

Arheje Asgard najbliži prokariotski srodnici eukariota

Kureljak, Dunja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:576367>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Arheje Asgard – najbliži prokariotski srodnici eukariota

**Asgard archaea - the closest prokaryotic relatives of
eukaryotes**

SEMINARSKI RAD

Dunja Kureljak

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Biljana Balen

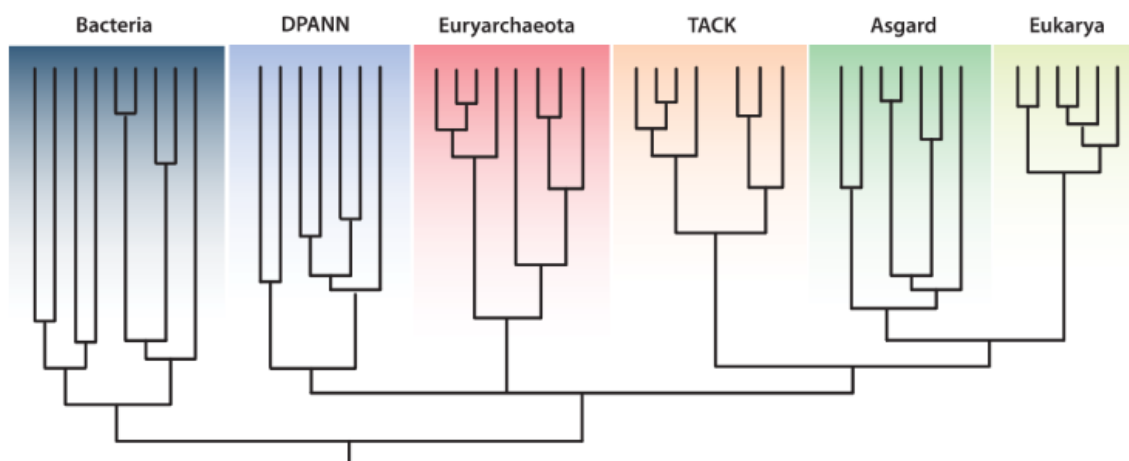
Zagreb, 2019.

Contents

1. UVOD	1
2. EKOLOGIJA ASGARD ARHEJA	2
2.1 Rasprostranjenost Asgard arheja	2
2.2. Mikrobne asocijacije	3
3. METABOLIZAM ASGARD ARHEJA	4
3.1. Metabolizam ugljika	4
3.2. Sudjelovanje u kruženju dušika i sumpora	7
3.3. Anaerobni način života	7
4. POVEZANOST S EUKARIOTIMA	9
4.1. Proteini ESPs za citoskelet	9
4.2. Proteini ESPs za membranski transportni sustav	10
5. NAPREDAK U OTKRIĆU RAZNOLIKOSTI ARHEJA	12
6. ASGARD ARHEJE I EUKARIOGENEZA	16
7. ZAKLJUČAK	19
8. LITERATURA	20
9. SAŽETAK	23
10. SUMMARY	24

1. UVOD

Stablo života prema Woese-ovom modelu podijeljeno je u tri domene: arheje, bakterije i eukariote, s topologijom arheja i eukaria kao sestrinskih skupina. Tome se suprotstavila Eocitna hipoteza predlažući razvitak eukariota unutar domene arheja na temelju sličnosti u kompoziciji proteina eukariota i arhealnog koljena Crenarchaeota. Zatim su filogenetske analize smjestile arhealno nadkoljeno TACK (Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota i Korarchaeota) bliskosrodnim eukariotima, a najrecentnijim istraživanjima to ključno mjesto zauzelo je upravo Asgard nadkoljeno (Slika 1). Stoga ne čudi njihov naziv – Asgard, prema nordijskoj mitologiji dom bogova i jedan od devet svjetova. Agard arheje sačinjavaju koljena Lokiarchaeota, Thorarchaeota, Odinararchaeota, Heimdallarchaeota i Helarchaeota. Prisutne diljem svijeta, raznolikog metabolizma i po mnogočemu nalik eukariotima, ove su arheje predmet istraživanja brojnih znanstvenika te omogućuju rasvijetljavanje jednog od najsloženijih događaja evolucije - eukariogeneze.



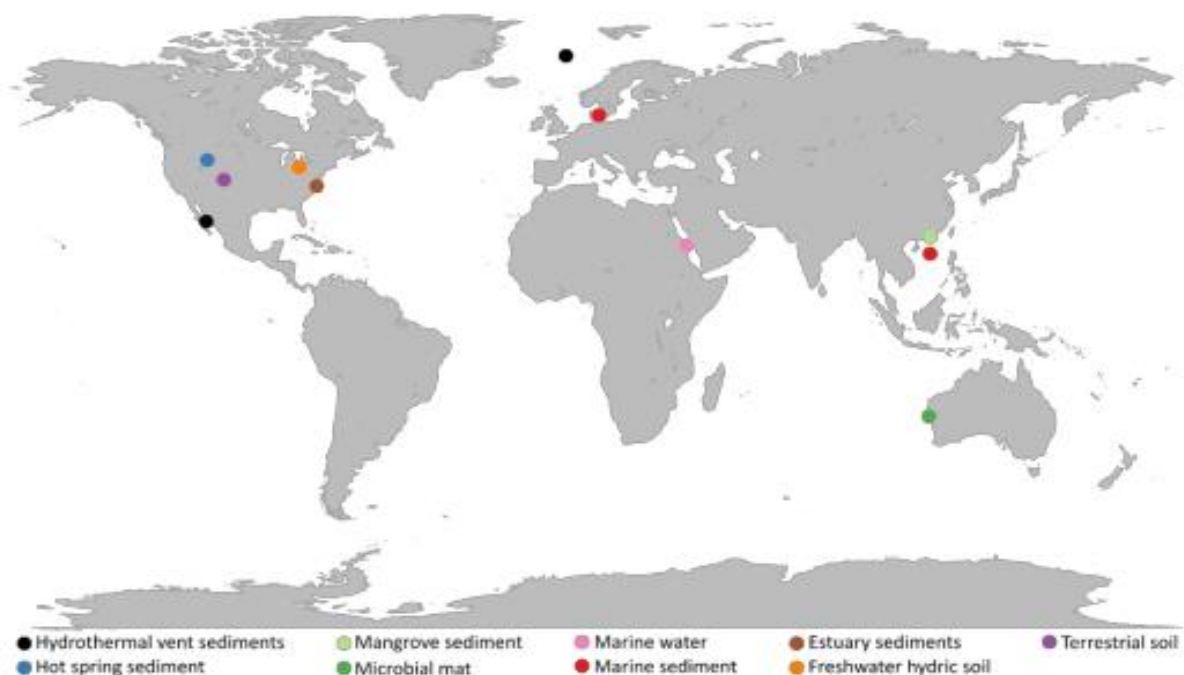
Slika 1. Shematski prikaz stabla života. DPANN nadkoljeno uključuje Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota, Woesearchaeota i Pacearchaeota, a TACK nadkoljeno Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota i Korarchaeota (preuzeto iz Robinson, N. P. (2018))

U ovom ću radu iznijeti kratak pregled najnovijih saznanja vezanih za nadkoljeno Asgard. Naglasak će biti na njihovoj raznolikoj ekologiji i metabolizmu, otkrićima sve većeg broja proteina eukariotskog potpisa, koje ove arheje sadrže, te njihov utjecaj na razumijevanje i razvoj novih modela procesa eukariogeneze.

2. EKOLOGIJA ASGARD ARHEJA

2.1 Rasprostranjenost Asgard arheja

Koljeno Lokiarchaeota je prvo opisano koljeno Asgard arheja (Spang i sur.,2015) te je u proučavanim mikrobiomima veće zastupljenosti od ostalih pripadnika nadkoljena Asgard. Otkriveno je u dubokomorskim sedimentima hidrotermalnih izvora. Koljena Thorarchaeota, Odinararchaeota i Heimdallarchaeota opisana su metagenomskim profiliranjem različitih sedimentnih staništa. Ova koljena pokazala su manju brojnost članova unutar mikrobioma razmatrajući 16S rRNA. Također, koljeno Odinararchaeota prisutno je gotovo isključivo na staništima visoke temperature (Zaremba i sur., 2017.) Staništa na kojima su izvedena metagenomska profiliranja u velikoj su mjeri anaerobna, uključujući dubokomorske sedimente, estuarije, kopno i pelagičke vode (Slika 2). Brojnost Asgard arheja veća je u hidrotermalnom okolišu te onome bogatom metanom za razliku od kopnenog i slatkovodnog okoliša.



Slika 2. Globalna distribucija Asgard arheja (preuzeto iz MacLeod i sur., 2019.)

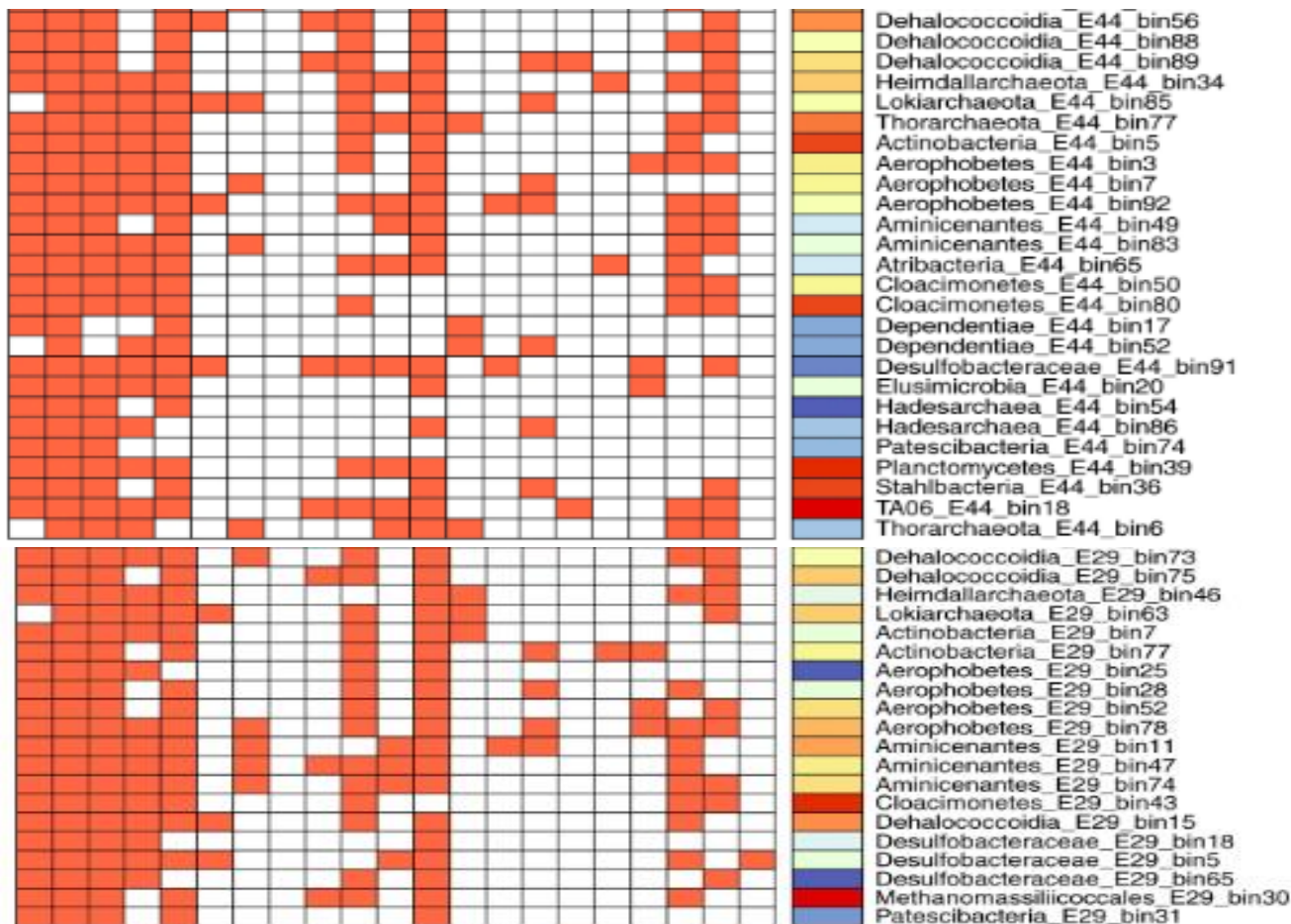
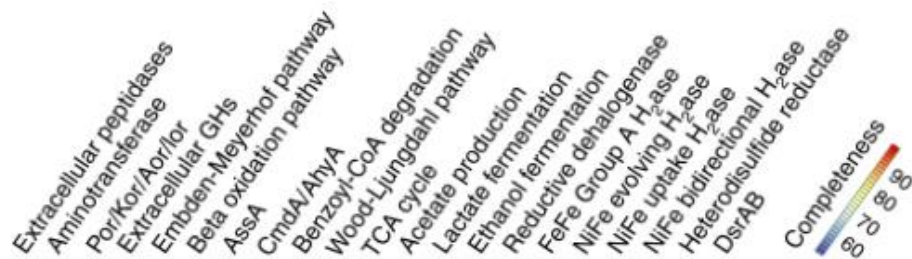
2.2. Mikrobne asocijacije

Mikrobne interakcije imaju važnu ulogu u funkcioniranju ekosustava te su zastupljene posebice u anoksičnim okolišima. To su primjerice metan- i butan-oksidirajuće Euryarchaeota od kojih brojne obligatno ovise o partnerskom organizmu. U radu Spang i sur., (2019) pretpostavljeno je da su proteini eukariotskog potpisa (engl. *eukaryotic signature proteins*; ESPs) Asgard arheja potpomognuli tranziciju iz metaboličke simbioze s drugim organizmom, tj. sintrofije u kompleksniju simbiozu. Primjerice, produkcija staničnih dijelova temeljenih na aktinu mogla je dovesti do snažnije interakcije između partnera, omogućavajući učinkovitiju suradnju s bakterijskim simbiontom, što je u konačnici moglo dovesti do endosimbioze. Istraživanje Seitz i sur., (2019) detektiralo je nekoliko transmembranskih motiva u proteinima koljena Helarchaeota koji potencijalno mogu omogućiti prijenos elektrona u obliku vodika na partnerski organizam i tako pospješiti anaerobnu oksidaciju alkana ovog koljena Asgard arheja. Također, Sghaï i sur., (2017) zabilježili su snažnu pozitivnu korelaciju između koljena Lokiarchaeota i potencijalnog bakterijskog reda oznake TA06 na mikrobnim obraštajima pustinje Atacama (Čile) koji čine topao, plitak morski okoliš. Oba organizma žive u anoksičnim uvjetima te stoga ova korelacija predstavlja zanimljivu arhealno-bakterijsku interakciju koja zahtjeva daljnje proučavanje.

3. METABOLIZAM ASGARD ARHEJA

3.1. Metabolizam ugljika

U radu Dong i sur., (2019) istražena je uloga mikrobnih zajednica u razgradnji organskih tvari, uključujući biomasu detritusa i naftne ugljikohidrate. Korištene su metagenomske, geokemijske i metabolomičke metode uzorkovanja dubokomorskih sedimenata (dubina vode oko 3 km). Metagenomi su generirani iz uzoraka te sakupljeni i grupirani kako bi se dobili metagenomski-sastavljeni genomi (eng. *metagenome-assembled genomes*; MAG-ovi) i rekonstruirali metabolički putevi dominantnih članova mikrobne zajednice. Sposobnost razgradnje masnih kiselina i drugih organskih kiselina putem beta-oksidacije identificirana je u 13 genoma MAG uključujući koljeno Lokiarchaeota (Slika 3). U uzorcima je identificirano više od 50 metabolita iz 8 putova uključujući ugljikohidratni metabolizam (npr. glukoza), metabolizam amino kiselina (npr. glutamat) i beta-oksidaciju (npr. 10-hidroksidekanoat). Stoga su Asgard arheje uključene u reckiliranje rezidualne organske tvari podmorja. Dokazana je prisutnost dva od četiri poznata puta za aktivaciju C-H veza neovisna o kisiku: hidroksilacija s vodom uz pomoć enzima koji kao kofaktor koristi molibden i adicija ugljikovodika na fumarat enzimima koji u aktivacijskom središtu sadrže glicilne radikale. Ovi posljednji enzimi posreduju adiciji ugljikovodika na fumarat u 13 genoma MAG uključujući koljena Thor- i Lokiarchaeota. Analize su pokazale je da primarni model prometa ugljika u uzorkovanim okolišima fermentacija. Brojni MAG-ovi posjeduju gene koji indiciraju sposobnost fermentativne produkcije acetata, laktata i etanola (Slika 3). Acetat također može biti sintetiziran acetogenom redukcijom CO₂ Wood–Ljungdahl-ovim (WL) putem koristeći razne anorganske i organske supstrate. Dva su tipa puta WL, ovisno o nositelju C1 atoma: jedan koristi tetrahidrofolat (THF), a drugi tetrahidroetanopterin (THMPT). Istraživanja su pokazala da koljeno Thorarchaeota iz prijelaznih zona sulfat-metan, hiperslanih mikrobnih obraštaja i mangrova imaju kompletan set gena za put THM-WL, što ukazuje na sposobnost vezanja CO₂ autotrofnom acetogenezom. Za razliku od njih, u koljenu Lokiarchaeota, ovisnom o vodik, su anaerobne autotrofne arheje koje imaju kompletan set gena za put THMPT-WL, što olakšava vezanje CO₂. Koljeno Odinarchaeota također kodira za put THMPT-WL, dok koljeno Heimdallarchaeota kodira za oba puta (MacLeod i sur., 2019.) Budući da su sposobne metabolizirati i autotrofno i heterotrofno, ovo nadkoljeno moglo bi biti miksotrofnog načina života, iako je takav zabilježen samo u koljenu Thorarchaeota i liniji Heimdallarchaeia.



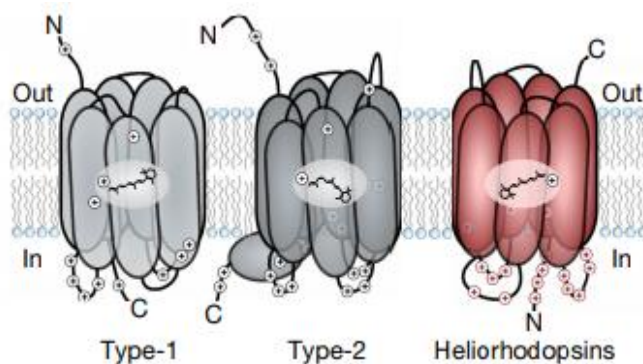
Slika 3. Identifikacija funkcionalnih gena ili puteva prisutnih u metagenomski sastavljenim genomima (preuzeto i prilagođeno iz Dong i sur., 2019.)

Rezerve zemnog plina u oceanskim dubinama podupiru kompleksne zajednice anaerobnih mikroba uključujući arhealne linije s potencijalom za oksidaciju ugljikohidrata. Genom koljena Helarchaeota kodira za metil-koenzim M enzime slične reduktazi (*Mcr*) koji slične onima nađenima u butan-oksidirajućim arhejama, kao i nekoliko enzima potencijalno uključenih u oksidaciju alkil-CoA i WL put. Kratkolančani acil-CoA može biti oksidiran u acetil-CoA koristeći beta-oksidaciju putem kratkolančane acil-CoA dehidrogenaze, enoli-CoA hidrataze i acetil-CoA acetil transferaze, enzima koji su svi prisutni u genomu Helarchaeota, a nađeni su i u drugim Asgard arhejama. Osim ovih enzima, identificirani su i geni za elektron transfer flavoproteinski kompleks te su otkriveni geni koji kodiraju za acetat-CoA ligazu i alkohol-dehidrogenazu, sugerirajući da su ovi organizmi sposobni izvoditi fermentaciju i proizvoditi acetil-CoA koristeći acetat i alkohole te gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). Budući da je prisutnost gena *Mcr* unutar Asgard nadkoljena

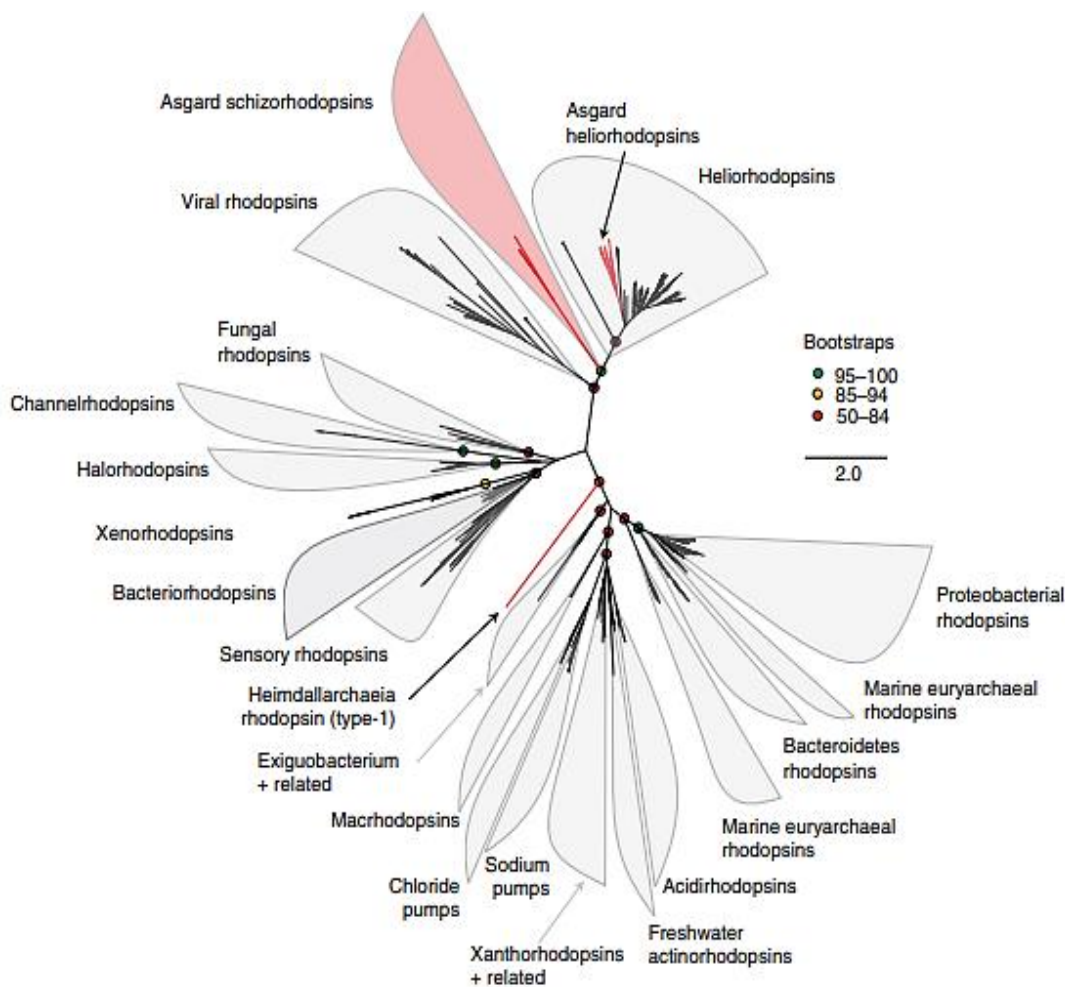
ograničena samo na koljeno Helarchaeota, moguće je da su ovi geni horizontalno transferirani od strane Batrzarchaeota ili Syntrophoarchaea pa ne sačinjavaju ancestralno obilježje unutar nadkoljena (Seitz i sur., 2019.) Ipak, sačuvanje horizontalno transferiranog puta indikacija je kompetitivne prednosti pa slijedi da transfer gena između različitih arhealnih koljena reflektira oksidaciju alkana kao poželjnu metaboličku karakteristiku.

Koljena Thor-, Loki- i Heimdalararchaeota te djelomično Helarchaeota imaju ribuloza bisfosfat karboksilazu (RuBisCo), glavni enzim za fiksaciju ugljika u Calvin-Benson-Bassham (CBB) fototrofnom putu. Analize su pokazale da enzim RuBisCo Asgard arheja nema ulogu u fotosintezi, već je povezan sa tipovima RuBisCa III I IV. Ovi tipovi enzima ne sudjeluju u CBB ciklusu, nego u metabolizmu i asimilaciji nukleozida. Stoga su Asgard arheje sposobne asimilirati ostatke nukleotida u glavne ugljikohidratne putove.

Recentno istraživanje Pushkareva i sur., (2019) je u koljenima Heimdall- i Thorarchaeota identificiralo je pigment heliorodopsin (HeR). Ova donedavno nepoznata i raznolika skupina pigmenata uklopljena je u membranu s amino krajem (N-terminus) prema staničnoj citoplazmi, orijentacije suprotne rodopsinima tipa 1 i 2 (Slika 4). Ustanovljeno je da je heliorodopsin daleko srodan rodopsinu tip-1 te poput ovog tipa funkcionira kao protonska pumpa. Rezultati Bulzu i sur., (2019) pokazuju da jedan od genoma MAG koljena Heimdallarchaeia kodira za tip-1 rodopsina što upućuje na osjetljivost na svjetlo. Također genomi MAG Asgard arheja iz ovog istraživanja kodiraju za sekvence rodopsina koje su filogenetskim analizama svrstane između heliorodopsina i tip-1 rodopsina (Slika 5). Zbog prisutnosti karakteristika tih dvaju tipova rodopsina, ovaj novootkriven označen je kao schizorhodopsin (SzR). Posjedovanje brojnih pigmenata sugerira da su u prošlosti Asgard arheje bile smještene pri površini sedimentnih slojeva izloženih svjetlosti te su potencijalno mogle registrirati i asimilirati svjetlost.



Slika 4. Shematski prikaz topologije membrane za tip-1 rodopsin, tip-2 rodopsin i heliorodopsin. N - amino-terminalni rep, C - karboksi-terminalni rep (preuzeto iz Pushkarev i sur., 2018.)



Slika 5. Filogenetska analiza rodopsina. Neukorijenjeno *Maximum-likelihood* stablo svih schizorodopsina Asgard arheja (n=6), heliorodopsina i tipa-1 rodopsina. Crvene grane su sekvence iz Asgard arheja. *Bootstrap* vrijednost na čvorovima pokazana je obojenim krugovima (vidi ključ boja zdesna). (preuzeto iz Bulzu i sur., 2019.)

3.2. Sudjelovanje u kruženju dušika i sumpora

Koljeno Heimdallarchaeota sadrži nitrat i nitrit reduktazu što ukazuje na uključenost u redukciju nitrata te denitrifikaciju. Nitrit reduktaza pronađena je u svim koljenima Asgard arheja, izuzev Odin- i Helarchaeota. Zbog toga je nitrit uz peptide potencijalni izvor dušika. Sve Asgard arheje kodiraju za sulfat adenililtransferazu i fosfoadenozin fosfosulfat reduktazu, indicirajući tako mogućnost redukcije i aktivacije sulfata.

3.3. Anaerobni način života

Kako je većina genoma Asgard arheja identificirano u anoksičnim okolišnim uvjetima te ove arheje imaju metabolizam neovisan o kisiku uvriježeno je mišljenje da su obligatno anaerobni organizmi. Slučaj suprotan tome zabilježen je u linije Heimdallarchaeia koja je miksotrofna te potencijalno posjeduje fakultativno aeroban metabolizam. U istraživanju Bulzu i sur., (2019)

dokazana je prisutnost komponenata aerobne respiracije: kompletan ciklus trikarboksilne kiseline podržan lancem prijenosa elektrona koji sadržava ν /A-tip ATP-azu, sukcinat-dehidrogenazu, NADH-kvinon oksidoreduktazu i citokrom c oksidazu. Rekonstrukcija putova ovisnih o kisiku ove linije ostavlja mogućnost da je arhealni protoeukariotni predak također mogao biti fakultativni aerob.

4. POVEZANOST S EUKARIOTIMA

Filogenomska istraživanja dokazala su smještaj eukariota unutar Asgard arheja i dokazano je da genom nadkoljena Asgard sadrži više proteina od bilo koje druge linije arheja (Spang i sur., 2015). Ovi proteini koji su prije smatrani specifičnima za eukariote uključuju set malih GTP-aza, eukariotsku porodicu proteina RLC7, homologe aktina, proteine s domenom gelsolin, komponente eukariotskog sustava ESCRT I, II I III (endosomalni sortirajući kompleksi zaduženi za transport) uključujući dvije podporodice proteina SNF7, ubikvitinske komponente te homologe eukariotskih proteina translokacijskog i glikozilatnog puta. Brojni od njih pripadaju proteinima koji u eukariota izvode brojne regulatorne procese kao što su remodeliranje citoskeleta, signalna transdukcija i promet vezikula. Pokazalo se da red *Lokiarchaeum* kodira za ribosom najbližnji eukariotskom koji je do sada identificiran u arheja, predloženi homolog eukariotskog ribosomalnog proteina L22e.

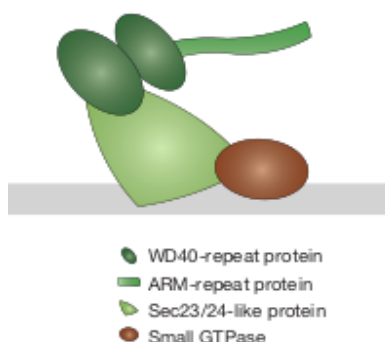
4.1. Proteini ESPs za citoskelet

Aktin je glavni protein citoskeleta eukariotske stanice te polimerizira u filamente pružajući mehaničku potporu, određuje stanični oblik te je ključan za brojne stanične procese uključujući diobu stanice, pokretljivost, fagocitozu te promet vezikula (Cooper i sur., 2007). Koljeno *Lokiarchaeota* kodira za pet homologa aktina koji pokazuju veliku sličnost s aktinom eukariota te su nazvani lokiaktinima. Profilini su skupina regulatora dinamike citoskeleta eukariota. To su proteini koji vežu aktin i potiču ugradnju aktinskih monomera u filamente (Cooper i sur., 2007). Asgard arheje kodiraju za multifunkcionalne profiline slične eukariotskima (Zeremba i sur., 2017), za razliku od prokariotskih profilina koji imaju jednu funkciju (Gunning i sur., 2015). Loki profilin-1, Loki profilin-2 i Odin profilin imaju tipično profilinsko smatanje te su sposobni interagirati s eukariotskim aktinom usprkos milijardama godina evolucije koje su prošle od razvitka arhealno-eukariotskog zajedničkog pretka. Asgard arheje posjeduju primordijalni, polarni sustav aktina reguliran profilinom koji je vjerojatno lokaliziran na membranama zahvaljujući osjetljivosti Asgard profilina I fosfolipida (Ak1 i sur., 2018). Značajna je identifikacija ortologa tubulina u koljena *Odinarchaeota* jer je srodniji eukariotskom tubulinu od prijašnje zabilježenog arhealnog homologa tubulina, *artubulina* u koljena *Thaumarchaeota* (Zeremba i sur., 2017). Otkriće homologa aktina i tubulina zajedno s proteinima koji posjeduju domenu profilina i gelsolina pokazuje da Asgard arheje sadrže sofisticirani citoskeletni sustav s homologima ključnih citoskeletnih komponenti

eukariota. Moguće je stoga da se zbog zajedničkog porijekla Lokiaktina i eukariotskog aktina proliferacija aktina pojavila već u arhealnom pretku eukariota.

4.2. Proteini ESPs za membranski transportni sustav

U eukariota biogeneza, očuvanje i funkcioniranje organela omeđenih membranom ovisi o kretanju molekula od jednog do drugog organela prometom vezikula. Ovaj proces započinje dolaskom vezikularnih proteina omotača na određenu membranu, gdje sakupljaju “teret” i oblikuju membranu u vezikulu. Tri su tipa omotača: COPII (*coat protein II*), COPI (*coat protein I*) te klatrin i AP (*adaptor protein*) kompleksi. Oni dijele brojne karakteristike koje podržavaju ideju o zajedničkom podrijetlu – primordijalni kompleks omotača. (engl. *primordial coat complex*). To je primjerice isti osnovni mehanizam za prihvaćanje na membranu putem malih GTP-aza (enzimi koji kataliziraju hidrolizu gvanozin-trifosfata (GTP) u gvanozin-difosfat (GDP)) praćen deformacijom membrane. Genom Asgard arheja kodira za proteine koji su ili najbliži ortolozi ključnih membranskih transportnih komponenata ili precizno ovih važnih proteinskih porodica (Dacks i sur., 2017). Otkriće osnovnih sastavnih dijelova omotača, homologa arhealnih kompleksa Sec23/24 i TRAPP C3/C5/C6 kao i brojnih malih GTP-aza u linijama Asgard donekle rasvijetljavaju porijeklo i ranu evoluciju eukariotskog membranskog transportnog sustava. Protocoatomer hipoteza predlaže da na temelju sličnosti NPC-ova, klatrina, COPI i COPII vezikularnih omotača oni dijele zajedničko evolucijsko porijeklo u ranom modulu zakrivljenja membrane, tj. protocoatomeru. (Field i sur., 2011.) Toj hipotezi idu u prilog otkrića homologa podjedinica COP kompleksa, komponenata adaptina AP1-5, kompleksa jezgrenih pora (Sec 13/31) i drugi. Posljedni zajednički predak Asgard arheja i eukariota stoga je mogao imati sposobnost izgradnje primordijalnog omotača (Slika 6).



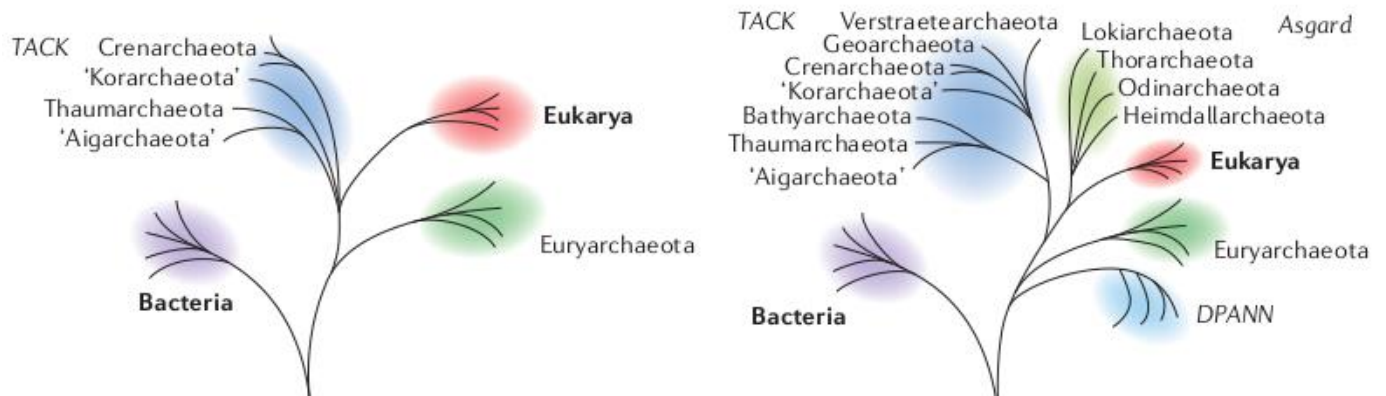
Slika 6. Shematski prikaz predloženog arhealnog “protocoatomer” kompleksa (preuzeto iz Zaremba i sur., 2017)

Navedena otkrića ukazuju na veliku kompleksnost arhealnog pretka eukariota te omogućuju predlaganje vremena i redosljeda nekoliko glavnih događaja u procesu eukariogeneze. Primjerice, arhealni geni uključeni u remodeliranje membrane i promet vezikula pokazuju da je pojava stanične kompleksnosti već bila u tijeku prije stjecanja mitohondrijskog endosimbionta (Poole i sur., 2014). Na temelju rezultata istraživanja Spang i sur., (2015) doista se čini vjerojatnim da je arhealni predak eukariota imao dinamičan aktinski citoskelet i potencijalnu sposobnost endo- i/ili fagocitoze, što je moglo olakšati invaginaciju mitohondrijskog pretka.

5. NAPREDAK U OTKRIĆU RAZNOLIKOSTI ARHEJA

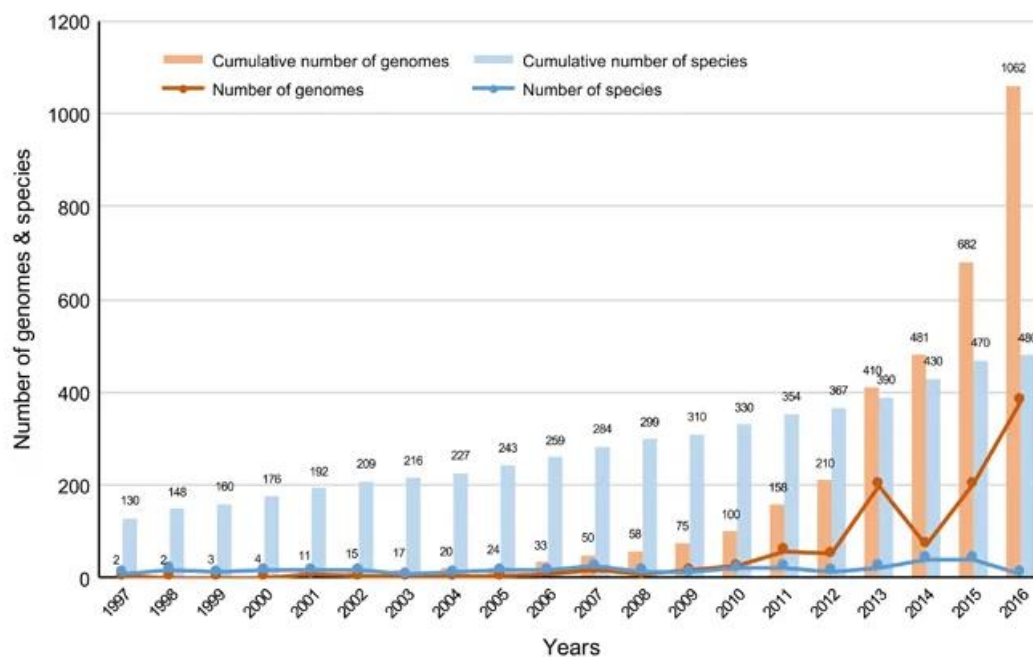
Woese i suradnici 1977. godine identificirali su do tada nepoznatu skupinu organizama koju su zbog svog metanogenog metabolizma koji odgovara okolišnim uvjetima koji su vladali na Zemlji prije više milijardi godina nazvali *archaebacteria*. Woese je na temelju usporedbi sekvenci rRNA ustanovio da sav život na našem planetu pripada trima velikim taksonomskim grupacijama – domenama. To su eukarioti, bakterije i arheje koje su do Woeseovog filogenetskog stabla smatrane samo malenom frakcijom unutar bakterija. Podizanje svijesti o ovoj domeni dovelo je do restrukturiranja živog svijeta te je Woese naglasio kako su različitosti između eukariotskih stanica minorne u usporedbi s prokariotskim svijetom koji je relativno slabo istražen (Woese i sur., 1990). Arheje su postale jednako važne kao i eukarioti te usprkos činjenici da izgledaju veoma slično bakterijama jer su mikroskopski organizmi bez jezgre, obično nemaju vanjsku staničnu stijenku te se ne skupljaju u kolonije koje bi se moglo zamijentiti višestaničnim organizmima.

Razvoj sekvenciranja molekule DNA 1990-ih u molekularnoj filogenetici omogućio je daljnje analize gena kako bi rasvijetlila evolucijske veze između glavnih grana stabla života. Na početku su te analize bile ograničene na manji broj gena koji su bili sekvencirani iz kultiviranih organizama. Iz tih razloga Crenarchaeota i Euryarchaeota određeno su vrijeme bile jedina prepoznata arhealna koljena. Međutim, tijekom posljednja dva desetljeća napredak u sekvenciranju molekule DNA pružio je podatke o novim arhealnim linijama primjerice onima nadkoljena TACK. Otkrića novih linija značajno su proširila naša znanja o raznolikosti, evoluciji te metaboličkim mogućnostima i ekološkim utjecajima arheja. Neke molekularne osobine koje dijele arheje i eukarioti poduprijele su sestrinsku topologiju ovih dviju skupina (Slika 7a). Zatim su razvitkom metagenomskih metoda otkrivene arhealne linije čiji pripadnici često imaju male stanice i male genome te čine nadkoljeno DPANN (Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota, Nanohaloarchaeota, Woesearchaeota i Pacearchaeota). Otkrićem koljena Lockiarchaeota (Spang i sur., 2015) predloženo da ono predstavlja najbližeg arhealnog srodnika eukariota. Zatim je otkriveno koljeno Thorarchaeota, a potom i Odin- i Heimdallarchaeota (Seitz i sur., 2016; Zaremba i sur., 2017) koji zajedno sačinjavaju monofiletsku skupinu nazvanu Asgard nadkoljenom. Filogenetske analize ribosomalnih gena molekule RNA, univerzalnih konzerviranih gena biljega i ribosomalnih proteina smjestile su eukariote unutar Asgard arheja, s koljenom Heimdallarchaeota kao najbližim srodnikom eukariota (Slika 7b) (Eme i sur., 2017).



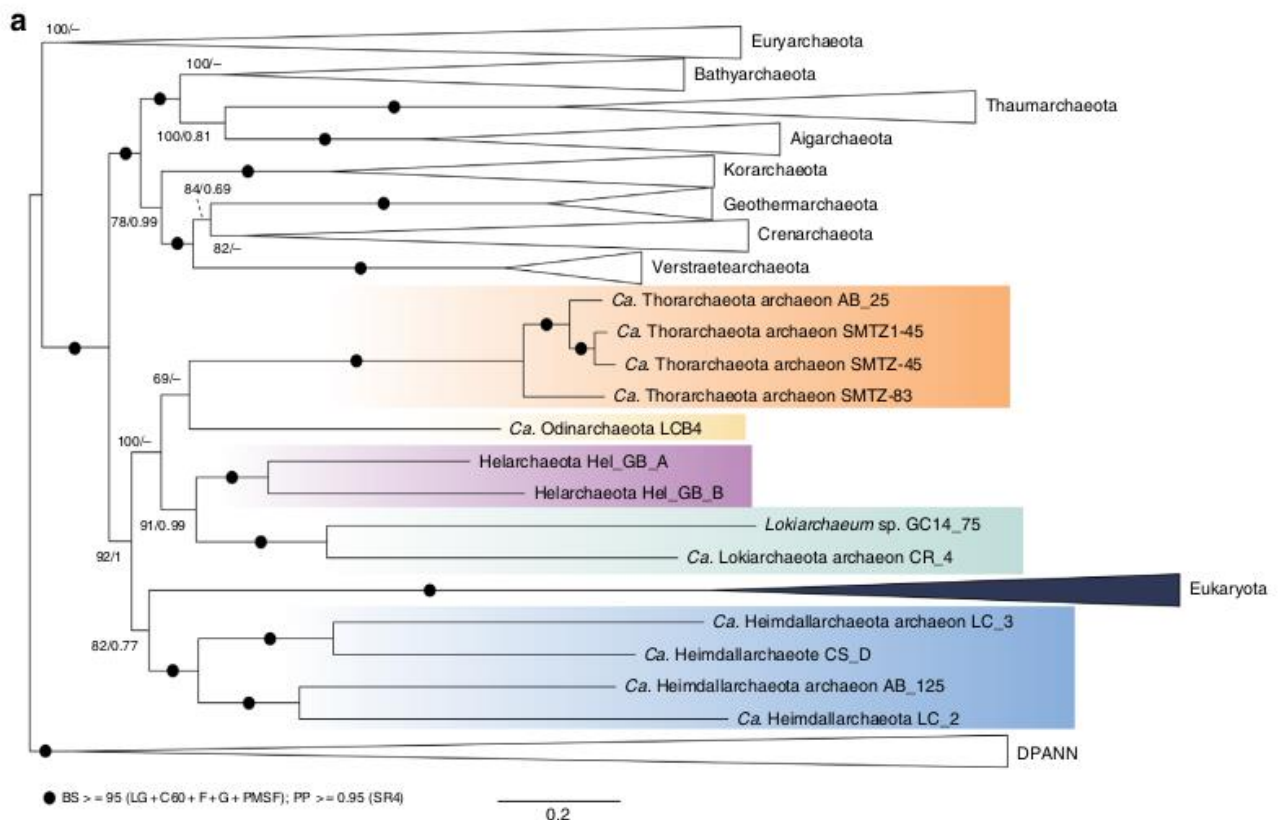
Slika 7. Evolucija stabla života. (preuzeto iz Spang i sur., 2017)

Genomika arheja napreduje velikom dinamikom koju prikazuje Slika 8. Prema bazi podataka NCBI 1062 arhealna genoma postala su dostupna do kraja 2016. god. Za razliku od genoma, broj izoliranih i novoopisanih vrsta ostaje relativno statičan (Slika 8), što ukazuje na potrebu za većim naporima identificiranja vrsta u ovom području.



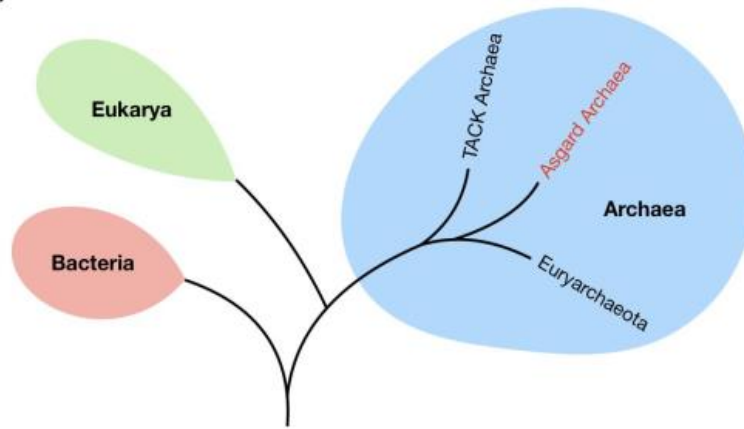
Slika 8. Broj arhealnih genomskih sekvenci i opisanih arhealnih vrsta u posljednja dva desetljeća. (preuzeto iz Adam i sur., 2017)

Najnovijim otkrićem koljena Helarchaeota (Seitz i sur, 2019) Asgard nadkoljeno dobilo je još jednog člana (Slika 9) i potvrdu da se u godinama koje slijede očekuju otkrića novih koljena ove raznolike skupine.



Slika 9. Filogenomska pozicija Helarchaeota unutar Asgard arheja. (preuzeto iz Seitz i sur. 2019)

Smještaj Asgard arheja kao najbližih srodnika eukariota bio je kritiziran od strane određenih znanstvenika koji su alternativno predložili Asgard nadkoljeno kao sestrinsku skupinu Euryarchaeota (Slika 10). Da Chugna i suradnici 2017. sugerirali su da je smještaj koji su predložili Spang i sur., (2015) posljedica filogenetskih artefakata, kontaminacije ili homologne rekombinacije eukariotskim sekvencama. U svom radu primijenili su drukčiju filogeniju na RNA polimerazu u genomu koljena Lockiarchaeota te tako razvili alternativno filogenetsko stablo koje podupire stablo života od tri domene (Slika 9). Međutim, takva je topologija kritizirana od strane Spang i sur., (2018) zbog primjene neadekvatne metodologije te pogrešno tumačenih podataka. Budući da je malo vjerojatno da se kontaminacija/rekombinacija s eukariotima dogodila među svim Asgard arhejama na isti način te da je više prijašnjih studija koje su koristile različite metode obrade genoma podržalo model stabla života od dvije domene, malo je vjerojatno da su ove kritike opravdane.

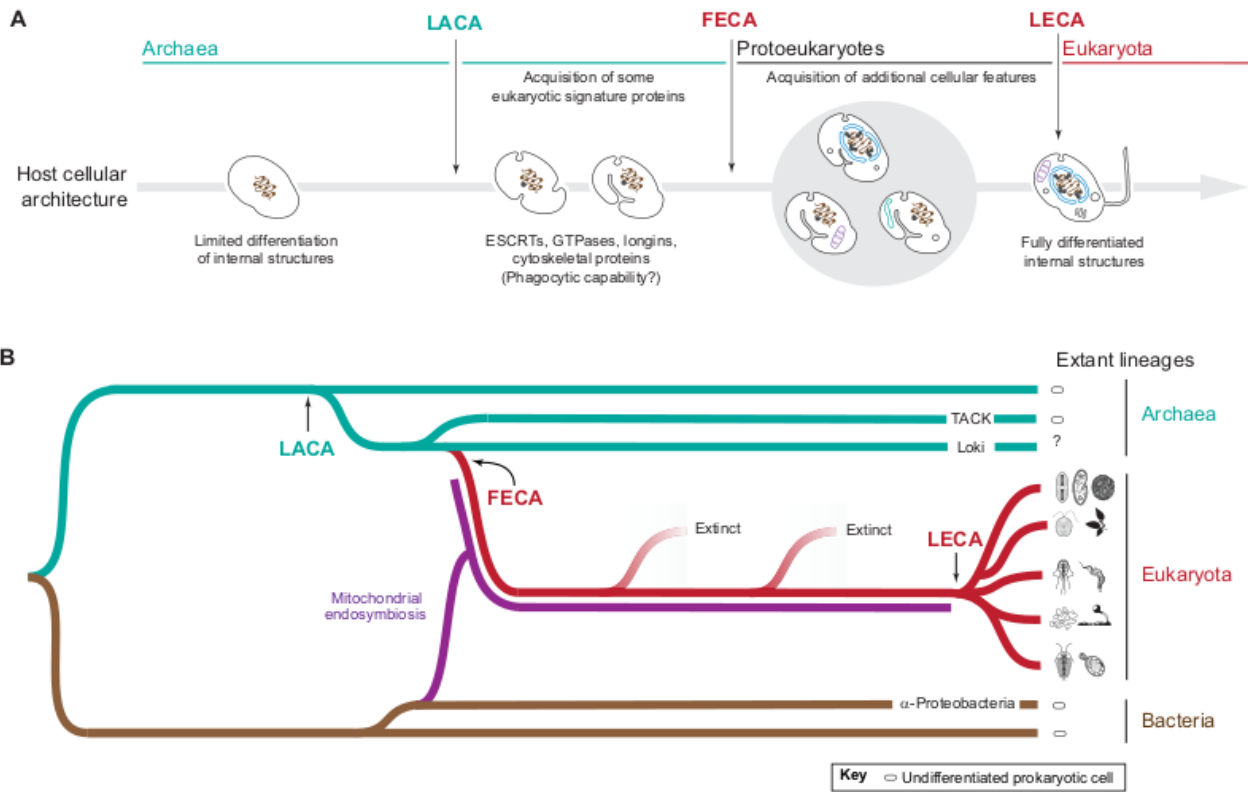


Slika 9. Stablo života napravljeno filogenetskom analizom Asgard gena za RNA polimerazu. Stablo podržava topologiju od tri domene, sa Asgard arhejama kao sestrinskom skupinom Euryarchaeota (preuzeto iz MacLeod i sur., 2019)

6. ASGARD ARHEJE I EUKARIOGENEZA

Eukariogeneza je proces u kojemu su se kroz više koraka pojavile karakteristike eukariotskih stanica u linijama koje su naposljetku dovele do nastanka svih današnjih eukariota (Slika 10a). LECA (engl. *last eukaryotic common ancestor*) je najrecentniji zajednički predak eukariotske stanice iz kojeg su se razvili svi moderni eukarioti. Istraživanja pokazuju da je predak LECA bio kompleksan u mnogim aspektima, primjerice prisutnosti proteinskih porodica za kompartmentalizaciju citoplazme. Važan je i prvi eukariotksi zajednički predak FECA (engl. *first eukaryotic common ancestor*), odnosno prvi predak eukariotske linije. To je zadnja točka grananja u kojoj su eukariotska linija i njeni najbliži izumrli predci razdvojeni. Predci LECA i FECA predstavljaju najstariju i najmlađu granicu između koje se odvila eukariogeneza (Slika 10b). Spomenute eukariotske karakteristike uključuju jezgru, citoskelet, mitohondrij i endomembranski sustav (ER, Golgi i endosomi) te dodatne značajke vezane za funkcioniranje genoma npr. linearne kromosome i neke od staničnih sposobnosti npr. biosinteza lipida, mitozu i mejozu. Neke od tih karakteristika nisu jedinstvene za eukariote i postoje brojni primjeri sličnih prokariotskih obilježja pa čak i molekularnih analoga (Dacks i sur., 2016).

Jedna od staničnih karakteristika, dio mozaika koju rješavaju biolozi s ciljem razumijevanja eukariogeneze jest već spomenuta biosinteza lipida. Cjelokupna biološka i kemijska funkcija staničnih membrana približno je jednaka u prokariota i eukariota, dok se njihov lipidni sastav bitno razlikuje. Lipidi arheja obično su sastavljeni od izoprenoidnih lanaca eterski vezanih za sn-glicerol-1-fosfatnu glavu (G1P), dok su bakterijski i eukariotski lipidi sastavljeni od masnih kiselina esterski vezanih za sn-glicerol-3-fosfatnu glavu (G3P, enantiomer G1P molekule). Ova razlika između dva lipidna tipa naziva se i “razdvajanje lipida” (engl. *lipid divide*). Uzevši u obzir evolucijski model po kojemu su današnji eukarioti nastali spajanjem domaćina Asgard arheje i endosimbiotske bakterije, postavlja se pitanje zašto su “bakterijski lipidi” prisutni ne samo u membrani mitohondrija, već i u jezgri te u drugim organelima eukariotske stanice. Jedna od mogućnosti jest da je Asgard arheja imala potpuno “bakterijske lipide”, umjesto “arhealnih lipida”. Međutim, do danas ne postoje podaci o takvoj arheji. No pripadnici bakterijskog nadkoljena FCB (Fibrobacteres/Chlorobi/Bacteroidetes) sadrže gene za sintezu “arhealnih lipida” zadržavajući i bakterijske (Sojo i sur., 2019). Drugi je stoga prijedlog da je arhealni domaćin imao sposobnost sinteze lipida oba tipa. Kada je bakterijski endosimbiont ušao u arheju, njen kapacitet za sintezu lipida sa eterskim vezama mogao se izgubiti, ostavljajući lipide s esterskim vezama glavnim

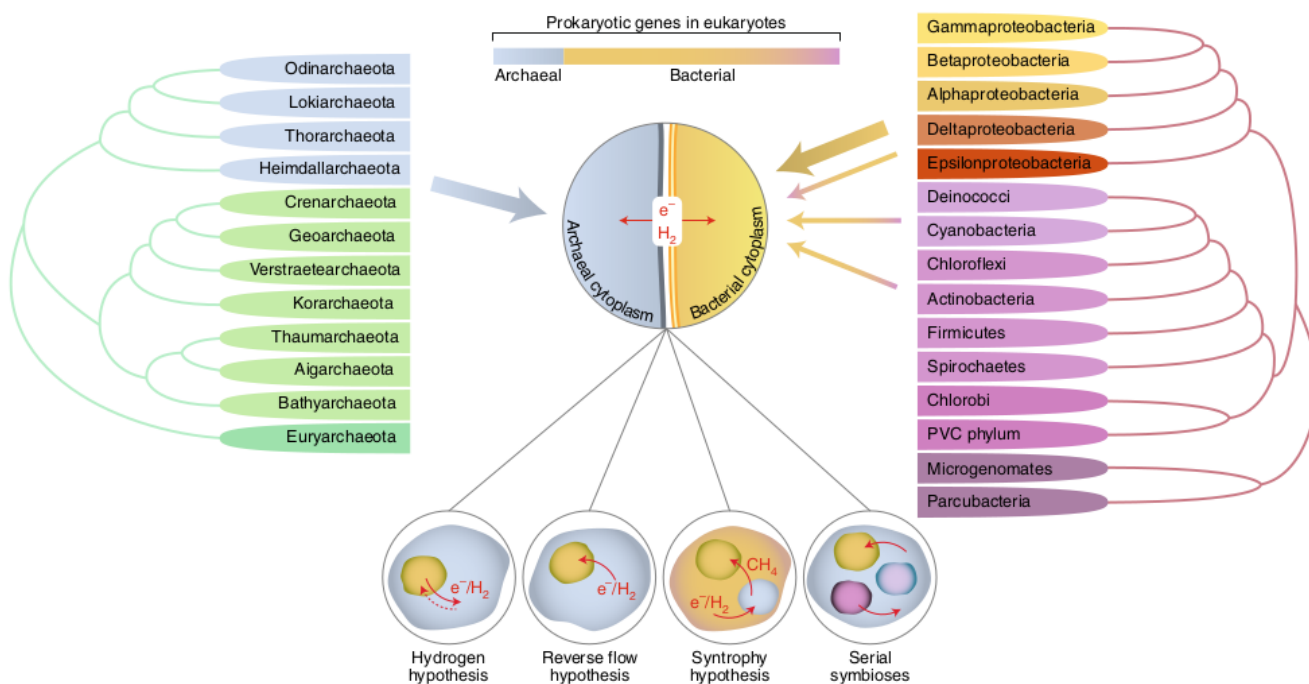


Slika 10. Događaji koji su doveli do eukariogeneze. A) Moguća stanična arhitektura predaka eukariotske stanice prikazana na temelju karakteristika u arhealnim i alfa-proteobakterijalnim linijama kao npr. pojava kompleksnijih staničnih struktura - jezgre (plavo), mitohondrija (ljubičasto) i primordijalnog endomembranskog sustava (tirkizna). B) Odnos arhealnih, bakterijskih i eukariotskih linija. Ključni raniji događaji su: diferencijacija arheja iz posljednjeg arhealnog zajedničkog pretka (LACA, tirkizno), diferencijacija prvog eukariotskog zajedničkog pretka (FECA, smeđe) od pretka arhealne arhealne linije koji je srodniji eukariotima i stjecanje mitohondrija od alfa-proteobakterijskog donora (ljubičasto). Kasniji događaji uključuju izumiranje prijelaznih eukariotskih formi i radijaciju od posljednjeg eukariotskog zajedničkog pretka (LECA, crveno). (preuzeto iz Dacks i sur., 2016.)

membranskim lipidima. Geni za sintezu višestrukih elemenata bakterijskog lipidnog sustava otkriveni su u nekoliko genoma Asgard arheja. Oni su mogli znatno utjecati na put biosinteze lipida do tolikog opsega da su proizveli "kimerne" membranske lipide. Arheja je mogla usvojiti jedan ili više bakterijskih gena koji su mogli rezultirati potpuno bakterijskim (eukariotskim) putem sinteze lipidne membrane te se tijekom vremena ona mogla razviti u potpuno eukariotsku membranu (Villanueva i sur., 2017). Usprkos tome, nijedan pripadnik Asgard skupine nije sposoban sintetizirati isključivo bakterijske lipidne membrane, stoga porijeklo eukariotske membrane još uvijek nije potpuno jasno. Pretpostavlja se da je rani mitohondrijski zajednički eukariotski predak sadržavao gene kako za arhealnu, tako i za bakterijsku sintezu lipida (Sojo i sur., 2019).

Pojavu eukariotske stanice opisuju brojni simbiogenetski modeli koji predlažu različite scenarije ovog događaja. Sintrofija je simbioza posredovana metaboličkim interakcijama. Sintrofija posredovana vodikom često je zastupljena u anoksičnim uvjetima, najpoznatiji primjeri uključuju fermentativne deltaproteobakterije s metanogenim ili metanotrofnim arhejama. "Hydrogen" (vodik) i "syntrophic" sintrofna hipoteza predlažu takvu metaboličku interakciju u kojoj je arheja metanogena (koristi H_2 za redukciju CO_2 u CH_4), a bakterija je fermentator (proizvodi H_2). U tom

slučaju arhealni sintrofni partner je primatelj, a ne izvor vodika. U najrecentnijem modelu nazvanom “reverse flow model” (Spang i sur., 2019) predloženi smjer sintrofne interakcije jest suprotan od onoga u vodik i sintrofnoj hipotezi te uključuje tok elektrona ili vodika s arhealnog na bakterijskog simbionta (Slika 11). U ovom modelu Asgard arhealni predak eukariota koristi fermentativne puteve za produkciju H₂, acetata ili drugih molekula koje su onda metabolizirane od strane fakultativno anaerobnog alfaproteobakterijskog pretka mitohondrija. Arhealni predak proizvodi reducirane ekvivalente za vrijeme rasta na manjim organskim supstratima (npr. ugljikohidrati i masne kiseline) te ga bakterijski partner iskorištava u formi H₂, malih reduciranih anorganskih i organskih spojeva ili direktnim elektron transferom. Takva metabolička sintrofija pružila je selektivnu snagu za uspostavljanje stabilne simbiotske interakcije koja je posljedično dovela do nastanka eukariotske stanice. Potvrđeno je da je horizontalni genski transfer (HGT) iz slobodnoživuće bakterije imao bitnu ulogu u ovom procesu i doprinio genskom repertoaru eukariotske stanice. (Spang i sur., 2019).



Slika 11. Metaboličke simbioze kod nastanka eukariotske stanice. “Reverse flow hypothesis” predlaže simbiogenetički model toka elektrona ili vodika sa arheje na bakterijskog simbionta. (preuzeto iz López-García i sur., 2019)

7. ZAKLJUČAK

Otkriće Asgard nadkoljena veoma je recentno te ima veliku ulogu u razumijevanju raznolikog metabolizma i ekoloških uloga arheja kao i jedne od glavnih evolucijskih inovacija - procesa eukariogeneze. Zbog prisutstva brojnih proteina ESPs, za koje se do nedavno smatralo da su prisutni isključivo u eukariotskim stanicama, ove su arheje objekt brojnih istraživanja. Daljnja proučavanja ove mikrobne skupine potrebna su kako bismo doznali više o fascinantnim sposobnostima ovih arheja i našim arhealnim korijenima.

8. LITERATURA

Adam, P. S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C., & Gribaldo, S. (2017). The growing tree of Archaea: new perspectives on their diversity, evolution and ecology. *The ISME journal*, *11*(11), 2407.

Akıl, C., & Robinson, R. C. (2018). Genomes of Asgard archaea encode profilins that regulate actin. *Nature*, *562*(7727), 439.

Bulzu, P. A., Andrei, A. Ş., Salcher, M. M., Mehrshad, M., Inoue, K., Kandori, H., Beja, O., Ghai, R. & Banciu, H. L. (2019). Casting light on Asgardarchaeota metabolism in a sunlit microoxic niche. *Nature microbiology*.

Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach*. Washington, DC: ASM press.

Dacks, J. B., & Robinson, M. S. (2017). Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats. *Current opinion in cell biology*, *47*, 108-116.

Dacks, J. B., Field, M. C., Buick, R., Eme, L., Gribaldo, S., Roger, A. J., Brochier-Armanet, C. & Devos, D. P. (2016). The changing view of eukaryogenesis—fossils, cells, lineages and how they all come together. *Journal of cell science*, *129*(20), 3695-3703.

Da Cunha V, Gaia M, Gadelle D, Nasir, A., Forterre, P. (2017) Lokiarchaea are close relatives of Euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLOS Genetics* *13*: e1006810.

Dong, X., Greening, C., Rattray, J. E., Chakraborty, A., Chuvochina, M., Mayumi, D., Dolfing, J., Li, C., Brooks J. M., Bernard, B. B., Groves, R. A., Lewis I .A., & Hubert, C. R. J. (2019). Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments. *Nature communications*, *10*(1), 1816.

Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature reviews microbiology*, *15*(12), 711.

- Field, M. C., Sali, A., & Rout, M. P. (2011). On a bender – BARs, ESCRTs, COPs, and finally getting your coat. *The journal of cell biology*, 193(6), 963–972. doi:10.1083/jcb.201102042.
- Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., & Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *Journal of cell science*, 128(11), 2009-2019.
- López-García, P., & Moreira, D. (2019). Eukaryogenesis, a syntrophy affair. *Nature Microbiology*, 4(7), 1068.
- MacLeod, F., Kindler, G. S., Wong, H. L., Chen, R., & Burns, B. P. (2019). Asgard archaea: Diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. *AIMS microbiology*, 5(1), 48-61.
- Poole, A. M., & Gribaldo, S. (2014). Eukaryotic origins: how and when was the mitochondrion acquired? *Cold spring harbor perspectives in biology*, 6(12), a015990.
- Pushkarev, A., Inoue, K., Larom, S., Flores-Uribe, J., Singh, M., Konno, M., Tomida, S., Ito, S., Nakamura, R., Tsunoda, Philosof, A., Sharon, I., Yutin, N., Koonin, E. V., Kandori, H. & Beja, O. (2018). A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics. *Nature*, 558(7711), 595.
- Robinson, N. P. (2018). Archaea, from obscurity to superhero microbes: 40 years of surprises and critical biological insights. *Portland press herald*, 2, 453-458.
- Saghaï, A., Gutiérrez-Preciado, A., Deschamps, P., Moreira, D., Bertolino, P., Ragon, M., & López-García, P. (2017). Unveiling microbial interactions in stratified mat communities from a warm saline shallow pond. *Environmental microbiology*, 19(6), 2405-2421.
- Seitz, K. W., Dombrowski, N., Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Sieber, J. R., Teske, A. P., Eterna, T. J. G. & Baker, B. J. (2019). Asgard archaea capable of anaerobic hydrocarbon cycling. *Nature communications*, 10, 1822.

Seitz, K. W., Lazar, C. S., Hinrichs, K. U., Teske, A. P., & Baker, B. J. (2016). Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal phylum with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *The ISME journal*, *10*(7), 1696.

Sojo, V. (2019). Why the lipid divide? Membrane proteins as drivers of the split between the lipids of the three domains of life. *BioEssays*, *41*(5), 1800251.

Spang, A., Stairs, C. W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E. F., Greening, C., Baker, B. J. & Ettema, T. J. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nature microbiology*, *4*(7), 1138–1148.

Spang, A., Eme, L., Saw, J. H., Caceres, E. F., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Lombard, J., Guy, L., Thijs, J. G. & Ettema, T. J. (2018). Asgard archaea are the closest prokaryotic relatives of eukaryotes. *PLoS genetics*, *14*(3), e1007080.

Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, L., Schleper, C., Guy, L. & Ettema, T. J. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, *521*(7551), 173.

Villanueva, L., Schouten, S., & Damsté, J. S. S. (2017). Phylogenomic analysis of lipid biosynthetic genes of Archaea shed light on the ‘lipid divide’. *Environmental microbiology*, *19*(1), 54-69.

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National academy of sciences*, *87*(12), 4576-4579.

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National academy of sciences*, *74*(11), 5088-5090.

Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A. & Ettema T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, *541*(7637), 353.

9. SAŽETAK

Asgard arheje nastanjuju raznolika staništa najčešće anoksičnih uvjeta kao što su hidrotermalni izvori te sedimentni morski i slatkovodni okoliši. U takvim okolišnim uvjetima česte su mikrobnе interakcije koje su uočene i kod ove skupine, ali još nisu detaljnije istražene. Metabolizam Asgard arheja veoma je raznolik. Određena koljena sposobna su razgrađivati masne i druge organske kiseline, proteine i ugljikohidrate. Ovi organizmi često su fermentativni te tako ovisno o koljenu produciraju acetat, laktat ili etanol. Također, jednim od dvaju tipova Wood–Ljungdahl (WL) puta reduciraju CO₂, dok su u nekih koljena zabilježena oba tipa. Posljednje otkriveno koljeno Helarchaeota specifično je jer kodira za metil-CoM enzime slične reduktazi (Mcr) te stoga ima potencijal za oksidaciju ugljikohidrata. U nekih koljena nađen je kompletan set gena za protein RuBisCo tip III i IV te su identificirani novi pigmenti koje sadrže ove arheje - heliorodopsin i schizorodopsin. Mogu sudjelovati i u kruženju dušika i sumpora. Većina ih je obligatno anaerobna, dok linija Heimdallarchaeia ima potencijal fakultativno aerobnog metabolizma. U genomu Asgard arheja nađeno je mnogo proteina ESPs za koje se smatralo da postoje samo u eukariota. Najznačajniji su oni za citoskelet, primjerice homolozi aktina, tubulina i profilina te oni za membranski transportni sustav, primjerice male GTP-aze i komponente vezikularnih omotača. Napredak u sekvenciranju molekule DNA te razvitak metagenomskih metoda pružaju podatke o novim arhealnim linijama. Novije filogenetske analize smještaju eukariote unutar Asgard arheja, s koljenom Heimdallarchaeota kao najbližim eukariotskim srodnikom. Sve navedeno pomaže razumijevanju eukariogeneze i postavljanju novih modela ovog ključnog evolucijskog događaja.

10. SUMMARY

Asgard archaea have been found in a diverse range of habitats, primarily in anoxic conditions, including hydrothermal vents, marine and freshwater sediments. These conditions support microbial interactions that are also observed in Asgard superphylum but so far are unexplained. Metabolism of Asgard archaea is very versatile. Some phyla are capable of degradation of fatty and other organic acids, proteins and carbohydrates. These organisms often ferment so that they can produce acetate, lactate or ethanol. Moreover, they reduce CO₂ via one of two Wood–Ljungdahl (WL) pathways, while some use both of them. The latest discovered phylum Helarchaeota has specific metabolism because it encodes for methyl-CoM reductase-like enzymes (Mcr) so it has potential for hydrocarbon oxidation. Some phyla were found to harbor complete set of genes for RuBisCo types III and IV. Recently, new Asgard archaea pigments are identified – heliorhodopsin and schizorhodopsin. Some of the archaea are also involved in nitrogen and sulfur cycling. Most of them are obligately anaerobic, while archaeal lineage Heimdallarchaeia has potentially facultative aerobic metabolism. Asgard archaea genome encoded for numerous eukaryotic signature proteins (ESPs) that were previously considered to be eukaryotic specific. The most significant ESPs are for cytoskeleton, such as actin, tubulin and profilin homologues and ESPs for membrane trafficking system such as small GTPases and vesicle coat components. Developed DNA sequencing technologies and metagenomic approaches provide us datasets about new archaeal lineages. New phylogenetic analysis place eukaryotes within the Asgard superphylum, more closely related to the phylum Heimdallarchaeota. All these discoveries help in understanding of eukaryogenesis and proposing new models for this key evolutionary event.