

ОТ ЛУКА ДО ЛЕКА И ДО РОДОСЛОВНОТО ДЪРВО НА ЖИВОТА

Доц. д.п.н. Здравка Костова

Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Резюме. Анализират се съвременни изследвания на ранната микробна еволюция от ЛУКА (последният общ универсален родоначалник) до установяването на двата клона на империя Прокариота – Археи и Бактерии. Обсъждат се основните етапи и фактори на биохимичната, физиологичната и биологичната еволюция на ацетогени и метаногени и ролята на генетичната дивергенция и естествения отбор за създаване на многообразие от микроорганизми. Направен е опит да се представят различни виждания за произхода на ядрото и на останалите клетъчни компоненти, свързани с еволюцията на еукариотната клетка.

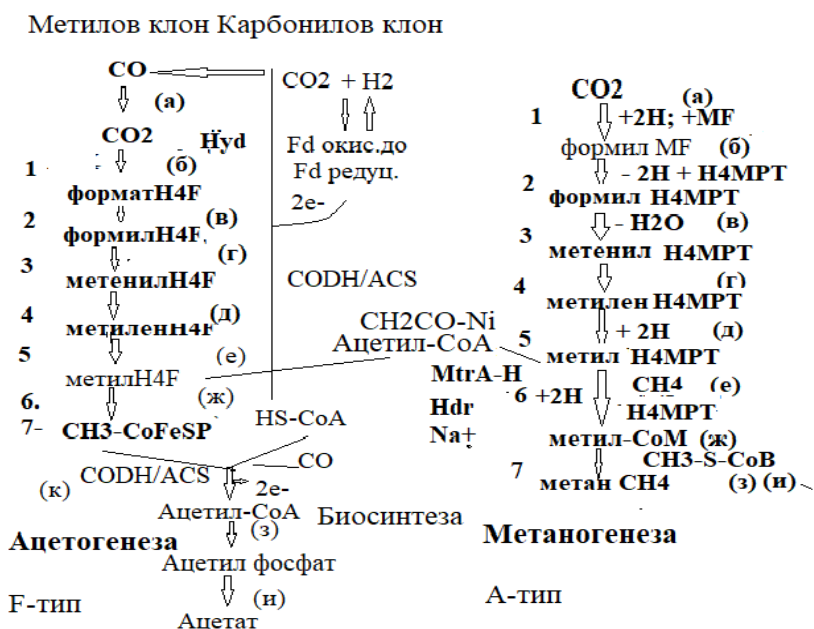
Ключови думи: ацетогенеза; метаногенеза; археи; бактерии; метаболизъм на прокариоти; ЛЕКА; хоризонтален генен трансфер; произход на еукариоти; ендосимбиоза

Еволюция на прокариоти

Праклетките на ЛУКА (последният общ универсален родоначалник на всички живи организми) са били прости термофилни прокариоти, имали са рибозоми в цитоплазмата и гени с интрони в генетичната си организация, използвали са автотрофен метаболитен път на ацетил-КоА и хемиосмоза в клетъчната мембрана. Интроните са съдействали за появата на нови и сложни гени чрез рекомбинация (разбъркване на екзоните). Подложен на естествен отбор, първичният геном се е превърнал в компактен прокариотен геном без сплайсозома и интрони, способен на бърза репликация (Martin & Sousa 2016).

Как от прокариотния геном на ЛУКА са възникнали два клона, класифицирани в две царства – Бактерия и Археа (предишни названия Еубактерии и Археобактерии) към надцарство (империя) Прокариота? Отговор на този въпрос се търси чрез сравняване метаболизма на най-древните съвременни организми – ацетогени и метаногени, които са поставени в основата на еволюционното дърво съответно на археите и на бактериите. Те са анаеробни автотрофи с най-простата физиология, използват ацетил-КоА метаболитен път, редуцират CO_2 и H_2 , съответно до метан (CH_4) и ацетат (CH_3COOH) и се срещат в алкалните хидротермални отвори (АХТО). Въглеродният и енергийният им метаболизъм се катализират от преходни метали.

При **ацетогенните бактерии** метаболизмът се осъществява в 6 последователни стъпки с помощта на ензими (фиг. 1, табл. 1). **1.** CO_2 се редуцира с помощта на форматдехидрогеназа до *формат* в присъствието на редуциран фередоксин и редуциран никотинамид динуклеотид (НАДН) (Thauer 1973). Фередоксинът (Fd) се редуцира с енергията от окисляването на H_2 по метода на електронната бифуркация. Водородът е източник на e^- , а фередоксинът е техен акцептор и преносител до НАД^+ . Свързващото място за превръщане на енергията е Rnf (Fd-NADP-оксидоредуктаза). Фередоксините са малки протеини, съдържащи 1 или 2 кълъстера от Fe-S. Те участват в електронотранспортни вериги като носители на електрони с нисък редокспоенциал. В електронната бифуркация са свързани с ензима хидрогеназа. Реакцията е важна за образуването на C_1 съединения. **2.** Форматът реагира с тетраhydrofolat и образува *формилтетраhydrofolat*. Ензимът тетраhydrofolat синтетазата е специфична трансфераза с кофактор тетраhydroфолиева киселина (ФКН4), която пренася C_1 отломки (формилова- CHO и метилова- CH_3 група). Тя съдържа птеридинов пръстен. Тетраhydrofolatът ($\text{H}_4\text{F}=\text{THF}$) е производно на фолиевата киселина (Kosekova et al. 2004, 276). Изразходва се енергия от електронната бифуркация – $\text{АТФ} \rightarrow \text{АДФ} + \text{Фн}$. **3.** Формил-THF се преобразува в *метенил-THF* от ензим метенилтетраhydrofolat циклохидролаза (формил- $\text{THF} \leftrightarrow 5,10\text{-метенил-THF} + \text{H}_2\text{O}$). **4.** Метенил-THF преминава в *метилен-THF* с участието на ензим метилен тетраhydrofolat дехидрогеназа ($\text{НАДФН} + \text{H}^+ \rightarrow \text{НАДФ}^+$). **5.** Метилен-THF с ензим метилен тетраhydrofolat редуктаза ($\text{НАДН} \rightarrow \text{НАД}^+$) образува *метил-THF*. Изпомпването на Na^+ се задвижва от екзергонно прехвърляне на e^- от Fd на НАДФ^+ :оксидоредуктаза (наречена Rnf, преобразуващ енергия фередоксин). **6.** Метилевата група на метил- H_4F се прехвърля чрез CoFeSP в CODH/ACS , където се отделя *ацетил- CoA* . Реакцията се катализира от ензима метилтрансфераза. Метилтрансферазите са група ензими, които използват донори на CH_3 , най-често S-аденозил-1-метионин, за да метилират своите субстрати. Метилирането е от основно значение за контролиране на генната транскрипция. **7.** Бифункционалният ензим CODH/ACS редуцира CO_2 до CO в карбонилния клон и го свързва с CH_3 от метил клона и с CoA , за да образува ацетил- CoA – **изходно вещество за много биосинтезни реакции**. Фосфотрансацетилазата превръща ацетил- CoA в ацетилфосфат, който с помощта на фосфатацетилтрансферазата образува ацетат и включва енергията от натриевия мембранен потенциал на клетката в синтез на АТФ (ацетилфосфат + $\text{АДФ} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{АТФ}$) в ацетогените (бактерии от групата на клостридиите). Ацеталдехид дехидрогеназата превръща ацетил- CoA в алдехид, а алкохол дехидрогеназата съдейства за образуването на етилов алкохол от ацеталдехид.



Фигура 1. Сравнение на ацетогенеза и метаногенеза (Martin, Sousa, 2016)

Таблица 1. Обяснения към фиг. 1:

I. Ацетогенеза	II. Хидрогенотрофна метаногенеза
1. формат дехидрогеназа;	1. формилметанофуран дехидрогеназа;
2. формилтетраhydrofolat синтеза;	2. формилтрансфераза;
3. метенил тетраhydrofolat циклохидролаза;	3. редуциране;
4. метилен тетраhydrofolat дехидрогеназа;	4. редуциране
5. тетраhydrofolat редуктаза;	5. редуциране с Co-F ₄₂₀ FeNi-зависима хидрогеназа;
6. метил трансфераза;	6. метилтрансфераза (екзоргенна реакция);
7. метилкоензимредуктаза;	7. метилкоензим редуктаза;
(а) редуциран CO ₂ до CO;	(а) MFR-метанофуран;
(б) +2e ⁻ , Rnf, ферредоксин:NADP ⁺ оксидоредуктаза	(б) H4MPT-тетраhydro-метаноптерин;
(в) АТФ до АДФ + Фн;	(в) отделяне на H ₂ O;
(г) Н ⁺ до Н ₂ O;	(г) и (д) редуциране с CoF ₄₂₀ ;
(д) НАДН до НАД ⁺ ;	(е) синтез на АТФ;
(е) Fd ред. до Fd окис.;	(ж) редуциране от CoB директно до метан (CH ₄) с участието на ензим (7);
(ж) CoFeSP+H ₄ P (тетраhydrofolat); Fd- ферредоксин; Нуд- хидрогеназа;	(з) образуване на CoM-S-S-CoB хетеродисулфид на коензимите М и В и разграждане с цитоплазмена хетеродисулфид редуктаза;
(з) фосфотрансацетилаза;	(и) Eha и Ehb енергопревърщащи хидрогенази; CODH/ACS – карбонмоксид дехидрогеназа/ ацетилкоензим синтеза; Hdr-хетеродисулфид редуктаза; MtrA-H, метилтрансфераза
(и) ацетаткиназа;	
(к) CODH/ACS бифункционален ензим	

При **хидрогенотрофните метаногени** (археи) редуцирането на CO_2 до CH_4 също се осъществява в 6 стъпки чрез ацетил-CoA или „W-L“ метаболитен път с помощта на поредица от ензими (фиг. 1, табл. 1). **1.** CO_2 се свързва с метанофуран (хетероциклено органично съединение) и по този начин се редуцира до формилова група като се образува N-формилметанофуран (CHO-MFR). Реакцията ($\text{CO}_2 + 2\text{H} + \text{MFR}$) е ендоргонична, катализира се от формилметанофуран дехидрогеназа и се задвижва от електрохимичния йонен градиент през мембраната (Schlegel & Muller 2011). Формил-MFR дехидрогеназата е желязо-серен протеин, който съдържа простетична група от метаноптерин (MPT) динуклеотид и молибден или волфрам. Вероятно е свързан с мембраната и има няколко различни субединици. Редуциран фередоксин (Fdred) приема електрони от H_2 и преминава в окислен фередоксин (Fdox). **2.** Формиловата група се прехвърля в тетрахидрометаноптерин ($\text{H4MPT} = \text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}$) – коензим на формилтрансферазата, който е открит в различни микроорганизми и участва в метаболизма на метилови и формилови групи (CH_3 и CHO). Образува се формилтетрахидрометаноптерин (CHON4MPT) и се освобождава метанофуран. **3.** От формиловата група се отделя вода (дехидриране) и се образува метенилтетрахидрометаноптерин ($\text{CH}\equiv\text{H4MPT}$). **4.** Последният се редуцира до метилтетрахидрометаноптерин ($\text{CH}_2=\text{H4MPT}$) от кофактор F_{420} . Реакцията се катализира от F_{420} -зависима $\text{N5}_2\text{N10}$ -метилтетрахидрометаноптерин редуктаза (F_{420} е донор на електрони). **5.** Метилен-H4MPT се редуцира от 5-метилтетрахидрометано-птерин:коензим- F_{420} -оксидоредуктаза с кофактор F_{420} като донор на електрони до метилтетрахидрометаноптерин ($\text{CH}_3\text{-H4MPT}$). **6.** Метилевата група се предава на коензим M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) с помощта на CoM-метилтрансфераза (белтък, съдържащ желязосерни клъстери и кориноид като простетична група) и се освобождава тетрахидрометаноптерин (H4MPT). Тази реакция е екзоргенна. Свободната енергия от ензимното пренасяне на CH_3 от метаноптерин на коензим M се използва да генерира Na^+ -мотивираща сила, създавана от метилтрансферазен комплекс (Mart-H). **7.** Метил-CoM-редуктаза (MCR) катализира последната стъпка до образуването на *метан*, като редуцира метил-CoM до метан и CoM (Grochowski & White 2010). MCR съдържа кофактор (коензим) F_{430} , съдържащ никел тетрапирол (не трябва да се бърка с F_{420}). Метил-CoM се атакува от коензим-B (HS-CoB), освобождава се CH_4 и се образува хетеродисулфид като краен акцептор на електрони в метаногенезата ($\text{CH}_3\text{-S-CoM} + \text{HS-CoB} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CoB-S-S-CoM}$). CoM-SH и CoB-SH тиолите се регенерират чрез редукция с електрони от H_2 посредством хетеродисулфидна редуктаза (Hdr) при силно екзергонична реакция. Hdr също генерира Fdred, който служи като редуктор с нисък потенциал за етапа на формил-MFR дехидрогеназа в стъпка 1.

Съединенията тетраhydrofolат (H4F) и тетраhydroметаноптерин (H4MPT) пренасят C₁-отломки между формилното и метиловото окисление. Те са структурно аналогични един на друг по отношение на птериновата част, но всеки има отделна странична верига. H4MPT присъства само в анаеробни метаногенни археи и аеробни метилотрофни протеобактерии. Той еволюира независимо от H4F и функционира като отделен носител в метаболизма на C₁. Синтезът на метил е възникнал независимо (геохимично) в ацетогени и метаногени в продължителна биохимична еволюция, макар метиловите групи да изпълняват хомоложна функция при хомоложен ензим CODH/ACS за синтезата на тиоестер. Това предполага, че: **(а)** генът за CODH/ACS е присъствал и функционирал в техния прикрепен жив общ предшественик (ЛУКА), **(б)** гените и протеините за пътищата на синтез на метил при ацетогени и метаногени са възникнали независимо и впоследствие са дивергирали между техните наследници в рамките на АХТО; **(в)** метилови групи са доставяни непрекъснато и изобилно от геохимични процеси (серпентинизация или геохимични окислително-редукционни процеси на границата отдушник – океан); **(г)** метиловите групи са използвани за спонтанната метилсинтеза на ацетил-КоА в метаболитния път на ацетогени и метаногени преди появата на гените и протеините; **(д)** генетично възникналите ензими за синтез на метил не са измислили тази синтеза, а само са ускорили химичните реакции, които са били възможни и без тях; **(е)** гените за съответните ензими са възникнали в независими клонове на ЛУКА (Sousa et al. 2013). Археите и бактериите са два самостоятелни клона прокариоти, които са запазили някои общи черти, но други са изобрели самостоятелно в резултат на дълга генетична диференциация (табл. 2).

Таблица 2. Сравнение на Бактерии и Археи

Прилики	
<p>Едноклетъчни, бинарно делене (просто делене на две), разнообразни по форма, рибозоми тип 70S. Имат нуклеоид (кръгова ДНК), плазмена мембрана, клетъчна стена с белтъчни израстъци пили, флагелум и цитоплазма с висока концентрация на разтворени вещества. Извършват хоризонтален генетичен трансфер (трансформация, трансдукция, конюгация). Пренесената ДНК може да бъде плазмид или хибрид. Получава се рекомбинантен организъм. Няма мембранни органели. Клетъчната мембрана от двоен фосфолипиден слой с глицерол и фосфатен остатък. Клетъчна стена (при някои отсъства).</p>	
Различия	
Археи	Бактерии
<p>Най-примитивни, появили се от ЛУКА преди 3,1 – 4,1 млрд. г.; 0,5 – 4μ преживяват в екстремни условия (горещи, солени е дълбоки води). Клетъчната стена е от псевдопептидогликани, гликопротеини протеини и полизахариди. Липидна мембрана с изопренови етери с разклоняващи се алифатни киселини. Съдържа белтъци, които образуват S-слой. Видове: 4 основни групи. Екологично: метаногени, термоацидофили, халофили. Не образуват спори. Размножаване също чрез фрагментация на клетката или пъпкуване. Имат интрони. Няма тимин в тРНК. РНК-полимеразата е сложна и е изградена от 10 субединици. Имат 31 рибозомни белтъци и малки ядрени РНК-и, които липсват при бактериите. Няма патогенни видове. Не следват гликолиза и цикъл на Кребс, а използват други пътища. Съдържат А-тип аденозинтрифосфатаза.</p>	<p>Сложно устроени, появили се от ЛУКА преди 2,5 – 3,2 млрд.г.; цианобактерии преди 2,6 млрд.г. (кислородна революция); 0,2 – 1.5μ, разпространени навсякъде, (почви, вода, въздух, трупове, живи организми). Клетъчна стена от пептидогликани с мураминова киселина или липополизахариди, върху която е разположена капсулата (при някои). Липидна мембрана с естери на мастни киселини. Видове: 5 основни групи (протеобактерии, хламидии, спирохети, цианобактерии, грам⁺ и грам⁻. Образуват спори за преживяване. Няма интрони. Имат тимин в тРНК. РНК-полимеразата е проста и е изградена от 4 субединици. Има патогенни видове. Използват гликолиза и цикъл на Кребс за разграждане на глюкоза. Имат камшичета и пътища за синтеза на хем, които се различават от тези на археите. Съдържат F-тип аденозинтрифосфатаза.</p>

Прокариотите се характеризират с голямо разнообразие от гени вътре в щамовете на вида. Примерите, открити досега за независим произход на гени в археи и бактерии, показват, че изобретението на пълния генен репертоар, необходим за свободното им съществуване, не е завършило в ЛУКА, а е продължило в тяхната по-нататъшна еволюция. Всеки нов щам се отличава от останалите средно с 33 гена. Цялата съвкупност от гени на всички щамове от даден вид се означава с термина *пангеном*. Изучаването на пангенома е важно за изясняване на метаболизма и еволюцията на

вида. Въпреки че използват ограничен набор от субстрати, метаногените и ацетогените имат сложна биохимия, която включва необикновени коензими и реакции, извършващи се при много ниски редокс потенциали. Например само за биосинтезата на ензимните системи на метаногенезата са необходими повече от 200 гена. Сложността им надминава тази на светлинните реакции при фотосинтезата. Гените в бактериите и археите идват от ЛУКА, но има и такива, които са резултат на хоризонтален генен трансфер (ХГТ), като например бактериалните гени на Haloarchaea. В нова среда прокариотите се срещат и усвояват нови донори и крайни акцептори, при което се разширяват съществуващите окислително-редукционни двойки. ХГТ между бактерии и археи довежда до раздалечаване на тяхната физиология и до разклоняване на еволюционното дърво както на бактериите, така и на археите (Martin & Sousa 2016).

Археите и бактериите нямат хомоложни мембрани, което показва, че родоначалникът им (ЛУКА) не е имал съвременна мембрана. Метилсинтезата, преходът към свободен начин на живот и прокариотното клетъчно делене вероятно са възникнали независимо в ацетогени и метаногени. Пътят на биосинтеза на хем при археи не е свързан с този при бактерии, а вероятно е възникнал неензимно още в ЛУКА. Някои съвременни ацетогени и метаногени имат цитохроми, получени от сулфатредуциращи бактерии чрез хоризонтален генен трансфер. Флавините са далеч по-универсални от хиноните, което се дължи на следната последователност от събития за спестяване на енергия в ранната еволюция: 1) тιοестер-зависими фосфорилиране на ниво субстрат; 2) хемиосмотично използване и универсалност на АТФ като енергийна валута; 3) използване на Na^+ градиенти, генерирани от H^+ / Na^+ антипорти; 4) генериране на йонни градиенти, зависими от бифуркация, базирани на флавин; 5) генериране на протонни градиенти на базата на хинон (и Q-цикъл), включващи мембранни интегрални цитохромни комплекси и дихателни вериги.

Физиологичните типове прокариоти са подредени последователно от строги анаероби през факултативни анаероби до аероби и от автотрофи и ферментатори до фототрофи и хетеротрофи. Това подреждане отразява биохимичната еволюция на редоксистемите. *Много ранна физическа дивергенция, предизвикана от различното химично съдържание в компартментите на АХТО и действието на химическия отбор е последвана от физиологична дивергенция. Приликите и разликите във въглеродния метаболизъм са успоредни с приликите и разликите в механизмите им за спестяване на енергия.* Ацетогените (кlostридии) и метаногените, стоящи в основата на прокариотната класификация, нямат цитохроми и хинони. Тяхната роля се изпълнява от корини¹. С усложняването на прокариотите са се появили сулфатни редуктори с порфин², следвани

от фотосинтезиращи бактерии (с форбин и хлорофил). По-нататъшната физиологична еволюция е довела до появата на дихателни вериги, включително и такива, които използват кислород като краен акцептор (табл. 3). *Физиологичната еволюция е протекла в следната последователност: облигатни анаероби → аеротолерантни анаероби → факултативни аероби → облигатни аероби.*

Таблица 3. Последователни етапи в еволюцията на микробния метаболизъм (по Martin & Sousa 2016)

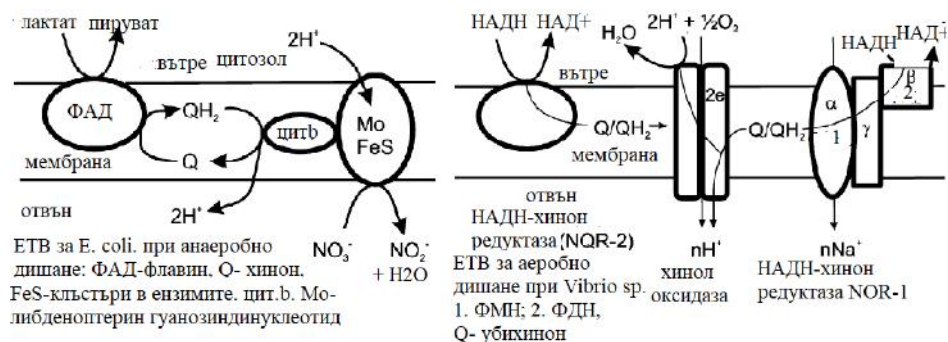
Облигатни анаероби			Аероби		
Аерооблигатни			Аеротолерантни	Факултативни	Облигатни
Метано-образуващи Клостридии	Сулфат-редуциращи	Зелени и пурпурни серни бактерии	Лактобацили и пропионови бактерии	Ентеробактерии, Атиородасеа	Псеудомонас, корине-бактерии
Корини ¹	+ Порфин ²	+ Форбин ³	-Цитохром оксидази	- Цитохром оксидази	+ Оксигенази
			+ Цитохром оксидази		

Забележка: *Корините*¹ са циклични съединения с пръстенообразуващи атоми (коринов пръстен) от различни химични елементи (C₁₉H₂₂N₄). *Порфинът*² (C₂₀H₁₄N₄) се състои от 4 подобни на пирол пръстена, свързани с четири метинови групи (=CH-). Той е най-простият от тетрапиролите, който образува основата на *порфирините* (група съединения с порфинова структура с различни странични вериги). В комбинация с желязо те образуват хем – компонент на биологично важни съединения като витамин B₁₂, (който действа като кофактор), хемоглобин и миоглобин (хем + белтъка глобин), цитохроми и други (Nikolov 1971, 336; Kosekova et al. 2004, 218). *Форбинът*³ е съединение без магнезий, родоначалник на хлорофила.

Цитохромни комплекси, хинони и транслокация на заряда на базата на хинон липсват в тези очевидно древни форми на живот, които не притежават комплекси I, II или III; нямат крайни оксидази, а само по едно място за свързване (йонно изпомпване). Техните енергийни метаболитни пътища се различават фундаментално от познатите хемиосмотични пътища от типа на дихателната верига на *E. coli* или митохондриите. Независимо от това биоенергетиката им се характеризира с хемиосмотични вериги, свързващи протеини, йонни електрохимични градиенти над мембраните и АТФ синтаза.

Анаеробното и аеробното дишане използват електронотранспортни (дихателни) вериги (ЕТВ), за да синтезират АТФ (фиг. 2). Анаеробните прокариоти използват различни субстрати като крайни акцептори на

електрони (сулфат, нитрат, нитрит, CO_2 , фери желязо и някои органични съединения като фумарат (фиг.1). За аеробните бактерии краен акцептор е кислородът, но за анаеробните той е „отровен“. ЕТВ е поредица от протеинови комплекси, които прехвърлят електрони от донори на акцептори чрез редокс реакции, протичащи едновременно и свързано с трансфера на H^+ през мембраната: $\text{NAD}^+ + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{NADH}$; $\text{ФАД} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longleftrightarrow \text{ФАДН}_2$ (окислително/редукционни реакции). Преносът на електрони по ЕТВ е екзергонимен процес. При това енергията се съхранява под формата на АТФ. Крайният продукт при ферментацията зависи от организма и може да бъде млечна, маслена, пропионова киселина, алкохол, ацетон еволюцията сред прокариотите води до възникване на нови коензими – цитохроми и хинони (табл. 3), а нови положителни мутации и естествен отбор подобряват каталитичните свойства на протеините и ускоряват физиологичната еволюция.



Фигура 2. Сравнение на електронотранспортни вериги при анаеробно и аеробно дишане на бактерии

ETV е спрегната с окислително фосфорилиране чрез протонен градиент през плазмената мембрана на прокариотите. Тя е аналог на ЕТВ във вътрешната мембрана на митохондриите на еукариотите, но е по-усложнена – има няколко различни електронни донора и електронни акцептора. Изградена е от протеиновите дихателни комплекси: Комплекс I – НАДН-убихинон-оксидоредуктаза прехвърля двойка електрони от коензим НАДН на коензим Q (убихинон). Това става чрез посредник флавин мононуклеотид (ФМН). Комплекс II – сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза прехвърля електроните от флавинадениндинуклеотид (ФАДН₂), който ги предава на FeS центрове и оттам на коензим Q. Комплекс III – убихинон-цитохром-с-оксидоредуктаза прехвърля електрони от редуцирания коензим Q към цитохром с (комплекс от 3 цитохрома – b, c и a).

Този комплекс съдържа хем с FeS центрове, в които се извършва окисление на $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$. *Комплекс IV* – цитохром с-оксидоредуктаза прехвърля електрони към кислорода. Комплекси I, III и IV са протонни помпи (създават протонен градиент през мембрана), а цитохром с и Q са мобилни електронни носители. При преминаването на електроните през веригата се освобождава енергия, която се използва от АТФ-синтазата за синтез на АТФ (комплекс V). **Оксигеназите катализират включването на един атом кислород в субстрата. Аеробните бактерии използват редица различни терминални оксидази. Повечето оксидази и редуктази са протонни помпи. Цитохром bc1 е протонна помпа, открита в много, но не във всички бактерии. Както подсказва името, бактериалният bc1 е подобен на митохондриалния bc1 (комплекс III). Анаеробните бактерии, които не използват кислород като терминален акцептор на електрони, имат терминални редуктази.** Някои бактерии в кислородна среда използват ЕТВ комплекси както при митохондриите. В анаеробни условия бактериалната ЕТВ е по-къса и се състои от два клона с различна последователност на цитохроми.

Фотосинтетичните ЕТВ са много сходни с ЕТВ при окислителното фосфорилиране. Те използват мобилни липидо-разтворими преносители (хинони) и мобилни, разтворими във вода преносители (цитохроми) и протонни помпи. **Аноксигенната фотосинтеза е фототрофният процес, при който светлинната енергия (фотони) се улавя и преобразува в АТФ или НАДФН, без производството на кислород, което означава, че водата не се използва като донор на електрони.** Характерна е за някои видове бактерии: зелени серни, пурпурни серни, сулфат-редуциращи, пурпурни несерни бактерии и хелиобактерии. Те притежават няколко вида бактериохлорофил, сходен с този на еукариотите и обикновено използват една фотосистема като извършват циклично фотофосфорилиране. Най-напред възниква аноксигенната (безкислородната) фотосинтеза, а след нея – оксигенната. Смята се, че двете фотосистеми са възникнали в една и съща клетка. Фотосинтетичната електронотранспортна верига с хлорофили изисква цитохроми и хинони.

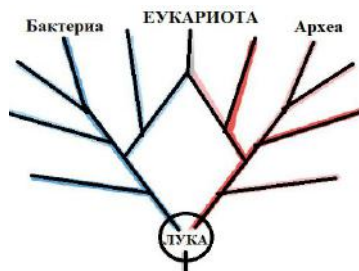
Натрупаните органични вещества в резултат на автотрофното хранене създават условия за възникване на ферментация (Martin & Sousa 2013; 2016). Това е анаеробен метаболитен път, при който се получава енергия, като пируватът, образуван чрез гликолиза, се разгражда до лактат или етанол, съпътствано от превръщането на NADH в NAD⁺. Ферментацията се различава от анаеробното и аеробното дишане по това, че не се нуждае от кислород, нито от ЕТВ или цикъл на Кребс, а фосфорилирането се извършва на субстратно равнище. Микроорганизмите, които получават енергия чрез ферментация, са потомци на **хемиосмотични предци** и имат

органотрофно хранене. Продуктите от метаболизма на автотрофите стават източник на хранителни вещества за хетеротрофите, при което биологичните видове си сътрудничат (един биологичен вид живее от метаболитните продукти на друг вид). Това явление се нарича *синтрофия*. Например водородотрофните микроорганизми образуват CH_4 от редукцията на CO_2 . Органотрофните микроорганизми (ацетотрофи) образуват CH_4 от разграждане на органични източници. Освободеният CH_4 се използва от метанотрофи, които го разграждат до CO_2 и H_2O . В основата на синтрофията е междувидовото взаимодействие в усвояването на водорода: синтрофът (археи) произвежда H_2 , а партньорът му (сулфатредуциращи бактерии) го консумира. Може да се приеме, че автотрофията и хетеротрофията са се появили едновременно.

Характеристиката на двата клона прокариоти – Археи и Бактерии, ни дава възможност да си отговорим на въпроса: *Как еукариотите се вметват в ранната еволюция на живота?*

Произход на домейн Еукариота – ЛЕКА

ЛЕКА е последният общ универсален родоначалник на еукариотите. Еукариотната клетка е твърде различна от прокариотната: 1) има организиран генетичен материал (хромозоми с линейна ДНК, свързана с хистони) в ядро, ограничено с пореста ядрена мембрана; 2) мембранна система за компартментализация; 3) уникална енергетична централа (митохондрии); 4) цитоскелет с микронишки и микротръбички; 5) органи за движение (ресни или камшичета или са ги загубили вторично); 6) сложно делене митоза; 7) пол (процес за генетична рекомбинация чрез мейоза); 8) клетъчна стена при някои; 9) цитоплазма, съдържаща клетъчния сок и органелите. Тези характеристики са й дали възможност да се приспособи към условията, да се изменя и да ги изменя и да създаде съществуващото многообразие от протисти, гъби, растения и животни (Alberts et al. 2006). Домейн Еукариота е наследник на ЛЕКА, произлязъл от двата клона на Прокариота – археи и бактерии (фиг. 2). Еукариотите са резултат от и начало на сложна биологична еволюция, която означава промяна на определени наследствени характеристики в последователните поколения на биологичните популации.



Фигура 3. Произход на домейн Еукариота – клетки с ядро (Yastrebov 2018)

Изясняването на метаболизма на прокариотите хвърля светлина върху проблема за произхода на еукариотите. Много от метаболитните пътища водят началото си от прокариотите, макар че някои, като азотфиксацията, не се срещат в еукариотите. Аеробното дишане е характерно за всички основни групи на еукариотите и е локализирано в митохондриите. То се среща и в много линии на прокариотите, но не присъства във всички, което показва, че тези прокариоти винаги са имали анаеробен метаболизъм. Преди около 3,5 млрд. г. някои бактерии започват да използват слънчева енергия за редуциране на CO_2 и образуване на органични вещества с помощта на водород от различни източници (фотоавтотрофи). Възникват фотосинтезата и цикълът на Калвин. Грам-отрицателни бактерии дават началото на цианобактерии, които използват водород от водата и освобождават O_2 като страничен продукт. Това позволява развитието на аеробно дишане, защита на организмите от кислорода и синтезиране на по-голямо количество АТФ. Наред с него се запазва и анаеробното дишане в места без кислород. Постепенно в атмосферата се натрупва кислород до достигане на съвременната концентрация преди 700 млн. г. Еукариотите се появяват преди 2 млрд. г. с увеличаване на кислорода в атмосферата от предци, съдържащи митохондрии. Предполага се, че митохондриите са били бактерии, попаднали в друг прокариот. Няма общоприето научно становище.

Цианобактериите са *фотоавтотрофи*, защото имат хлорофил и сами произвеждат органични вещества от неорганични чрез фотосинтеза: $6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2$ (хлорофил, светлина) \rightarrow $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$. Те са образували кислорода в атмосферата и са дали началото на зелените растения. Зелени серни бактерии са също фотоавтотрофи, приличат си екологично с цианобактериите, но използват серни йони вместо вода и не произвеждат кислород (анаксигенна фотосинтеза): $\text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2$ (бактериохлорофил) \rightarrow

$C_6H_{12}O_6 + 2S$. *Фотохетеротрофи* използват светлинна енергия и CO_2 от органични съединения (пурпурни несерни, зелени несерни и хелиобактерии). *Хемоавтотрофите* (азотфиксиращи и желязоокисляващи бактерии) използват химическа енергия и неорганичен въглерод, за да синтезират органични вещества от неорганични. *Хемохетеротрофите* (гнилостни и паразитни бактерии) са анаеробни бактерии, които използват химична енергия и въглерод от органични съединения.

Хипотезите за произхода на еукариотите се различават в наименованията и обясненията и могат да се обединят приблизително в 6 групи: 1. Независима хипотеза; 2. Ендогенна хипотеза; 3. Хипотеза за химерата; 4. Ендосимбионтна хипотеза; 5. Серийна ендосимбионтна хипотеза и 6. Синтрофна хипотеза (Aroga). Използват се и други класификации като: 1. Автогенна хипотеза; 2. Хипотеза за ендокариозата; 3. „От вътре навън“ хипотеза; 4. Вирусна хипотеза и 5. Инвазия от интрон. Най-убедителна е ендосимбионтната хипотеза, която съчетава много от основните положения на останалите хипотези.

1. Независима хипотеза (варианти)

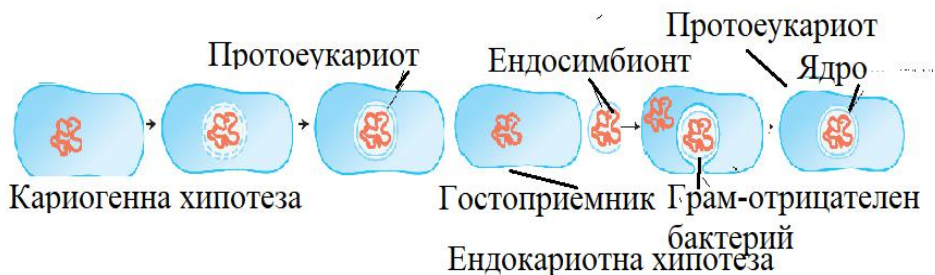
1.1. *Несимбионтна* хипотеза. Уникалната същност на еукариотното ядро със структурно сложни хромозоми се е появила независимо и не е произлязла нито от бактерии, нито от археи, нито от техни предшественици. Тя е произлязла пряко от първите форми на живот. Възможно е първите молекули РНК, способни да се самосглобяват и да катализират самовъзпроизвеждането си, да са придобили гени за синтез на белтъчна обвивка, да са обменяли фрагменти с РНК или ДНК и да са пораждали нови рекомбинантни форми. РНК вирусите са много променливи, защото нямат механизъм за коригиране на грешки и всяка мутация остава в техния геном. На тази мисъл навежда откритието на бактерии, които имат включени в цитоплазмата структури, ограничени с белтъчна, а не с липидна обвивка. Това се приема като възможност за самостоятелна еволюция на първична органична структура в еукариотна клетка. Няма конкретни доказателства в подкрепа на тази хипотеза.

1.2. Хипотеза „*Еоцита*“. Предложена е от Джеймс Лейк и сътрудници (Lake et al. 1984) въз основа на приликата между рибозомите на Еукариота и Кренархеота (тип термофилни прокариоти със старо название Еоцита към царство Археа). Колонии от РНК придобили способност да синтезират или да адсорбират хидрофобни вещества, които образували около тях обвивка и ги отделили от околната среда. Те запазили свойството си да задържат каталитични РНК молекули във водната среда, и представлявали първообраз на клетъчна организация, наречена *рибоцит* (Ribocyte 2008). Нямали ДНК и белтъци, но многообразните свойства на РНК им дали възможност да живеят, да се размножават, да се конкури-

рат и да еволюират (Woese 1977). В рибозита, възникнал в РНК свят, се развил апарат за синтез на белтъци въз основа на рибозоми. Предполага се, че първобитната рибозома се е състояла само от РНК. Рибозитът е имал само една рибозома, която синтезирала малък брой белтъци. Появата и съхраняването на информацията в ДНК може да е била иновация от вируси, двукратно прехвърлена на рибозит – веднъж, превръщайки го в бактерия, и втори път, превръщайки го в архея. След като се появява възможност да се внедри в чужда генетична програма и да я преустрои съгласно своя геном, вирусът внася новости в заразения рибозит. Вирусът осигурява смърт на голямо количество слаби индивиди и създава място за нови, по-приспособени (Karpachev 2020).

1.3. *Автогенната* хипотеза (Seravin 1986) твърди, че произходът на еукариотната клетка се дължи на прокариотна клетка, която се е регенерирала от само себе си (фиг. 4, ляво). Тя е придобила ядро, което ѝ е дало възможност да образува еукариотна клетка. Наред с него е развила и останалите органели чрез компартиментализация на функциите. Като доказателство се привежда наличието на наченки на компартиментализация при прокариотите (ламели и тилакоиди на фото- и хемосинтезиращи бактерии) (Markova 2006).

1.4. *Ендогенна* хипотеза (фиг. 4, дясно). Според нея еукариотната клетка е произлязла от „протоеукариот“ – голяма анаеробна бактерия, която е образувала ядро, митохондрии, хлоропласти и други органели, чрез вгъване на плазмената мембрана към вътрешността и ограждане на генетичния материал с двойна мембрана в резултат на мутация. Плазмената мембрана с прикрепените към нея рибозоми започнала да образува мрежа от гънки в клетката – зърнеста ендоплазмена мрежа (ЕПМ), а от нея се създавала ядрената обвивка, в която се загражда ДНК. Тази промяна довела до отделяне на нуклеоплазмата от цитоплазмата и на транскрипцията – от транслацията.



Фигура 4. Произход на протоеукариот: ляво – автогенна хипотеза; дясно – ендокариотна хипотеза

1.5. *Вирусна* хипотеза (Bell 2001). Главната характеристика на еукариотната клетка – ядрото, е възникнало преди митохондриите и пластидите. Възможно е чужд наследствен материал от външната среда да е погълнат от археон. В бактериите са установени карбоксизоми, независимо еволюирали на два пъти, за да фиксират въглерод. Заедно с по-малки самосглобяващи се нанокмпартменти те имат полиедрична структура, която прилича на вирусен капсид (протеиновата обвивка, която обхваща вирусен геном). Доказателства: ДНК на един вид бактерия (*Gemmata obscuriglobus*) е заобиколена с мембрана и прилича на еукариотно ядро. Обвивката не е напълно затворена и не отговаря на критериите за органела. В бактерии е наблюдавана сложна вътрешна мембранна система, наподобяваща еукариотните мембрани. Предполага се, че още в „първичната супа“, когато са се появили самовъзпроизвеждащи се молекули, способни да образуват молекулни комплекси, някои от тях са синтезирали мембрана и са дали началото на протоклетки, а други (предците на вирусите) са станали техни паразити. Между паразита и гостоприемника се е извършвала обмяна на фрагменти с ДНК и РНК, пораждайки нови рекомбинантни форми. Според вирусната хипотеза еукариотите са съставени от три прадедни части: вирус, който е станал ядро на съвременната клетка; прокариотна клетка – археон, която е дала цитоплазмата и клетъчната мембрана, и още една прокариотна клетка – бактерия, която чрез ендоситоза е станала митохондрий или хлоропласт. Вирусите имат своето място в еволюцията на ядрото и въобще в еволюцията на живота, защото са го съпътствали от най-ранните химични процеси досега. Тази хипотеза се подкрепя от възможността за трансфер на ДНК между отделни видове бактерии днес.

2. Хипотеза „от вътре навън“ (Vaum 2015). Външната мембрана на археална клетка (археон) има изпъкналости, наречени мехури (блемби). Комплекси на ядрени пори (NPCs = nuclear pore complexes) са еволюирали рано в археон. Мехурчетата се разширявали навън около ядрените пори (NPCs) и задържали митохондриите. Енергията от митохондриите е използвана за разширяване и за сливане на мехурчетата. Те започнали да се допират и да образуват ендоплазмената мрежа (ЕПМ). Има доказателства, че комплекси на ядрените пори и ядрената мембрана са коеволюирали с ендомембранната мрежа. Последният общ еукариотен прадед (ЛЕКА) е имал напълно функциониращи NPCs. Хипотезата от вътре навън се основава на фагоцитоза: инвагинация (вгъване) на плазмената мембрана в прокариот, чиято клетъчна стена изтънява, ролята ѝ намалява, става гъвкава и в даден момент изчезва. Клетъчната мембрана придобива способност да фагоцитира хранителни частици и да образува цитоскелет, който ѝ осигурява опора отвътре. Клетката е придобила свойството да се движи с псевдоподи, да обхваща частици и да образува ендозоми, наречени фагозоми, чието съдържимо се смिला както

при храненето на амебата. Еукариотната клетка става хищник. Има възражения срещу тази хипотеза: много прокариоти, макар да притежават цитоскелет, не губят клетъчната си стена; има бактерии без клетъчни стени, но не се превръщат в еукариоти. Съвременни еукариоти имат стена или обвивка над мембраната, но това са по-късни образувания, които се отличават дори между самите еукариоти.

3. Хипотеза за *химерата* (Martin 2011). Според тази концепция днешните еукариотни клетки са потомци на химерен организъм, възникнал от две или повече прокариотни клетки – едната клетка (гостоприемник) е заселена от α -протеобактерии. Алфа-протеобактериите са голяма група бактерии, в която влизат видове, живеещи в симбиоза с растения, както и видове, инфектиращи хората чрез кърлежи преносители или свободно живеещи фотосинтезиращи бактерии. Предполага се, че еукариотите са възникнали като химера между археобактерия (археон) и еубактерия. Докато при симбиозата двата организма (клетки) взаимно се подпомагат и са относително самостоятелни, то при химерния организъм съжителстващите си прокариоти са станали един цялостен организъм. Той е резултат на интимни отношения за продължителни периоди от време, които позволяват на симбионтите да се развиват съвместно и да станат зависими един от друг.

Джеймс Макинерни (Cooper 2017; Ku 2015) предполага, че еукариотите са произлезли от две прокариотни клетки, които са обединили своите гени (малко гени от археите и малко гени от бактериите) и са образували хибриден организъм с общ метаболитен път. Много от ядрените гени, репликацията и транскрипцията са свързани с Археа. Органелите за метаболизма и гените, отговорни за енергетичните процеси в клетката, имат бактериален произход.

Въпреки че няма междинни организми между прокариотите и еукариотите, смята се, че еукариотите са тясно свързани с термофилните археобактерии от горещи извори, които не притежават клетъчна стена, приличат на амeba, със структура, подобна на цитоскелет. Енергийният им метаболизъм е основан на серни съединения, Fe^{3+} или Mn^{4+} , действащи като дихателни окислителители с аеробно дишане. Едно от предположенията е, че мембраната на археон, който предварително е претърпял ендосимбиоза с прокариот и се е снабдил с митохондрий, се е вгънала навътре и е образувала ендоплазмената мрежа, ядрената мембрана и останалите органели. Друго предположение е, че група грам⁻ бактерии (цианобактерии) са разграждали вода като източник на водород и са освобождавали кислород като страничен продукт. Трето предположение е, че РНК-протоеукариот е фагоцитирал археон (Fitzpatrick et al. 2006).

Компютърният модел показва, че след обединяването хибридният организъм започва да губи част от своята новопридобита генетична информация,

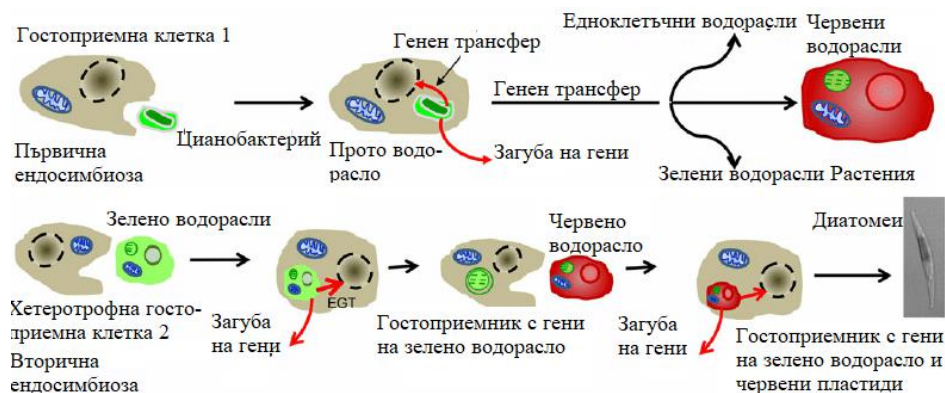
както в играта на шах. Тя започва с всички фигури, подредени в редове, но в процеса на играта фигурите една по една отпадат. Същото става и с хибридният организъм. В процеса на еволюцията части от генома една по една отпадат от общия геном на хибрида. По останалите части може да се реконструира как е протекъл самият процес. Според Уилиам Мартин⁸ техните изследвания показват, че еукариотите днес рядко се включват в тази непрекъсната размяна на гени, но включването им в ранната еволюция е довело до образуването на техните органели. Хлоропластите са възникнали от цианобактериите при ендосимбиоза с хетеротрофен факултативен анаероб. По такъв начин автотрофията в растенията се унаследява от цианобактериите. Митохондриите са образувани от тип протобактерии, потомци на аеробни бактерии, родствени на клас Рикетсии (Fitzpatrick 2006). Гостоприемник на тези бактерии е археон. И двете органели са запазили своята биохимия, но геномите им са редуцирани и повечето от органелните протеини се кодират в ядрото. Едно от обясненията на произхода на митохондрии и хлоропласти се означава като ендосимбиоза чрез поглъщане (фагоцитираща археон хипотеза). Бактериалните гени са навлезли в еукариотните геноми чрез предшественици на органели (прокариоти). Епизодичният приток на прокариотни гени в еукариотната линия на еволюцията се е осъществявал чрез ендосимбионтни събития. Еукариотните геномни последователности все по-често включват ХГТ както от прокариоти към еукариоти, така и сред еукариоти. Този процес е източник на генетично разнообразие в еукариотните геноми и предопределя непрекъснато придобиване на специфични прокариотни гени в дивергиращите еукариотни групи.

Клетките имат различен брой митохондрии в зависимост от енергетичните си нужди. Митохондриите могат да се делят подобно на бактериите или да се сливат, различават се по големина и форма. Променят мястото си в клетката чрез взаимодействието си с цитоскелета. Митохондриите са двойномембранни органели – едната мембрана е от алфа-протеобактерия, а другата – от вакуолата, чрез която се е осъществила ендосимбиозата. Вътрешната мембрана образува гънки-кристи, които приличат на мембраната на алфа-протеобактериите. Митохондриите не могат да съществуват извън клетката, което се обяснява със загубата на гени при хоризонталния генен трансфер. Включването на митохондриите е дало възможност за производство на повече енергия от ген и за развитие на сложната еукариотна клетка, защото ендосимбиозата е енергетично зависима. Митохондриите са център на клетъчния живот и смърт, защото играят важна роля в апоптозата. Предполага се съществуването на еукариотни еволюционни предшественици без митохондрии. Еукариотната клетка е произлязла като геномна химера, в която прокариот (археобактерий) гостоприемник е придобил еубактериален ендосимбионт. Еукариотни черти, като пол, ядро и апоптозата, сега се преразглеждат в светлината на химерния произход.

Някои еукариоти са анаеробни и не могат да оцелеят в кислородна среда. Появата им се обяснява като вторична загуба или редуциране на митохондрии. Всички еукариоти обаче имат в ядрото си гени от митохондриален произход. Освен АТФ митохондриите имат и други функции, като например образуване на кофактори на ензими, които съдържат желязо и сяра. Смята се, че анаеробиозата в еукариоти не е еволюционна придобивка, а е екологична специализация. Например хламидомонас (зелено водорасло) фотосинтезира на светло в присъствие на кислород, но оцелява и на тъмно в безкислородна среда, като за тези условия включва гени, съдържащи се в неговия геном. Затова се приема, че ЛЕКА е притежавал митохондрии. Фотосинтезиращите еукариоти притежават хлоропласти с пигмента хлорофил и други допълнителни пигменти.

С помощта на групиране и филогенетичен анализ на еукариотни генни семейства с прокариотни хомолози е установено, че: (1) трансферът на гени от бактерии към еукариоти е епизодичен и съвпада с основните еволюционни преходи в началото при образуване на хлоропластите и митохондриите; (2) наследяването на гени при еукариотите е вертикално; и (3) непрекъснатият специфичен хоризонтален генен трансфер, въпреки че понякога се случва, не допринася за дългосрочното развитие на генното съдържание в еукариотните геноми.

4. *Ендосимбионтната* хипотеза е предложена от Лин Маргулис (1967) при обяснение на произхода на пластидите (Margulis et al. 2006). Те са произлезли от цианобактерии, живеещи в симбиоза с аеробен хетеротрофен еукариот (фиг. 5). Наречена е първична ендосимбиоза и пластидите с първичен произход са двумембранни, чиято външна мембрана произлиза от ендцитозното мехурче. Хлоропластите имат кръгова ДНК, рибозомите им са като на цианобактериите. Ендосимбиозата се е случила два пъти в историята на еукариотите. Първият път, преди около 1,5 млрд. г., ЛЕКА е приел цианобактериен симбионт и е дал началото на хлоропластите в почти всички еукариоти (червени и зелени водорасли, зелени растения). При втория път (преди 90 – 150 млн. г.) е приел различен цианобактериен ендосимбионт, който е дал началото на хроматофорите в едноклетъчни амeboидни еукариоти. Цианобактериите са грам-отрицателни и за разлика от останалите бактерии имат много вътрешни мембранни торбички тилакоиди, свързани с белтъци на светлинните реакции. Стените им са изградени от птериโดгликани и липополизахариди. Вторичните пластиди са заобиколени от три или повече мембрани. Много от гените на ендосимбионта са прехвърлени в ядрото и затова не могат да съществуват самостоятелно. Подобно на митохондриите, хлоропластите се размножават чрез просто делене. Вероятно ЛЕКА е имал клетъчна стена, която в някои от неговите наследници се е загубила.



Фигура 5. Поява на водорасли и растения чрез първична и вторична ендосимбиоза

Вариантите на ендосимбионтната хипотеза се отнасят до начините на възникване на съжителството между гостоприемника археон и симбионта бактерия: а) чрез сливане; б) чрез поглъщане=фагоцитоза или в) чрез симбиоза (Margulis et al. 2006). Тази хипотеза по-добре обяснява произхода на еукариотните органели, по-добре е документирана и е общоприета. Връзката между гостоприемник и симбионт се стабилизира от взаимните им ползи в метаболитната симбиоза и става задължителна. Получената клетка при определени обстоятелства може да оцелее, да се дели и да предава в поколението своите структури. Ядрото на клетката се образува от ДНК на голямата клетка – археон (метаноген според неговия метаболитизъм – метаногенеза). Преди 2 млрд. г. митохондриите и хлоропластите са произлезли от бактерии. Клетъчната мембрана на гостоприемника е по-сходна с археите и затова се смята, че еукариотите са произлезли директно от този голям клон на прокариотите. Най-старите фосили и най-близки до еукариотите са червените водорасли. През протерозойската ера бактериите, археите и еукариотите са били добре установени.

4.1. Хипотезата „от вън навътре“, или *ксеногенна хипотеза приема, че органелите* и ядрените гени на еукариотната клетка имат бактериален произход и са получени отвън чрез симбионта. Твърдението се основава на данни от молекулярния и филогенетичния анализ. Метаболитизмът на еукариотите се обяснява с генетичен трансфер от генома на митохондриалния ендосимбионт към генома на гостоприемника, при което е станало генетично изместване на предварително съществуващи метаболитни пътища. Вероятно тази промяна е била предпочитана от естественния отбор. Развитието от симбионт до органа завършва със загубата на неговата независима способност за оцеляване. Тази

идея се потвърждава от факта, че органели като митохондрии и хлоропласти: (а) са репликатори, т.е. могат да се делят независимо чрез прищъпване на две, а не чрез митоза; (б) носят генетична информация, т.е. кръгова ДНК, която е суперспирална, с единична начална точка за репликация, чиито секвенции не приличат на секвенциите на ДНК в ядрото; (в) рибозомите им приличат на бактериалните; (г) органелите са заобиколени с една или две мембрани; (д) метаболитните им пътища са като на прокариотите; (е) молекулите, които изграждат мембраните, са сходни с тези на прокариотите, но се различават от еукариотните мембрани. Установено е, че ДНК на митохондриите и хлоропластите контролира синтезата на техните рРНК и иРНК, а чрез тях на рибозомни протеини и някои протеини на дихателната верига (митохондрии). Подобни гени са отговорни за фотосистема I и за фотосистема II, цитохром комплекс, АТФ синтаза и рибулозо бисфосфат карбоксилаза на хлоропластите. Митохондриите и хлоропластите съдържат свои собствени рибозоми (1): 30S + 50S = 70S {16S рРНК + 21 рР} {5S & 23S рРНК + 34 рР}; (2): Шайн-Далгарно (Shine-Dalgarno) последователност на 16S рРНК; (3) антибиотична специфичност: рибозомите са чувствителни към хлорамфеникол, стрептомицин и тетрациклин като бактериите, но еукариотните рибозоми са нечувствителни към тези антибиотици; (4) молекулярната филогения (секвенирането на 16S рРНК и тРНК) показва, че хлоропластите и митохондриите са еволюционно свързани с бактериите.

Процесът може да бъде представен схематично. Начало: еубактерия + архебактерия = протоеукариот + α -протеобактерия = симбионт (ядро ↔ протомитохондрий: трансфер на гени и загуба на гени) = митохондриен протист = три клона (**1. гъби, 2. животни, 3. протисти**); 3. протист + цианобактерий = симбионт (пластиди) = 4. **растения**.

Ендосимбионтната хипотеза, предложена от К. С. Мережковский през 1905 г., обяснява произхода на митохондриите и хлоропластите, но не и на ядрото (Zakharov-Gezekhus 2010). Ядрото също е възникнало чрез ендосимбиоза. Ако ядрото, митохондриите и хлоропластите са ендосимбионти, то организъмът, който ги е погълнал, не е бил ДНК организъм, а примитивен РНК организъм. Тази хипотеза обяснява защо в еукариотите съществуват повече РНК вируси. Центриолата и базалните телца нямат двойна мембрана и ДНК, поради което може да се допусне, че ранен РНК организъм е дал началото на еукариотната клетка, а не симбиоза с бактерии, защото еукариотната клетка използва РНК по различен начин от бактериите.

Молекулярните данни са изиграли важна роля в поддържането на ксеногенен произход (от вън навътре, а не от вътре навън на органелите). Последните филогенетични анализи разкриват, че много еукариотни органелни и ядрени гени, чието прокаритно наследство може да бъде проследено, са от бактериален произход.

4.2. Хипотезата „Ендокариоза“ се отнася за еволюцията на ядрото. Счита се, че то се е образувало от метаноген, който губи метаболитните си свойства с времето. В еволюцията на прокариотната клетка до еукариотна са станали две ендосимбионтни събития – едно, свързано с включване на ядро, и друго, с включване на митохондрий. Ядрото еволюира преди или едновременно с митохондриите, които произвеждат необходимата енергия за осъществяване на ендосимбиозата. Тази хипотеза обяснява защо информационните системи (репликация, транскрипция и транслация) са от археи, а мембранните системи са от бактерии; ядрената мембрана е хомоложна на бактериалната. Възраженията към нея са: а) не е позната фоликуларна лимфомна (ФЛ) клетка с мембрана, подобна на ядрената мембрана; б) не е ясно защо е погълнат само един симбионт, а не популация, както ендосимбиозата с митохондрии; в) ФЛ клетки имат АТФ генерираща физиология, а ядрото няма; г) отворената митоза е уникална за ядрото, но във ФЛ клетки тя не съществува; д) ФЛ клетки не са така пропускливи, както ядрените пори; е) не обяснява защо цялата ДНК на гостоприемника е била прехвърлена на ендосимбионта. Ендосимбиозата се означава като „замразена катастрофа“, защото не носи селективна полза за ядрото.

Ядрото е уникално – ядрената обвивка е изградена от две мембрани с пори за пропускливост, генетичният материал има сложно делене, в ядрото не се синтезира АТФ. Всичко това е различно от която и да е друга жива клетка и затова обяснението на произхода му е толкова трудно, но същевременно е много важно, защото подчертава участието на клетки от два различни вида прокариоти – бактерии и археи. По тази причина се смята, че еукариотите са по-късен клон, отделен от прокариотите и съчетаващ генетичен материал от тях. Хистони от еукариоти и археи си приличат в третичната структура, но не в четвъртичната – еукариотните хистони образуват октамери върху ДНК, а в археите те формират нишки с различни размери. Хистоните регулират транскрипцията и транслацията, но в бактериите липсват.

5. *Серийната ендосимбионтна* хипотеза е формулирана от Лен Маргулис през 1967 г. (Marguliset al. 2006) и се изразява в следните стъпки в еволюцията на еукариотната клетка. Начало: бактериална клетка с рибозоми, ДНК, клетъчна мембрана и клетъчна стена. **1.** Загуба на клетъчната стена. **2.** Нагъване на мембраната навътре, увеличаване на гънките и на повърхността. **3.** Формиране на вътрешни мембрани, покрити с рибозоми, част от които заграждат ДНК. **4.** Образуване на цитоскелет с актин и миозин. **5.** Прикрепване на ДНК за мембрана, която образува около нея мехурче и *изгражда ядрото*. **6.** *Първа симбиоза* с бактерия и образуване на камшиче, което помага на клетката да се движи. **7.** Превръщане на хранителните мехурчета в лизозоми и използване на ензими от първичната

ендоплазмена мрежа. **8. Втора симбиоза**, ендоцитоза на аеробни прокариоти с детоксикиращи свойства в анаеробни прокариоти и образуване на пероксисоми. **9.** Образуване на митохондрии чрез ендоцитоза от прокариоти, които имат свойството да генерират АТФ. **10. Трета симбиоза.** Образуване на хлоропласти с помощта на ендоцитоза на цианобактерии и придобиване от клетката на възможност да изгражда хранителни вещества чрез използване на слънчева енергия.

Друг вариант с малка промяна в последователността на процесите:

1. Произход на камшичетата (флагелуми): термоацидофилна, грам-отрицателна бактерия ферментатор, поглъща спирохета чрез фагоцитоза, за да се развият така наречените ундилоподиеви камшичести клетки. **2. Произход на ядрото:** полученият протоеукариот преминава през вторична ендосимбиоза чрез поглъщане на археон с мембранни гънки. Археонът се превръща в ядро, губейки клетъчната мембрана, докато мембранните гънки развиват ядрена обвивка и ЕПМ. Геномът на бактерията се пренася в ядрото през мембранните пори. Класически пример за такъв еукариот е *Giardia lamblia* (камшичест паразитен протозой). **3. Произход на митохондриите:** митохондриите имат двойна мембрана, представляваща външната и вътрешната мембрана на бактериите. Вътрешната мембрана е нагъната, образувайки тръбовидни или дисковидни кристи. Биохимията на енергийния метаболизъм в митохондриите прилича на тази на пурпурните несерни бактерии. Хипотезата предполага, че аеробната бактерия се е утвърдила като симбионт в анаеробен протоеукариот, който произвежда енергия чрез ферментация, загубила е способността си да фотосинтезира, и е станала митохондрий. *Strombidium purpureum* (ресничест протист) е пример, където митохондриалната рибозомна РНК последователност показва аналогия с еубактериалната рибозомна РНК. Серийната ендосимбионтна хипотеза предполага, че улавянето на протобактериален ендосимбионт от еукариотен гостоприемник с ядро наподобява съществуващи амитохондриални протисти (едноклетъчни еукариоти) и е довело до произхода на митохондриите. Примитивен анаеробен еукариот, подобен на *Giardia* (камшичест протист), чрез поглъщане на аеробна грам-отрицателна коковидна бактерия като *Parasoccus denitrificans* е довело до появата на протист с митохондрии. Класически пример е *Pelomyxa palustris* (Margulis, 2006). **4. Произход на хлоропластите:** еукариотни клетки, съдържащи митохондрии и хлоропласти, са се развили чрез асоцииране на фотосинтетични ендосимбионти като фотосинтезиращи бактерии или цианобактерии. Гените на пластидите поразително приличат на цианобактериите по организацията, последователността и начина на експресия. Филогенетичният анализ на рибозомната РНК и на туйф А последователностите показват цианобактериален произход на всички пластиди. *Synechocystis*

paradoxum е добре проучен пример за симбионтен цианобактерий. В камшичестите криптомонади и динофлагелати, хлоропластите представляват второ поколение ендосимбионти. Този тип вторична/третична ендосимбиоза води до няколко комплекта мембрани около хлоропластите, в които най-външната мембрана представлява клетъчната мембрана на последния ендосимбионт. **5. Произход на пероксизомите:** пероксизомите може да са се образували чрез ендцитоза на прокариоти с детоксикиращи способности. **6. Произход на системата** на ендоплазмената мрежа и лизозомите (ЕПМ): лизозомите се развиват чрез инвагинирали везикули (мехурчета) с ензими. По-нататъшното разширяване на инвагинациите в цитоплазмата образува тръбеста мрежа, от която се развиват апарата на Голджи и ЕПМ. Вторият вариант на симбионтната хипотеза е по-приемлив поради това, че поставя появата на митохондрии в началото.

6. *Синтрофна* хипотеза: метаболитна симбиоза (синтрофия) между еубактерия и термофилен археон-метаноген е довела до миксотрофни еукариоти. Миксотрофията е смесено хранене: на светло – фотосинтеза, а на тъмно – хетеротрофно хранене. Характерна е за зелената еуглена. Синтрофията означава съществуването на един вид организми върху метаболитните продукти на друг вид. Лин Маргулис (2006) обяснява произхода на еукариотното ядро чрез синтрофно сливане между термоацидофилен архебактерий и плуващ еубактерий, при което естественният отбор е покровителствал химерния организъм еукариот. Местообитанията са били периодично добре осветявани, което е благоприятствало развитието на цианобактерии и натрупване на органични вещества.

7. *Инвазия от интрони.* Хипотезата за ендосимбиозата важи не само за митохондриите и хлоропластите, но и за ядрото (Woese 1977). Ядрото е нова органела, възникнала в резултат на амалгама на две прокариотни клетки, които са погълнати от РНК примитивен организъм. Не е изяснено дали прокариотните клетки са на бактерии, или на археи. Ядрото има две мембрани, външната е свързана с поглъщащия организъм и е продължение на ЕПМ, а вътрешната е резултат на множество ендосимбионтни събития. Двете мембрани образуват пори, през които ядрото комуникира с цитоплазмата, като транскрипцията остава вътре в него, а трансляцията – в цитоплазмата. В тази връзка, еволюират три вида РНК полимерази от бактериалната полимераза. Не е ясно как бактериален хромозом се е превърнал в еукариотен хромозом и как хромозомите на едноклетъчните са станали хромозоми на многоклетъчните организми. Примитивният еукариот е възникнал в анаеробни условия. За да си изясним същността на РНК организма, трябва да разберем какво представляват РНК вирусите, които преобладават в еукариотните клетки. РНК вирусите са два вида – едновирижни и двувирижни. Двувирижните вируси имат ДНК ге-

номи. Едноверижните РНК вируси са или информационни РНК (РНК+) или комплементарни на иРНК (РНК-). Всички РНК вируси имат висока честота на мутации (10^{-3} до 10^{-4}) за включен нуклеотид, защото нямат механизъм за коригиране на грешките. Всеки комплексен вирус има сегменти от по 10 нуклеотида. Ако РНК вирусите са остатъци от древни РНК клетки, то техният геном трябва да бъде сегментиран. Вироидите (растителни вируси без белтъчна обвивка) са избягали интрони, а РНК зреенето е остатък от примитивно състояние на РНК вирусите. Примитивните геноми са изградени от малки части (100 нуклеотида), които са еволюирали в големи части (10^5 нуклеотида). Някои от малките части са станали интрони. Еволюцията на големи части (сегменти) на РНК от малки части включва еволюция на сплайсинга (зреенето) на РНК и неговия контрол. Малки стабилни РНК-и се намират в ядрото и цитоплазмата на днешните еукариотни клетки. Голяма част от примитивния РНК организъм се съдържа в еукариотната клетка. Според закона на Коуп типичните прогресивни линии са еволюирани от неспецифични форми (закон за неспециализацията). При появата на специализирани клетки старите неспециализирани РНК клетки са поглъщали своето поколение и са образували еукариотни клетки. При поява на по-сложно състояние на дадена система, малките механизми в нея се използват за контрол. Контролиращият механизъм трябва да може да изпраща информация и да я получава. Остатъци от древни малки системи за контрол се намират в малки пептиди, малки РНК и хормони (стероиди). Малките РНК в еукариотната клетка се използват за контрол и структура.

Еукариотно ядро с интрони и сплайсеозоми, възникнало чрез митохондриален ендосимбионт, създава силен селективен натиск, чрез който се изключват рибозомите около хромозомите и се предизвиква компартиментализация на ядрото и цитозола. Нарушава се котранскрипционната трансляция и се постига правилното зреене на иРНК.

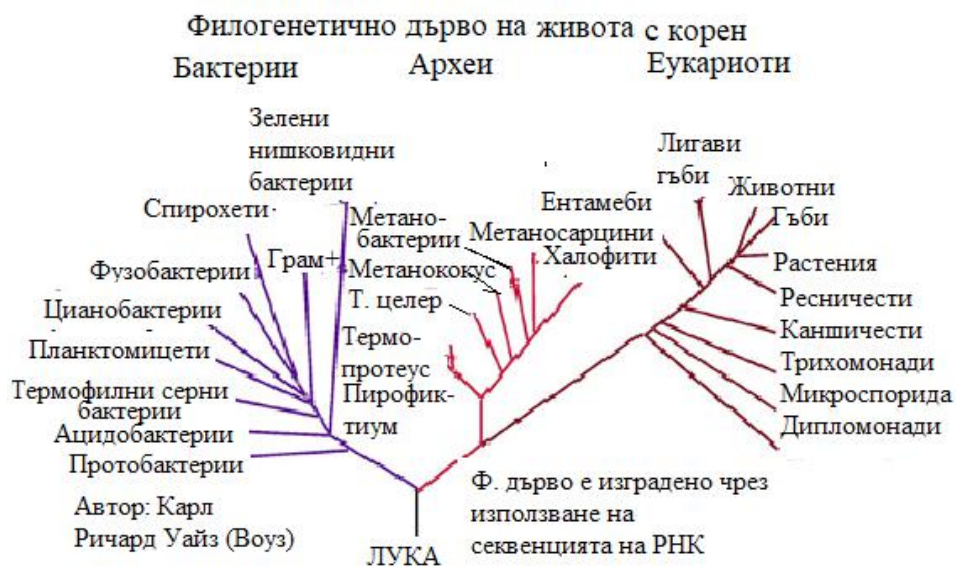
Цитозолните рибозоми на еукариотите са хомологни с прокариотните рибозоми в археите според данни от последователността на протеиновия и на рибонуклеиновия компонент на рибозомата. Това показва, че цитоплазмата на еукариотите е произлязла от археите. Археон е станал гостоприемник на еубактерий, който е образувал митохондрий. Въз основа на тези данни се изграждат нови еволюционни дървета. Други доказателства за тази теза идват по биоенергийни причини – еволюционните изобретения, които отделят еукариотите от прокариотите, изискват повече енергия. Митохондриите осигуряват на еукариотите 4 – 5 пъти повече енергия на ген. Синтезът на протеини изразходва ~75% от енергийния бюджет на клетката, репликацията на ДНК само ~3%.



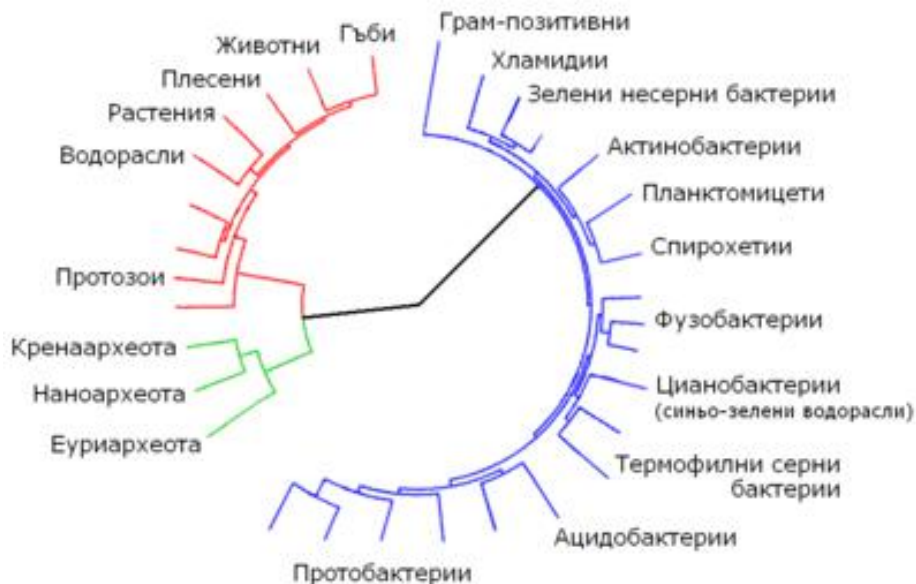
Фигура 6. Еволюция на прокариоти и еукариоти

Урکاریотът е еволюционен родоначалник на ядрения геном на еукариотните клетки, а митохондрияте и хлоропластите са придобити от еубактериалната линия като резултат от ендосимбиоза, включваща представители съответно на пурпурни фотосинтезиращи бактерии и цианобактерии. Според това виждане Археи, Бактерии и Урکاریота (предшественик на ЛЕКА) имат общ родоначалник, наречен Прогенот – организационно равнище преди появата на ЛУКА. Анализите на молекулната организация на различни клетъчни компоненти показва, че ЛУКА има прокариотна организация и е еволюирал от по-ниско равнище на клетъчна организация. На равнище Прогенот гените и кодираните от тях белтъци са по-малки и точността на транскрипцията и транслацията е по-неточна от прокариотното равнище на клетъчна организация. От прости саморепликиращи се молекули възниква Прогенот – междинно звено между РНК свят и първите прокариоти (ЛУКА), които са имали ДНК и РНК полимераза, сложни рибозоми, изградени от тРНК и белтъци, както и мембрани за използване на спрегнатата хемиосмоза. ЛУКА съдържа геном, който кодира много биохимични и структурни функции – репликация на генома, транслация на геномната информация във функционални молекули и образуване на полупропусклива преграда между

организма и заобикалящата го среда. Усложняващата се клетъчна организация е изисквала все повече и повече гени. Прокариотният тип опаковка на наследствения материал (една пръстенна „хромозома“) е удобен за къси ДНК вериги, но явно неподходящ за по-дългите. Родоначалникът на еукариотите (ЛЕКА) е преминал към линейни молекули ДНК, и то обикновено повече от една. Вероятно митозата, въведена заедно с ядрото, впоследствие е позволила ДНК да се разпределя успешно между дъщерните клетки дори ако е опакована в две или повече различни хромозоми. Новото филогенетично дърво (фиг. 7) е с два клона – Прокариоти и Еукариоти. Ендосимбиозата и генетичните взаимодействия между археи и бактерии са допринесли за оформянето и отделянето на втория клон на живота.



Фигура 7а. Филогенетично дърво на живота с корен по С. R. Woese, 1977



Фигура 76. Филогенетично дърво на живота без корен

Началото на живота на Земята винаги е било загадка за търсещия човешки ум. ЛУКА не е първият жив организъм, но е последният, оставил своите генетични следи в днешните организми. ЛУКА е свидетелят на началото на биологичната еволюция – Ч. Дарвин, (Darwin 1959), предшествана от биохимичната еволюция. Стивън Гулд и Елдредж Найлс през 1972 г. представят нов модел на еволюцията, наречен *прекъснато равновесие* (punctuated equilibrium), алтернативен на Дарвиновия модел – *филетичен градуализъм*. Според тях „Еволюцията е бавен процес, но от време на време се извършват големи скокове напред за кратко време“ (Gould 2002).

Метаболитните пътища влияят върху размера на генома при еубактериите, архебактериите и еукариотите. Като цяло, са необходими повече гени за автотрофия (хемолитотрофия и фототрофия), отколкото за осмотрофия (с изключение на фаготрофията при еукариотите). Автотрофите обикновено имат най-големите минимални размери на генома. Пренасочването на голяма част от генома към фотосинтетичния апарат означава, че фототрофните организми имат по-бавни темпове на растеж от хемоорганотрофите. Еукариотите са възникнали само веднъж, а многоклетъчността има многоброен произход. Цитозолният FeS клъстер се е появил преди третата ендосимбиоза в растенията, водеща до пластиди. Всички основни еволюционни преходи имат енергийна основа, а в някои случаи – и енергийна причина. Няма енергия, няма еволюция. Синтезът на енергетика и генетика дава възможност еволюцията на клетките да

се разглежда в нова светлина (Lane et al. 2013). Тази насока е от значение и за осветяване на централните аспекти на човешкото здраве и стареене.

ЛИТЕРАТУРА

- КАРПАЧЕВ, В. В., 2020. Развитие цивилизаций и технологии происхождения видов. *Litres*, ISBN 5041981078, 9785041981075
- КОСЕКОВА, Г., Митев, В., Алексиев, А., Николов, Т., 2004!. *Лекции по биохимия*. София: Централна медицинска библиотека, 448 стр.
- МАРКОВА, М., 2006. *Молекулни основи на живота Еукариотна клетка – Eukaryotic cell (mayamarkov.com)*
- НИКОЛОВ, Т., 1971. *Обща биохимия*. София: Наука и изкуство, 588 стр.
- ЯСТРЕБОВ, С., 2018. Источником энергии для древнейшей жизни мог служить ацетилфосфат. *Элементы, Новости науки, Биохимия*.

REFERENCES

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P., 2006. *Molecular biology of the cell*. (4th ed.): Alberts, B., 4th edition. *Biochemistry and Molecular Biology Education*
- ARORA, Sh. *Hypothesis and the Origin of Eukaryotic cell. Biology* <https://www.biologydiscussion.com/eukaryotic-cell/hypothesis-and-the-origin-of-eukaryotic-cell-biology/38563>. <https://www.biologydiscussion.com/disclaimer> Shruthi Arora
- Bell, P.J., 2001. Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus? *Journal of Molecular Evolution* **53**(3), 251 – 6.
- COOPER, K., 2017. Looking for LUCA, the last universal common ancestor. *Astrobiology at NASA. Life in the Universe*, 30th of March.
- FITZPATRICK, D. A, CREEVEY CH. J, MCINERNEY J. O. (2006) Genome phylogenies indicate a meaningful α -proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales, *Molecular Biology and Evolution*. **23**(1), 74 – 85.
- GROCHOWSKI, L., WHITE, R.H., 2010. Biosynthesis of coenzyme F430. *Comprehensive Natural Products II*.
- GOULD, S. J., 2002. *The Structure of Evolutionary Theory*. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University Press. p. 775. ISBN 978-0-674-00613-3.
- HARTMAN, H., FEDOROV, A., 2002. The origin of eukaryotic cell: A genomic investigation. *PNAS*. **99**(3), 1420 – 1425; <https://doi.org/10.1073/pnas.032658599>

- KARPACHEV, V. V., 2020. Razvitie tsivilizatsiy i tehnologii proizhozhdeniya vidov. Litres, ISBN 5041981078, 9785041981075 [in Russian].
- KOSEKOVA, G., Mitev, V., Aleksiev, A., Nikolov, T., 2004!. Lektsii po biohimiya. Sofiya: Tsentralna meditsinska biblioteka, 448 str. [in Bulgarian].
- KU, C., NELSON-SATHI, S., ROETTGER, M. et al., 2015. Endosymbiotic origin and differential loss of eukaryotic genes. *Nature.*, **524**, 427 – 432. <https://doi.org/10.1038/nature14963>
- LAKE, J.A., HENDERSON, E., OAKES, M., CLARK, M.W., 1984. Eocytes: A new ribosome structure indicates a kingdom with a close relationship to eukaryotes. *Proc National Academy of Sciences of the USA.* **81**, 3786 – 3790.
- Margulis, L., Chapman, M., Guerrero, R., Hall, J., 2006. The last eukaryotic common ancestor (LECA): Acquisition of cytoskeletal motility from spirochetes in Proterozoic Eon. *PNAS* **103**(35), 13080-13085; <https://doi.org/10.1073/pnas.0604985103>
- MARKOVA, M., 2006. Molekulni osnovi na zhivota Eukariotna kletka – Eukaryotic cell (mayamarkov.com) [in Bulgarian].
- MARTIN, W. F., 2011. Early evolution without a tree of life. *Biol Direct.* **6**, 36. [Published online 2011 Jun 30. doi: 10.1186/1745-6150-6-36PMCID: PMC3158116].
- MARTIN, W. F., SOUSA, F., 2016. Early microbial evolution: The age of anaerobs. *Gold Spring Harbor Perspect Biology.* **8**(2): a018127, doi: 10.1101/cshperspect.a018127 Perspect Biol
- MAYNARD-SMITH J, SZATHMÁRY E., 1995. *The Major Transitions in Evolution.* Oxford: Oxford University Press [Google Scholar]
- RIBOCYTE, 2008. Ribocyte. In: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics.* Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_14633
- NIKOLOV, T., 1971. Obshta biohomiya. Sofiya: Nauka i izkustvo, 588 str. [in Bulgarian].
- SCHLEGEL, K., MULLER, V., 2011. *Methods in methane metabolism. Part A, Methods in Enzymology.*
- SERAVIN, L. N., 1986. The origin of the eukaryotic cell. IV. The general hypothesis of the autogenous origin of eukariotes. *Tsitologia.* **28**(9):899-910. PMID: 3541331
- SOUSA F.L., THIERGART T., LANDAN G., NELSON-SATHI S., PEREIRA I.A., ALLEN J.F., LANE N., MARTIN W.F., 2013. Early bioenergetic evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **368**. doi: 10.1098/rstb. 0088. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- THAUER, R.K., 1973. CO₂ reduction to formate in *Clostridium aciduri*. *Journal of Bacteriology.* **114**(1), 443 – 444.

- WOESE, C. R., FOX, G. E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*. **74**(11), 5088–5090. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/270744/>
- ZAKHAROV-GEZEKHUS, I. A., 2010. 100 years of symbiogenesis theory. *Ecological Genetics* **8**(2), 66-70. DOI: 10.17816/ecogen8266-70
- YASTREBOV, S., 2018. Istochnikom energii dlya drevneyshey zhizni mog sluzhity atsetilfosfat. *Elementay, Novosti nauki, Biohimiya* [in Russian].

FROM LUCA TO LECA AND TO THE EVOLUTIONARY TREE OF LIFE

Abstract. The article analyzes contemporary research on early microbial evolution starting from LUCA (Last universal common ancestor) to the establishment of the two branches of the empire (superkingdom) Prokaryota – Archaea and Bacteria. Under discussion are the basic stages and driving forces of biochemical, physiological and biological evolution of acetogens and methanogens and the role of genetic divergency and natural selection for the creation of microbial diversity. An attempt was made for the representation of different views on the origin of the nucleus and other cellular components, connected to the evolution of the eukaryotic cell.

Keywords: acetogenesis; methanogenesis; archaea; bacteria; metabolism of prokaryotes; LECA; horizontal gene transfer; origin of eukaryotes; endosymbiosis

✉ **Assoc. Prof. Zdravka Kostova, DSc**

ORCID iD: 0000-0001-8879-7680

Department of Information and In-service Teacher Training

Sofia University

Sofia, Bulgaria

E-mail: zdravkako@abv.bg.