

Evoluční genomika

Eduard Kejnovský

Kapitola II.: Relikty světa RNA



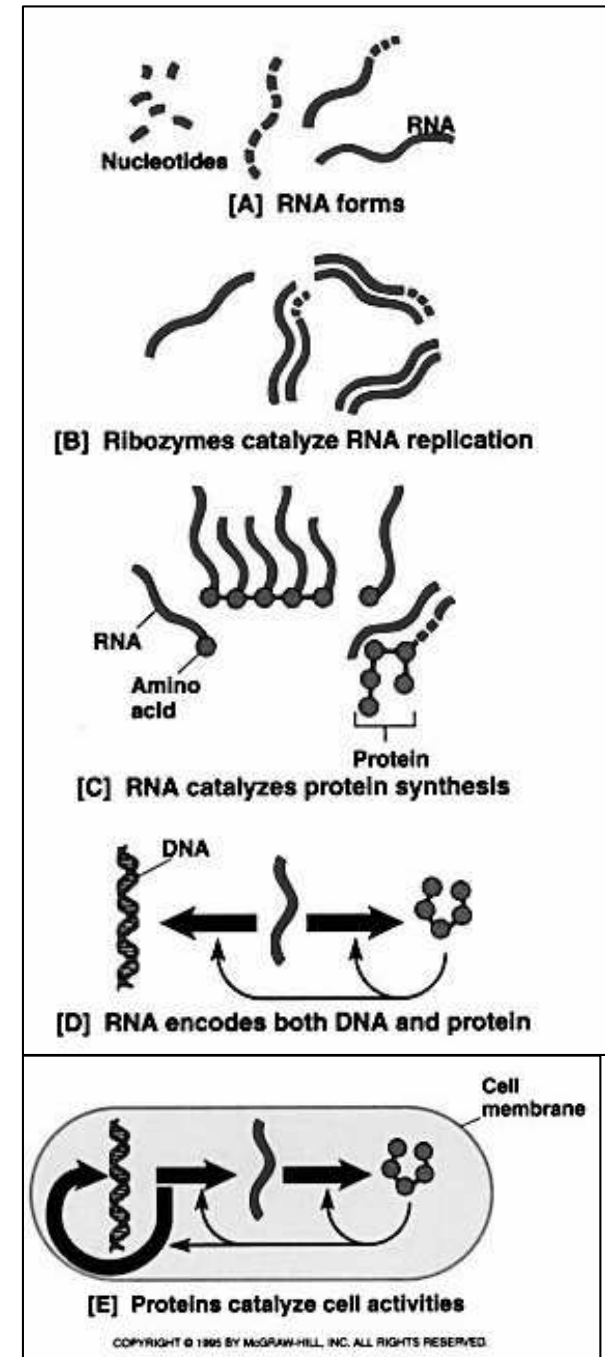
Svět RNA

- co bylo dříve - DNA nebo proteiny?
- RNA je genetický materiál i katalyzátor
postuloval Crick 1968
- katalytická aktivita RNA (Cech 1982)
- RNA svět (W. Gilbert 1986)
- zvláštní postavení virů

jednoduché polymery - replikátory, RNA

↓
evoluce

**autonomní organizmy jsou buněčné
složitá biochemie: DNA - RNA - protein**



Svět RNA

Funkční specializace:

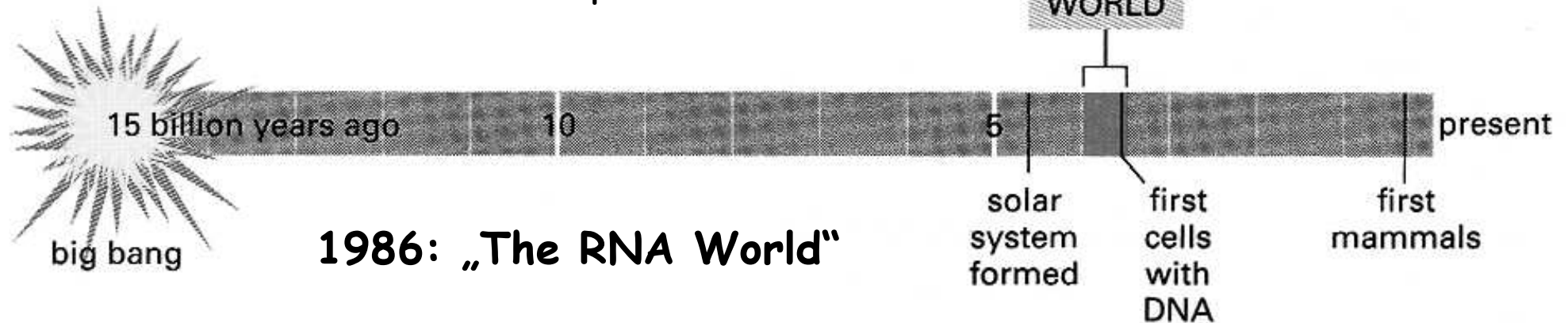
- uchování, přenos a exprese genetické informace - nukleové kyseliny
- strukturální a katalytická funkce - bílkoviny

Období, kdy oba typy funkcí zastával jeden typ sloučenin

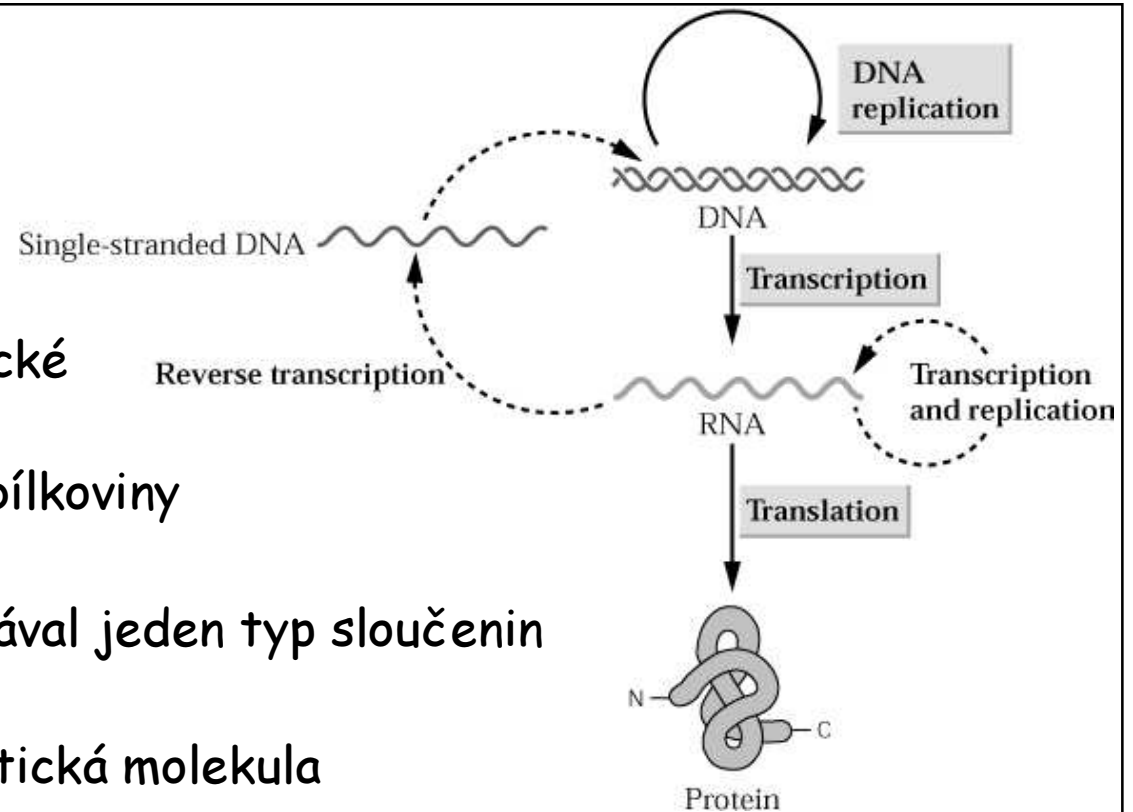
RNA - informační i katalytická molekula

1982-83: objev ribozymů

1985: diskuse o úloze RNA v prebiotickém světě



1986: „The RNA World“



Důkazy RNA světa

1. Důležitá role RNA v realizaci genetické informace dnes (mRNA, tRNA, rRNA, peptidyltransferázová aktivita, snRNA, RNázaP, snoRNA, aj.)
2. RNA viry, retroelementy, telomery a konzervativní mechanismus jejich replikace

Kritéria testující zda RNA je reliktem světa RNA:

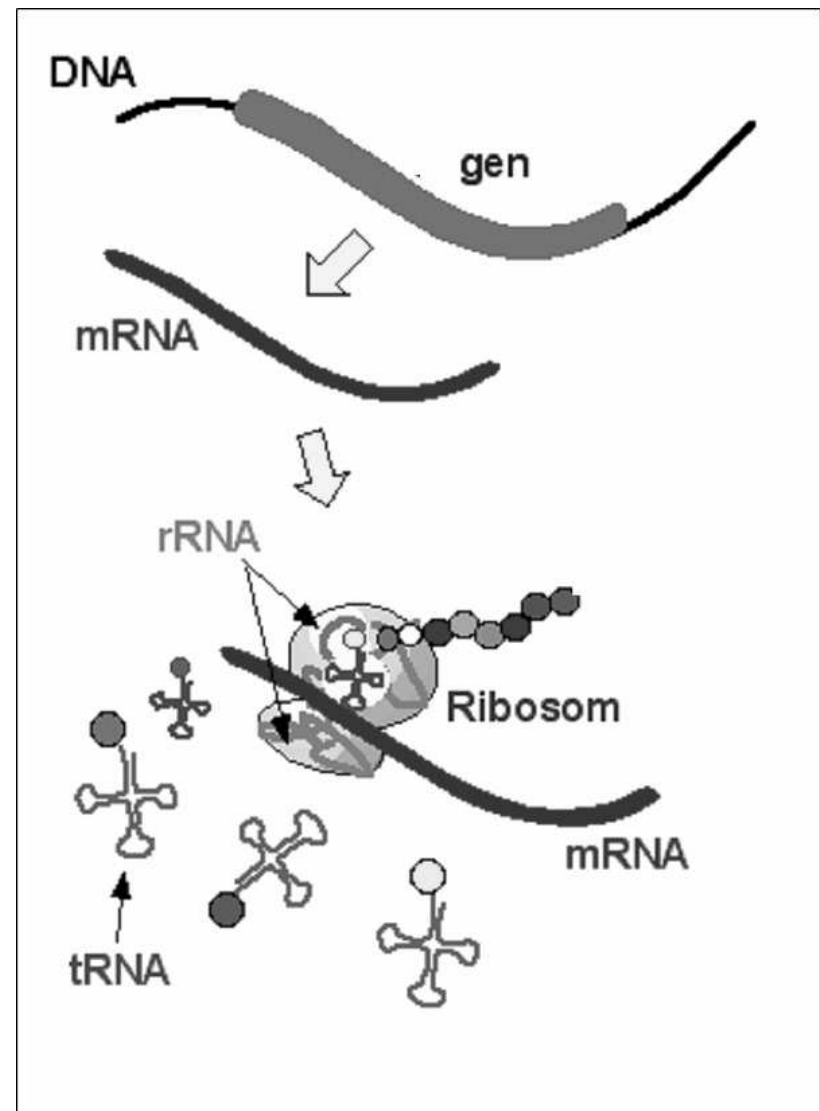
1. Katalytické vlastnosti
2. Všudypřítomnost
3. Centrální postavení v metabolismu

Centrální role RNA v dnešních biologických systémech

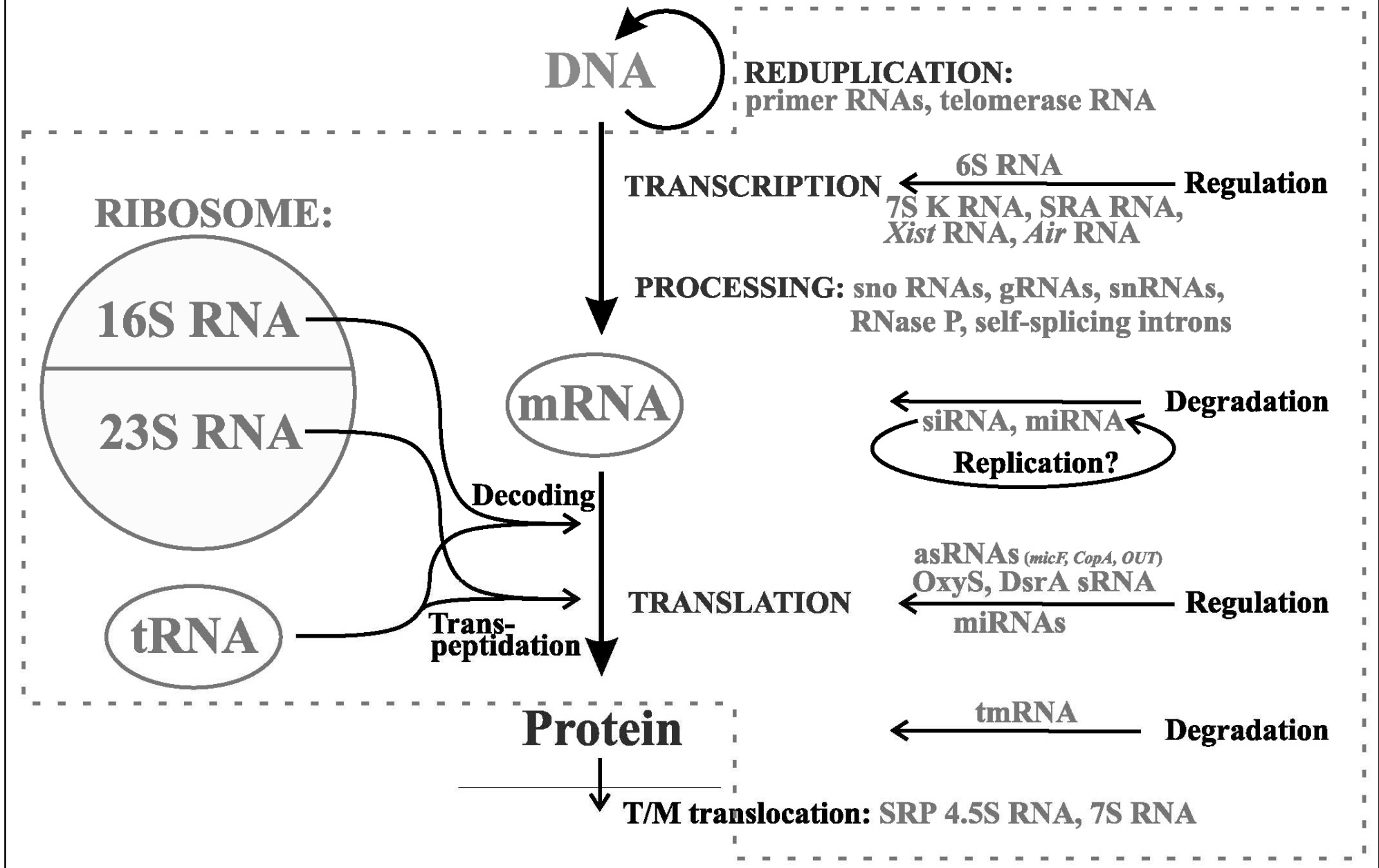
mRNA - jediný templát pro proteosyntézu,
- sestřih pomocí snRNA

tRNA - přináší AK na ribozómy,
- sestřih pomocí RNázyP (ribozym)

rRNA - součást ribozómů,
- tvorba peptidové vazby,
- sestřih pomocí snoRNA



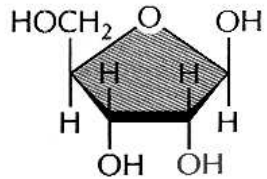
Typy RNA v buňce



Chemická struktura RNA

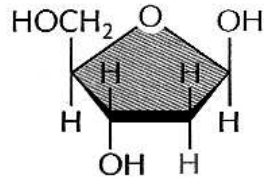
Rozdíly mezi RNA a DNA:

Ribosa (2'-OH skupina)
Uracil místo thyminu (absence
methyly v poloze 5)



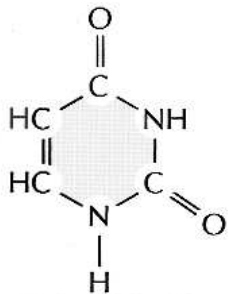
ribose

used in ribonucleic
acid (RNA)



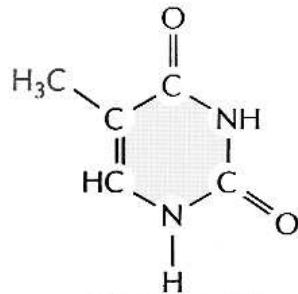
deoxyribose

used in deoxyribonucleic
acid (DNA)



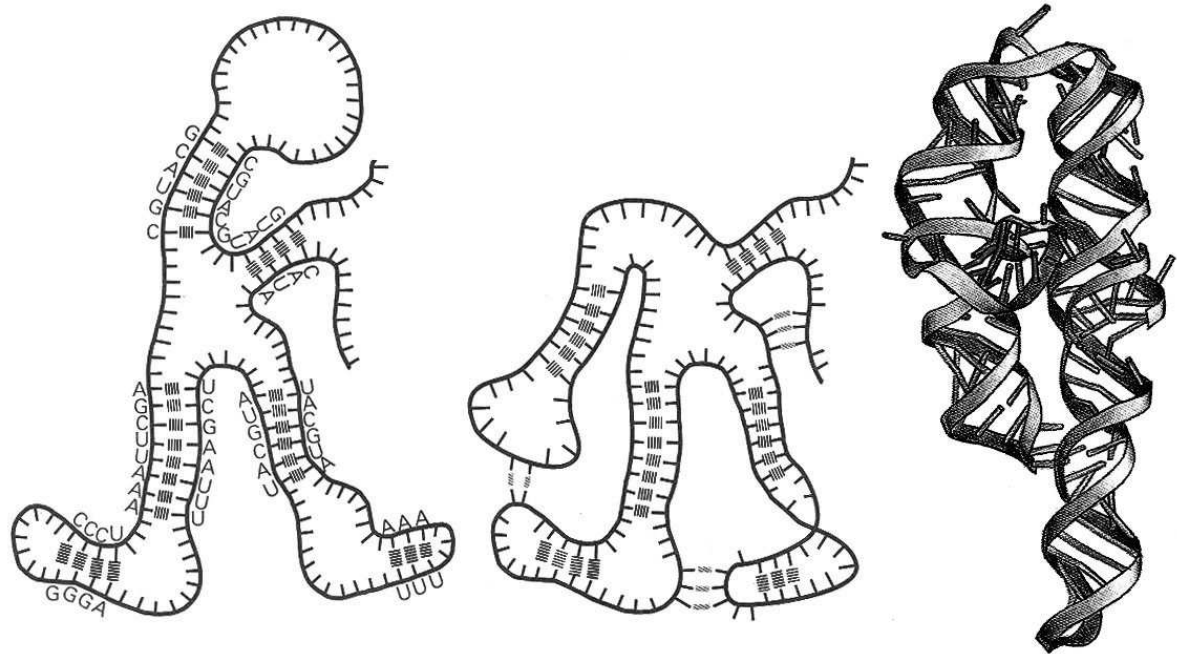
uracil

used in RNA



thymine

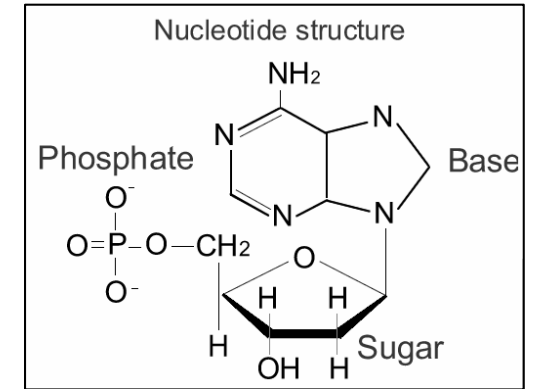
used in DNA



Důsledky:

- Většinou jednořetězcová šroubovice s kratšími dvouřetězcovými úseky
 - Variabilita prostorové organizace druhého a dalších řádů
 - Komplexní trojrozměrná struktura
- RNA může mít i strukturní a katalytickou funkci

Počátky světa RNA



Puriny: syntéza z HCN a formamidu

Pyrimidiny: kyanoacetyleny nebo z kyanoacetaldehydu a močoviny
malé výtěžky lze zvýšit zmražováním nebo v podmínkách vysoké energie (hydrotermální prameny)

Ribóza: formozová reakce z formaldehydu, směs pentóz a hexóz,
nestabilita ribózy, stabilizace Pb-katalýzou nebo Ca-borátovou stabilizací,

Nukleozid: vazba bází na cukr, beta-orientace

Nukleotid: fosforylace nukleozidů v roztoku CaP (hydroxylapatitu), volné fosfáty nebyly k dispozici.

Racemická směs nukleotidů: alfa a beta a L a D-izoformy

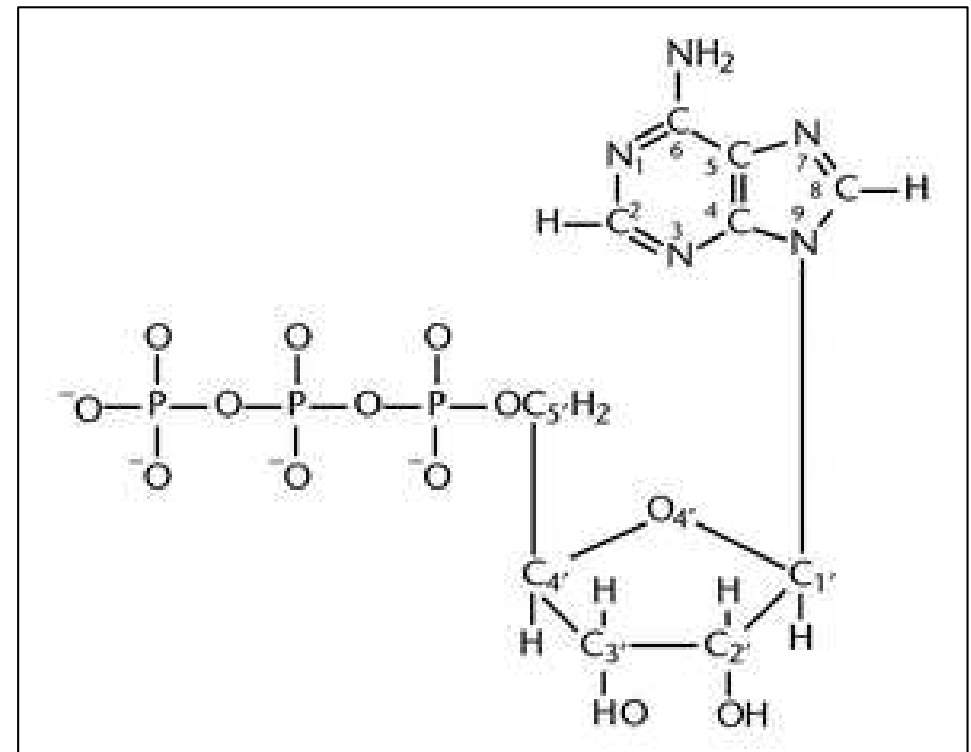
Polymerizace: pomalá a spontánní, pouze 5-3 fosfodiesterová vazba mezi beta-D-nukleotidy byla funkční a byla prodlužována při nízkých teplotách (led) katalyzováno ionty kovů, v hydrotermálních pramenech

Abiotická syntéza polynukleotidů

(1) Aktivace nukleotidů

Nukleosid aktivovaný v 2' či 3' pozici bezprostředně tvoří 2'-3' cyklickou formu

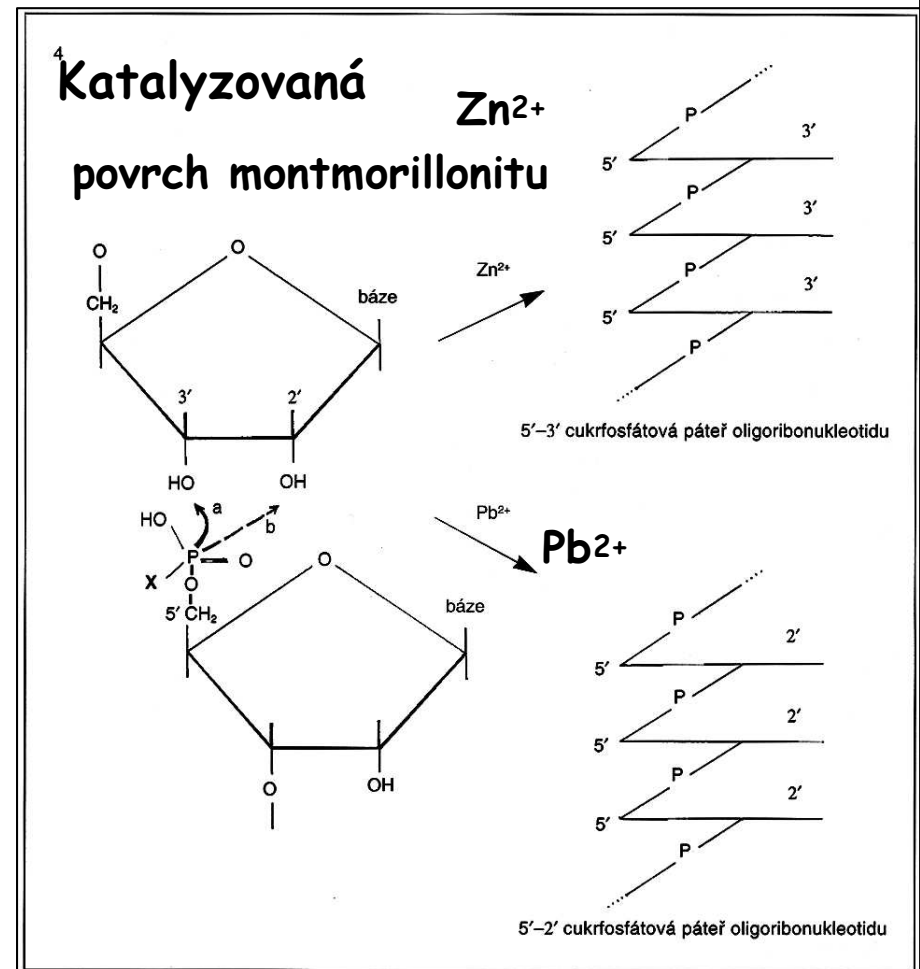
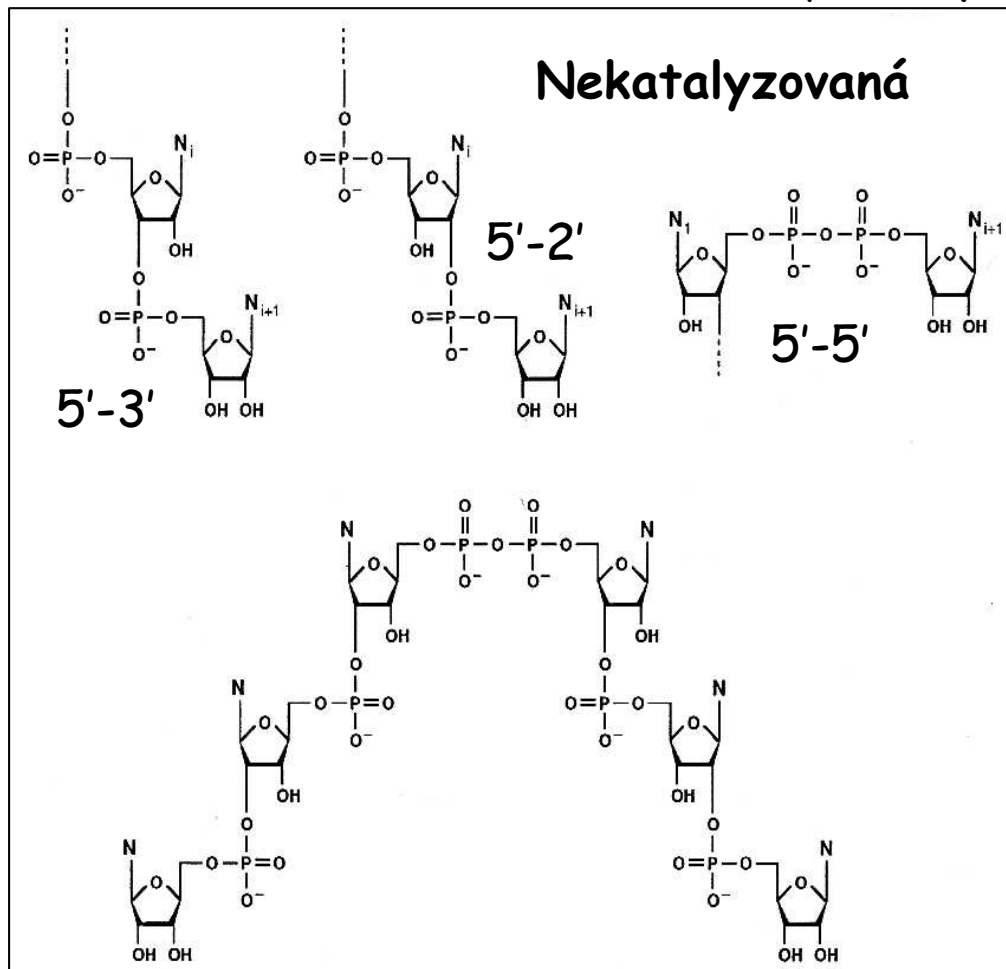
Syntéza 5' polyfosfát nukleotidů



Abiotická syntéza polynukleotidů

(2) Syntéza 5'-3' polynukleotidu - vznik fosfodiesterových vazeb

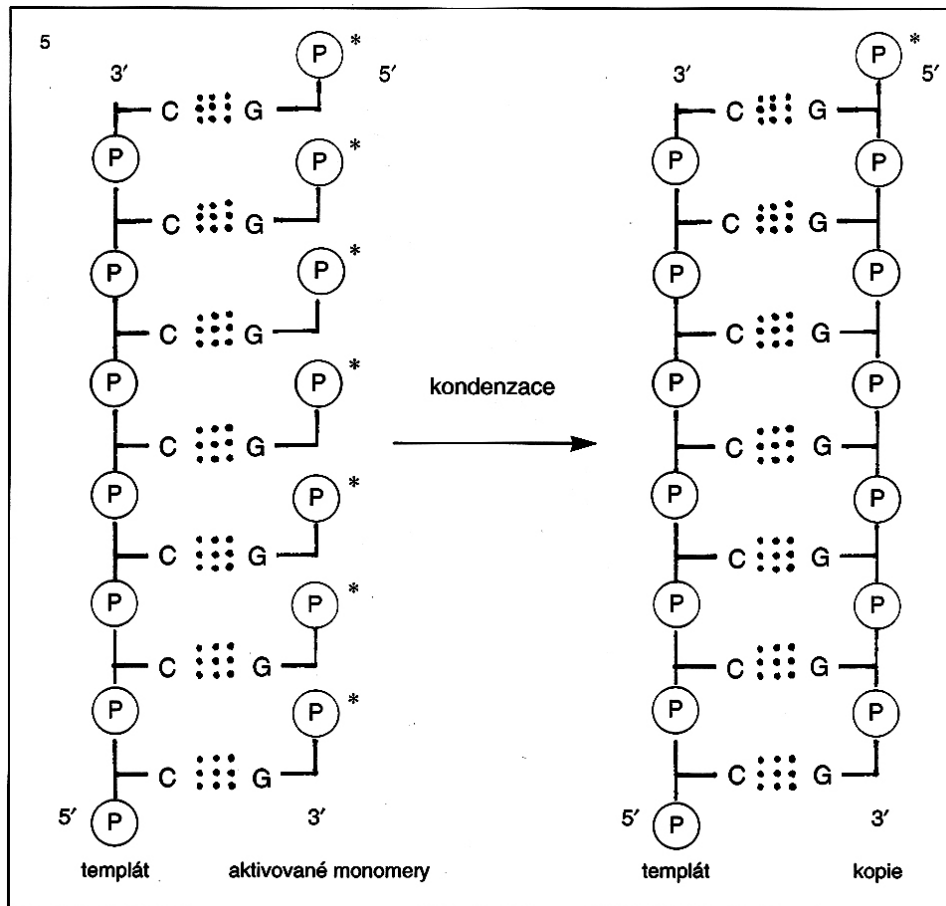
Chemická kondenzace aktivovaných 5'-polyfosfát nukleotidů



Neenzymatická replikace RNA

Základní reakce: syntéza podle templátu

Většina aktivovaných nukleotidů tak činí jen velmi neochotně

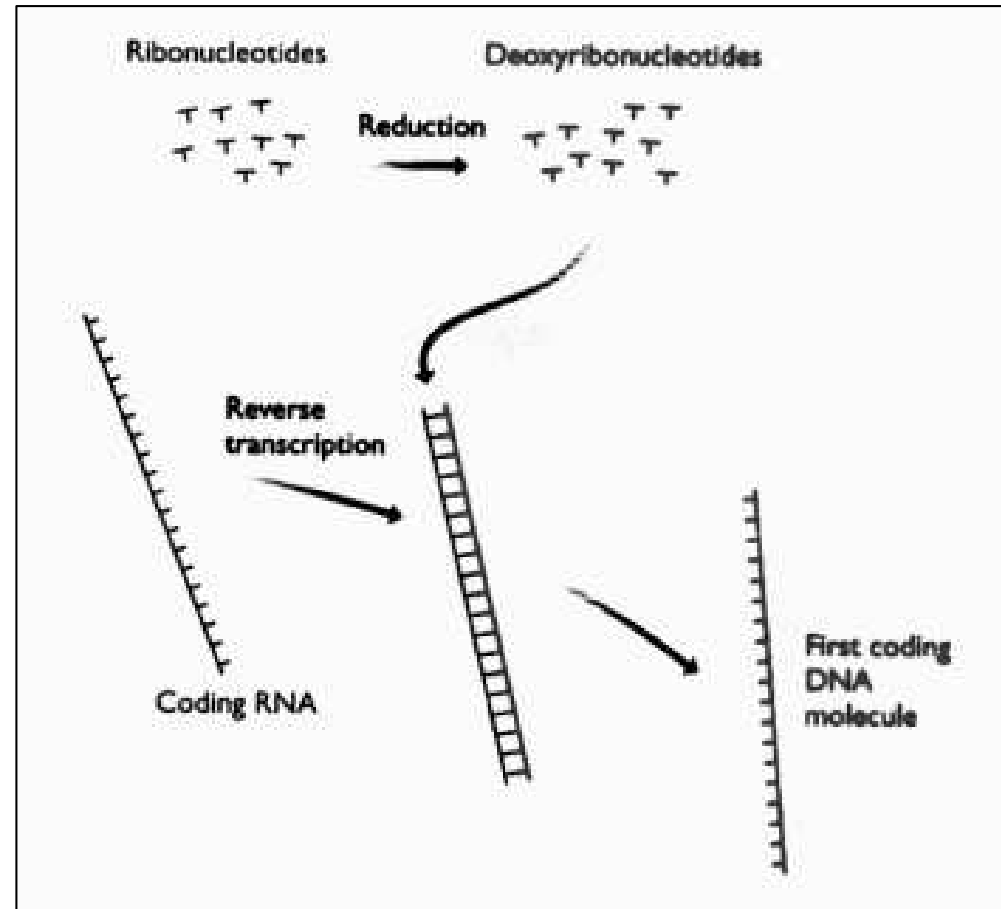
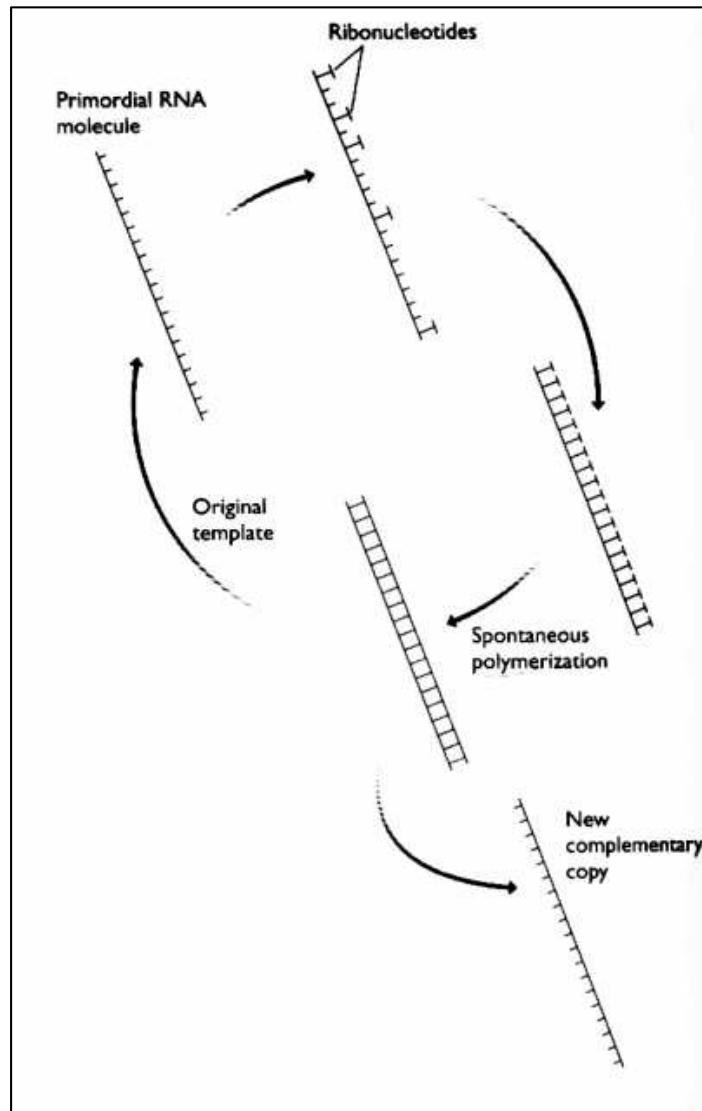


Výjimka: Kondenzace oligoG podle oligoC

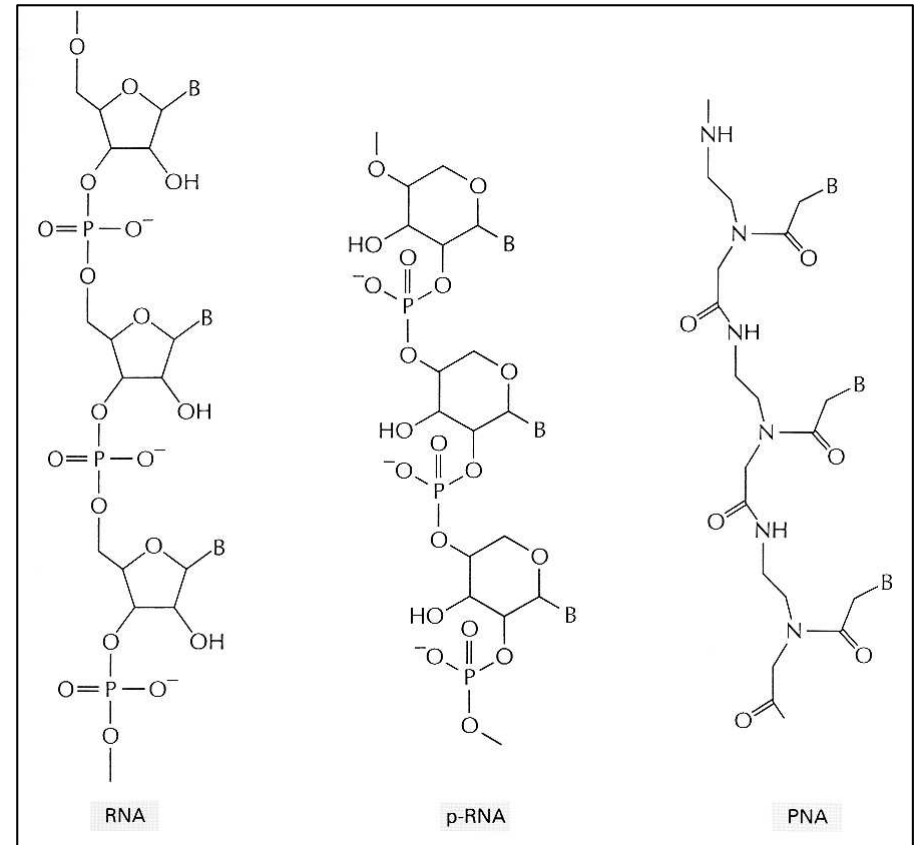
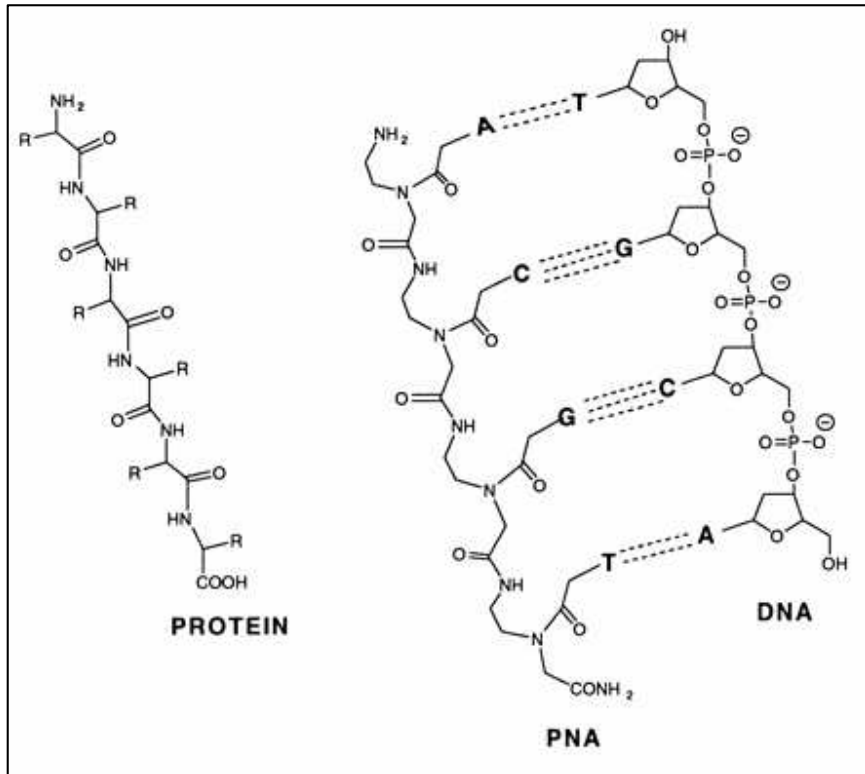
Pravděpodobná syntéza polynukleotidů bohatých G podle templátů bohatých C

Velmi nepravděpodobná samoreplikace - stabilní struktura - 3 vodíkové můstky v páru GC

Spontánní syntéza prvních RNA a syntéza první DNA

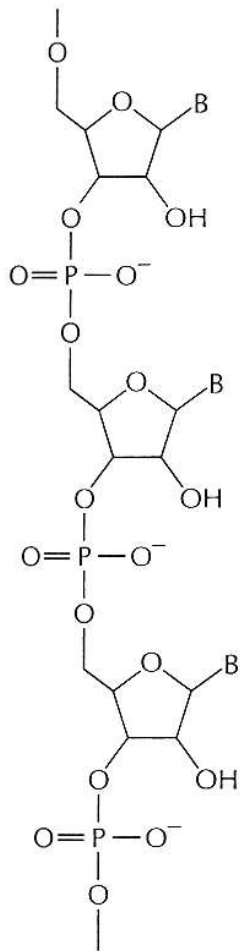


Předchůdci molekul RNA

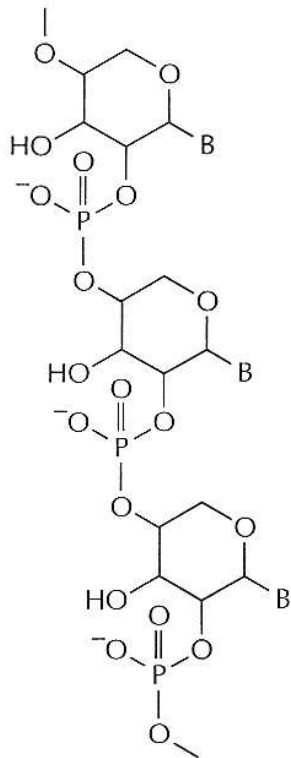


- PNA (peptide nucleic acids)
- TNA (threose nucleic acids)
- Nukleové kyseliny odvozené od glycerolu a pyranosylu
- Proto RNA kvadruplexy
- Minerály, jíly (Cairns-Smith 1982)

Alternativní genetické systémy - pRNA (Pyranosový analog RNA)



RNA

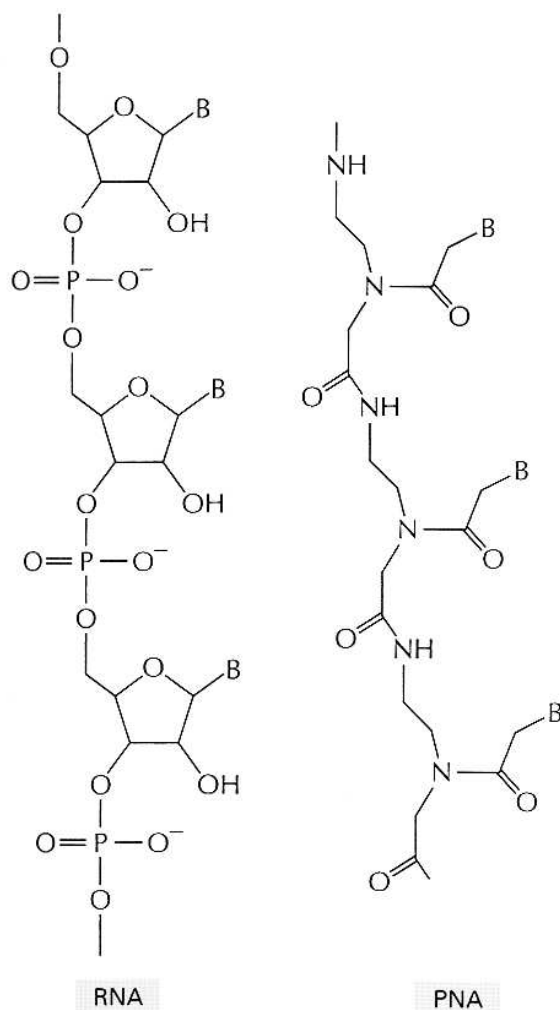


p-RNA

- Furanosová forma ribosy nahrazena pyranosovou
- Watson-Crickovské párování stabilnější než u RNA
- Menší pravděpodobnost formování víceřetězcových struktur
- Stabilnější než RNA
- Pozvolnější stoupání dvoušroubovice => snadnější separace řetězců při replikaci
- Genetický systém - skvělá volba
- Nemožnost postupného přechodu na genetický systém založený na RNA

Alternativní genetické systémy - PNA

Peptidová nukleová kyselina



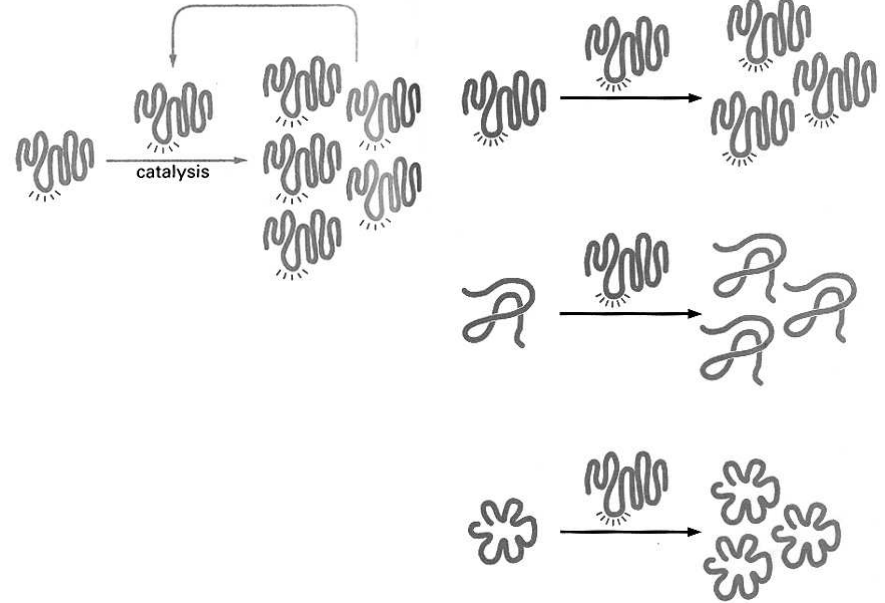
- Nenabitý a achirální analog NA
- Monomery spojeny peptidovou vazbou
- Formuje stabilní heteroduplexy s RNA i DNA
- Prokázán přenos informace PNA→RNA i RNA→PNA
- Možný postupný přechod na RNA svět
- Aktivované monomery ochotně cyklisují; obtížný vznik oligomerů v prebiotickém světě

První RNA replikáza

Molekula RNA, která katalyzuje svou vlastní replikaci

Nutné předpoklady:

- RNA dependentní RNA polymerasa
- Autoreplikace
- Syntéza potomstva musí být rychlejší než degradace rodičů
- Dostatečná přesnost, ale ne absolutní (možnost evoluce)



Molekula RNA je schopná splnit všechny podmínky

- chemismus podobný aktivitě ribozymů (intronů) I. skupiny
 - experimentálně ověřeno

Vznik první RNA replikasy -
jeden z nejslabších článků teorie RNA světa

Osud RNA katalyzátorů po převzetí jejich funkce proteiny

1. Vymizely:

2. Převzaly nové funkce:

- přeměna ribozomů a tRNA účastnících se replikace na součásti translační mašinerie
- protospliceosom měl původně úlohu v rekombinaci, bimolekulární sestřih

3. Zachovaly si vysoce konzervativní funkce:

- snoRNA - procesing rRNA
- RNAza P - procesing tRNA
- snRNA - sestřih intronů v mRNA

- Tyto funkce vysoce konzervativní, zachovaly se u eukaryot
- ztráta některých RNA reliktvů u prokaryot, proteiny jsou účinnější
- podpora představy progenitora podobného eukaryotům

Katalytická RNA

Ribozymy:

- molekuly RNA oplývající katalytickou aktivitou
- obecně analogy bílkovinných enzymů
- aktivní v několika základních reakcích metabolismu RNA a syntézy bílkovin
- pozůstatek z RNA světa ?

Objev:

- Thomas Cech - intron I. typu v 26S rRNA u *Tetrahymena*, samosestřih (1982)
- Sydney Altman - RNasa P u *Escherichia coli*, zrání tRNA (1983)
- 1989 - Nobelova cena za chemii

Co dokáží RNA katalyzátory

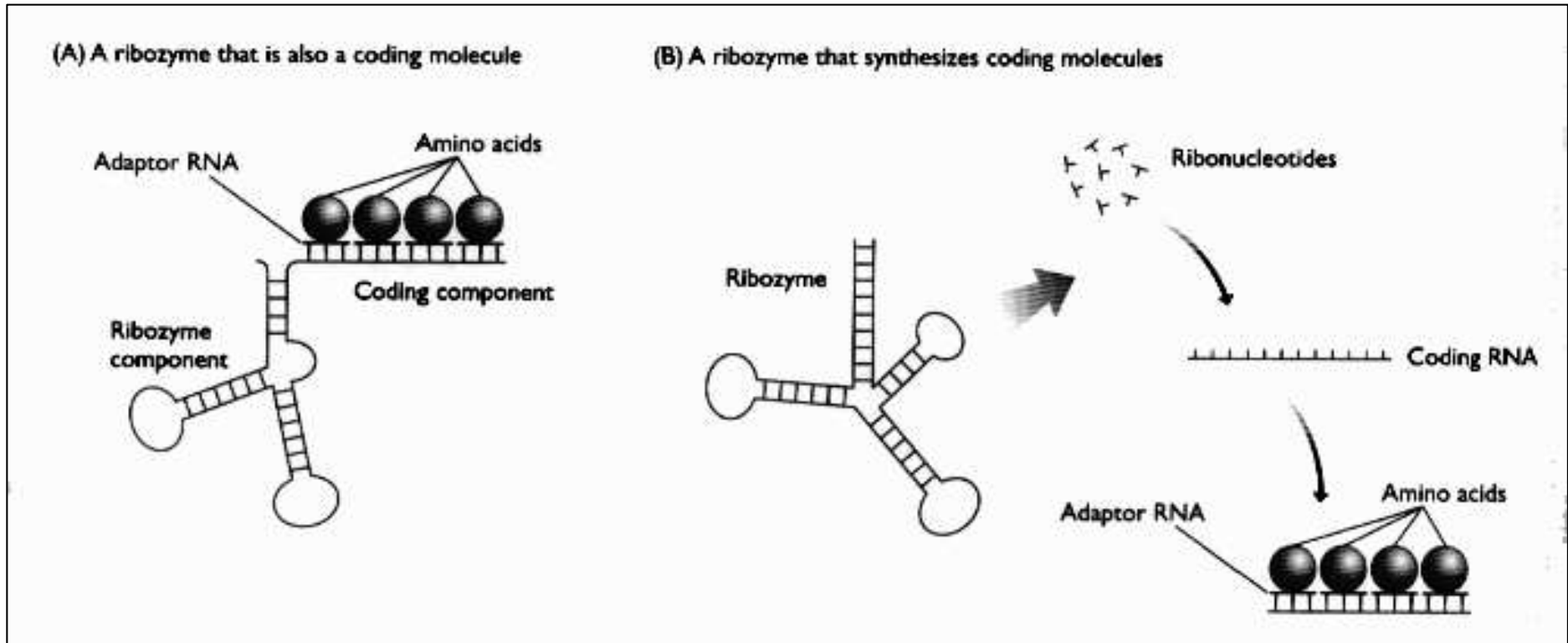
Katalyzované reakce - substrátem většinou RNA:

1. nejčastěji místně specifická hydrolýza fosfodiesterových vazeb
 - a) endonukleasa
 - b) *cis*-reakce - ribozym i substrát původně součástí jediné molekuly
 - c) *trans*-reakce - ribozym i substrát původně různé molekuly
2. obrácený směr - syntéza fosfodiesterových vazeb
RNA ligasa, RNA polymerasa, nukleotidyltrasnsferasa
3. transesterifikace
sestřih, editace

Substrátem není RNA !

1. hydrolýza aminoacylsterových vazeb
2. syntéza peptidové vazby
- 28S rRNA

Co dokáží RNA katalyzátory



(a) Kódující RNA je součástí ribozymu

(b) Ribozym katalyzuje syntézu kódující RNA

Představitelé reliktního světa RNA

1. tRNA - od replikace k proteosyntéze
2. Ribozóm
3. Sestřih a snRNA
4. Maturace rRNA a snoRNA
5. Maturace tRNA a RNázaP
6. Signální rozpoznávací částice a srpRNA
7. Editace RNA a řídicí RNA (gRNA)
8. Telomeráza a telomerická RNA
9. Vault RNA (vRNA)

Starobylé struktury:

Ribozóm - proteosyntéza, účast rRNA, tRNA a mnoha proteinů (původně replikace)

Spliceozóm - sestřih pre-mRNA, účast snRNA a mnoha proteinů (původně rekombinace)

Snorpozóm - sestřih pre-rRNA, účast snoRNA a mnoha proteinů

1. Role tRNA a ribozómů: od replikace k proteosyntéze

Dnešní translace - složitá koordinovaná síť interakcí RNA a proteinů - vyvinula se z mnohem jednodušších systémů existujících ještě ve světě RNA (RNA-RNA interakce), důležitá schopnost replikace
Prvotní funkce ribozómů - polymerizace nukleotidů - RNA replikace

Původní role ribozómů v replikaci:

- Ribozomální protein S1 a translační elongační faktor Tu a Ts - jsou podstatnou složkou replikázového komplexu fága Q β
- Elongační faktory jsou složkami replikázových komplexů některých rostlinných RNA virů

Hypotéza genomových značek:

Molekuly primitivních tRNA fungovaly jako značky molekul RNA určených k replikaci RNA ribozymy, TLS (tRNA-like structures) - na 3-konci Q β
Aminoacylace tRNA - další značka

Pozůstatky replikační role tRNA v dnešních genomech

1. Telomeráza:

krátký fragment RNA funguje jako primer pro RT

2. Retroelementy:

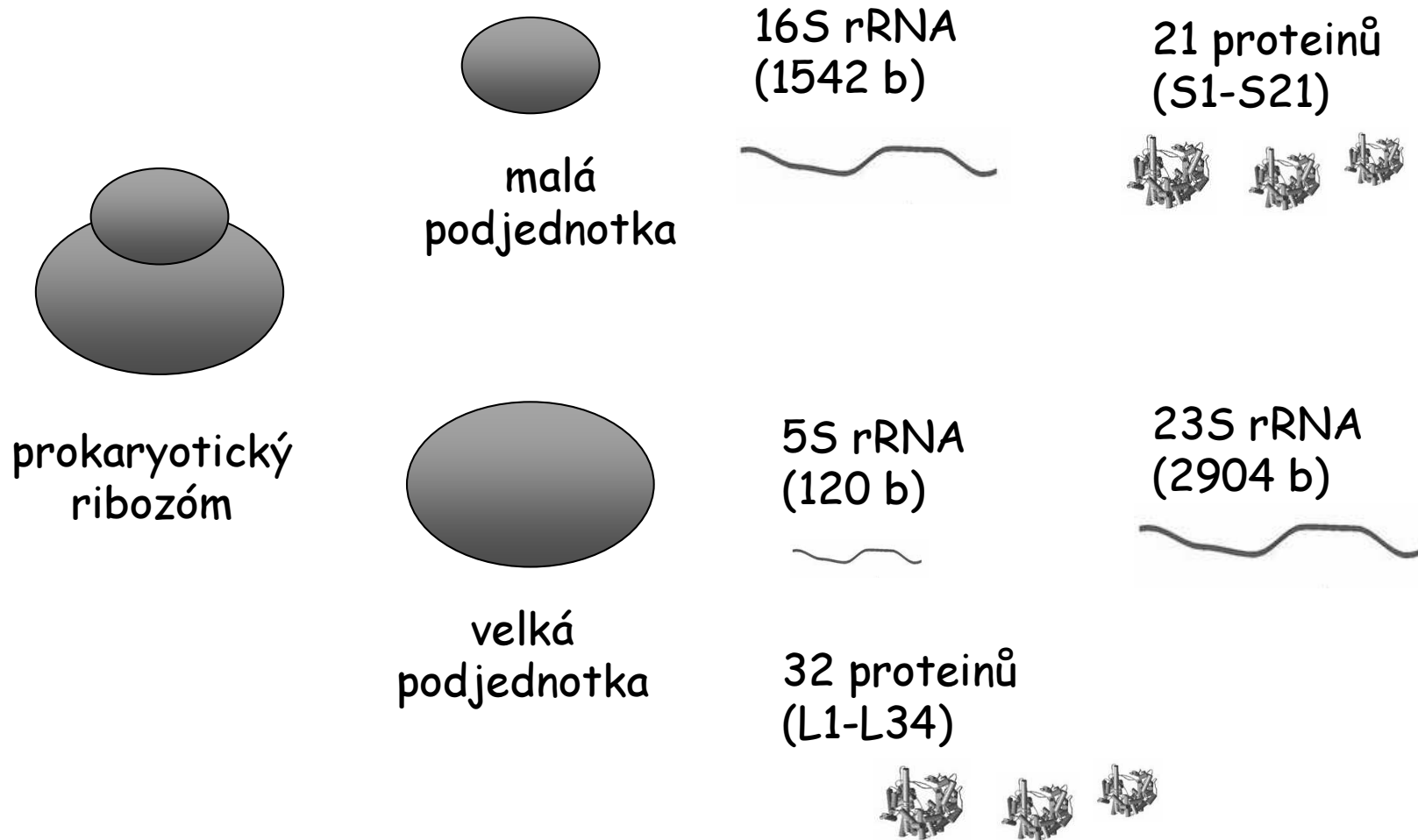
tRNA funguje jako primer syntézy cDNA při reverzní transkripci

3. RNA viry:

struktury podobné tRNA na 3-koncích genomové RNA

TLS (tRNA like structure) jsou aminoacylovány histidinem, valinem nebo tyrosinem a fungují jako primery replikace RNA, jen 3-koncové CCA nebo CCCA jsou potřebné pro replikaci

2. Ribozómy: ribozymy stabilizované proteiny



2. Ribozómy: ribozymy stabilizované proteiny

Dnešní ribozóm:

- RNA-RNA interakce: tRNA - 23S rRNA
- peptidyltransferázová aktivita rRNA
- u některých organismů převzal tuto roli ribozomální protein L2

Protoribozóm:

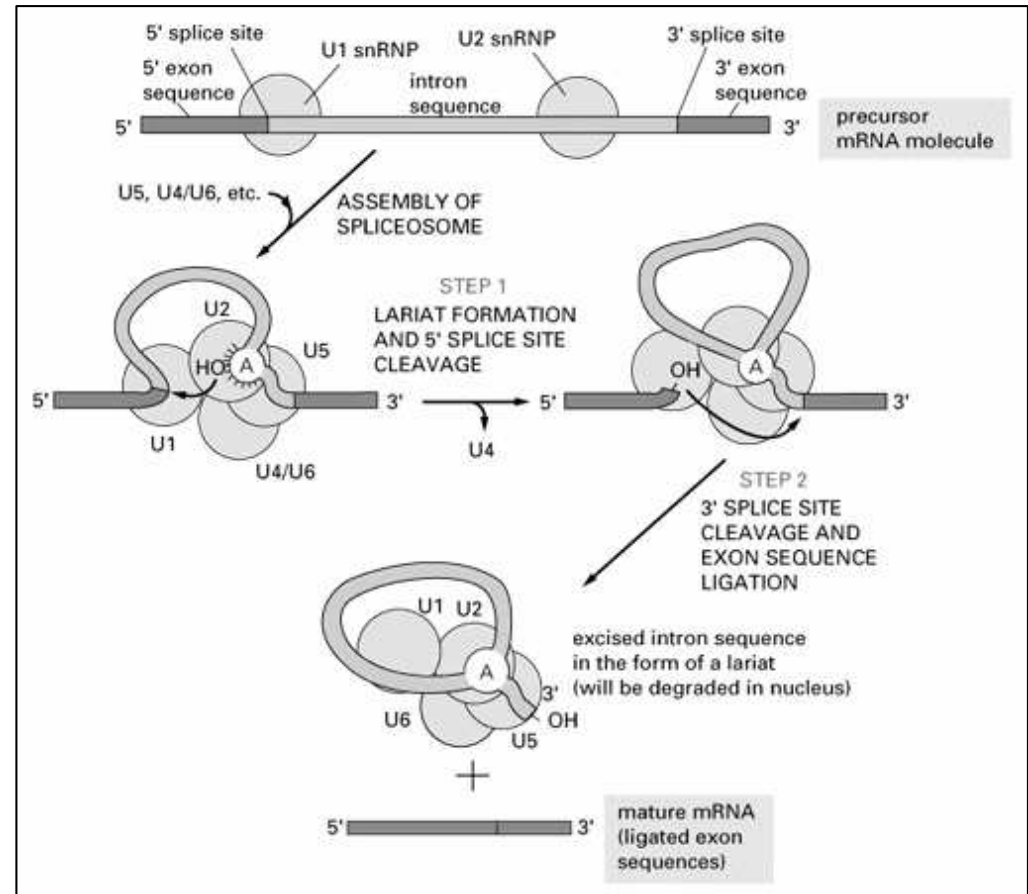
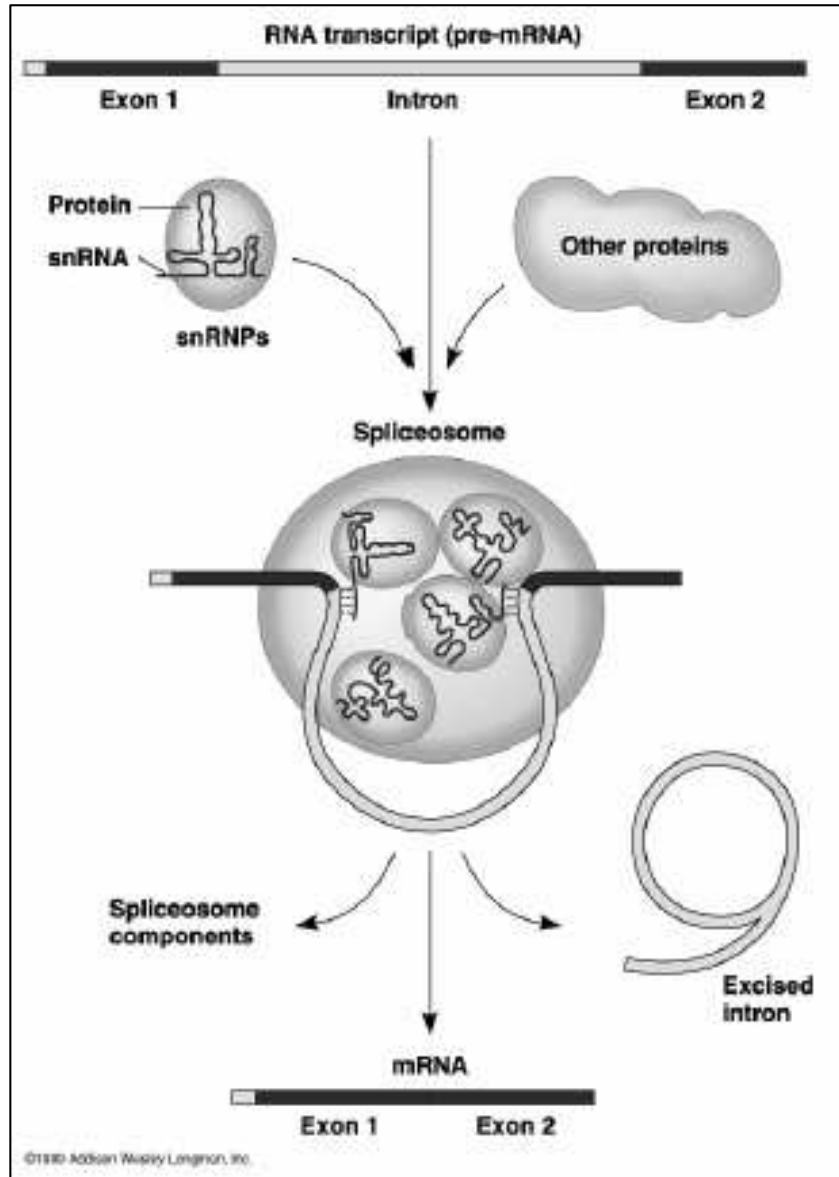
- představa ribozómu tvořeného pouze RNA, in vitro experimenty
- původně odlišná funkce, replikace
- velikost 7500 nukleotidů (Eigenův limit)
- původně možná více ribozymů
- RNA je schopna aminoacylace tRNA

3. Sestřih, spliceozóm a snRNA

Spliceozóm:

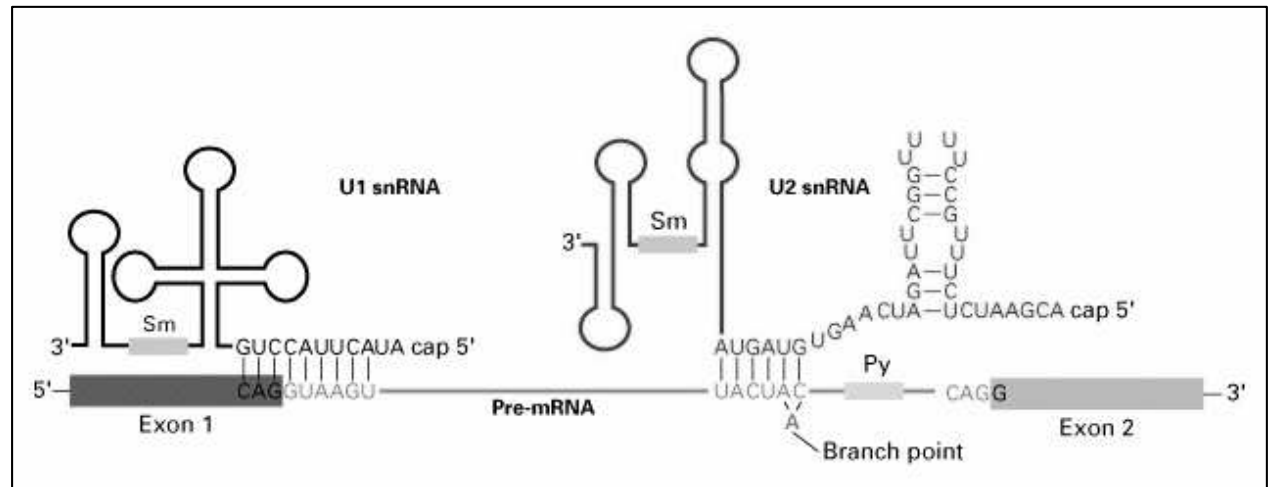
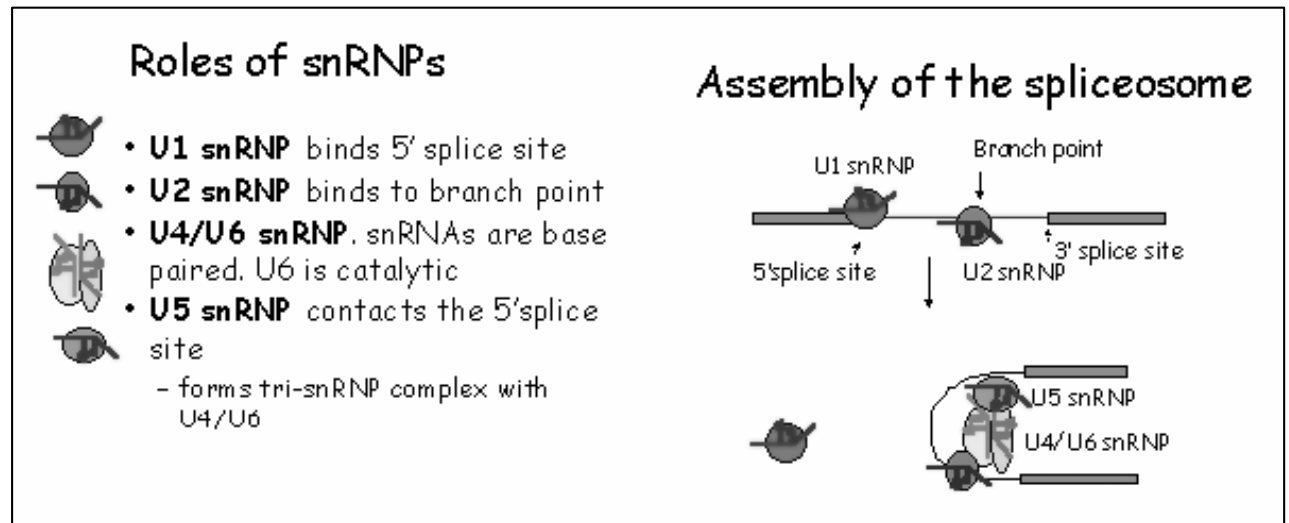
- posttranskripční úprava pre-mRNA (hnRNA), vystřižení intronů
- obsahuje RNA struktury podobné intronům II skupiny a hammerhead ribozymům
- RNA-RNA interakce
- starší než translace - původ v rekombinaci molekul RNA,
- bimolekulární trans-splicing molekul ssRNA,
- vzájemná závislost snoRNA a spliceozómu: vznik snoRNA ze sestřiženého intronu

3. Sestřih, spliceozóm a snRNA

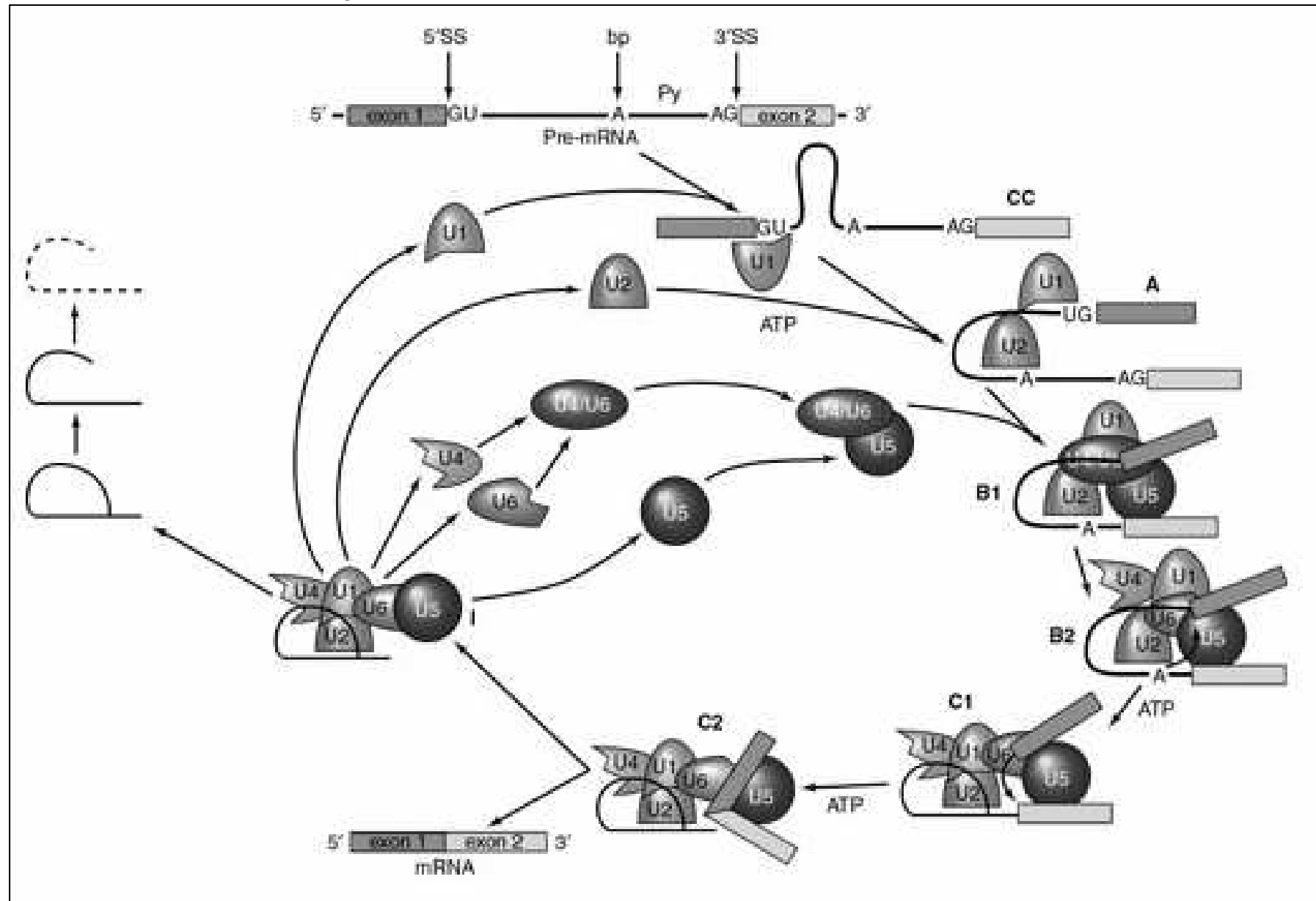


Malé jaderné RNA (snRNA)

- nacházejí se v jádře eukaryot
- účastní se sestřihu hnRNA a udržování telomer
- tvoří nukleoproteinové částice (snRNP = snurps), každá s více proteiny
- jsou kódovány introny
- U1, U2, U4, U5, U6
- U4+U6 se párují spolu a U6 je katalytický



Malé jaderné RNA (snRNA)



4. Maturace rRNA a snoRNA

snoRNA:

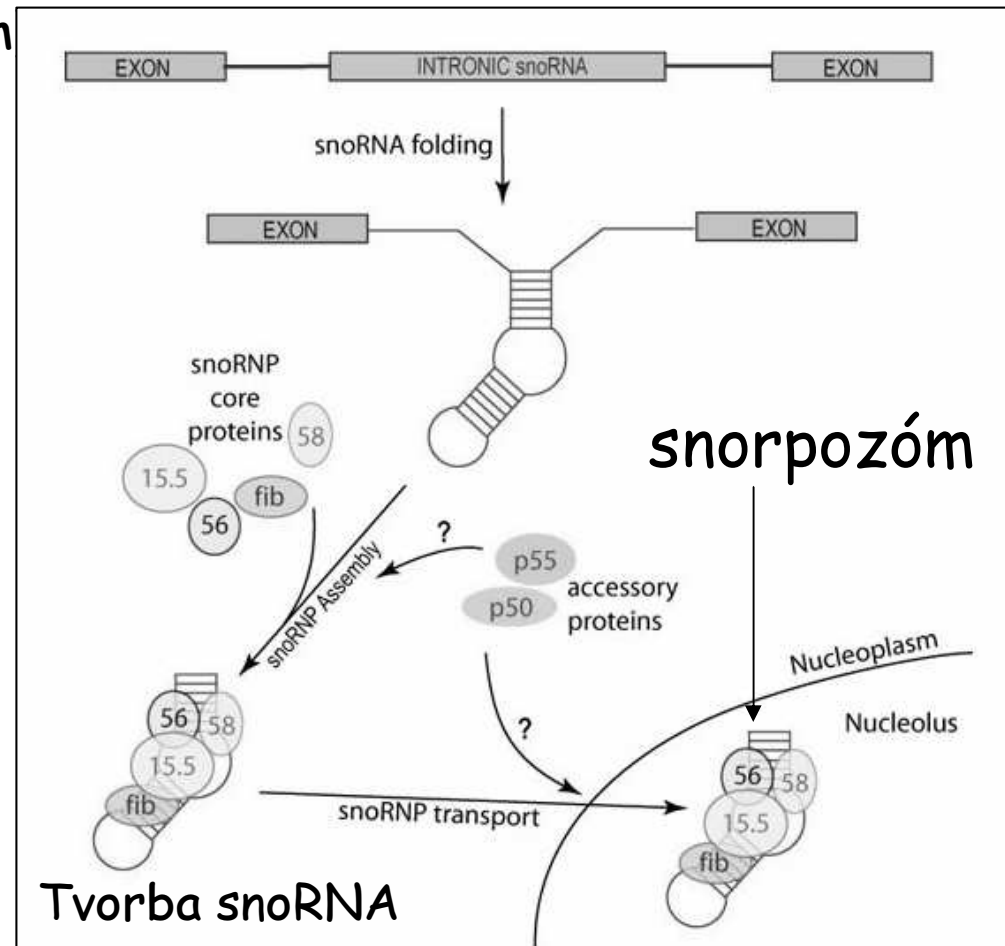
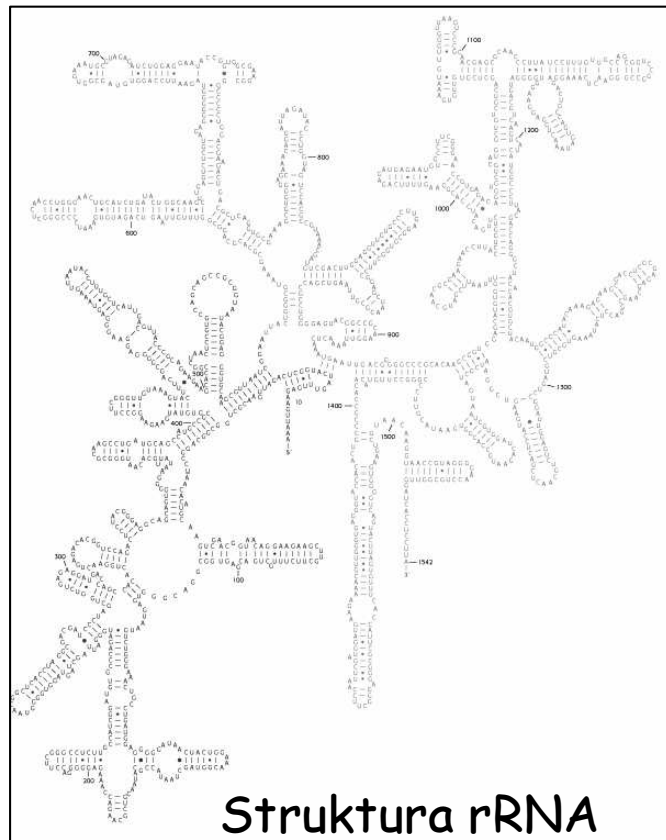
- účast při maturaci rRNA a ribozómů
- velký funkční komplex - snorpozóm
- kódovány introny některých genů - ribozomálních a heat shock genů
- 8 různých snoRNA kódováno 8 introny jednoho genu
- u savců nejméně 30 různých snoRNA, u kvasinky 26 snoRNA délky 5426 b (ancestrální snorpozóm)
- homologie snoRNA s 18S a 28S rRNA, kontakt (kroslinkování) i s oběma rRNA, intra- i intermolekulární kontakty
- některé snoRNA potřebují spliceosom ke své maturaci

Prokaryota:

- absence snoRNA u prokaryot je záhadou
- maturace rRNA jen za účasti proteinů
- objev U3snoRNA u archebakterie *Sulfolobus acidocaldarius*

Malé jadéřkové RNA (snoRNA)

- geny pro snoRNA se nacházejí v intronech
- účastní se modifikace rRNA a dalších RNA genů (např. metylace)
- snoRNA hybridizuje k cílové sekvenci rRNA, modifikuje, štěpí prekurzorovou RNA, sbaluje do terciálních struktur
- jsou součástí snoRNP (snorpozóm)



Introny jsou někdy důležitější než exony

- gen UHG (U22 host gene) obsahující v 8 intronech 8 různých snoRNA
- sestřihem vzniká mRNA, která je však degradována
- mRNA je málo konzervativní mezi člověkem a myší
- hlavním funkčním produktem UHG genu jsou tedy molekuly snoRNA

Tycowski et al (1996): A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. Nature 379: 464-466.

5. Maturace tRNA a RNázaP

tRNA:

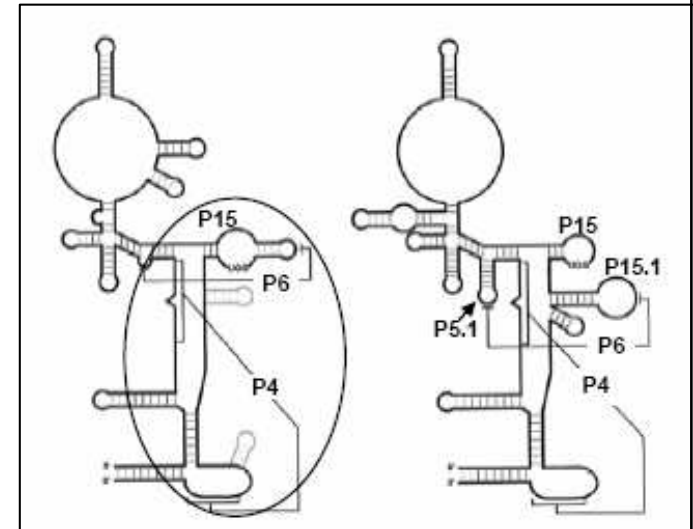
- relikv světa RNA - konzervativní, všudypřítomná, centrální úloha v metabolismu
- interakce s rRNA (CCA konec tRNA interaguje s 23SrRNA)
- původní funkce v replikaci, později v proteosyntéze
- některé geny pro tRNA mají introny

RNázaP (Guerrier-Takada, 1983):

- úloha v maturaci tRNA
- je skutečným enzymem, štěpí opakovaně
- RNA katalytická podjednotka (M1 RNA) - molekulární fosilie
- jediný ribozym modifikující RNA u prokaryot

RNáza MRP:

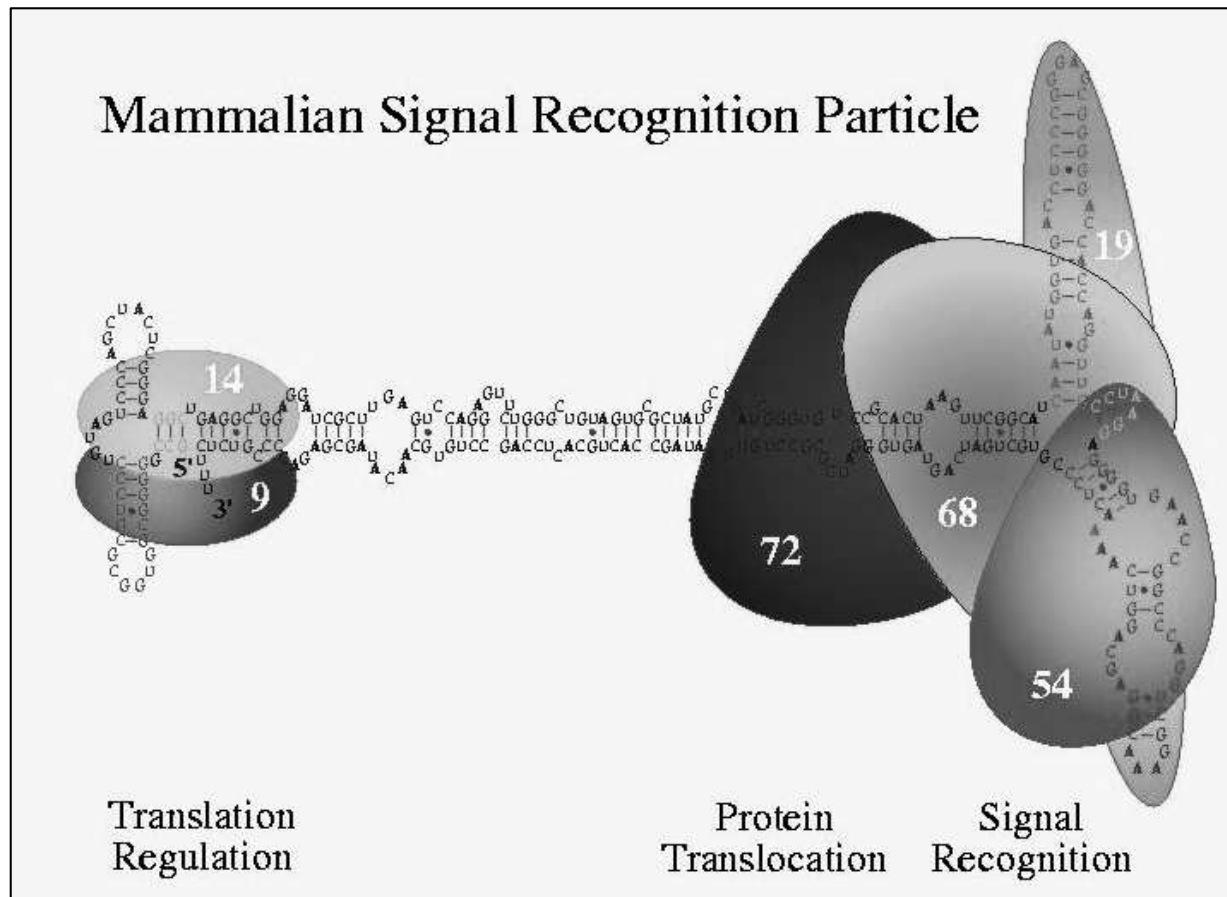
- druhá podobná molekula vzniklá duplikací a divergencí u eukaryot nebo endosymbiózou
- výskyt u *Giardia* a *Microsporidia*? - nemají mitochondrie



RNázaP a její RNA složka

6. Signální rozpoznávací částice a srpRNA

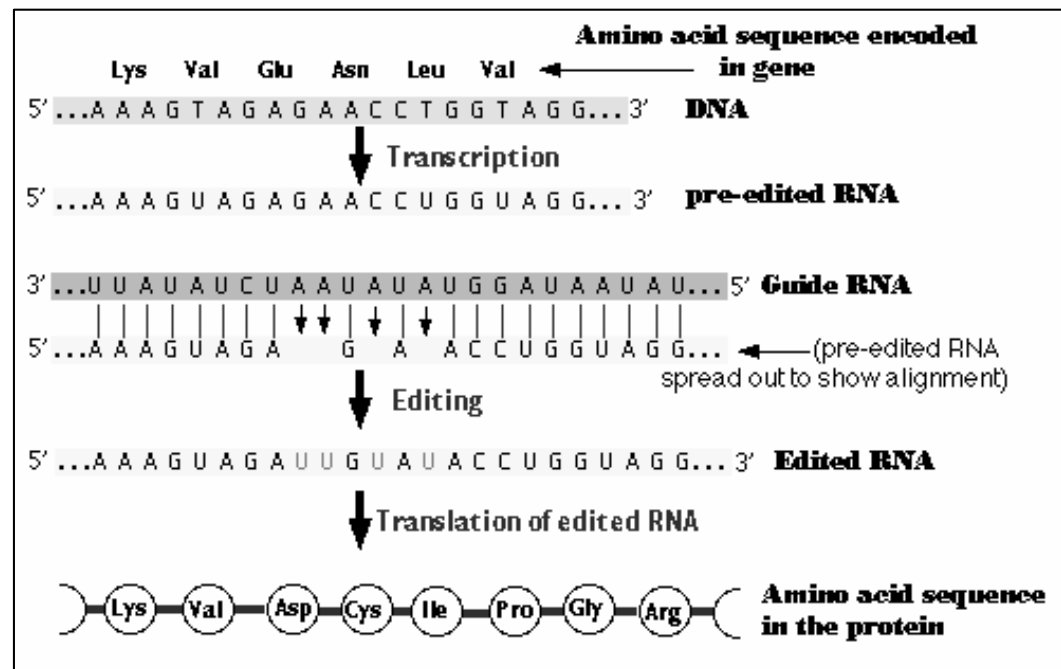
- RNA-proteinový komplex zajišťující vazbu ribozómu na ER a sekreci proteinů
- RNA složka 4.5S RNA u bakterií a 7S u eukaryot a archeí
- podobná struktura a funkce
- stimuluje hydrolýzu GTP
- původně ribozym štěpící GTP



Schematic representation of the mammalian SRP depicting SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72 and SRP RNA. The part of SRP comprising SRP9/14 complexed with RNA forms a distinct structural domain known as the **Alu domain due to homology of the Alu family of RNA sequences** with the Alu family of repetitive DNA sequences and the small cytoplasmic Alu RNAs (scAlus). The Alu domain of SRP mediates the specific pauses(s) in the synthesis of nascent ER targeted proteins whose signal sequence has been bound by SRP54.

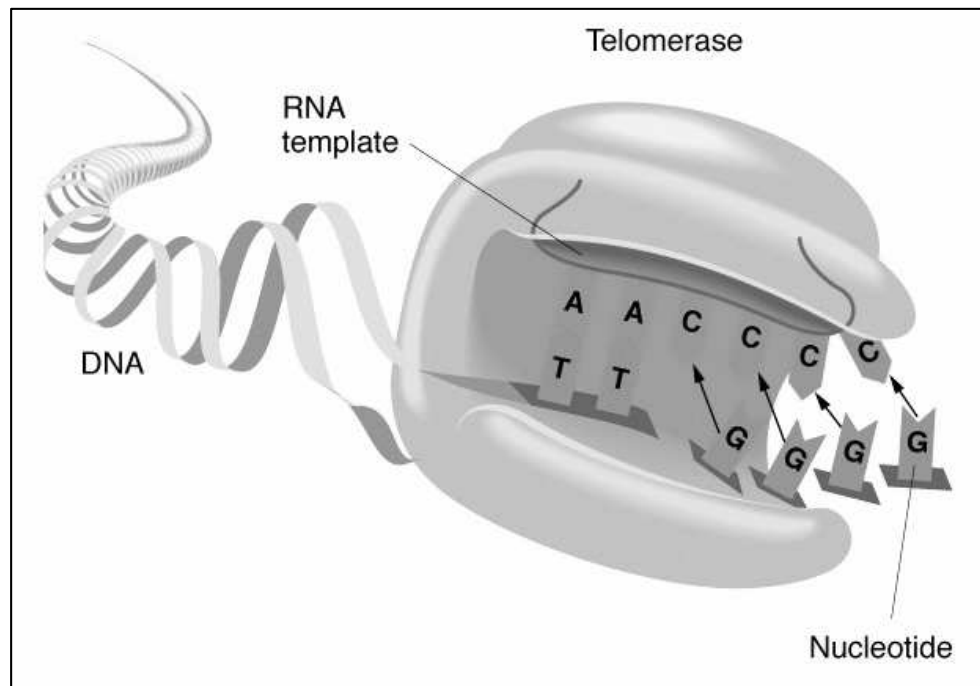
7. RNA editace, g-RNA, editozóm

- modifikace tRNA, rRNA a spliceozómu, templátem je guide RNA (g-RNA)
- substituce, inserce, delece
- eukaryota, mitochondrie kinetoplastů - inserce či delece polyU
- editace je podmínkou tvorby sekundárních struktur bez nichž nemůže dojít k maturaci tRNA RNázou P
- u mitochondrií - reakce na asexualitu (Mullerova rohatka)
- v světě RNA - editace jako kontrolní mechanismus exprese tRNA
- nádorová nebo neurologická onemocnění (epilepsie)



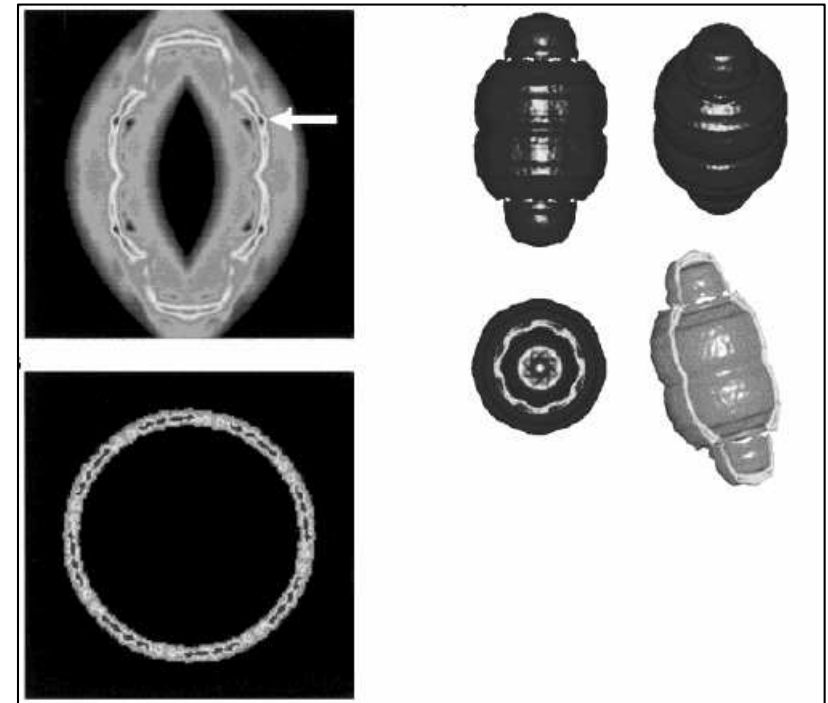
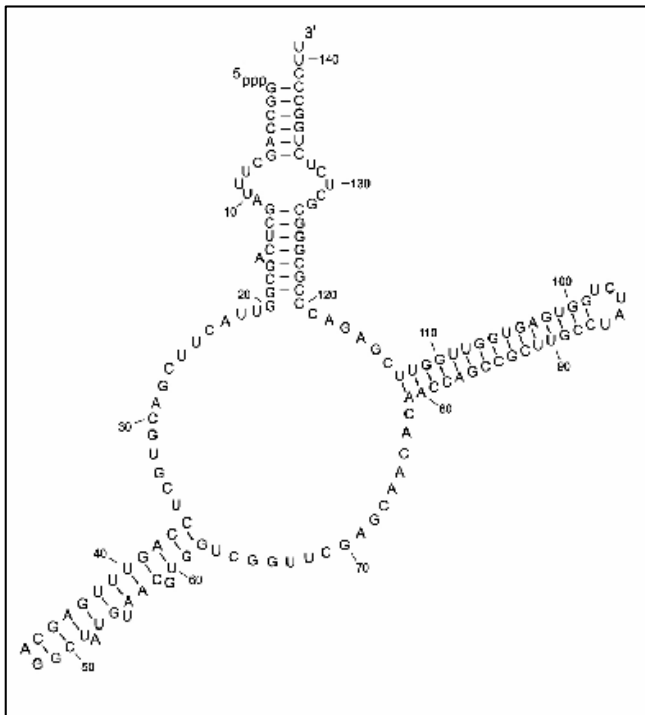
8. Telomeráza

- problém replikace konců lineární DNA u eukaryot - RNP komplexy
- RNA složka jako templát pro syntézu telomerických repeticí
- RNA složka tvoří terciální strukturu
- nepřítomna u prokaryot, některá prokaryota mají lineární genomy
- mutace telomerické RNA vede k prodlužování telomer
- otázka účasti v syntéze DNA - méně jasné než u spliceozómu a ribozómu
- starobylé RNA genomy byly lineární --> podpora hypotézy genomových značek



9. Vault RNA

- přilepena na povrchu jaderné membrány a asociována s komplexem jaderných pórů
- funkce neznámá, spíše funkční než strukturní (exp. odstranění RNA)
- souvisí s rezistencí rakovinných buněk k léčivům
- obsahuje RNA, sekvence konzervativní
- tvoří značku pro transport NK z jádra a do jádra
- v RNA světě existovala proto-jádro a proto-plazma, aby separovaly replikaci a transkripci, omezení šumu



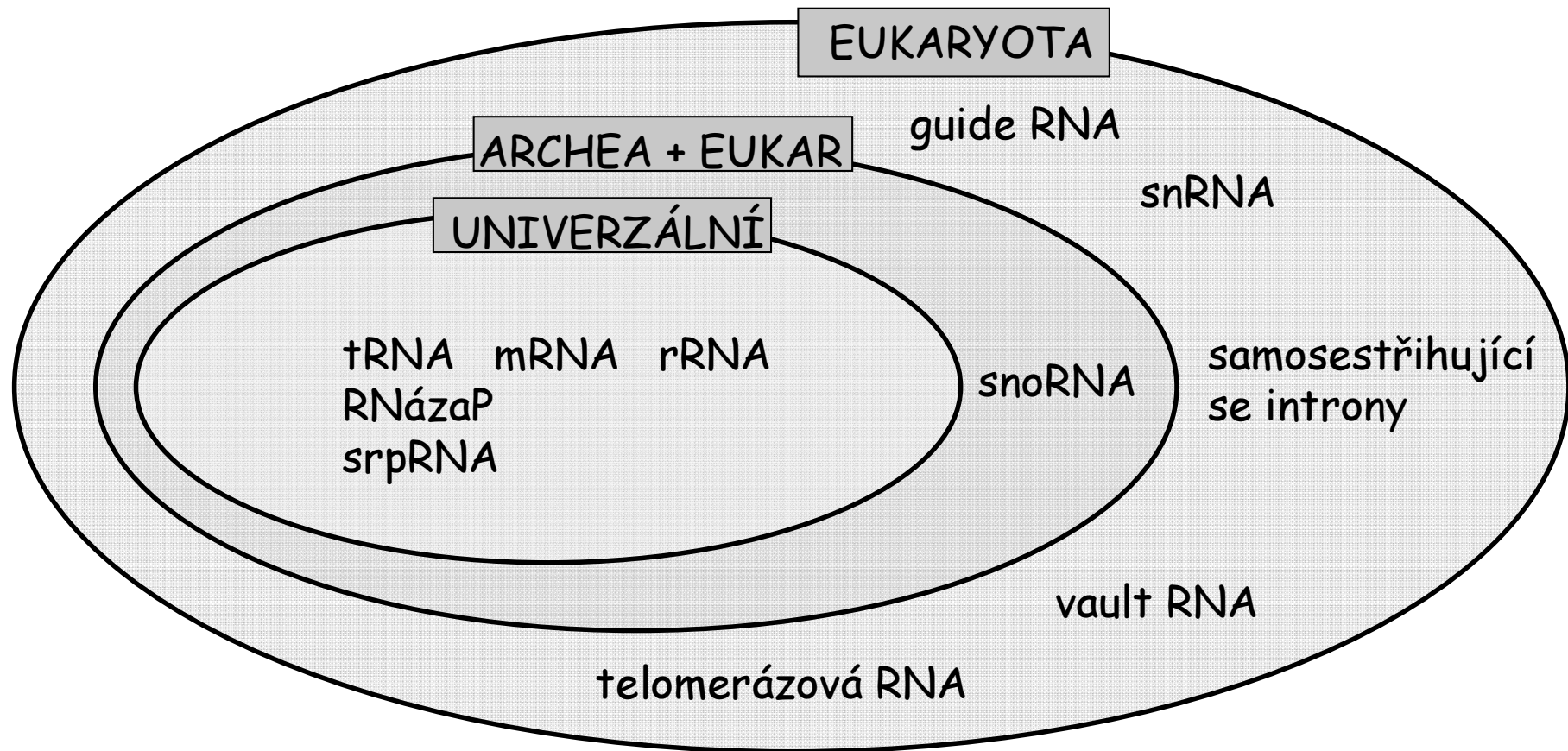
Provázanost ribozymů



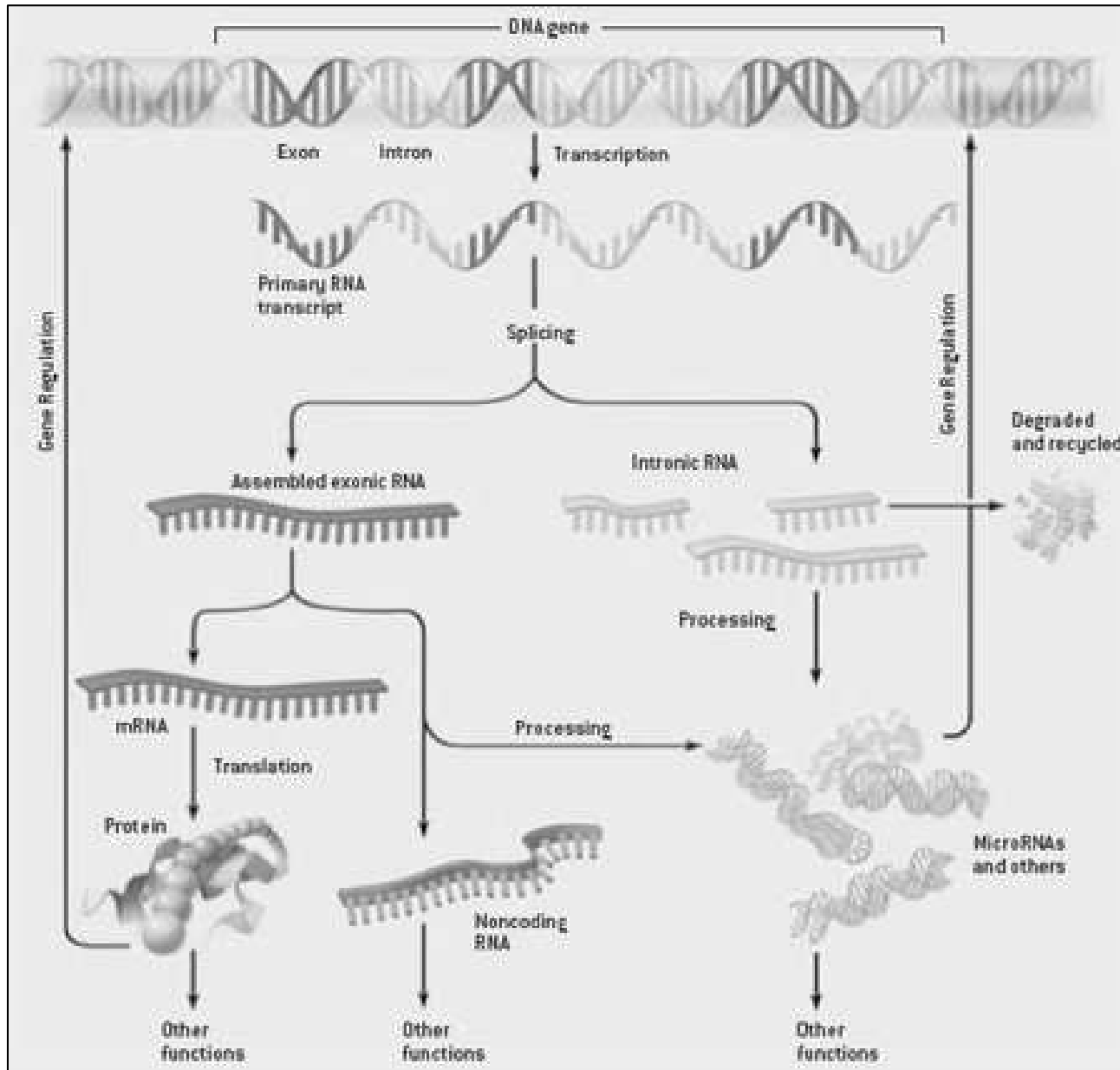
snRNA jsou
potřeba pro
sestřih
snoRNA, které
se nacházejí v
intronech
jiných genů

snoRNA jsou
potřeba pro
sestřih rRNA

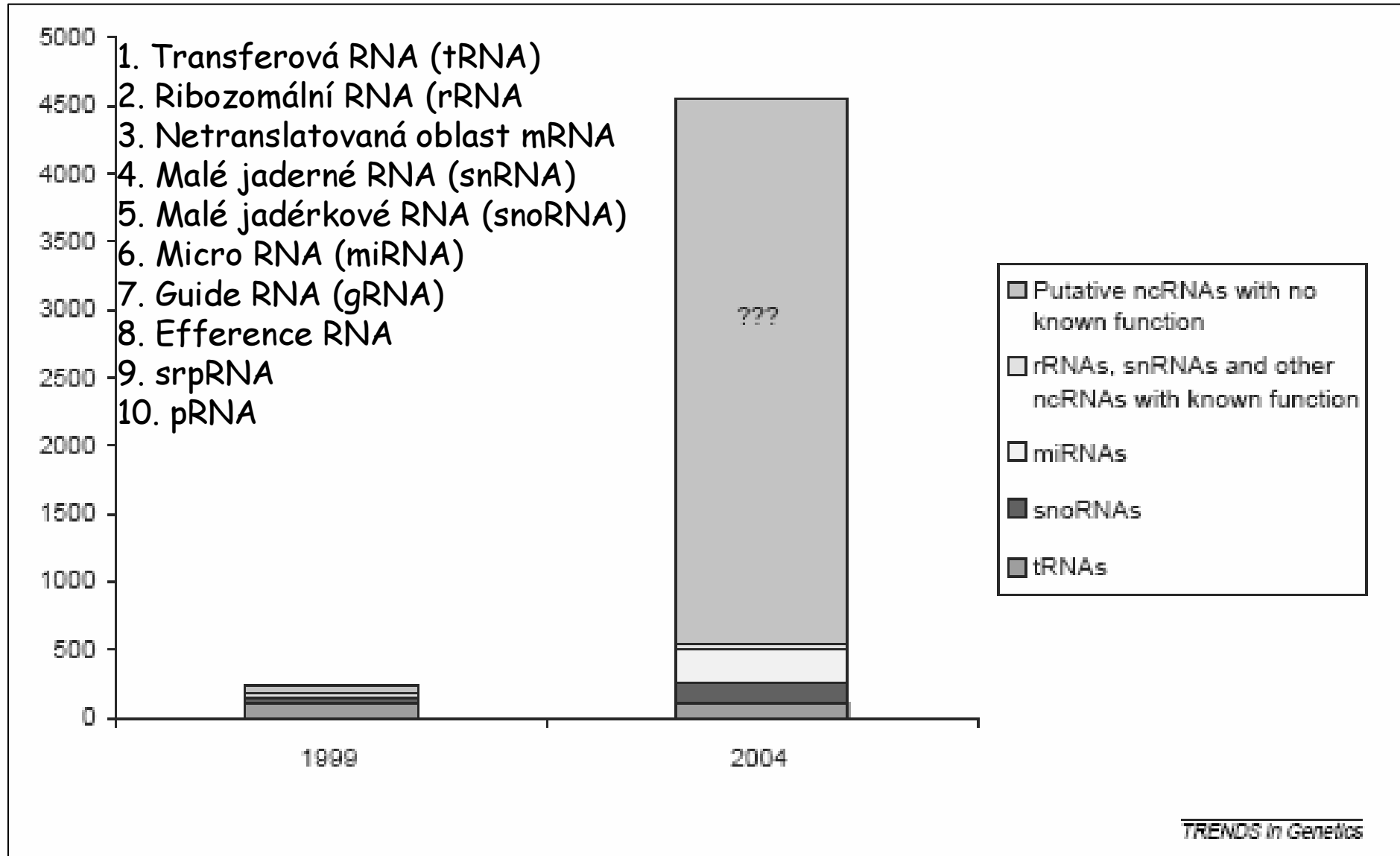
Fylogenetický výskyt fosilních RNA



Nekódující RNA: důležité regulační funkce



Nekódující RNA



První protein: RNA-dependentní RNA polymeráza

RNA → RNP → protein

Proteiny zvýšily účinnost ribozymů

- první geneticky kódovaný protein vznikl náhodou
- krátký peptid strukturně jednoduchý
- interagoval s RNA replikonem a zvyšoval jeho stabilitu nebo zlepšoval jeho konformaci
- později změna aktivity na reverzní transkriptázu a syntéza DNA

RNA polymeráza → Reverzní transkriptáza

První RNA organizmus kódující proteiny: *Riborgis eigensis*

(Jeffares 1998)

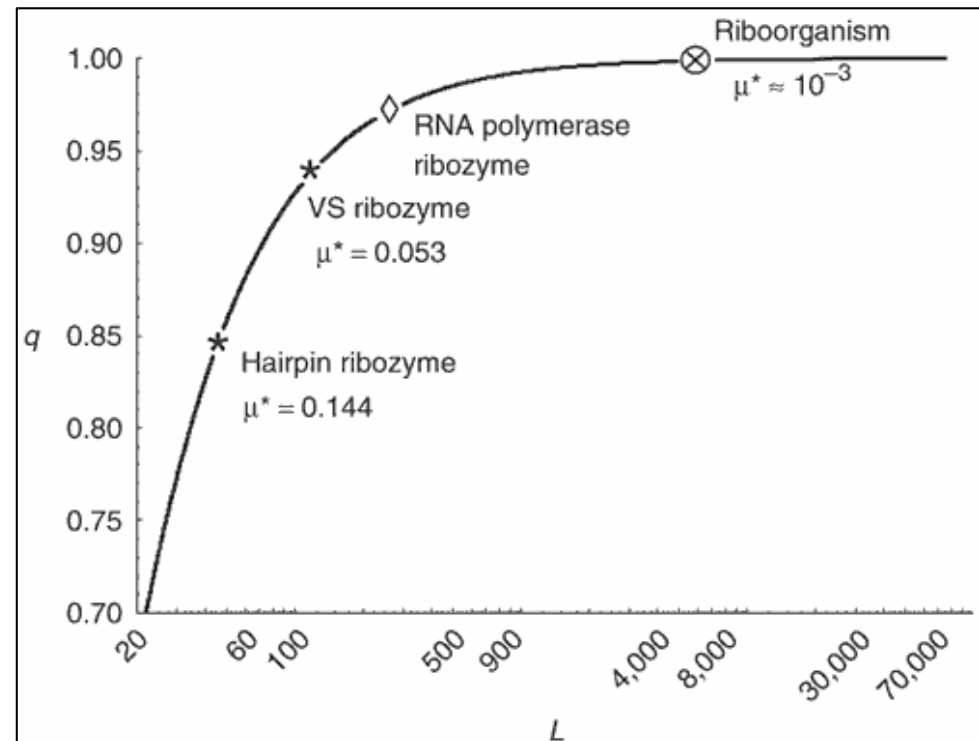
První RNA genomy replikované RNA polymerázami - kódovaly 1 peptidový řetězec

Množství chyb \rightarrow populace lišících se molekul RNA \rightarrow koreplikace vzájemně výhodných lineárních molekul kódujících:

- replikázu
- ochranný plášťový protein
- konformační podjednotku.

Vznik fragmentovaných interagujících genomů (podobnost struktury eukaryontního genomu - původní, prokaryota odvozená)

R. eigensis ~ 15kb genom



Eigenův limit: replikační přesnost je limitujícím faktorem

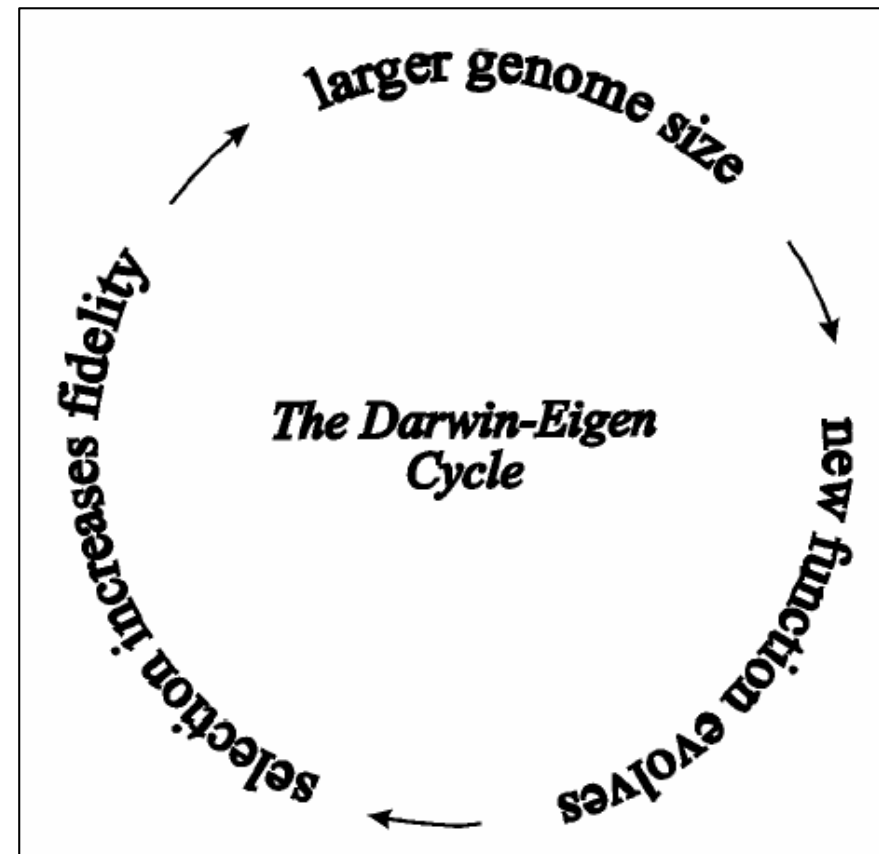
(Eigen, 1992)

- **Definice:**

Čím je vyšší frekvence chyb při replikaci, tím menší genom může projít do další generace

- **Omezení katastrofických dopadů chyb replikace:**

- více kopií (ploidie)
- rekombinace
- fragmentace genomu do chromosomů



Dnešní viry: Funkční relikty časných replikonů?

Pohled na viry:

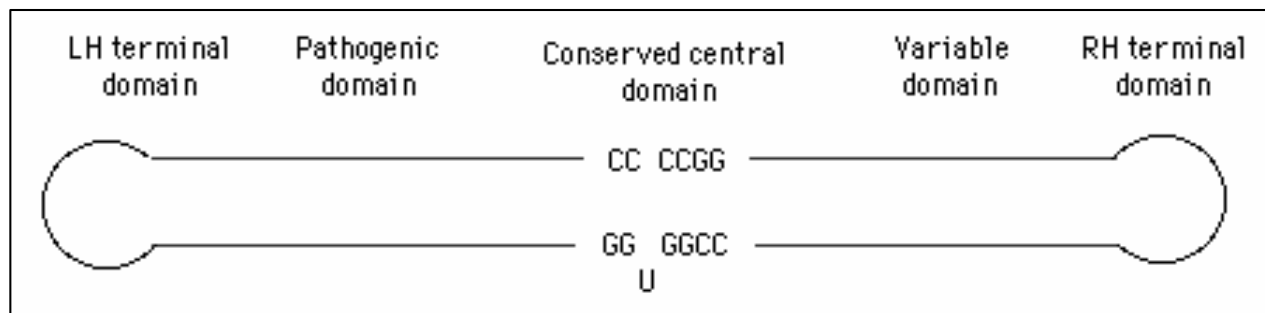
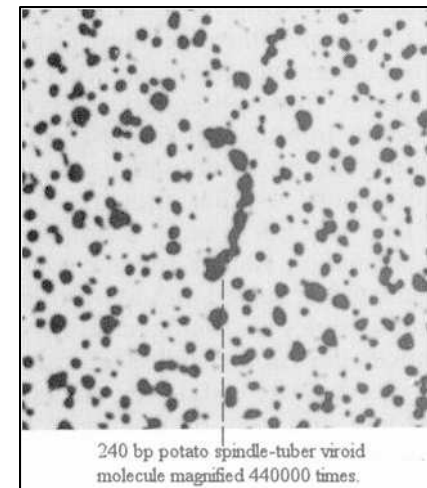
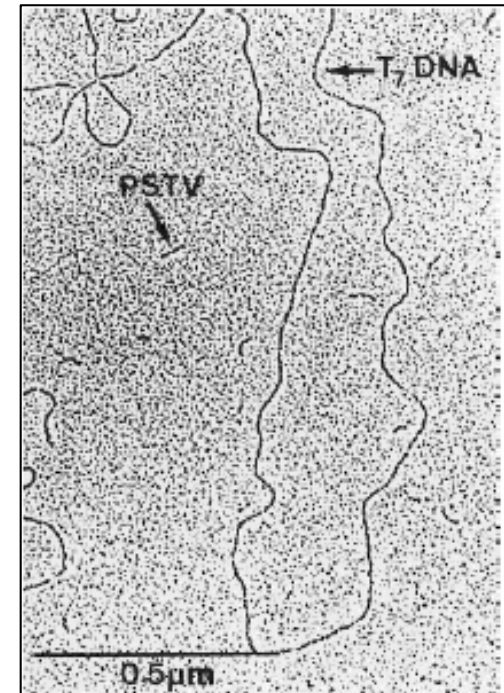
- molekulární paraziti, odvození v důsledku způsobu života
- primitivní, na hranici života podobně jako časná replikátory
- funkční relikty x funkční modely RNA-proteinových replikonů

RNA viry:

- minimální kódující kapacita,
- ochranné kapsidové proteiny
- některé se replikují v vesikulárních strukturách tvořených hostitelskými membránami
- některé viry střídají fáze RNA a DNA - reminiscence přechodu RNA genomů na DNA genomy
- primerem replikace je tRNA

Viroidy: nejpodobnější časným replikonům

- patogeny rostlin
- 200 až 10 000 kopií na buňku
- malé RNA genomy (240-400 b), ssRNA, cirkulární,
- nekódují proteiny - jako replikony éry před proteiny
- replikovány hostitelskými RNA polymerázami
- rolling-circle mechanismus
- multimery štěpené autokatalytickými ribozymovými sekvencemi
- intenzivní vnitřní párování bází jejich genomické sekvence
- tvorba sekundárních struktur stabilizujících genomy

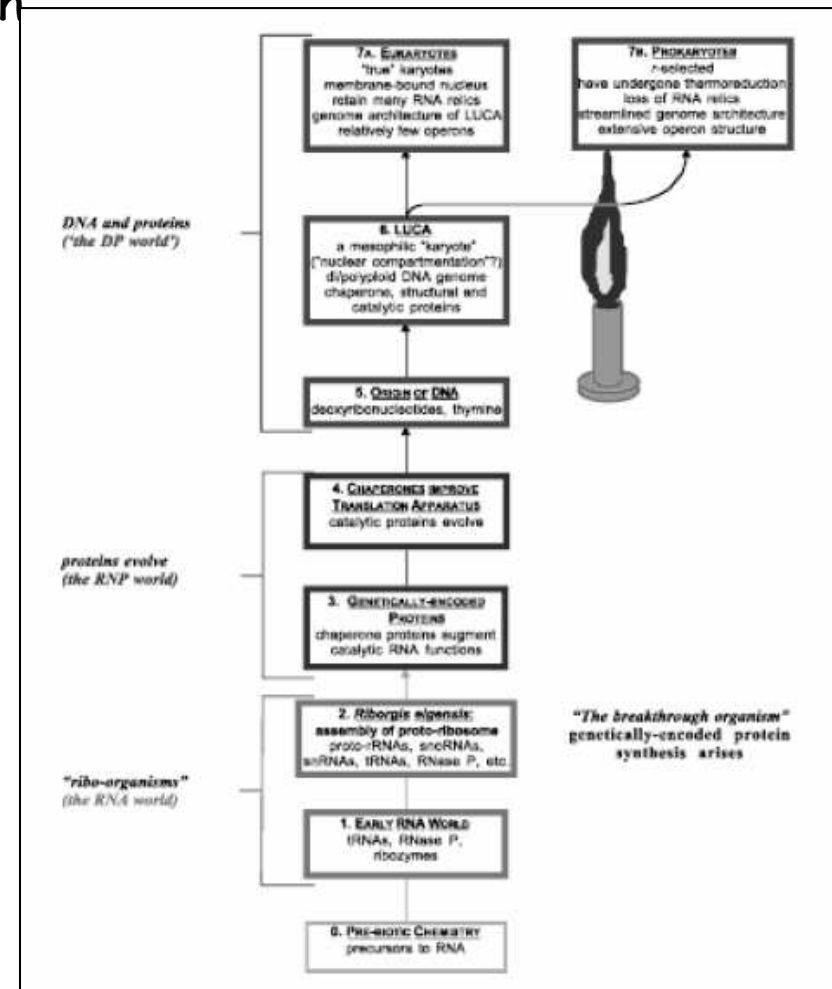


Svět RNA podporuje představu starobylosti eukaryot

1. Mnoho reliktnů světa RNA u eukaryot, jen některé také u prokaryot
2. Posttranskripční úpravy mRNA a rRNA jsou rychlé a účinné u prokaryot
3. Neexistuje selekční výhoda pro moderní vznik sestřihu a spliceosomu u eukaryot
4. Eukaryotické telomerázy jsou starobylé struktury, homologie s RT

Původ prokaryot a hypotéza „termoredukce“

- v evoluci prokaryot bylo stádium termofilních organizmů
- malá stabilita RNA při teplotách nad 50°C
- časové i prostorové oddělení transkripce a translace nevýhodné - degradace RNA
- odstraněním intronů odpadl náročný sestřih
- malé RNA vymizely nebo nahrazeny stabilnějšími proteiny



Genomy prokaryot jsou mladší a odvozené

Derivation of the Prokaryotes

	<i>Riborgis eigensis</i>	LUCA	Eukary- otes	Prokary- otes
DNA genome	–	+	+	+
Diploid or polyploid	+	+	+	–
Telomerase RNA	+	+	+	–
Linear Genome	+	+	+	–
rRNA processing by snoRNA	+	+	+	–
mRNA processing by snRNA ^a	+	+	+	–
tRNA processing by RNase P	+	+	+	+
Coupled rRNA transcription & processing	–	–	–	+
Coupled transcription & translation	–	–	–	+
Genome-encoded CCA tail ^b	–	–	–	+

Genomy prokaryot jsou mladší a odvozené

PŮVODNÍ GENOM

- lineární
- fragmentovaný
- introny obsahující
- RNA molekuly potřebné pro úpravy RNA

EUKARYOTA

ODVOZENÝ GENOM

- cirkulární
- jedna molekula
- operony obsahující
- mnohé RNA nahrazeny proteiny

PROKARYOTA

Mechanismus přechodu LIN → CIRK genomů na modelu retrovirů:

- transkripce retroviru spolu s genem a přepsání do DNA a cirkularizace
- množství cirkulárních molekul s různými geny, jejich rekombinace a zvětšování
- selekční zvýhodnění cirkulárních molekul (termostabilita a rychlejší replikace)