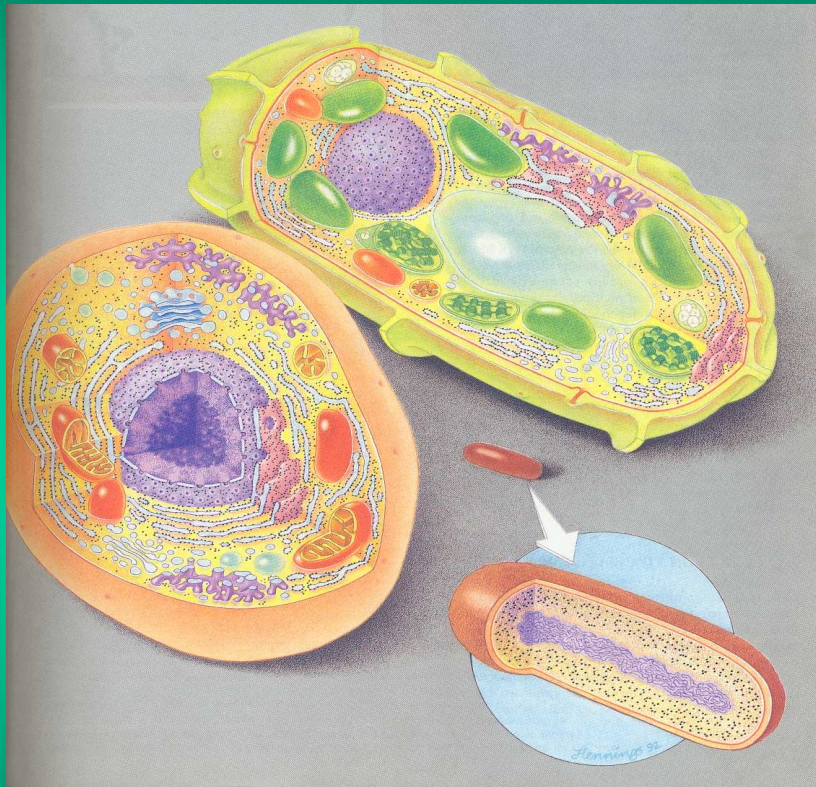


Molekulárna evolúcia

GÉNY AKO HISTORICKÉ DOKUMENTY

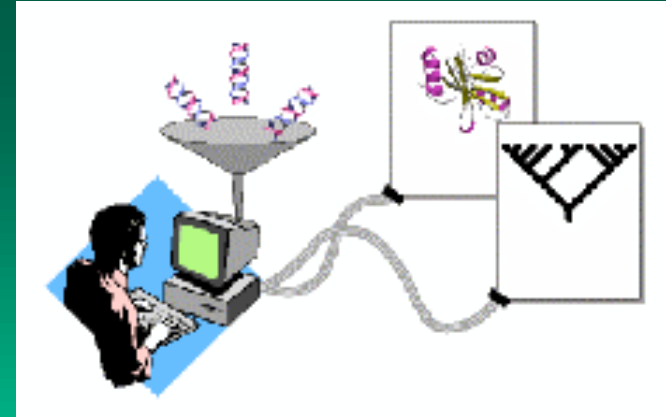


Prof. RNDr. Juraj Krajčovič, CSc.

Ústav bunkovej biológie, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave

Mimoriadne pozoruhodné na súčasných objavoch v molekulárnej biológii je i to, že poukazujú na bohatstvo informácií o evolúcii organizmov, ktoré je ukryté v bunke, konkrétne v nej uloženej genetickej informácii (DNA)

Gény (resp. ich produkty – RNA a bielkoviny) ako historické dokumenty – živé kroniky, ktoré dokumentujú evolúciu ich nositeľov

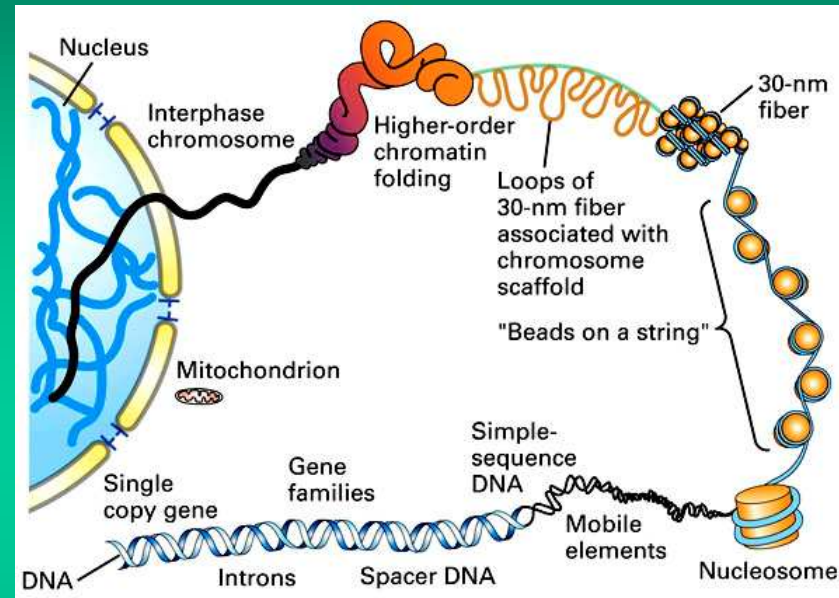
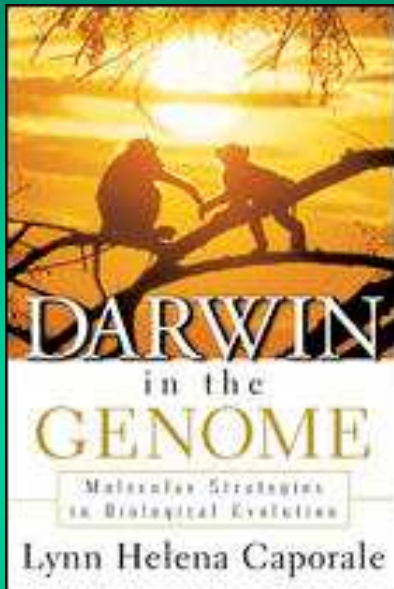


PATTERNS IN EVOLUTION
The New Molecular View

Roger Lewin



Molekulárna biológia priniesla úplne nové metódy, ktorými je možné študovať **evolučné vzťahy medzi organizmami**. Sformovala sa nová biologická disciplína – **molekulárna evolúcia**.



Organizmy, o ktorých na základe **podobnosti v anatomických, či fyziologických znakoch** predpokladáme, že sú **blízko príbuzné**, majú **vyššie percento homológie v sekvencii génov (proteínov)**, v porovnaní s menej príbuznými druhmi.

Ak sa sekvencie nukleotidov v porovnávaných génoch (resp. AK v proteínoch) z dvoch organizmoch líšia len minimálne, znamená to, že príslušnú sekvenciu zdedili po nedávnom **spoločnom predkovi**.

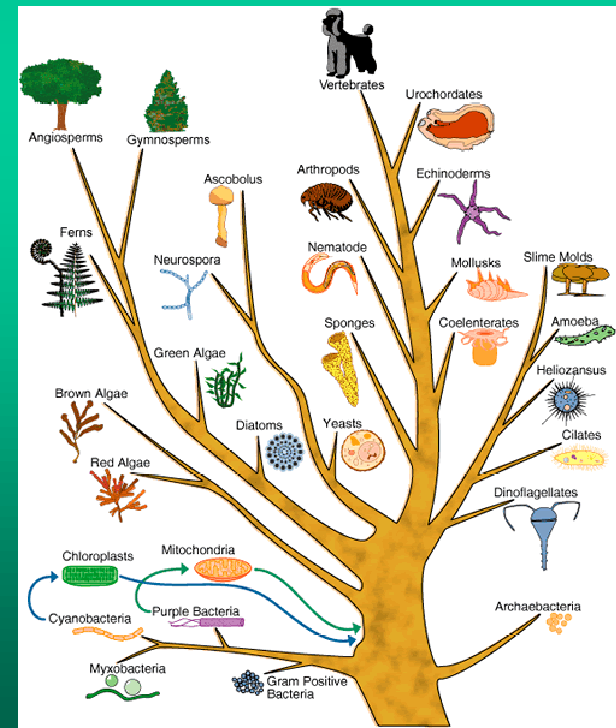
Živé kroniky

Pri rekonštrukcii procesu evolúcie nie sme teda odkázaní len na paleontologické nálezy.

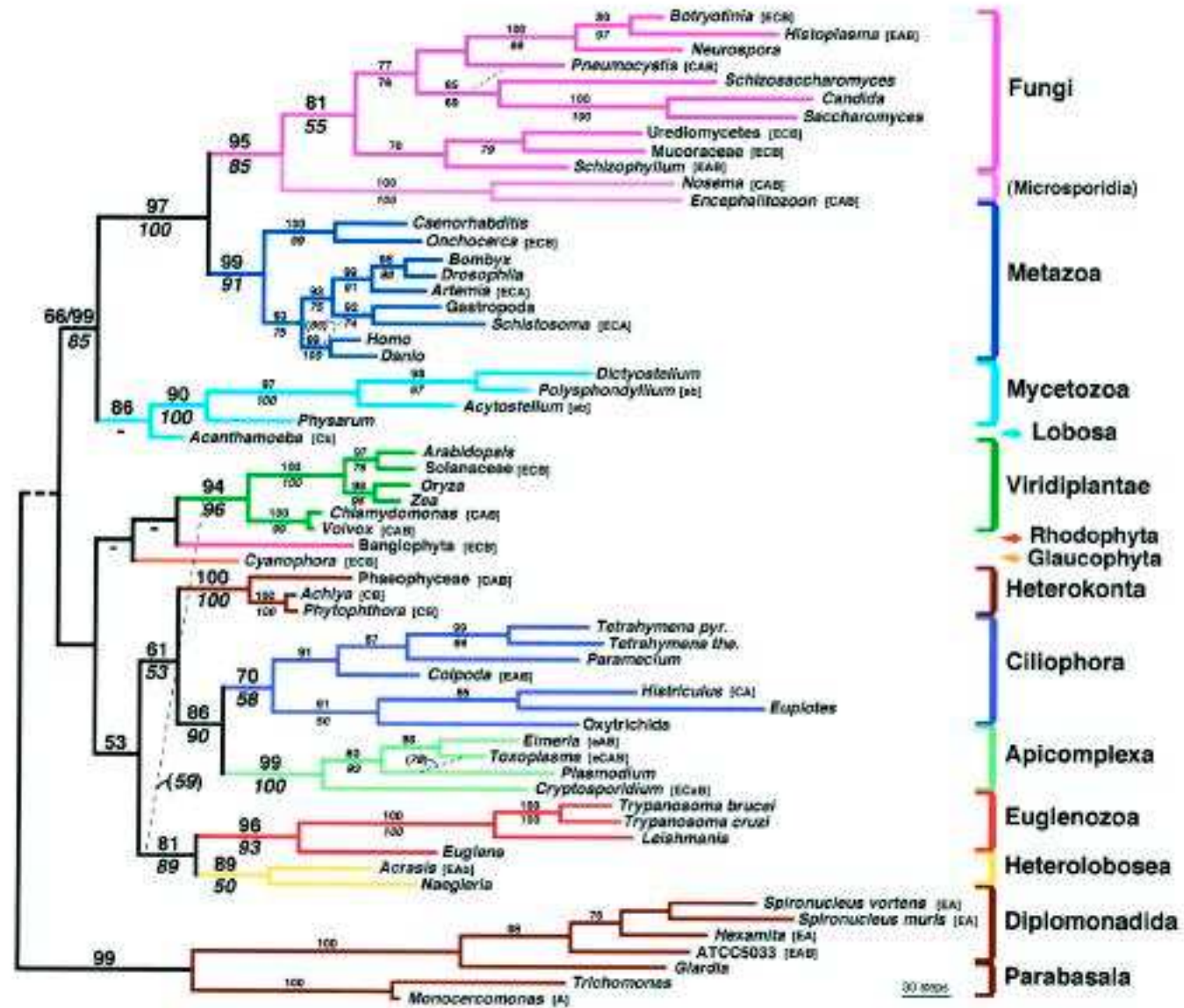
Bunka si zachováva záznam o svojej evolúcii:

- (i) v charaktere jej vlastných **metabolických procesov**,
- (ii) hlbšie – **v poradí aminokyselín v bielkovinách**,
- (iii) principiálne – **v poradí nukleotidov v nukleových kyselinách**.

Tieto "živé fosílie" sú potenciálne oveľa bohatšie a rozsiahlejšie ako skutočné fosílné pozostatky a siahajú ešte oveľa ďalej – až k počiatkom bunky, do obdobia, keď existoval spoločný predok všetkého živého.



Molecular evidence of evolution



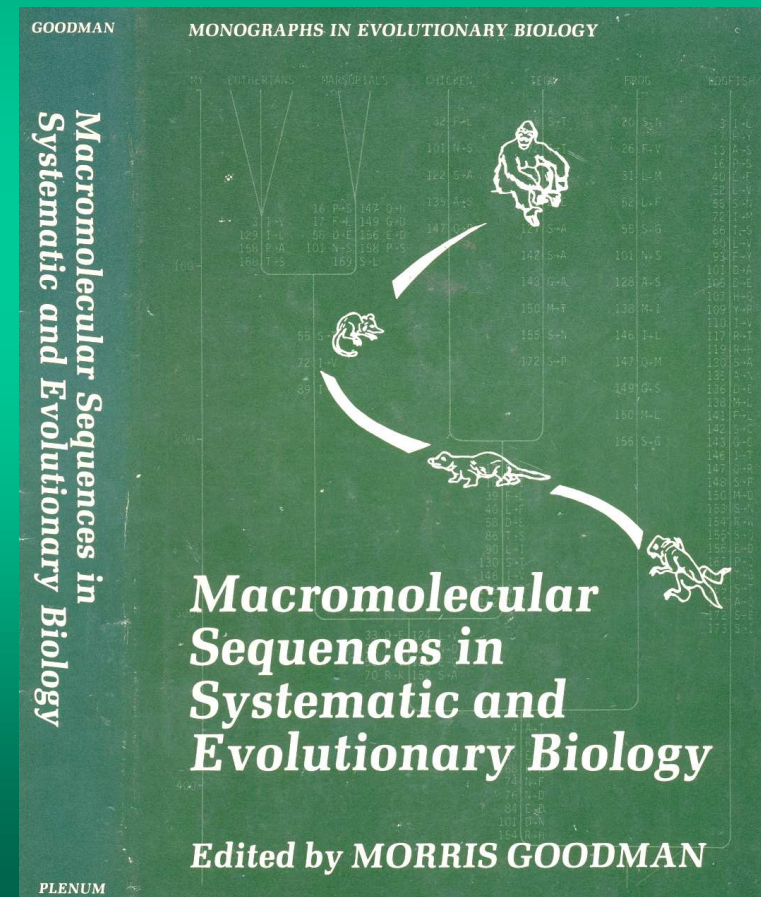
Porovnávacie analýzy informačných makromolekúl (nukleové kyseliny, bielkoviny)

kvantitatívna miera pre stanovenie evolučného vzťahu
medzi súčasťami bunky, bunkami, organizmami,
populáciami atď.

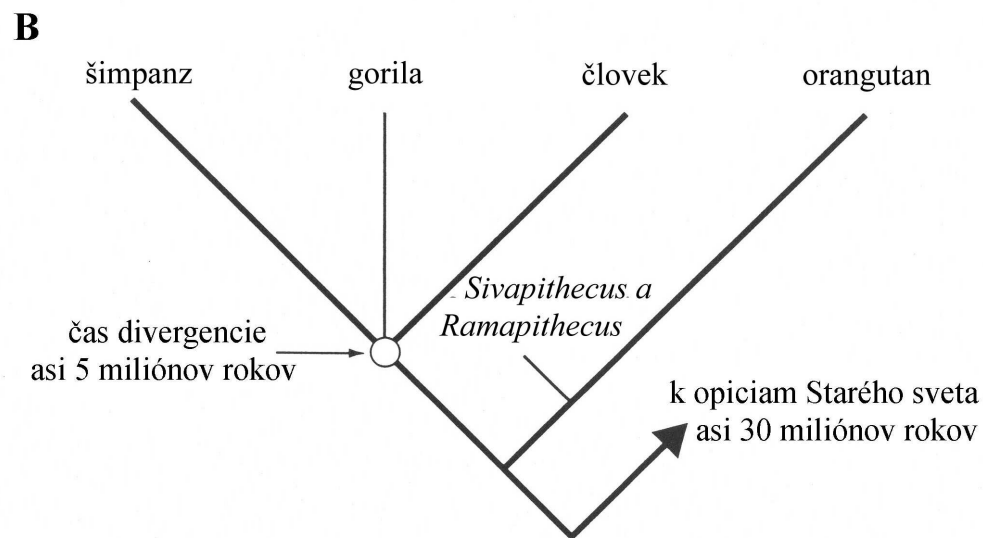
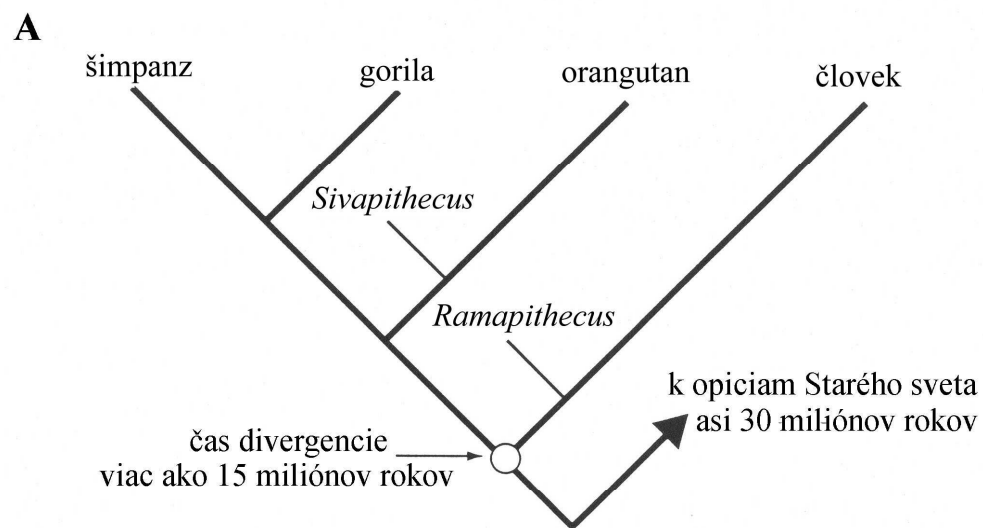
Zuckerlandl a Pauling (1965)

"Molekuly ako dokumenty
evolučnej histórie"

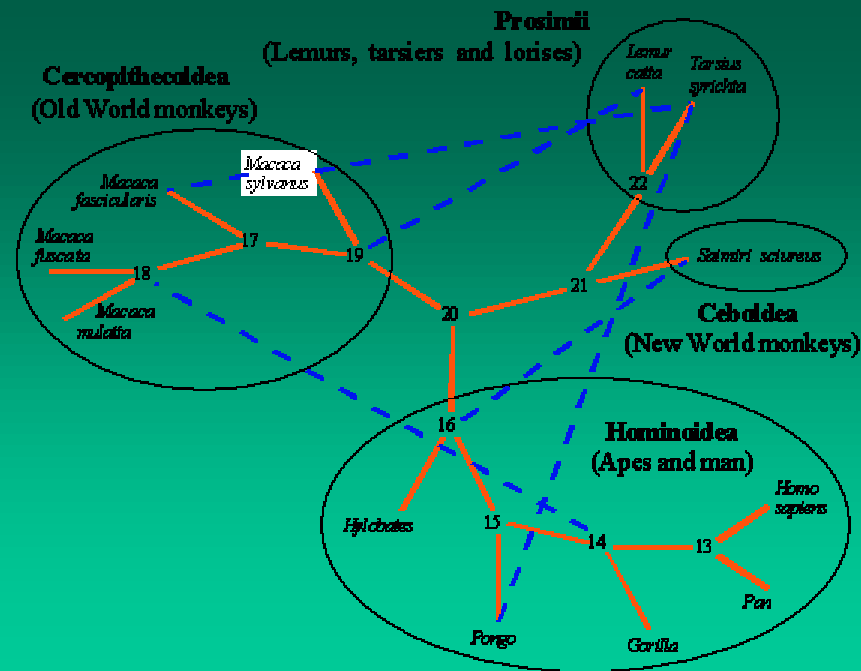
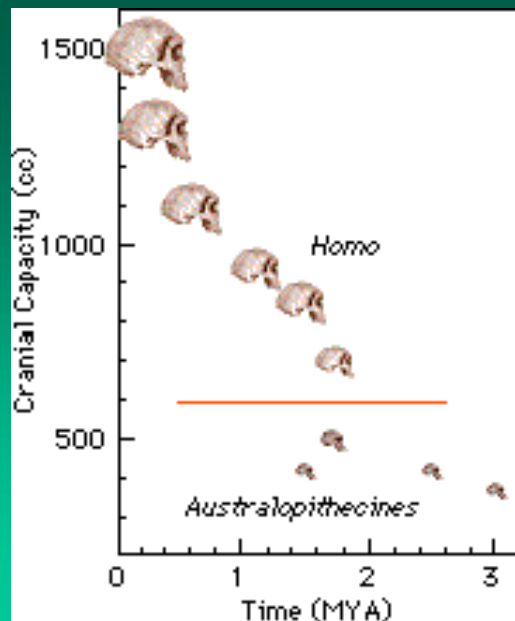
– molekulárna revolúcia
v biológii.



Ako molekulárno-biologické údaje zmenili obraz pôvodu človeka.



Strom A zobrazuje všeobecne akceptovaný pohľad na evolúciu primátov okolo roku 1960. **Strom B** zostrojili **Sarich a Wilson (1967)** na základe imunologických porovnávacích štúdií (albumín sér). Správnosť stromu **B**, spolu s **časom divergencie 5 miliónov rokov** (podľa stromu **A** – 15 miliónov), bola následne potvrdená aj pomocou analýz ďalších molekulárno-biologických údajov. Jediným rozdielom oproti súčasnosti je posúdenie otázky príbuznosti človeka, šimpanza a gorily. Dnes sa všeobecne akceptuje, že šimpanz je bližším príbuzným človeka ako gorila (podľa Page a Holmes 1998).



20 rokov po tzv. Sarich-Wilsonov míľniku sa na základe ďalších paleontologických nálezov potvrdilo, že *Ramapihecus* nepatrí do vývojovej línie človeka, ale orangutana.

Výsledky ďalších molekulárno-biologických štúdií boli nielen v súlade s novou konštrukciou fylogenetického stromu primátov, ale ukázali aj, že šimpanz je bližším príbuzným človeka ako gorila.

Najnovšie porovnávaná rozsiahlych úsekov genómu človeka a šimpanza dokumentujú, že rozdiel medzi nimi je asi len 1,5%, a to pritom veľká väčšina odlišností sa týka nekódujúcich sekvencií.

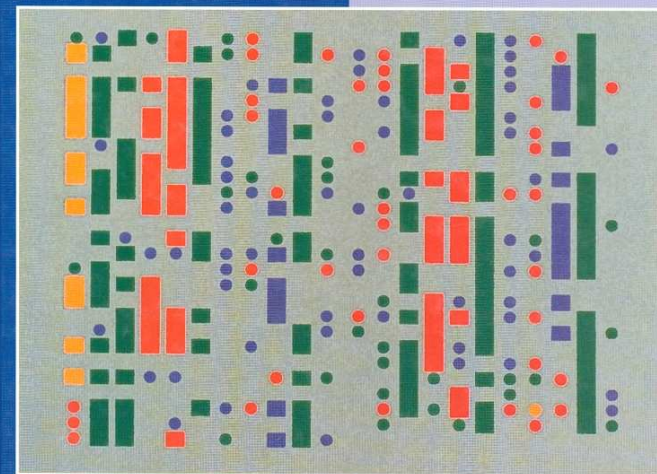
Molekulové hodiny

Molekuly sa vyvíjajú približne rovnakou rýchlosťou a rozdiely medzi podobou homologickej molekuly u predstaviteľov dvoch rôznych druhov sú úmerné času, ktorý uplynul od odčlenenia sa oboch druhov od spoločného predka.

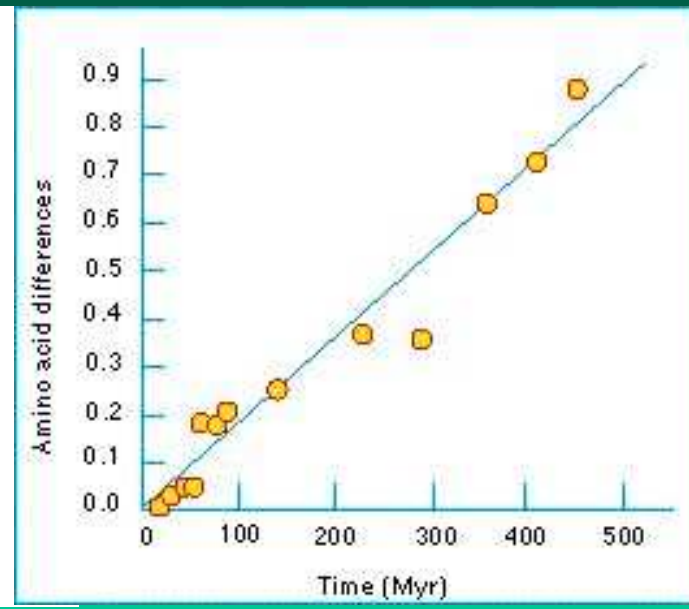
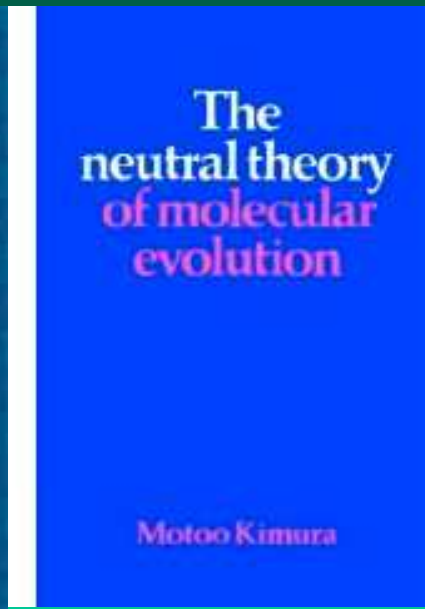
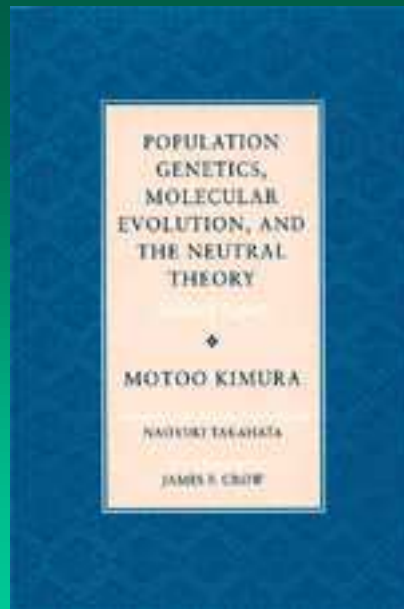
Mutácie sa hromadia viac menej konštantnou rýchlosťou vo všetkých vývojových líniách, pokiaľ si daná informačná molekula zachováva svoju pôvodnú funkciu.

Informačné makromolekuly v úlohe biologickej časomiere

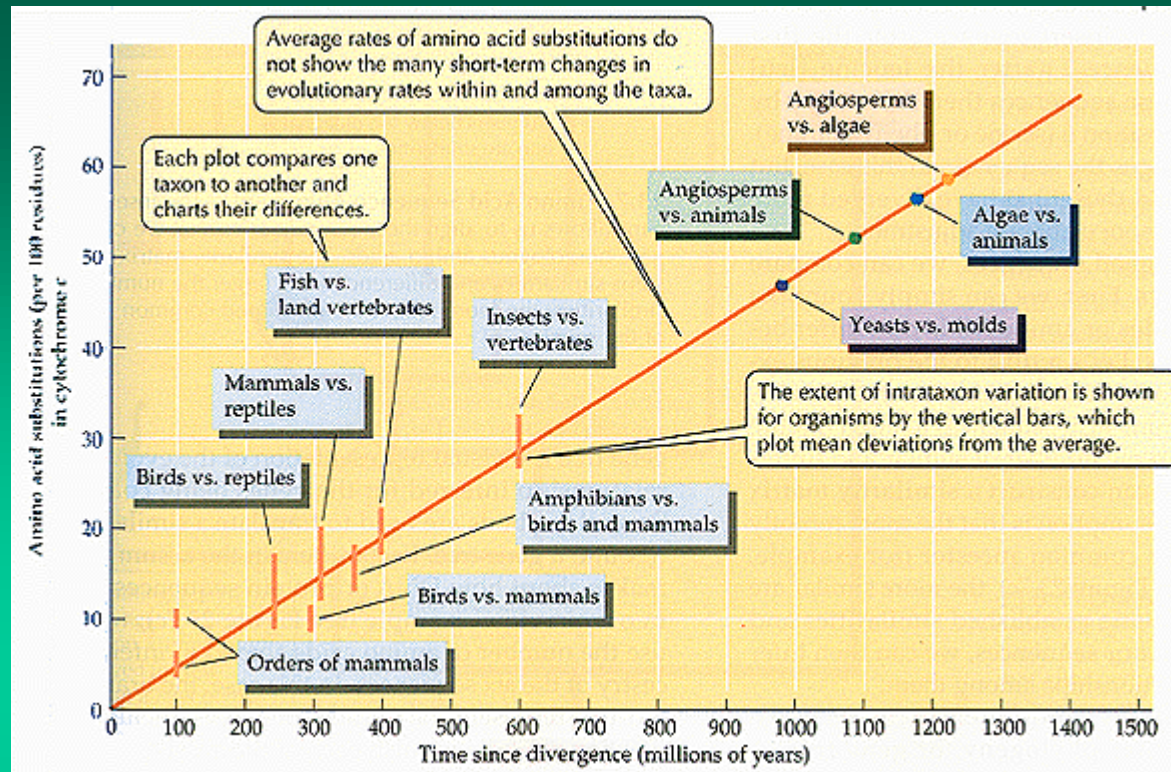
Molecular Evolution



Wen-Hsiung Li

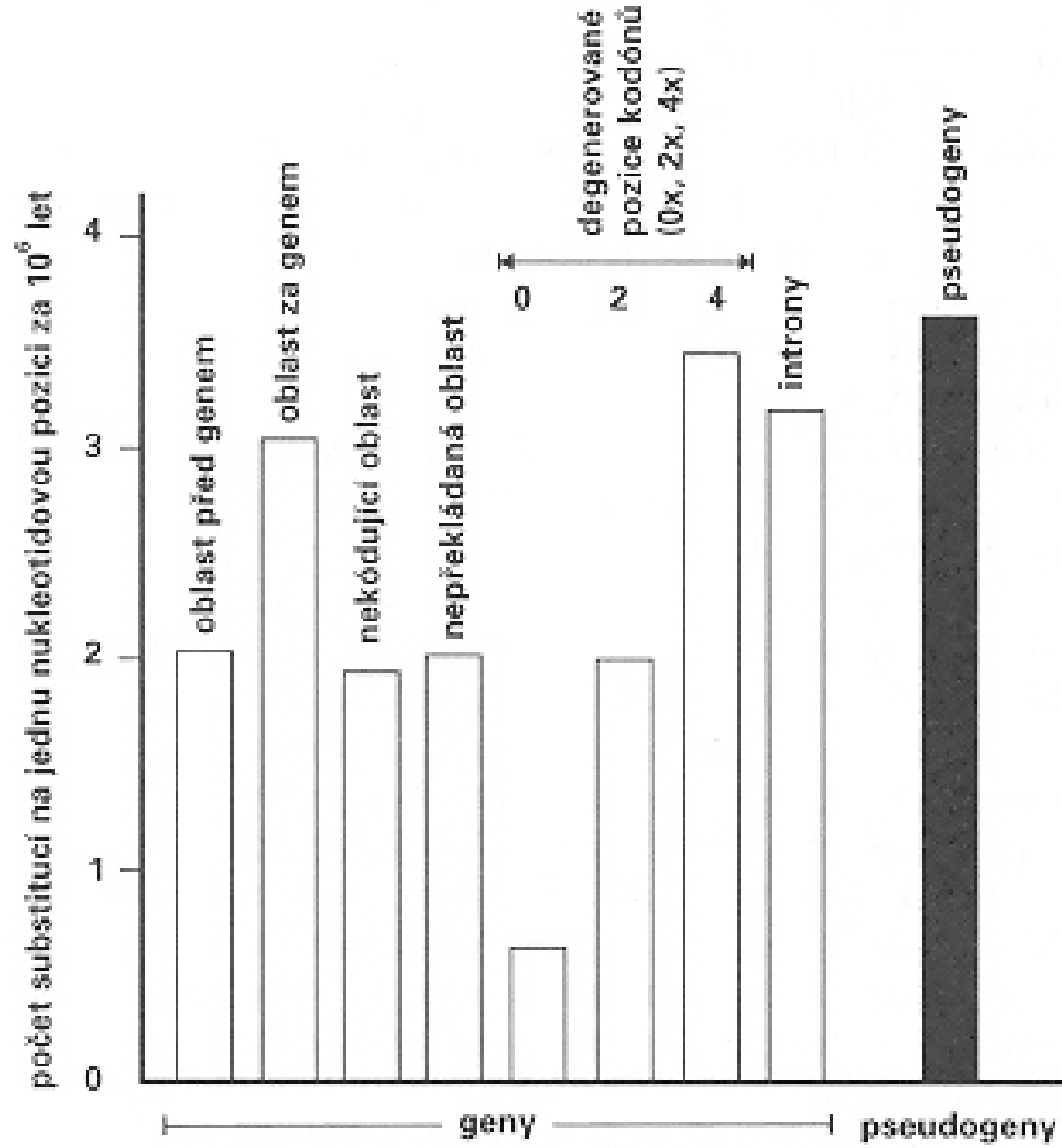


Odhalenie fenoménu "**evolučné, fylogenetické, resp. molekulové hodiny**" – jeden z najväčších objavov 20. storočia. Ich princíp sa spája s Kimurovou teóriou tzv. neutrálnej evolúcie (Kimura 1983), čo približuje citát: "Skutočnosť, že v rôznych organizmoch rozdielne (no zjavne príbuzné) molekulové sekvencie vykonávajú rovnakú molekulovú funkciu naznačuje, že väčšina zo zmien, ktoré sa postupne zafixovali v tej-ktorej molekulovej sekvencii sú **selekčne neutrálne**, t.j. nemajú žiaden fenotypový dopad."



Príklady: mutácie v nekódujúcich oblastiach alebo v tretích pozíciách nukleotidových tripletov (v dôsledku degenerovanosti genetického kódu v tomto prípade zmena nukleotidu nespôsobuje zámenu aminokyseliny v kódovanej bielkovine – tzv. synonymné substitúcie), resp. pseudogény (nefunkčné kópie génov).

38. Substituce v různých částech genů a v pseudogenech. Hodnoty v počtu substitucí na jedno místo za milion let. Předpokládá se, že v pseudogenech jsou všechna místa rovnocenná. Ve funkčních genech se takové volnosti těší jen pozice na čtyřikrát degenerované místech kodónů, sekvence intronů a sekvence v oblasti za genem. Méně volnosti mají sekvence před genem, nekódující sekvence na začátku a konci přepisu a dvojnásobně degenerované pozice kodónů. Nejnižší je frekvence změn v jedinečných pozicích kodónů. Podle [312]

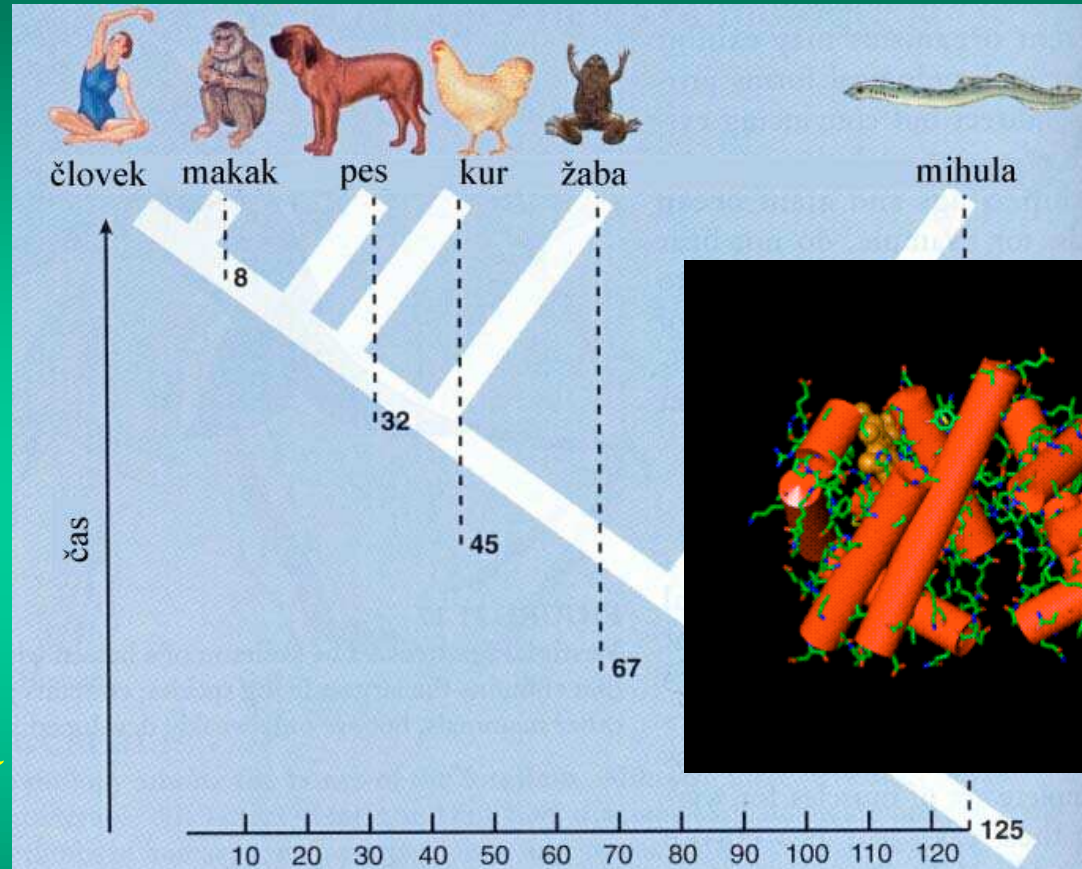


Sekvence polypeptidov ako miera evolučnej príbuznosti organizmov – molekuly odrážajú evolučnú vzdialenosť

Druh

človek	0
gorila	1
gibon	2
makak	8
myš	27
žaba	67

(celková dĺžka reťazca je 146 aminokyselín)



Čísla v obrázku udávajú počet rozdielov v aminokyselinovom zložení β reťazca hemoglobínu príslušného organizmu a človeka.

Čím väčšia je evolučná vzdialenosť od človeka (biely kladogram), tým väčší je aj počet odlišných aminokyselín (podľa Kimura 1983).



Fig. 7.6 Alignment of amino acid sequences from adult α - and β -haemoglobin and myoglobin (Mb) proteins from four vertebrate species. Light-shaded residues are those conserved between all four sequences from each protein while heavy-shaded residues are those conserved across all proteins. Arrows indicate residues which are also conserved in invertebrate and plant globins. For ease of presentation a repetitive sequence of STSTSTS was removed from the start of the shark α -haemoglobin sequence.

Molekulárne chronometre – konkrétne nástroje, ktoré merajú čas v molekulových hodinách

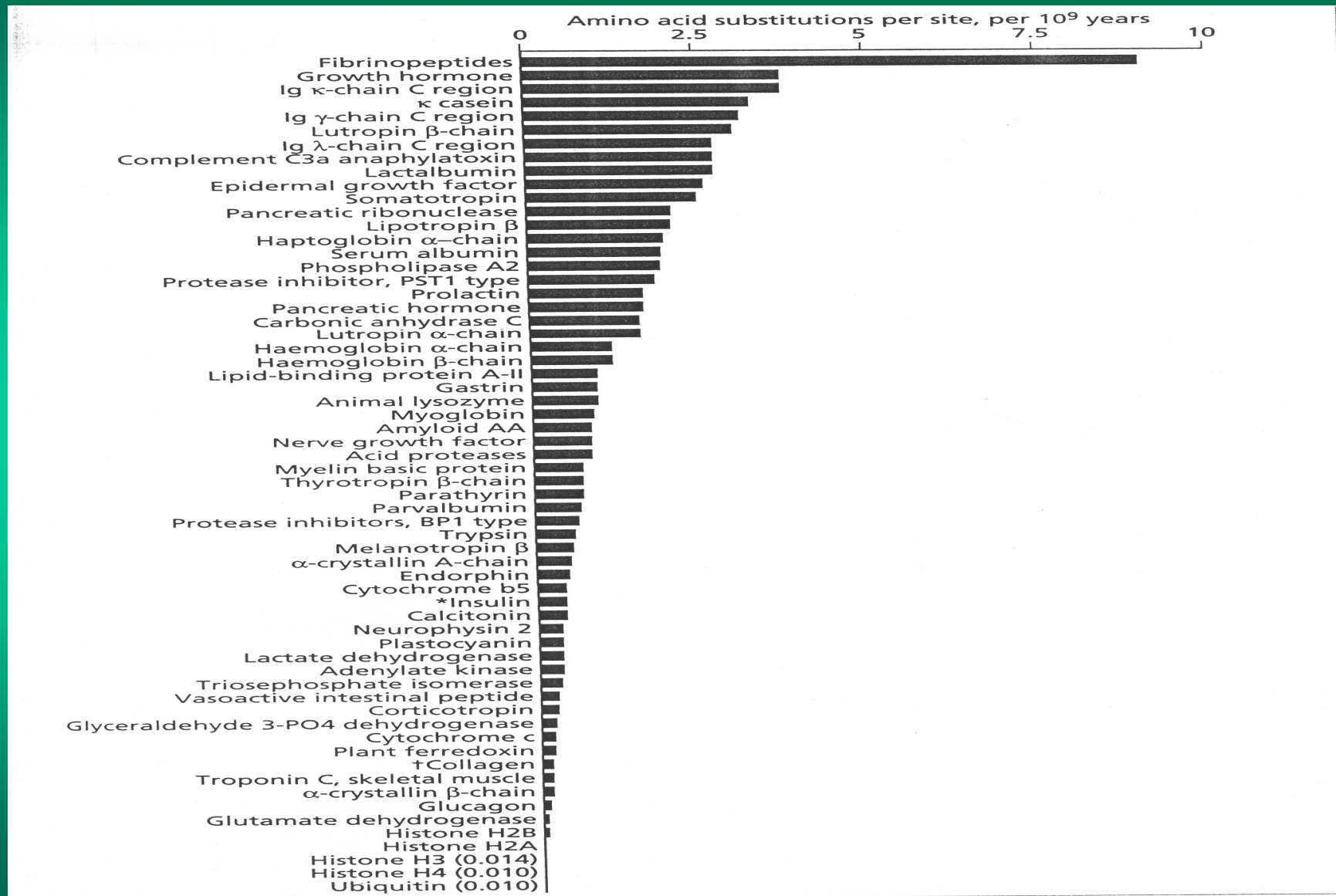
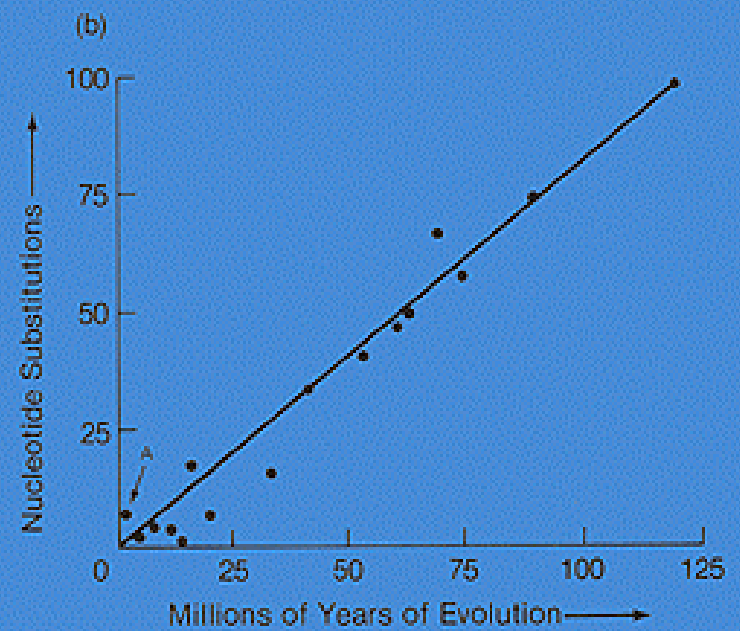
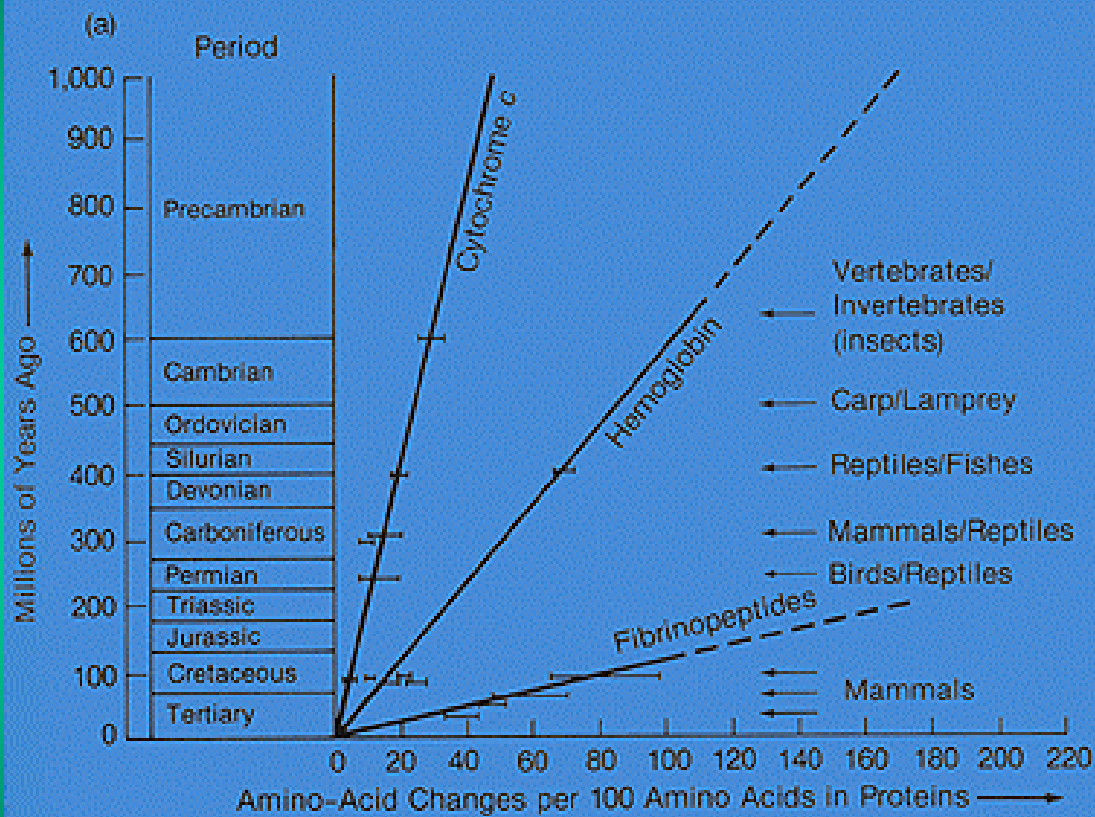


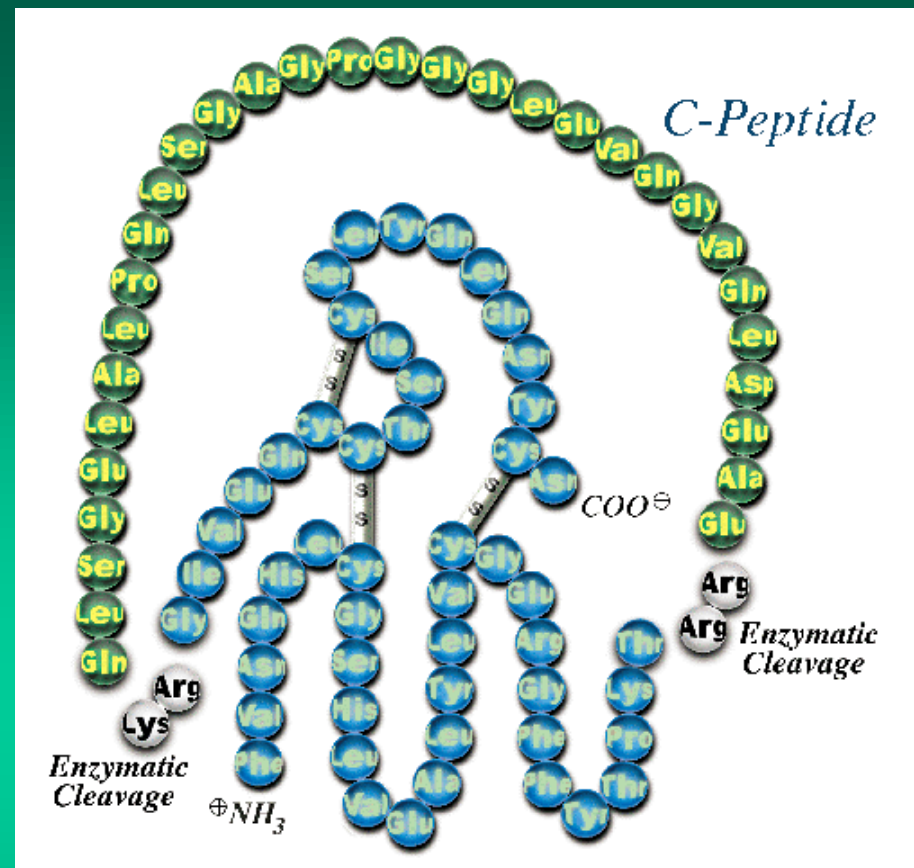
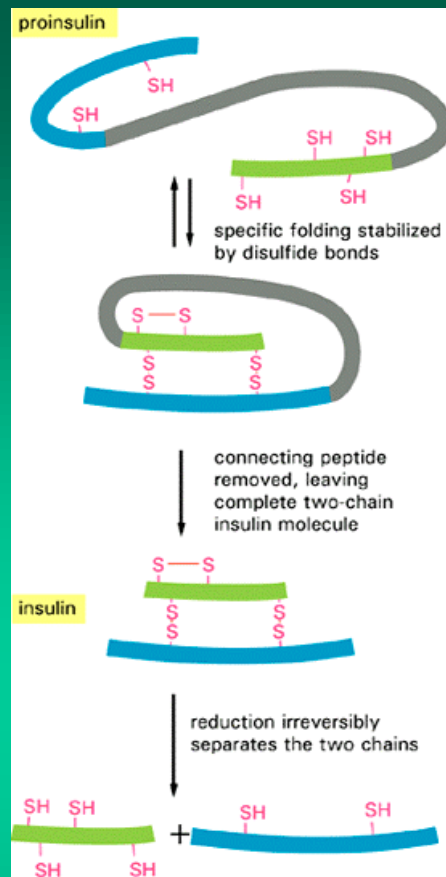
Fig. 7.4 Rates of amino acid substitution for various mammalian proteins. *Excluding guinea pig and coypu, the phylogenetic position of which has been debated (see section 7.4); † Excluding non-repetitive ends. Data from Nei (1987).

Rýchlosť evolúcie niektorých proteínov cicavcov

<u>proteín</u>	<u>rýchlosť</u>
fibrinopeptidy	8,3
ribonukleáza	2,1
lyzozým	2,0
α -globín	1,2
myoglobín	0,89
inzulín	0,44
cytochróm <i>c</i>	0,3
histón H4	0,01

Rýchlosť je vyjadrená ako priemerný počet substitúcií aminokyselín na jednej pozícii za 10^9 rokov (podľa Kimura 1983).

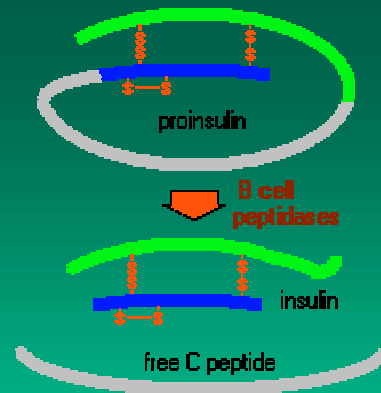




Rozdiel v rýchlosti medzi synonymnými a nesynonymnými

substitúciami v príslušnom géne ukazuje, že čím silnejšia je v danej časti informačnej makromolekuly potreba zachovania jej funkcie, tým pomalšia je rýchlosť jej evolúcie.

Ilustrovať to možno takmer klasicky na proinzulíne, ktorý sa skladá z troch segmentov A, B a C (Kimura 1983).

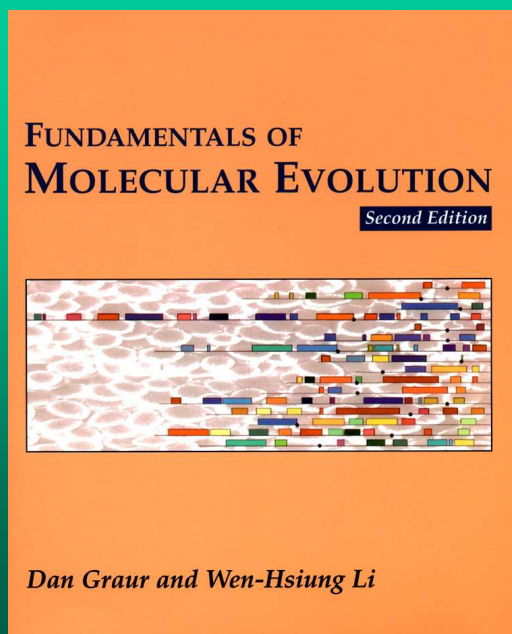
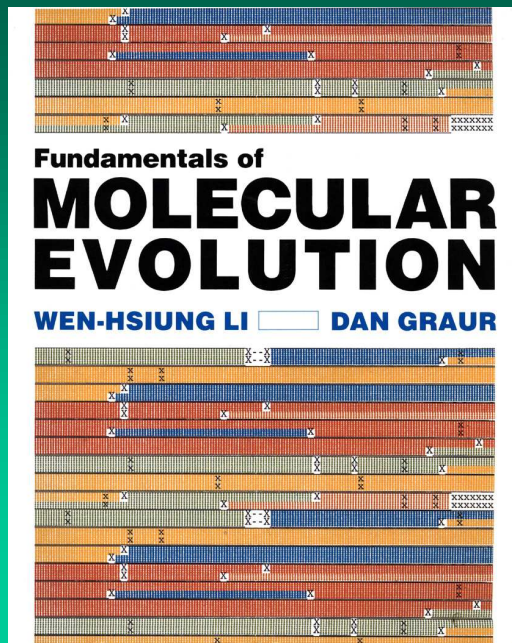


V rámci postranlačných úprav sa segment C vyštepuje z daného peptidu a neparticipuje na hormonálnej aktivite inzulínu.

Premieta sa to do rýchlosti nesynonymných substitúcií v oblasti kódujúcej segment C, ktorá je sedemkrát vyššia ako pri úsekoch DNA kódujúcich segmenty A a B.

Obdobné odlišnosti možno pozorovať aj v rozdieloch evolučných rýchlostí medzi tzv. aktívnymi miestami bielkovín, ktoré zodpovedajú za ich funkciu a ostatnými oblasťami týchto molekúl.

Príklad – reťazce hemoglobínu. Tie časti molekuly, ktoré viažu hém predstavujú jej aktívne centrum. Rýchlosť aminokyselinových substitúcií je v nich desaťnásobne nižšia ako v povrchových častiach, ktoré sú pravdepodobne funkčne menej významné.



Každý gén, prítomný v bunke, je kópiou génu, existujúceho pred ním v bunke rodičovskej.

Nemusí to byť do detailov striktná kópia, pretože pôvodný genetický materiál môže byť pozmenený mutáciou, ale stopy po pôvodnom stave väčšinou pretrvávajú.

Ak sú si dva gény podobné v rozsiahlych úsekoch s väčším počtom nukleotidov, znamená to, že mali spoločného predka.

Takéto geneticky príbuzné gény či ich produkty sa nazývajú homologické, resp. ortologické (čo predstavuje taký druh homológie, pri ktorom sekvenčne podobné molekuly majú v rôznych druhoch organizmov rovnakú funkciu a sú kódované homologicky postavenými génmi, t.j. v rovnakom lokuse).

Poradie základných stavebných kameňov v génoch, resp. v ich produktoch, poskytuje tri druhy evolučnej informácie:

1. Možno z nich vyčítať stupeň príbuznosti medzi dvoma organizmami. Rozsah, v akom sú dva gény pre rovnakú funkciu v rôznych organizmoch homologické, svedčí o stupni ich príbuznosti.

2. Môžu byť mierou evolučného času. Porovnávanie súboru homologických molekúl, ktoré pozostávajú z príbuzných sekvencií stavebných prvkov, môže byť podkladom pre zostrojenie fylogenetických stromov, na ktorých body rozvetvenia sú približným vyjadrením relatívneho času bifurkácie.

3. Sú záznamom charakteristík pôvodného stavu. Porovnanie rozsiahleho súboru primárnych štruktúr homologických molekúl umožňuje zároveň rekonštruovať predpokladanú pôvodnú verziu génu.

Keďže **vzt'ah medzi génom a jeho produktom** (či už bielkovinou alebo niektorým druhom RNA) je **kolineárny**, pre potreby fylogenetickej analýzy je znalosť sekvencie prvkov v produkte obyčajne rovnako užitočná ako poznanie sekvencie génu samého.

Molekulárna paleontológia

Existuje viacero príkladov dokumentujúcich skutočnosť, že **počet zmien** (substitúcií aminokyselín) v **bielkovine závisí len od času, a nie od evolučných foriem, ktorými daný gén do súčasnosti prešiel.**

Ak je vzdialenosť dvoch druhov organizmov od evolučného uzla približne rovnaká, potom počty substitúcií aminokyselín sú v podstate totožné, bez ohľadu na to, či jeden z organizmov predstavuje dlhodobu morfológicky nezmenenú, tzv. živú skamenelinu (napr. lalokoplutvú rybu – latimériu), resp., že vo vývojovej línii vedúcej k druhému organizmu dochádzalo k mnohorakým zmenám za vzniku nových biologických foriem.

Molekulárna evolúcia "živých fosílií" poskytuje pozoruhodný dokladový materiál nielen o konštantnej rýchlosti molekulárnej evolúcie, ale aj o vzájomnej nezávislosti medzi molekulárnou a morfológickou evolúciou.



Za jednu zo živých fosílií sa považuje aj žralok *Heterodontus portus-jacksoni*, druh ktorý veľmi pripomína svojich fosilizovaných predkov starých 300 miliónov rokov.

Jeho molekuly sa vyvíjali veľmi odlišne od morfológie jeho tela. Predpokladá sa, že k zdvojeniu génov pre hemoglobín a od tohto momentu relatívne nezávislému formovaniu sa neidentických α a β reťazcov, došlo ešte na stupni spoločného predka cicavcov a žralokov, na začiatku radiácie chordátov.



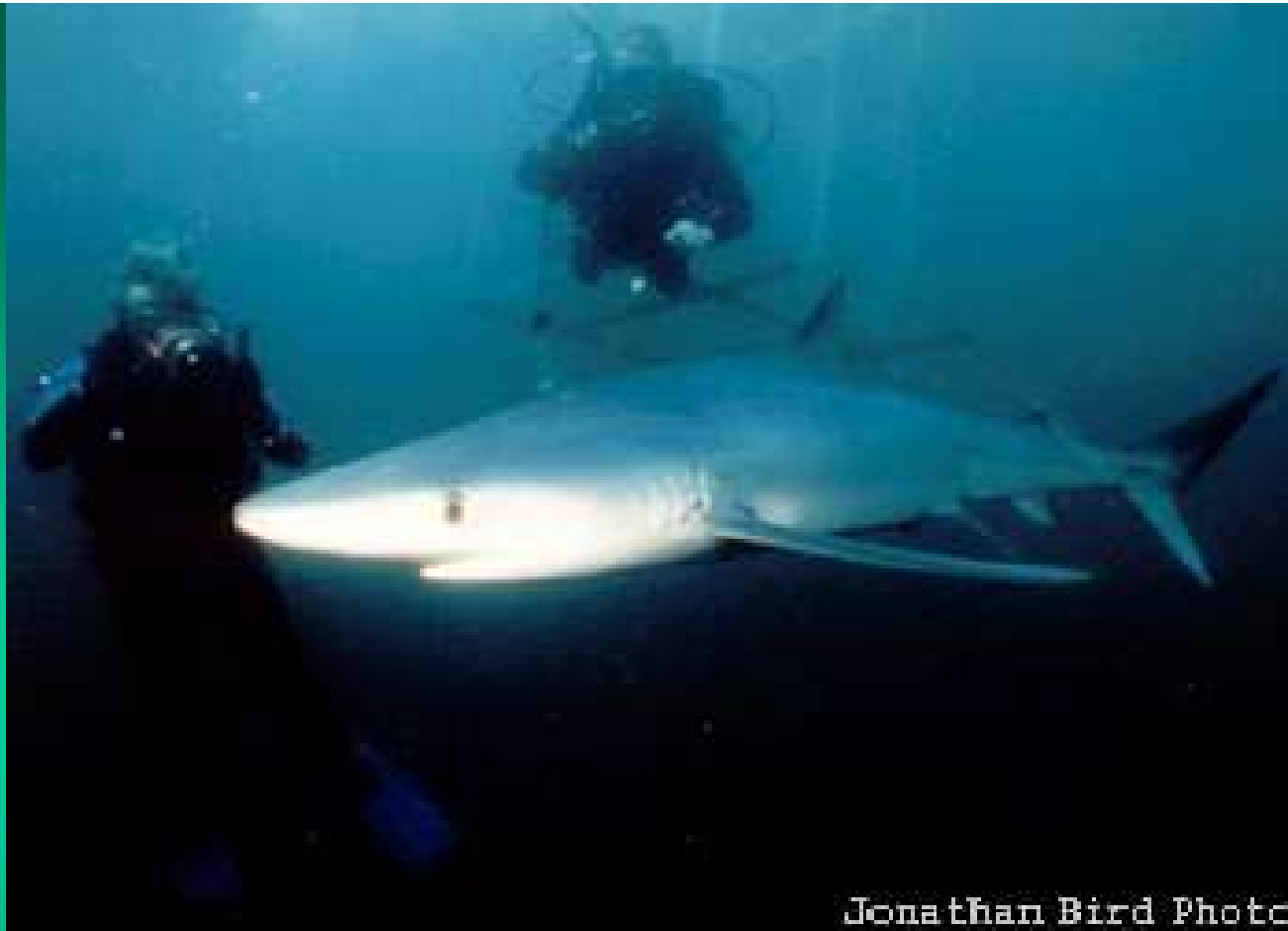
Mapovanie rozdielov v aminokyselinovom zložení α - a β -globínových reťazcov môže slúžiť ako miera molekulárnej evolúcie vo vývojových líniách vedúcich k moderným druhom živočíchov (Kimura 1983). Čísla ukazujú, že rozdiely, ktoré sa počas evolúcie naakumulovali v aminokyselinovom zložení α a β reťazcov hemoglobínu vo vývojovej línii vedúcej k človeku a tej, ktorá je reprezentovaná spomínaným archaickým žralokom, sú takmer identické, t j. 147, resp. 150 nesynonymných substitúcií.



Rýchlosť molekulárnej evolúcie v oboch odlišných vývojových líniách je približne rovnaká, čo výrazne kontrastuje s rýchlosťou evolúcie tvaru v oboch líniách, počas ktorej sa žralok takmer vôbec nezmenil, kým človek sa od svojich ryby pripomínajúcich predchodcov značne vzdialil.

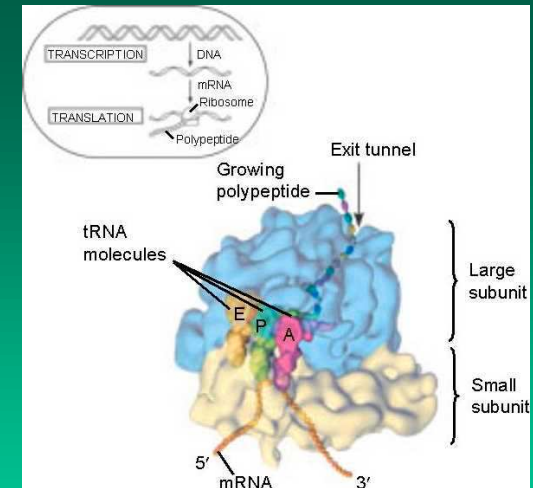
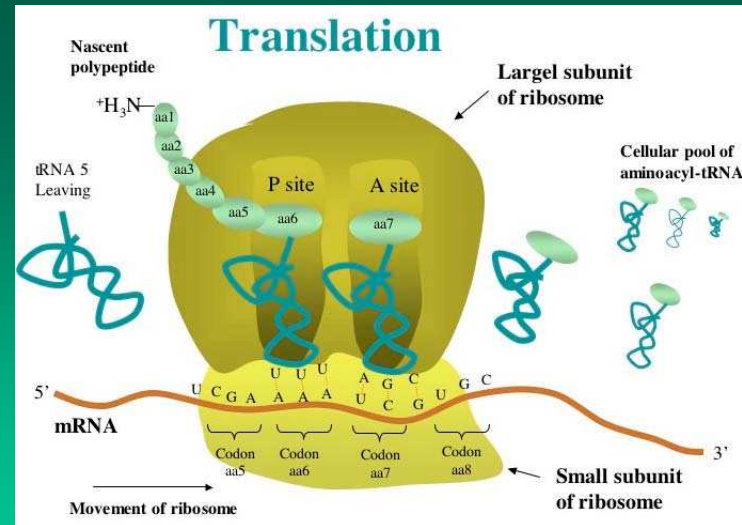
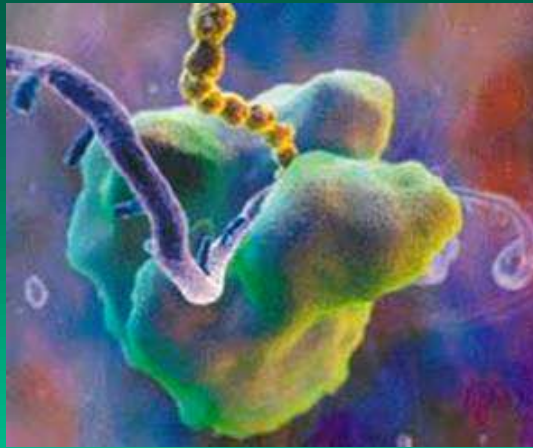
Okrem toho β -globínový reťazec človeka sa odlišuje od AK zloženia α -globínového reťazca človeka takmer identickým množstvom substitúcií aminokyselín ako od α -globínu kapra (147, resp. 149).

α a β globínové molekuly akumulovali zmeny približne rovnakou rýchlosťou a nezávisle na vonkajších selekčných okolnostiach, t.j. bez ohľadu na to, či sa α a β globíny nachádzali v rovnakom či v podstatne odlišnom organizme.



Väčšina rozdielov, ktoré v súčasnosti pozorujeme v aminokyselinovom zložení oboch reťazcov hemoglobínu bola v priebehu evolúcie spôsobená neutrálnymi posunmi medzi adaptačne rovnocennými formami.

Z príkladu vidno, že zatiaľ čo rýchlosti morfológických zmien sú medzi rôznymi evolučnými líniami stavovcov veľmi odlišné, rýchlosti evolúcie informačných makromolekúl sú pozoruhodne podobné.

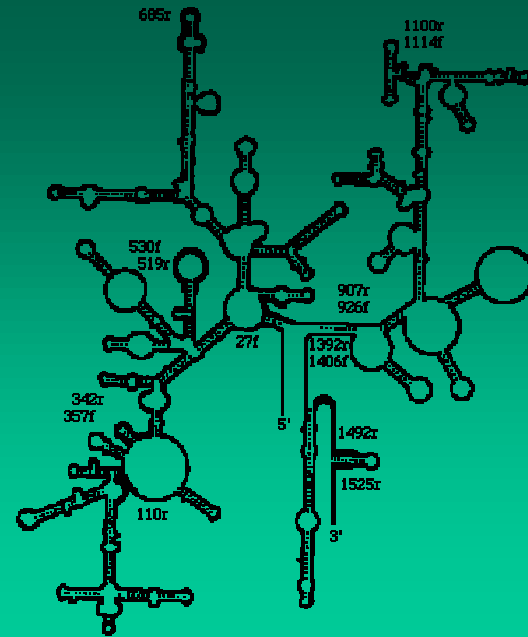
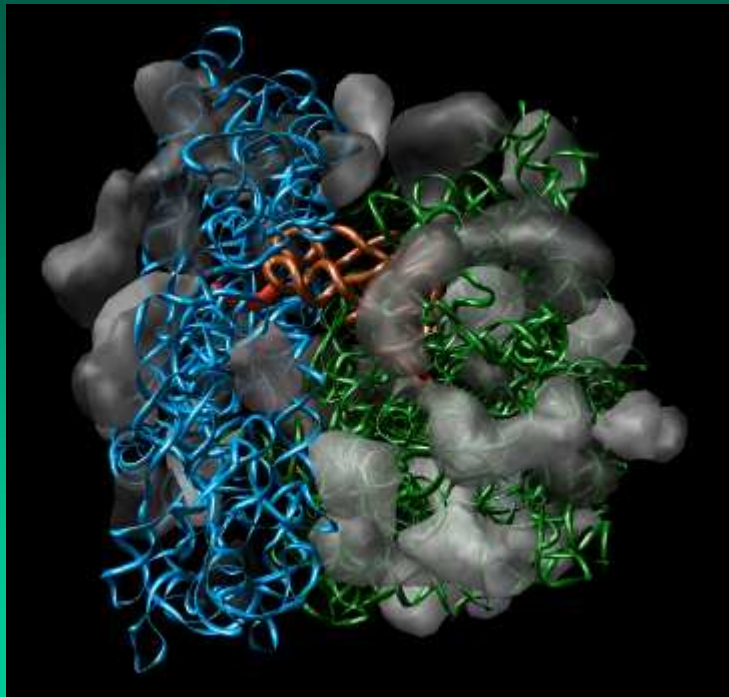


Univerzálne molekulové chronometre – ribozómové RNA

Všetky samostatne sa replikujúce štruktúry nevyhnutne vlastnia aparát na udržiavanie a reprodukciu genetickej informácie, ako aj na jej realizáciu – transláciu do postupnosti aminokyselín v príslušných bielkovinách.

Väčšina veľkých molekúl, zahrnutých v týchto procesoch, musí niesť pečať svojho pôvodu už z veľmi skorých štádií evolúcie bunky.

Museli existovať už v období pred dosiahnutím úrovne komplexnosti prokaryotickej bunky. Preto možno očakávať, že tieto molekuly majú potrebné vlastnosti univerzálneho fylogenetického markera.

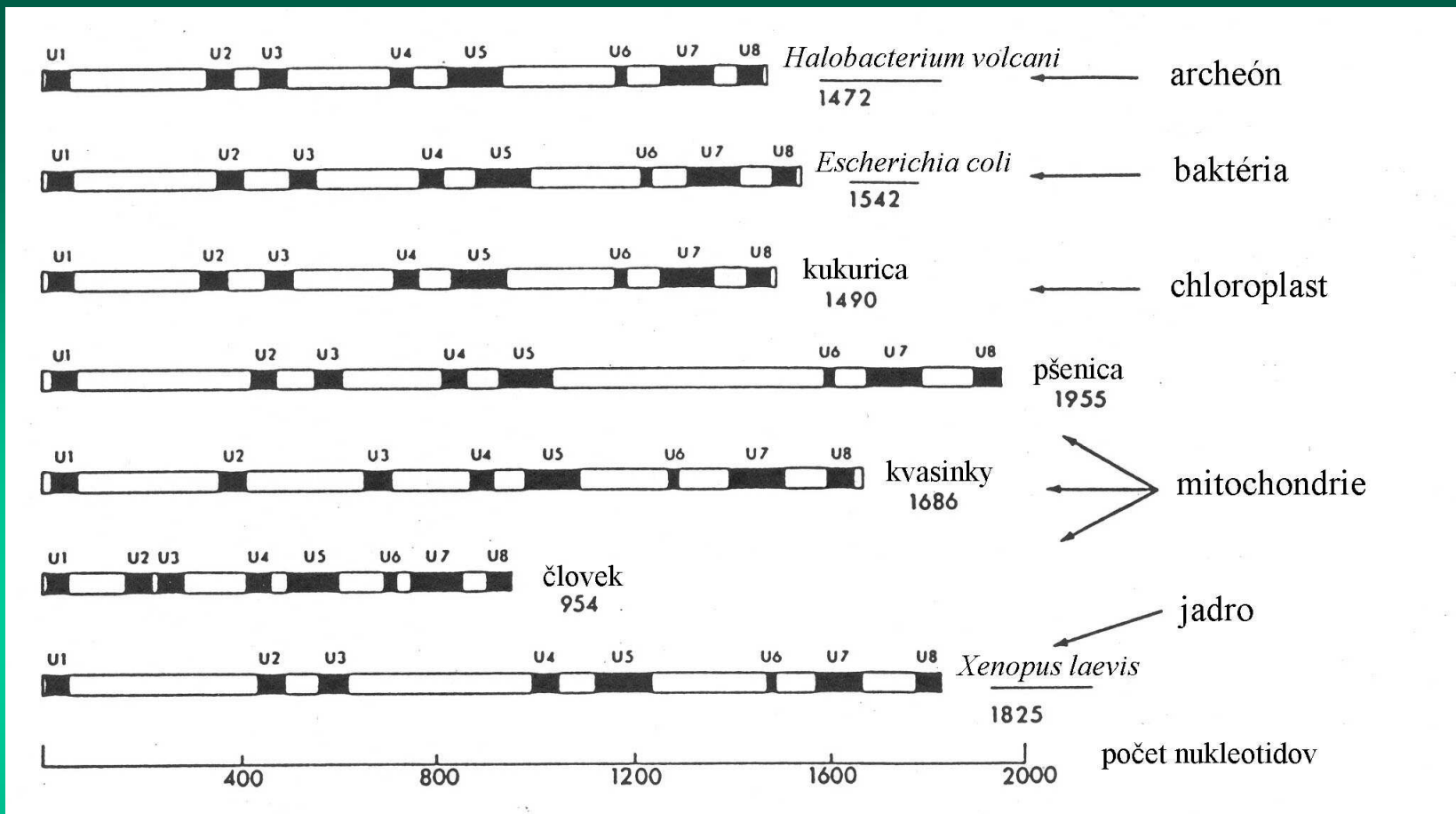


Univerzálne molekulové chronometre – ribozómové RNA

Z molekúl, ktoré spĺňajú všetky požadované predpoklady, sú to predovšetkým molekuly ribozómových RNA (rRNA).

Sú kľúčovou súčasťou ribozómov, organel, na ktorých sa prekladá genetická informácia – uskutočňuje sa syntéza bielkovín.

Predpokladá sa, že vzhľadom na kardinálnu dôležitosť funkcie, ktorú zastávajú v procese prekladu genetickej informácie, podliehajú zmenám počas evolúcie pomaly.

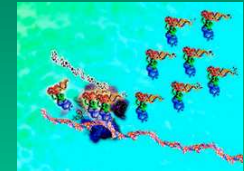


Univerzálne, jadrové oblasti v rRNA z malých ribozómových podjednotiek (podľa Gray 1988)..

Plné obdĺžniky označujú osem nesusediacich úsekov v primárnej štruktúre rRNA (U1 až U8), ktoré vytvárajú veľmi konzervatívne centrálnu jadrovú sekundárnej štruktúry tejto rRNA. Dĺžka tej-ktorej rRNA v nukleotidoch je uvedená pod menom príslušného organizmu.

Univerzálne molekulové chronometre – ribozómové RNA

Ekvivalentnosť a konštantnosť funkcie je veľmi dôležitá, pretože rozdiely prinášajú so sebou dodatočné zmeny v sekvencii nukleotidov, čo sťažuje, ba až znemožňuje porovnávanie, a tým dedukciu fylogenetických vzťahov.



Ribozómové RNA sú univerzálne rozšírené.

Ich ďalšou výhodou je, že prinajmenšom niektoré časti molekuly sa menia dostatočne pomaly na to, aby pôvodné spoločné sekvencie úplne nevymizli. Inými slovami, porovnávanie sekvencií nukleotidov v rRNA, resp. v ich génoch, umožňujú odvodzovať najhlbšie fylogenetické vzťahy.

Popri vysoko konzervatívnych úsekoch obsahujú tieto molekuly aj úseky hypervariabilné, čo umožňuje zároveň študovať vzdialené i blízke stupne príbuznosti.

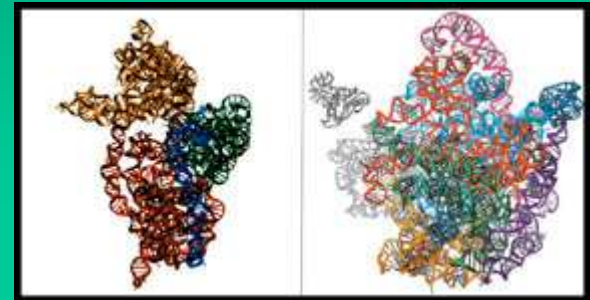
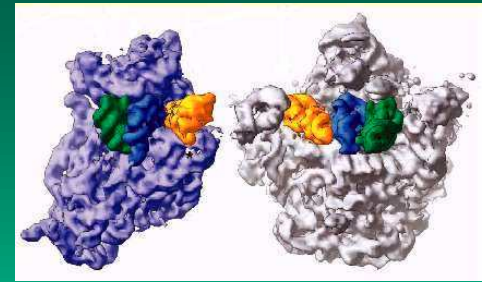
Okrem toho sú tieto molekuly dostatočne dlhé, takže predstavujú dostatočne veľký "štatistický súbor" pre spoľahlivú analýzu.

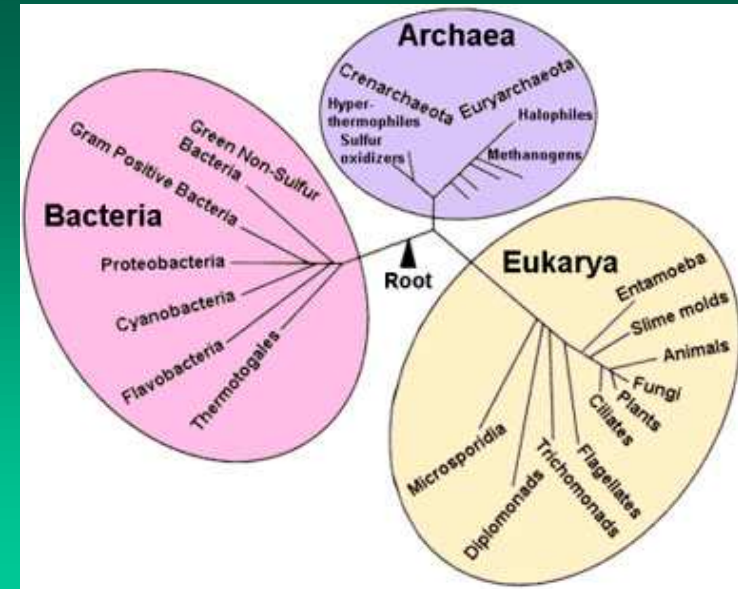
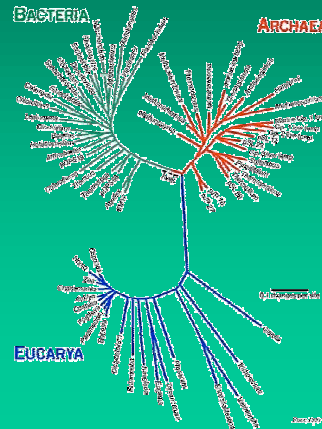
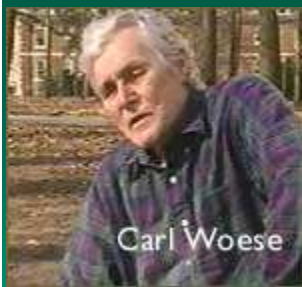
Zo spomenutých dôvodov sú to práve molekuly rRNA (resp. ich gény), predovšetkým z malých ribozómových podjednotiek, z porovnávania ktorých sa v posledných rokoch odvodzujú fylogeneticky najzávažnejšie závery.

Ribozómové RNA = malej ribozómovej podjednotky
(12S; 16S; 18S rRNA)
v úlohe fylogenetického markera

- univerzálne rozšírené (net, arch, eub, mt, ct) *
- funkčne ekvivalentné (proteosyntéza)
- univerzálne konzervovaný skelet sekundárnej štruktúry (súvis s funkciou) umožňuje presné zosúladenie primárnych sekvencií nukleotidov v homologických oblastiach a ich komparáciu
- úseky veľmi konzervatívne aj hypervariabilné
⇒ umožňuje súčasne študovať veľmi vzdialené ako i veľmi blízke stupne príbuznosti
- dostatočne veľký, vhodný štatistický súbór
16S rRNA *Escherichia coli* - 1540 nukleotidov
- ľahko dostupné
izolovateľné v dostatočnom množstve zo všetkých genetických systémov *

- * net - nukleocytoplasma eukaryotov (Eucarya)
- arch - archeobaktérie (Archaea)
- eub - eubaktérie (Bacteria)
- mt - mitochondrie
- ct - chloroplasty





Univerzálne molekulové chronometre – ribozómové RNA

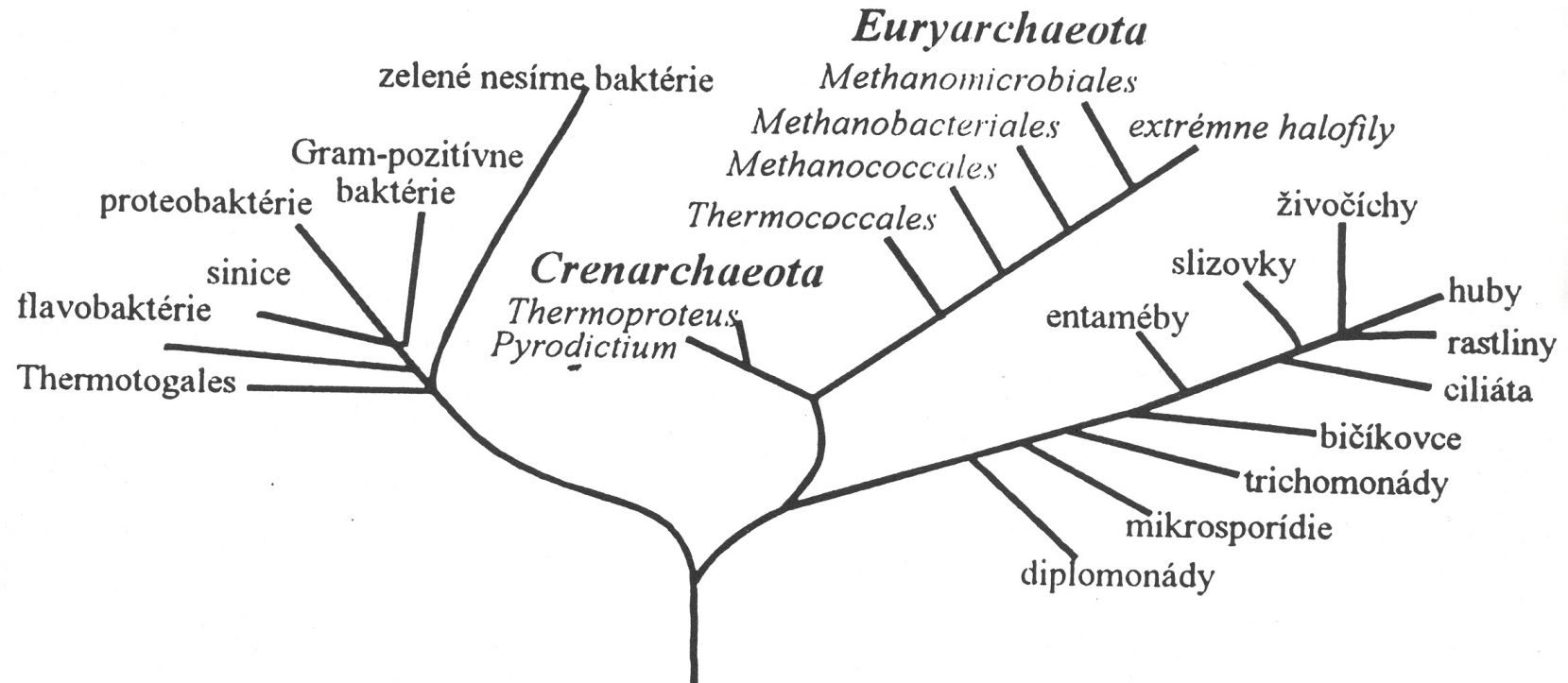
Obrovský význam univerzálneho fylogenetického stromu skonštruovaného na základe porovnávania rRNA spočíva v tom, že rekonštruuje evolúciu života na našej planéte aj v tej jeho najdlhšej etape, tzv. bunkovej, kedy neexistovali žiadne mnohobunkové organizmy a morfológické rozdiely boli minimálne.

Toto obdobie, ktoré trvalo približne 3 miliardy rokov, sa niekedy označuje ako vek mikroorganizmov.

BACTERIA

ARCHAEA

EUKARYA

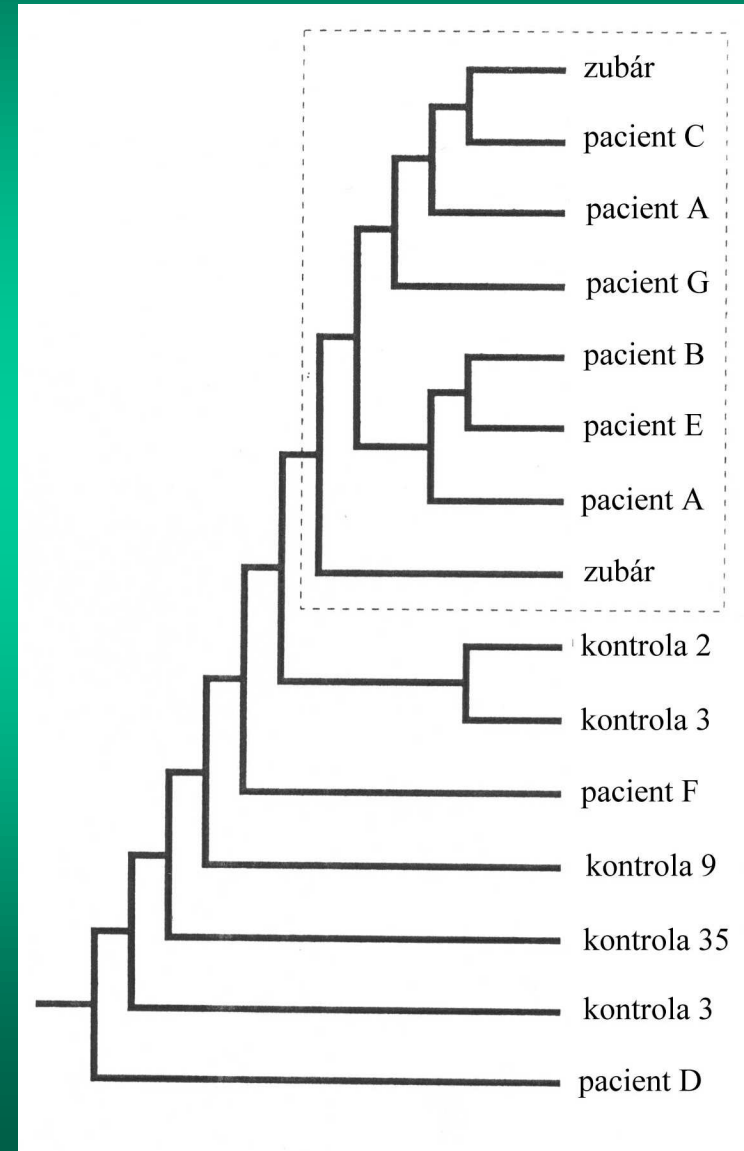


Ob. 1 Univerzálny fylogenetický strom zobrazujúci tri domény života (Woese et al. 1990). Poradie vetvenia a dĺžka vetiev sú založené na porovnávaní poradia nukleotidov v rRNA z malých ribozómových podjednotiek. Zakorenený dendrogram znázorňuje skoré odčlenenie sa baktérií (Bacteria) od spoločného predka a relatívne tesný vzťah archeónov (Archaea) k eukaryotickým organizmom (Eukarya). Doména Archaea je primárne rozčlenená na dve vetvy - Crenarchaeota (obsahujúce najmä hypertermofily a acidofily) a Euryarchaeota (hlavne halofilné a metanogénne archeóny). Evolučná vzdialenosť medzi dvomi skupinami organizmov je daná kumulovaným množstvom rozdielov v sekvenciách rRNA a je úmerná vzdialenosti medzi koncami vetiev a uzlami, ktoré spájajú príslušné dve skupiny.

Prípád floridského zubára.

Vysoká rýchlosť evolúcie vírusu HIV (10^6 rýchlejšie ako ľudské gény v jadre) umožňuje sledovať jeho šírenie sa v populácii

Každá vetva reprezentuje sekvenciu časti génu *env* vírusu HIV-1. Sekvencie nukleotidov sa získali od zubára a sedem jeho bývalých pacientov (označených A až G), ktorí boli taktiež infikovaní vírusom. Piati z týchto pacientov (A, B, C, E a G) mali sekvencie veľmi blízko príbuzné k sekvenciám zubára (vyznačené čiarkovaným obdĺžnikom) a zároveň nepatrili do rizikovej skupiny pre získanie HIV, čo naznačuje, že ich infikoval zubár. Dvaja z bývalých pacientov (D a F), ktorí zároveň patrili do rizikovej skupiny pre získanie HIV, mali sekvencie vírusov významne odlišnejšie. Od sekvencií zubára sú oddelené tzv. miestnou kontrolou, ktorú predstavujú HIV infikovaní jedinci žijúci v okruhu 90 míľ od zubárovej ambulancie. Pretože HIV-1 je veľmi premenlivým vírusom, uvedené sú dve odlišné sekvencie pre zubára a pacienta A (podľa Page a Holmes 1998; podklady Ou *et al.* 1992).



Molekulárna evolúcia

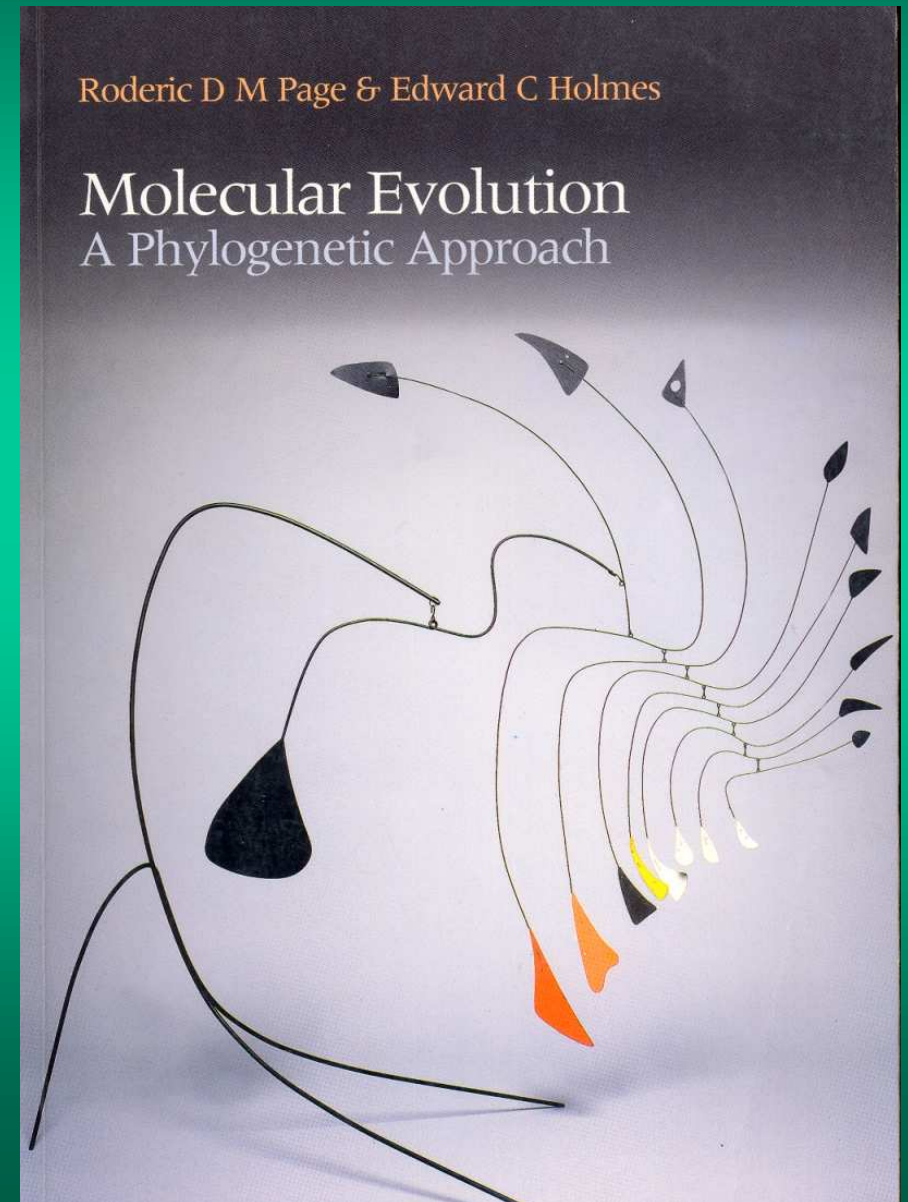
* štúdium evolúcie informačných makromolekúl

– rýchlosť a charakter zmien,
typy procesov

* rekonštrukcia evolučnej
histórie génov, genómov,
organizmov...

– využitie
molekulárno-biologických
markerov:

v populačnej genetike,
v molekulárnej ekológii,
v molekulárnej systematike,
v konzervačnej biológii



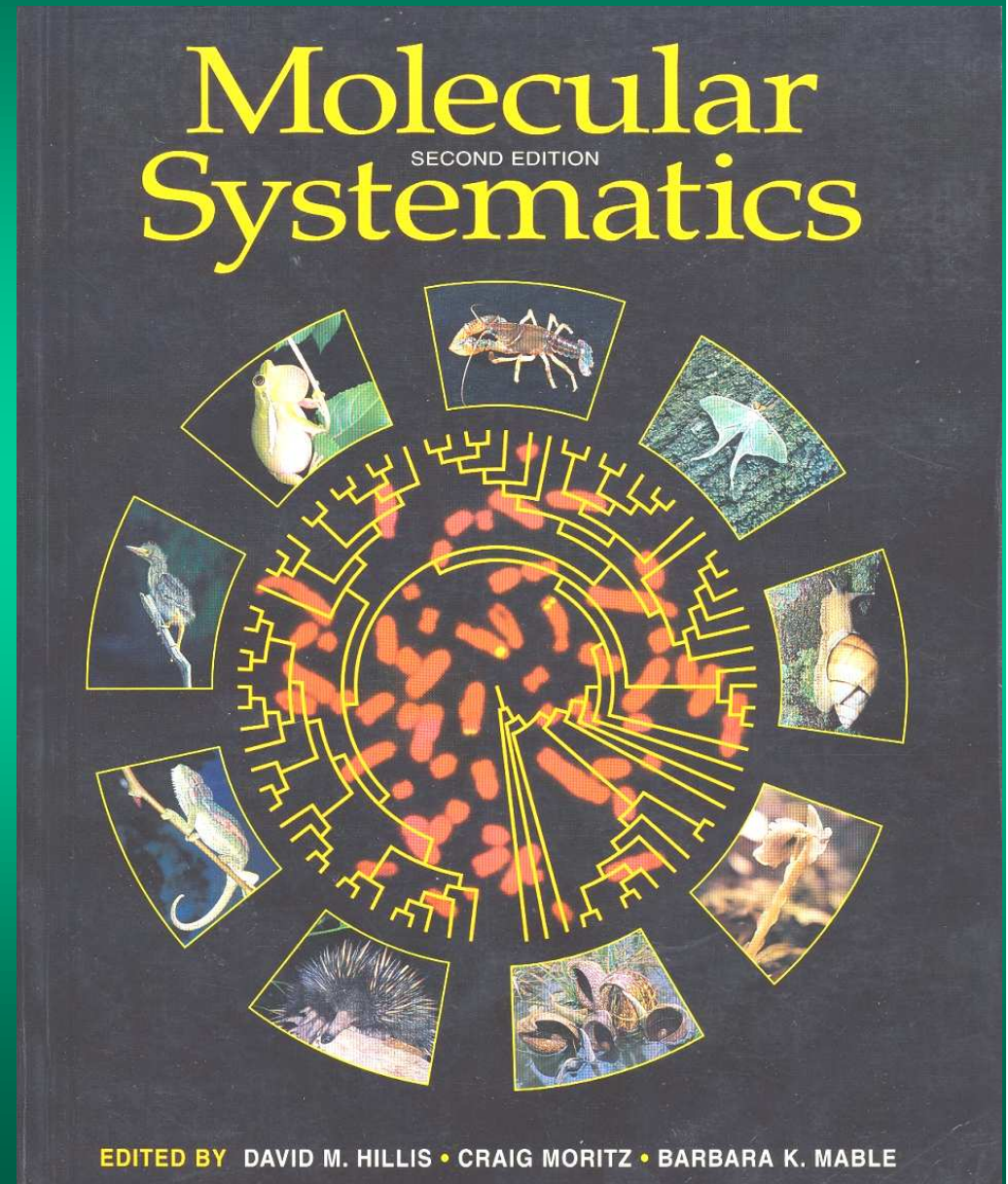
Molekulárna systematika (syn. molekulárna fylogenetika)

– klasifikuje organizmy
na základe informácií
získaných z porovnávania
poradia stavebných prvkov
v informačných
makromolekulách

prienik

molekulárna ekológia

molekulárna evolúcia



V dôsledku širokého využívania molekulových chronometrov vo všeobecnosti, a ribozómových RNA (resp. ich génov) zvlášť, sa východisko pre definovanie príslušného taxónu postupne presúva z roviny organizmovej na bunkovú, resp. molekulovú.



DNA Barcoding

A Global Standard for Identifying Biological Specimens

The Consortium for the Barcode of Life (CBOL) is an international initiative devoted to developing DNA barcoding as a global standard in taxonomy. CBOL has more than 130 Member Organizations from 40 countries including: *Natural history museums *Zoos *Herbaria *Botanical gardens *University departments *Biodiversity organizations *Governmental and intergovernmental organizations *Private biotech companies *Other research organizations

DNA Barcoding is a technique that uses a short gene sequence from a standardized region of the genome as a diagnostic "biomarker" for species. Different species have different DNA barcodes, making it possible to use barcodes to: *identify specimens *discover possible new species *to make taxonomy more effective for science and society

Príklad využitia metódy molekulových hodín pre určenie pôvodu rias

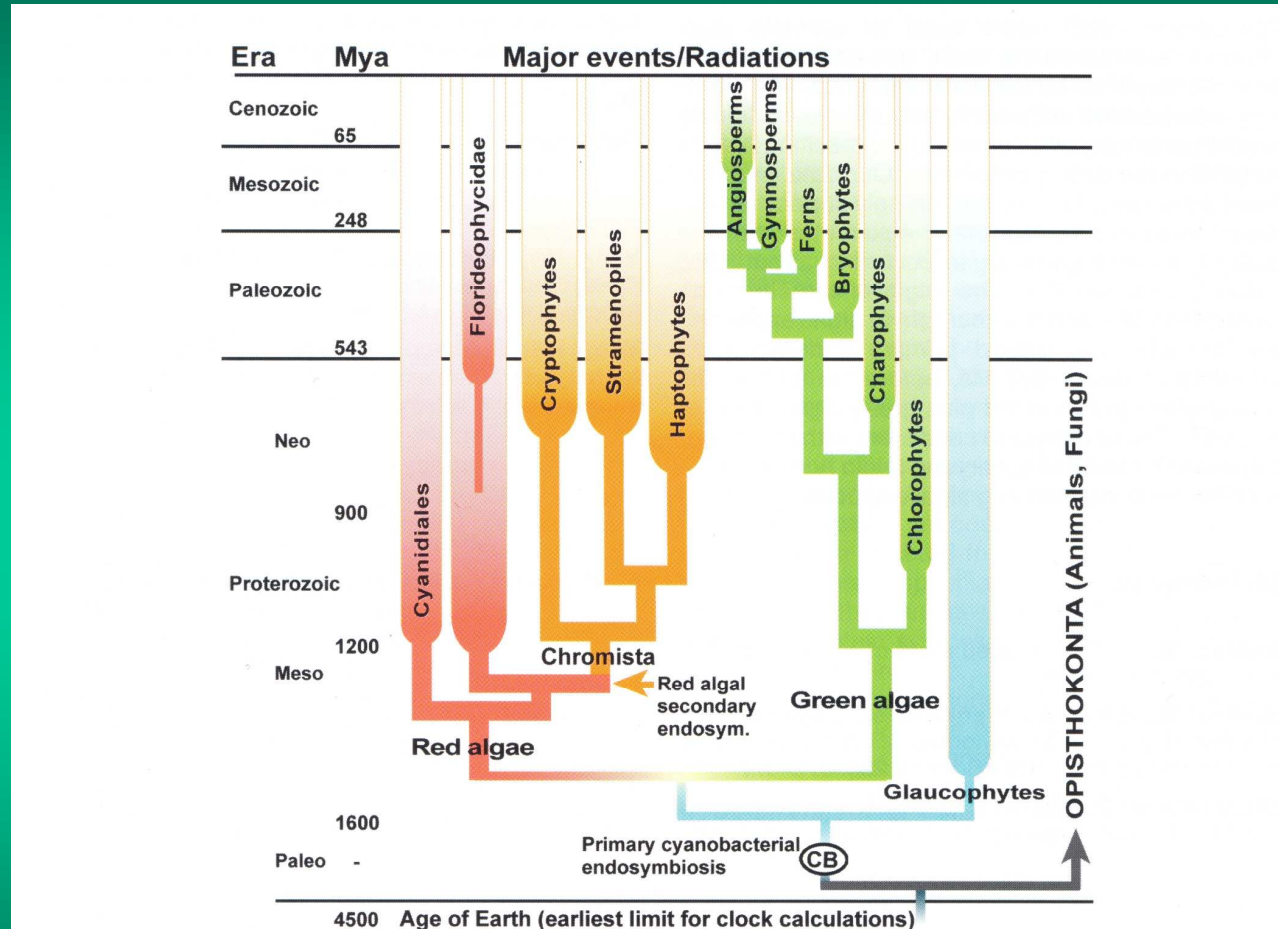
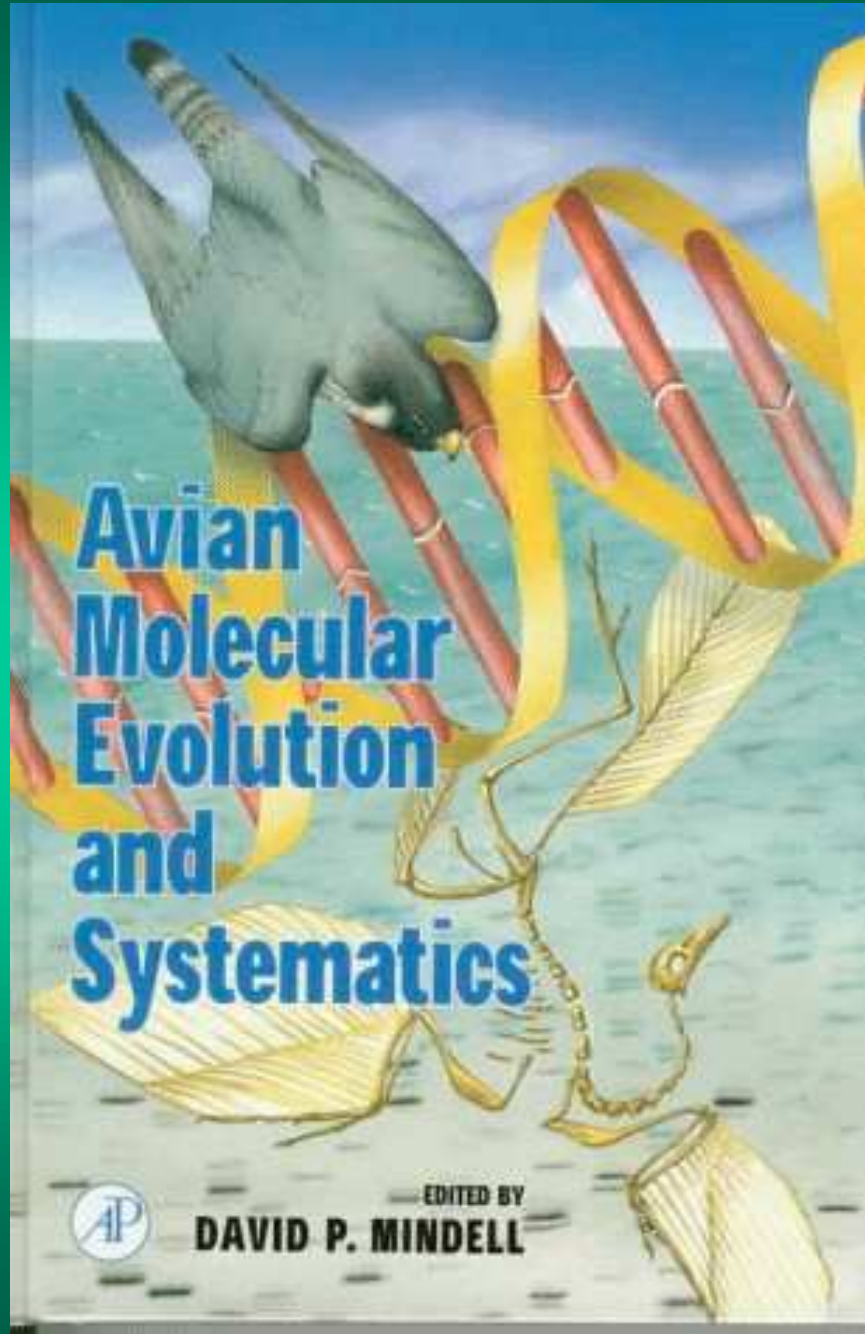


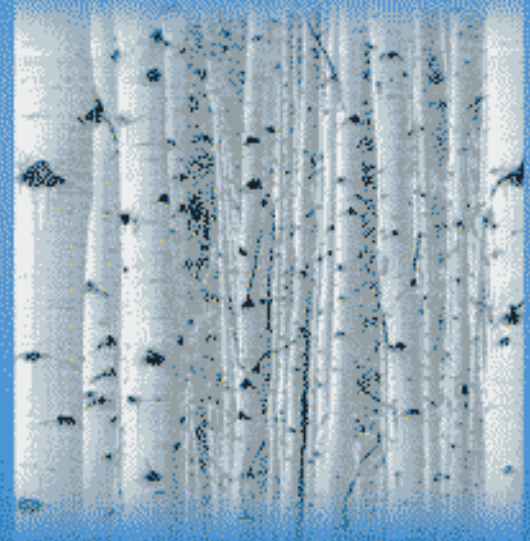
Figure 1. Schematic representation of plastid relationships and divergence times for the red, green, glaucophyte, and chromist algae. These photosynthetic groups are outgroup-rooted with the Opisthokonta that putatively ancestrally lack a plastid. The branches on which the cyanobacterial primary and red algal chromist secondary endosymbioses occurred are shown.

Bhattacharya D., Medlin L.K.: Dating Algal Origin Using Molecular Clock Methods, Protist, 155, 1, 9-10, 2004



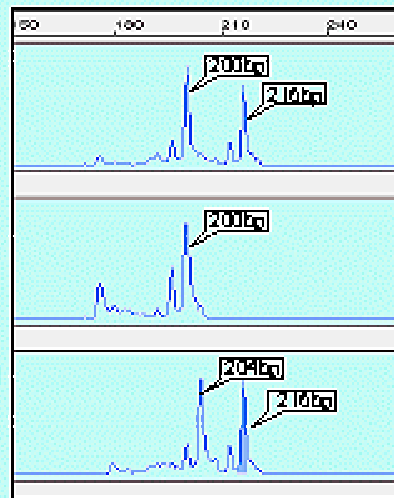
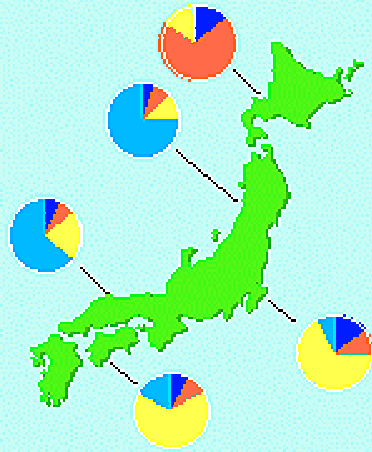
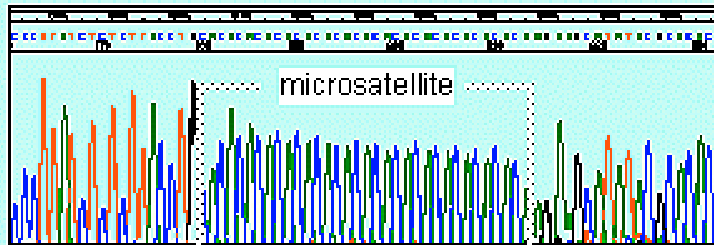
Molecular Markers, Natural History, and Evolution

Second Edition



JOHN C. AVISE



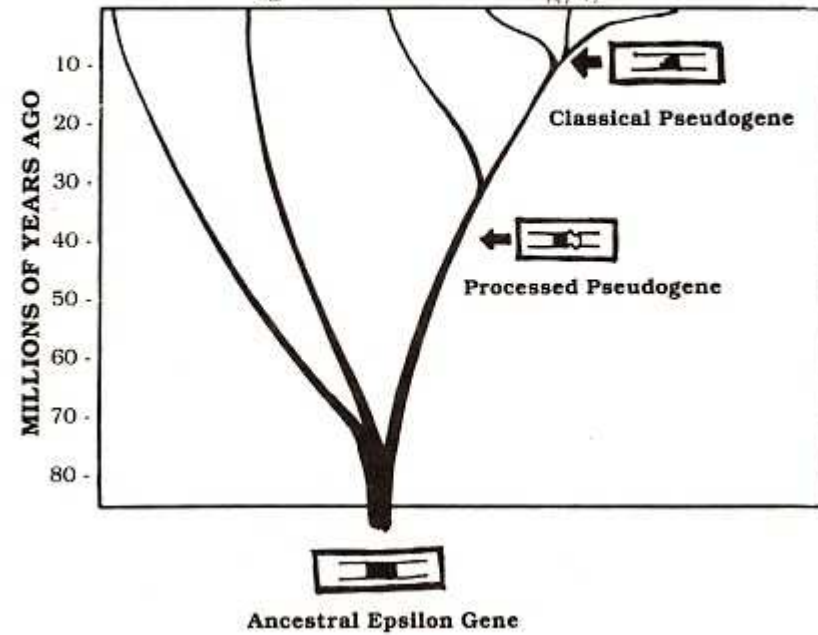
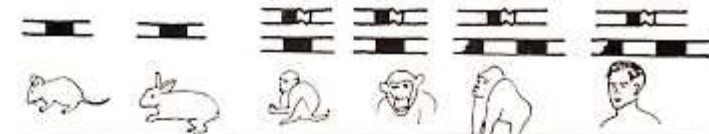


Genotype

200/216

200/200

204/216



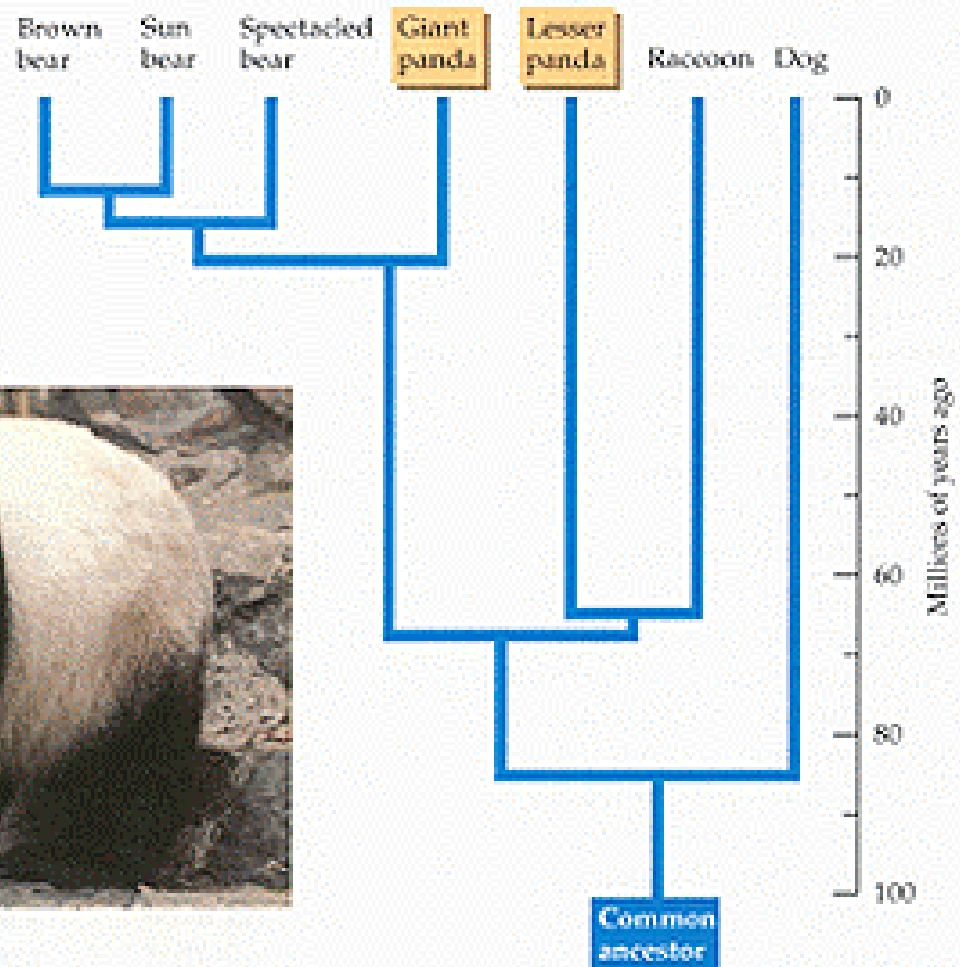


Ailurus fulgens
(lesser panda)



Ailuropus melanoleuca (giant panda)

22.9 The Giant Panda Is a Bear The DNA hybridization data used to construct the cladogram indicate that the giant panda of Asia is a bear. The lesser panda, also of Asia, was long thought to be closely related to the giant panda, but it is actually more closely related to raccoons and their allies of the Americas.

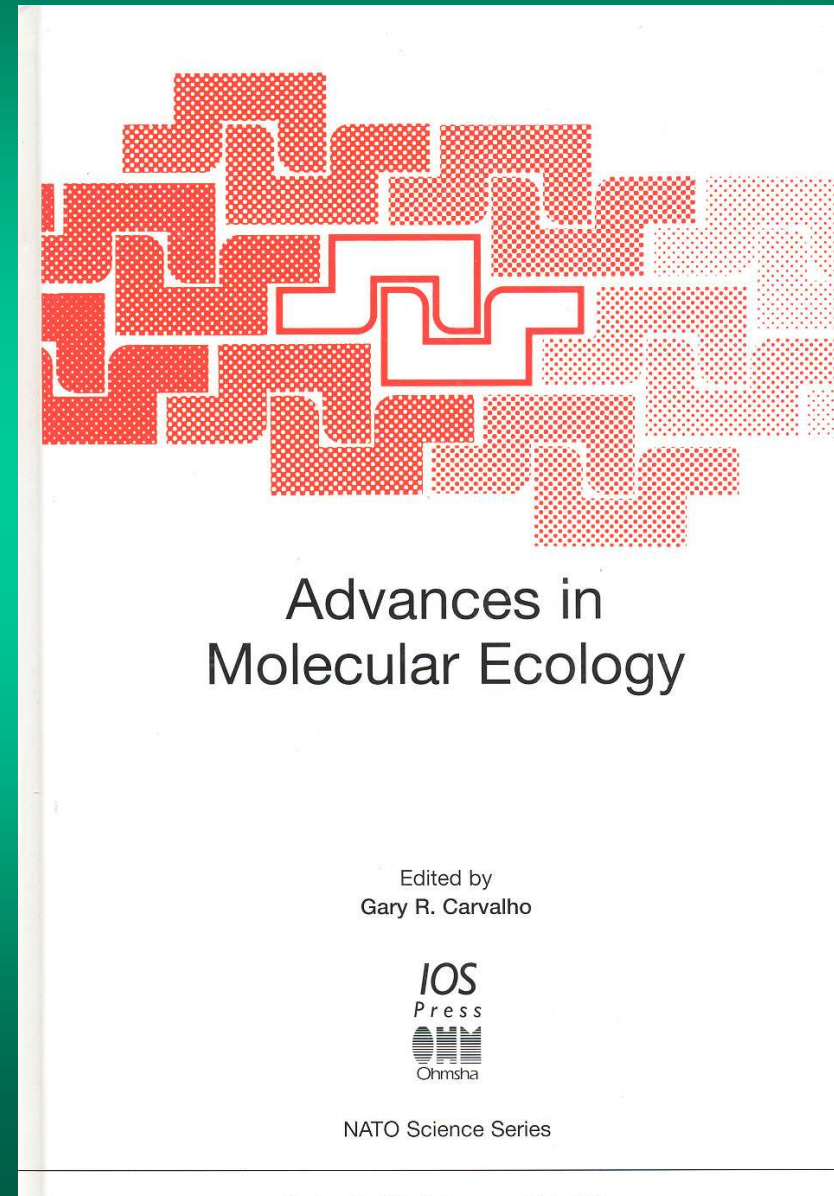


Molekulárna ekológia

– využitie molekulárno-genetických markerov na štúdium ekológie a evolúcie.

určovanie príbuzenských vzťahov
medzi organizmami,
populáciami,
druhmi,
i vyššími taxónmi

– metodicky čerpá
z populačnej genetiky a
molekulárnej systematiky



OXFORD



AN INTRODUCTION TO

MOLECULAR ECOLOGY

TREVOR BEEBEE
GRAHAM ROWE



Konzervačná biológia

Acinonyx jubatus
(the African cheetah)

žiadna genetická
variabilita:
fyziologické abnormality,
vysoká úmrtnosť
potomstva, precitlivosť
k infekciám, na strane
druhej bezproblémová
transplantácia kože

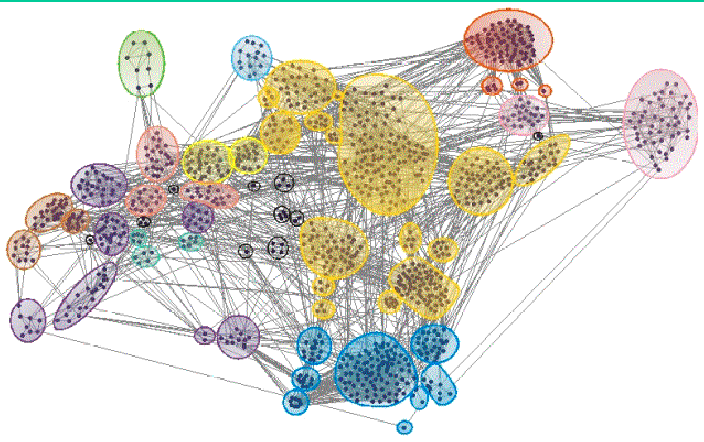
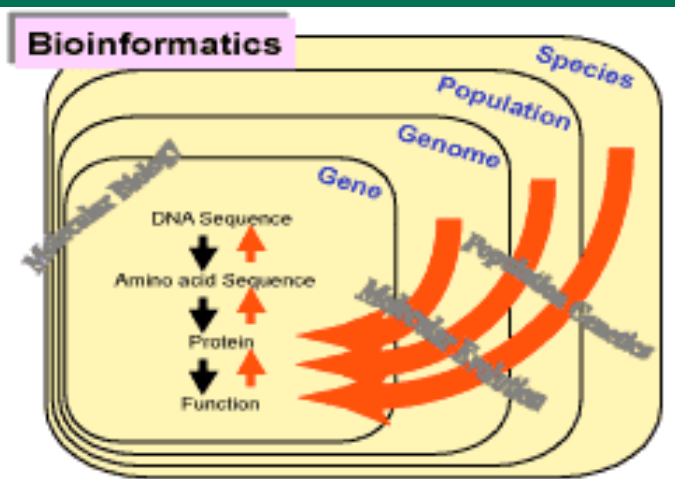
Porovnávacia genomika

Od roku 1995 sa začína písať história ďalšej novej biologickej disciplíny, ktorá sa nazýva komparatívna (porovnávací) genomika. Porovnávanie úplných zápisov genetickej informácie organizmov.

baktéria *Haemophilus influenzae* (1,83Mbp) (Mbp = milión párov báz) a *Mycoplasma genitalium* (0,58Mbp), zástupcovia domény Bacteria.

Vzápätí k nim pribudla znalosť úplného zápisu genetickej informácie eukaryotického organizmu, kvasinky – *Saccharomyces cerevisiae* (13,5Mbp) (doména Eukarya).

Rok 1996 – údaj o kompletnom genóme hypertermofilného archeónu *Methanococcus jannaschi* (1,66Mbp), predstaviteľ domény Archaea.

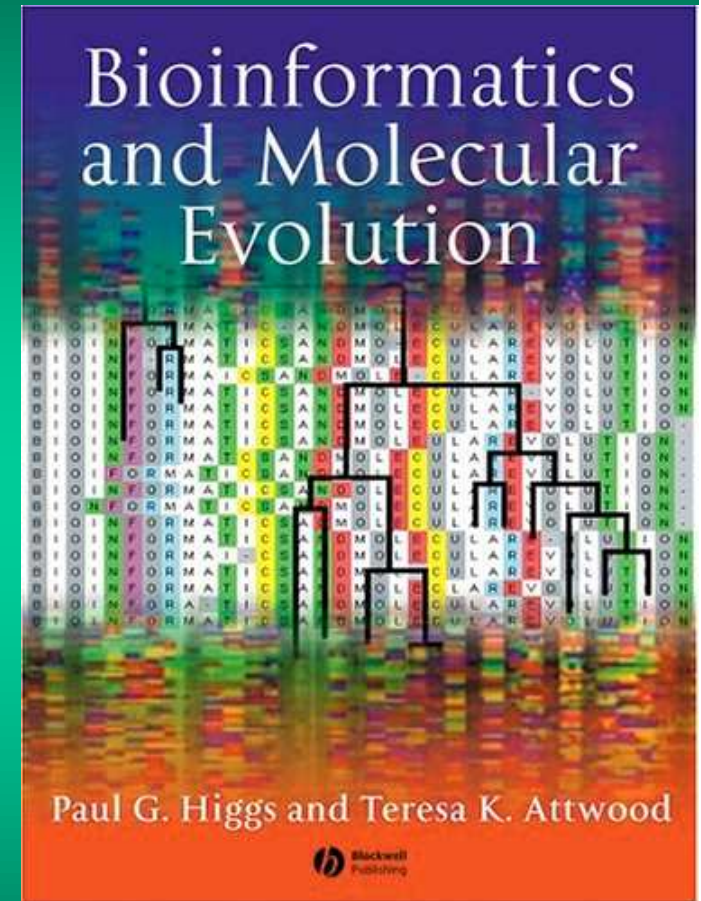


Obrovský nárast úplných sekvencií nukleotidov z genómov rôznych organizmov.

Na stránkach najprestížnejších prírodovedeckých časopisov sa stále vedú diskusie o význame týchto poznatkov pre modernú biológiu.

Hoci hnacou silou porovnávacej genomiky sú hlavne biotechnologické pohnútky s očakávanými výstupmi do humánnej medicíny

Najväčší podiel zo spoznaných genómov pripadá na bakteriálne patogény človeka, očakáva sa, že nové poznatky významným spôsobom ovplyvnia aj názory na evolúciu organizmov.



Grab File Edit Capture Window Help

VMD Main

File Molecule Graphics Display Mouse Extensions Help

ID	T	A	D	F	Molecule	Atoms	Frames	Vol
0	T	A	D		1LHS (Loggerhead Sea	2731	1	0
1	A	D	F		1MBA (Sea Hare)	2552	1	0
2	A	D			1MBC (Sperm Whale)	2943	1	0
3	A	D			1MBS (Common Seal)	2945	1	0
4	A	D			1MYT (Yellowfin Tuna)	2539	1	0
5	A	D			1WLA (Horse)	2706	1	0

0 | zoom | Loop | step | 1 | speed

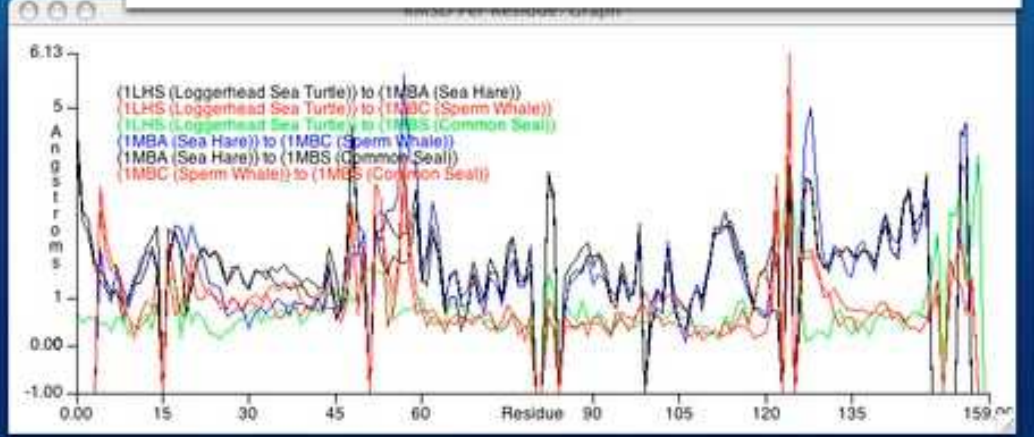
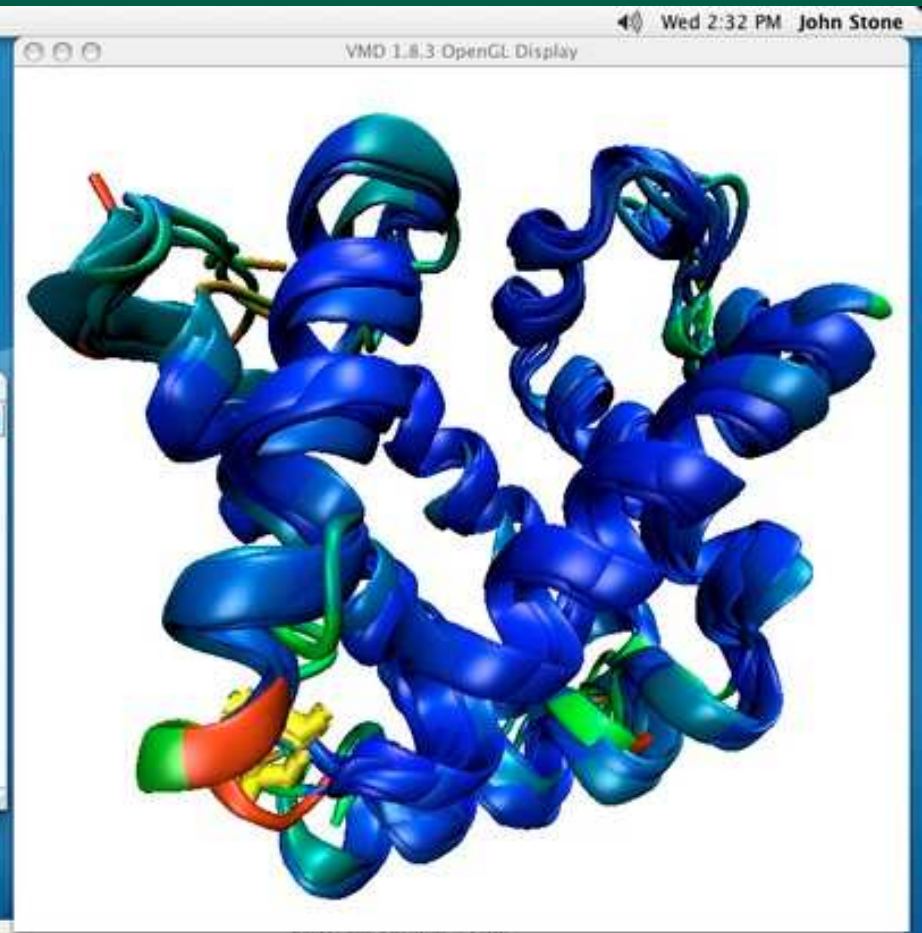
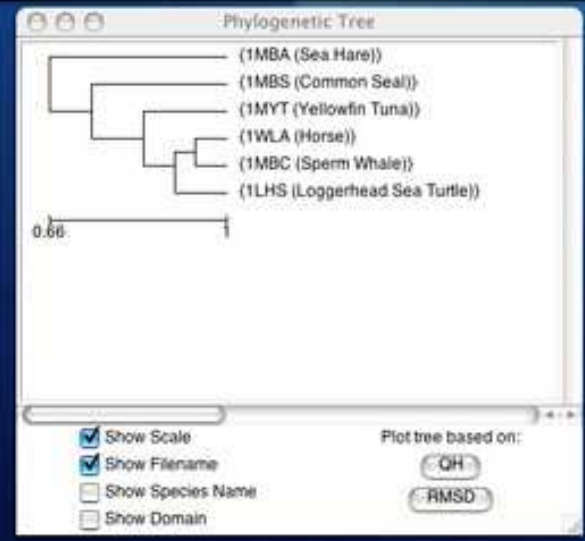
Multiple Alignment

File Tools Alignment View Help

Sequence Display

```

(1LHS (Sea Turtle))  EPETQERFASVPEGLTTIDALEKSSERVRRKQTVVITALGRILKQE--IS-XEQLA
(1MBA (Sea Hare))   PFDGAMFFADFFGKS-VNDIKASPELKNVSDRPTFKLSEFVINAAGAGNSAMLD
(1MBC (Sperm Whale)) EPETLERVDRPEKLETEADGKAGELLRKGVIVITALGAILKKE--GK-XEARLR
(1MBS (Common Seal)) EPETLEKFDKPEKLESEDDGQSDGKXQSTVITALGQILKKE--GK-XEARLR
(1MYT (Yellowfin Tuna)) EPETQKLPFPEFAGIA-GADINQAAIIRAGATVLRKLGELAAK--GK-XAATLR
(1WLA (Horse))      EPETLEKFDKPEKLETEADGKASERDLKQNTVVITALGAILKKE--GK-XEARLR
  40 + 50 + 60 + 70 + 80 + 90
  
```



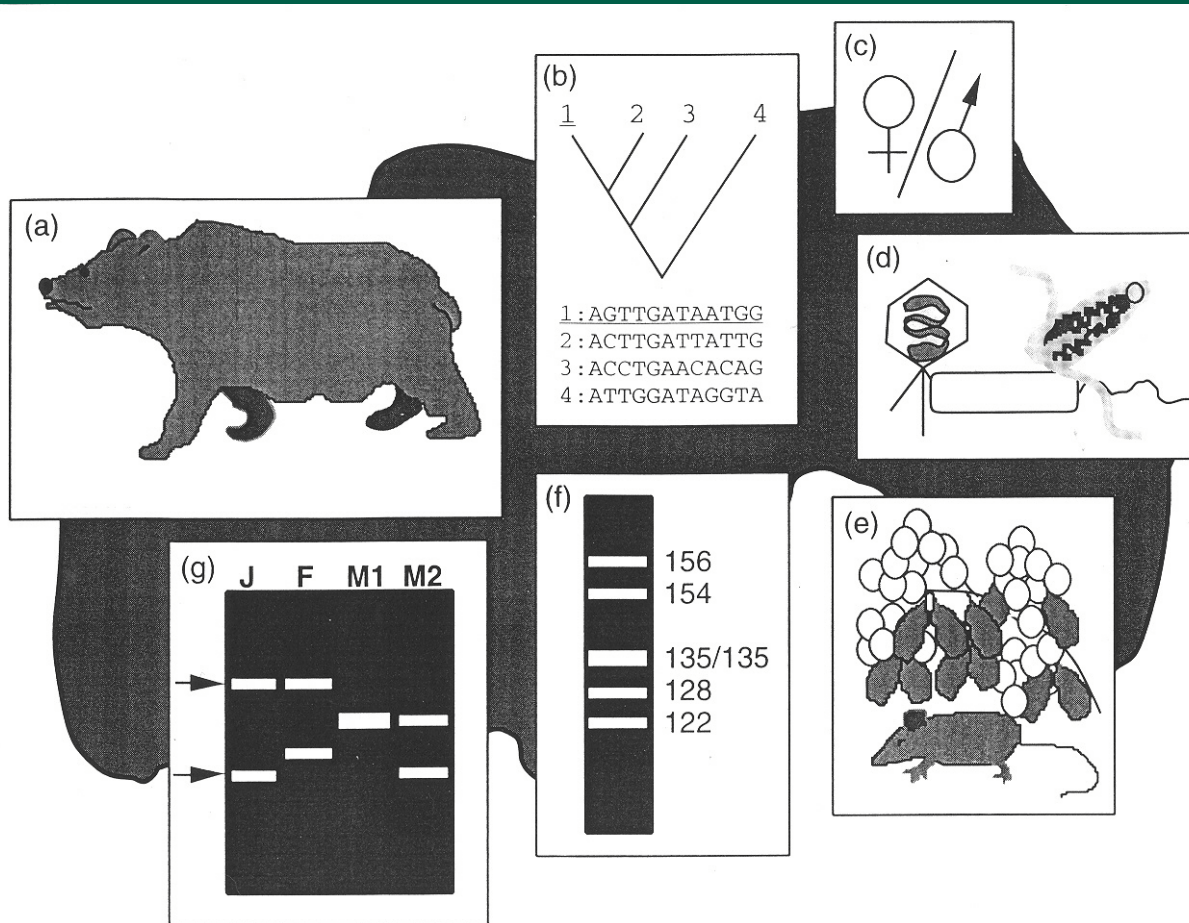
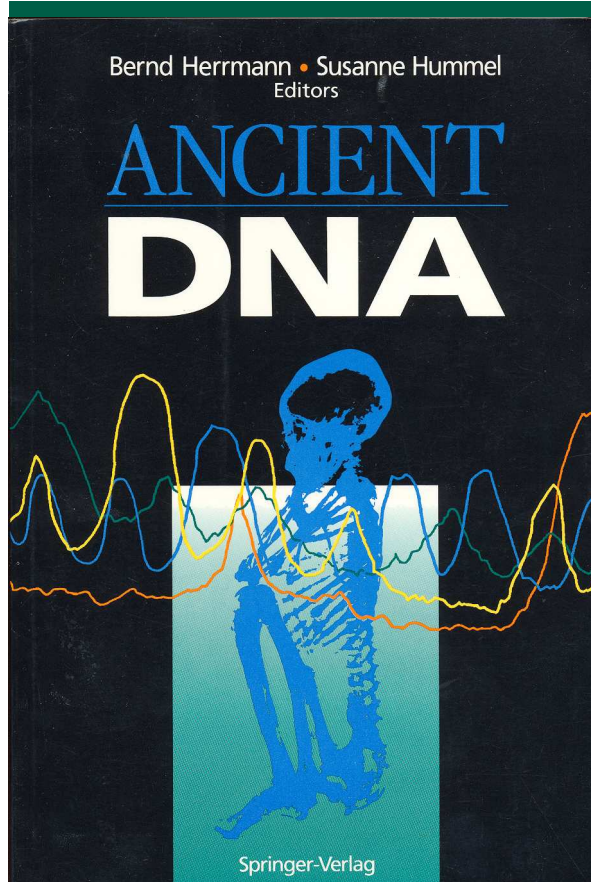


Fig. 1. A fecal sample collected in the field can be analyzed in many different ways. Recently-introduced molecular techniques (molecular scatology) allow the isolation and analysis of DNA from feces and thereby provide genetic and life history information on individuals. (a) mtDNA sequencing (e.g. cytochrome *b*) allows the animal species (in this case, *Ursus arctos*) to be identified; (b) mtDNA analysis reveals the phylogenetic relationship of the individual (underlined) to other species or conspecifics; (c) the sex can be determined using primers specific for the mammalian Y chromosome; (d) pathogen sequences (viruses, bacteria, protists, macroparasites) can be identified through amplification by strain-specific primers; (e) plant and animal food items revealed using species-specific plant chloroplast primers (e.g. *rbcL*) or animal mtDNA primers (e.g. from cytochrome *b*). Individuals can be fingerprinted through microsatellite typing, and population size, genetic variation, kinship and paternity can be deduced through extensive microsatellite genotyping of feces collected throughout an area, for example, see (f) and (g). (f) shows a multilocus microsatellite fingerprint. In (g), male 1 (M1) shares an allele with male 2 (M2), but M1 can be excluded as father of the juvenile (J). The female parent is indicated by F.

Molekulárna Scatológia – vzorky exkrementov zozberané v teréne sa analyzujú rôznymi spôsobmi pomocou techník molekulárnej biológie



Molekulárna paleontológia

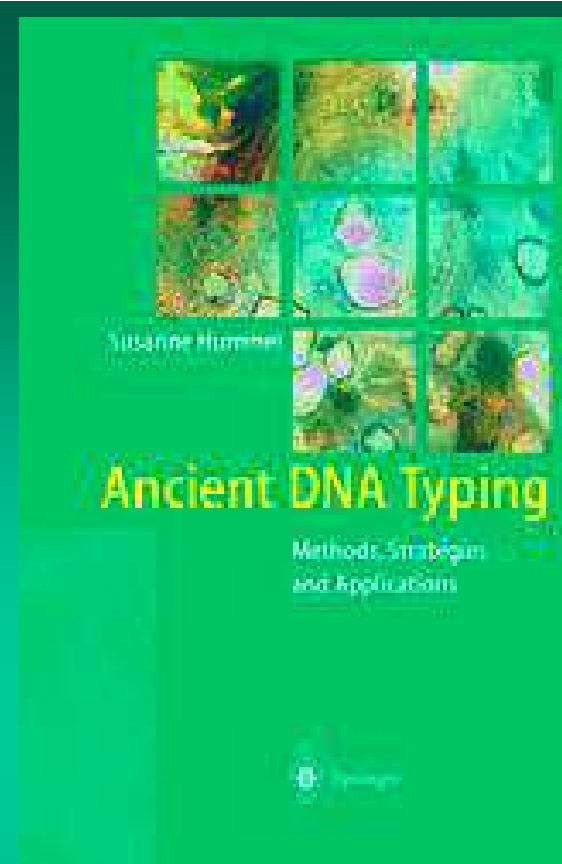
Molekulárna antropológia

Molekulárna archeológia

Molekulárna múzeológia

Molekulárna egyptológia

Molekulárna speleológia



Starodávna DNA poskytuje úplne nový pohľad na evolúciu.

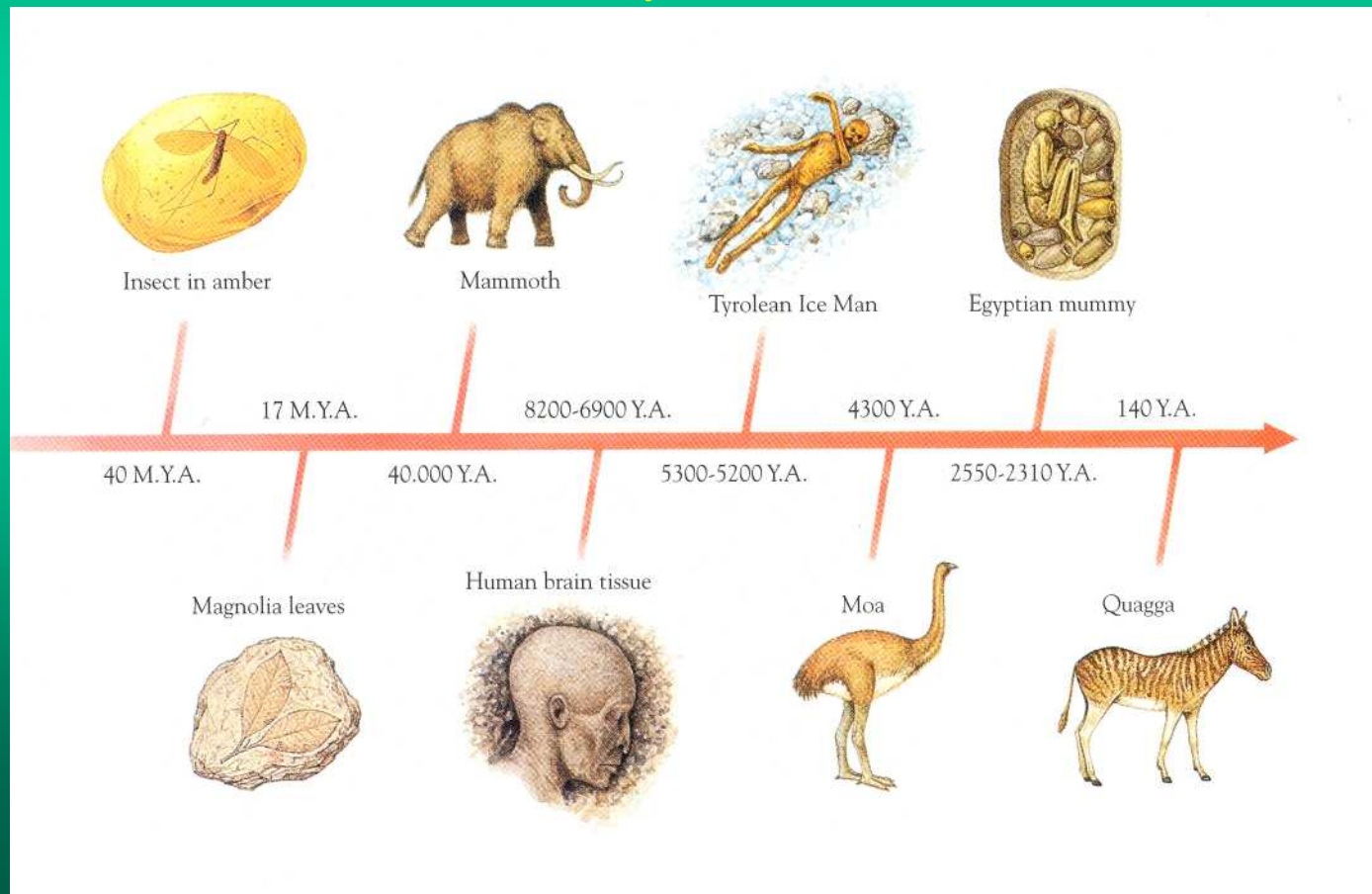
Po prvýkrát umožňuje analyzovať viacero aspektov mikroevolúcie a populačnej genetiky v reálnom čase.

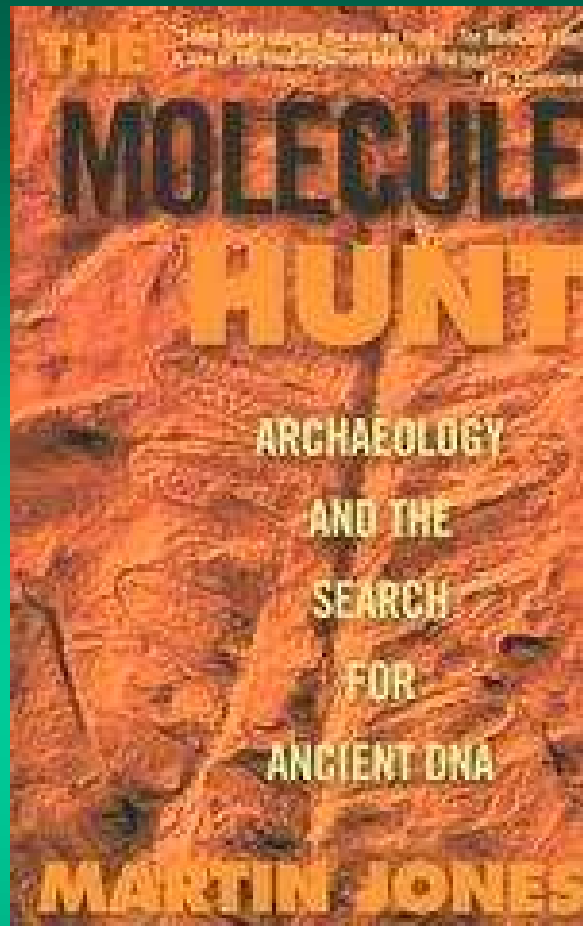
Nosným nástrojom molekulárno-biologickej analýzy historického biologického materiálu je technika polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá umožňuje analyzovať minimálne množstvá východiskového materiálu.

STARODÁVNÁ DNA

Ancient DNA– historická, prastará DNA

Termín sa používa na označenie procesov a postupov spätých so získavaním a analýzou genetického materiálu z paleontologických a archeologických nálezov, muzeálnych exponátov, herbárov (niekedy aj klinických vzoriek).





V súčasnosti najčastejšími príkladmi využitia starodávnej DNA je **štúdium makroevolúcie – rekoštrukcia evolučnej histórie vyhynutých druhov organizmov** (neandertálci, zebrovitá quagga, vták moa, mamuty, jaskynné medvede), alebo **opätovné preskúmanie problémov donedávna dostupných len cez štúdium morfológie fosílií.**

Starodávna DNA môže byť použitá na **kalibrovanie molekulárnych hodín** bez potreby spätosti s kalibráciou pomocou ďalších fosílií.



Jedným z najvýznamnejších aspektov výskumu starodávnej DNA je otázka kontaminácie modernou DNA (zo súčasných organizmov).

Problém je kľúčový hlavne pre analýzu ľudského materiálu. Takmer všetky archeologické nálezy sú kontaminované DNA archeológov, kurátorov múzeí a pod.

Otázka autenticity získanej DNA – požiadavka dodržiavania veľmi prísnych pravidiel pri práci – ochranné pomôcky, špeciálna ventilácia, izolované priestory a pod.

Analýza pradávnych patogénov je veľkým príslubom – vysoké evolučné rýchlosti pri patogénoch – test, či získaná sekvencia je naozaj pradávnou, odlišnou od sekvencie zo súčasných mikroorganizmov).



Ancient Biomolecules Centre
at Oxford University





Úspešnosť analýzy spravidla klesá úmerne veku vzoriek – absolútny vek fosílií však nie je jediným limitujúcim faktorom.

Veľký význam má **zloženie, vlhkosť a teplota prostredia**, v ktorom sa materiál uchoval.

Priebeh PCR reakcie môže inhibovať celý rad látok, napr. hém, cytochrómy a iné porfyríny, fenolické látky, polysacharidy, ale aj humínové kyseliny, ktoré sa nachádzajú vo všetkých typoch pôd, resp. asfalt používaný pri mumifikácii v starom Egypte.

Na opak, **iné látky**, napr. albumín hovädzieho séra, **blokujú činnosť inhibítorov PCR reakcie.**

Preto neprekvapuje, že oblasť výskumu starodávnej DNA nielen využíva najnovšie molekulárno-biologické metódy, ale zároveň aj prispieva k ich ďalšiemu rozpracovávaníu.





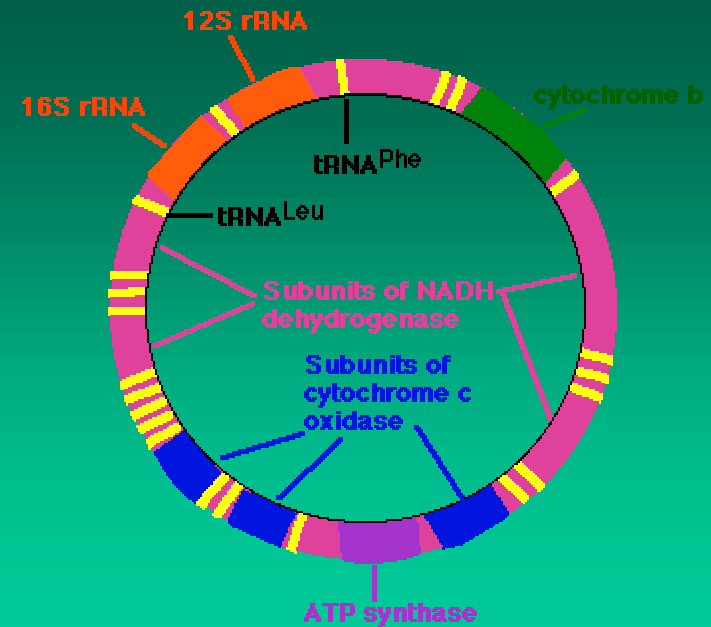
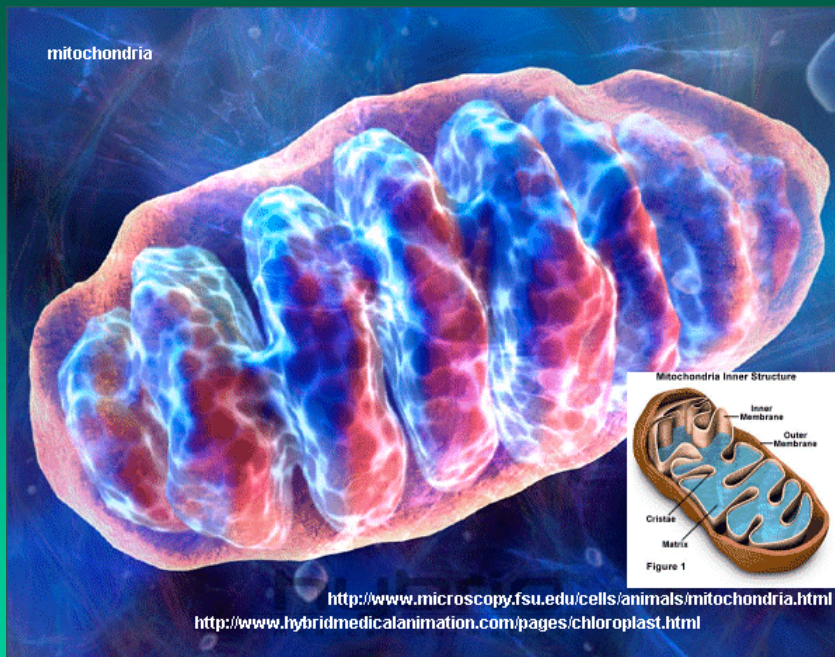
Hranice úspešnej analýzy – **vek vzoriek približne stotisíc rokov** (v závislosti na podmienkach uloženia).

Existujú však pokusy analyzovať aj biologický materiál, ktorého vek je vyšší (až niekoľko miliónov rokov).



Tento sa však musel zachovať v špeciálnom prostredí, najčastejšie uviazol v **živiciach** dávnych stromov a spolu s nimi bol fosilizovaný (**jantár**).



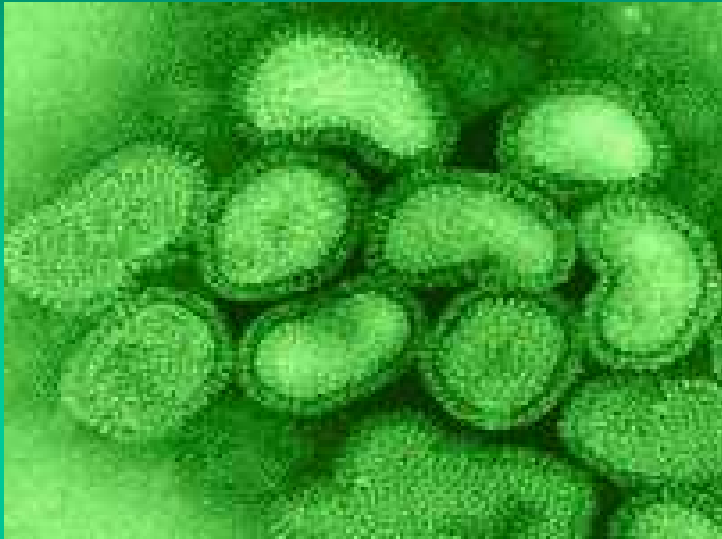


Úspešnosť PCR analýzy starodávnej DNA závisí aj od počtu kópií príslušných génov.

V jadre lokalizovaná genetická informácia je spravidla prítomná len v malom počte kópií (dve pri diploidných organizmoch).

Na strane druhej genetická informácia sa v **mitochondriách** a v **plastidoch** nachádza vo veľkom počte kópií (niekoľko sto až tisíc). Z tohto dôvodu pravdepodobnosť jej rekonštrukcie je oveľa vyššia. Štúdium **mitochondriových génov/genómov** z mŕtvych tel organizmov predstavuje doposiaľ najrozšírenejší typ analýz na poli starodávnej DNA.

Údaje o rýchlosti a spôsobe evolúcie sekvencie patogénov získané analýzou strodávnej DNA rozširujú naše vedomosti o minulosti a budúcnosti ochorení – ich evolúcii (napr. rekonštrukcia vírusu španielskej chrípky).



6,000,000 DEATHS FROM INFLUENZA

This Is Estimate For World, For Past 12 Weeks:

RECALLS BLACK DEATH

"Flu" Five Times Deadlier Than World War.

LONDON, Dec. 19.—Canadian Press, via Reuter's.—The Times' medical correspondent says that it seems reasonable to believe that about 6,000,000 persons perished from influenza pneumonia during the past 12 weeks. It has been estimated that the war caused the death of 20,000,000 persons in four and a half years.

Thus, the correspondent points out, influenza has proved itself five times deadlier than war, because, in the same

INFLUENZA DEATH RATE IN ONTARIO

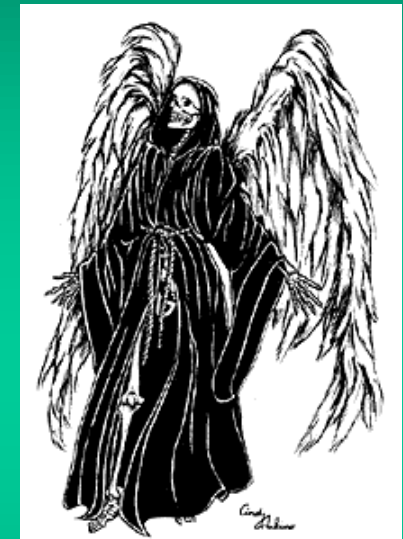
London's Fatality List 329 per 100,000 of Population.

Statistics compiled by Dr. J. W. B. Macdonald, chief officer of health for Ontario, indicate that in none of the cities in this province was the death rate from Spanish influenza and complications as great as in the United States cities. Toronto's death rate is given as 327 per 100,000. Kingston was the highest in Ontario, the rate being 642 per 100,000. Winnipeg suffered the most of any Canadian city, according to the figures now available. The death rate in that city was 714 per 100,000.

Camp Sheridan, Ont., where 23,000 soldiers were encamped, had the heaviest death rate of all, it being 2,851 to 100,000 of population.

The figures, which cover an approximate period of six weeks, are:

City	Deaths from Influenza and Complications, 1918	Death Rate per 100,000 Population
Fort William	45	218
Sault Ste. Marie	41	219
Ottawa	270	181
Port Arthur	20	106
Windsor	142	642
Kingston	187	327
London	1,600	327
Toronto	136	326
St. John, N.S.	136	326
Winnipeg	133	422
Halifax	133	322
Hamilton	133	322
United States Figures		
Boston	2,344	721
Pittsburg	2,854	721
Philadelphia	12,627	821
Washington	11,624	821
Camp Sheridan, O.	2,851	2,851
New York	22,450	400

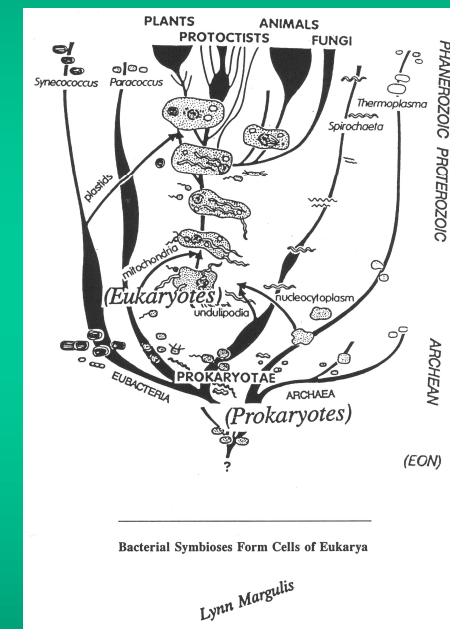
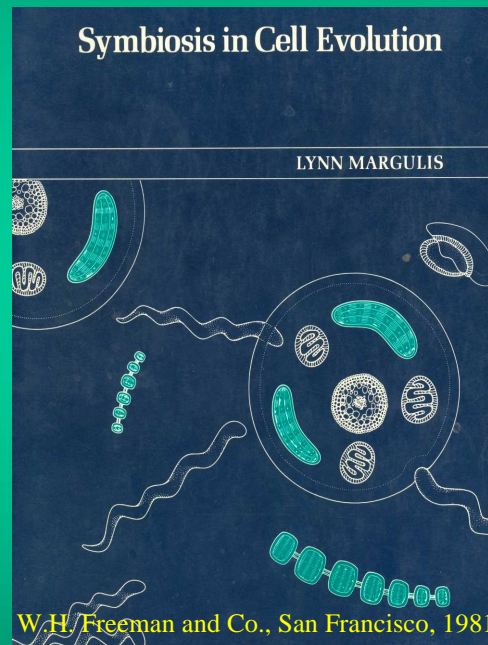


Newspaper articles during the Spanish flu pandemic of 1918 – the worst pandemic in modern times – a disease that killed 22 million people worldwide by 1922.

The viruses of the bird flu and Spanish influenza are indeed alike. Scientists found out that the Spanish influenza genes have a clear avian origin. But the bird flu is unlikely to kill off half of Europe, like Spanish influenza did for one simple reason. At the beginning of the 20th century there were no antibiotics and people were treated with home remedies. These days, the healthcare industry is well equipped to fight the influenza virus with modern methods.

Pôvod a evolúcia eukaryotickej bunky

Endosymbiotické spolužitie prokaryotických buniek ⇒
nová biologická entita – **eukaryotická bunka**



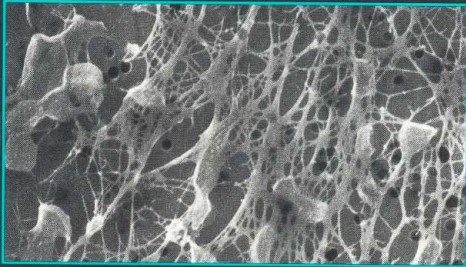
mitochondrie a plastidy – bunkové organely s vlastnou
DNA a proteosyntetickým aparátom

Endosymbióza ako východisko eukaryotického stavu

Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology
Ralph Mitchell, Series Editor

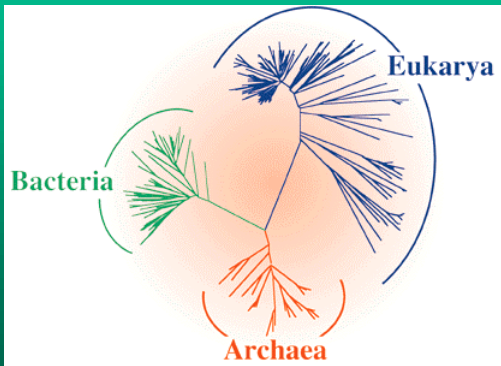
EXTREMOPHILES

MICROBIAL LIFE IN EXTREME ENVIRONMENTS

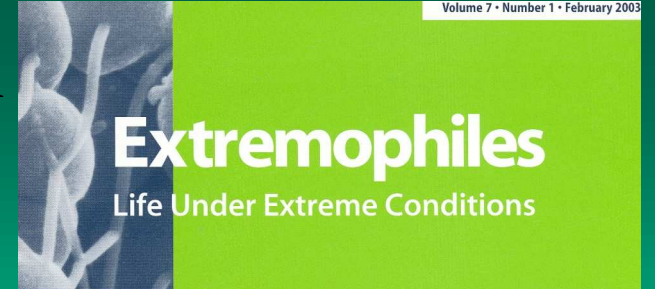


Edited by

**KOKI HORIKOSHI
WILLIAM D. GRANT**



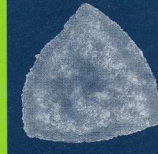
Život v extrémnych podmienkach



Extremophiles

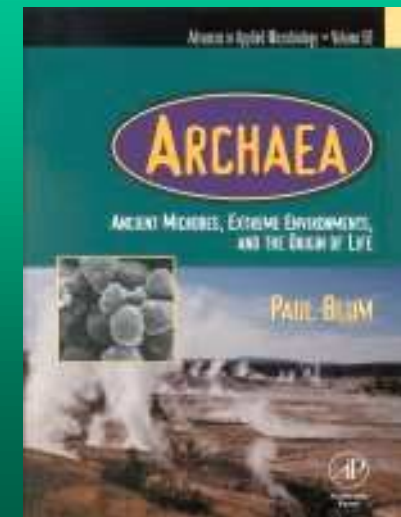
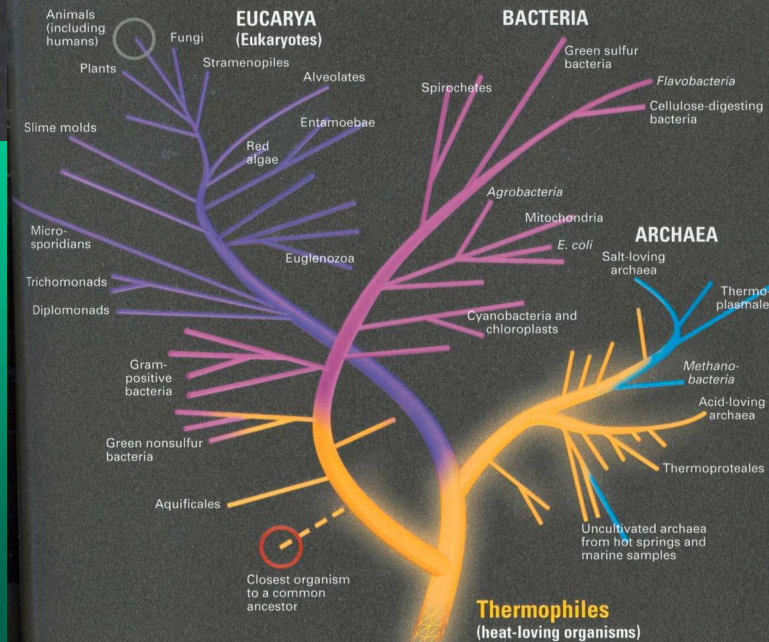
Life Under Extreme Conditions

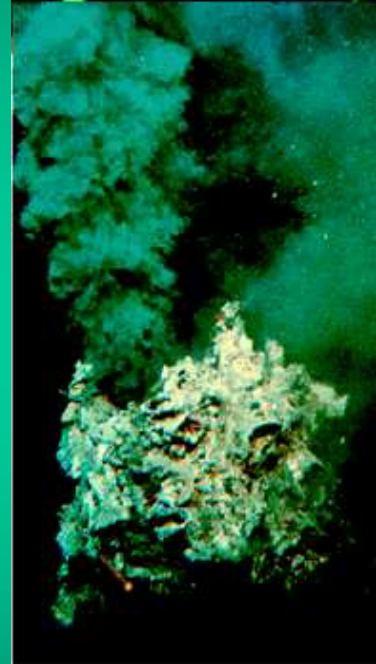
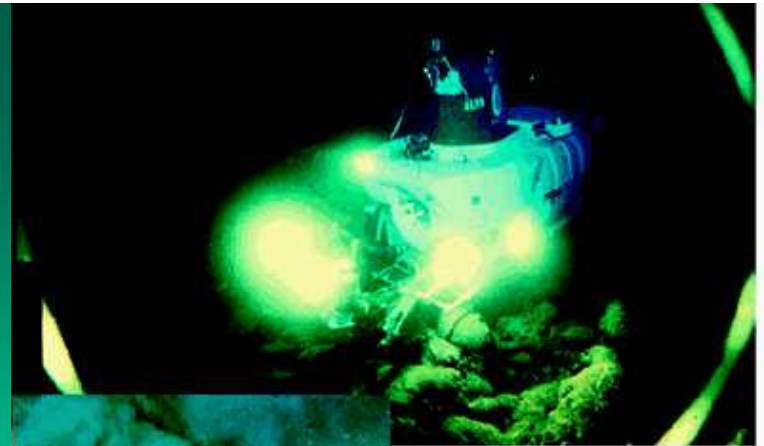
Official organ of
the International
Society for
Extremophiles



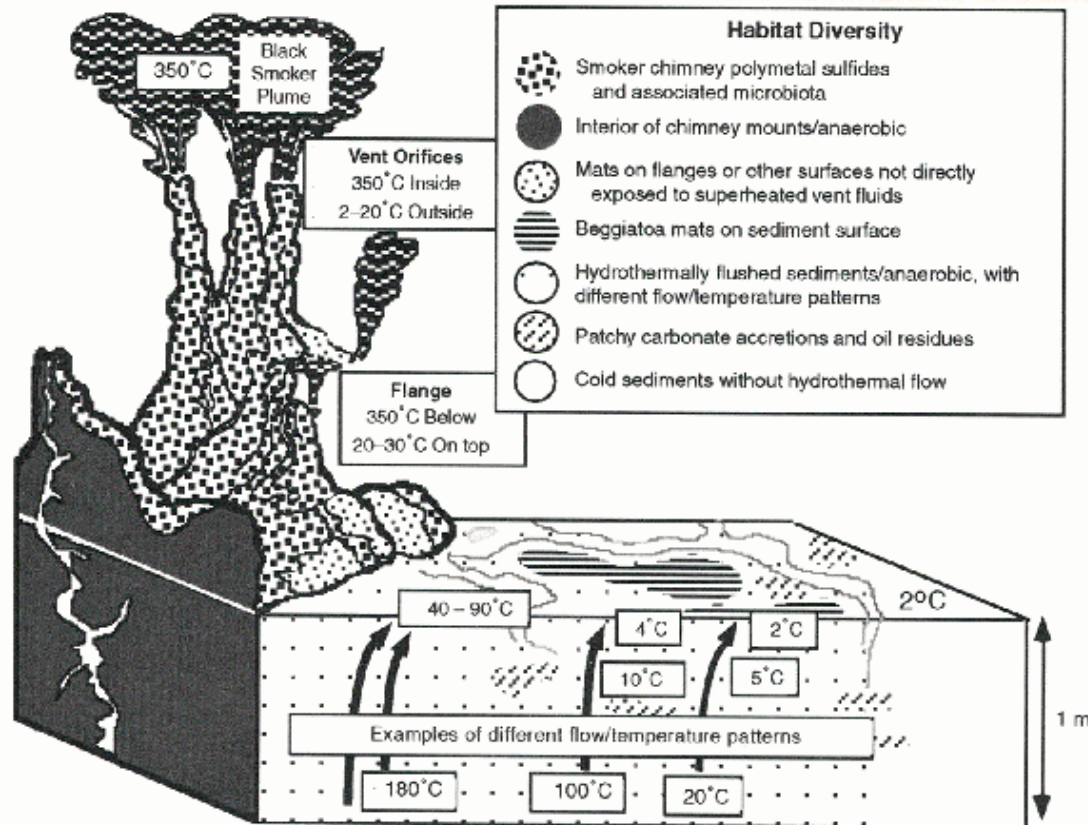
Springer

Online First
Immediately Online
<http://link.springer.de/link.springer.de>
fast publication





Microbial Habitat Diversity at Hydrothermal Vent Sites



Hydrothermal Vent Black Smoker 21^N as seen from the WHOI Submersible *Alvin*—Essential for sampling hydrothermal vent sites.

THERMOPHILES
The keys to molecular evolution and the origin of life?



Edited by Juergen Wiegand and Michael W. W. Adams

Also available as a printed book see title verso for ISBN details

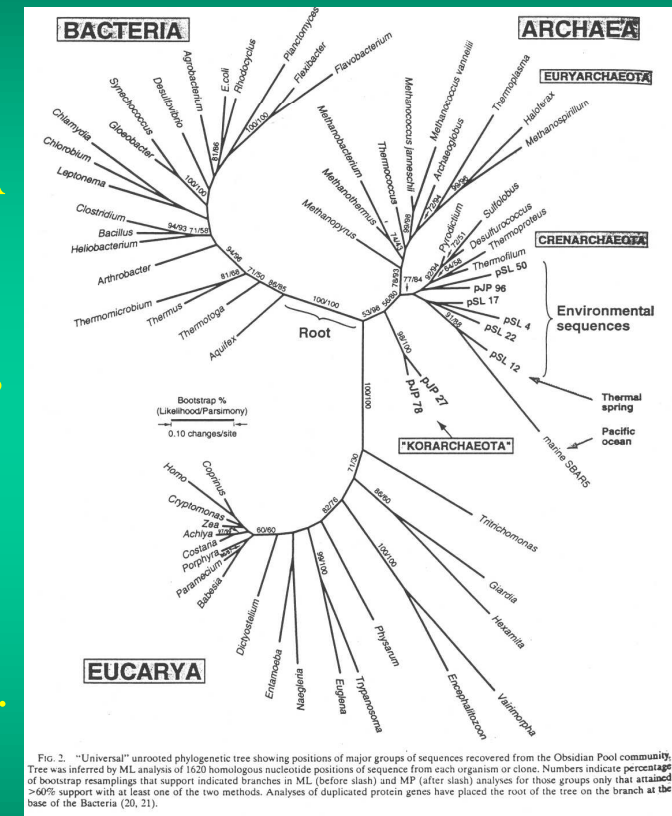
Život v extrémnych podmienkach (na Zemi; i mimo nej?)

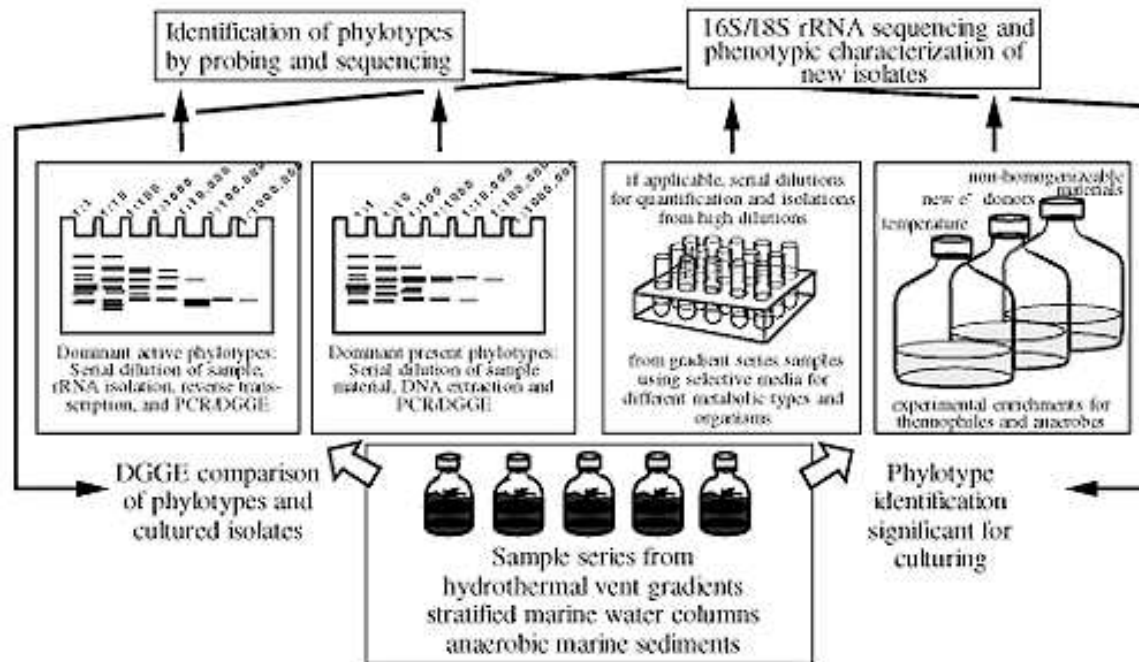
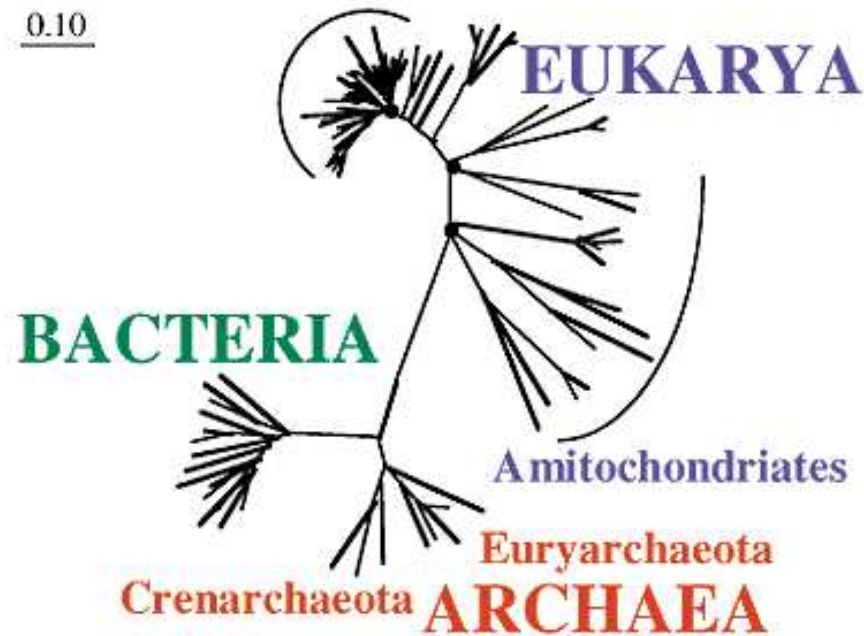


voda na **Marse** a mesiacoch **Jupitera** Európa a Callisto

Umiestnenie tzv. environmentálnych sekvencií z neznámych archeónov v nezakorenenej verzii univerzálneho fylogenetického stromu.

Dendrogram je skonštruovaný na základe porovnávania rozdielov v sekvencií nukleotidov v ribozómových RNA z malých ribozómových podjednotiek. Environmentálne sekvencie sa získali pomocou techniky PCR a univerzálnych primerov pre zástupcov domény Archaea, z celkovej DNA izolovanej z bližšie nedefinovanej biomasy z rôznych stanovišť. Predstavujú rRNA z doposiaľ bližšie neurčených archeónov, ktoré sa zatiaľ nepodarilo kultivovať. Environmentálne sekvencie sú označené číselným a písmenovým kódom (napr. pSL22). pJP 27 a pJP 78 sú svojim sekvenčným zložením najbližšie k bodu vetvenia všetkých troch domén, resp. koreňu fylogenetického stromu. Tieto sekvencie vytvárajú hypotetickú skupinu archeónov nazvanú "Korachaeota", do ktorej by mohli patriť teoreticky najstarobylejšie organizmy (podľa Barns *et al.* 1996)





Záverečné zhrnutie

Molekuly ako živé kroniky

Molekulárna biológia podstatným spôsobom rozširuje paletu nástrojov, ktorými je možné analyzovať príbuzenské vzťahy medzi organizmami v súčasnosti i ďaleko do minulosti.

Molekulárna biológia prestupuje všetkými oblast'ami biológie a významne tým ovplyvňuje nielen skúmanie života, ale i život sám.