

Kapitola I.: VZNIK ŽIVOTA

- 1.1. Kosmologická předepra
- 1.2. Představy o vzniku života
- 1.3. Moderní teorie chemické evoluce, Millerovy experimenty
- 1.4. Eigen, Wachterhauser, Martin a Russel
- 1.5. Vznik prvních živých systémů
- 1.5.1. Původní živé systémy byly na bázi proteinů
- 1.5.2. Původní živé systémy byly na bázi nukleových kyselin (genová hypotéza vzniku života)
- 1.5.2.1. Ribozymy
- 1.6. Koevoluce nukleových kyselin a proteinů, genetický kód
- 1.6.2. Vznik genetického kódu – najednou nebo postupně?
- 1.6.3. Selekcce in vitro a aptamery
- 1.6.4. Na scénu přichází transferová RNA
- 1.6.5. Nejstarší aminokyseliny a evoluce kodonů
- 1.7. První živé systémy byly založeny na jiném principu
- 1.8. Převzetí role média pro uchování genetické informace molekulami DNA
- 1.9. Panspermie
- 1.10. Extremofilové
- 1.11. Život na bázi jiných prvků a rozpouštědel

1.1. Kosmologická předepra

Podle současné kosmologické teorie je náš Vesmír jedním z mnoha vesmírů a vznikl ze singularity – podivného stavu nekonečné hustoty, extrémních teplot, křivosti a nekonečně malého rozměru, kde neplatí přírodní zákony. V důsledku fluktuace falešného vakua došlo k Velkému třesku před 15 miliardami, či lépe před 10-20 miliardami podle fyzika S. Hawkinga. Prostor, čas i hmota začaly existovat současně. Obecná teorie relativity poskytla poprvé solidní rámec pro kosmologii. Již **Albert Einstein** si uvědomil, že pomocí rovnic teorie relativity se vědci mohou pustit do modelování vesmíru a jeho vývoje. Ruský matematik **Alexander Friedman** a belgický kosmolog abbé **Georges Lemaître** zjistili, že rovnice teorie relativity nemají žádné statické řešení takže ve vesmíru musí docházet ke změně rozměrů s časem. V úvahu přicházelo tedy buď smršťování nebo rozšiřování vesmíru. Einstein se zpočátku domníval, že Friedman se mýlí, až po čase uznal jeho práci. Klíčovým objevem bylo zjištění **Edwina Hubblea** roku 1929, který zjistil, že ve spektrech galaxií dochází k posunu čar do červené oblasti. To bylo vysvětlitelné jedině tak, že čím jsou galaxie od nás dál, tím rychleji se od nás vzdalují, tedy že vesmír se rozpíná. Poskytl tak důkaz, že Einsteinova teorie ve Friedmanově nebo Lemaîtreově interpretaci je správná. Pokud se vesmír rozpíná, znamená to, že musel mít někdy začátek. Zásadní byla práce amerického fyzika ruského původu **George Gamowa** publikovaná 1948, která pojednávala o velmi raném žhavém vesmíru. Populárně ji pak vyložil v knize Pan Tompkins v říši divů. Teorie je známa jako teorie velkého třesku (big bang), jak ji hanlivě označil její oponent britský astrofyzik **Sir Fred Hoyle**, aby naznačil, že jde o mnoho povyku pro nic. Sám byl totiž propagátorem alternativní teorie ustáleného vesmíru (steady state universe). Název big bang se přesto ujal. Gamow také předpověděl, že pozůstatkem velkého třesku a počátečního velmi horkého a hustého stavu vesmíru by mělo být záření vesmírného pozadí. Jeho genialitu dokládá skutečnost, že v polovině 60. let bylo toto záření vesmírného pozadí objeveno americkými radioastronomy z Bellových laboratoří **Arno Penziasem**, a **Robertem Wilsonem** a bylo označeno jako reliktní záření. Jedná se o mikrovlnné záření o teplotě 2.7 stupňů kelvina a ve vesmíru homogenně rozptýleno. Vesmír, původně nepředstavitelně žhavý a hustý, dnes v rozředěném stavu zkomírá kousek nad absolutní nulou. Objev reliktního záření na jedné straně přispěl k přijetí myšlenky velkého třesku, ale na druhé straně existence spojitého záření vědcům znemožňuje dělat jakoukoliv pozorovací astronomii před okamžikem, kdy reliktní záření oddělilo od látky, asi před 300 000 let po velkém třesku. Před tímto časem reliktní

záření silně interagovalo s velmi žhavou látkou a neustále docházelo k rozptylu fotonů na tomto žhavém pozadí.

Je vesmír konečný nebo nekonečný? Má vesmír nějaké stáří, nebo je tu věčně? **Otázky, které si kladou dnes kosmologové**, si kladl člověk odpradáva a odpovídal si na ně v nejrůznějších mytologických příbězích. Stále zůstává otázkou zda se vesmír rozpíná parabolicky, hyperbolicky nebo elipticky. Také není jasné zda je otevřený nebo uzavřený. Pokud je otevřený, pak je časová budoucnost vesmíru nekonečná a bude se rozpínat věčně. Naopak, pokud je vesmír uzavřený, po nějaké době se rozpínání zastaví a začne docházet ke smršťování až vše skončí stejně jako to začalo v singularitě. Závěrečné singularitě se také někdy říká velký krach. Podle výpočtů by rozpínání mělo trvat ještě 70 miliard let a smršťování dalších minimálně 85 miliard let.

1.2. Představy o vzniku života

Vznik živé hmoty z anorganické hmoty popisují pojmy **abiogeneze a heterogeneze**. Abiogenezi se označuje vznik života z anorganických látek, zatímco heterogeneze z organických látek. Heterogeneze hledá původ života v mrtvé organické hmotě (např. vznik larev z rozkládajícího se masa, žížal z bláta atd.) byla přijímána Newtonem, Descartem bez námitek. **Vitalistická filosofie** dělila přírodu na živou a neživou a vyloučila myšlenku abiogeneze. Křesťanský názor na vznik života vyloučila myšlenku abiogeneze. Heterogeneze byla opuštěna poté co Francesco Redi dokázal, že se v mase umístěném pod mušelínovým krytem, který zabrání mouchám naklást vajíčka, larvy nikdy nevytvoří. Poslední ránu dostala heterogeneze od **L. Pasteura** (1864) a dalších, kteří prokázali, že mikroorganismy jsou přítomny v různých organických materiálech. V té době byla publikována práce Darwina, který předložil stejně obtížně vysvětlitelnou představu vzniku života abiogenezi.

Důležitou roli zde sehrála **redukcionistická teorie** odmítající rozdíl mezi anorganickou a organickou světem. Woehler syntetizoval v roce 1828 močovinu, první syntetickou organickou látku. Také bylo ukázáno, že energii lze během reakcí kvantifikovat beze zbytku a tak nezbyvá prostor pro žádnou vitalistickou sílu, živá hmota žádnou vitální sílu neobsahuje. Henry Bastian prosazoval myšlenku nepřetržité abiogeneze. Roku 1880 byla teorie klasické abiogeneze opuštěna.

Až po objevu základní struktury hmoty se teorie abiogeneze znovu objevila v moderní podobě jako **moderní teorie chemické evoluce** ve spojení se jmény Oparin, Haldane, Urey a Miller. Moderní definice abiogeneze se týká tvorby nejjednodušších forem života z primordiálních chemikálií v prostředí považovaném za podobné tomu, jaké bylo na Zemi v době jejího formování. Definice je zcela odlišná od definice Aristotelovy postulující opakovanou tvorbu složitých organismů. Rozdíl mezi klasickou a moderní teorií abiogeneze spočívá tedy ve frekvenci vzniku života a složitosti vznikajících organismů.

1.3. Moderní teorie chemické evoluce, Urey-Millerův experiment

Počátkem **moderního pojetí** chemické evoluční teorie bylo roku 1924 tvrzení Alexandra Ivanoviče Oparina, že složité molekulární struktury a funkce živých soustav se vyvinuly z jednodušších molekul, které existovaly již na prebiotické Zemi. Haldane 1928 věřil, že z primordiální polévky vzešel život. Podle něj hrálo rozhodující úlohu ultrafialové záření, které působilo na prebiotickou atmosféru a zvyšovalo koncentraci cukrů a aminokyselin v oceánu. Harold Urey vycházel ze zjištění, že atmosféry všech planet sluneční soustavy jsou bohaté na vodík a tedy redukující a tudíž příznivé pro tvorbu organických sloučenin. Navrhoval, že atmosféra Země se stala oxidativní až v průběhu evoluce.

Laureát Nobelovy ceny Harold Urey a jeho diplomant Stanley Miller provedli v roce 1953 experiment - tzv. **Urey-Millerův experiment** – v němž simulovali podmínky redukující atmosféry Země a podařilo se jim tak syntetizovat z anorganických látek aminokyseliny.

Modelová atmosféra obsahovala směs plynů metanu, amoniaku, vodíku a vodní páry. Aparatura z varného skla se skládala z malé varné baňky naplněné vodou, komory s wolframovými elektrodami, mezi nimiž docházelo k jiskrovému výboji, chladiče a sifonu s vodou, který sloužil ke shromažďování produktů. Na dávné Zemi sice nebyla vroucí moře, var však zajišťoval cirkulaci plynů. Sifon s vodou a také varná baňka představovaly moře a jezera. Miller napsal: “Koncem týdne jsem odebral roztok a po drobné úpravě jsem provedl dvourozměrnou papírovou chromatografií... Tři z detegovaných aminokyselin byly dosti koncentrované .. jsem identifikoval jako glycin, alfa-alanin a beta-alanin.“ Základní prebiotický experiment byl následně proveden dalšími badateli s mnoha obměnami. Ve většině experimentů byla použita v podstatě stejná technika. Byla vytvořena atmosféra rozmanitého složení, v níž byly použity následující plyny: metan, etan, dusík, vodní pára, vodík, oxid uhelnatý, oxid uhličitý a sirovodík. Pokud byl vyloučen kyslík, vznikaly aminokyseliny a jiné organické sloučeniny.

V modifikovaných experimentech bylo místo elektrod použita například pícka vytápěná na 900-1100°C (Sidney Fox). Tyto experimenty známé jako syntéza teplem nebo **pyrosyntéza** měly simulovat situaci, kdy docházelo k uvolňování sopečných plynů ze štěrbin a průduchů ve žhavých vyvřelých horninách. Plyny se nacházely v horké zóně jen zlomek vteřiny, pak byly rychle ochlazeny. V některých modifikacích („no-flow“) se ohřívají na 200-1000°C na 15 minut. Množství tepelné energie produkované v současnosti sopečnou činností je srovnatelné s energií produkovanou blesky. Touto metodou bylo syntetizováno 12 proteinogenních aminokyselin (Harada a Fox 1964), podle jiných autorů jen 3 aminokyseliny. Modifikací je Fischer-Tropschova metoda využívající katalyzátorů na bázi kovu nebo hlíny, která se používá i v průmyslové výrobě uhlovodíků z oxidu uhelnatého a vodíku.

Další modifikací Urey-Millerova experimentu používaly např. **UV-záření**, to je považováno za hlavní zdroj energie na prebiotické Zemi. Další pokusy využívaly tlakové vlny a ukázaly, že jsou velmi účinné při syntéze aminokyselin (glycin, alanin, valin, leucin). Tlakové vlny vznikaly při bouřkách nebo průletech meteoritů. Zdroji energie byly zajisté i kosmické záření, radioaktivita a sluneční vítr. Při výše uvedených prebiotických experimentech bylo získáno 19 ze 20 proteinogenních aminokyselin, všech 5 heterocyklických bází tvořících nukleové kyseliny a hlavní cukry včetně glukózy, ribózy a deoxyribózy.

Názor vědecké veřejnosti na dávnou atmosféru se v současné době mění. Nyní je široce přijímána představa o podstatně **neutrálnější prebiotické atmosféře** složené z CO₂, N₂, H₂O a snad i 1% H₂. Je sporné, zda dávná Země a její atmosféra mohly být opravdu oxidující. Pokusy s prebiotickou atmosférou jsou nyní přehodnocovány ve světle těchto představ neutrální a snad dokonce oxidující atmosféry.

Organické sloučeniny se na Zemi mohly dostat i z **meziplanetárního** či mezihvězdného prostoru. Bylo zjištěno, že komety a meteority obsahují organické molekuly. V roce 2004 byly detegovány stopy polycyklických aromatických uhlovodíků v mlhovině, což byl objev nejsložitější molekuly nalezené ve vzdáleném vesmíru.

1.4. Eigen, Wachterhauser, Martin a Russel

Základním problémem teorie vzniku života je otázka polymerizace monomerů tvořených jednoduchými organickými sloučeninami za vzniku složitějších struktur. Hydrolýza polymerů nebo oligomerů je zvýhodněna před kondenzací monomerů do polymerů. Polymerizace není přímočarý proces. Během abiotických experimentů se tvořily také látky fungující jako inhibitory polymerizace jednoduchých organických látek. Důležitá zde je i otázka homochiralita.

Významný posun v řešení otázky vzniku života představuje teorie **hypercyklů** Manfreda Eigena z Max Plankova institutu (1970). Aplikuje nerovnovážnou termodynamiku na evoluci biologických systémů. Systémy jsou schopné samostatné replikace, nacházejí se v rovnovážném stavu, sestávají z mnoha informací uchovávaných jednotek, pravděpodobně na bázi RNA, které produkují enzymy katalyzující tvorbu jiných jednotek v celé řadě, přičemž poslední jednotka katalyzuje tvorbu jednotky první a tím se cyklus uzavírá. Kaplan spočítal, že cyklus potřebuje 20-40 funkčních bílkovin (po 70-100 aminokyselinách) a podobný počet nukleových kyselin. Zabýval se také frekvencí mutací jednotlivých prvků hypercyklu, jejich selekcí, rychlostí jejich evoluce, objevováním se nových prvků cyklu. Silnou podporou teorie hypercyklů byl objev katalytických schopností RNA – ribozymů.

Další posun v chápání počátků života představuje teorie Guntera Wachterhausera z roku 1980 nazývaná jako „**teorie světa sulfidu železa**“. Narozdíl od experimentů Millera, kde zdrojem energie byly vnější (výboje, UV záření), se zde počítá s využitím vnitřní energie sulfidů železa nebo jiných minerálů jako je pyrit. Tato energie je uvolněna redoxními reakcemi a je využita na tvorbu monomerů organických molekul i jejich polymerizaci. Vznikly tak primitivní metabolické cykly a je možné, že takové systémy se mohou vyvinout do autokatalytických soustav samoreplikujících se a metabolicky aktivních jednotek předcházejících živým formám. Podle Wachterhausera tento časný metabolismus předcházela genetice. Zvláštní postavení přiřadil Wachterhauser kyselině octové, která je i dnes klíčovou molekulou v buňce. V roce 1997 Wachterhauser a Claudie Huberová smíchali CO, H₂S, NiS, FeS při 100°C a získali aminokyseliny a dokonce i peptidy.

Nejnovější modifikací teorie světa sulfidů železa je teorie W. Martina a M. Russela z roku 2002, podle níž život vznikl v prostředí **podmořských komínů**. Podmořské komíny jsou hydrotermální prameny nacházející se na dně oceánů v hloubkách kolem 2000 metrů. Poprvé byly nalezeny roku 1977 u Galapág. Jedná se o otvory o šířce stovek metrů, z nichž vychází přehřátá voda bohatá na minerály, především pak na sulfidy, která se při styku s vodou oceánu ochlazuje a krystalizuje, což vytváří černé zbarvení, a nakonec se usazuje na dně oceánů.

1.5. Vznik prvních živých systémů

První živé systémy se vyznačovaly schopností replikace, proměnlivostí a dědičností. Cesta od jednoduchých organických komponent po systémy vykazující výše uvedené atributy života mohla být značně složitá a i dnes je pouze předmětem spekulací. Zatímco dnešní živé organizmy jsou založeny na principu koexistence nukleových kyselin a proteinů, panují spory o to, jaký charakter měly první živé systémy, zda byly na bázi nukleových kyselin, proteinů nebo zda od počátku docházelo k jejich koexistenci, anebo byl použit zcela odlišný princip.

1.5.1. Původní živé systémy byly na bázi proteinů

Jedná se o historicky starší skupinu názorů, jejímž nejstarším reprezentantem byl A.I Oparin se svou teorií koacervátů (1928). Novějšími zastánci byli Fox s teorií mikrosfér, Wachterhauser s teorií sulfidů železa (1980) a Christian de Duve s chemií thioesterů (1990). Tyto systémy vykazují růst (koacerváty) a metabolismus (zejména mikrosféry), nejsou však schopny reprodukce a dědičnosti. Takto primitivní metabolismus mohl představovat prostředí pro pozdější zavedení RNA a její replikaci.

Koacerváty jsou primitivními modely buňky ohraničené semipermeabilní membránou, která umožňuje hromadění produktu nějaké reakce, růst a následné dělení koacervátu. Struktury typu koacervátů mohou vznikat v koloidních roztocích. Problémem je vznik a fixace enzymaticky aktivních molekul uvnitř koacervátu, které se dělením koacervátů ředí.

Hypotéza **mikrosfér** se snaží zodpovědět otázku původu enzymatických molekul. Mikrosféry vznikají z tzv. protenoidů, což jsou polymery vzniklé kondenzací aminokyselin. Pořadí

aminokyselin v těchto polymerech je ale náhodné. Některé z nich však mohou vykazovat určitou katalytickou funkci.

1.5.2. Původní živé systémy byly na bázi nukleových kyselin (genová hypotéza vzniku života)

Podle této hypotézy byly původními strukturami, které vykazovaly znaky živých soustav, nukleové kyseliny nebo látky jim podobné. Nukleové kyseliny nenesly ještě žádnou informaci ani neměly metabolickou aktivitu, byly však schopny autoreplikace. Tato hypotéza, která má v současnosti nejvíce zastánců, předpokládá, že původním polymerem byla RNA, proto se také hovoří o hypotéza RNA světa (Gilbert 1986).

Tuto hypotézu velmi podpořil objev katalyticky aktivních molekul RNA – **ribozymů** (Orgel 1986), za jejichž objev dostali Tom Cech a Sidney Altman 1989 Nobelovu cenu. Postupně se ukázalo, že ribozymy jsou schopny se replikovat, prodlužovat i spojovat jiné molekuly RNA nebo provádět syntézu peptidů. Molekuly RNA tedy mohou jak uchovávat tak i realizovat genetickou informaci. Až v průběhu evoluce převzala funkci média pro uchování genetické informace molekula DNA, která je pro tuto funkci podstatně vhodnější. Úlohu realizátora genetické informace převzaly od ribozymů proteiny, vyznačující se vyšší katalytickou flexibilitou, účinností, přesností i širší spektra katalyzovaných reakcí. Ribozymem je vlastně i ribozóm. Je pozoruhodné, že i klíčová reakce tvorby proteinů, tvorba peptidické vazby, spojující jednotlivé aminokyseliny, je uskutečňována molekulou RNA, tedy ribozymem. Ribozymy jsou považovány za pravděpodobné relikty z období, kdy nukleové kyseliny zajišťovaly jak uchování tak i realizaci genetické informace, relikty ze světa bez proteinů. Podobnými relikty jsou zřejmě i koenzymy, neproteinové komponenty dnešních proteinů, často odvozené z nukleotidů. Jsou klíčové pro určení substrátové specifity, což bylo kritické právě v počátečních stádiích evoluce. Molekuly RNA dodnes hrají centrální úlohu ve všech hlavních stupních realizace genetické informace. Molekuly mRNA nesou přepis genetické informace z místa jejího uložení v jádře do místa syntézy proteinů v ribozómech, malých nukleoproteinových útvech nacházejících se v cytoplasmě. Samotné ribozómy jsou tvořeny vedle proteinů i několika typy molekul RNA, tzv. rRNA (ribozomální RNA). Aminokyseliny jsou dopravovány na povrch ribozómů, kde probíhá syntéza proteinů, prostřednictvím molekul tRNA.

1.5.2.1. Ribozymy

Introny I. typu byly poprvé objeveny v pre-rRNA u prvoka Tetrahymena. Nacházejí se v genech pro rRNA, tRNA i v pre-mRNA. Byly nalezeny u mitochondriálních hub, chloroplastech řas a také u bakteriofágů. Při jejich sestřihu dochází ke dvoukrokové transesterifikaci, První je indukována ne nukleotidem ležícím uvnitř intronu, ale volným nukleosidem nebo nukleotidem jako iniciačním nukleofilem, guanosinem nebo guanosin-mono-, di- nebo trifosfátem. Druhá transesterifikace je indukována 3-OH skupinou ležící na konci exonu. Uvolněný exon je lineární, ale mnohé v průběhu degradace podléhají dalším transesterifikacím vedoucím k cirkulárním produktům. Introny I. typu vytvářejí výrazné sekundární a terciární struktury. Pomocí rentgenové difrakce byla zjištěna přítomnost katalytického jádra tvořeného dvěma doménami. Někdy je stabilita intronů zvýšena nekatalytickými proteinovými faktory, které se na introny váží. Introny I. typu obsahují ORF kódující enzym maturázu účastnící se sestřihu a tzv. „homing endonukleázu“ důležitou pro mobilitu. Kromě toho se sestřihu účastní proteiny kódované hostitelem.

Introny II. typu se nacházejí v genech pro rRNA, tRNA i v pre-mRNA v genomech organel hub, rostlin a prvoků v mRNA bakterií. Sestřih rovněž zahrnuje dvoukrokovou transesterifikaci, avšak iniciačním nukleofilem je adenosin. Introny kódují enzymy potřebné pro sestřih a mobilitu – RNA maturázu, reverzní transkriptázu, endonukleázu, a také se

využívá enzymatický aparát hostitele. Existují dvě podskupiny, typ IIA a IIB, lišící se konsensním místem sestřihu, vzdáleností adeninu od místa sestřihu, určitými terciárními interakcemi a fylogenezí otevřených čtecích rámců.

Introny III. typu jsou velmi krátké introny podobné intronům II. typu, vyskytují se v pre-mRNA plastidů krásnooček. Někdy se vyskytují jako tzv. „twintrony“ – introny uvnitř jiných intronů.

Ribozymy „hammerhead“ a „hairpin“. Ribozymy typu „hammerhead“ jsou malé katalytické RNA, schopné samy se štěpit. Jedná se o nejmenší známou formu katalytické RNA. Dostaly jméno díky kladivovitému tvaru sekundární struktury, kterou vytváří. Jsou totiž tvořeny třemi vlásenkami. Účastní se replikace RNA viroidů a satelitů. Tento typ ribozymu lze připravit *in vitro* tak, že se nasyntetizují dva řetězce, spojí se dohromady a poté lze pozorovat samoštěpící reakci. Ten řetězec, který je štěpen je považován za substrát, štěpící řetězec je enzymem. Od ribozymů „hammerhead“ jsou odvozeny malé vlásenkové („hairpin“) ribozymy, které jsou schopny se navázat na cílovou molekulu RNA na bázi komplementarity bází a štěpit ji. Byly připraveny syntetické ribozymy tohoto typu a použity k cílenému štěpení virových molekul RNA, např. HIV-1.

1.6. Koevoluce nukleových kyselin a proteinů, genetický kód

Podle této hypotézy probíhala evoluce nukleových kyselin a proteinů již od počátku společně. Klíčovou rolí v životních procesech má proteosyntéza založená na existenci genetického kódu. Genetickým kódem rozumíme soubor pravidel, podle nichž se určitému pořadí nukleotidů v DNA určuje pořadí aminokyselin v proteinech.

1.6.1. Degenerace kódu a odchylky od standardního kódu

Jak může být jazyk čtyř písmen, jazyk DNA, přeložen do jazyka 20 slov, řeči proteinů? Již zmiňovaný fyzik George Gamow ještě dávno před objevem genetického kódu konstatoval, že dinukleotidový kód by nestačil (kódoval by pouze $4^2 = 16$ aminokyselin), a navrhl tudíž kód tripletový. Jeho předpověď byla správná. Vzhledem k tomu, že každý kodon je vždy tvořen tripletem bází a bází jsou čtyři druhy, kodonů je celkem 64 ($=4^3$). Z toho 3 kodony nekódují aminokyselinu, nýbrž určují ukončení tvorby proteinu. Označují se jako terminační kodony nebo jako stop-kodony. Na druhé straně, aminokyselin kódovaných zbývajícími 61 kodony je pouze 20. Je tedy zřejmé, že některé aminokyseliny jsou kódovány více kodony. V tom spočívá tzv. degenerace genetického kódu. Např. leucin, arginin a serin jsou kódovány každý dokonce šesti kodony. Dvě aminokyseliny jsou určovány pouze jediným kodonem, jedna z nich, methionin, označuje začátek transkripce. Kodony pro stejnou aminokyselinu se liší zpravidla ve třetí pozici kodonového tripletu. Proto mnoho mutací nevede k záměně aminokyseliny, jedná se o tzv. synonymní mutace.

Vědci byli fascinováni skutečností, že tentýž kód používají viry, bakterie i člověk. Hovořilo se proto zpočátku o „univerzálním“ kódu, svědčícím o jednotném organizačním principu všeho živého, v souladu s Darwinistickými představami vývoje života od jednodušších forem ke složitějším. Velkým překvapením bylo zjištění, že v buněčných organelách mitochondriích je používán kód vyznačující se odchylkami od „univerzálního“ kódu. Mitochondrie byly původně volně žijící bakterie, než se v průběhu evoluce staly součástí eukaryontních buněk. Z oněch dob si však uchovaly část původní genetické informace. Postupně byly nalezeny různé odchylky od genetického kódu u některých bičíkovců, kvasinek, bakterií i archebakterií. Ukázalo se tedy, že kód není zcela univerzální a nyní se proto označuje jako kód „standardní“. Pád představy neměnnosti kódu oslabilo také představu, že kód vznikl jednou provždy a poté se již dále nevyvíjel.

1.6.2. Vznik genetického kódu – najednou nebo postupně?

Přestože genetický kód byl rozluštěn již před čtyřmi desetiletími, stále zůstává záhadou obklopenou řadou otázek. Vznikl genetický kód najednou anebo se postupně vyvíjel? Bylo na počátku všech současných 20 aminokyselin z nichž se dnes sestavují proteiny, anebo si první proteiny vystačily s menším počtem tehdy dostupných aminokyselin? Na jednom konci stojí hypotéza označovaná jako „frozen accident“ (zmražená náhoda), předpokládající, že kód vznikl jednou a náhodně a již se dále neměnil, neboť jakékoliv odchylky od něj by způsobily mutace v proteinech, které by byly pro stávající organizmus letální. Vzhledem k tomu, že existují i alternativní genetické kódy, muselo by těchto okamžiků „zamrznutí“ kódu být více, což se zdá málo pravděpodobné. V současnosti převažuje názor, že genetický kód se postupně vyvíjel. **Představa evoluce** genetického kódu je podporována **řadou důkazů**. Analýzy ukázaly, že kód je vytvořen tak, že minimalizuje dopad chyb. To znamená, že v mnoha případech záměna nukleotidu v kodonu nevede k záměně aminokyseliny. Takové optimální nastavení kódu lze vysvětlit tak, že kód prošel postupnou selekcí. Dále bylo zjištěno, že aminokyseliny syntetizované stejnými biochemickými dráhami jsou kódovány podobnými kodony. Zde se nabízí představa, že časný kód byl jednodušší (dinukleotidový) a kódoval méně aminokyselin, a až postupně, jak v tehdejších podmínkách vznikaly další aminokyseliny, kód expandoval a přiřazoval podobným aminokyselinám podobné kodony. Podle některých představ původní kód obsahoval pouze báze G a C. Původní velikost kódu i počty a typy aminokyselin (viz níže), stejně jako doba a průběh evoluce kódu jsou stále záhadou.

1.6.3. Selektce *in vitro* a aptamery

Snad nejvýznamnější podporu evoluce genetického kódu poskytly experimenty „selektce *in vitro*“. Při těchto pokusech se smíchají molekuly syntetických RNA nebo DNA s různými jinými molekulami a opakovaně se vybírají látky s nejsilnější vzájemnou vazbou. Tyto krátké molekuly nukleových kyselin se specifickou afinitou k určitým molekulám se označují jako **aptamery**. V experimentech selektce *in vitro* se podařilo získat aptamery RNA, které se vázaly např. na aminokyselinu arginin. Nejpozoruhodnější bylo zjištění, že vazebná místa pro arginin obsahovala opakující se triplety argininových kodonů. Aminokyseliny tedy mohou přímo fyzicky interagovat se svými kodony. Zdá se, že přímé interakce kodonů a aminokyselin hrály roli při formování prvního kódu. Složitý translační mechanismus zahrnující tRNA je zřejmě až pozdějším výdobytkem. Aminokyseliny se vázaly i na DNA aptamery, což dokazuje, že rozhodující jsou báze a ne cukrfofosátová páteř. To vedlo některé badatele k myšlence, že páteř mohla být v původních informačních molekulách tvořena peptidy místo fosfátů. Tyto molekuly se označují jako PNA. Mimořádně, uvedenými selekčními experimenty se podařilo připravit i enzymaticky aktivní molekuly DNA, tzv. DNAzomy.

Pokusme se zrekonstruovat **vznik a vývoj genetického kódu**. Na počátku, ještě ve světě RNA, byly první peptidy zřejmě tvořeny přímou vazbou aminokyselin na templátovou RNA bez potřeby enzymatické katalýzy. Pořadí aminokyselin v těchto peptidech bylo převážně náhodné a o jejich úspěšnosti rozhodovalo to, jak obstojí v přírodním výběru. Fáze této nekódované syntézy peptidů byla později nahrazena kódovanou syntézou. První kód byl zřejmě dinukleotidový a kódoval menší počet aminokyselin než dnešní tripletový kód. Postupně došlo ke zvýšení počtu aminokyselin na bázi jejich metabolické (biochemické) příbuznosti a kód se změnil na tripletový.

1.6.4. Na scénu přichází transferová RNA

Zřejmě již ve fázi dinukleotidového kódu přicházejí na scénu molekuly tRNA a enzymy aminoacyl-tRNA-syntetázy (aaRs) a do systému vstupuje mRNA. Aminoacyl-tRNA-syntetázy připojují aminokyseliny k jednotlivým tRNA. Patří k nejstarším proteinům na Zemi.

Jejich funkci předtím zřejmě plnily ribozymy. Začleněním tRNA do translačního aparátu byly odstraněny přímé interakce aminokyselin s kodony a byl umožněn určitý stupeň optimalizace přiřazování kodonů. Zajímavou vlastností molekul tRNA je jejich schopnost vytvářet složité sekundární a terciární struktury, jedná se o známý tvar jetelového listu. Na jeden konec tRNA se váže aminokyselina. Na druhém konci, vzdáleném 7,6nm, se prostřednictvím tří nukleotidů tvořících antikodon tRNA váže na komplementární trojici nukleotidů (kodon) molekuly mRNA, která představuje přepis genu. Molekuly tRNA nesoucí jednotlivé aminokyseliny se řadí vedle sebe podle pořadí kodonů v mRNA a aminokyseliny se spojují za tvorby proteinu. Každému kodonu odpovídá jedna tRNA (obsahující specifický antikodon), přičemž některé tRNA nesou stejnou aminokyselinu. Konec tRNA, na který se váží aminokyseliny je vždy zakončen bázemi CCA.

U některých bakteriálních nebo rostlinných virů (bakteriofág Q β , virus CaMV), jejichž genetická informace je uložena v molekulách RNA vznikají struktury podobné dnešním molekulám tRNA, které hrají klíčovou roli v replikaci. Zdá se, že tyto struktury dříve hrály důležitou roli v nezákladnějším procesu živých systémů, jímž je replikace, jako specifická značka určující, kde má replikace začít. Až postupně převzaly úlohu v proteosyntéze. Předkové tRNA tak možná představovali jedny z nejstarších biomakromolekul.

1.6.5. Nejstarší aminokyseliny a evoluce kodonů

Existují různé názory na to, které kodonové triplety a které aminokyseliny jsou nejstarší. K nejznámějším badatelům v této oblasti patří nositel Nobelovy ceny Manfred Eigen, jakož i japonský vědec Susumu Ohno, autor teorie evoluce genovou duplikací. Zde se zaměříme na pozoruhodné objevy Edwarda Trifonova z Izraele, podle jehož představ na počátku existovaly triplety GCX, GXU a XCU (X je libovolná báze). Tyto kodony byly odvozeny vždy jedinou mutací od konvenční sekvence GCU. V této souvislosti je zajímavé, že ke spontánní expanzi trinukleotidových repetíci DNA, jež stojí v pozadí některých nemocí, dochází právě v sekvencích (GCT) $_n$ a (GCC) $_n$. Při pohledu do tabulky současného genetického kódu zjistíme, že tyto nejstarší kodony kódují aminokyseliny alanin, kyselinu asparagovou, glycin, prolin, serin, threonin a valin. Znamená to tedy, že zde máme kandidáty na první aminokyseliny? Snad ano, neboť uvedené aminokyseliny jsou jak chemicky nejjednodušší, tak byly syntetizovány ve známém experimentu Ureyho a Millera (viz výše). To by však znamenalo, že přiřazení kodonů aminokyselinám se od počátku nezměnilo. Předpoklad, že některé aminokyseliny jsou starší než jiné, vedl vědce k nápadu srovnat jejich zastoupení v evolučně starých a mladých proteinech. Ukázalo se, že staré proteiny obsahují více časných aminokyselin než proteiny mladší. Tzv. „glycinové hodiny“ založené na měření obsahu glycinu v proteinech umožňují podle Edwarda Trifonova dokonce datovat evoluční události. Trifonov se pokusil na bázi chronologie aminokyselin rekonstruovat i pořadí, v němž se objevovaly v průběhu evoluce jednotlivé kodony. Všiml si, že kodony pro nejstarší aminokyseliny alanin a valin (GGC a GCC) se mohou vzájemně párovat na principu komplementarity, a co víc, tento pár kodonů je termodynamicky nejstabilnější ze všech možných párů. Triplety dalších aminokyselin – valinu (GAC) a kyseliny asparagové (GUC) jsou opět komplementární. Tak se lze dopracovat až k nejmladším aminokyselinám, přičemž nové kodony se objevovaly vždy v komplementárních párech. To mimo jiné svědčí o tom, že první proteiny byly zřejmě kódovány současně oběma komplementárními vlákny replikující se nukleové kyseliny.

1.7. První živé systémy byly založeny na jiném principu

Kromě uvedených představ o vzniku života existují i alternativní hypotézy. Podle nejznámější z nich, kterou vyslovil na počátku 80. let Cairns-Smith (1982), byly médiem pro uchování genetické informace **látky typu jílu**. Jíly totiž vytvářejí krystaly, které jsou schopny

produkovat kopie sebe sama a navíc mutovat (generovat drobné poruchy struktury). Různé formy jsou pak různě úspěšné v daném prostředí (nabalují na sebe další vrstvy, vysychají či se rozdrobují na menší částice, které infikují další lokality) a může docházet k období přírodního výběru. Spekuluje se o tom, že život založený na jílech mohl předcházet současnému životu na bázi uhlíku nebo alespoň fungovat jako matrice a katalyzátor reakcí vedoucích k dnešním formám života. Je však obtížné si představit, jak mohlo dojít k přechodu od systémů uchovávání genetické informace anorganickými látkami typu jílu ke genetickým systémům na bázi nukleových kyselin.

Podle **teorie „hluboké horké biosféry“** navržené Thomasem Goldem v roce 1990 se první život nevyvinul na povrchu Země, ale několik kilometrů pod zemským povrchem. Je známo, že bakterie se v současné době nacházejí až do hloubky několika kilometrů. Tato skutečnost také nastoluje otázku, zda i na jiných planetách naší sluneční soustavy se nenachází primitivní formy života.

1.8. Převzetí role média pro uchování genetické informace molekulami DNA

Jak bylo uvedeno výše, nejranější formy života zřejmě obsahovaly samoreplikující se genomy tvořené molekulami RNA. Jejich vznik se datuje do období před 4 miliardami let. RNA je schopna vlastní replikace bez přítomnosti enzymů, dokáže sebe sama modifikovat, tj. vystřihovat ze sebe určité části a rozdělená vlákna opět spojovat, a dokonce syntetizovat peptidové vazby. Klíčovým evolučním procesem bylo zřejmě převzetí genetických funkcí molekulou DNA, přičemž klíčovou roli hrál proces **reverzní transkripce**. Tento starobylý proces se významně podílí na tvarování velikostí a struktury genomů dodnes. Dokladem toho je i existence retroelementů, mobilních genetických entit používajících reverzní transkripci ke své reprodukci (viz kapitoly o evoluci genomů a mobilních elementech). O tom, že jsou relikty dávného světa RNA, které zřejmě stály u zrodu života, svědčí jak jejich konzervativní struktura a replikační cyklus, tak jejich všudypřítomnost. Zajímavý je i fakt, že thymin (báze v DNA) se biochemicky syntetizuje z uracilu (báze RNA).

Současně s převzetím genetických funkcí **molekulou DNA** došlo k oddělení katalytických funkcí, které převzaly proteiny. Molekula DNA je chemicky stabilnější než RNA, i dnešní molekuly DNA jsou delší než RNA. Skupina ribózy je velmi reaktivní, což je v souladu s původním fungováním RNA jako enzymu, je však nežádoucí u media uchovávajícího informaci. Důležitá je i vyšší flexibilita DNA oproti rigidním molekulám RNA. Důsledkem toho je fakt, že DNA může nabývat v závislosti na vnějším prostředí (hydratace, ionty, pH) různých prostorových struktur, které mohou mít funkční relevanci. Zásadní vlastností je však schopnost DNA se replikovat, což umožňuje komplementarita bází této dvouřetězcové molekuly. Rigidita původních ribozymů byla také zřejmě příčinou toho, že katalytickou funkci převzaly mnohem flexibilnější proteiny, což zásadně rozšířilo spektrum biochemických reakcí.

1.9. Panspermie

Zajímavá je i koncepce panspermie, podle níž byl život na Zemi přenesen odjinud z vesmíru, např. v podobě mikrobů. Tato hypotéza však problém vzniku života neřeší, pouze jej přesouvá jinam. Podle této teorie vznikl život kdysi někde ve vesmíru a od té doby se přenáší z místa na místo. Takto byl život kdysi přenesen i na Zemi, kde se uchytil a vyvíjel. Tímto se rozšířil časový interval pro vznik života i rozpětí možných podmínek prostředí. Poprvé lze najít myšlenku panspermie v díle řeckého filosofa Anaxagora, v moderním pojetí se jí zabývá poprvé Hermann von Helmholtz 1879, dále ji pak prosazovali Sir Fred Hoyle a Chandra Wickramasinghe (1915-2001). Slavný objevitel struktury DNA Francis Crick vystoupil s představou, že inteligentní bytosti z jiné planety mohly vyslat před 4 miliardami let k Zemi

vesmírnou loď plnou mikrobů. Tato představa není příliš fantastická, vzhledem i dnes vědci uvažují o kolonizaci jiných planet.

V této souvislosti je zajímavé, že v kometách byly nalezeny organické látky. Byl prokázán meziplanetární přenos materiálu, konkrétně když na Zemi dopadl meteorit pocházející z Marsu. Mimoto existují mikroorganismy extrémně odolné vůči záření. Na Zemi dnes dopadá více než sto tun kosmického materiálu ročně a v minulosti bylo toto číslo ještě vyšší. Zajímavý je objev ohromného množství organických látek – aromatických polycyklických uhlovodíků - ve vesmíru, především v okolí mrtvých hvězd. Bylo také objeveno velké množství glycinu, jednoduché aminokyseliny, v mezihvězdném prachu. Pozoruhodné je i to, že aromatické polycyklické uhlovodíky obsahují také dusík, podobně jako nukleové kyseliny. Toto značné množství organických látek jako stavebních kamenů života ve vesmíru zvýšilo pravděpodobnost vzniku života.

1.10. Extremofilové

Vznik života v extrémních podmínkách podmořských sopek jakož i přenos živých organizmů z vesmíru je podporován existencí různých druhů mikroorganismů označovaných jako extremofilové. Jedná se zejména o bakterie značně odolné vůči radioaktivnímu záření jako je *Deinococcus radiodurans*. Tato bakterie vykazuje 37% životaschopnost při dávce 10 000 Gray, zatímco člověk umírá při dávce 10 Gray a *E. coli* 60 Gray. *D. radiodurans* je schopný života např. v jaderném reaktoru. Kuriózní je příklad bakterie *Streptococcus mitis*, která byla zavlečena na Měsíc roku 1967 lodí Surveyor3 a po 31 měsících na povrchu Měsíce byla lodí Apollo12 dopravena jako živá zpět na Zemi. Bakterie žijí i několik kilometrů pod ledovým pokryvem v Antarktidě, prostředí velmi podobné tomu, které se nachází v ledových kometách. Život v podobě bakterií i jiných organizmů byl objeven i v okolí podmořských sopek, kde teploty překračují 100°C a kde je vysoký tlak v hloubkách kolem 10km. Dalšími příklady extremofilů jsou bakterie žijící uvnitř skal (endolithové), v kyselém nebo naopak zásaditém pH (acidofilové resp. alkalifilové), ve vysoké koncentraci solí (halofilové), bez kyslíku (anaerobové), v prostředí těžkých kovů jako je měď, kadmium, arsen či zinek (metalotolerantní bakterie), žijící v prostředí vysokého tlaku (piezofilové či barofilové).

1.11. Život na bázi jiných prvků a rozpouštědel

Existující život je založen na sloučeninách obsahujících uhlík a na vodě jako na rozpouštědle. Spekuluje se však i o možnosti, že život někde jinde by mohl být založen na jiném prvku, nejčastěji se uvažuje o křemíku, a na jiných rozpouštědlech. První, kdo spekoval o křemíku jako o alternativním prvku, na němž by mohl stát život, byl již Julius Schneider 1891. Jeho myšlenku rozšířil Emerson Reynolds roku 1893, který dával do souvislosti především značnou tepelnou stabilitu křemíku se schopností organismů na bázi křemíku žít při vysokých teplotách (termofilové). Křemík je ve vesmíru běžným prvkem. V periodické tabulce leží hned pod uhlíkem a má dost podobnou chemii, např. podobně jako uhlík váže čtyři vodíky za vzniku silanu SiH_4 , tvoří také dlouhé polymery, silikony, v nichž se střídá křemík s kyslíkem podobně jako uhlík s kyslíkem tvoří polyacetyly.

Křemík má však i řadu nevýhod oproti uhlíku. Je větší a proto hůře tvoří dvojně a trojně vazby, dlouhé řetězce tvořené křemíkem jsou méně stabilní oproti stabilitě dlouhých uhlovodíků. Silany jsou velmi reaktivní s vodou a proto se dlouhé řetězce snadno rozkládají. Počet uhlíkatých látek objevených ve vesmíru byl zhruba desetkrát vyšší než počet křemíkových látek a je podobný poměru čistého uhlíku oproti křemíku (10:1).

Dalšími prvky, o kterých se uvažuje, je fosfor. Ten je schopen podobně jako uhlík tvořit dlouhé polymery, je však dost reaktivní, mnohem stabilnější je v kombinaci s dusíkem. Vazby P-N mohou vytvářet nejrůznější sloučeniny včetně cyklických. Síra může rovněž tvořit dlouhé molekuly, je zde však rovněž problém s vysokou reaktivitou podobně jako u křemičitanů a

fosforu. Některé bakterie využívají síru místo kyslíku. Rovněž o chlóru se uvažuje jako o biologické alternativě kyslíku.

Výhodou vody jako rozpouštědla je mimo jiné značná rozsah teplot, při nichž je v kapalném stavu a velké množství látek, které se ve vodě rozpouštějí. Existují však i další látky s podobnými vlastnostmi. Nejčastěji se v této souvislosti mluví i čpavku, rozpouští se v něm většina organických látek podobně jako ve vodě a navíc také některé kovy. Je však kapalný při teplotách minus 79°C až minus 33°C při normálním atmosférickém tlaku. Pokud však tlak vzroste např. na 60 atmosfér, taje čpavek při minus 77°C a vře až při 98°C. Podmínky, při nichž je čpavek kapalný, panují například na jupiterově měsíci Titanu, hluboko pod jeho povrchem.

Kapitola II.: RELIKTY SVĚTA RNA

- 2.1. Důkazy světa RNA
- 2.2. Vznik světa RNA
- 2.3. Evoluční osud prvních RNA katalyzátorů
- 2.4. tRNA - od replikace k proteosyntéze
- 2.5. Ribozóm
- 2.6. Sestřih, snRNA, snoRNA
- 2.7. Maturace tRNA a RNázaP
- 2.8. Signální rozpoznávací částice a srpRNA
- 2.9. Editace RNA a řídicí RNA (gRNA)
- 2.10. Telomeráza a telomerická RNA
- 2.11. Vault RNA (vRNA)
- 2.12. tmRNA u prokaryot
- 2.13. Malé nekódující RNA a RNA interference – miRNA, siRNA, smRNA aj.
- 2.14. První RNA organizmus: Riborgis Eigensis
- 2.15. Dnešní viry a viroidy – nejpodobnější časným replikonům
- 2.16. Jsou starobylější prokaryota nebo eukaryota?

Dnes je všeobecně přijímáno, že současným živým systémům, jejichž genetická informace je na bázi molekul DNA, předcházely organizmy na bázi pouhé RNA a poté na bázi RNA a proteinů. Předtím, než vznikl genetický kód a proteosyntéza, musely existovat replikony nezávislé na proteinech, zřejmě pouze na bázi molekul RNA. RNA molekuly se postupně vyvinuly v centrálního hráče i v pozdějším světě, kde katalytickou roli měly proteiny. Tato fáze evoluce se označuje jako **svět RNA** (Gilbert 1986). Starobyle formy života na bázi molekul RNA postupně vymizely. Avšak některé ústřední funkce v moderních buňkách jsou katalyzovány molekulami RNA nebo alespoň koenzymy s ribonukleotidovými kofaktory. Tyto funkční RNA nebo nukleotidy možná představují molekulární relikty nebo fosilie předbuněčných předků. Možnou výjimkou jsou dnešní RNA viry a viroidy. Jejich původ není jasný. Buď jsou to pouze deriváty moderního světa DNA, a jejich mechanismy se vyvinuly v důsledku jejich parazitického života, anebo lze původ virů hledat ve RNA světě a jsou jeho funkčními relikty. Přinejmenším mohou složit jako funkční modely světa RNA.

2.1. Důkazy světa RNA

Hlavními skutečnostmi, které podporují hypotézu existence světa RNA je (i) centrální role nejrůznějších molekul RNA v dnešních živých systémech a (ii) přítomnost různých retroelementů v moderních genomech. **Molekuly RNA** dodnes hrají nezastupitelnou roli ve všech hlavních stupních realizace genetické informace. Molekuly mRNA nesou přepis genetické informace z místa jejího uložení v jádře do místa syntézy proteinů v ribozómech. Samotné ribozómy jsou tvořeny vedle proteinů i několika typy molekul RNA, tzv. rRNA. Aminokyseliny jsou dopravovány na povrch ribozómů, kde probíhá syntéza proteinů, prostřednictvím molekul tRNA. Je pozoruhodné, že i klíčová reakce tvorby proteinů, tvorba peptidické vazby, spojující jednotlivé aminokyseliny, je uskutečňována molekulou 23S rRNA, tedy ribozymem. Jak je vidět proteiny mohou být syntetizovány jedinečně podle RNA templátů a to jedinečně za účasti dalších klíčových molekul RNA. Zrání tRNA i rRNA i sestřihu pre-mRNA se účastní další molekuly RNA, v případě tRNA je to RNáza P, jejíž katalytickou jednotkou je ribozym, v případě zrání rRNA jsou to malé jadéřkové RNA (snoRNA) a při sestřihu pre-mRNA (neboli hnRNA) jsou to malé jadéřkové RNA (snRNA). Dalším důkazem pro existenci světa RNA jsou různé **retroelementy** (viz kapitola XX) vyznačující se starobylým mechanismem reprodukce, jehož součástí jsou molekuly RNA, a také svou

všudypřítomností v genomech eukaryot i prokaryot. Mezi retroelementy se také někdy zahrnují **RNA viry** replikující se mechanismem reverzní transkripce. O pohledu na ně jako na funkční relikty anebo alespoň funkční modely světa RNA jsme mluvili výše.

2.2. Vznik světa RNA

Podmínkou vzniku světa RNA byla existence potřebných prekurzorů, z nichž spontánním sestavováním vznikaly první RNA polymery. První fáze nebyly katalyzovány enzymaticky a zahrnovaly syntézu dostatečných množství ribózy, purinových a pyrimidinových bází, z nichž byly dále neenzymaticky syntetizovány ribonukleotidy. Syntéza **purinů** mohla probíhat jednoduchými prebiotickými reakcemi vycházejícími z kyanovodíku a zřejmě zahrnovala také formamid. **Pyrimidinové** báze mohly vznikat z kyanoacetylenu nebo z kyanoacetaldehydu a močoviny (nebo ještě dříve z metanu a molekulárního dusíku). Protože výtěžky těchto reakcí jsou velmi nízké, je možná, že probíhaly v prostředí, kde se roztoky mohly být zahušťovány opakovaným vymrazováním, anebo naopak v prostředích velmi horkém a o vysoké energii, např. v hydrotermálních pramenech. **Ribóza** může vznikat tzv. formózovou reakcí z formaldehydu. Při této reakci vzniká proměnlivá směs různých pentóz a hexóz. Obohacení o ribózu je problematické i vzhledem k její nízké stabilitě, situaci zčásti řeší katalýza za přítomnosti olova a stabilizace zprostředkovaná borátem vápenatým. Puriny a pyrimidinové báze musí být kovalentně vázány v beta orientaci s uhlíkem 1 ribózy. Tím vznikají nukleosidy. Fosforylací nukleozidů vznikají **nukleotidy**. Rozpustné fosfáty nebyly moc hojně dostupné v prebiotickém světě. K fosforylaci dochází ve zředěném roztoku fosforečnanu vápenatého (CaP, hydroxyapatit) v přítomnosti močoviny a při zahřátí. Jako fosforylační činidla mohou fungovat i polyfosforečnany vznikající při vulkanické činnosti. Prebiotická syntéza nukleotidů vzniká racemická směs různých nukleotidů, které jsou jak alfa a beta, tak i v D a L izoformách. Spontánní **polymerizace** je pomalá a vede ke tvorbě různých vazeb. Schopné prodlužovat se a replikovat se mají jen ty, které vznikly vazbou 5-3 fosfodiesterovou vazbou mezi beta-D-nukleotidy. Účinnost polymerizace může být zvýšena přítomností iontů kovů nebo zmrazováním. Protože tvorba nukleotidů a jejich polymerů z molekulárních prekurzorů (HCN, NH₃, CH₂O, CH₄, PO₄³⁻, H₂O) zahrnuje mnoho málo pravděpodobných kroků, existují názory, že molekulám RNA předcházely jednodušší polymery. Nejčastěji se mnoví o peptidových nukleových kyselinách (PNA), threosových nukleových kyselinách (TNA) a nukleových kyselinách odvozených od glycerolu a pyranosylu. V této souvislosti se také hovoří o již zmíněných anorganických látkách, jílových minerálech (Cairns-Smith 1982).

2.3. Evoluční osud prvních RNA katalyzátorů

Experimenty in vitro i in vivo ukázaly, že pradávne molekuly RNA byly schopny katalyzovat celou řadu různých reakcí jako je polymerizace RNA, aktivaceaminokyselin, aminoacylace tRNA, štěpení a ligace molekul RNA, tvorba C-C vazeb, tvorba peptidové i glykosidické vazby. Po nástupu nových katalyzátorů v podobě proteinů čekal RNA katalyzátory nový osud. Většina z nich **vymizela** (i). Některé se adaptovaly na novou situaci tak, že získaly **nové funkce** (ii) a jiné si zachovaly svoji **konzervativní roli** (iii).

Příkladem získání **nové funkce** ve světě proteinů jsou ribozómy a tRNA, které se obojí staly součástí translačního aparátu (viz níže fág Qbeta, kapitola 4). Naopak vysoce **zakonzervovanými** molekulami RNA jsou malé jaderné RNA (snRNA) a jimi katalyzovaný procesing rRNA, dále procesing tRNA molekulou RNázyP u všech říší organizmů a také sestřih intronů. Zajímavé je, že zatímco u eukaryot jsou tyto funkce jsou vysoce konzervativní, u prokaryot byly některé z nich nahrazeny proteinovými katalyzátory. To podporuje představu, že eukaryota jsou bližší původním organizmům, zatímco prokaryota jsou odvozené organizmy, které opustily systém méně účinných katalyzátorů na bázi RNA

světa a vytvořily si pro některé funkce účinnější mechanismy katalýzy založené na proteinech.

Vzhledem, komu, že proteiny jsou mnohem účinnějšími katalyzátory než RNA, lze předpokládat, že katalytická schopnost RNA není novým evolučním výdobytkem ale pouze pozůstatkem, reliktem. Molekuly RNA, které se nacházejí u širokého spektra organismů, lze považovat za starobylé spíše než předpokládat, že vznikly u různých organismů vícekrát na sobě nezávisle. Molekuly RNA, které zaujímají centrální postavení v metabolismu, bude v evoluci obtížné zaměnit a tak pravděpodobně přežily ze světa RNA.

Hlavními kritérii, podle kterých se posuzuje, zda určitá molekula RNA může být **reliktem ze světa RNA**, jsou (i) katalytické schopnosti, (ii) všudypřítomost a (iii) centrální postavení v metabolismu. RNA s katalytickými schopnostmi je pravděpodobnějším reliktem ze světa RNA než RNA nesoucí pouhou informaci. Dále se budeme zabývat jednotlivými příklady reliktní světové RNA jako jsou předchůdci tRNA, ribozómy, spliceozómy, snorpozómy, vault částice, signální rozpoznávací částice, telomeráza, editace RNA a jiné struktury a procesy, v nichž se do dnešních dob dochovala interakce proteinů s molekulami RNA.

2.4. tRNA - od replikace k proteosyntéze

Názorný příkladem nám nabízí svět RNA virů, dokládající, jak se mohly původní ribozymy adaptovat na novou funkci je převzetí role tRNA účastníci se proteosyntézy molekulou či spíše strukturou podobnou tRNA, tzv. mikrohelixem původně důležitým v replikaci RNA genomu. U některých bakteriálních nebo rostlinných virů (**bakteriofág Q β** , virus CaMV), jejichž genetická informace je uložena v molekulách RNA, byla totiž na jednom konci nalezena vláseňková struktura nápadně podobná struktuře tRNA. Tato struktura byla podobně jako tRNA zakončena tripletem CCA. A co více, ukázalo se, že i v tomto případě sekvence CCA váže aminokyseliny, které zde však hrají roli v procesu replikace. U RNA virů jsou struktury podobné molekulám tRNA, tzv. TLS (tRNA-like structures) aminoacylovány aminokyselinami histidinem, valinem a tyrosinem a fungují jako primery pro replikaci. Máme před sebou zřejmě starobylou strukturu, jakousi molekulární fosilii přežívající z dob, kdy aminokyseliny plnily ještě jinou roli, než jako stavební kameny pro syntézu proteinů. O tom, že některé proteiny se původně účastnily replikace a až později se zapojily do translace, svědčí i to, že ribozomální protein S1 stejně tak jako translační elongační faktory Tu a Ts jsou u bakteriofága Qbeta součástí replikázového komplexu. Elongační faktory jsou součástí replikázových komplexů i u některých rostlinných RNA virů. Struktury podobné dnešním tRNA tehdy hrály důležitou roli v nejzákladnějším procesu živých systémů, jímž je replikace, jako specifická značka určující, kde má replikace začít. V tomto kontextu je zajímavé také to, že i dnešní mobilní genetické elementy množící se prostřednictvím molekul RNA, tzv. retroelementy (viz Vesmír 2000/5), využívají k zahájení své replikace molekuly tRNA. Podobné vláseňky byly objeveny i při replikaci konců eukaryotických chromosomů, telomer, jimiž se buňky brání proti jejich zkracování. Zdá se, že molekuly tRNA vznikly z krátkých vláseňkových struktur, tzv. mikrohelixů. Analýza sekvencí mnoha tRNA ukázala, že skladbu dnešních tRNA lze odvodit z opakovaných spojení, přeskupování a mutací krátkých sekvencí. Dvě domény současných tRNA, jedna vážící aminokyselinu a druhá interagující s mRNA, mají asi počátek ve dvou původně nezávislých mikrohelixech, z nichž mikrohelix vážící aminokyselinu je zřejmě evolučně starší. Předkové tRNA tak možná představovali jedny z nejstarších biomakromolekul. Pozůstatkem z dávných dob je možná i přítomnost podivných aminokyselin inosinu a hypoxantinu v tRNA.

2.5. Ribozóm

Ribozómy jsou malé buněčné organely tvořené molekulami RNA a ribozomálními proteiny. Probíhá na nich translace, při níž se překládá genetická informace z molekul mRNA do

proteinů. Ribozomy se nacházejí volně v cytoplazmě anebo jsou navázány na endoplazmatické retikulum či na jadernou membránu. Ribozomy se nacházejí také uvnitř dalších organel – mitochondrií a chloroplastů. Z evolučního hlediska jsou ribozomy pozůstatky světa RNA, jsou to vlastně ribozomy stabilizované proteiny. Mnoho funkcí ribozomů vykonávají dodnes molekuly RNA, např. katalyzují tvorbu peptidické vazby peptidyltransferázovou aktivitou RNA. Důležité jsou interakce RNA-RNA, např. interakce tRNA s 23S rRNA. Bylo experimentálně zjištěno, že ribozomy zbavené proteinů mohou dokonce katalyzovat některé reakce. Podle současných představ mohl dříve existovat ribozóm tvořený pouze molekulami RNA bez účasti proteinů. Bylo např. ukázáno, že molekuly RNA vzniklé in vitro jsou schopny aminoacylovat molekuly tRNA. Přejít od RNA katalyzátorů k proteinovým katalyzátorům dokládá i fakt, že u některých organismů je podstatný pro peptidyltransferázovou aktivitu ribozómalní protein L2. Proteiny postupně stabilizovaly původní ribozomy tvořené pouze molekulami RNA a především zvýšily jejich přesnost. Je také možné, že ribozomy měly původně jinou úlohu, např. v replikaci. V důsledku Eigenova limitu byly původní molekuly dlouhé jen několik stovek bází a až postupně se zvyšující se přesností replikace se jejich délka zvyšovala. Je také možné, že jednotlivá aktivní místa dnešních ribozomů existovala původně jako nezávislé ribozomy a ty byly poté spojeny rekombinací. To je podporováno i zjištěním, že některé interakce RNA v ribozómu lze napodobit malými RNA. Odhadovaná původní velikost ribozómu je 7500 nukleotidů, což zahrnuje velkou podjednotku, 5.8S rRNA a mezilehlé sekvence. Podle jednoho medelu byl prekurzorem proteosyntézy systém, v němž RNA polymeráza specificky prodlužovala molekulu RNA podle templátu a to tak, že připojovala vždy trinukleotidy, předtím než vždy disociovala. Délka trinukleotidu se zdá být optimální z hlediska přesnosti a rychlosti. Čím je oligonukleotid, o který je vlákno najednou prodlouženo, delší, tím je přesnost vyšší ale rychlost replikace nižší. Stabilita roste lineárně a počet možností exponenciálně. Podobná periodičita se uplatňuje při prodlužování telomér in vitro u Tetrahymena, zde je základní délkou hexanukleotid. Při replikaci pomocí struktur podobných molekulám tRNA je trinukleotid přenesen z této tRNA do rostoucího vlákna RNA. Označení těchto tRNA struktur aminokyselinami napomáhá replikáze v jejich rozpoznávání. Je možné, že původní aminokyseliny navázané na tRNA mohly plnit ještě nějakou další úlohu, např. napomáhat včleňování trinukleotidů. Původní molekuly tRNA zřejmě sestávaly pouze z části dnešních tRNA. Ribozóm je tedy zvláštním ribozymem, který v průběhu evoluce přeměnil svoji úlohu z replikace na vznikající translaci.

2.6. Sestřih, snRNA, snoRNA

Sestřih je postranskripční úprava pre-mRNA (hnRNA), při níž je z primárního transkriptu vystřižen prepis intronů a jsou spojeny prepisy exonů. Vzniká mRNA, která slouží jako templát pro translaci na ribozómech. Při sestřihu se stvoří komplex nukleových kyselin a proteinů, tzv. spliceosom. Spliceosom je dalším příkladem RNP komplexu, jehož součástí je katalytická RNA. Aktivní místo spliceosomu obsahuje struktury RNA, které jsou podobné intronům II. skupiny a intronům typu hammerhead (viz výše). Při sestavování spliceosomu a tvorbě jeho aktivního místa hrají důležitou roli interakce RNA-RNA. Tato představa naznačuje, že spliceosom má původ ve světě RNA. Vznik spliceosomu před vznikem translace zdánlivě nemá smysl, není důvod přesně sestřihovat pre-mRNA a těžko by se v evoluci udržela takováto struktura, pokud by neměla nějakou selekční výhodu. Zdá se, že protospliceosom měl původně úlohu v rekombinaci jako jakási původní **rekombináza**. Umožňoval zřejmě kombinování různých molekul RNA. Toto je další příklad, kdy se změnila původní funkce ribozymu na funkci novou. V této souvislosti je pozoruhodný objev bimolekulárního sestřihu u trypanozom a nematod. Při něm jsou kombinovány dvě molekuly RNA, exony se nacházejí na dvou různých primárních transkriptech.

Sestřihu **pre-mRNA** se účastní molekuly malých jaderných RNA, **snRNA**. Tyto molekuly interagují s proteiny označovanými jako snRNP-proteiny a vytvářejí spolu snRNP částice. Tyto částice řídí ve spliceosomu proces sestřihu. Proteiny ve spliceosomu zřejmě mění konformaci pre-mRNA a umožňují její posttranskripční úpravy. Molekulami snRNA účastnicími se sestřihu pre-mRNA jsou U1, U2, U4, U5 a U6 snRNA. Každá z těchto molekul tvoří komplex s několika proteiny. Molekula U1 se váže na 5-místo a molekula U5 na 3-místo sestřihu. Molekula U2 se váže na místo větvení, kde se poté uzavře smyčka tvořená intronem.

Posttranskripčním úpravám podléhají i molekuly **pre-rRNA**. Tento proces probíhá v jadérku a zajišťují jej molekuly malých jadérkových RNA, **snoRNA**. Ty se účastní kromě sestřihu molekul pre-rRNA také modifikací RNA. Samotné molekuly snoRNA vznikají výhradně sestřihem intronů. Nacházejí se v intronech ribozomálních genů nebo „heat shock“ genů. Na příkladu molekul snoRNA je vidět, že mRNA mohla vzniknout jako vedlejší produkt, kdy byly spojeny oblasti mezilehlé mezi oblastmi kódujícími ribozymy, které se tak staly introny a nadále kódují snoRNA. Extrémním příkladem podporující právě tuto představu je gen, který je po transkripci sestřihem a vzniklá mRNA je degradována bez translace, zatímco intronové oblasti kódují osm různých snoRNA. Introny jsou zde tedy důležitější než exony, došlo ke ztrátě funkce proteinu při zachování důležitosti snoRNA. Molekuly snoRNA ve starších intronech tak možná předcházejí vzniku translace a také vzniku mladších exonů, které je dnes obklopují. To, že introny obsahují funkční relikty světa RNA, svědčí o tom, že se jedná o struktury velmi staré.

2.7. Maturace tRNA a RNázaP

Některé geny pro tRNA obsahují introny. Pro maturaci molekul tRNA je potřebný enzym RNázaP. Tento enzym je RNA-proteinovým komplexem. Byl objeven u všech hlavních skupin organismů, nejlépe je prozkoumána RNázaP *E. coli*. RNA složka RNázyP, označovaná také někdy jako P-RNA, je zde dlouhá necelých 400 nukleotidů. Samotná P-RNA je schopná katalyzovat štěpení pre-tRNA *in vitro*. Narozdíl od ostatních RNA katalyzátorů, které jsou schopny provést určitou reakci pouze jednou, je RNázaP skutečným enzymem štěpícím opakovaně. V současnosti jsou známy mnoha P-RNA a studuje se také jejich struktura. Přestože podobnosti na úrovni sekvence jsou dost nízké, jsou zde zřejmé podobnosti na úrovni sekundární a terciární struktury. RNA složka enzymu RNázy P a její schopnost štěpit pre-tRNA se stala druhým objeveným ribozymem (Guerrier-Takada, 1983), hned rok po objevu samosestřihujícího se intronu u *Tetrahymena thermophila* (Kruger et al, 1982)

2.8. Signální rozpoznávací částice a srpRNA

Signální rozpoznávací částice je RNA-proteinový komplex zajišťující vazbu ribozómu na endoplazmatické retikulum a následnou sekreci nově syntetizovaných proteinů do endoplazmatického retikula. Složení SRP je konzervativní mezi eukaryoty, pokaryoty a archebakteriemi. RNA složkou je u eukaryot a archebakterií 7S RNA. U eukaryot je délka této srpRNA asi 300 nukleotidů. srpRNA zřejmě existovala již ve světě RNA. Z oněch dob si srpRNA uchovala pouze schopnost napomáhat hydrolyze GTP.

2.9. Editace RNA a řídicí RNA (gRNA)

Editace je jedním z mechanismů posttranskripčních úprav. Při editaci RNA dochází k drobným úpravám, inzercím, delecím či substitucím, výsledkem čehož je zralá mRNA. Nejznámějším příkladem je vkládání několika uracilů do sekvence pre-mRNA. Strukturní geny, které obsahují informaci podléhající editaci, se označují jako kryptogeny. Editace byla objevena nejprve u mitochondrií trypanozom, později i u jiných organismů, např.

v mitochondriích vyšších rostlin či strunatců. Nejznámější je inserce bloku uridinů u mitochondrií trypanozom, dále nahrazení cytosinu uracilem nebo naopak uracilu cytosinem u rostlinných mitochondrií a chloroplastů, editace tRNA u *Acanthamoeba* a vačnatců, nahrazení adeninu inosinem u savců a virů a v neposlední řadě inserce guaninů u RNA virů.

Proces editace není náhodný, nýbrž je přesně řízen. Účastní se ho molekuly **řídící RNA** (guideRNA, gRNA), která vykazuje homologii s upravovanou pre-mRNA a obsahuje také např. nukleotidy (blok uracilů), které budou při editaci vloženy do pre-mRNA. U mitochondrií *Acanthamoeba* bylo zjištěno, že čtyři z pěti tRNA v každém ze dvou klastrů dochází k editaci RNA. Pokud k této editaci nedojde, pak výsledná tRNA nevytvoří potřebnou sekundární strukturu a to zabrání zrání tRNA molekulami RNázyP (také ribozym, viz výše). Ve světě RNA mohl tento mechanismus, podobně jako i dnes, řídit expresi molekul tRNA. Existují však protichůdné názory na původ RNA editace. Podle některých autorů vznikl ještě před endosymbiotickou událostí, která dala vznik mitochondriím, snad ještě ve světě RNA, podle jiných vznikl tento proces až po vzniku mitochondrií. Někteří autoři se také domnívají, že vznik RNA editace je až evoluční reakcí na skutečnost, že mitochondrie nemohou, narozdíl od svých volně žijících předchůdců (proteobakterií), volně rekombinovat a v důsledku tzv. Mullerovy rohatky (Mullers ratchet) se v nich akumulují drobné mutace. RNA editace je rozhodně významným mechanismem, jehož selhání může mít pro organizmus fatální důsledky, u člověka je např. příčinou řady nádorových onemocnění nebo neurologických onemocnění (např. epilepsie v případě chybné editace adeninu na inosin).

2.10. Telomeráza a telomerická RNA

Vzhledem k tomu, že replikace DNA se účastní primer tvořený RNA, který je nakonec odstraněn, vzniká u lineárních molekul eukaryot a RNA virů problém nezreplikovaného 3-konce. Ten je u eukaryot vyřešen pomocí enzymu telomerázy. Telomeráza je enzym tvořený jednak proteinovou složkou a jednak molekulou RNA. Tato RNA slouží jako templát pro přidávání telomerických repeticí, opakujících se úseků typických pro určitý organizmus (TTAGGG u všech obratlovců). Přestože telomeráza neexistuje u prokaryot, jejichž cirkulární genomy se replikují mechanismem otáčivé kružnice, předpokládá se, že se jedná o relikvy ze světa RNA. Telomeráza je vlastně reverzní transkriptáza syntetizující úseky DNA podle templátu RNA, který si sama nese. Není proto překvapením, že byla zjištěna homologie telomerázy s reverzními transkriptázami různých retroelementů. RNA složka telomerázy může i bez účasti proteinů tvořit složité sekundární struktury. Její účast v katalýze však není zatím zcela jasná jako je tomu u RNA složek, jež jsou součástí ribozómu nebo které se účastní sestřihu. Bylo ale zjištěno, že mutace v RNA složce vedou k prodlužování teloméru. Předpokládá se, že tato RNA hrála svoji roli již ve světě RNA ještě před vznikem proteosyntézy. První genomy byly zřejmě lineárními dvouřetězcovými molekulami RNA.

2.11. Vault RNA (vRNA)

Na povrchu jaderné membrány byly v polovině 80. let objeveny RNA-proteinové částice, tzv. vault částice, které jsou spojeny s komplexem pórů v jaderné membráně (Kedersha a Rome, 1986). V buňkách savců jsou přítomny desetitisíce těchto částic. RNA složka těchto částic byla označena jako vault RNA (vRNA) a ukázalo se, že je značně konzervativní mezi různými organizmy. I přes rozdíly ve své délce jsou konzervativní především sekundární struktury které vRNA tvoří. Úloha vRNA není zatím jasná, předpokládá se, že může fungovat jako značka určující které molekuly budou transportovány z jádra a do jádra. Je známo, že např. u člověka hrají vault částice roli při rezistenci rakoviných buněk proti léčivům. Vault RNA má spíš funkční než strukturní úlohu, neboť odstranění RNA složky z vault částic nevedlo ke změně jejich struktury. Její existence může souviset s kompartmentací prvních RNA organizmů a může tak představovat další relikv světa RNA. Je totiž možné, že již ve

světě RNA existovalo protojádro a protoplazma jako nástroj separace replikace a transkripce (genové exprese). To mohlo být evolučně výhodné, např. k oddělení informace a potlačení šumu.

2.12. tmRNA u prokaryot

V bakteriích byly objeveny molekuly mající charakter jak mRNA tak současně i tRNA, byly proto označeny jako tmRNA. tmRNA se účastní procesu trans-translace, kdy přidává na C-konec peptidu, vznikajícího omylem podle rozbité mRNA, značku signalizující, že peptid je určen k proteolýze. Geny pro tmRNA byly nalezeny ve všech osekvenovaných genomech prokaryot, bakteriofágů, mitochondrií a chloroplastů.

2.13. Malé nekódující RNA a RNA interference – miRNA, siRNA, smRNA aj.

viz speciální lekce tohoto kurzu – přednáší dr. Hobza

2.14. První RNA organizmus: Riborgis Eigensis

První RNA genomy byly zřejmě v další fázi stabilizovány proteiny, které vznikaly nově vzniklou syntézou proteinů. Vznikaly RNA-proteinové (RNP) komplexy. RNA mohly být také uzavírány do membránových vesikulů. Prvními RNA replikony byly krátké molekuly RNA, které byly replikovány RNA-dependentní RNA polymerázou (RNA replikázou). Tento enzym byl zřejmě zřejmě nejstarším proteinem. Vznikl pravděpodobně náhodou a na opátku byl výhodný pro RNA genom tím, že ho např. stabilizoval nebo nějak výhodně měnil jeho konformaci, až později byl schopen katalyzovat syntézu dalších kopií RNA genomu. V důsledku chyb RNA polymerázy vznikla populace podobných molekul RNA. Tyto replikony si byly vzájemně výhodné, některé kódovaly replikázu, jiné zase ochranný plášťový protein nebo konformační podjednotky. Tak vznikal interaktivní fragmentovaný genom. Z RNA-dependentní RNA polymerázy se pravděpodobně vyvinula reverzní transkriptáza, jejíž vznik byl jednou z podmínek přechodu od molekul RNA k molekulám DNA.

Při uvažování o velikostech prvních genomů je důležitý tzv. **Eigenův limit** – podle něhož je replikační přesnost limitujícím faktorem (Eigen 1992). Čím je totiž frekvence chyb při replikaci vyšší, tím menší genom může projít do další generace. Délka původních molekul RNA zřejmě v důsledku tohoto omezení nepřesahovala několik stovek bází.

2.15. Dnešní viry a viroidy – nejpodobnější časným replikonům

První genomy byly na bázi molekul RNA. Limitujícím faktorem byla malá velikost těchto genomů, což vyplývá z nestability RNA. Postupně byl RNA genom stabilizován proteiny a RNA byla chráněna membránovými vesikuly nebo enkapsidací do proteinových struktur. První genomy byly fragmentovány. Vyvíjely se díky v tehdejší době značně chybující RNA polymeráze a díky častým rekombinacím. Tento stupeň organizace genomu velmi připomíná současné RNA viry. Dnešní RNA viry jsou proto často považovány za funkční reliktů časných RNA-proteinových replikonů.

Viry jsou molekulární parazité, mohou se replikovat pouze v prostředí, z něhož mohou získávat všechny potřebné látky. Ve vhodném prostředí se replikují velice účinně a mohou se adaptovat na nové prostředí. Jsou to organizmy na hranici života podobně jako časné replikony. Viry používají také odlišný genetický kód, některé se replikují ve speciálních vesikulárních strukturách tvořených membránou hostitele. Některé viry (pararetroviry a retroviry) mají ve svém cyklu jak DNA tak i RNA stádia a při tom používají reverzní transkripci. To zase připomíná evoluční přechod z RNA do DNA. Pozoruhodná je i skutečnost, že mnohé dnešní viry obsahují ve svých kapsidách více molekul RNA, což může připomínat dávnou organizaci prvních RNA genomů.

Viroidy jsou parazité rostlin tvořené molekulami RNA. Od virů se odlišují tím, že jejich RNA jsou menší, v rozmezí 240-400 bází, jsou cirkulární a neobsahují žádné sekvence kódující proteiny. V buňce se obvykle nachází 200-10 000 kopií viroidové RNA. Existence genomů bez kódovací kapacity může připomínat replikony z dob před vznikem proteosyntézy. Viroidy se replikují mechanismem otáčivé kružnice a jejich replikaci zajišťují hostitelské RNA polymerázy. Při replikaci vznikají multimerní kopie, které jsou štěpeny autokatalytickými ribozymovými sekvencemi. RNA genom viroidů vytváří v důsledku vnitřního párování výrazné sekundární struktury, které silně zvyšují jeho stabilitu a chrání jej proti enzymatické i fyzikální degradaci i pokud je tato RNA volná bez přítomnosti proteinů.

2.16. Jsou starobylější prokaryota nebo eukaryota?

Svět RNA může přispět k zodpovězení otázky, zda prapůvodnímu organizmy byly podobnější spíše dnešním prokaryotům nebo eukaryotům. Níže uvedené argumenty podporují představu **starobylosti eukaryot**: 1. Je známo **mnoho reliktních** světa RNA u eukaryot, jen několik také u prokaryot. Vzhledem k tomu, že proteiny jsou účinnější katalyzátory než molekuly RNA (turnover u proteinů 10^3 až 10^6 zatímco u ribozymů je turnover 1) není důvod proč by selekční tlak měl zvýhodnit nahrazení proteinů ribozymy u eukaryot. 2. Posttranskripční **úpravy** mRNA a rRNA jsou rychlé a účinné u prokaryot. Pokud by se eukaryota vyvinula z prokaryot, muselo by se de novo vyvinout množství nových molekul RNA a RNP komplexů účastnících se např. sestřihu pre-rRNA eukaryot, např. 30 snoRNA a proteinů účastnících se sestřihu. 3. Neexistuje selekční výhoda pro moderní vznik sestřihu s **spliceosomu** u eukaryot. Těžko si lze představit selekční síly, které by zvýhodňovaly zavedení složitějšího systému úpravy mRNA pomocí komplexu RNA a proteinů, aby vytvořily mRNA za 1 hodinu místo původního času 1 minuty, jak je tomu u prokaryot. 4. Eukaryotické **telomerázy** jsou starobylé struktury. I některá prokaryota mají lineární chromosomy s jednoduchými telomerickými strukturami podobnými telomerickým strukturám u DNA virů.

Podle některých současných představ je tedy fragmentovaný, introny obsahující a diploidní genom starobylý, zatímco rychle se replikující a operony obsahující genom utvořený jednou cirkulární molekulou odvozený. U prokaryot genom přešel z podoby lineárních molekul do podoby cirkulárních molekul. Při tom se zbavil mnoha kroků, při nichž docházelo k úpravám primárních transkriptů, zbavil se intronů, a geny pro nekódující RNA (snoRNA), které byly potřebné pro úpravy primárních transkriptů buď nebyly již potřeba nebo byly nahrazeny proteiny.

Zajímavou představou vysvětlující příčiny vzniku cirkulárních genomů bez intronů u prokaryot je „**hypotéza termoredukce**“ založená na předpokladu, že v evoluci prokaryot existovalo termofilní stádium, ne-li extrémně termofilní stádium. Vše vychází z faktu, že jednořetězcová RNA je značně citlivá k hydrolýze při teplotách nad 50°C . Všechny prekurzorové RNA by byly v takovém prostředí rychle degradovány, pokud by jejich zráním nebylo odstraněno anebo nebyly nahrazeny proteiny. Z hlediska možné degradace je nevýhodná i časová a prostorová separace transkripce a translace. Jakákoliv prodleva by vedla k degradaci dříve než by molekuly byly upraveny. Proto u prokaryot translace bezprostředně navazuje na transkripci a je zahájena ještě před dokončením transkripce. Odstraněním intronů odpadl zdoluhavý proces sestřihu. Malé jadérové RNA (snoRNA) účastníci se úprav rRNA a následně sestavování ribozómů by neodolaly vyšší teplotě. Proto byly u prokaryot nahrazeny stabilnějšími proteiny. Důležitá je i skutečnost, že cirkulární molekuly DNA jako genetický materiál prokaryot mají mnohem nižší teplotu tání než molekuly lineární. Představu, že prokaryota mohla projít stádiem termofilních organizmů, podporuje i existence mnoha termofilních druhů u různých skupin prokaryot. Pokud jde o mechanismus přechodu lineárních genomů k cirkulárním, posloužily jako model retroviry. Ty se nacházejí v genomu včleněné v podobě proviru. Pokud provirus leží v blízkosti genu, může být tento gen

transkribován spolu s provirem a začleněn do virové částice. Virová RNA je následně přepsána do dvouřetězcové DNA. Část těchto molekul se zpětně včlení do genomu a ostatní molekuly zůstanou cirkulární. V selekci potom mohou být za určitých podmínek zvýhodněny cirkulární molekuly (rychlejší replikace, tepelně stabilnější). Takových molekul může být mnoho a mohou spolu rekombinovat a spojovat se v molekuly delší tvořící rostoucí cirkulární DNA genomy.

Kapitola III.: EVOLUCE GENOMŮ

- 3.1. Typy genomů - srovnání prokaryotického a eukaryotického genomu
- 3.2. První genomy – lineární nebo cirkulární
- 3.3. Velikosti genomů a paradox hodnoty C
- 3.4. Genomy prokaryot
- 3.5. Minimální genom
- 3.6. Anatomie eukaryotického genomu a struktura chromosomů
- 3.7. Počty chromosomů
- 3.8. B chromosomy – parazitě?
- 3.9. Repetice – podstatná složka genomu
- 3.10. Změny ve velikosti genomů, plynulost nebo skoky
- 3.11. Polyploidizace v linii obratlovců, rostlin a kvasinky
- 3.12. Genomová obezita rostlin a „big bang“ v genomu kukuřice
- 3.13. Proměnlivost velikosti genomu v rámci druhu
- 3.14. Kolinearia (syntenie)
- 3.16. Izochory

3.1. Typy genomů - srovnání prokaryotického a eukaryotického genomu

Genom je celková genetická informace daného organismu. U všech autonomních forem života jsou nositelem genetické informace molekuly DNA. Pouze u některých virů nesou genetickou informaci molekuly RNA. Genom **prokaryotických** organismů je představován jednou dvouřetězcovou molekulou DNA, tzv. bakteriálním chromosomem, který je většinou cirkulární. Kromě toho některé bakterie obsahují malé kružnicové molekuly DNA nazývané plazmidy. Genetická informace **eukaryotické** buňky se nachází převážně v jádře, ale také v mitochondriích a případně chloroplastech. V jádře tvoří složité chromatinové struktury, tzv. chromosomy, každý z nichž obsahuje jednu molekulu DNA. V mitochondriích a chloroplastech se nacházejí kružnicové molekuly DNA.

3.2. První genomy – lineární nebo cirkulární

Není známo, zda byly první genomy tvořeny lineárními nebo cirkulárními molekulami nukleových kyselin a také se neví, kdy došlo k přechodu z RNA genomů na genomy tvořené molekulami DNA. Podle představ Edwarda Trifonova byly první DNA genomy tvořeny mnoha malými kružnicovými molekulami DNA. Tyto autonomní DNA se přenášely do dceřiných buněk a jejich počty a zastoupení byly pouze statistické. Nenesly pouze geny kódující proteiny, ale kódovaly i syntézu rRNA a tRNA a snad i další důležité funkce raného **disperzního genomu**. O existenci malých kružnicových genomů dnes svědčí jednak periodicitu délek proteinů, kde monomer odpovídá právě délce DNA, o které bylo experimentálně zjištěno, že nejochotněji cirkularizuje. Se stejnou periodicitou se v proteinech objevuje aminokyselina metionin stojící vždy na začátku proteinu, a tak vymezuje hranice mezi fúzovanými geny.

Jednotlivé kružnicové molekuly DNA postupně **fúzovaly a rekombinovaly**, což vedlo k jejich zvětšování. Nakonec vynikly první chromosomy obsahující různé počty kopií a kombinace původních genů. Existence chromosomů usnadnila distribuci genů při buněčném dělení. Pozůstatky dávné organizace disperzních genomů můžeme pozorovat i v dnešních genomech v podobě různých extrachromosomálních DNA jako jsou plazmidy, mobilní elementy, lyzogenní fágy, a snad i genomy organel.

3.3. Velikosti genomů a paradox hodnoty C

Velikosti genomů se uvádějí v kilobázích (kb) nebo megabázích (Mb). Jindy se množství DNA daného organismu uvádí jako hodnota C. Ta se udává většinou v pikogramech DNA na jedno jádro (haploidní genom). Prokaryotické genomy jsou velké většinou miliony bází, např. velikost genomu *E. coli* je 5 Mb. Nejmenší genomy mezi buněčnými organismy mají mykoplazmata – *Mycoplasma genitalium* 500kb. Jednoduchý eukaryotický organismus, jako je kvasinka, má genom veliký 13,5 Mb. Lidský genom je velký přibližně 3 200Mb. Největší genomy mají někteří obojživelníci, např. mloci, nebo liliovité rostliny, přesahující velikost genomu člověka až téměř 100x. Pozoruhodným jevem je velké rozmezí velikostí genomů mezi často i příbuznými druhy. Tyto rozdíly dosahují až pěti řádů, tedy liší se až 100 000 krát! Např. u obojživelníků se velikosti genomů pohybují mezi 700Mb až 100 000Mb. U kvetoucích rostlin najdeme genom velký pouhých 120 Mbp u *A. thaliana* a na druhém konci liliovitou rostlinu *Fritillaria assyriaca* s genomem o velikosti 110 000 Mbp. Genom pšenice je 11krát větší, než genom rýže, přičemž obě obiloviny mají podobnou morfologii, podobný počet biochemických drah a fyziologických procesů. Existují primitivní řasy honosící se obřimi genomy, stejně tak jako evolučně pokročilé druhy s malými genomy. Např. čolek či lilie mají 30krát větší genomy než člověk.

Je tedy evidentní, že mezi velikostí genomu a složitostí organismu neexistuje jednoduchý vztah. Tomuto nesouladu se říká „**paradox hodnoty C**“. Tento fakt je do značné míry vysvětlitelný redundancí určitých oblastí genomů, především nekódujících repetitivních sekvencí DNA, jejichž funkce (pokud vůbec nějaká existuje) není zcela pochopena. Tyto části genomů bývají označovány jako „zbytečná“ či „sobecká“ DNA. Repetice jsou v genomu rozptýlené anebo jsou nahloučené v tandemech. Výzkumy z poslední doby naznačují, že jak velikosti genomů, tak i počty genů se v průběhu evoluce nevyvíjely plynule, nýbrž, že docházelo k jakýmsi skokům či časově omezeným expanzím. Příčiny těchto změn i jejich mechanismus jsou stále zahaleny tajemstvím. Pokud se však berou v úvahu nejnižší hodnoty velikostí genomů dané systematické skupiny, lze pozorovat jejich závislost na složitosti organismů, resp. jejich postavení v evolučním stromu.

3.4. Genomy prokaryot

Velikost bakteriálních genomů většinou nepřesahuje 5 Mb (jednou z výjimek je *Bacillus megaterium* s genomem 30Mb). To odpovídá skutečné délce asi 1.6mm, přičemž velikost bakteriálních buněk *E. coli* je 1x2um. Je tedy jasné, že bakteriální genom musí být nějakým způsobem kompaktizován. Napomáhají tomu proteiny vážící se na DNA. Spolu s DNA pak vytvářejí **bakteriální chromosom**, tzv. **nukleoid**. V bakteriálním chromosomu je DNA nadšroubovicově zavínutá, což je ideální způsob, jak namačkat cirkulární DNA do malého prostoru. Nadšroubovicové vinutí (supercoiling) je řízeno dvěma enzymy - gyrázou a topoizomerázou I. Molekula DNA *E. coli* tvoří přibližně 40-50 smyček vyčnívajících z centrálního proteinového jádra do cytoplazmy (OBR, Brown str. 131). Každá smyčka obsahuje asi 100kb nadšroubovicově vinuté DNA. Nejhojnějším proteinem zodpovědným za udržování DNA ve sbaleném stavu je protien Hu, který je sice strukturně zcela odlišný od eukaryotických histonů, avšak funguje podobně, tvoří tetramery, kolem nichž se ovíjí 60bp dlouhý úsek DNA.

V poslední době se ukazuje, že dosavadní pohled na anatomii prokaryotických genomů, odvozený převážně ze studia *E. coli*, byl příliš zjednodušen. Ačkoliv je drtivá většina bakteriálních a archeálních genomů skutečně cirkulární, stále přibývá nově objevených **lineárních genomů prokaryot**. První z nich byl popsán v roce 1989 u *Borrelia burgdorferi* (Ferdowe a Barbour, 1989), podobná situace byla zjištěna i u *Streptomyces* a dalších bakterií. U *B. burgdorferi* je hlavní lineární genom (910kb nesoucích 853 genů) provázen existencí nejméně 17 lineárními a cirkulárními plazmidy (dohromady 533kb nesoucích 430 genů). Tyto plazmidy jsou podstatnou složkou genomu a svědčí o tom, že i prokaryotické genomy mohou

být rozděleny do více molekul DNA, což připomíná situaci u eukaryot. Uspořádání genomu u *B. burgdorferi* je však spíše výjimkou, neboť i její blízký příbuzná bakterie *Treponema pallidum* má standardní prokaryotický genom tvořený velkou cirkulární molekulou DNA, a neobsahuje žádné homology genů přítomných u *B. burgdorferi* na plasmidech.

Dalšími místy uložení genetické informace u prokaryot jsou **plazmidy** – malé cirkulární molekuly nacházející se v bakteriální buňce. Některé jsou schopny se začleňovat do bakteriálního chromosomu, jiné jsou trvale nezávislé a přenášejí se z mateřské buňky do dceřiné buňky při buněčném dělení. Plazmidy nesou geny, které mohou za určitých podmínek být pro bakterii užitečné. K fenotypovým projevům (funkcím) některých plazmidů patří rezistence k antibiotikům (Rbk u *E. coli*), schopnost konjugace (F plazmid), syntéza toxinů zabíjejících bakterie (Col plazmidy), patogenita (Ti plazmid *Agrobacterium tumefaciens*). Mnohé plazmidy se snadno přenášejí z jedné buňky do druhé a mohou tak putovat i mezi různými bakteriálními druhy. Bakterie může obsahovat kombinaci různých plazmidů a naopak jeden typ plazmidu může „hostovat“ ve více druzích bakterií. Mnohé druhy bakterií tak mohou sdílet určitý „banku“ genů přítomných na plasmidech, které si mohou podle potřeby vzájemně „půjčovat“.

Genetická **organizace prokaryotických genomů** je charakteristická, že geny jsou velmi blízko sebe pouze s krátkými mezilehlými úseky. Například u *E. coli* tvoří nekódující DNA pouze 11% genomu. Kompaktní uspořádání prokaryotických genomů se vysvětluje nejčastěji výhodností pro rychlou replikaci těchto genomů. Dalším typickým znakem prokaryotických genomů je přítomnost operonů. Operon je skupina genů nacházejících se za sebou, oddělené pouze několika nukleotidy. Všechny geny operonu jsou transkribovány současně jako jedna jednotka. Genom *E. coli* obsahuje téměř 600 operonů, každý z nichž má dva nebo více genů. Nejznámějším příkladem je laktózový operon *E. coli* tvořený třemi geny důležitými pro přeměnu laktózy na glukózu a galaktózu. Syntéza enzymů kódovaných třemi geny laktózového operonu je tak koordinována.

3.5. Minimální genom

Jednou z nejvíce provokujících otázek biologie je otázka minimálního genomu resp. minimálního počtu genů v genomu autonomně žijícího organismu. Tato otázka má dosah i do filozofie či náboženství. Nejmenší genom ze známých organismů má *Mycoplasma genitalium* s 470 geny a příbuzná *M. pneumoniae* s 679 geny. Jeden z nejmenších genomů má i bakterie *Pelagibacter ubique* nesoucí 1354 genů. Přestože byla objevena až roku 1990, představuje asi nejhojnější bakterii na Zemi, vyplňující téměř celý vodní sloupec všech oceánů. Při studiu minimálního genomu se používají jak teoretické tak experimentální přístupy. Teoretické studie jsou založeny na srovnávací analýze známých genomů prokaryot (např. *E. coli*, *M. genitalium* a *H. influenzae*), a minimální počet genů se odhaduje podle počtu genů přítomných u všech těchto bakterií. Experimentální přístupy mají dvě základní strategie.

V první strategii se postupuje „**shora dolů**“ tak, že v bakteriálních genomech jsou systematicky inaktivovány jednotlivé geny a tak se zjistí, jaký počet genů a které geny jsou nepostradatelné. Minimální počty genů, k nimž se u různých organismů dospělo se pohybovaly od 260 do 670 genů v závislosti na prostředí, v němž bakterie rostly. Takto byl zkoumán genom *Bacillus subtilis* a dospělo se k počtu 271 nepostradatelných genů v prostředí bohatém na živiny. U *M. genitalium* bylo transpozonovou mutagenézí zjištěno, že 265-350 genů z celkového počtu 480 genů je podstatných, přičemž u 100 z nich není známa jejich funkce.

Opačnou strategii reprezentuje přístup „**zdola nahoru**“, kdy se vědci snaží syntetizovat autonomní živý organizmus de novo. Je však otázkou zda se vůbec někdy člověku podaří smícháním patričních chemikálií připravit v laboratoři nový život. Předpokladem toho je pochopení všech i těch nejjemnějších detailů fungování živých systémů. To se zdá značně

nepravděpodobné, když si uvědomíme k jakým revolučním objevům otvírajícím zcela nové obzory stále dochází (např. objev úlohy malých RNA, fenomén RNA interference) svědčící o tom, jak velké mezery ještě máme.

3.6. Anatomie eukaryotického genomu a struktura chromosomů

Pro eukaryota je charakteristické velké rozmezí velikostí genomů sahající od 10Mb až po 100 000Mb. Genom je rozdělen do chromosomů, které jsou vždy lineární. Již i ty nejjednodušší organismy včetně **bakterií a virů** si vyvinuly strategie umožňující jim vměstnat dlouhé molekuly DNA do svých buněk (nebo virových částic). Bakterie *E. coli* je dlouhá přibližně 2 μ m a obsahuje DNA o délce 1.6mm, tedy přibližně 1000x delší než bakterie. To je možné díky uspořádání DNA do shluku smyček zahuštěných do tvaru klubka. Stabilita této struktury je závislá na síti interakcí DNA s proteiny a molekulami RNA.

U **eukaryot** se DNA nachází v chromosomech, vláknitých útvarech tvořených chromatinem, který je složen z DNA a proteinů označovaných jako histony. Základními jednotkami chromatinu jsou částice nazývané **nukleozómy**. Jsou tvořeny 8 molekulami histonů, vždy po dvou molekulách každého ze 4 typů histonů (H2A, H2B, H3 a H4). Histony tvoří válcovité jádro, kolem něhož se ovíjí ve dvou otáčkách DNA o délce 140-150bp. Mezi histony se nachází spojovací DNA (linker DNA) o délce 50-70bp. Spojování nukleozómů do vyšších struktur napomáhá další histon, histon H1. Tak vzniká 10nm vlákno, označené podle své tloušťky, jehož další kompaktizaci způsobenou interakcemi histonů se tvoří 30nm vlákno. To je základním typem chromatinu v interfázním jádře. Během buněčného dělení dochází k další kompaktizaci za vzniku typických metafázních chromosomů. Velikost chromosomů se pohybuje většinou v rozmezí jednotek až desítek mikrometrů, například součet délek lidských chromosomů je 300 μ m (pokud vezmeme všech 46 chromosomů a položíme je do řady) a obsahuje více než 2 metry DNA. Z toho vyplývá, že kompaktizace zkrátila DNA přibližně 7000x.

Struktura chromosomů se během buněčného cyklu mění. Zatímco v interfázi jsou despiralizované a vytvářejí síť vláken, na začátku mitózy (v profázi) se začínají spiralizovat a zkracovat za tvorby vysoce kondenzovaných chromosomů mikroskopicky nejlépe pozorovatelných v metafázi, kde nabývají charakteristických tvarů. Typický metafázní chromosom je tvořen dvěma chromatidami (každá obsahuje jednu molekulu DNA), které jsou spojeny v centrální oblasti, která se nazývá centromera. Centromera dělí chromosom na dvě části nazývaná ramena. Kratší se vždy označuje jako p-rameno, delší jako q-rameno. Označování ramen je důležité pro mapování chromosomů. Konce chromosomů se označují jako telomery. Telomery jsou důležité z hlediska zachování integrity chromosomů. U člověka dochází během života k jejich zkracování a fungují tak jako biologické hodiny.

Strukturu chromosomů, stejně jako jejich kondenzaci a intenzitu transkripce, lze studovat pomocí barvitelnosti chromatinu bazickými barvivy. Rozlišujeme tzv. **heterochromatin**, lépe barvitelné kondenzované oblasti chromosomů obsahující většinou repetitivní sekvence DNA, a **euchromatin**, který se barví hůře a představuje dekonenzované oblasti obsahující často transkribované geny. Heterochromatin je buď konstitutivní, který je trvale transkripčně inaktivní, nebo fakultativní, který je potenciálně transkribovatelný.

3.7. Počty chromosomů

Počty i velikosti chromosomů se mezi jednotlivými druhy velmi liší. **Neexistuje korelace** mezi počtem chromosomů a komplexitou organismu. Všechny eukaryotické druhy mají nejméně dva chromosomy. Např. kvasinka *S. cerevisiae*, jednoduchý jednobuněčný organizmus, má čtyřikrát více chromosomů než *D. melanogaster*. Počet chromosomů nezávisí ani na velikosti genomu. Někteří mloci mají genom 30x větší než člověk, přičemž mají pouze polovinu počtu chromosomů. Jsou známy blízko příbuzné druhy jelínků rodu *Muntiacus*,

kteří se výrazně liší počtem chromosomů. Extrémisty jsou například mravenec *Myrmecia pilosula*, který má pouze 1 pár chromosomů, přičemž samec nese jen 1 chromosom, naopak kapradina *Ophioglossum reticulatum* vlastní 630 párů chromosomů. Tato srovnání jsou sice zajímavá, ale v současné době nám neříkají nic o genomech jako takových, svědčí jen o různé intenzitě působení sil tvarujících genomy různých organismů.

Počet chromosomů závisí také na typu buňky daného organismu. Ve většině buněk se chromosomy nacházejí v párech, mluvíme o **diploidních** buňkách. Naproti tomu pohlavní buňky obsahují pouze jednu sadu chromosomů, jsou **haploidní**. Po splynutí pohlavních buněk vzniká opět diploidní buňka.

3.8. B chromosomy – parazité?

Zajímavým fenoménem jsou tzv. **B chromosomy**. Jsou definovány většinou jako přidatné postradatelné chromosomy přítomné v některých jedincích některých populací určitých druhů, které zřejmě vznikly z „normálních“ chromosomů, označovaných také někdy jako A chromosomy. Jejich základními vlastnostmi je tedy (i) postradatelnost, (ii) původ z A chromosomů, (iii) fakt, že nerekombinují a (iv) neúčastní se meiózy. Vykazují tedy nemendelovskou dědičnost. Poprvé byly popsány Wilsonem (1906) jako tzv. „extra“ chromosomy u hmyzu *Metapodius*, později je pozorovali například N. Stevens (1908) u brouka *Diabrotica* nebo Kuwada (1915) u kukuřice. Pokud jde o jejich rozšíření, byly objeveny u 10 druhů hub, 1300 druhů rostlin a 500 druhů živočichů, přičemž převažují v některých taxonech jako jsou čeledi Compositae, Graminae, Liliaceae, Orthoptera, např. u hmyzu Orthoptera jsou přítomny u 10-15% druhů. Počet B chromosomů v buňce většinou nepřevyšuje 3-4, existují však rozdíly mezi populacemi i mezi jedinci. Extrémními příklady jsou *Pachyphytum fittkai* s 50 B chromosomy, kukuřice s 34 B chromosomy nebo *Fritillaria japonica* s 26 B chromosomy. Velikostí jsou B chromosomy srovnatelné s normálními chromosomy, i když jsou známy i extrémní případy, kdy B chromosomy jsou buď nejmenší ze všech chromosomů (u ryby *Astyanax scabripinnis*) nebo naopak nejmenší (myš *Reithrodontomys megalotis*). Jsou metacentrické nebo akrocentrické. Jsou většinou heterochromatické, což souvisí s jejich velkým obsahem repetitivní DNA, buď satelitní DNA, rDNA nebo transposonů. Vysoký obsah „sobecké“ či „parazitické“ DNA v B chromosomech vedl k představě, že se jedná o ve své podstatě parazitické genetické entity, jejichž jedinou úlohou v genomu je se replikovat a šířit do dalších generací. Důležitou vlastností B chromosomů je to, že se neúčastní rekombinace, podobně jako pohlavní chromosom Y. Podle některých představ dokonce z pohlavních chromosomů mohly vzniknout nebo naopak daly vznik pohlavním chromosomům. To bylo dokonce prokázáno u drozofily, kde tzv. „ancestrální“ chromosom Y vznikl z B chromosomu, jež se začal párovat s X chromosomem po zániku původního (original) Y chromosomu.

3.9. Repetice – podstatná složka genomu

Podstatnou část genomů tvoří opakující se sekvence DNA, tzv. repetice. Vyskytují se ve dvou základních typech organizace: tandemově uspořádané a rozptýlené. **Tandemově uspořádané** repetice se dělí dále na mikrosatelity, minisatelity a satelity; někdy se hovoří o megasatelitech. Ty mohou tvořit úseky dlouhé až stovky milionů bází. Předpokládá se, že tandemové repetice vznikly expanzí progenitorových sekvencí buď při replikaci „prokluzováním“ polymerázy (u mikrosatelitů), anebo rekombinačními procesy.

Většina rozptýlených repeticí je tvořena **mobilními DNA elementy**, buď retroelementy, šířícími se prostřednictvím RNA intermediátu, nebo DNA transposony. Retroelementy představují dominantní typ sekvencí DNA, u některých druhů tvoří více než polovinu jejich genomů. Jedná se o archaické parazitické DNA elementy množící se mechanismem „zkopíruj

a vložit, které zřejmě představují pozůstatky dávného světa, kdy byly nosičem genetické informace molekuly RNA.

Existence repetitivních sekvencí v genomech je velkou záhadou. Pokud jde o jejich **funkci** stojí proti sobě dva názory. Podle jednoho mají repetitivice nějakou zatím neznámou funkci, např. ve struktuře chromatinu, či jiné kontrolní funkce. Druhá představa se dívá na repetitivice jako na DNA bez funkce, která se replikuje bez ohledu na to, zda je to pro organismus užitečné či nikoliv, a genom tak expanduje až do mezí tolerovatelných daným organismem

3.10. Změny ve velikosti genomů, plynulost nebo skoky

Velikost genomu je dána výslednicí působení protichůdných mechanismů vedoucích k jejich zvětšování, resp. zmenšování. Při ohledu na velikosti genomů jednotlivých taxonů je zřejmé, že existuje jasný trend zvětšování genomů v průběhu evoluce. Tento trend se uplatňuje v evoluci života na Zemi zejména v průběhu posledních stovek milionů let a zřejmě nějak odráží větší schopnost větších genomů reagovat na měnící se vnější podmínky.

Za růst genomů jsou zodpovědné především dva základní procesy. Prvním je duplikace, celého genomu, **polyploidizace**, která bývá někdy opakovaná. Obzvláště u rostlin jde o poměrně běžný jev, uvádí se, že asi 70% druhů angiospermů prošlo ve své evoluci alespoň jednou duplikačním procesem. K duplikaci genomu došlo i u obratlovců, kdysi dávno byl zdvojen i genom kvasinky. Následně po polyploidizaci dochází často k restrukturalizacím genomu, což může někdy vést ke tvorbě nových genových komplexů, a tak ke zrychlení evoluce. Polyploidizace je evolučně úspěšná snad i proto, že vede ke zvýšení počtu všech genů stejně, aniž by drasticky ovlivnila rovnováhu mezi geny. Druhým klíčovým mechanismem zvětšování genomů je **amplifikace jeho částí**. Jedná se jednak o expanzi krátkých opakování několika nukleotidů (mikrosatelitů), především pak o duplikaci **mobilitních elementů**, z nichž nejrozšířenější jsou tzv. retroelementy. Zatímco polyploidizace vede ke znásobení veškeré genetické informace organismu, tedy také genů, amplifikace zmnožuje většinou jen tzv. "sobeckou" DNA. Retroelementy, starobylé reliktové dávného světa RNA, se totiž šíří po genomu duplikačním prostřednictvím molekul RNA jako intermediátů a zanechávají přitom své kopie na původních místech. Tak jsou schopny během evolučně krátkého období okupovat značnou část hostitelského genomu.

Byla zjištěna zajímavá korelace mezi velikostí genomu a **teplotním režimem**. Arktické druhy či populace – lososovitě ryby, zooplankton (*Daphnia*, *Bosmina*) či rostliny v polárních oblastech byly polyploidní, zatímco jejich příbuzní v teplých oblastech byly jen diploidní. Existuje korelace velikosti genomu a některých **fenotypových znaků**. Velikost genomu pozitivně koreluje s velikostí buněčného jádra, s velikostí buňky (tzv. nukleotypický efekt), s dobou mitózy a meiózy, s velikostí semen. Naopak byla prokázána negativní korelace s morfologickou komplexitou mozku u žab a mloků nebo s rychlostí bazálního metabolismu u obratlovců. Zde se často uvádí jako příklad malý genom ptáků a netopýřů, tedy organismů s rychlým metabolismem při letu, v protikladu k malým genomům ryb, které estvivují za hypoxických podmínek.

3.11. Polyploidizace v linii obratlovců, rostlin a kvasinky

V linii **obratlovců** došlo zřejmě nejméně ke dvěma duplikačním celého genomu. S touto myšlenkou přišel již Susumo Ohno a tato hypotéza je označována jako hypotéza „2R“ (2 round). Ukázalo se, že některé genové rodiny mají 4 kopie zatímco u bezobratlých je přítomna pouze jedna kopie. V genomu člověka byly nalezeny dlouhé oblasti přítomné ve čtyřech kopiích. Zejména duplikace, která se datuje před 450 miliony let zřejmě napomohla vzrůstu komplexity a diverzifikaci obratlovců.

K podobným duplikačním došlo také v genomech **rostlin** před 100-200 miliony let. U *Arabidopsis thaliana* leží 60% genomu v duplikovaných oblastech. U rostlin je známa řada

tetraploidů (kukuřice, bavlna, brambor, zelí), hexaploidů (pšenice, chrysanéma) či oktoploidů (jahodník).

Je pozoruhodné, že dokonce i v genomu **kvasinky** bylo nalezeno 54 dlouhých duplikovaných segmentů, přičemž drtivá většina z nich si zachovala stejnou orientaci vzhledem k centroméře. Protože nebyly nalezeny žádné triplikované segmenty a příbuzné druhy (*Kluveromyces waltii* a *Ashbya gossypii*) tyto duplikace neobsahovaly, předpokládá se, že i u předků kvasinky došlo k polyploidizaci. Bylo také zjištěno, že některé z duplikovaných genů se vyvíjejí mnohem rychleji ve srovnání se svými homology u příbuzného druhu *Kluveromyces waltii*.

3.12. Genomová obezita rostlin a „big bang“ v genomu kukuřice

Narůstání genomů do obřích rozměrů je vlastností vyšších eukaryot. Přestože byly popsány různé mechanismy vedoucí ke zmenšování genomů (např. delece způsobené nerovnoměrnou rekombinací), zdá se, že převažují procesy vedoucí k zvětšování genomů. Tento trend je zřejmý především u rostlin, kde se někdy mluví o jednosměrném procesu vedoucím k **obezitě** rostlinných genomů. V mnoha případech bylo prokázáno, že k explozím šíření retroelementů došlo dokonce pouze v průběhu posledních několika milionů let, což je v evolučním měřítku pouhý okamžik.

Nedávno bylo např. prokázáno, že u **kukuřice** došlo v průběhu posledních 6 milionů let k **periodickým explozím retroelementů**, jejichž počet dosáhl několika desítek tisíc kopií. Je pozoruhodné, že nové kopie retroelementů byly téměř vždy včleněny do již existujících retroelementů. To lze chápat jako obranu proti negativnímu působení přírodního výběru. Existují však i mobilní elementy, které se vyskytují nejčastěji poblíž nebo uvnitř genů. Některé druhy se dokáží bránit okupaci svých genomů retroelementy, nebo je dokáží dokonce ze svého genomu aktivně odstraňovat, a tak si zachovávají štíhlou linii. Základním dosud známým mechanismem je metylace retroelementů, což vede k jejich „**umlčení**“ a znemožnění jejich dalšího šíření po genomu.

Genom zřejmě disponuje i mechanismy **aktivního odstraňování** některých svých oblastí, čímž se brání růstu velikosti. Tyto mechanismy jsou na bázi rekombinace a důležitou roli zde zřejmě hrají rozptýlené repetice, které se nacházejí na různých místech genomu. Mezi nimi pak dochází k homologickému párování v procesu tzv. nerovnoměrného crossing-overu (unequal crossing-over). Pokud tyto dvě vzdálené repetice ležící na téže chromosomu, může dojít k deleci mezilehlé oblasti. Tento mechanismus je také někdy označován jako ektopická rekombinace a je možná klíčovým mechanismem vedoucím ke zmenšování velikosti genomů a alespoň částečně kompenzujícím jeho neustálý růst. Důsledkem rekombinačního odstraňování úseků DNA je existence osamělých dlouhých koncových repeticí, tzv. „**solo**“ **LTR**, retrotransponů. Původní retroelementy mají vždy dvě dlouhé koncové repetice (LTR) nacházející se na jejich koncích. Pokud mezi nimi dojde k rekombinaci a odstranění mezilehlé oblasti, zůstanou v genomu jako otisky dávných retrotransponových inzercí osamělé LTR. Dokonce se ukázalo, že mezi delšími LTR dochází k rekombinaci častěji, což způsobilo, že retrotransposony jsou selektovány tak, aby jejich LTR byly spíše kratší.

3.13. Proměnlivost velikosti genomu v rámci druhu

Ke změně obsahu DNA může dojít i v rámci téhož jedince, a to jak ke zvýšení tak i ke snížení obsahu DNA. Příkladem **zvýšení obsahu DNA** je endopolyploidie a polytenie. Dobře známý jsou polytenní chromosomy slinných žláz drozofily. U rodu *Daphnia* dochází ke tkáňově specifickým rozdílům v ploidii v rozmezí 2-2048C, což má vliv na velikost vajíčka a na morfologii hlavy indukovanou predátorem. U *Bombyx mori* se nacházejí polyploidní buňky

(1 000 000x) ve žlázách produkujících hedvábí. I zde existuje korelace mezi ploidií a velikostí buňky.

Ke **snížení obsahu DNA** může dojít v některých somatických buňkách u nematod, bičíkovci nebo dvoukřídých. Například somatické buňky u *Cyclops strenuus* mají pouze 5% obsahu DNA oproti oplozenému vajíčku. Nabízí se vysvětlení z hlediska „sobecké“ DNA, kdy je logická delece DNA ze slepé somatické linie a ne v zárodečné linii. Je to nádherný příklad toho, jak repetitivní DNA může významně ovlivnit genetické mechanismy svého „hostitele“. Pozoruhodné je i to, že dochází ke změně obsahu DNA během života jako odpověď na stimuly prostředí, což odpovídá spíše představám Lamarcka než Darwina.

3.14. Kolinearia (syntenie)

Srovnávací analýza genomů vedla k pozoruhodnému zjištění: pořadí genů v genových ostrovech je často konstantní, a to i u vzdálených druhů. Tomuto jevu se říká kolinearita nebo také syntenie. Existují pochopitelně menší či větší odchylky, které jsou způsobené různými lokálními přestavbami, jako je například převrácení pořadí genů, tzv. inverze DNA. Míra konzervativnosti pořadí genů je však někdy taková, že se geny do genetických map určitých oblastí dají zakreslovat v podobě soustředných kružnic, na nichž se v totožných polohách nacházejí totožné geny. To platí například pro obiloviny, a to i přesto, že se velikosti jejich genomů za pouhých 60 milionů let evoluce, které je dělí od společného předka, dramaticky rozrůznily. Vždyť genom rýže je velký pouhých 430 Mbp, zatímco ječmen má 2600 Mbp a pšenice se dokonce honosí obřím genomem o velikosti 14 000 Mbp. Je pozoruhodné, že ani takové množství repetitivní DNA tvořící 80% genomu (případ pšenice) nezpůsobilo erozi původního pořadí genů. Současná genomika kolinearity genů s úspěchem využívá při mapování genomů. Informaci o polohách genů získanou z malého genomu, který je již osekvenován, lze použít při studiu velkého genomu, jehož sekvenování je zatím neekonomické. Takto lze extrapolovat i mnohé známé genové funkce, čímž se otvírá široké pole aplikací například při vytváření rostlin rezistentních k patogenům či při léčbě lidských nemocí.

Zatímco struktura dlouhých úseků (makrokolinearita) bývá často značně konzervativní, mikrostruktura (**mikrokolinearita**) je **více dynamická**. Zejména polyploidizace značně urychlí evoluci této mikrostruktury. Byly prokázány rozdíly (např. duplikace genů, inverze) u druhů, které divergovaly před pouhými několika miliony let. Rozdíly lze pozorovat dokonce i mezi různými ekotypy téhož druhu, zejména pokud jde o oblasti podléhající rychlé evoluci. Takovou oblastí je u *Arabidopsis thaliana* např. oblast rezistence k patogenu *Peronospora parasitica*, jejíž struktura se značně liší mezi ekotypy Lansberg erecta a Columbia, kde došlo k rozrůznění v důsledku duplikací genu RPP5, přeměně řady jeho kopií v pseudogeny a k akumulaci mobilních elementů. Je logické, že oblast rezistence k patogenu, která je klíčová z hlediska přežití organismu, podléhá rychlejší evoluci.

Mechanismy výše uvedených chromosomových přestaveb fungují zřejmě na bázi rekombinace DNA, tedy zlomu a znovuspojení (crossing-over). Tak dochází k delecím, duplikacím, inverzím i translokacím.

3.15. Distribuce genů v genomech

Zatímco v malých genomech eukaryot jsou geny v přibližně konstantních vzdálenostech (např. u rostliny *Arabidopsis thaliana* je to vzdálenost asi 5 kb), u velkých genomů je tomu jinak. Geny nejsou rozloženy rovnoměrně, nýbrž se shlukují do určitých oblastí. Tvoří tak jakési ostrovy genů uprostřed moře ostatní DNA, většinou repetitivní a méně probádané. Tyto genové ostrovy se často nacházejí poblíž konců chromozomů. Ukázalo se, že vzdálenosti mezi jednotlivými geny v těchto shlucích jsou podobné vzdálenostem mezi geny v malých genomech. To je v rozporu s původním očekáváním, že ve velkých genomech budou mezi

jednotlivými geny jednoduše ve větších vzdálenostech. Shluky genů tak připomínají shluky hvězd v galaxiích oddělených navzájem černou hmotou tvořenou převážně starobylými mobilními sekvencemi DNA, retroelementy. Je pozoruhodné, že nové kopie retroelementů se téměř vždy včleňují do již existujících retroelementů, neboť inserce do genů by mohla být pro jejich hostitele a potažmo i pro samotné retroelementy fatální. Až hlubší analýza dat pocházejících z genomových projektů ukáže, zda snad neexistuje analogie s chováním galaxií, totiž, zda se v důsledku insercí retroelementů do jiných retroelementů geny nevzdalují v genomu tím rychleji, čím jsou od sebe více vzdáleny. Nezapomeňme však, že genom je sice tvořen lineárními molekulami DNA (jejich počet odpovídá počtu chromozomů), ale pro fungování genomu je klíčové jeho dynamické trojrozměrné uspořádání.

3.16. Izochory

Genom má mozaikovou strukturu tvořenou různými segmenty DNA a připomíná tak fraktály – obrazce jejichž vzhled je podobný bez ohledu na použité měřítko (rozlišení). Podle **izochorového modelu** jsou genomy obratlovců a rostlin (a možná i nižších eukaryot) tvořeny segmenty o délce přibližně 300kb s charakteristickým zastoupením bází odlišným od sousedních segmentů. Průběh obsahu bází, např. GC obsah, tak má skokovitý charakter, zahrnující oblasti s víceméně stejným obsahem, který prudce přechází do oblasti s odlišným obsahem. S touto představou přišel již v 60. letech Giorgio Bernardi a dlouho poté byla předmětem bouřlivých debat. V genomu člověka se rozlišuje pět oblastí – L1 a L2 s nízkým obsahem GC, a oblasti H1, H2 a H3 s vysokým GC-obsahem. Je pozoruhodné, že oblast H3 tvoří jen 3% genomu a obsahuje 25% genů.

Existence izochor se vysvětluje nejčastěji třemi možnými **mechanizmy** – mutačním biasem, selekcí a genovou konverzí. **Mutační** představa tvorby izochor vychází z toho, že včleňování nukleotidů při replikaci je ovlivněno koncentrací volných nukleotidů, ta zase závisí na poloze v jádře a dále je známo, že různé části genomu jsou replikovány v různou dobu. Výsledkem je pak odlišný obsah bází v určitých částech genomu. Dalšími příbuznými mechanismy může být různá účinnost reparace DNA a také deaminace cytosinu na uracil, která je častější v AT-bohatých oblastech. Podle jiné teorie izochory nevznikají aktivně mutacemi, ale jsou až výsledkem **selekce**. Ta například může působit na úrovni teplotní stability DNA. Představu selekce podporuje srovnání starých a mladých insercí mobilních Alu elementů u člověka. Ukázalo se, že zatímco mladé Alu elementy jsou GC-chudé, staré Alu elementy jsou naopak GC-bohaté, což se vysvětluje právě selekcí. Posledním mechanismem, kterým vědci vysvětlují tvorbu izochor, je **genová konverze**. Je to proces na bázi rekombinace, kdy je určitá oblast DNA (např. alela) přeměna (konvertována) na jinou podle určitého vzoru za vzniku dvou totožných oblastí. Výsledkem je homogenizace těchto oblastí. Představa, že genová konverze se může podílet na tvorbě izochor pramení z poznatku, že existuje korelace mezi frekvencí rekombinace a obsahem GC, což vede ke zvyšování GC-obsahu. V oblastech, které přestaly rekombinovat, dochází k poklesu GC obsahu, což bylo pozorováno u některých genů na chromosomu Y.

Kapitola IV.: EVOLUCE GENŮ

- 4.1. Historie konceptu genu
- 4.2. Definice genu, typy genů, složené geny
- 4.3. Základní struktura genu
- 4.4. Velikosti genů, počty a velikosti exonů a intronů
- 4.5. Alternativní sestřih a kuriózní uspořádání genů
- 4.6. Jsou introny evolučně staré anebo mladé struktury?
- 4.7. Genové rodiny, pseudogeny, orfony
- 4.8. Počty genů v genomech
- 4.9. Nekódující RNA (ncRNA), miRNA, siRNA, RNAi
- 4.10. Vznik nových genů, úloha duplikací v evoluci genomů
- 4.11. Geny nedávno vzniklé na příkladu genů *jingwei*, *sphinx*, *Sdic* a AFGP
- 4.12. Vznik AFGP genu a konvergentní evoluce
- 4.13. Vznik nových genů štěpením a fúzí
- 4.14. Vznik nových genů řízenou evolucí
- 4.15. Horizontální genový přenos

4.1. Historie konceptu genu

V dnešní době chápeme gen jako základní funkční jednotku genetické informace zapsanou v sekvenci nukleotidů DNA nebo RNA. Když Mendel postuloval zákony pro přenos genů z rodičů na potomky sám ještě nepoužíval termín geny, ale hovořil o faktorech, které určují určité vlastnosti či znaky. Na počátku 20. století Morgan ukázal, že geny se nacházejí ve vazbových skupinách odpovídajících chromosomům a že jsou na chromosomu uspořádány lineárně za sebou. Roku 1928 Griffith proslulými transformačními experimenty na bakteriích prokázal, že geny lze přenášet z bakterie na bakterii. Jako substance zodpovědná za přenos genů byla identifikována DNA (Avery, MacLeod, McCarthy, 1944, Hershey a Chaseová, 1952). To znamenalo pád dosud uznávané proteinové hypotézy genu - Caspersonovy teorie, podle níž je třeba hledat chemickou podstatu genu ve struktuře proteinů, neboť DNA obsahující pouze čtyři nukleotidy genetickou informaci nést nemůže (tetranukleotidová teorie DNA). V roce 1941 Beadle a Tatum ukázali, že mutace v genech mohou vést ke změnám v metabolických drahách a formulovali hypotézu „jeden gen – jeden enzym“, podle níž jednotlivé geny kódují jednotlivé proteiny. Roku 1953 byla objasněna struktura DNA (Watson a Crick), na jejímž základě bylo možné vysvětlit základní funkce genu – kódování informace, replikaci a mutabilitu. Následně byla objevena řada různých druhů molekul RNA a Francis Crick formuloval centrální dogma molekulární biologie (genetická informace se přenáší ve směru DNA-RNA-protein) a teorie proteosyntézy (Crick 1958). V témže roce byl podán experimentální důkaz semikonzervativní replikace (Meselson a Stahl 1958) a v roce 1961 navržena operonová teorie (Jacob a Monod, 1961). V průběhu 60. let byl rozluštěn genetický kód (Nirenberg, Khorana, Ochoa, 1966) a v podstatě položeny základy nového oboru – molekulární biologie. Na počátku 70. let byly zkonstruovány první rekombinantní molekuly DNA a začala tak éra genového inženýrství (Cohen, 1973) trvající dodnes. Během 90. let se postupně zformoval další nový obor - genomika - studující geny v kontextu celých genomů. V rámci tzv. genomových projektů byla poznána kompletní genetická informace celých genomů, nejprve virů, později bakterií a následně mnoha eukaryotických organismů počínaje kvasinkami až po rostliny a živočichy včetně člověka a šimpanze.

4.2. Definice genu, typy genů, složené geny

Geny jsou základními funkčními jednotkami genetické informace. Vyskytují se jako strukturální geny kódující primární strukturu polypeptidu nebo geny pro RNA, kódující transferovou nebo ribozomální RNA (tRNA, rRNA). Definice genu různých autorů se stále liší. Je jasné, že genem je vždy úsek nukleové kyseliny – DNA u všech autonomních forem života a jen u některých RNA virů je to molekula RNA. Podle nejširší definice se za gen považují všechny sekvence potřebné k syntéze funkční bílkoviny nebo molekuly RNA, tedy i oblasti regulační a signální. Podle jiných definic se genem rozumí sekvence přepisované (transkribované) z DNA do RNA. Konečně, podle nejužší definice jsou genem pouze sekvence, které přímo určují pořadí aminokyselin v proteinech nebo pořadí nukleotidů ve funkčních molekulách RNA (posttranskripčně upravených molekulách tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, miRNA atd).

U většiny eukaryotických genů není informace zapsána v souvislém sledu nukleotidů, ale je rozdělena do částí kódujících a nekódujících proteiny. Jedná se o tzv. **složené geny**, tvořené exony a introny. Exony (název pochází z „expressed sequence“) jsou úseky, jejichž transkripty jsou po sestřihu RNA v mRNA zachovány. Naopak introny (název pochází z „intervening sequence“) jsou z primárního transkriptu vyštěpeny procesem sestřihu. Sestřih probíhá za účasti ribonukleoproteinových částic označovaných jako snRNP (viz kapitola II „Relikty světa RNA“), při čemž dojde k vychlípení intronu v podobě smyčky a ke spojení sousedních exonů. Některé introny – introny I., II. a III. skupiny – jsou považovány za ribozymy - katalyticky aktivní molekuly RNA, schopné samostatného sestřihu (viz kapitola I „Vznik života“). Introny se nacházejí nejen v jaderných genech kódujících proteiny, ale i v genech pro rRNA a tRNA, a také v mitochondriálních genech nižších eukaryot. Introny byly nalzeny i v genech bakterií a bakteriofágů. V prokaryotických genomech jsou však vzácné, nacházejí se pouze v genech pro tRNA a rRNA a to se jedná o samovystřihující se introny I. a II. skupiny.

4.3. Základní struktura genu

Mezi geny prokaryot a eukaryot existují značné rozdíly. Hlavním rozdílem je kromě přítomnosti intronů v genech eukaryot uspořádání prokaryotických genů do operonů – jednotek obsahujících několik genů, které jsou transkribovány najednou. Před genem se nachází regulační sekvence - promotor. Na promotor se váže RNA polymeráza zajišťující transkripci přilehlého genu. Promotor obsahuje konvenční sekvence TATAA v oblasti -10 (označuje se také jako Pribnowův box) a sekvenci TTGACA v oblasti -35. Síla promotoru určuje intenzitu transkripce a závisí na tom, jak se promotor podobá uvedeným konvenčním sekvencím. Místo zahájení transkripce a zahájení translace nejsou shodná. Oblast mezi 5-koncem mRNA a místem zahájení translace (prvním kodonem) se označuje jako vedoucí sekvence. Vedoucí sekvence obsahuje tzv. Shine-Dalgarnovu sekvenci (AGGAGG), pomocí níž se následně mRNA váže na 16S rRNA ribozómu. Podobná netranslatovaná sekvence se nachází i na 3-konci transkriptu a označuje se jako koncová sekvence. Za vedoucí sekvencí následují jednotlivé geny. Ty jsou vždy vymezeny iniciačním a terminačním kodonem. Jak bylo uvedeno výše u prokaryot transkript obsahuje více genů. Tak jako se na začátku transkripční jednotky se nachází promotor, na jejím konci leží terminátor. Terminátor zajišťuje zakončení transkripce genu a uvolnění transkriptu a RNA polymerázy z matricového DNA řetězce. Existují dva typy terminátorů lišící se tím zda jsou nebo nejsou závislé na tzv. Ró-faktoru (rho factor), proteinu důležitém pro uvolnění RNA polymerázy z DNA. Terminátorová sekvence RNA obsahuje obrácené repetice, což umožní intramolekulární párování komplementárních bází a vznik terminátorové vlásenky se smyčkou. Terminátory nezávislé na Ró faktoru obsahují za vlásenkou úsek tvořený několika uracily. V některých případech může dojít k předčasné terminaci – tzv. atenuaci. Některé geny obsahují ve své

vedoucí sekvenci (na 5-konci genu) sekvenci, která po přepisu do RNA může za určitých podmínek vytvořit smyčku s vlásenkou – atenuátor – která předčasně zastaví transkripci.

4.4. Velikosti genů, počty a velikosti exonů a intronů

Zatímco exony jsou dlouhé většinou jen několik stovek bází, introny mohou dosahovat délek až desítek tisíc bází a tvoří tak podstatnou část délky genu. **Velikost genu** se pohybuje většinou v kilobázích u nižších eukaryot (většinou do 2kb) a v jednotkách až desítkách kilobází u živočichů. Geny rostlin jsou ve srovnání s geny živočichů kratší. Značné délky některých genů jsou způsobeny přítomností dlouhých intronů, neboť součet kódujících úseků, resp. délka mRNA, jsou podobné u dlouhých i krátkých genů. Za příklad **extrémně krátkého genu** lze považovat bakteriální antibiotikum mikrocín C7 dlouhý 21 nukleotidů, který je nesen plazmidem bakterie *E. coli* a kóduje oligopeptid o sedmi aminokyselinách. Tento gen je transkribován spolu s dalším mikrocínovým genem, translatován je však jako samostatný gen. Translace začíná zařazením N-formylmethioninu jako u všech pravých bakteriálních bílkovin. Pozoruhodná je i konzervativita exonů ve srovnání s variabilitou intronů, čehož se využívá i při hledání exonů.

Počet exonů resp. intronů vzrůstá s rostoucí složitostí organismů. Zatímco kvasinka má jen několik procent genů složených, u zástupce hmyzu *Drosophila melanogaster* většina genů obsahuje introny a u savců je přes 90% genů složených, obsahujících často i desítky intronů. **Délky exonů** jsou mnohem nižší oproti délkám celých genů a většina nepřesahuje 100 aminokyselin, což platí zejména u obratlovců a rostlin. Většinu z celkové délky genů tedy tvoří **introny**. Jejich délka se pohybuje v rozmezí od několika stovek bází, tedy délka srovnatelná s délkami exonů, až po desítky kilobází. Extrémním případem je lidský gen pro dystrofin dlouhý 2,4Mb obsahující desítky intronů z nichž nejdelší má 32kb. Zatímco u savců jsou mnohdy v genech desítky exonů, u hmyzu jejich počet většinou nedosahuje deseti.

4.5. Alternativní sestřih a kuriózní uspořádání genů

Pojem exonů a intronů je relativní a úsek, který je v jednom případě exonem může být jindy intronem a naopak. Určitý úsek DNA může být v závislosti na čase a místě (např. různé tkáně nebo pohlaví) sestřižen různým způsobem za vzniku odlišných produktů. Jedná se o tzv. **alternativní sestřih**. Kombinací velkého počtu exonů a intronů lze vytvořit obrovské množství různých produktů. Podobný proces, kde však k této kombinaci dochází již na úrovni DNA, se uplatňuje při tvorbě protilátek (VDJC rekombinace). K alternativnímu sestřihu je nutné ještě připočíst skutečnost, že transkripce může začínat i končit na různých místech téhož úseku DNA. Při transkripci se využívají alternativní promotory, které mohou měnit 5'-konec transkriptu, anebo naopak se uplatňují alternativní terminátory, určující různá místa jeho 3'-konce.

Příklady **kuriózního uspořádání genů** jsou jednak překrývající se geny, které se občas vyskytují v kompaktních genomech virů a vzácně i v genomech vyšších organismů; dále jsou to geny nacházející se v intronech jiných genů. Gen hrající roli při neurofibromatose I. typu (neurofibromatosis type I gene) má dlouhý intron, v němž se nacházejí tři další krátké geny (OGMP, EVI2B a EVI2A), každý z nichž má také svůj intron. Tyto geny jsou přepisovány v opačné orientaci než gen v němž leží.

4.6. Jsou introny evolučně staré anebo mladé struktury?

Existují protichůdné názory na to, zda **introny** jsou struktury **starobylé** či **mladé**. Skutečnost, že se introny vyskytují u eukaryot a chybí u prokaryot lze totiž vysvětlit dvěma způsoby. Buď se včlenily až do genů eukaryot nebo byly z genů rychle se dělicích prokaryot odstraněny. Většina vědců se dnes kloní k představě, že introny jsou starobylé struktury, které

jsou součástí genomů již miliardy let. Některé nejnovější názory však poukazují na to, že introny jsou původně parazitické elementy, které se včlenily do genů eukaryot až nedávno.

Na jedné straně stojí názory, podle nichž jsou introny evolučně **mladé struktury**. V rámci této představy se lze dále na introny dívat také z jiného úhlu, zda jde o elementy pro hostitelský genom nějak užitečné nebo naopak se jedná o parazitické elementy. Podle jedné představy jsou introny **genomoví parazité**, kteří buňce nepřinášejí žádný užitek. Kopírují se v genomu z místa na místo a protože nekódují virový kapsid (jako např. retroviry) nemohou se šířit horizontálně, ale pouze v rámci téhož genomu a v populaci pak vertikálně z rodičů na potomky. Z tohoto pohledu je sestřih mechanismem zajišťujícím, aby introny nezabíjely buňku. Spliceosom – komplex zajišťující vystřižení intronů - je sice kódován buňkou, původně se však mohlo také jednat o autonomní parazitické elementy typů virů nebo transposonů.

Podle jiných představ jsou introny svým **genomům užitečné**. Nejčastěji se mluví o pozitivním vlivu na rychlost evoluce, podle některých autorů dokonce vznik intronů stojí v pozadí vzniku eukaryot. Je zřejmé, že existence exonů a intronů dává genomům stavebnicový charakter umožňující kombinovat jednotlivé strukturní a funkční domény procesem genové rekombinace. V opačném případě, u genů bez intronů, by k rekombinaci docházelo v libovolné místě, což by vedlo k nefunkčním produktům. Další výhoda intronů může souviset s existencí histonů u eukaryot. Na nich jsou totiž navinuty dlouhé úseky DNA, které jsou nepřístupné pro regulační proteiny. Introny mohou posunout regulační oblasti tak, aby mohly s těmito proteiny interagovat. Introny mohou hrát i důležitou roli tím, že brání potenciálně fatálním důsledkům nelegitimní rekombinaci. Při ní dochází ke genetické výměně mezi homologickými oblastmi, které se nacházejí v různých lokusech, např. paralogních genech. Tomu lze zabránit právě vložením intronů do různých pozic jinak homologických genů.

Na druhé straně stojí názory, považující **introny za struktury staré**, přítomné již v primitivních genech. Tuto představu podporuje zjištění, že některé sekvenční motivy se nacházejí v genech bez ohledu na přítomnost exonů a intronů. To, že tyto často starobylé motivy přesahují hranice exonů a intronů, spíše svědčí o jejich současném vzniku. Diferenciace původní souvislé sekvence na introny a exony může umožnit kódovat delší proteinové řetězce nepřerušované terminačními kodony.

4.7. Genové rodiny, pseudogeny, orfony

Většina genů se v genomu vyskytuje v jedné kopii případně několika málo kopiích. Některé geny se však v genomu **mnohonásobně opakují**, uspořádané v tandemu na témže chromosomu. Jedná se o geny, jejichž produkty buňka potřebuje ve značném množství – histony a geny pro ribozomální RNA (rRNA). Například obojživelníci, jejichž embryonální vývoj je extrémně rychlý, mají mnohonásobně vyšší počet kopií genů pro histony, než ptáci a savci, jejichž buňky se v embryonálním stádiu tak rychle nedělí.

V některých případech může dojít k sekvenční divergenci jednotlivých kopií tandemově uspořádaných genů. Pak se jedná o **genovou rodinu**, což je skupina sekvenčně podobných genů majících společný evoluční původ a stejnou biologickou funkci. Často jsou geny jedné rodiny exprimovány v různých stádiích vývoje organismu. Nejznámějšími zástupci jsou geny pro syntézu globulinů, aktinu, ovalbuminu. Několik příbuzných rodin může tvořit nadrodiny. Pokud se člen genové rodiny nachází ojedinele v genomu v místě vzdáleném od ostatních členů rodiny, hovoříme o tzv. **orfonech** (orphan – sirotek).

Za členy genové rodiny jsou považovány i tzv. **pseudogeny**, neaktivní kopie původně funkčních genů. Za pseudogen se často označuje sekvence homologická s genem, která však nekóduje funkční produkt. To ale neznamená, že pseudogen nemůže plnit nějakou funkci. Byl popsán kuriózní případ, kdy byl pseudogen exprimován a ovlivňoval stabilitu RNA svého funkčního homologa a fungoval tak tedy jako důležitá regulační RNA. Pseudogeny vznikají

buď duplikací původního genu a následnou degenerací jedné kopie, tento pseudogen není upraven posttranskripčními úpravami a obsahuje tedy i intronové sekvence. Druhou možností je vznik pseudogenu retrotranspozicí, kdy takto vzniklý pseudogen introny neobsahuje. Je zajímavé, že „poločas rozpadu“ genů je delší u rostlin než u živočichů. Například v genomu člověka se nachází asi 19 000 pseudogenů.

4.8. Počty genů v genomech

Počty genů v genomech zhruba odrážejí komplexitu organismu. Virové genomy obsahují jednotky až desítky genů, maximálně něco přes 100 genů. Prokaryotické genomy nesou od několika stovek (*Mycoplasma genitalium* – 470 genů) do několika tisíc genů (*E. coli* – 3000 genů). Nižší eukaryota obsahují tisíce genů (kvasinka 6000 genů), vyšší eukaryota desítky tisíc genů.

Přečtení kompletní informace genomů několika vyšších eukaryot ukázalo, že různé organismy mají **podobné počty genů**, a to i přesto, že byly v evoluci separovány po stovky milionů let. Člověk má 20 000 – 40 000 genů, ostatní obratlovci mají genů o něco méně, červ *Caenorhabditis elegans* a moucha *Drosophila melanogaster* mají do 20 000 genů. Vzhledem k tomu, že některé geny se vyskytují ve více kopiích a tvoří genové rodiny, se zdá, že přibližně 10 000 typů proteinů vytváří kompletní proteinovou sadu (tzv. proteom) jakékoliv mnohobuněčného organismu.

4.9. Nekódující RNA (ncRNA), miRNA, siRNA, RNAi

Velké pozornosti se v poslední době těší tzv. **nekódující RNA molekuly** (ncRNA), které byly identifikovány jak experimentálně tak i nalezeny v genomových databázích pomocí nástrojů bioinformatiky. Podle některých by mohly tyto molekuly RNA představovat komplexní regulační systém paralelní s regulačními systémy na bázi proteinů. Jejich existence by také mohla vysvětlit i vyšší složitost savců oproti nižším organismům (hmyz, červi) při zachování podobného počtu genů. Nejznámějšími představiteli nekódujících molekul RNA jsou **miRNA** (microRNA) a **siRNA** (small interfering RNA). Jedná se o dvouřetězcové molekuly RNA o délce 21-26 párů bází, které vznikají z delších dvouřetězcových RNA prekurzorů štěpením enzymem označovaným jako Dicer. Pracují pak v kombinaci s proteiny vázícími se na RNA za vzniku komplexu označovaného jako RISC (**R**NA **i**nduced **s**ilencing **c**omplex). Jak miRNA tak i siRNA při svém fungování využívají mechanismu protismyslné (antisense) nukleové kyseliny, a tak sekvencně-specificky inhibují translaci či integritu cílové mRNA. Tento jev se nazývá **RNA interference (RNAi)** a uplatňuje se při širokém spektru procesů od odpovědi na patogenní exogenní i parazitické endogenní nukleové kyseliny přes genovou regulaci až po ovlivňování struktury chromatinu; od regulace počtu bakterií až po inaktivaci chromosomu X u savců.

4.10. Vznik nových genů, úloha duplikací v evoluci genomů

Nový gen vzniká ve většině případů z jiného genu. Důsledkem toho je skutečnost, že geny se často vzájemně podobají. Podobné geny pak tvoří rodiny a nadrodiny, které je možné řadit do genealogických stromů. V genomech vyšších eukaryot se nachází 10-40 tisíc genů. Naproti tomu, počet exonů, z nichž jsou tyto geny tvořeny, se pohybuje v řádech stovek nebo maximálně tisíců, je tedy výrazně nižší. Ještě nižší bude zřejmě počet tzv. genových modulů, ještě kratších jednotek tvořících exony.

Byla popsána řada **mechanismů vzniku nových genů**. Hlavními je duplikace genů, kdy si jedna kopie zachová původní funkci a druhá kopie získá funkci novou. Tento proces se nazývá neofunkcionalizace. Ve většině případů se však druhá kopie stane nefunkčním pseudogenem, který sbírá mutace a degeneruje. Jedná se o tzv. pseudofunkcionalizaci. Pouze výjimečně druhá kopie kóduje užitečný produkt. Rozdíly jsou také v tom, jak rychle

duplikovaná kopie genu získá novou funkci, zda rychle nebo až po delší době. Nový gen může vznikat i pouhým přeskupováním svých vnitřních částí – exonů – nebo duplikací exonů. Při tzv. subfunkcionalizaci mutace poškodí odlišné části dvou kopií genu, takže výsledný produkt vznikne komplementací dvou neautonomních produktů, většinou se však jedná o subfunkcionalizaci na úrovni regulačních oblastí. Dalším mechanismem je transpozice a retropozice, které mohou způsobit, že přenesený gen nebo jeho část se dostanou do nového sekvenčního kontextu, např. do blízkosti jiných regulačních sekvencí či přímo do jiného genu za vzniku fúzního genu. Nový gen může vzniknout i fúzí sousedních dvou genů a naopak jeden gen může být rozštěpen na dva geny. Organismy mohou získat geny i přenosem z jiných organismů, tzv. horizontálním neboli laterálním přenosem, což je běžné především u bakterií. Tento přenos může dokonce přeměnit neškodnou bakterii v patogenní. Ve vzácných případech mohou geny vznikat i de novo z původně nekódujících sekvencí, např. z intronů (např. gen *Sdic* u drozofily). Často však dochází při vzniku genů ke kombinování více mechanismů.

Pro geny stejného původu (homologní geny) se běžně používají termíny **paralogní a ortologní** geny neboli paralogy a ortology. Geny, které vznikly duplikací a následnou diverzifikací v rámci jednoho druhu se označují jako paralogy. Často mají odlišnou funkci. Naopak ortology jsou homologické geny u různých druhů mající společného předka a většinou plní podobné funkce.

Nejrychlejším způsobem zvýšení počtu genů v genomu je **duplikace celého genomu**. Chybou v meióze se mohou vytvořit diploidní gamety místo haploidních, a jejich fúzí vznikne polyploidní, v tomto případě tetraploidní organismus. Polyploidie je poměrně častá u rostlin. Podle některých názorů lze najít stopy duplikací genomů (před 200 a 80 miliony let) u všech dnešních rostlin. K obdobným duplikacím genomů došlo i v evoluci obratlovců. Kdysi dávno byl zdvojen i genom kvasinky. Následně po polyploidizaci může dojít k restrukturalizacím genomu, což může vést ke tvorbě nových genových komplexů, a tak ke zrychlení evolučních procesů. Polyploidizace je evolučně úspěšná snad i proto, že vede ke zvýšení počtu všech genů stejně, aniž by tak výrazně ovlivňovala rovnováhu mezi geny. Přestože byly popsány i mechanismy vedoucí ke zmenšování genomů, zdá se, že navrch mají procesy vedoucí k jejich zvětšování.

4.11. Geny nedávno vzniklé na příkladu genů *jingwei*, *sphinx*, *Sdic*

V roce 1990 byl objeven u skupiny afrických drozofil objeven nově vzniklý gen. Byl pojmenován ***jingwei***. Tento gen vznikl před 2 miliony let u předka dvou druhů drozofil *D. yakuba* a *D. teissieri*. Základem pro vznik nového genu byl gen *yellow-emperor*. Ten se zdublikoval, jedna kopie zůstala aktivní a do třetího intronu druhé kopie se retrotranspozicí přenesl (jako fúzní exon) gen *Adh*, který kóduje alkoholdehydrogenázu. Gen *Adh* si nesl vlastní terminační signál na 3-konci. Exony původního genu *yellow-emperor* ležící napravo od včleněného genu pro *Adh* proto zdegenerovaly. Tak vznikl nový gen označený jako *jingwei*. Jedná se o krásný příklad dokládající kombinaci exonů původně dvou různých genů, čímž vzniká nová struktura proteinu. Také to dokládá, že původní gen musel být duplikován, aby byla druhá kopie volná pro evoluční experiment vedoucí ke genu s novou funkcí. Skutečnost, že k fúzi genů došlo v intronu, svědčí o jejich úloze při vzniku nových genů mechanismem kombinace exonů. Gen byl pojmenován po princezně Jingwei, dceři prvního čínského císaře Yandeho. Ta velmi ráda plavala až se jednou utopila při koupání v moři a poté se převtělila v krásného ptáka, který se snažil zabránit tragedii jiných tím, že nosil do moře kamínky. Gen *jingwei* byl totiž nejprve považován za nefunkční pseudogen a až po nějaké době se „převtělil“ do nového funkčního fúzního genu.

Podobným příkladem vzniku nového genu je gen ***Sphinx*** (*spx*) u *D. melanogaster*, jehož stáří je pouhé 2 miliony let. Ke vzniku genu *sphinx* došlo tak, že genu pro ATPázový řetězec

F se včlenil do genu pro RNA. Tento příklad dokládá, že vzniku nových genů se účastní nejen geny kódující proteiny, ale i geny pro RNA.

Gen *Sdic* je nově vzniklý gen u *D. melanogaster*, který vznikl fúzí genu *AnnX* pro annexin a genu *Cdic*, který kóduje polypeptidový řetězec cytoplazmatického dyneinu. Fúzí se spojil čtvrtý exon genu *AnnX* se třetím intronem genu *Cdic*. Dostaly se tak do blízkosti tři potenciální promotory, které mohou zajišťovat expresi specifickou pro varlata. Dva jsou odvozeny z genu *AnnX* a jeden z intronu genu *Cdic*. Fúzní gen *Sdic* se nachází v tandemově uspořádaných deseti kopiích ležících mezi rodičovskými geny *Cdic* a *AnnX*. Tyto geny se nacházejí na chromosomu X. Vznik genu *Sdic* představuje příklad, kdy ke vzniku nového genu vedla duplikace původních genů, jejich fúze a následný vznik nových promotorů zajišťujících tkáňově specifickou expresi. Fúzí vznikl nový exon kódující N-konec peptidu. Ke vzniku genu došlo před méně než 3 miliony let.

4.12. Vznik AFGP genu a konvergentní evoluce

Dalším příkladem zajímavého vzniku nového genu je vznik genu pro nemrznoucí glykoprotein, **AFGP** (antifreeze glycoprotein). Byl objeven u ryb žijících v polárních oblastech, jak v Antarktidě tak i v Arktidě a má odlišné formy – antarktickou a arktickou. Jedná se o protein, který brání růstu krystalů ledu a tím zmrznutí krve. Antarktický AFGP vznikl před asi 10 miliony let, právě v době, kdy došlo k prvnímu zamrznutí polárních oblastí. Arktický AFGP vznikl před 2.5 miliony let. Přestože obě formy genu AFGP vznikly z různých genů, oba obsahují dlouhé úseky kódující tripeptid Thr-Ala-Ala, který váže ledové krystalky. Antarktický AFGP vznikl z funkčně zcela nepříbuzného genu pro trávicí enzym trypsinogen tak, že byly zachovány oblasti genu na 5'-konci a 3'-konci a uvnitř byl mnohonásobně amplifikován segment kódující tripeptid Thr-Ala-Ala, zřejmě v důsledku prokluzování polymerázy při replikaci genu. Naopak arktický AFGP nemá žádnou homologii s genem pro trypsinogen. Vznik genů AFGP je tak nádherným příkladem **konvergentní evoluce**. Tyto geny vznikly nezávisle z různých předků u velmi vzdálených organismů avšak evoluce je dovedla v podobných prostředích k podobnému výsledku.

4.13. Vznik nových genů štěpením a fúzí

V několika z mnoha kompletně osekvenovaných genomech byly sledovány homologické geny (ortology), které byly v některých genomech rozštěpeny do dvou či více genů, zatímco v jiných tvořily pouze jeden gen. Bylo zjištěno, že **počet genů vzniklých fúzí vzrůstal** s rostoucí velikostí genomů. V evoluci tedy zřejmě převládaly fúze genů nad jejich štěpením. Převaha fúzí nad štěpením je logická, protože pro organismus je výhodné také fyzické spojení funkcí, které spolu biologicky souvisejí.

Zvláštní postavení zaujímají **termofilní organizmy**, u nichž byl zjištěn zvýšený výskyt štěpení genů. Vysoká teplota a teplotní fluktuace totiž vedou k replikačním chybám a tím k vyšší frekvenci mutací, které způsobují rozštěpení genů. Rozštěpené geny mohou být také pouze adaptací k vyšším teplotám, vzhledem k častým chybám u termofilních organismů, jež jsou úměrné délce genu, je výhodnější rozdělit informaci do oddělených podjednotek tvořících proteinový komplex.

4.14. Vznik nových genů řízenou evolucí

Vědci se snaží připravit umělé geny, které by kódovaly proteiny s požadovanými vlastnostmi, anebo aptamery - molekuly RNA vážící se silně na některé proteiny. Hlavním přístupem jsou experimenty typu **SELEX**, kdy dochází k selekci (evoluci) in vitro. Představme si, že chceme získat molekulu RNA vážící se silně na určitý protein. V prvním kroku vezmeme požadovaný gen, který chceme „vylepšit“ z hlediska síly vazby jeho RNA na určitý protein a tuto sekvenci amplifikujeme pomocí PCR. Použijeme přitom však polymerázu, která dělá často chyby, čímž

vznikne populace vzájemně se lišících molekul DNA. Tyto molekuly poté přepíšeme do molekul RNA a necháme je navázat na imobilizované proteiny. Nejsilněji navázané molekuly RNA potom přepíšeme reverzní transkriptázou do DNA a použijeme na další kolo „chybující“ amplifikace. Tento cyklus generování chyb a selekce nejsilněji se vážících molekul mnohokrát opakujeme. Na konci tak získáme požadované molekuly RNA s nejsilnější vazbou na požadovaný protein. Podobným postupem byly například získány kmeny virů rezistentních k protilátkám hostitele, což je nutné pro úspěšnou genovou terapii. Horší by však bylo, kdyby se takové viry dostaly do rukou bioteroristů.

Dalším přístupem řízené evoluce jsou experimenty, při nichž se **smíchají dva homologické geny** pocházející z odlišných druhů s cílem získat rekombinantní protein s lepšími vlastnostmi než produkty původních dvou genů, například gen pro rezistenci k určitému antibiotiku. Výchozí geny se fragmentují a smíchají dohromady, čímž vznikne řada kombinací původních genů. Poté se pomocí polymerázy dosyntetizují chybějící úseky DNA, geny se vpraví do bakterie a selektují se klony s nejsilnější rezistencí. Takto byly připraveny extrémně účinné geny pro rezistenci k moxolactamu, kdy bakterie vlastní nový rekombinantní gen vykazovaly rezistenci ke 250x vyšším koncentracím antibiotika.

4.15. Horizontální genový přenos

Genetická informace se normálně přenáší s rodičů na potomky, tento proces se označuje jako vertikální genový přenos. Kromě toho občas dochází i k tzv. horizontálnímu (laterálnímu) genovému přenosu, kdy organizmem, na který se přenáší genetická informace není potomek dárce. Horizontální přenos je častý zejména u prokaryot, vyskytuje se však i u eukaryot. Je to další mechanismus, kterým organismus získává nové geny.

U bakterií si mohou vyměňovat svoji genetickou informaci často i velmi vzdálené druhy. Jedná se například o přenos rezistence k antibiotikům. Někteří badatelé hovoří dokonce o tom, že bakterie žijící v určitém prostředí mohou vlastnit dohromady určitý soubor (pool) genů, který si podle potřeby vzájemně půjčují. Jsou známy tři hlavní mechanismy horizontálního přenosu u bakterií – transformace, transdukce a konjugace. **Transformace** spočívá v přijetí (absorbci) čisté DNA nacházející se v prostředí, při **transdukcii** je přenašečem cizorodé DNA virus (bakteriofág), a při **konjugaci** si bakterie vyměňují genetickou informaci při vzájemném kontaktu.

Horizontální přenos **u eukaryot** spočívá v přenosu genů z genomů chloroplastů a mitochondrií do jádra. Tyto orgány byly podle endosymbiotické teorie původně volně žijící bakterie podobné sinicím (předchůdci chloroplastů) a alfa-proteobakteriím (předchůdci mitochondrií). DNA přenesená z organel do jádra se označuje jako **promiskuitní DNA**. Dochází také k přenosu genů z bakterií na některé houby, např. kvasinku *Saccharomyces cerevisiae* nebo z endosymbiotické bakterie *Wolbachia* na hostitelské druhy hmyzu. *Wolbachia* je dokonce schopna tímto přenosem ovlivnit fenotyp napadeného jedince – zabíjí samečky nebo mění samčí pohlaví na samičí. V genovém inženýrství se často využívá fenoménu přenosu části Ti plazmidu (T-DNA) z bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nebo *A. rhizogenes*, jež se zabudovává do genomu hostitelských rostlin. Jsou známy i případy, kdy se na horizontálním přenosu podílely mobilní genetické elementy – transposony a retrotransposony (např. retroviry). Ke konstrukci fylogenetických stromů u bakterií se často využívá genu pro 16S rRNA, protože tato sekvence je velmi konzervativní mezi různými druhy a současně dostatečně variabilní, aby bylo možné měřit rozdíly a evoluční vzdálenosti. Ukázalo se však, že i tato sekvence podléhá v některých případech horizontálnímu genovému přenosu a v některých případech musejí být evoluční stromy přehodnoceny.

Je tedy zřejmé, že přírodní genetické inženýrství, kdy dochází k výměně genetické informace mezi často i velmi vzdálenými druhy, je v přírodě časté. Měli bychom tedy spíše

než o stromu života hovořit o síti života, kde horizontální genový přenos představuje příčné spojky mezi hlavními evolučními větvemi.