

Mehanizmi evolucije

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

Evolucija kemijskih molekula

- Evolucija kemijskih molekula rezultirala je stvaranjem života na Zemlji prije otprilike 3,8 milijarde godina. Evolucija primitivni stanica nastalih u tom procesu postupno su dovele do primitivnim oblika organizama kao što su bakterije, alge, gljivice i protozoe. Ovi organizmi, iznjedrili su razne oblike života koji postoje danas na Zemlji.

Nastanak života na Zemlji

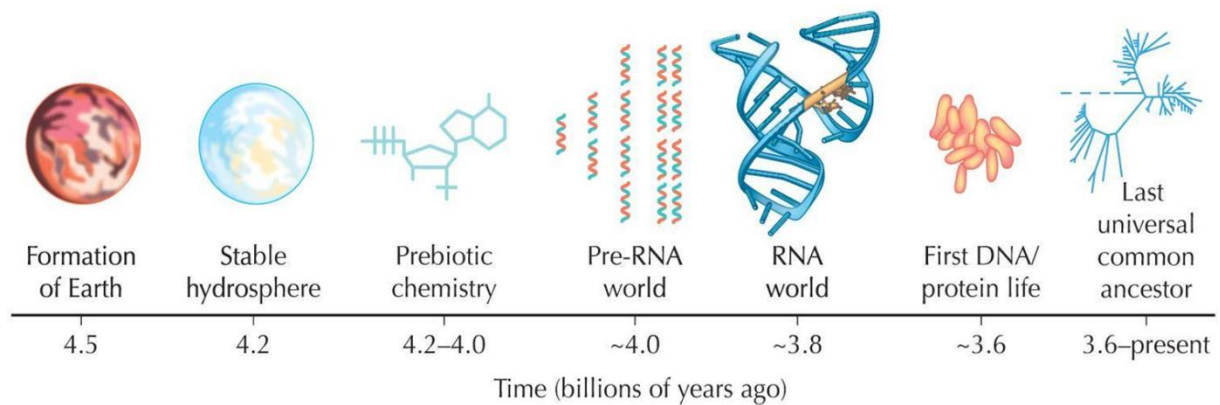


FIGURE 4.4. Steps in the origin of life.

4.4, modified from Joyce G.F., *Nature* **418**: 214–221, © 2002 Macmillan, www.nature.com

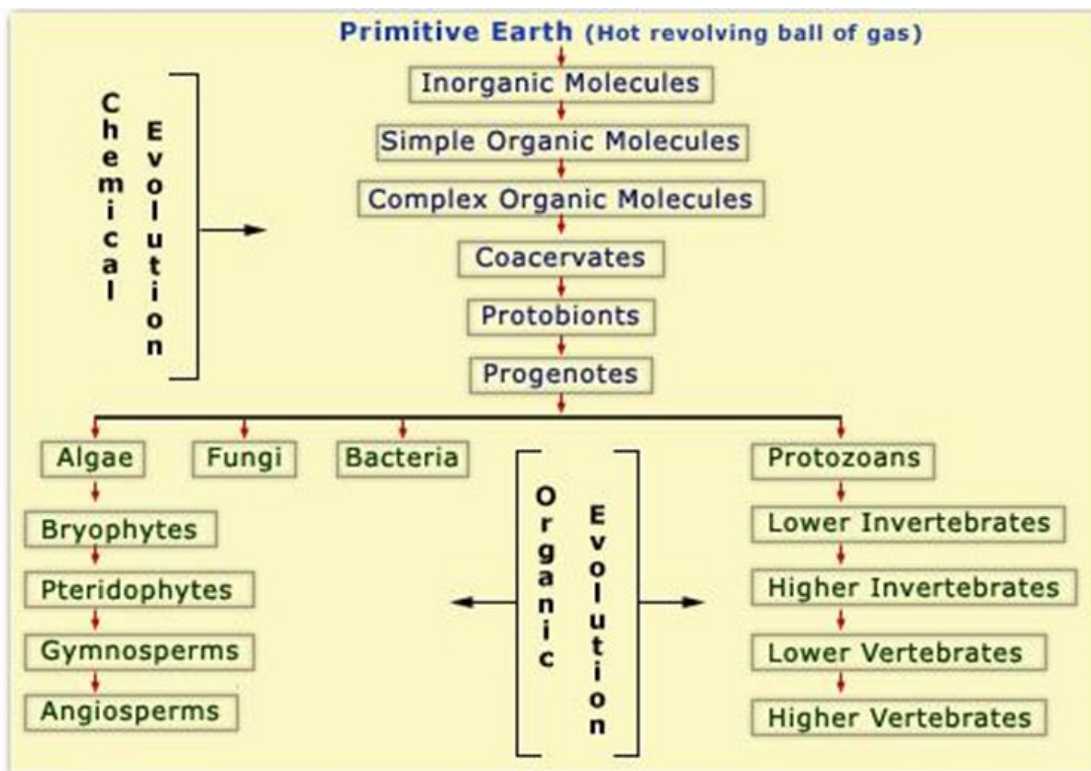
Evolution © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press

Slika 1. Nastanak života na Zemlji do danas

Evolucija organizama

- opisuje slijed događaja koji su uključeni u evoluciju neke vrste ili taksonomske skupine organizama.
- opisuje spor i postupan proces kojim živi organizmi prolaze kroz promjene od najjednostavnijih jednostaničnih oblika života do najsloženijih višestaničnih oblika koji se mogu vidjeti i danas.

Evolucija kemijskih molekula i evolucija organizama



Slika 2. Shematski prikaz evolucije kemijskih molekula i evolucije organizama

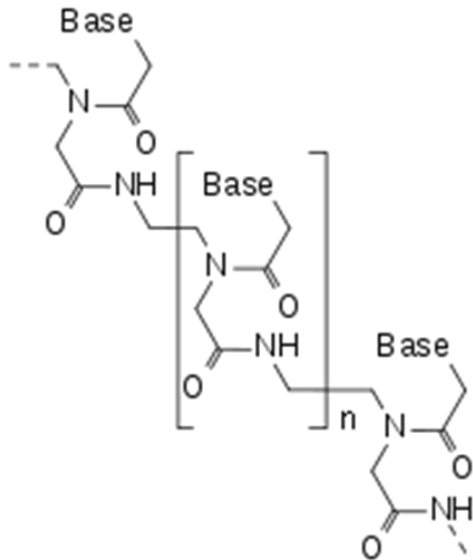
Prve genetske molekule života na Zemlji

Moguće su prve okosnica za peptidne nukleinske kiseline koje su mogle biti prve genetske molekule života na Zemlji;

Peptidne nukleinske kiseline (PNA) su umjetno sintetizirani polimeri slične molekulama RNA ili DNA (1991, Science 254).

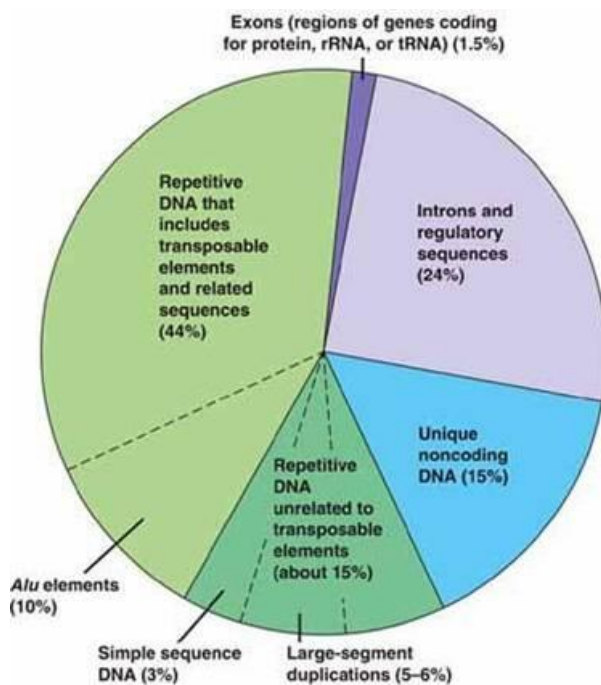
Naziv je pogrešan jer PNA nije kiselina.

ne zna je li se dogodila molekula PNA, međutim molekula N-(2-aminoetil)-glicin (AEG), koja je okosnica PNA, utvrđeno je kao produkt rasta cijanobakterija (PLoS ONE 7: E49043, 2012).



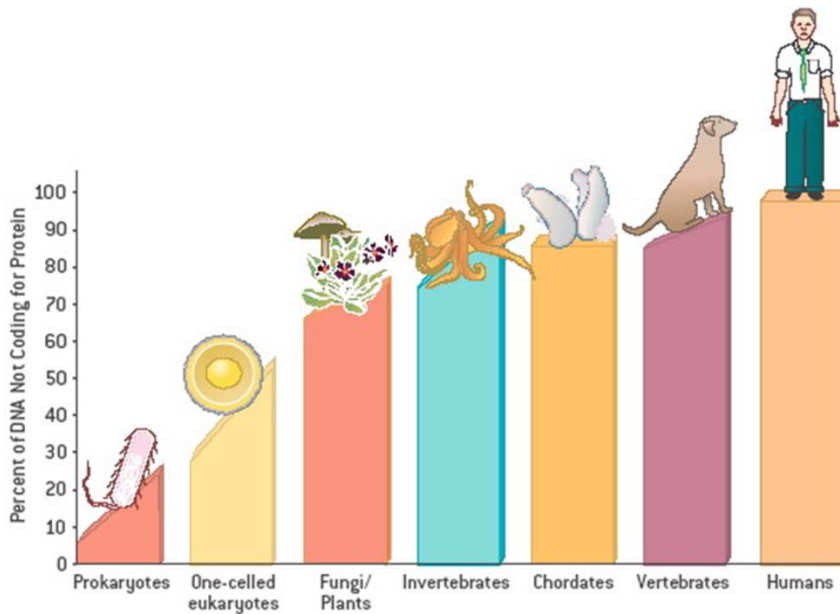
Slika 3. Prikaz peptidne nukleinske kiseline (PNA), umjetno sintetizirani polimeri slične molekulama RNA ili DNA (1991, Science 254).

Udio humane kodirajuće i nekodirajuće DNA



Slika 4. Udio humane kodirajuće i nekodirajuće molekule DNA

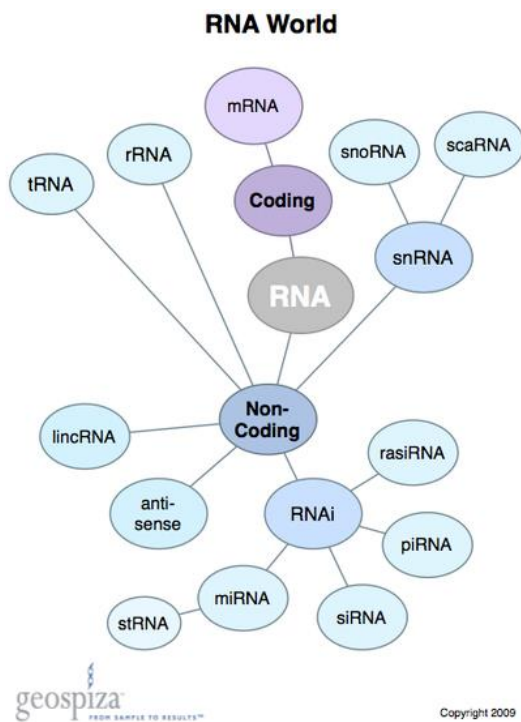
Udio nekodirajuće DNA u prokariotima i eukariotima



NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

Slika 5. Udio nekodirajuće DNA u prokariotima i eukariotima

Svijet molekula RNA

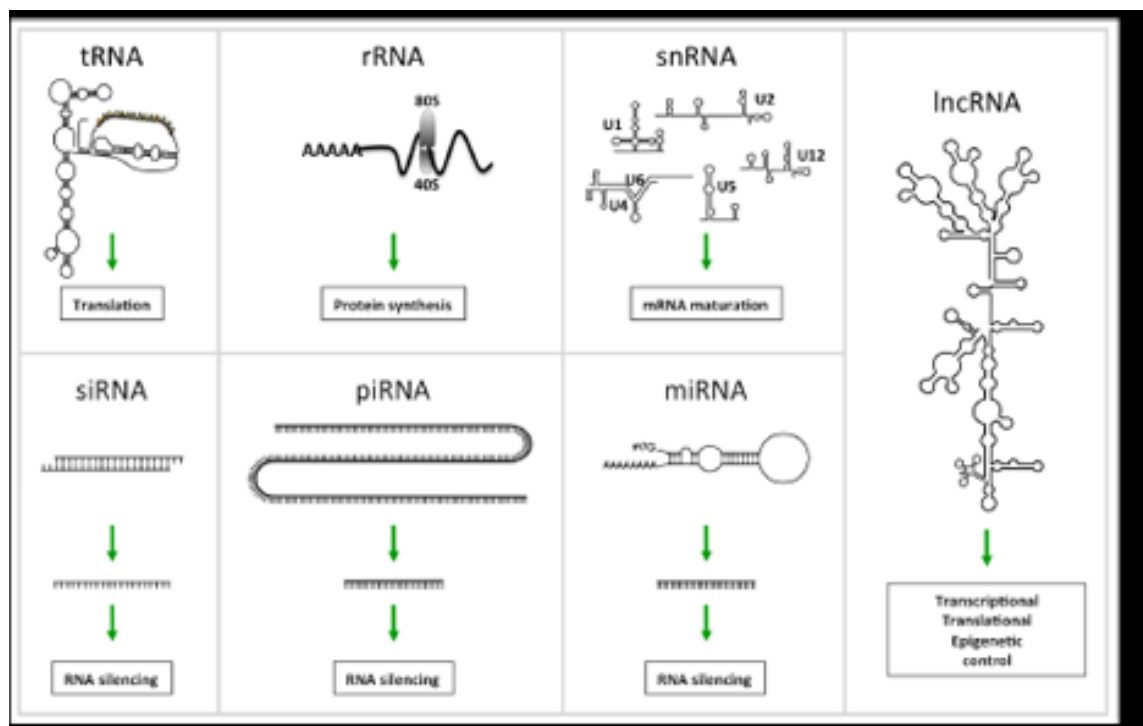


Slika 6. Shematski prikaz kodirajuće i nekodirajućih molekula RNA

Nekodirajuće RNA (ncRNA)

- Funkcionalne molekule RNA koje se ne prevode u proteine.
- Sinonimi: non-protein-coding RNA (npcRNA), non-messenger RNA (nmRNA) i functional RNA (fRNA).

Uloga nekodirajućih RNA

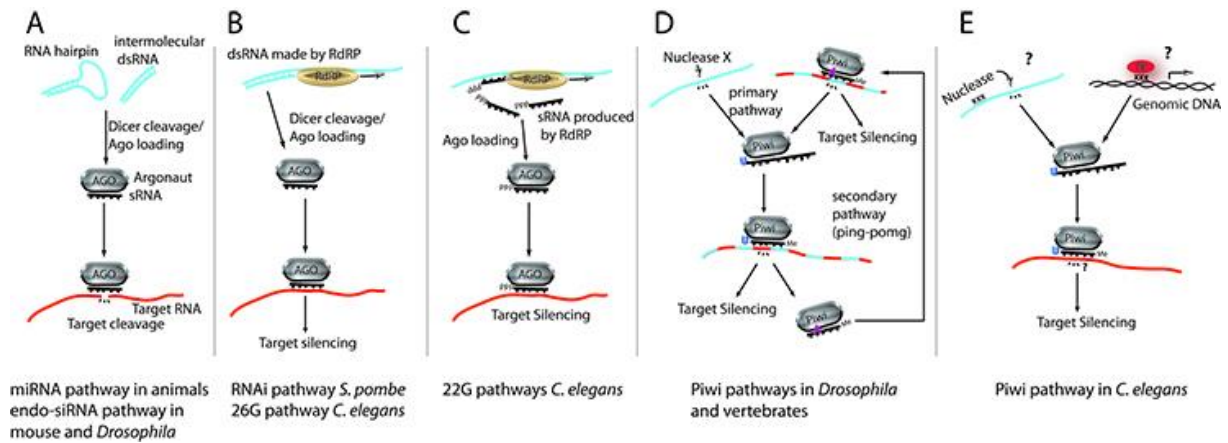


Slika 7. Shematski prikaz nekodirajućih RNA

Nekodirajuće RNA (ncRNA)

- Vrlo raznolike: tRNA i rRNA, te snRNA (mala nukleolarna RNA provodi kemijske modifikacije drugih RNA, uglavnom rRNA, tRNA i malih nuklearnih RNA), snRNA (uvijek povezana sa specifičnim proteinima u malim nuklearnim ribonukloproteinima, sazrijevanje pre-mRNA, u spajsosomu), mikroRNA (djeluje na transkripcijsku i post-transkripcijsku regulaciju ekspresije gena), siRNA (najznačajnija u interferenciji RNA), exRNA (izvanstanična RNA u tjelesnim tekućinama kao što su venska krv, slina, majčino mlijeko, urin i dr., zadužene za međustaničnu komunikaciju i staničnu regulaciju), piRNA (Piwi interakcija RNA, oblik RNA-proteinski kompleksa u interakciji je Piwi proteinom, nađen u Drosophila, povezani s stišavanjem epigenetskih i post-transkripcijski gena retrotranspozona i drugih genetskih elementa spolnih stanica) i dr.

Djelovanje nekodirajućih RNA



Slika 8. shematski prikaz djelovanje nekodirajućih molekula RNA

siRNA

- Molekule koje specifično utišavaju ekspresiju gena su snažno istraživačko oruđe, a siRNA (eng. “small interfering”) molekule su jedne od najnovijih sredstava koji „utišavaju gen” u specifičnoj sekvenciji (eng. “sequence-specific gene-silencing agents”);
- Danas kada su genomi mnogih modelnih organizama sekvencionirani, pristupi koji uključuju nukleinske kiseline koje djeluju na ekspresiju gena u specifičnoj sekvenciji koriste se za istraživanje funkcije gena i kao potencijalni terapeutici.

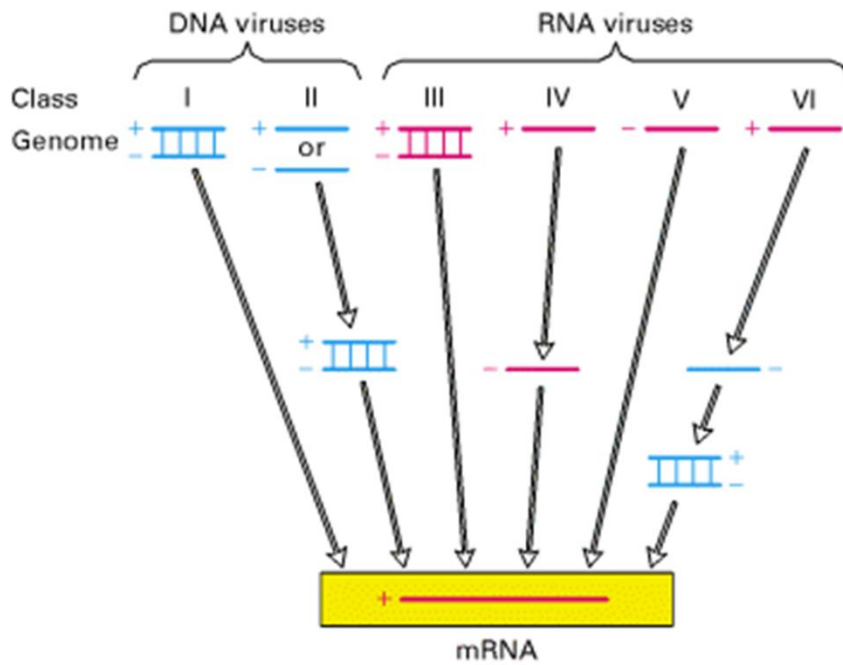
Klasifikacija animalnih virusa

na bazi sastava genoma i nastanka mRNA.

DNA – plava boja;

RNA – crvena boja.

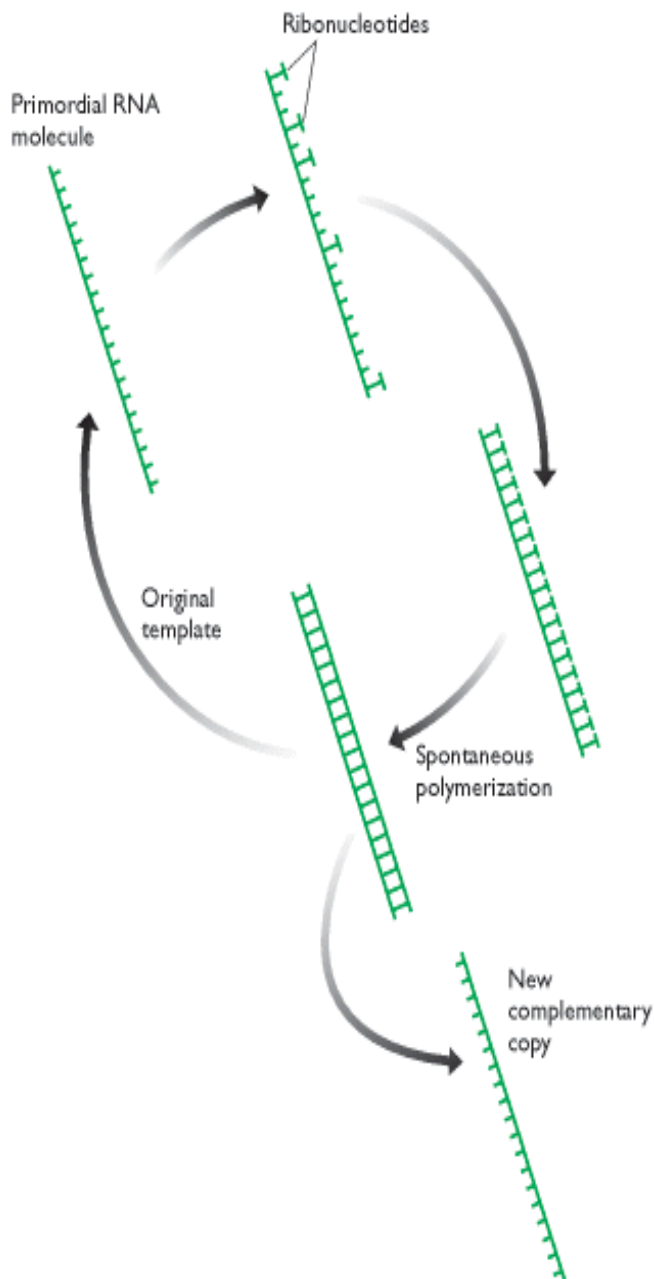
VI – retrovirusi.



Slika 9. Shematshi prikaz klasifikacije animalnih virusa obzirom na nasljedni materijal

Stvaranje prvih molekula RNA

- Spontanom polimerizacijom ribonukleotida nastala je prva molekula RNA koja se nadalje spontano replicirala.
- Taj proces je bio uz mnoge pogreške pa su nastajale mnoge različite molekule RNA.



Slika 10. Shematski prikaz spontanog nastanka različitih oblika molekula RNA

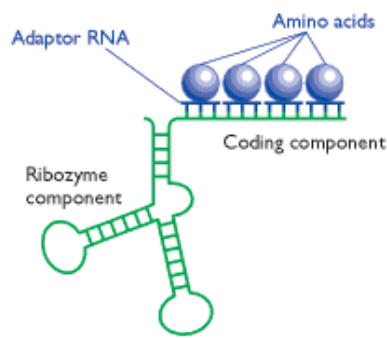
Dvije mogućnosti evolucije prvih kodirajućih molekula RNA

Ribozim dvostruka funkcija: katalitička i kodirajuća.

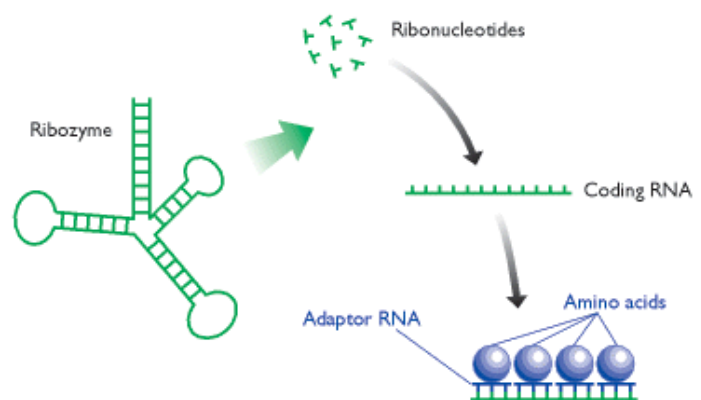
Ribozim (enzim) može sintetizirati kodirajuću molekulu.

U oba slučaja aminokiseline su povezane s kodirajućim molekulama posredstvom adaptor molekulom RNA, koje su preteče današnjih tRNA.

(A) A ribozyme that is also a coding molecule



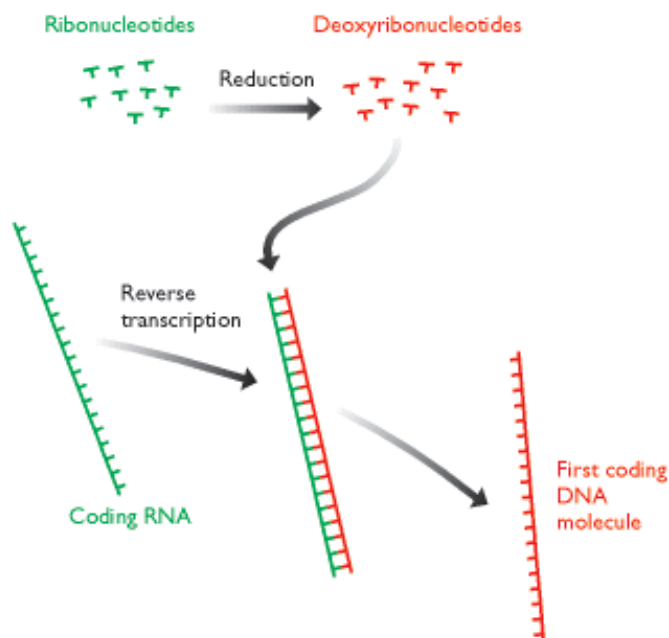
(B) A ribozyme that synthesizes coding molecules



Slika 11. Shematski prikaz djelovanja različitih molekula RNA

Nastajanje prvih molekula DNA

Prepisivanje kodirajuće molekule RNA u preteču prvog lanca molekule DNA



Slika 12. Shematski prikaz nastanka preteče prvog lanca molekule DNA

PORIJEKLO VIRUSA I NJIHOVA ULOGA U EVOLUCIJI PRIJENOSA GENETSKO MATERIJALA

Virusi: "stari igrači u evoluciji života"

- RNA virusi
- Retrovirusi ostatak RNA/DNA tranzicije (influenza, HIV..) ostatak RNA svijeta

- Transformacije staničnog organizma u virusni bile su mnogo lakše u svijetu RNA stanica (jednostavnije)
- I i II RNA virusi prisutni u bakterija (nepoznati u Archea)
- Homologija unutar virusa koji napadaju bakterije i eukariote (RNA zavisna RNA polimeraza)
- Prisutni u vrijeme LUCA ili čak prije njega
- Razlike u DNA replikacijskim enzimima (T4, Archaea, eukarioti...)

Porijeklo virusa

- Virusi su pobjegli genetički materijal, razvili su se iz “pravog” organizma
- **3 HIPOTEZE O PORIJEKLU VIRUSA**

1. Hipoteza: Prvo virus

2. Hipoteza bijega

3. Hipoteza redukcije

1. Hipoteza: Prvo virus

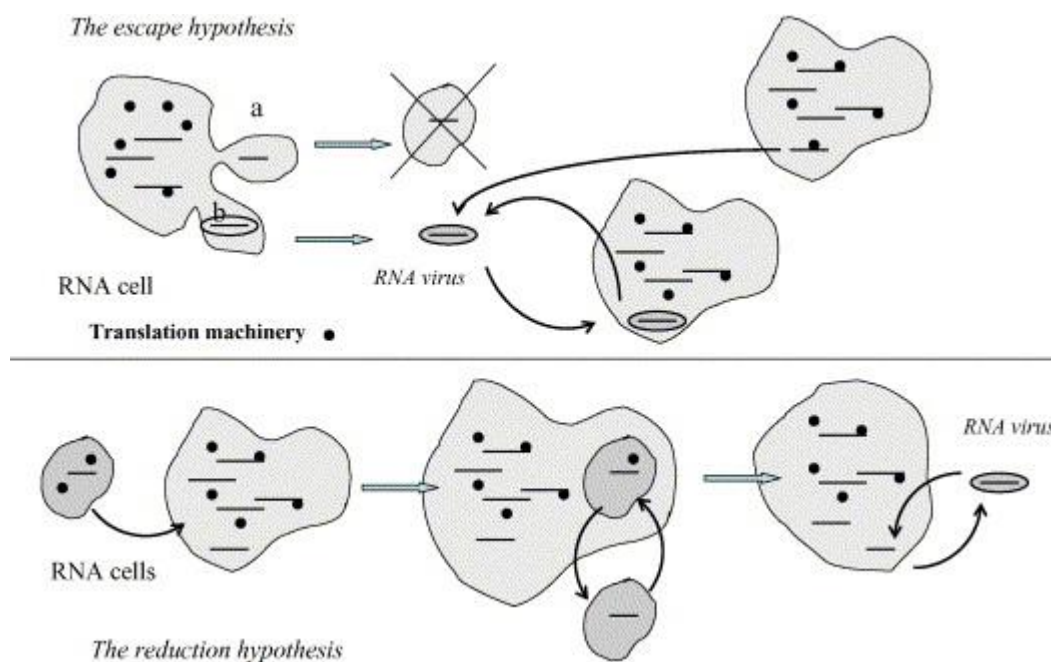
- Virusi su se razvili iz “primitivne juhe”
- RNA svijet zajednica slobodnih molekula
- LUCA nije stanični subjekt
- Stanične membrane nastale nakon razdvajanja Archaea i bakterija
- Ali...
- LUCA bez membrane, a prisutni homologni proteini unutar svih triju domena
- Moderni virusi sadrže proteine i trebaju stanični okoliš za razmnožavanje

2. Hipoteza bijega

- virusi se razvili iz fragmenata genoma koji su pobjegli iz stanica koje su postojale prije LUCA.
- Fragment je mogao postati autonoman u staroj RNA stanici, s obzirom na to da su različiti molekularni mehanizmi koji su djelovali u proto-stanicama su bili puno jednostavniji i manje integrativni od onih koji su danas prisutni u DNA stanicama.

3. Hipoteza redukcije

- Transformacije staničnog organizma u virusni moguć u svijetu RNA stanica (jednostavnije od današnjih s DNA),
- RNA stanica, koja živi kao parazitski endosimbiont u drugoj RNA stanici, mogla je izgubiti svoju mašineriju za sintezu proteina i proizvodnju energije, koristeći kao zamjenu onu od domaćina;
- Viralna kapsida mogla je poteći od ovojnice RNA stanica građene od istih proteina, nalik S-layer-u današnjih prokariota.



Slika 13. Shematski prikaz 2 hipoteze o nastanku virusa

Dvije alternativne hipoteze o porijeklu virusa u drugoj dobi RNA svijeta (nakon izuma sinteze proteina), crni krugovi odgovaraju translacijskoj mašineriji (npr. dalekom pretku ribosoma), a crna linija linearnoj kromosomskoj RNA. Gornja slika predstavlja hipotezu bijega: nejednaka podjela stanice proizvodi ministanice s jednim kromosom (a ili b), ali ne i prijevodnim aparatom (ribosomom). Kromosom a) će biti eliminiran, ali kromosom b) će opstati, jer je povezan s proteinima koji čine kapsidu koja omogućava prijenos svojih RNA u novu stanicu, ona postaje virusom. Donja slika predstavlja hipotezu redukcije: male RNA stanice udružuju se u veliku koja postaje endosimbiont velike RNA stanice. Takve stanice zatim gube svoj prijevodni aparat, ali i dalje se mogu samostalno replicirati i postaju zarazne (slično nekim patogenim bakterijama u eukariotskim stanicama).

Porijeklo DNA virusa

- Samostalno
- Iz RNA virusa:

na strukturnom i mehanističkom nivou između virusne RNA replikacije/transkripcije, reverzne transkripcije i nekih DNA polimeraza ili između virusnih RNA i DNA helikaza-homologije između RNA i DNA virusa,

Porijeklo DNA virusa iz RNA virusa

- postojanjem oblika kao što su retrovirusi (s RNA genom i RNA-DNA-RNA ciklusom) i hepadnavirusi (s DNA genomom i ciklusom DNA-RNA-DNA).
- Uočena evolucijska povezanost retrovirusa i hepadnavirusa, što snažno podupire ideju da se prijelaz iz RNA u DNA dogodio u virusnom svijetu.

Hepadnavirusi genom

Obitelj virusa koji mogu izazvati infekciju jetre sisavaca (*Hepatitis B virus*)

DNA genomom i prisutan ciklus DNA-RNA-DNA

Genom:

- sastoji od dva neujednačena lanca DNA,
- djelomično je dupla zavojnica i djelomično cirkularni jednostruki lanac DNA
- Jedan lanac DNA je antisens, drugi, kraći, je sens.

Replikacija hepadnavirusa

- Replikacija prvo mRNA te pomoću reverzne transkriptaze, koja se kovalentno vezuje na početnicu dužine 3-4 nukleotida), nastaje cDNA (J. Virology, 2004,78, 6252–6262) .
- Većina hepadnavirusa se replicira jedino u specifičnom domaćinu otežava istraživanja.

Porijeklo DNA virusa iz RNA virusa

- Tranzicija biosinteze nukleinskih kiselina je vjerojatna jer specifičnost RNA/DNA polimeraze nije velika,

- RNA-ovisna RNA polimeraza iz Brome mozaičnog virusa (biljni v.) može koristiti kao kalup lanac RNA, DNA, pa čak i RNA/DNA hibrid. RNA virusi mogli su koristiti svoje stanične enzime kako bi transformirali svoj RNA genom u DNA genom.
- RNA virusi (enzimi) → DNA virusi → **DNA je virusni izum ?**

DNA virusi nastali redukcijom od pradavnih DNA stanica

- potaknuta otkrićem mimivirusa, divovskog virusa koji napada *Entamoebae*.
- genoma ovog virusa iznosi 1.2 Mb i tri je puta veća od genoma najmanje bakterijske stanice, a četiri ili pet puta veća od minimalnog bakterijskog genoma predviđenog za funkcionalnu stanicu.
- intermedijer između pravih stanica i virusa (nedostaje im samo ribosomalni protein).
- geni mimivirusa "posuđeni" iz drugih virusa i/ili iz drevnih predaka DNA ili RNA stanica.

Acanthamoeba polyphaga mimivirus domaćin ameba *Acanthamoeba polyphaga*

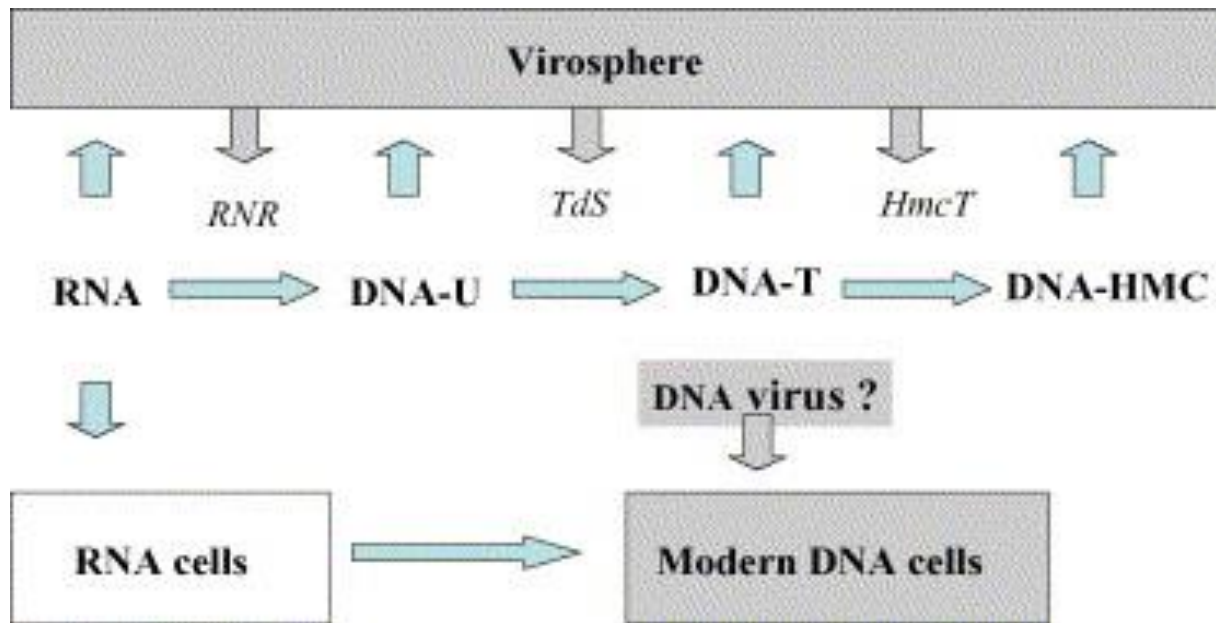
Genom mimivirus je linearan, dvolančane molekule DNA duljine od 1 181.404 parova baza;

Otpribliže 90% genoma je kodirajuće podeučje dok je 10% "junk DNA".

Virusi i porijeklo DNA

- DNA molekula je stabilnija, zahvaljujući tome što nema reaktivni kisik na položaju 2' riboze,
- modifikacija u genetičkom zapisu koja je proizvedena deaminacijom citozina u uracil (česta spontana kemijska reakcija) može se prepoznati i popraviti u DNA, ali ne i u RNA.
- zamjena RNA u DNA po prvi put dogodila u virusu, modifikacija svojih RNA genoma u DNA genom mogla je trenutno proizvesti veliku prednost i dobitak za sam virus,
- virusi mogu zaštititi svoj genom (metilacijom, hidrosimetilacijom ili čak složenijim kemijskim modifikacijama) pa ga nukleaze domaćina kojeg napadnu ne mogu razgraditi, a i kako bi mogao biti što sličniji humanoj DNA.
- pojava ribonukleotid reduktazne aktivnosti u virusa koja je mogla modificirati RNA genom u DNA genom koji sadrži još uvijek uracil, dakle nastala bi U-DNA.
- međukorak u RNA-DNA tranziciji je završen sintezom dTMP iz dUMP modernih stanica (neki bakteriofagi koji i dan danas imaju U-DNA genom),
- Drugi korak mogao je biti nastanak timidilat sintezne aktivnosti u nekih U-DNA i DNA koja sadrži timin (T-DNA).

Virusi i porijeklo DNA



Slika 14. shematski prikaz teorije nastanka DNA. RNR = ribonucleotide-reductase; TdS = thymidylate-synthase, HmcT = hydroxymethylcytosine-transferase, prilagđeno prema P. Forterre (2006) Virus Research 117, 5-16.

DNA je virusnog porijekla

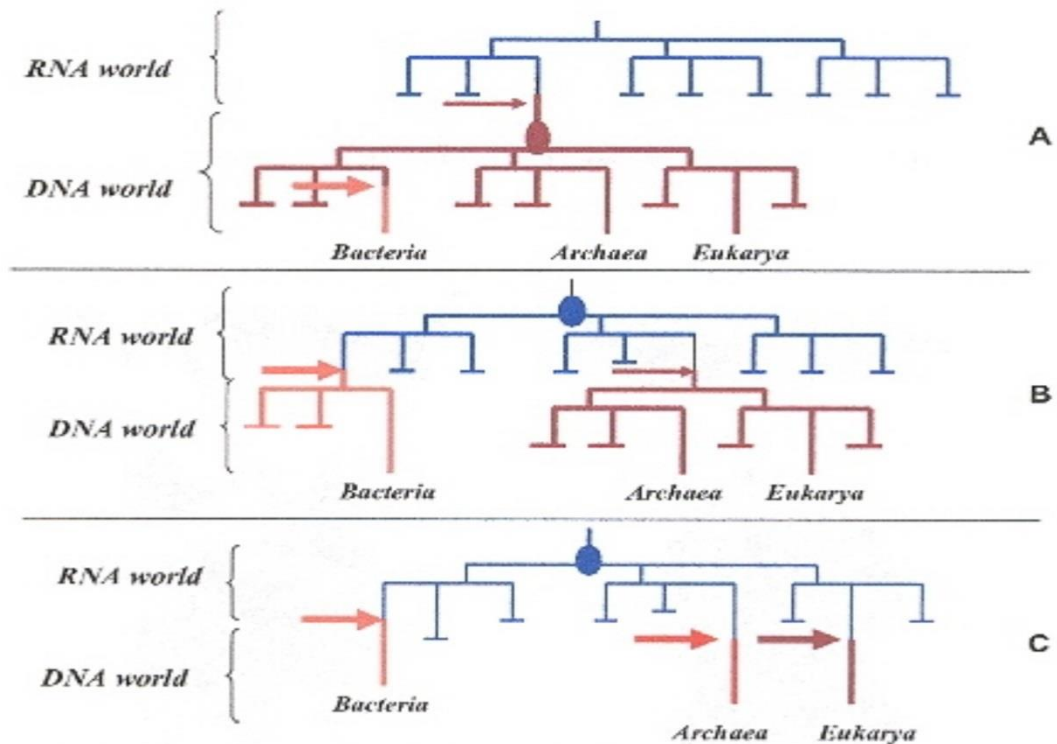
- DNA replikacijski mehanizam: jednolančani RNA virus s dvolančanim RNA replikacijskim intermedijerom postao jednolančani DNA virus koji je replicirao svoj genom putem DNA/RNA intermedijera. U ovoj fazi je jedan enzim mogao transkribirati DNA u RNA i retro-transkribirati RNA u DNA.
- prisutnost primaze koja započinje replikaciju na drugom lancu → RNA, koji bi tako postao kasneći lanac (*eng.* lagging strand). Na kraju ovog evolucijskog procesa bila je moguća brza replikacija vrlo dugačkog genoma s istovremenim izvođenjem replikacije kasnećeg i vodećeg lanca u replikacijskoj viljušci, kao što se to odvija u svim modernim stanicama i u mnogim DNA virusima.

VIRUSI I PORIJEKLO TRIJU DOMENA

dva seta ne homolognih DNA replikacijskih proteina: onih u *Bacteria* i drugih u *Archaea* i *Eukarya*.

potrebno uzeti u obzir i zamisliti najmanje dva neovisna prijenosa (slika A i B).

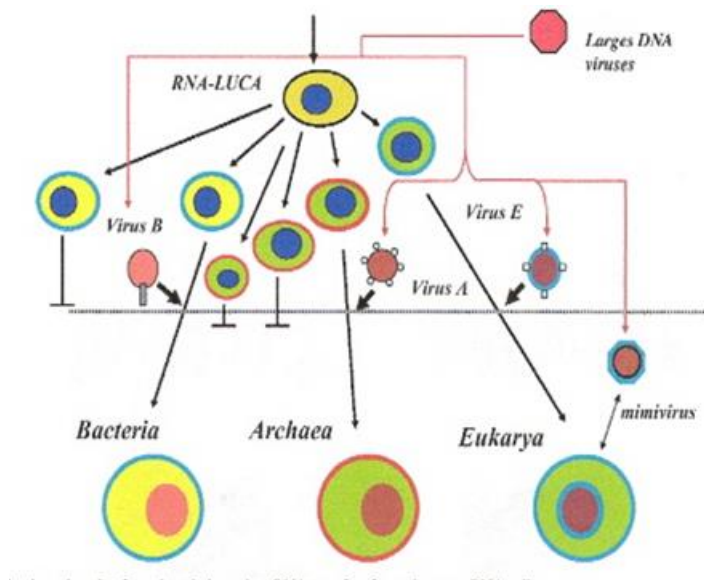
- predložio da je moguće da su se dogodila tri takva nezavisna prijenosa DNA iz virusa u RNA stanice, što je zatim dovelo do formiranja triju domena; *Archaea*, *Bacteria* i *Eukarya* (slika C) - **>Hipoteza tri virusa - tri domene**



Slika 15. Shematski prikaz nekoliko modela za mogući prijenos DNA iz virusa u stanice. (A) Jedan prijenos prije LUCA nakon kojega slijedi razvoj jednog drugog DNA replikacijskog mehanizma u bakterijskog grani. U takvom scenariju LUCA ima DNA genom, (B) dva neovisna prijenosa nakon LUCA s RNA genomom, (C) tri nezavisna prijenosa nakon LUCA koja vode do formiranja triju staničnih domena (razlike između *Archaea* i *Eukarya* u DNA replikacijskom mehanizmu prikazane su različitim bojama).

Hipoteza tri virusa za tri domene

- Tri DNA virusa, koji su postojali na samome početku razvoja svih ostalih “modernih” stanica, dijelili su mali set homologne DNA koja je kodirala informaciju za homologne proteine prisutne u sve tri domenama života.
- hipoteza tri virusa-tri domene može isto tako objasniti zašto članovi različitih domena mogu biti inficirani specifičnim grupama virusa.
- Da je predak svih prisutnih virusa bio prisutan još za vrijeme LUCA, član neke viralne porodice morao bi moći zaraziti stanice svih triju staničnih domena.
- nakon početne diversifikacije i razdvajanja viralnih predaka zajedno s razdvajanjem RNA staničnih predaka, samo oni virusi koji su bili u mogućnosti inficirati RNA stanicu u ishodu svake domene te su mogli preživjeti masivu eliminaciju RNA stanica (i RNA/DNA virusi) koja se dogodila nakon pojave triju predaka DNA stanica.
- To bi moglo selekcionirati iz svake domene subpopulaciju različitih viralnih porodica koje su pre-adaptirane na to da mogu inficirati samo novo nastale DNA stanice.



Slika 16. Shematski prikaz nastanka tri domene iz virusa

Virusi i porijeklo eukariotske jezgre

- 1. hipoteza: endosimbioza Archaea i Bakterije

→ U eukariotima specifični proteini koji nemaju svoje homologe niti u *Arhaeae* niti u Bakterija, spliceosomi, modifikacija mRNA kapa, jezgrine pore - "Nije moguće zamisliti nastanak jezgre ovojnice bez toga da su prethodno postojale jezgrine pore."

- 2001. HIPOTEZA VIRUSNE EUKARIOGENEZE

HIPOTEZA VIRUSNE EUKARIOGENEZE

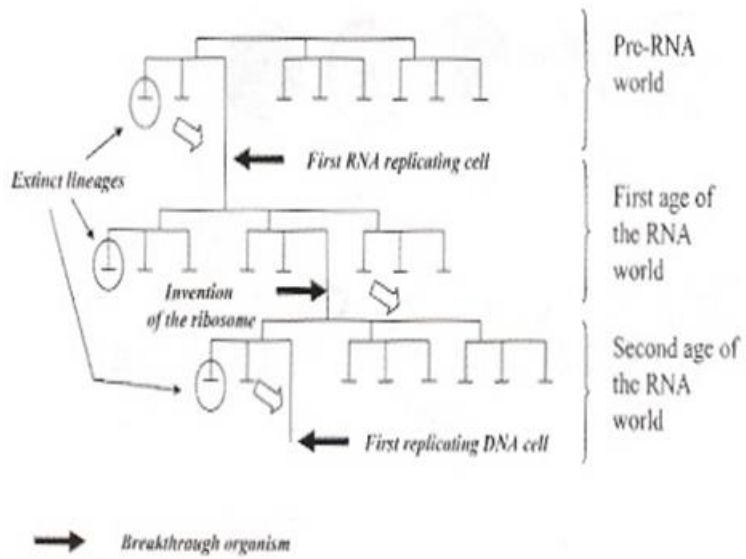
2001. godine dva su autora nezavisno predložila potpuno novu hipotezu koja bi objasnila porijeklo jezgre. To je bila HIPOTEZA VIRUSNE EUKARIOGENEZE, tj. hipoteza nastanka jezgre od virusa. Oni su predložili kako je moguće da se jezgra razvila iz virusa čiji je genom bila velika dvolančana DNA. Moguće je da je takav virus inficirao organizam sličan prokariotskom. Ovaj mehanizam ima veliku prednost jer može objasniti problem jezgrinih pora budući da su virusi razvili veliki broj kompleksnih molekularnih alata kako bi translocirali RNA ili DNA kroz razne tipove membrana, uključujući stanične membrane.

- hipoteza nastanka jezgre od virusa.
- jezgra razvila iz virusa čiji je genom bila velika dvolančana DNA.
- inficirao organizam sličan prokariotskom
- može objasniti problem jezgrinih pora budući da su virusi razvili veliki broj kompleksnih molekularnih alata kako bi translocirali RNA ili DNA kroz razne tipove membrana, uključujući

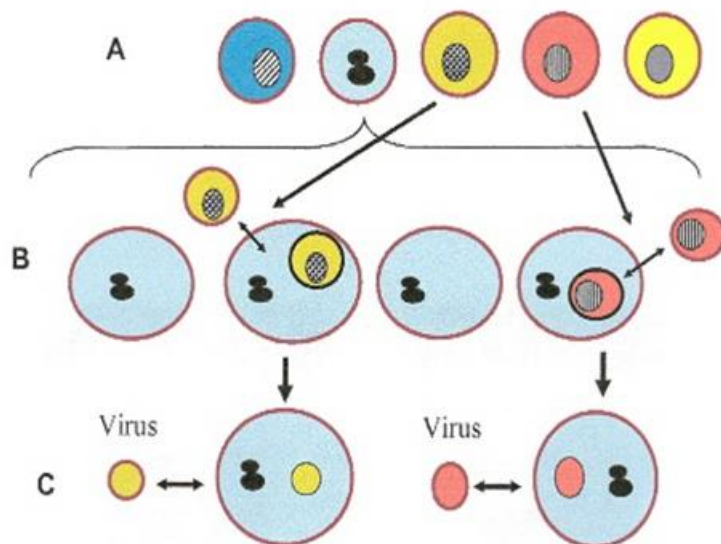
stanične membrane i nastanak jezgrinih pora i membranskih vezikula endoplazmatskog retikuluma.

Uloga virusa u evoluciji mitohondrija i kloroplasta

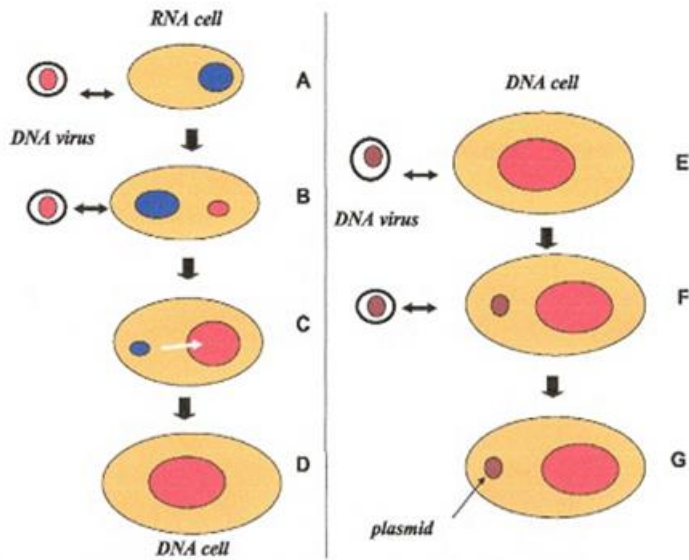
- mitohondriji potekli iz slobodno-živeće α proteobakterije
- problem; RNA i DNA polimeraza i DNA helikaza homologne onima za koje kodira bakteriofag T3/T7 (provirus u genomu nekoliko proteobakterija)
- α proteobakterija sadržavala je provirus (u srodstvu s T3/T7) te je došlo do zamjene gena
- RNAP prisutna i u kloroplastima
- Filogenetičke analize su nedavno otkrile da su RNA polimeraza, DNA helikaza i DNA polimeraza, koje su uključene u DNA replikaciju, isto tako specifično povezane s istom grupom virusa (u srodstvu s T3/T7).
- homolozi ova tri proteina kodirani od strane nekih kriptičnih provirusa (tihi, bez izraženog fenotipa) u genomu nekoliko proteobakterija.
- upućuje da je možda alfa-proteobakterija sadržavala kriptični provirus koji je bio u srodstvu s T3/T7 i da su RNA polimeraza, DNA helikaza i DNA polimeraza, za koje je kodirao ovaj provirus, zamijenile originalnu DNA transkripciju i replikaciju proteina koji su bili prisutni u pretku alfa-proteobakterije tijekom transformacije u mitohondrij.
- predak bakterijskog tipa RNA polimeraze (cijanobakterijskog porijekla) i T3/T7-sličnog tipa RNA polimeraze koriste se u transkripciji genoma unutar kloroplasta.
- Enzim sličan virusnom u kloroplastu potječe iz duplikacije gena koji kodira mitohondrijska RNA polimeraza.
- Biljke dakle sadrže dvije RNA polimeraze koje slične onima iz virusa u mitohondriju i u kloroplastu .
- veliki selekcijski pritisak koji je potaknuo na zamjenu staničnih enzima s onima od virusa u mitohondrijima i kloroplastima.
- U oba organela takva zamjena povezana je i s mnogim modifikacijama i promjenama u mehanizmu replikacije DNA i kromosomalne strukture.
- virusi mogu biti izvor novih staničnih proteina koji nose informaciju za DNA i kao takvi mogli su igrati ključnu ulogu u oblikovanju staničnog genoma.



Slika 17. Shematski prikaz nastanka svijeta s molekulom RNA

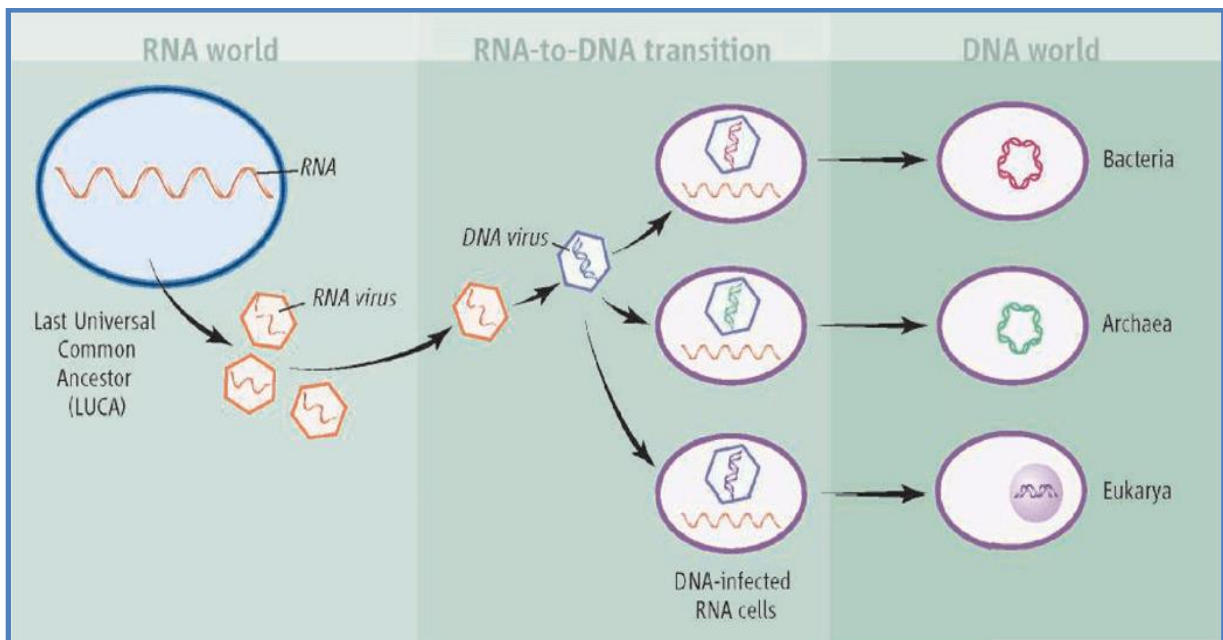


Slika 18. shematski prikaz nastanka različitih RNA virusa



Slika 19. Schematyczny obraz powstania komórek z RNA i DNA

Od RNA do DNA świata



Slika 20. Schematyczny obraz powstania świata z molekułami DNA, dostosowane do C. Zimmera (2006) Science 312, 870 - 872

Ulożenie wirusa w ewolucji komórek

- Wirusy odegrały ważną rolę w ewolucji komórek.
- Wirusy mogą być źródłem nowych genów i odegrać kluczową rolę w kształtowaniu komórkowego genomu.

- Ukoliko su virusi nastali vrlo rano u Zemljinoj prošlosti to omogućuje bolje razumijevanje njihove raznolikosti, te objašnjava zašto većina viralnih genoma nema staničnih homologa.
- Ukoliko se ovakve hipoteze pokažu točnima, to znači da će istraživanje virusne raznolikosti biti jedan od najvećih izazova biologije u 21. stoljeću (P. Forterre, 2006, *Virus Res.* 117).
- Važan prirodni način prijenosa gena između različitih vrsta, čime se potiče evolucija i povećava genetička raznolikost.
- Virusi čine najveću akumulaciju neistražene genetske raznolikosti na Zemlji (Suttle CA. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews. Microbiology.* 2007;5,10:801–12).

Korijen stabla života uronjen u "virusni ocean"

Dugo vremena virusi nisu bili uključeni u univerzalno stablo života budući da nemaju ribosomalnu RNA.

- ukoliko se viruse vrati natrag u stablo života te ako se sam korijen stabla uroni u virusni ocean (slika), mogu se postaviti nove, vrlo raznolike hipoteze koje bi mogle biti u mogućnosti riješiti probleme pronađene u dešifriranju veza između triju domena života i povijesti DNA.



Slika 21. shematski prikaz stabla života uronjenog u ocean virusa.

Ideja da su virusi potekli još od prije nastanka LUCA isto tako se predlaže da su moderni virusi naslijedili molekularni mehanizam od starih RNA i DNA stanica koje su nestale u modernim DNA stanicama. Jasan primjer tome bio bi mehanizam započinjanja DNA replikacije. To bi moglo objasniti zašto je molekularna biologija viralnog svijeta za transkripciju i replikaciju mnogo različitija od one prisutne u staničnom svijetu. Mnogi nepoznati molekularni mehanizmi i njihovi proteini još se moraju otkriti u virosferi. Ukoliko su ovakve hipoteze i razmišljanja u skoroj budućnosti pokažu ispravnima, to znači da će istraživanje virusne raznolikosti biti jedna od najvećih izazova biologije u 21 stoljeću!