

RNA v proteosyntéze

Genetický kód a příprava aminoacyl-tRNA

Jiří Jonák

V buňce existují tři hlavní a tradiční třídy RNA, které se podílejí na biosyntéze proteinů: ribozomální RNA (rRNA), transferové RNA (tRNA) a messenger RNA (mRNA, dříve také nazývaná informační RNA, iRNA). O jejich struktuře a historii výzkumu pojednával nedávno jiný článek (Živa 2007, 3: 98–100). K nim se dnes řadí nové a stále zajímavější a důležitější třídy tzv. malých RNA. Jednou z nich jsou microRNA (miRNA) — nekódující genové produkty složené z jednovláknové ribonukleové kyseliny dlouhé asi 22 nukleotidů, které se u rostlin a živočichů (včetně člověka) vážou na komplementární úsek v mRNA a mohou indukovat buď její destrukci, anebo stericky zablokovat její překlad do proteinů (translaci). Čili působí jako negativní regulátory genové exprese. Vznikají posttranskripční úpravou enzymem nukleázou Dicer z charakteristických vlásečkovitých úseků větších jednovláknových RNA prekurzorů. Další třídou malých RNA jsou siRNA (short interfering RNA). Velikostí i funkcí se podobají miRNA, ale vznikají (opět účinkem Diceru) z hybridů složených ze dvou antiparalelních RNA transkriptů, tj. dlouhých dvouvláknových molekul RNA ať už endogenního anebo exogenního původu. Každá z RNA (až na prekurzory exogenních siRNA) se syntetizuje podle matrice tvořené jedním, tzv. nekódujícím vláknem DNA (DNA templát), a to v procesu, který se nazývá přepis — transkripce. O problematice RNA a proteosyntézy z evolučního hlediska bylo již v Živě pojednáno v článku M. Bezděka O vzniku života II. (2003, 2: 52–56).

Zapojení RNA do proteosyntézy začalo být zřejmé ke konci 30. let 20. stol. na základě pokusů T. Casperssona a J. Bracheta. Oba vědci objevili v cytosolu eukaryotických buněk částice bohaté na RNA a bílkoviny (ribonukleoproteinové částice) a zjistili, že jejich koncentrace koreluje s rychlostí, jakou jsou v buňce bílkoviny syntetizovány. To bylo poprvé, kdy se usoudilo, že mezi RNA a proteosyntézou existuje nějaký vztah. Brachet navíc navrhl, že ribonukleoproteinové částice, které byly později pojmenovány ribozomy, jsou místem proteosyntézy. To se však potvrdilo až v 50. letech, kdy započaly experimenty s radioaktivními aminokyselinami. Krátce po vstříknutí radioaktivně značené aminokyseliny se totiž větší radioaktivita vestavěná do bílkovin našla na ribozomech. Tento experiment také naznačoval, že alespoň u eukaryot není proteosyntéza bezprostředně řízena DNA, neboť DNA (v jádře) a ribozomy (nacházející se v cytosolu) jsou v buňce prostorově odděleny.

V r. 1958 se do té doby zcela matně chápané vztahy mezi DNA, RNA a bílkovinami pokusil uspořádat F. Crick formulací tzv. centrálního dogmatu molekulární biologie: totiž, že DNA řídí svou vlastní replikaci a svou transkripci na RNA a RNA zase řídí svou translaci do proteinů (Živa 2007, 3: 98–100). F. Jacob a J. Monod pak celý pochod genové exprese dále specifikovali, když uvedli, že strukturální geny na DNA se nejdříve přepisují do komplemen-

tárních vláken mRNA a že molekuly mRNA se přechodně spojují s ribozomy a řídí je, aby syntetizovaly proteiny.

Bakterie *Escherichia coli* může syntetizovat odhadem asi 4 300 různých bílkovin (polypeptidů), ale množství každé z nich v buňce je různé. Před dělením může bakterie obsahovat až asi 70 000 kopií různých ribozomálních proteinů (tj. podle počtu ribozomů). Jiná složka proteosyntetického systému, elongační faktor EF-Tu tvoří 5–10 % celkové bílkoviny buňky. Na druhé straně koncentrace určitých regulačních proteinů může být velmi nízká — např. Lac represor, který blokuje expresi z laktózoového operonu (*lac*), představuje jen asi 0,002 % z celkové bílkoviny. Mnohé enzymy, zvláště ty, které se podílejí na základních, tzv. house-keeping funkcích buňky, se syntetizují víceméně stále a stejnou rychlostí a nazývají se konstitutivní. Jiné enzymy, označované jako adaptační nebo indukovatelné, jsou syntetizovány až podle okolností, tj. změn v prostředí.

Genetický kód

Proteosyntéza — biosyntéza bílkovin — představuje pochod, při kterém se genetická informace uchovává a předávána v řeči DNA exprimuje, tj. realizuje formou bílkovin. Proteosyntéza se také nazývá translace — překlad, neboť představuje biochemický převod informace z řeči nukleových kyselin do řeči bílkovin.

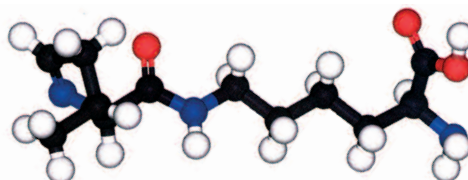
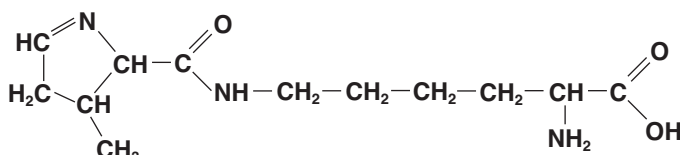


Obr. 1a Struktura a vzorec aminokyseliny selenocysteinu (Sec, $C_3H_7NO_2Se$; molekulová hmotnost ~ 168,05 g/mol). Obr. z archivu autora

Genetická informace je lineární, je uložena ve formě polynukleotidového vlákna (obvykle) DNA, což je polymer nukleotidů. Připomeňme, že používá čtyř písmen — nukleotidy A, G, C a T (adenin, guanin, cytozin, thymin). Naproti tomu bílkoviny jsou složeny jak z biochemického, tak i stereochemického hlediska ze zcela jiných písmen nazývaných aminokyseliny. Počet těchto aminokyselin dnes dosahuje čísla 22. Při tvorbě bílkoviny se rovněž spojují, polymerují do lineárního vlákna a dá se říci, že existuje kolinearita (souběžnost) mezi pořadím nukleotidů v DNA a sekvencí aminokyselin v bílkovině, která je touto DNA kódována. Prakticky jde tedy při translaci o vytvoření bílkovinného vlákna podle vlákna polynukleotidového. Podle konvence se polynukleotidové sekvence píšou ve směru 5'–3' a aminokyselinové sekvence proteinů od amino N-konce ke karboxylovému C-konci, což odpovídá směru jejich čtení.

Jak už odvodili F. Jacob a J. Monod, „přeměna“ DNA na bílkovinu neprobíhá přímo, ale přes prostředníka, kterým jsou mRNA. Každá mRNA je kopií určitého úseku jednoho z vláken DNA zhruba v délce jednoho nebo více genů. Tak jako DNA nese tedy stejnou specifickou zprávu pro výrobu jedné nebo více bílkovin. Nukleotid T je však v mRNA nahrazen jiným pyrimidinovým nukleotidem U a jako cukerná složka zde slouží ribóza a ne deoxyribóza jako v DNA. Navíc je RNA přirozeně jednovláknová. Tím vším se však RNA stává i mnohem labilnější než DNA. Dá se snadno a rychle odbourat přirozenými mechanismy buňky, když už se např. dosáhlo požadované hladiny dané bílkoviny a její přebytek by byl buňce k ničemu anebo by mohl i škodit (např. nadbytek mRNA kódující protoonkogeny, viz článek na str. 236). Uvádí se, že v buňce *E. coli* je průměrný poločas mRNA asi 2–3 minuty, naopak mRNA kódující v eukaryotické buňce β-globin má poločas delší než 10 hodin.

Obr. 1b Struktura a vzorec aminokyseliny pyrrolyzinu (Pyl, $C_{12}H_{21}N_3O_3$; molekulová hmotnost ~ 255,32 g/mol). Obr. z archivu autora



Tab. 1 Genetický kód — kódovací pravidla pro 22 aminokyselin kódovaných geneticky. Jsou uvedeny i mezinárodní jednopísmenové zkratky aminokyselin a pro tři stop triplety i jejich historická pojmenování Amber, Opal a Ochre. Syntéza naprosto většiny bílkovin začíná methioninem, který je kódován kodonem AUG (univerzální startovací signál), výjimečně valinem (kodon GUG), případně ještě jinou aminokyselinou. Z tabulky je dobře patrná degenerace genetického kódu vyjádřená zejména proměnlivostí ve třetí pozici kodonů

Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG	Phe	F	UUU, UUC
Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Asn	N	AAU, AAC	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Asp	D	GAU, GAC	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Cys	C	UGU, UGC	Trp	W	UGG
Gln	Q	CAA, CAG	Tyr	Y	UAU, UAC
Glu	E	GAA, GAG	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG	Start		AUG, (GUG)
His	H	CAU, CAC	Stop		UAG (Amber)
Ile	I	AUU, AUC, AUA	Stop		UGA (Opal)
Leu	L	CUU, CUC, CUA, CUG, UUA, UUG	Stop		UAA (Ochre)
Lys	K	AAA, AAG	Pyl	O	UAG
Met	M	AUG	Sec	U	UGA (+SECIS)

Jaký je šifrovací klíč neboli kód mezi čtyřmi nukleotidy v mRNA a 22 aminokyselinami v bílkovině? Ukázalo se, že tento tzv. genetický kód je třípísmenový, tj. pořadí tří nukleotidů — triplet kóduje vždy jedinou aminokyselinu. Ze čtyř různých nukleotidů v mRNA se tak může vytvořit $4^3 = 64$ různých tripletů neboli kódových slov, kodonů (tab. 1). To je naprosto dostatečný počet ke specifikaci každé z 22 aminokyselin a navíc i k vytvoření signálů, které určí, odkud má v mRNA translace začít (obvykle od kodonu AUG) a kde má skončit (tři signály stop — UAA, UAG a UGA). Představují jakousi tečku za větou, tj. v našem případě za syntetizovanou bílkovinou.

Přirazení jednotlivých aminokyselin k jednotlivým kodonům, tj. rozšifrování genetického kódu, se experimentálně podařilo asi v polovině 60. let 20. stol. Jak je vidět z tab. 1, pouze dvě aminokyseliny, a to methionin a tryptofan, jsou kódovány jen jedním kodonem (AUG, resp. UGG). Pro zbytek aminokyselin platí, že jsou kódovány dvěma, třemi, čtyřmi nebo dokonce šesti kodony. Kodony pro stejnou aminokyselinu se označují jako synonyma a obvykle se liší ve třetí nukleotidu. Existence více kodonů pro jednu aminokyselinu znamená, že kód je degenerovaný. Na druhé straně je však jednoznačný, neboť každý kodon specifikuje vždy jen jednu jedinou aminokyselinu. Genetický kód je také skoro (viz dále) univerzální, neboť se používá pro translaci ve všech organismech. Tato skutečnost je jedním z nepřesvědčivějších důkazů o společném předku všech živých organismů.

Kodony jdou v mRNA za sebou, bez mezer a bez překrývání v tzv. čtecím rámci. Ten se nastává prvním — iniciačním — kodonem, což je nejčastěji AUG kódující methionin. Naprostá většina nově syntetizovaných bílkovinných řetězců tedy začíná touto aminokyselinou. Methionin se však velmi často — a to buď ještě před dokončením translace, anebo až po ní, už z hotové bílkoviny — odštěpuje. Informace v mRNA se tedy čte a překládá souvisle po úsecích dlouhých tří nukleotidy a jejich sled se nastaví prvním iniciačním kodonem (Živa 2006, 5: 198).

Ne všechna kódová slova pro jednu aminokyselinu jsou využívána v organismu se stejnou frekvencí. Naopak, některá ze synonym jsou v genetické informaci skoro nevyužívána (anebo jen pro speciální pro-

teiny), na rozdíl od tzv. běžných kodonů. Přitom četnost využívání jednotlivých kodonů je specifická už pro každý jednobuněčný organismus, jiný typický výběr platí pro obratlovce a jiný zase např. pro vyšší rostliny. Mluvíme o tzv. kodonovém dialektu.

Kódování selenocysteinu a pyrrolyzinu — úloha kontextu mRNA

Ke klasicky geneticky kódovaným 20 aminokyselinám přibyla před více než 25 lety další, a to 21. aminokyselina selenocystein (Sec, obr. 1a) a před několika lety 22., pyrrolyzin (Pyl, obr. 1b). Na rozdíl od všech předchozích aminokyselin jsou kódovány triplet, které normálně slouží jako signály pro ukončení translace. Tak triplet UGA slouží pro inkorporaci selenocysteinu a UAG pro inkorporaci pyrrolyzinu (tab. 1).

Ačkoli je selen při zvýšení své koncentrace v organismu vysoce toxický, jeho nedostatek zase vede k závažným onemocněním (kardiomyopatiím). Jde o stopový prvek, který je ve formě selenocysteinu nezbytnou složkou aktivního místa několika důležitých enzymů. Tyto selenoproteiny, jako např. thioredoxin reduktázy, se podílejí zejména na oxido-redukčních reakcích. Jsou přítomny jak u některých bakterií a archaeobakterií, tak u eukaryot; ani rostliny, ani kvasinky však neumějí selenocystein do proteinů inkorporovat.

Naproti tomu výskyt pyrrolyzinu (Pyl) se dosud omezuje jen na členy rodiny archaeobakterií *Methanosarcinaceae* a na bakterii *Desulfotobacterium hafniense*. Zapojení Pyl do metabolismu těchto organismů souvisí s jejich výjimečnou schopností využívat metylaminy jako zdroj energie. Činí to prostřednictvím enzymů metylaminometyltransferáz a pro jejich zdárnou syntézu je nutné, aby se jeden triplet UAG umístěný ve čtecím rámci jejich mRNA přečetl ne jako terminační signál, ale jako signál pro inkorporaci pyrrolyzinu. *D. hafniense* kóduje navíc i systém, kterým se do bílkovin zabudovává selenocystein, a tak tato bakterie představuje zatím jediný známý organismus, který používá při translaci všech 22 aminokyselin.

K vestavění obou těchto zvláštních aminokyselin do bílkovinného řetězce je tedy nutno při translaci jaksi „předdefinovat“ kód pro dva triplet UGA a UAG. Z terminačních signálů, které nekódují žádnou aminokyseli-

Tab. 2 Pravidla volnějšího párování („wobble“) mezi první báží antikodonů aminoacyl-tRNA a třetí báží kodonů v mRNA

5' (1.) báze antikodonu	3' (3.) báze kodonu
A	U
C	G
G	C, U
U	A, G
I	U, A, C

Tab. 3 Příklady změněného kódování v mitochondriích savců

Kodon	Obvyklý význam	Mitochondriální význam
UGA	terminace	tryptofan
AUA	izoleucin	methionin
AGA	arginin	terminace
AGG	arginin	terminace

nu, se stávají aminokyselinové kodony, čili dochází jakoby k odchylce od pravidla jednoznačnosti kódu. Kdyby však opravdu platilo, že tyto dva terminační triplet se v buňce zcela náhodně jednou využijí jako signály pro ukončení translace a podruhé jako signály pro inkorporaci selenocysteinu a pyrrolyzinu, znamenalo by to pro každou buňku velké nebezpečí. Ve skutečnosti to však vůbec neplatí. To, že se v případě inkorporace selenocysteinu triplet UGA „přečte“ jako kodon pro Sec, vyžaduje zvláštní zabezpečení. Jednak specializovaný translační aparát pro tento proces (o něm zde ale psát nebudu) a pak především musí mRNA obsahovat zcela nový prvek, totiž speciální sekvenci SECIS (Selenocysteine Incorporation Signal), a to buď přímo za UGA, anebo až v nepřekládané oblasti na svém 3' konci (3' UTR). SECIS v těchto polohách vytvoří v mRNA unikátní sekundární strukturu; ta je spolu s UGA rozpoznávána jedním z členů speciálního translačního aparátu buňky pro Sec a jenom takto dohromady se z UGA stane signál pro inkorporaci Sec. Pokud je tedy v mRNA umístěn ve čtecím rámci kodon UGA a struktura SECIS chybí, čte se UGA vždy jen jako terminační signál.

Změna ve specifitě tripletu UGA je jedním z mnoha případů, jak sama RNA, v tomto případě mRNA, může zabezpečit závažný regulační krok. Určitým kontextem může ovlivnit účinnost terminace, navodit jiné kódování, změnit kód. Nevystupuje jako pasivní rigidní molekula, ale aktivně se podílí na usměrnění funkcí.

Jak se zajistí, že se další terminační triplet UAG změní na kodon pro pyrrolyzin, není dosud úplně objasněno. Žádný speciální RNA motiv podobný SECIS nebyl v případě Pyl nalezen. Zdá se, že se tato aminokyselina dostala do genetického kódu u *Methanosarcinaceae* teprve „nedávno“. Zabezpečení proti zneužití UAG proto možná nejsou ještě tak dokonale jako u Sec, anebo nebyla dosud objevena. Zneužití UAG je ale jistě omezeno už tím, že: 1) triplet UAG se vyskytuje v mRNA těchto archaeobakterií významně méně často (0,05 %) než UAA (1,8 %) nebo UGA (1,2 %) a 2) mají-li být UAG triplety čteny jako stop signály, pak jsou téměř bezprostředně následovány ještě dalším terminačním tripletem UAA nebo UGA. To má za následek výrazné zmenšení pravděpodobnosti nechtěného přeložení UAG na Pyl a tím i negativních důsledků, které by to

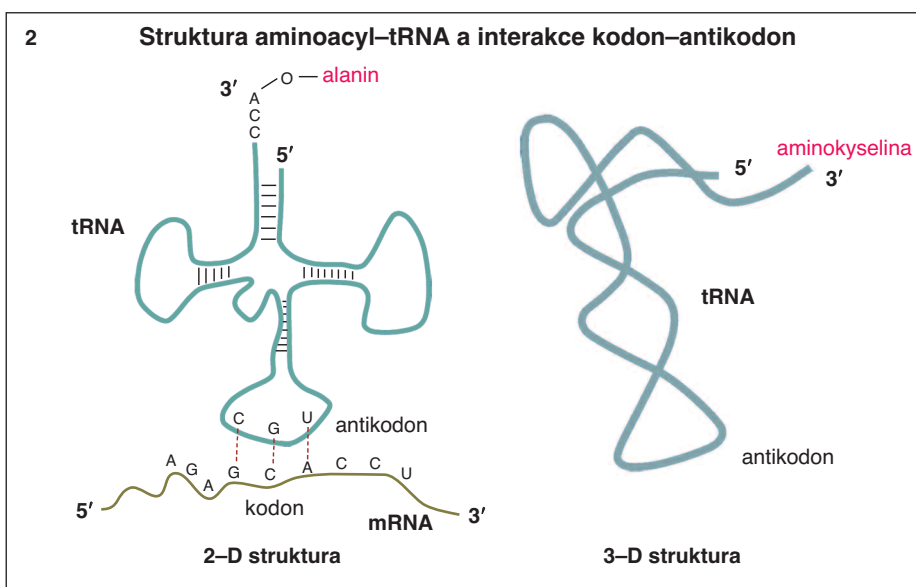
mohlo mít pro integritu proteomů (soubor všech bílkovin buňky/organismu) rodiny *Methanosarcinaceae*.

Transferové RNA a čtení kodonů; aminoacyl-tRNA syntetázy

Výběr jednotlivých aminokyselin kodony neprobíhá přímo, ale pomocí velké rodiny „dvoujazyčných“ adaptorových molekul tRNA. Vláknko těchto molekul, složené asi z 80 nukleotidů, se svinuje tak, že se zhruba v půli obrátí, obě půlky se na sebe přerušovaně, v rámci vzájemné komplementarity přiloží a vytvoří útvar podobný obrácenému L (obr. 2, 3). Na konci delšího ramene L, tj. v místě svého zpátečního ohybu, vytváří vláknko RNA vlásenku se smyčkou s tripletovou nespárovanou sekvencí, která se nazývá antikodon. To je nástroj ke čtení kodonů. Kratší rameno L tvoří 5' a 3' konec vláknka tRNA. 3' konec končí nespárovanou sekvencí -CCA, kam se na A připojuje aminokyselina. Proto se toto rameno nazývá akceptorové. Přitom platí, že antikodon každé tRNA je komplementární jen s takovým kodonem v mRNA, který kóduje aminokyselinu, jejíž kodon umí antikodon této tRNA rozpoznat.

Vláknka aminoacyl-tRNA a mRNA probíhají při vzájemném setkávání při translaci antiparalelně, podobně jako vláknka v dvoušroubovici DNA (obr. 2). Postupnou interakcí mezi antikodony jednotlivých aminoacyl-tRNA a kodony v mRNA dochází ke čtení mRNA po jednotlivých kodonech (ve směru 5'–3') a překladu těchto kodonů na aminokyseliny. Jedna po druhé jsou přitom z aminoacyl-tRNA připojovány do rostoucí bílkoviny (viz dále). Tak se zabezpečuje kolinearita mezi genetickou informací a pořadím aminokyselin v bílkovině, které zase jednoznačně určuje vlastnosti bílkovin, a tak výsledný fenotyp organismu.

Každá tRNA nese specifickou aminokyselinu a má specifický antikodon. Z hlediska počtu aminokyselin by tedy k translaci stačilo 22 různých tRNA, ale z hlediska počtu různých tripletů, které se mají překládat, by při požadavku, že antikodon se může specificky vázat jen s jedním kodonem, bylo zapotřebí 63 různých tRNA. Avšak během evoluce se vytvořil určitý kompromis reagující na degeneraci genetického kódu. Pro přenos jedné aminokyseliny obvykle slouží více než jedna tRNA (v závislosti na počtu synonymních kodonů). Naopak degenerované kodony se často čtou jedinou tRNA. Platí zde pravidla tzv. hypotézy „wobble“, kterou vyslovil F. Crick v r. 1966 (tab. 2). Podle ní mohou platit mezi nukleotidem ve 3. (degenerovaném) pozici kodonu v mRNA a nukleotidem v 1. pozici antikodonu tRNA méně rigorózní pravidla vzájemného párování než mezi prvními dvěma nukleotidy kodonu a 2. a 3. nukleotidem antikodonu. Prvními nukleotidem v antikodonu, tj. na jeho 5' konci, bývá často inozinová kyselina (I), tzv. minoritní nukleotid odvozený od hypoxantinu, který se může párovat s U, A nebo C. Transferová RNA přenášející leucin s antikodonem 5' IAG tak může číst tři leucinové kodony: 5' CUU, CUC i CUA. Určil v první pozici antikodonu se podle „wobble“ může spojit nejen s rigorózním A, ale i s G; někdy však musí být toto U pro interakci s G modifikované atd. Guanin v první pozici antikodonu se může párovat nejen s C, ale i U. Při platnosti pravidel „wobble“ by tedy stačilo asi 33 různých

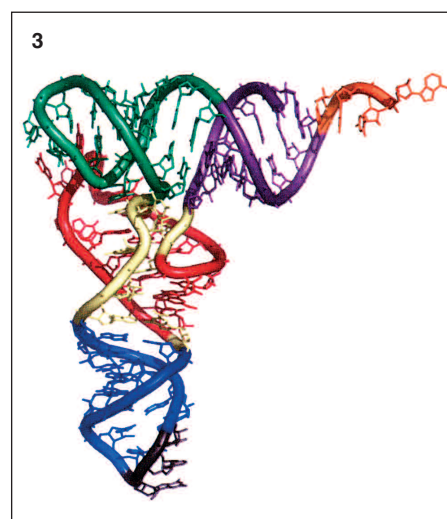


Obr. 2 Vlevo: Schematické znázornění párování kodonu v mRNA s antikodonem v aminoacyl-tRNA. GCA je kodon pro alanin. Je čten antikodonem 5' UGC v alanyl-tRNA. Je jasně patrný antiparalelní průběh vláken mRNA a tRNA. Aminoacyl-tRNA je znázorněna ve formě své sekundární struktury. Obr. vpravo ukazuje, jak se schematicky znázorňuje tRNA ve své terciární struktuře. Podle www.langara.bc.ca/kreslila T. Chýlová, upraveno

molekul tRNA k dekódování všech tripletů (kromě terminačního UAA). Takovému počtu se blíží situace u některých bakterií, avšak buňky vyšších organismů mají obvykle 50 nebo více druhů tRNA, zřejmě k pojištění vysoké specifity dekódovacího procesu. Naopak v mitochondriích platí pro párování kodonů s antikodony ještě volnější pravidla „wobble“, a tak např. nemodifikované U v 1. pozici antikodonu „má dovoleno“ se párovat — v případě synonymních kodonů — se všemi čtyřmi základními nukleotidy A, G, C i U. Pak proteosyntetický systém mitochondrií (na rozdíl od situace v cytosolu) vystačí, připočteme-li k tomu i změny v kódování některých aminokyselin (tab. 3), s velmi úsporným počtem 22 různých tRNA. Vedle úspory v počtu molekul tRNA nabízí fenomén degenerace genetického kódu i další výhodu. Dojde-li ve 3. pozici degenerovaných kodonů k mutaci, tedy záměně jedné báze za jinou, nemusí to vždy znamenat, jak je z tab. 1 zřejmé, změnu ve výběru aminokyseliny. Jde jen o tzv. tichou mutaci, bez důsledků pro aminokyselinové složení bílkoviny a tím i jejích vlastností.

Z toho, co bylo uvedeno je zřejmé, že připojení správné aminokyseliny na molekulu tRNA je stěžejním krokem pro zabezpečení věrnosti translace. Aminoacylovaná tRNA, to je s navázanou aminokyselinou, už totiž při čtení mRNA nijak nekontroluje, zda nesená aminokyselina je či není tou, kterou právě čtený kodon kóduje. Zde se, za aktivní účasti ribozomu, jen důkladně prověřuje komplementarita mezi kodonem a antikodonem (viz dále).

Úkol vytvářet správné aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) připadl celé rodině enzymů zvaných aminoacyl-tRNA syntetázy. Každá z nich je vybavena schopností vybrat a aktivovat jedinou aminokyselinu z 20–22 možných, najít pro ni odpovídající tRNA z několika desítek různých a vybranou ami-

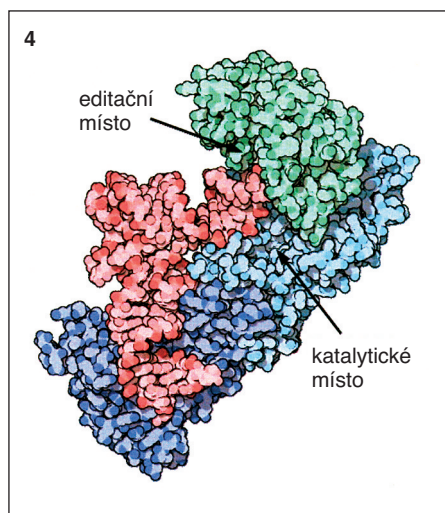


Obr. 3 Model terciární struktury tRNA. Oranžově je znázorněn 3' konec -CCA, akceptorové rameno je fialové, antikodon černě, antikodonové rameno modře. Struktura je reprodukována s laskavým svolením N. R. Vosse

nokyselinu kovalentně připojit esterickou vazbou na 2' či 3' -OH skupinu ribózy 3' koncového adenylátového zbytku molekuly tRNA (obr. 2). Každý z enzymů je přitom schopen zabezpečit tvorbu správné aminoacyl-tRNA s přesností 10^4 až 10^5 , neboli teprve v jednom případě z 10–100 tisíc dojde k chybné aminoacylaci tRNA. Vysoká přesnost je zde velmi důležitá, neboť právě tento pochod je vlastně hlavní stereochemickou reakcí translace, při něm se realizuje vztah mezi kodonem a aminokyselinou vyjádřený v genetickém kódu. Aminoacyl-tRNA syntetázy (AaRS) tedy poskytují molekulární základnu pro spojení genotypu s fenotypem. [Pozn. Syntetázy lze rozdělit do dvou nepříbuzných tříd, a to podle topologie jejich vazebného místa pro molekulu ATP a připojení aminokyseliny na 2' či 3' OH skupinu ribózy. V podstatě platí, že pro každou aminokyselinu pracuje v buňce jedna AaRS z třídy 1 nebo 2. Celkem tedy může v buňce být maximálně 22 syntetáz, obvykle ale jen 20. Na druhé straně také platí, že každá ze syntetáz dovede rozpoznat všechny tRNA, které tuto aminokyselinu přenášejí. Takovým tRNA říkáme izoakceptorové].

Sec-tRNA a Pyl-tRNA mají své antikodony (UCA a CUA) komplementární termina-

Obr. 4 Editační schopnosti některých aminoacyl-tRNA syntetáz. Izoleucyl-tRNA syntetáza (třída I) v komplexu s tRNA pro izoleucin. Výběr některých aminokyselin syntetázou musí být zabezpečen zvláštními mechanismy. Takovým příkladem je izoleucin. Na enzym se váže do vazebné části jeho katalytického místa — dutiny, která má izoleucinový tvar. Je tak dostatečně malá, aby se do ní nemohly vázat větší aminokyseliny jako methionin nebo fenylalanin a také natolik hydrofobní, aby se do ní nemohly vázat aminokyseliny s polárním vedlejším řetězcem. Na druhé straně však nelze zabránit, aby se do dutiny dostala trochu menší aminokyselina valin, která má postranní řetězec kratší o $-CH_2-$ můstek. K tomu dochází v poměru 1:150. To však už představuje příliš vysokou míru chybování a musí nastoupit korekce — editační krok, který je zabezpečen existencí druhého aktivního, tzv. editačního místa v syntetáze. Izoleucin kovalentně spojený s tRNA se do tohoto místa nedostane, ale chybný, menší misacylovaný valin ano. Je v tomto místě však z tRNA odštěpen a tRNA se znovu připraví pro přijetí izoleucinu. Editacním mechanismem se tak úroveň chybování sníží na přípustnou mez. Jindy má editační místo i schopnost rozštěpit už chybný intermediát aminoacylace — aminoacyl-adenylát. Tedy provést korekci ještě před tím, než se chybná aminokyselina naváže na tRNA. Červeně tRNA, izoleucyl-tRNA syntetáza ostatní barvy. Upraveno podle mgl.scripps.edu



Translace pak pokračuje až k obvyklému terminačnímu signálu. Tato druhá mutace se nazývá supresorová a transferové RNA, které ji nesou a umějí tak „přečíst“ terminační triplet, se nazývají supresory. Např. bodovou mutací v kodonu pro glutamin (CAG) vznikne ve čtecím rámci mRNA terminační triplet UAG a tím dojde k produkci jen zkrácené formy bílkoviny. Dojde-li nyní k druhé mutaci, a to v antikodonu tRNA přenášející tyrozin, a její antikodon se změní z GUA na CUA, potom změněný antikodon umožní „přečíst“ terminační triplet UAG jako kodon pro tyrozin. Vytvoří se protein často funkčně téměř normální, pokud nevádí nahrazení původního glutaminu tyrozinem. V buňce samozřejmě musí být přítomna ještě další tRNA pro tyrozin, kterou se zachová čtení tyrozinových kodonů. Na druhé straně zabezpečení normální terminace syntézy peptidu na terminačním tripletu UAG je pojištěno obvykle přítomností ještě dalšího terminačního tripletu za UAG ve stejném čtecím rámci (podobně jako u Pyl) a i tím, že supresorová tyrozyt-tRNA se nevyskytuje ve vysoké koncentraci. Do třídy supresorových tRNA funkčně patří i Sec-tRNA a Pyl-tRNA. Ty však mají svůj antikodon už přirozeně komplementární s jedním z termi-

načních tripletů a nepotřebují tudíž žádnou další mutaci.

Fenomén supresorové tRNA také ukazuje něco ze způsobů, jaké oblasti v tRNA rozpoznává tyrozyt-tRNA syntetáza. V tomto případě k nim rozhodně nepatří antikodonová oblast, neboť k tvorbě tyrozyt-tRNA dochází bez ohledu na složení antikodonu, jeho mutace z GUA na CUA tyrozylaci neovlivňuje. To je jistě překvapující, neboť transferové RNA pro jednotlivé aminokyseliny se vždy musí lišit v antikodonu, a o této oblasti by se tedy dalo přirozeně soudit, že by měla být u syntetáz první v řadě při určování specifity tRNA. Je nutno poznamenat, že v mnoha případech opravdu patří antikodonové oblasti tRNA mezi základní identifikační prvky pro syntetázy, ale jak je vidět z popsaného případu, není tomu tak vždy. Jiným příkladem je tRNA pro alanin u bakterie *E. coli*. Její rozpoznání a aminoacylace plně závisí na přítomnosti charakteristického páru bází G3-U70 v akceptorovém rameni tRNA. Změní-li se, tRNA ztratí schopnost interagovat s alanyl-tRNA syntetázou. Obvykle je však rozpoznání dané tRNA syntetázou závislé na více identifikačních prvcích v tRNA.

Rozpoznání jednotlivých aminokyselin syntetázami a jejich vzájemné odlišení je ještě složitější než u tRNA. Ve srovnání s tRNA jde totiž o malé molekuly, z nichž některé se od sebe často liší jen nepatrně, např. jedinou $-CH_3$, $-OH$ nebo $-CH_2-$ skupinou. Rozpoznávání jednotlivých aminokyselin syntetázami proto probíhá dvou-
stupňově a v každém stupni se rozhoduje, zda se formující se komplex mezi aminokyselinou a syntetázou zachová anebo rozpadne. Vyžaduje se energie ve formě ATP. Valyl-, fenylalanyl- a izoleucyl-tRNA syntetázy mají navíc schopnost vytvořené aminoacyl-tRNA deacylovat, pokud byly chybně acylovány příbuznými aminokyselinami, tj. threoninem, tyrozinem nebo valinem. Proces se nazývá „proof-reading“, nebo-li editace (obráz. 4).

Naše putování přípravnými fázemi a teorií translace bude v další kapitole následováno pohledy do její ribozomální fáze.