

Ранние этапы эволюции
жизни - от
протобиологических
химических циклов до
оксигенного фотосинтеза



Молекулярная палеонтология как один из методов изучения ранних этапов эволюции жизни.

- Жизнь как сохраняющаяся во времени структура нуждается в системе сбора и обработки информации об окружающей среде =>
- Эта информация где-то записывается =>
- Эти записи можно попробовать прочесть и по сохранившимся «архивам» попытаться восстановить последовательность событий
- Информация о ранних этапах эволюции частично сохранилась в ДНК и механизмах работы самых древних метаболических цепочек. =>
- Подобно тому, как изучая различные античные документы мы пытаемся восстановить объективную последовательность исторических событий, так и изучая геномы и особенности метаболизма наиболее архаичных организмов мы можем попытаться восстановить ранние этапы эволюции.

Почему гипотетический «мир РНК» вряд ли был первым этапом предбиологической эволюции

- Даже лучшие РНК-репликазы, имеющие малореалистичную для самосборки длину около 200 н.м, способны без ошибок реплицировать произвольную РНК-цепочку лишь примерно на порядок меньшую собственной длины.
- В работающих в живых клетках РНК полимеразах (в отличие от рибосомы) нет рибозимов.
- Все полученные на сегодняшний день РНК-репликазы умеют лишь достраивать уже существующую затравочную последовательность нуклеотидов (им нужен праймер).
- Полученные искусственно рибозимные аминоксил-тРНК-синтетазы работают существенно лучше и имеют в несколько раз меньшую длину, чем соответствующие белковые ферменты => непонятно, почему они были впоследствии замещены последними.
- Исследование истории рибосомных белков показывает, что они формировались одновременно с усложнением рРНК и коэволюционировали вместе с её отдельными участками.

Какая из групп современных прокариот наиболее близка к LUCA?

- По типу строения мембраны (одинарная или двойная)
- По механизму запасения энергии мембранного потенциала (протонная или натриевая помпа)
- По типу метаболизма (аэробный или анаэробный)
- По вставкам и делециям аминокислот в консервативных белках
- По вставкам и делециям генов в консервативных участках геномов
- По доле генов, у которых направление транскрипции совпадает с направлением репликации ДНК

По совокупности результатов применения различных методов ближе всего к LUCA оказываются **кlostридии**.

Сначала метаболизм или сначала репликация?

Не то, и не другое, а параллельная взаимосвязанная эволюция обоих процессов, взаимно поддерживающих друг друга.

1. В умеренно восстановительной среде (например, в атмосфере) при условии подвода к ней в той или иной форме энергии синтезируются разнообразные органические молекулы. В частности, аминокислоты, сахара, углеводороды, жирные кислоты, некоторые нуклеиновые основания.
2. При наличии так же содержащей фосфаты окислительной среды, отделённой от восстановительной тонким липидным слоем (например, водоёма, покрытого сверху нефтяной плёнкой), создаются условия для абиогенного синтеза нуклеотидов и протекания окислительно-восстановительных реакций.
3. Некоторые из указанных выше молекул частично полимеризуются, создавая небольшие макромолекулярные комплексы (олигомеры). Начинается естественный отбор указанных молекул и их олигомерных комплексов, при котором накапливаются, в основном, макромолекулы, способные катализировать реакции, приводящие (прямо или косвенно) к синтезу собственных копий, либо увеличению степени их устойчивости к эффектам распада (деградации). Формируются система замкнутых самоподдерживающихся химических циклов.

4. Одна из упомянутых выше макромолекул (РНК длиной в несколько десятков нуклеотидов, предшественник современных тРНК) оказывается способной как к неферментативной саморепликации (через синтез своей комплиментарной копии), так и к катализу цепочек, состоящих из двух или более аминокислотных остатков. Происходит отбор из всего спектра синтезируемых кислот именно аминокислот благодаря их свойству удерживать фосфаты в «гнезде», состоящем из практически любой последовательности длиной в 5 ак остатков (за исключением пролина).

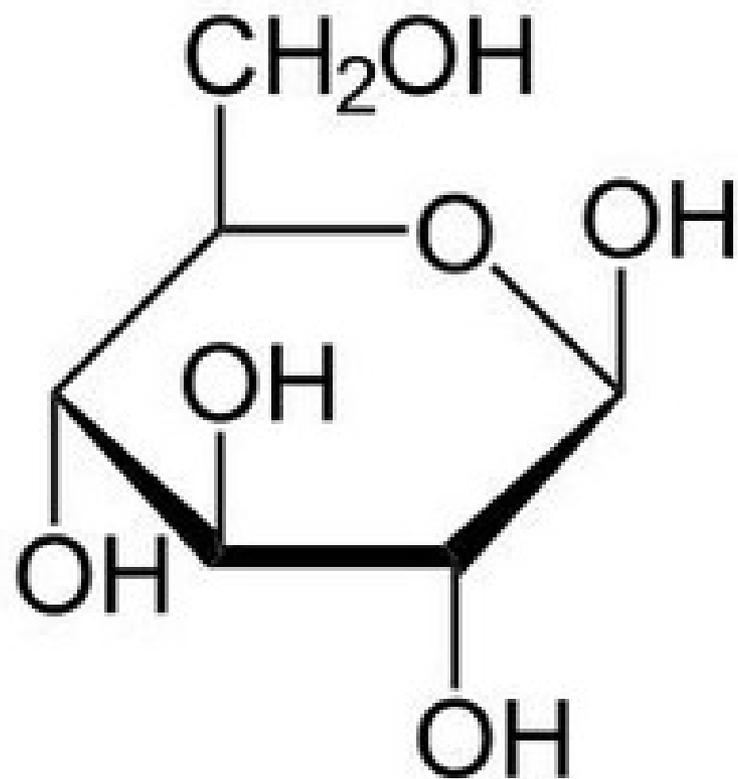
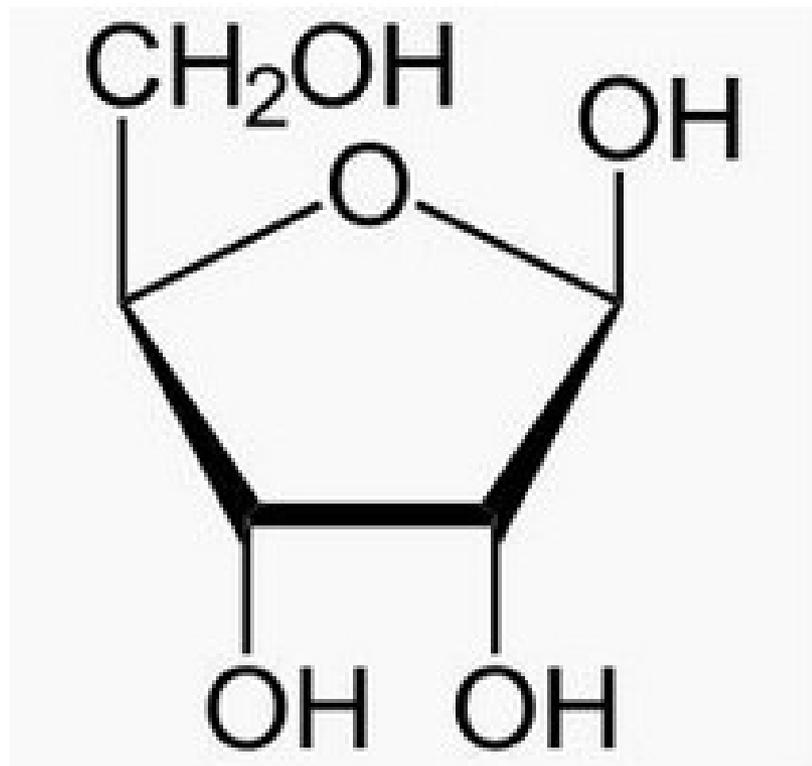
5. Начинает действовать отбор, происходит селекция молекул прото-тРНК с удерживаемыми ими в петлях, на концах стеблей и/или другим способом аминокислотами на предмет совместной выживаемости прото-тРНК и коротких протеноидов в условиях ограниченных ресурсов (свободных нуклеотидов, аминокислот и т.д.).

6. Указанный в предыдущем пункте отбор и мутации при копировании РНК приводит к постепенному улучшению скорости и точности репликации аминорибозимов. В частности, известно, что в современных РНК полимеразах в активном центре фермента располагаются три остатка аспаргиновой кислоты, удерживающих в необходимой для эффективного прохождения реакции позиции ион магния. Вполне возможно, что аналогичным образом расставленные в "правильных" местах РНК (или входящие в состав коротких протеноидов, удерживаемых РНК за счёт водородных связей) эти легко синтезируемые абиогенно аминокислоты могли существенно улучшать способность РНК к самокопированию. Аналогичным образом постепенное "обрастание" взаимодействующих при образовании пептидной связи прото-тРНК дополнительными петлями, аминокислотами и небольшими белками могло в результате пошаговой эволюции привести к появлению большой единицы рРНК. Когда эффективность и точность синтеза протеинов достигла таких уровней, что уже не было смысла в "привязке" к рРНК отдельных аминокислот, соответствующие её участки, селективно связывающие определённые аминокислоты, стали анахронизмом, лишь мешающим "возмужавшим" рибосомным протеинам наиболее эффективно делать свою работу, и, как следствие, начали вырезаться в процессе созревания рРНК, но соответствующие следы в интронах остались, и теперь доносят до нас весточки от тех древних времён.

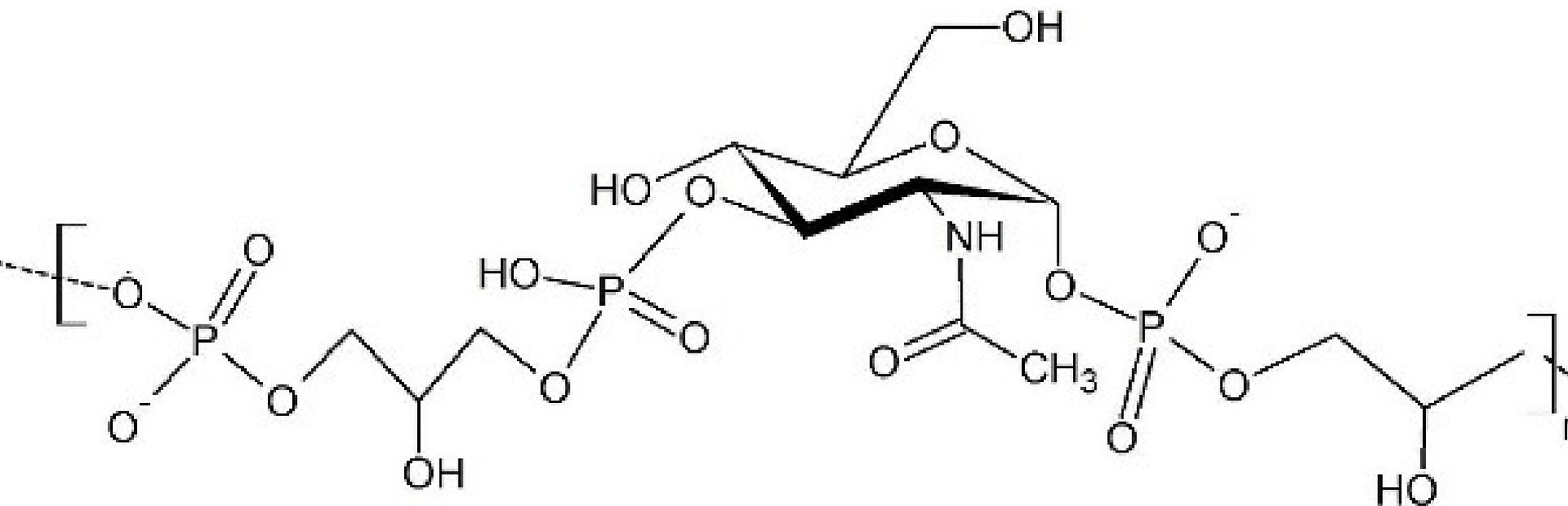
7. Отделение рибосомных протеинов от их собратьев, выполняющих метаболические функции, начало их независимой эволюции и окончательный разрыв (в том числе, чисто механический, в смысле отсоединения от тела рибосомы) "метаболической" компоненты от "рибосомной", появление малой единицы рРНК и "классической" трансляции белков. Начало собственно клеточной эволюции.

Некоторые факты, поддерживающие вышеизложенный сценарий и существование мира олигомеров и кофакторов

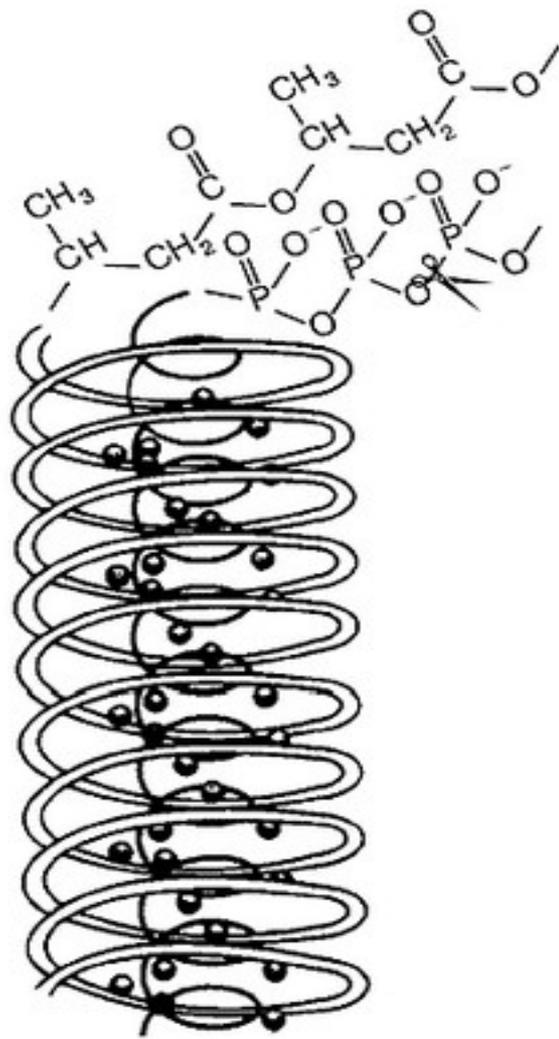
- Универсальная клеточная органелла асидокальцисома заполнена кислой средой, обогащённой катионами кальция и полифосфатами (сходный хим. состав имеют природные материалы апатит и брушит). Так называемые «нанобактерии» тоже в итоге оказались продуктом взаимодействия микроскопических кристаллов апатита с белками и некоторыми витаминами.
- В некоторых случаях (например, в натриевых и протонных помпах) вместо АТФ может использоваться пирофосфат ($\text{PO}_3^{2-}\text{-O-PO}_3^{2-}$).
- В процессе гликолиза фосфатная группа присоединяется к атому углерода, находящемуся в позиции, аналогичной той, в которой рибоза соединяется с фосфатом в молекулах нуклеотидов и АТФ.
- Существование полимерных молекул, отдалённо напоминающих РНК, но с глюкозой вместо рибозы и аланином вместо нуклеинового основания.
- В качестве запасного источника энергии часто используются полифосфаты.



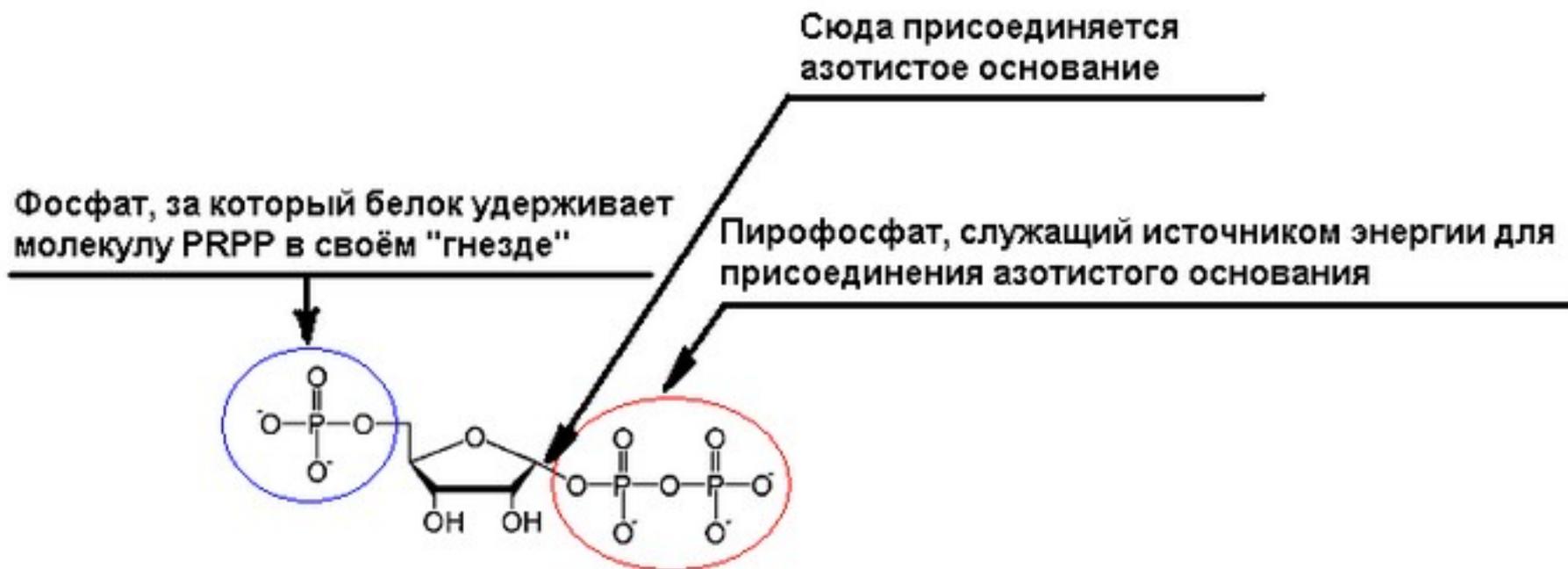
Две базовые органические молекулы - рибоза (слева) и глюкоза (справа)



Типичная структура тейхоевой кислоты клеточной стенки грам-положительных бактерий (взято из Википедии). Состав: фосфат, глицерин, глюкоза. Опционно к группе OH может быть присоединён D-Alanin.



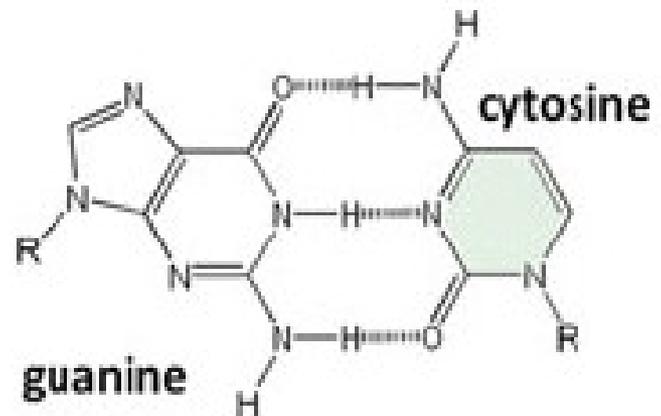
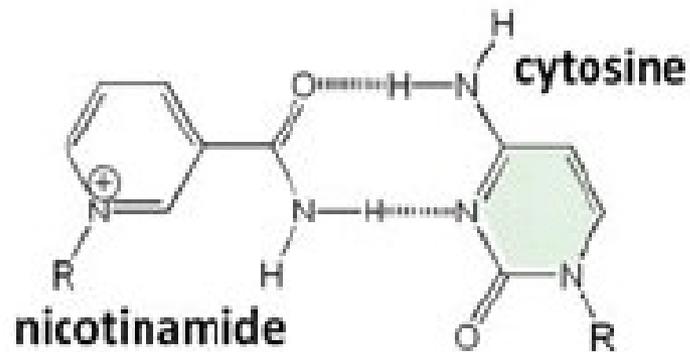
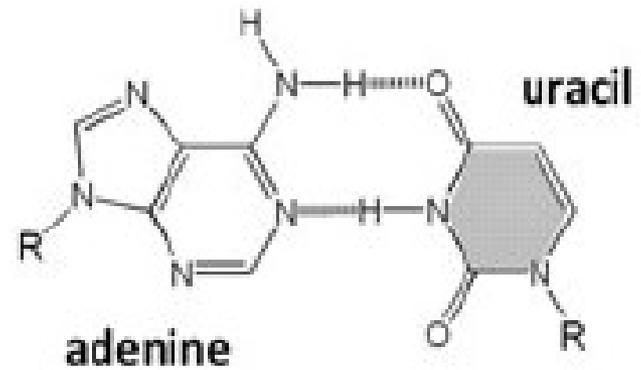
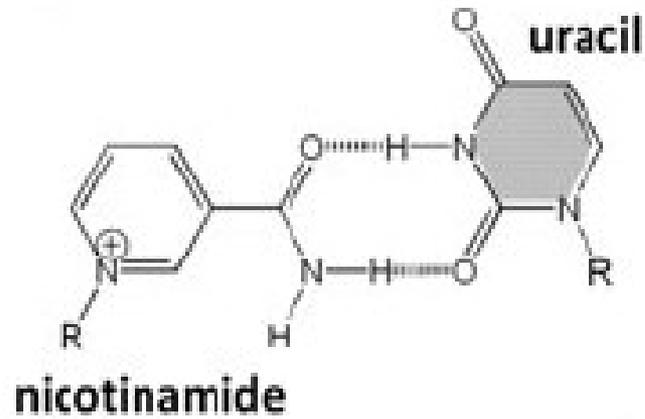
Строение простейшего мембранного канала, состоящего из полифосфатов, полимерной цепочки бетаоксималяной кислоты (продукт одного из вариантов неполного окисления глюкозы) и катионов кальция (символически обозначены частично покрашенными шариками). Ножницы символизируют возможное отщепление (гидролиз) конечной фосфатной группы, за счёт чего высвобождается энергия, используемая для прокачки через канал фосфатов и кальция.



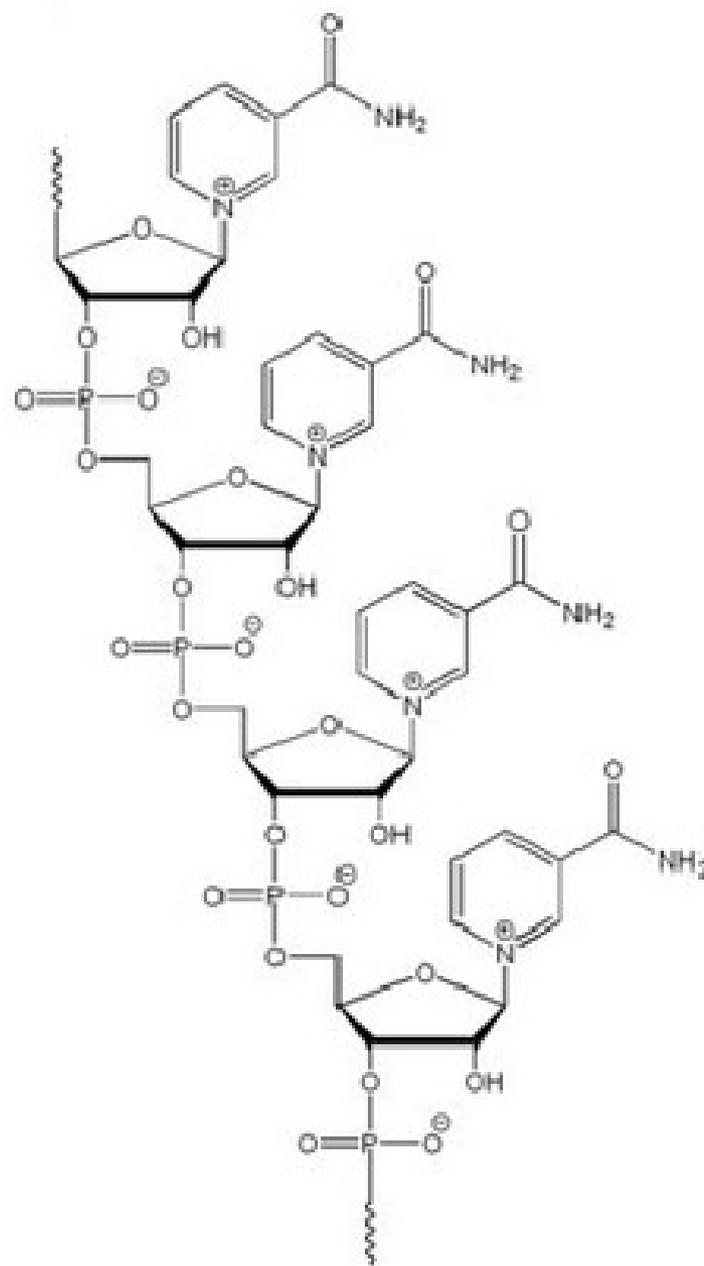
Схема, поясняющая принцип синтеза нуклеотидов на базе молекулы PRPP (фосфорибозил пирофосфат).

Возможное решение основной проблемы неферментативной репликации РНК

- Первые удачные опыты (Оргел и др.) – вторая половина 80-х годов. Одно из лучших достижений – успешная репликация последовательности CCCGCCCGCCCGCCC.
- Основная проблема – более-менее длинные последовательности, в которых ощутимую долю составляет гуанин, слипаются ещё до того, как закончится репликация.
- Возможное решение – замена гуанина на никотинамид, который способен образовывать комплиментарные пары с цитозином и уридином, и, в то же время, у него нет имидазольного кольца.
- Дополнительные бонусы – у никатинамида, как и у гуанина, тоже есть «вынесенная» аминогруппа NH_2 . Нуклеотид NMN, подобно CMP и UMP синтезируется прямым присоединением соответствующего азотистого основания к PRPP. Некоторые организмы используют NAD в качестве праймера. Так же некоторые бактерии с не вполне понятными пока целями синтезируют полинуклеотиды, состоящие исключительно из NMN.



Образование никотинамидом водородных связей с урацилом и цитозином

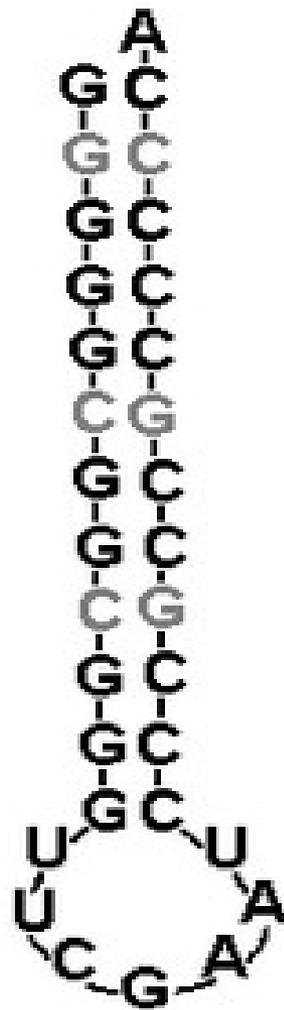


Синтезируемая бактериями цепочка нуклеотидов, состоящая из молекул никотинамида, способных к комплиментарному взаимодействию с РНК, содержащей цитозин

Следы дорибосомной эпохи в современных клетках

- Нерибосомные белки, характерные признаки:
 - Длина от 2 до 12 ао.
 - Могут присутствовать «неканонические, и/или «левые» ак.
 - Могут иметь циклическую или разветвлённую структуру.
 - Присоединение ао друг к другу и к липидной мембране осуществляется похожими на классические тРНК молекулами, причём, реакция катализируется белками, похожими на аминоцил-тРНК-синтетазы. У примерно 2000 протеинов, считающихся наиболее древними, вероятность соответствия взятых наугад двух соседних ао разным классам аминоцил-тРНК-синтетаз равна 56.9%. Вероятность того, что это случайное отклонение, составляет величину порядка 0.01%.

- в тРНК присутствует несколько «неканонических» нуклеотидов.
- Иногда аминокислота прикрепляется к «чуждой» тРНК, и не к концу её стебля, а в районе петли антикодонового триплета.
- Кроме ДНК и РНК нуклеиновые основания и подобные им структуры входят в состав многих кофакторов таких как NAD(P), FAD, CoA, F420, B12, SAM и т.д.
- NAD может может выступать в качестве переносчика фосфатой и ацетильной групп.



Предполагаемая предковая пра-тРНК.

Немного философии

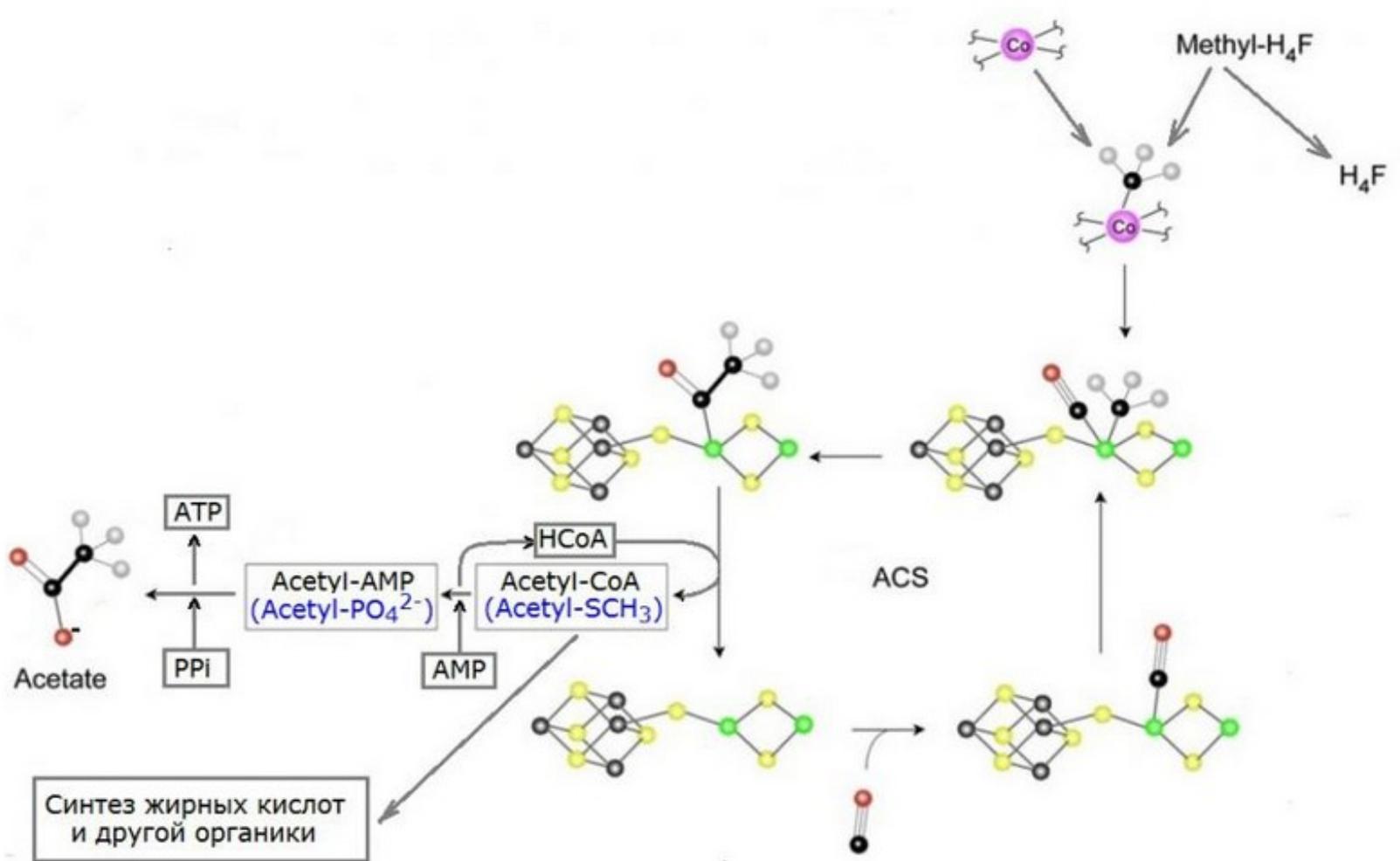
- История человеческой цивилизации насчитывает не менее 10 тысяч лет, но лишь примерно начиная от середины этого промежутка оно стало обладать письменностью. Таким образом, многие тысячи лет культурные традиции, знания и навыки успешно передавались лишь с помощью устной речи. Появление письменности позволило, с одной стороны, зафиксировать уже накопленную информацию на более надёжном носителе, а с другой стороны, дало мощный импульс дальнейшему ускоренному развитию цивилизации. Представляется, что аналогичным образом и у биологической эволюции был достаточно длительный период, предшествовавший современному способу записи информации в геноме. В этот период времени применялись другие, более простые способы хранения и передачи информации, которые, тем не менее, уже позволяли поддерживать клеточные структуры на достаточно высоком уровне сложности, в частности, синтезировать полимерные молекулы и формировать из них липидную мембрану и полифосфаты, целенаправленно производить некоторые необходимые для метаболических циклов аминокислоты, воспроизводить синтезируемые нерибосомно короткие протеиноиды и кофакторы, запасать получаемую из окислительно-восстановительных реакций и облучения среды ультрафиолетовым светом свободную энергию. По-видимому, мы ещё только начинаем приоткрывать завесу над одним из самых интересных этапов эволюции жизни, её дорибосомным периодом, и на этом пути нас ещё ждёт масса интересных и неожиданных открытий.

Характерное число атомов в различных биологических структурах клетки

- неорганические коферменты $\sim 10^0$ - 10^1
- органические коферменты (витамины) $\sim 10^1$
- липиды (жиры) $\sim 10^1$
- Белки $\sim 10^2$ - 10^4 атомов
- РНК $\sim 10^3$ - 10^5 атомов
- ДНК $\sim 10^8$ - 10^{12} атомов

Переход от неживого к живому, как это могло происходить

- Ацетогенез – основной метаболический путь клостридий.
- Признаки его архаичности:
 - - энергия запасается либо в виде натриевого потенциала (причём, при этом не используется цитохром bc_1 комплекс и хиноны), либо в виде ацетил-фосфата.
 - - широко используются неорганические кофакторы (кобальт, железо, никель, молибден, селен, сера).
 - - вариант пути с CO вместо CO_2 на входе идёт абиогенно, причём при этом одновременно с запасением энергии происходит фиксация углерода
 - - реакция образования ацетил-фосфата подавляется в присутствии натрия и усиливается в присутствии калия и аммония.



Заключительные реакции ацетатного цикла (путь Вуда-Люнгдала) у бактерий. Атомы различных химических элементов условно обозначены в виде шариков, окрашенных в следующие цвета: железо - серый, сера - жёлтый, никель - зелёный, углерод - чёрный, кислород - красный, кобальт - фиолетовый.

Ацетогены:



Реакция, идущая абиогенно:

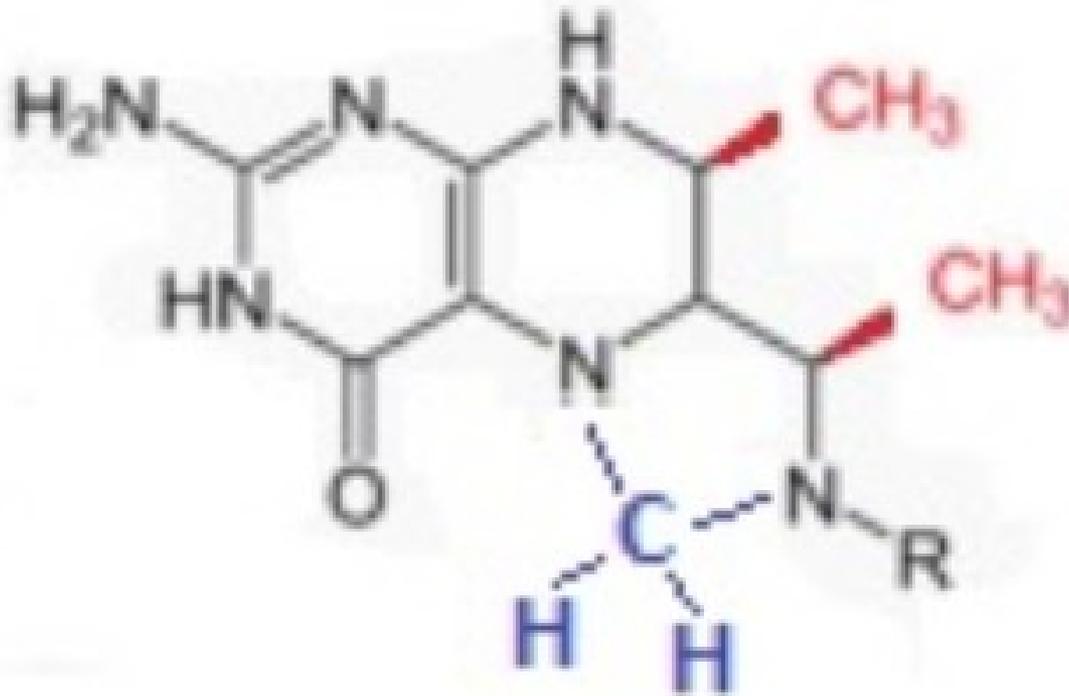


(опыты Вэхтерсхойзера и недавнее их повторение группой французских учёных)

Кроме ацетата в растворе обнаруживается метантиол (CH_3SH) который может рассматриваться как примитивный аналог CoA.

Синтез пирофосфата мог существенно расширить круг возможных автокаталитических реакций.

Кобальт, железо и никель – ферромагнетики, а сероводород, угарный газ и ацетат – полярные молекулы.



Завершающие реакции цепочки ацетогенеза у клостридий и метаногенов катализируются одинаковыми или похожими кофакторами, в частности, сборка метильной группы CH_3 идёт на птерине. Красным цветом обозначены метильные группы, присутствующие у тетрагидрометанртерина, но отсутствующие у тетрагидрофолата.

Примеры использования живыми системами распространённых в неживой природе кристаллов:

- железно-серные кластеры (входят в состав ферродоксинов) - грейгит (Fe_3S_4 , Fe_4S_4);
- L-кластер ($\text{Fe}_8\text{S}_9\text{C}$), являющийся прекурсором при сборке активного центра нитрогеназы, и обладающий свойством при подаче на вход системы CO и CN (цианид) катализировать образование углеводородных цепочек длиной до 6-ти атомов углерода, по своей структуре похож на фрагмент кристалла цементита (атом углерода, окружённый шестью атомами железа), который попав в среду богатую сероводородом, покрылся «шубой», состоящей из серы.

КОГДА ПОЯВИЛСЯ КИСЛОРОДНЫЙ ФОТОСИНТЕЗ

1. Новые данные о наличии кислорода, растворённого в воде (концентрация примерно 0.1% от нынешней), полученные из анализа полосчатых железистых формаций (BIF-ов) возрастом 3.23 млрд. лет. Наиболее правдоподобное объяснение – кислородный фотосинтез.
2. Строматолиты и возможные отпечатки цианобактерий в породах возрастом 3.48-3.49 млрд. лет.
3. Структуры осадочных пород на Марсе возрастом не менее 3.7 млрд. лет, возможно сформированные цианобактериальными матами (статья Норы Нюфк (Nora Noffke) в февральском номере журнала Астробиология)
4. Большая концентрация оксида марганца в осадочных породах кратера Гейла свидетельствует о насыщенной кислородом марсианской атмосфере в период 3.5-3.8 лет млрд. лет назад.

Различия оксигенных и аноксигенных фотосинтетиков

- цитохром f – цитохром c1
- хлорофилл – бактериохлорофилл
- 2 РС разных типов – 1 РС

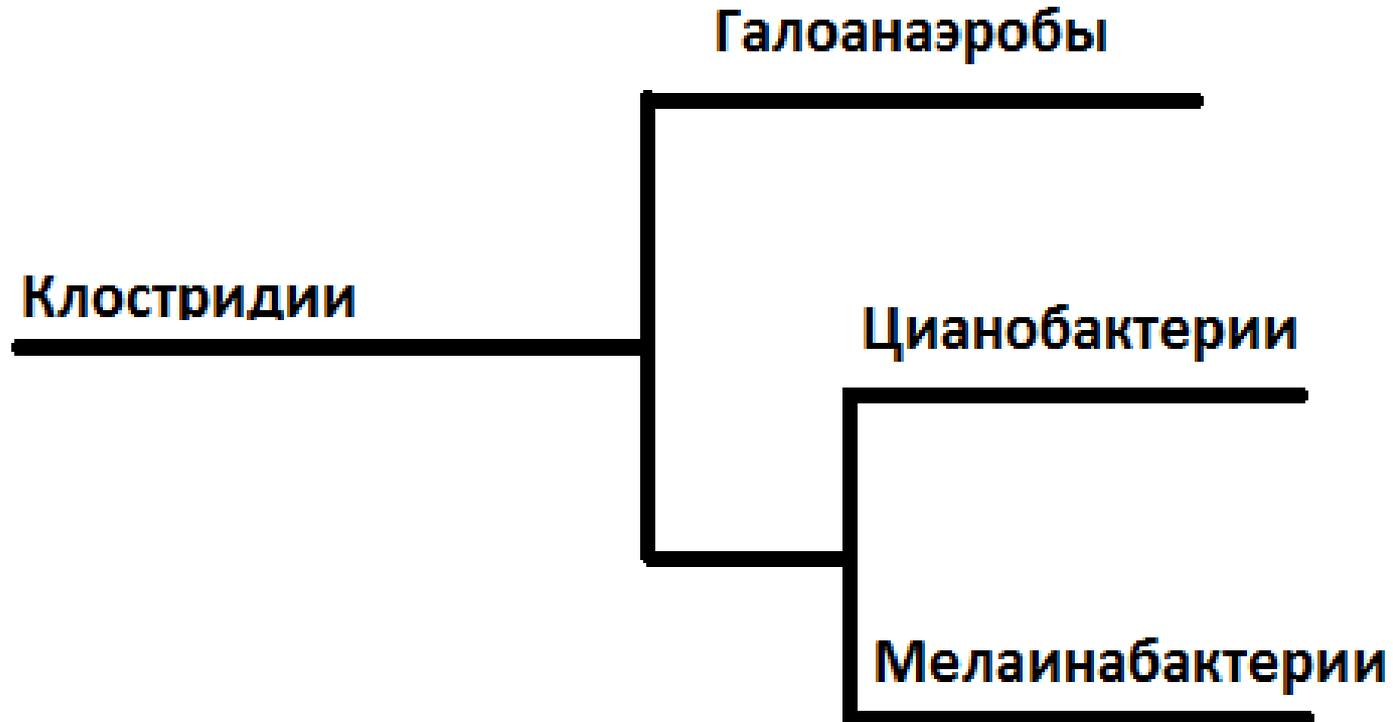
• **КАК ПОЯВИЛСЯ КИСЛОРОДНЫЙ ФОТОСИНТЕЗ**

- «Отпечаток» древней системы фотосинтеза вероятного общего предка всех хлорофильных фотосинтетиков, перенесённый, по всей видимости, древним вирусом, хорошо сохранился в геноме бактерии *Heliobacterium modesticaldum*, принадлежащей к семейству анаэробных гелиобактерий. Данный оперон включает:
 - Цитохром-bc₁ комплекс (транспорт протонов в межмембранное пространство и восстановление в нём цитохрома c);
 - Гены, необходимые для синтеза бактериохлорофилла-G;
 - Ген, кодирующий реакционный центр с антенной.
 - Записанный на противоположной (в норме некодирующей) нити реакционного центра ген, характерный для вирусов, паразитирующих на цианобактериях рода Прохлорококков (*Prochlorococcus* phage P-SSM7).

Внутри вышеописанного оперона присутствует ген транспозазы, а рядом с ним имеется ген, кодирующий РНК зависимую ДНК полимеразу.

Ген, кодирующий у *Heliobacterium modesticaldum* реакционный центр имеет как участки, гомологичные реакционному центру цианобактерий I-го типа (ФС1), так и участки, гомологичные антенне реакционного центра II-го типа (ФС2). Данный факт позволяет предположить, что он кодирует древний белок, использовавшийся предками цианобактерий ещё до дупликации данного гена, давшей начало эволюции двух разных реакционных центров хлорофильного фотосинтеза.

Знакомтесь – Мелайнабактерия (нимфа тёмных вод)

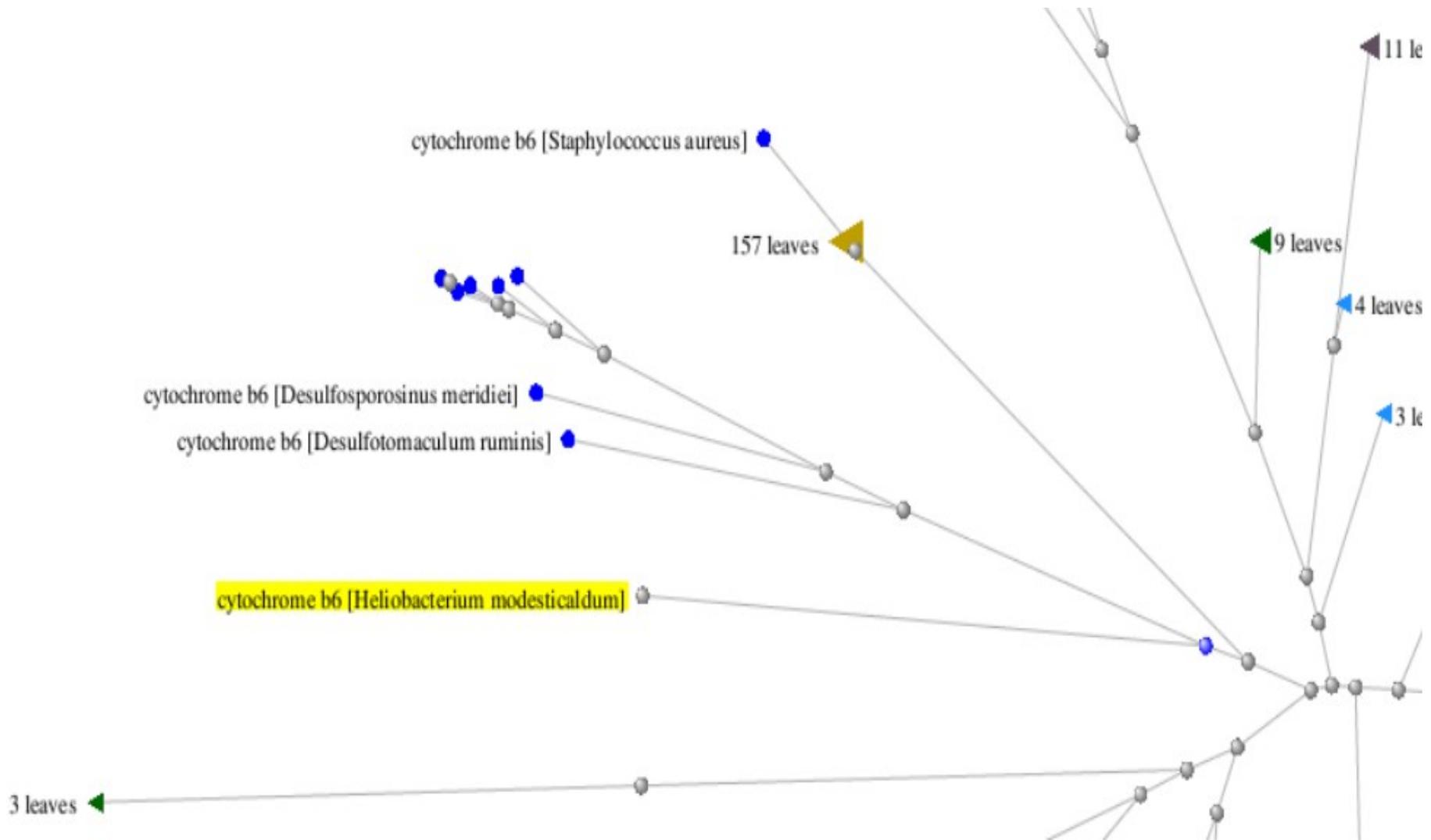


Мелайнабактерии – утратившая способность к фотосинтезу ветвь цианобактерий или их предок?

- Дигемовый цитохром с в bc1/b6f комплексе гомологичен дигемовому цитохрому с в аналогичном комплексе гелиобактерий.
- Имеют цитохром с оксидазу, характерную для факультативных анаэробов.
- => они могли в своё время быть фотосинтетиками, в качестве побочного продукта жизнедеятельности которых выделялся кислород.

Возможные этапы эволюции хлорофилльного фотосинтеза.

1. Клостридии, живущие в лагунах в активно испаряющихся солёных водоёмах в качестве защиты от ультрафиолета приобрели каратеноиды и хлорофиллы. Мембранный протеин, объединяющий их в единый комплекс, стал прототипом первого РС. Комплекс переноса протонов через мембрану в периплазматическое пространство при помощи менахинонов и другие составные элементы цикла сульфатредукции были использованы для создания механизмов генерации протонного потенциала и восстановления в рабочее состояние молекул хлорофилла. Появление примитивной системы фотосинтеза, напоминающей таковую у нынешних гелиобактерий.
2. Отделение цианобактерий от общего с мелаинабактериями ствола, замена у них цитохрома c_1 на цитохром f , появление бактериохлорофилла как ответвления при синтезе 8¹-ОН-хлорофилла a , отделение ФС1 от ФС2.
3. Эволюция ФС2, постепенное усложнение её каталитического центра (см. следующие слайды).



Фрагмент филогенетического дерева цитохрома b6

Возможная связь хлорофилльных фотосинтетиков с сульфатредукторами



Конфуркация электронов \rightleftharpoons бифуркация электронов

Восстановление истории эволюции ФС2 на основе изучения специфики её специализированных вариантов, полученных в результате дупликаций исходного реакционного центра RCI (по Tanai Cardona).

- Архаичный реакционный центр (гомодимер) => дупликация первых пяти его трансмембранных доменов и появление общего предка всех RCII (тоже гомодимер) => их дивергенция на общего предка всех анаэробных RCII и предка ФС2 цианобактерий => дупликация гена, кодирующего гомодимер RCII с образованием гетеродимера (D1 + D2).
- Особенности различных версий протеина D1 ФС2 позволяют восстановить предполагаемую историю появления кластера Mn_4CaO_5 . В настоящее время стандартная форма D1 имеет 7 аминокислотных мостиков, фиксирующих кластер Mn_4CaO_5 в апопротеине. Известны так же необычные варианты D1 (так называемые «изгои»). В частности:
 1. Нестандартная версия данного белка у рано отделившегося от общего ствола цианобактерий штамма *Gloeobacter kilaueensis* JS-1 (ещё нет типичных для современных цианобактерий аминокислотных мостиков, но уже есть путь для отвода протонов).
 2. Специфический вариант, экспрессирующийся при длительном облучении дальним красным и инфракрасным светом (совместо с синтезом хлорофилла F, имеющим максимум поглощения в районе 710 нм).
 3. Экспрессируемый в условиях темноты или слабой освещённости (возможно, его функции каким-то образом связаны с фиксацией молекулярного азота).
 4. Синтезируемые в микроаэробных условиях.

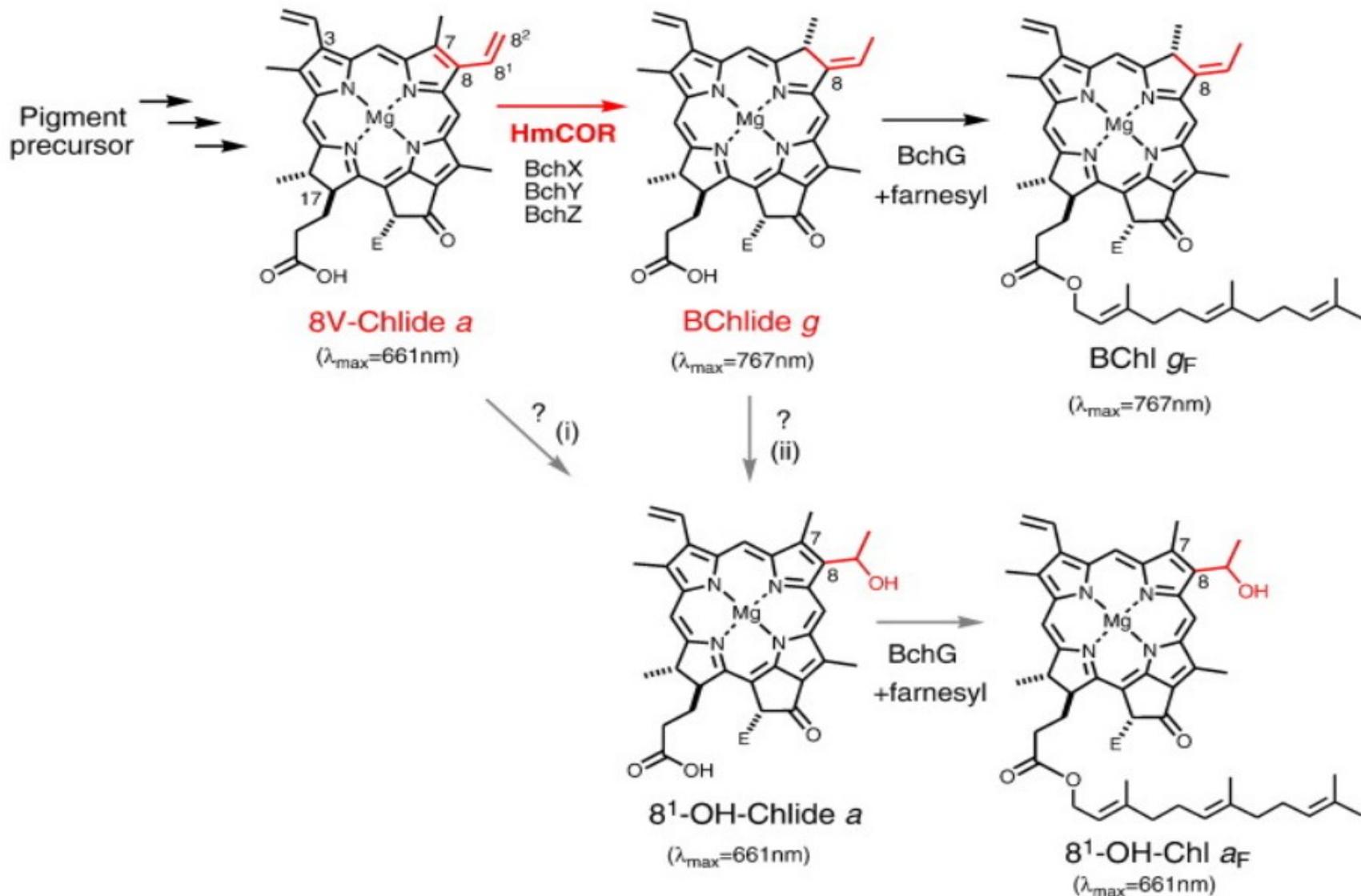
Предполагаемые этапы формирования ФС2 оксигенного фотосинтеза:

1. RCII – гомодимер, каждая из идентичных субъединиц которого способна захватывать Mn^{2+} и окислять его до Mn^{4+} (итого, появляются 4 свободных электрона).
2. Дополнение ионов марганца анионами бикарбоната (HCO_3^-) создаёт кластер с восстановительным потенциалом, в принципе (при наличии в его эpsilon-окрестности остатков определённых аминокислот), достаточным для разложения воды на водород и кислород напрямую (хотя, видимо, и с низким КПД), либо через промежуточный этап образования H_2O_2 .
3. Дивергенция субъединиц RCII, появление дополнительных мостиков в D1, утрата каталитического центра D2, стабилизация комплекса ионом кальция.
4. Адаптация к аэробным условиям, комплекс принимает современный вид.

Этапы сборки RCII современных цианобактерий:

1. D1, D2, PsbI и Cytochrome *b*559 объединяются в единый комплекс, напоминающий примитивный RC.
2. В указанный комплекс добавляются ионы марганца.
3. На основе протеинов CP43 и CP47 собираются антенные комплексы, которые потом добавляются к собранному ранее ядру RC.
4. К ионам марганца добавляются атомы кислорода, каталитический центр удерживается благодаря АК мостикам из D1 и CP43.
5. Происходит фотоактивация (один из атомов Mn^{2+} окисляется до Mn^{3+}), одновременно одна из молекул воды депротенируется (протон отводится по специальному каналу на внешнюю сторону мембраны), что приводит к изменению конфигурации всего комплекса, при этом марганец смещается в новое место, а его бывшее место занимает ион кальция, что, в свою очередь, приводит к стабилизации всего комплекса.

Синтез бактериохлорофилла g и одной из модификаций хлорофилла a у гелиобактерий (рисунок взят из статьи [doi:10.1016/j.bbabi.2013.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.06.007))



Литература для дополнительного чтения

- А.Марков «Рождение сложности»
- Э. Галимов «Феномен жизни»
- М. Мосевицкий «Распространённость жизни и уникальность разума?»
- Е.Кунин «Логика случая»
- М.Никитин «Происхождение жизни. От туманности до клетки» (?)
- Статьи LUSA о происхождении жизни:
http://scorcher.ru/theory_publisher/autor_list.php?id=2694