

# GÉNY AKO ŽIVÉ KRONIKY

*Juraj Krajčovič*

**Abstract.** The enormous growth of molecular biology, primarily genomics over the past decades has provided valuable data useful for reconstructing the history of life on the earth. It is clear that the greatest riches of data on the evolution of organisms are concealed in the present-day cell itself. Genes may be considered as a kind of living fossils and the information contained in them reaches back all the way to the primordial life on this planet. Comparisons of these information molecules based on nucleotide sequences in homologous genes serves as a yardstick for assessing kinship between cells as well as between organisms. Tracing the history of cells and their genes to their very origin thus becomes more and more amenable to scientific examination.

Mimoriadne pozoruhodné na súčasných objavoch v biológii je i to, že poukazujú na bohatstvo informácií o histórii života na Zemi, ktoré je ukryté v bunke, konkrétne v nej uloženej genetickej informácii vo forme DNA. Na gény, resp. ich produkty (RNA a bielkoviny) sa nazerá ako na historické dokumenty. Molekulárna biológia preniká do všetkých oblastí biológie. Podstatným spôsobom rozširuje paletu nástrojov, ktorými je možné skúmať najrozmanitejšie formy života (súčasných i vyhynutých organizmov) i aktívne ich pozmeňovať. Nové poznatky, zásahy i perspektívy sú tak významné, že sa nimi navodzuje akási revolúcia v biológii. S prívlastkom „molekulárna“ sa možno stretnúť pred názvom takmer všetkých biologických disciplín – od molekulárnej bunkovej biológie, cez molekulárnu genetiku, molekulárnu systematiku až po molekulárnu antropológiu; v niektorých prípadoch sa dokonca prekračujú hranice biológie, napr. v spojeniach – molekulárna paleontológia, resp. molekulárna archeológia.

Gény môžu teda predstavovať akési živé kroniky, ktoré dokumentujú evolúciu ich nositeľov, buniek, resp. organizmov. Molekulárna biológia priniesla úplne nové metódy, ktorými je možné študovať evolučné vzťahy medzi organizmami. Sformovala sa nová biologická disciplína – molekulárna evolúcia. Naplňajú sa očakávania, že dva druhy organizmov, o ktorých na základe podobnosti v anatomických, či fyziologických znakoch predpokladáme, že sú blízko príbuzné, budú mať vyššie percento homológie v sekvencii génov (proteínov), v porovnaní s menej príbuznými druhmi. Ak sa sekvencie nukleotidov v porovnávaných génoch (resp. aminokyselín v proteínoch) z dvoch organizmov líšia len minimálne, znamená to, že príslušnú sekvenciu zdedili po nedávnom spoločnom predkovi.

## **Živé kroniky**

Pri rekonštrukcii procesu evolúcie nie sme teda odkázaní len na paleontologické nálezy. Bunka si zachováva záznam o svojej evolúcii

v charaktere jej vlastných metabolických procesov, hlbšie - v poradí aminokyselín v bielkovinách, principiálne - v poradí nukleotidov vo svojich nukleových kyselinách. Tieto „živé fosílie“ sú potenciálne oveľa bohatšie a rozsiahlejšie ako skutočné fosílné pozostatky a siahajú ešte oveľa ďalej - až k počiatkom bunky, do obdobia, keď existoval spoločný predok všetkého živého. Na to, aby bolo možné čítať z vysoko informatívnych genetických záznamov, bolo potrebné vyvinúť technologické postupy na stanovenie sekvencií stavebných elementov v génoch, resp. v ich produktoch. Pozoruhodný pokrok v metódach štúdia bielkovín (proteomika) a nukleových kyselín (genomika, transkriptomika), predovšetkým nové techniky sekvenovania nukleových kyselín, urýchlili čítanie evolučnej informácie z genetických záznamov a ešte viac umocnili záujem o otázky evolúcie (pozri 2).

Všeobecne sa prijíma názor, že porovnávacie analýzy tzv. informačných makromolekúl (nukleové kyseliny, bielkoviny) môžu poskytnúť kvantitatívnu mieru pre stanovenie evolučného vzťahu medzi súčasťami bunky, bunkami, organizmami, populáciami, atď. Niet pochyb o tom, že porovnávanie sekvencií stavebných prvkov v homologických génoch, resp. v ich produktoch, je veľmi cenným prístupom na zodpovedanie viacerých otázok fylogénzy. Priekopníkmi na poli využitia molekúl ako dokumentov evolučnej histórie boli svojimi prácami z roku 1965 Zuckerkandl a Pauling (29). Ich pionierske práce otvorili novú etapu štúdia evolúcie organizmov.

Za jeden z prvých príkladov využitia molekulárnej biológie pri riešení evolučných otázok sa považujú imunologické štúdie, konkrétne krížové reakcie albumínu sér viacerých primátov, vrátane človeka. Tento, dnes už učebnicový príklad, tzv. Sarich-ov a Wilson-on medzník z roku 1967 (24), priniesol úplne novú odpoveď na otázky o príbuzenských vzťahoch človeka, šimpanza, gorily a orangutana a veku ich spoločného predka. Dovedty panoval názor, že človek je fylogeneticky veľmi vzdialený od ostatných veľkých opíc (samostatná čeľaď) a odčlenenie vývojovej línie vedúcej k človeku nastalo pred asi 15 miliónmi rokov. Takéto datovanie bolo založené na fosíliách vyhynutého organizmu nazvaného *Ramapithecus*, ktorý bol považovaný za prvého predstaviteľa ľudskej vývojovej línie. Imunologické štúdie však ukázali, že človek, šimpanz a gorila sú geneticky takmer rovnako vzdialené organizmy, kým orangutan je výrazne odlišnejší. Zároveň, za predpokladu, že albumín séra je dobrým molekulárnym chronometrom, ktorý možno kalibrovať na základe času odvetvenia primátov od ostatných opíc Starého sveta, t. j. približne pred 30 miliónmi rokov, potom vývojové línie človeka, šimpanza a gorily sa oddelili asi pred 5 miliónmi rokov.

Spomínané štúdie Saricha a Wilsona (24) priniesli nielen nový pohľad na pôvod človeka, ale odštartovali aj širokú a intenzívnu diskusiu

o vhodnosti využívania molekúl *versus* morfológie, ako nástrojov pre štúdium evolúcie a určovanie príbuzenských vzťahov medzi organizmami (21). Predstavovali silný impulz nielen pre využívanie molekúl pri štúdiu fylogénézy, ale aj pre starostlivé prehodnocovanie paleontologických nálezov. Otázka dnes už nestojí tak, či porovnávacia analýza molekúl alebo morfológických znakov je tým jediným správnym prístupom pre rekonštrukciu fylogénézy (1). Hoci niekedy ťažko a s problémami, predsa len sa hľadá a nachádza cesta akéhosi vzájomného dopĺňania sa, korigovania a obohacovania oboch prístupov (veľakrát sa už ukázalo, že význam, či váha tých-ktorých znakov a vlastností pre určovanie fylogenetických vzťahov bola nad-, resp. podhodnotená). Dvadsať rokov po tzv. Sarich-Wilsonovom mílniku sa na základe ďalších paleontologických nálezov potvrdilo, že *Ramapithecus* nepatrí do vývojovej línie človeka, ale orangutana. To odstránilo prekážku v prospech uznania argumentu, že človek, šimpanz a gorila mali oveľa nedávnejšieho spoločného predka, ako sa pôvodne myslelo. Medzičasom výsledky ďalších molekulárno-biologických štúdií boli nielen v súlade s novou konštrukciou fylogenetického stromu primátov, ale ukázali aj, že šimpanz je bližším príbuzným človeka ako gorila. Najnovšie porovnávanie rozsiahlych úplných sekvencií genómu človeka a šimpanza dokumentujú, že rozdiel medzi nimi je asi len 1,5 %, a to pritom veľká väčšina odlišností sa týka nekódujúcich sekvencií.

### Molekulové hodiny

Využitie informačných makromolekúl v úlohe molekulových chronometrov je úzko späté s pojmom molekulové hodiny. Vychádza sa pritom z predpokladu, že molekuly sa vyvíjajú približne rovnakou rýchlosťou a rozdiely medzi podobou homologickej molekuly u predstaviteľov dvoch rôznych druhov sú úmerné času, ktorý uplynul od odčlenenia sa oboch druhov od spoločného predka. Viacerí autori sa nazdávajú, že v danej informačnej makromolekule, resp. v sekvencii nukleotidov v géne, sa mutácie hromadia konštantnou rýchlosťou vo všetkých vývojových líniách, pokiaľ si daná sekvencia zachováva svoju pôvodnú funkciu. Napriek tomu, že voči rovnomernosti chodu molekulárnych hodín existujú isté výhrady, predstavujú široko využívané východisko pre konštruovanie tzv. stromov života – dendrogramov.

Odhalenie fenoménu „evolučné, fylogenetické, resp. molekulové hodiny“ sa pokladá za jeden z najväčších objavov 20. storočia (rok 1983). Ich princíp je častokrát spájaný s Kimurovou teóriou tzv. neutrálnej evolúcie (12), čo približuje citát: „Skutočnosť, že v rôznych organizmoch rozdielne (no zjavne príbuzné) molekulové sekvencie vykonávajú rovnakú molekulovú funkciu, naznačuje, že väčšina zo zmien, ktoré sa postupne zafixovali v tej-ktorej molekulovej sekvencii, sú selekčne neutrálne, t. j. nemajú žiaden fenotypový dopad.“ Ako príklad možno uviesť mutácie v nekódujúcich oblastiach alebo v tretích pozíciách nuk-

leotidových tripletov (v dôsledku degenerovanosti genetického kódu v tomto prípade zmena nukleotidu nespôsobuje zmenu aminokyseliny v kódovanej bielkovine – tzv. synonymné substitúcie), resp. pseudogény (nefunkčné kópie génov). Frekvencia fixácie neutrálnych mutácií závisí len od mutačnej rýchlosti a môže slúžiť ako molekulové hodiny. Čím dlhší čas uplynul od momentu, kedy sa evolučná línia rozdelila na dve vetvy (od tzv. evolučného uzla), tým viac sa mohlo naakumulovať mutácií v homologických informačných makromolekulách a úmerne tomu sa budú od seba odlišovať aj sekvencie stavebných prvkov, z ktorých molekuly pozostávajú.

### Univerzálne molekulové chronometre

Všetky samostatne sa replikujúce štruktúry nevyhnutne vlastnia aparát na udržiavanie a reprodukciu genetickej informácie, ako aj na jej realizáciu – transláciu do postupnosti aminokyselín v príslušných bielkovinách. Väčšina veľkých molekúl, zahrnutých v týchto procesoch, musí niesť pečať svojho pôvodu už z veľmi skorých štádií evolúcie bunky. Museli existovať už v období pred dosiahnutím úrovne komplexnosti prokaryotickej bunky. Preto možno očakávať, že tieto molekuly majú potrebné vlastnosti fylogenetického markera.

Z molekúl, ktoré spĺňajú všetky požadované predpoklady, sú to predovšetkým molekuly ribozómových RNA (rRNA). Sú kľúčovou súčasťou ribozómov, organel, na ktorých sa prekladá genetická informácia – uskutočňuje sa syntéza bielkovín. Predpokladá sa, že vzhľadom na kardinálnu dôležitosť funkcie, ktorú zastávajú v procese prekladu genetickej informácie, podliehajú zmenám počas evolúcie pravdepodobne vôbec najpomalšie.

Ekvivalentnosť a konštantnosť funkcie je veľmi dôležitá, pretože rozdiely prinášajú so sebou dodatočné zmeny v sekvencii nukleotidov, čo sťažuje, ba až znemožňuje porovnávanie, a tým dedukciu fylogenetických vzťahov. Ribozómové RNA sú univerzálne rozšírené. Ich ďalšou výhodou je, že prinajmenšom niektoré časti molekuly sa menia dostatočne pomaly na to, aby pôvodné spoločné sekvencie úplne nevyzmizli. Inými slovami, porovnávanie sekvencií nukleotidov v rRNA, resp. v ich génoch, umožňujú odvodzovať najhlbšie fylogenetické vzťahy. Popri vysoko konzervatívnych úsekoch obsahujú tieto molekuly aj úseky hypervariabilné, čo umožňuje zároveň študovať vzdialené i blízke stupne príbuznosti. Okrem toho sú tieto molekuly dostatočne dlhé, takže predstavujú dostatočne veľký „štatistický súbor“ pre spoľahlivú analýzu. Zo spomenutých dôvodov sú to práve molekuly rRNA (resp. ich gény), predovšetkým z malých ribozómových podjednotiek, z porovnávanie ktorých sa v posledných rokoch odvodzujú fylogeneticky najzávažnejšie závery. Obrovský význam univerzálneho fylogenetického stromu skonštruovaného na základe porovnávanie rRNA spočíva v tom, že rekonštruuje evolúciu života na našej planéte aj v tej jeho najdlhšej etape, tzv.

bunkovej, kedy neexistovali žiadne mnohobunkové organizmy a morfológické rozdiely boli minimálne. Toto obdobie, ktoré trvalo približne 3 miliardy rokov, sa niekedy označuje ako vek mikroorganizmov.

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

### **Potrojná klasifikácia organizmov**

Autorom potrojnej klasifikácie organizmov – Archaeobacteria, Bacteria a Eukaryota – je prof. Carl R. Woese z Univerzity v Illinois, USA. Toto svoje stanovisko k systematike organizmov, odvíjajúce sa primárne od rozsiahlych porovnávacích štúdií ribozómových RNA, publikoval po prvýkrát v roku 1977 (27). V roku 1990 ho aktualizoval do súčasnej podoby troch domén – Archaea, Bacteria, Eukarya (28).

Celý rad pozorovaní potvrdil, že medzi prokaryotickými organizmami skutočne existuje hlboká fylogenetická priepasť (prehľad 6, 13). Táto ich delí na dve od seba nezávislé vývojové línie – archeóny (Archaea, po staršom archebaktérie) a baktérie (Bacteria, resp. eubaktérie), ktoré sú zase v tej či onej miere odlišné od eukaryotov (Eukarya). Ukázalo sa, že porovnávanie sekvencií ribozómových RNA z malých podjednotiek ribozómov predstavuje významný medzník v objasňovaní fylogenetických vzťahov medzi organizmami (predovšetkým prokaryotickými). Na tomto základe možno skonštruovať prirodzený systém klasifikácie organizmov, ktorý by bol odrazom skutočných evolučných vzťahov. Objav archeónov (archebaktérií) ako samostatnej primárnej vývojovej línie predstavuje sám o sebe zistenie obrovského významu, ktoré môže navyše veľa prezradiť aj o počiatkoch života na Zemi. Za predpokladu, že existujú len dve primárne vývojové línie, ťažko možno evolučne interpretovať rozdiely medzi nimi. Odhalenie tretej línie poskytuje možnosť stanoviť, ktoré vlastnosti sú pôvodné a ktoré sa vyvinuli relatívne nedávno.

Úsilie o vypracovanie prirodzeného systému klasifikácie organizmov vyústilo v súčasnosti do názoru, že existujú tri základné, principiálne odlišné vývojové línie života: Archaea, Bacteria, Eukarya. Nenazývajú sa ríše, ale domény, čo je výrazom snahy vyhnúť sa terminologickým zmatkom pri označení najvyšších taxonomických jednotiek. Rozdiely medzi uvedenými tromi zoskupeniami organizmov sú naozaj veľmi hlboké, oveľa významnejšie ako rozdiely, ktorými sa od seba líšia typické ríše, akými sú napr. rastliny a živočíchy. Dokonca i koncepcia Prokaryotae – Eukaryotae, ktorá bola, a v istom zmysle aj stále je považovaná mnohými vedcami za základnú fylogenetickú dichotómiu, prestáva vyhovovať. Rozdiely v morfológii buniek (hlavne jadra) sú skutočne tak výrazné, že primárne rozdelenie života by naozaj mohlo ležať medzi pro- a eukaryotickými formami. Problém však spočíva v tom, že klasifikácia

organizmov na eukaryotické a prokaryotické je vo svojej podstate cyto-  
logická, a len nepriamo fylogenetická. Z cytologického hľadiska sú totiž  
archeóny skutočne prokaryotami, pretože nevykazujú nijaké charakte-  
ristiky, ktorými sú definované eukaryoty, t. j. nemajú bunky s pravým  
jadrom. Avšak na molekulovej úrovni sa archeóny nepodobajú ostat-  
ným prokaryotom reprezentovanými baktériami. Pravdou je skôr pravý  
opak. Archeóny sa v mnohých svojich znakoch a vlastnostiach ponášajú  
väčšmi na zástupcov eukaryotických organizmov ako baktérií. Premie-  
ta sa to zároveň i do fylogenetických stromov života skonštruovaných  
na základe porovnávania vhodných molekulových chronometrov (hlav-  
ne rRNA). Korene eukaryotickej línie (Eukarya) ležia bližšie k doméne  
Archaea ako Bacteria (28). Tieto dendrogramy, ktoré sú založené na  
kvantifikácii rozdielov medzi organizmami v sledovaných parametroch,  
okrem toho názorne demonštrujú, aké priepastné sú na molekulovej  
úrovni rozdiely medzi niektorými predstaviteľmi prokaryotov, no na  
druhej strane zase ukazujú, že rastliny a živočíchy (na prvý pohľad tak  
odlišné organizmy) sú si relatívne blízke.

### Porovnávacía genomika

Od roku 1995 sa začína písať história ďalšej novej biologickej disciplí-  
ny, ktorá sa nazýva komparatívna (porovnávacía) genomika. Štartuje  
éra porovnávania úplných zápisov genetickej informácie organizmov.  
V tomto roku sa totiž podarilo stanoviť primárnu sekvenciu nukleotidov  
v genóme baktérií *Haemophilus influenzae* (1,83 Mbp) (Mbp = milión  
párov báz) a *Mycoplasma genitalium* (0,58 Mbp), zástupcov domény  
Bacteria. Vzápätí k nim pribudla znalosť úplného zápisu genetickej in-  
formácie eukaryotického organizmu, kvasinky – *Saccharomyces cere-  
visiae* (13,5 Mbp) (doména Eukarya).

Nasledujúci rok 1996 možno označiť za zlomový pre primárnu sys-  
tematiku organizmov. Pribudol totiž údaj o kompletnom genóme hy-  
pertermofilného archeónu *Methanococcus jannaschi* (1,66 Mbp),  
predstaviteľa domény Archaea. Bol to posledný chýbajúci článok v ko-  
lekcii úplných sekvencií nukleotidov genómov z vybraných zástupcov  
všetkých troch domén (Archaea, Bacteria, Eukarya), ktoré z pohľadu  
molekulárnej evolúcie organizmov predstavujú tri základné vývojové  
línie života. Odvtedy sa kolekcia úplných sekvencií nukleotidov z genó-  
mov rôznych organizmov významne rozrástla a vďaka novým metodic-  
kým postupom sa stále rozrastá donedávna nevídaným, až neuveriteľ-  
ným tempom. Na stránkach najprestížnejších prírodovedeckých časo-  
pisov sa stále vedú diskusie o význame týchto poznatkov pre modernú  
biológiu. Akýmsi vyvrcholením celého tohto úsilia je spoznanie úplnej  
sekvencie ľudského genómu. Hoci hnacou silou porovnávacej genomiky  
sú hlavne biotechnologické pohnútky s očakávanými výstupmi do  
humánnej medicíny (najväčší podiel zo spoznaných genómov pripadá  
na bakteriálne patogény človeka), celkom prirodzene sa očakáva, že

nové poznatky významným spôsobom ovplyvnia aj názory na evolúciu organizmov.

Isté obavy, či čítanie genetických záznamov má dostatočne vysokú výpovednú hodnotu pre analýzu fylogenézy, vyplynuli z popísania fenoménu, ktorý sa označuje ako horizontálny transfer génov. Ak by sa totiž gény mohli masívne a ľubovoľne presúvať z jedného organizmu do druhého, výrazne by to sťažilo, až znemožňovalo analýzu príbuzenských vzťahov medzi organizmami. Napriek tomu, že k horizontálnemu transferu génov dochádza (najmä medzi prokaryotickými organizmami), jeho frekvencia je veľmi odlišná, a to v závislosti od typu génov. Gény, ktorých produkty sa podieľajú na procesoch replikácie, transkripcie a translácie genetickej informácie, z analýz ktorých sa odvodzujú najvýznamnejšie fylogenetické závery, podliehajú týmto procesom len celkom výnimočne. Rozsiahle analýzy celých genómov ukazujú, že horizontálny transfer génov neznehodnocuje genealogické analýzy (3, 7).

### **Pôvod eukaryotickej bunky v novom svetle**

Rozpoznanie principiálnych rozdielov medzi archeónmi a baktériami nebývalou mierou sprístupnilo a stimulovalo riešenie ďalšieho zásadného evolučného problému, ktorým je pôvod a evolúcia eukaryotickej bunky. V súčasnosti sa univerzálne akceptuje, že eukaryotická bunka je chimérou, ktorá vznikla endosymbiotickým splynutím viacerých pôvodne samostatne žijúcich prokaryotických buniek (prehľad 13).

Diskusie sa vedú iba o rozsahu endosymbiôzy, postupnosti krokov, ich opakovaní (mono- *versus* polyfyletizmus). Eukaryotickú bunku teda nemožno pokladať za produkt jednej vývojovej línie, ktorý by bol porovnateľný s predstaviteľmi dvoch prokaryotických vetiev – takto sa možno pozeráť len na niektoré z jej komponentov. Pôvod semiautonómnych bunkových organel (majú svoju vlastnú DNA a translačný aparát) sa jednoznačne odvodzuje od endosymbiotických baktérií, a to konkrétne v prípade mitochondrií od  $\alpha$ -proteobaktérií a v prípade plastidov od cyanobaktérií (siníc) (prehľad 13). Integrácia dýchacieho (mitochondrie) a fotosyntetického (plastidy) aparátu bola pravdepodobne vyvolaná zmenami okolitého prostredia (hlavne zvyšujúca sa koncentrácia kyslíka v ovzduší). Vnútrobunkové spolužitie viacerých prokaryotických buniek (celulárna kohabitácia) umožnilo vývoj pokročilejšieho, pravého mnohobunkového života a v kombinácii s kyslík produkujúcou fotosyntézou taktiež život mimo vodného prostredia. Takéto spolužitie sa zároveň stalo zdrojom obrovskej morfolologickej a genetickej rozmanitosti. Podstatnou črtou eukaryotickej bunky je enormná kapacita preskupovať (reštrukturalizovať) genetický materiál v priebehu evolúcie, čo je späté so stratou starých a nadobúdaním nových funkcií. Ruka v ruku s presunom väčšiny génov z predkov organel do jadra sa musel vyvinúť dômyselný systém transportu ich produktov z nukleo-cytosolu späť do mitochondrií a plastidov (prehľad 26).

Vysvetliť pôvod nukleocytosolu eukaryotických buniek sa pokúša niekoľko hypotéz (napr. vodíková, syntrofia). Tieto vychádzajú nielen z neustále pribúdajúcich molekulárno-biologických údajov, ale i poznatkov ekológie, biochémie, mikropaleontológie. Predpokladajú, že na vzniku jadra sa podieľali baktérie zo skupiny proteobaktérií spolu s metanoarcheónmi. Vodíková hypotéza predpokladá symbiotickú asociáciu medzi autotrofným, anaeróbnym, striktno na vodíku závislým metanoarcheónom (hostiteľ) a  $\alpha$ -proteobaktériou (symbiont), ktorá vodík produkovala (mala zároveň potenciálnu schopnosť respirácie) (16). Hypotéza syntrofie vychádza z predpokladu, prvotným bolo spolužitie  $\delta$ -proteobaktérie (sulfát redukujúca myxobaktéria) a metanoarcheónu (sformovali akési syntrofické konzorcium), do ktorého, či už súčasne alebo neskôr, vstúpila aj  $\alpha$ -proteobaktéria (metanotrof) (17).

### Chronometre na krátke vzdialenosti

Molekulové chronometre umožňujú merať evolučný čas v širokom rozpätí. Zatiaľ čo veľmi konzervatívne molekuly (napr. aj spomenuté univerzálne molekulové chronometre - rRNA, resp. ich gény - rDNA) umožňujú stanovovať najvzdialenejšie stupne príbuznosti, veľmi rýchlo sa meniace molekuly sú vhodné pre určovania najbližších príbuzenských vzťahov. V tomto smere extrémnym príkladom sú molekuly RNA vírusov.

RNA vírusy, napr. HIV (spôsobuje ochorenie AIDS - syndróm získanej imunodeficiencie) sa vyvíjajú miliónkrát rýchlejšie ako v jadre lokalizované gény eukaryotických organizmov. To je i dôvodom, prečo vývoj efektívnych liekov alebo vakcín proti RNA vírusom je takým veľkým problémom. Vysoká rýchlosť evolúcie RNA vírusov umožňuje sledovať ich šírenie sa v populácii. V tomto smere sa stal už klasickým, učebnicovým príkladom tzv. prípad floridského zubára.

V roku 1990 Centrum pre kontrolu ochorení v Atlante (USA) zaregistrovalo správu o ochorení mladej ženy na AIDS. Jediným rizikovým faktorom, ktorý by prijateľným spôsobom vysvetľoval jej infikovanie sa vírusom HIV, bola skutočnosť, že bola pacientkou zubára trpiaceho na AIDS. Následné štúdium zdravotného stavu ďalších zubárových pacientov ukázalo, že je medzi nimi viacero nositeľov vírusu HIV. Mohli byť títo ľudia infikovaní týmto dentistom? Výsledkom porovnávacej analýzy sekvencií génu *env* (kóduje obalový proteín vírusu HIV) bolo zistenie, že všetci pacienti, pre ktorých jediným rizikovým faktorom pre získanie infekcie HIV bol kontakt so zubárom, boli nositeľmi sekvencie veľmi podobnej zubárovej. Pravdepodobnosť, že zdrojom infekcie bol zubár, je veľmi vysoká. Na strane druhej, medzi pacientmi boli dvaja takí, ktorí mohli byť infikovaní aj iným spôsobom ako len kontaktom so zubárom (patrili do tzv. rizikovej skupiny). V oboch týchto prípadoch sa sekvencie významne líšili od ostatných. Porovnania ukázali, že genóm vírusu HIV si uchoval evolučnú informáciu v podobe množstva naakumulova-



ných mutácií, ktoré je úmerné času medzi prenosmi vírusu. Odlíšnosť sekvencií zubára a pacientov z rizikovej skupiny svedčí v prospech dávnejšej infekcie vírusom HIV, a to z iného zdroja ako od zubára; naopak, podobnosť sekvencií pri pacientoch z nerizikovej skupiny poukazuje na veľmi nedávnu históriu prenosu a zdrojom infekcie bol podľa všetkého zubár (19).

### **Molekulárna evolúcia, systematika, ekológia**

Prieknik molekulárnej biológie do takmer všetkých oblastí biológie vedie k formovaniu sa nových biologických disciplín, začínajúcich sa prívlastkom molekulárna. Najčastejšie je spoločným menovateľom štúdium príbuzenských vzťahov medzi skúmanými organizmami a rekonštrukcia ich evolúcie, ktoré sa odvíja od údajov získaných molekulárno-biologickými metódami (9, 14, 18). Molekulárna evolúcia ako novokonštituovaná disciplína sa týmito otázkami zaoberá v dvoch rovinách. V rovine teoretickej študuje rýchlosť, charakter zmien, mechanizmy a typy procesov, ktoré stoja v pozadí evolúcie informačných makromolekúl (pozri napr. 15). V rovine praktickej využíva získané poznatky pre rekonštrukciu evolučnej histórie génov, genómov, organizmov (pozri napr. 20). V tomto smere dochádza k istému prekryvu s inou biologickou disciplínou – molekulárnou ekológiou. Tá využíva molekulárno-biologické markery na štúdium ekológie a evolúcie a na určovanie príbuzenských vzťahov medzi organizmami, populáciami, druhmi i vyššími taxónmi.

Čítanie genetickej informácie cestou stanovenia postupnosti základných stavebných prvkov – nukleotidov v nukleových kyselinách – sa stáva rutinnou, doslova strojovou záležitosťou. Množstvo pribúdajúcich údajov pochádzajúcich z najrozmanitejších organizmov je obrovské a hojne sa využíva i pri identifikácii organizmov a ich systematickej klasifikácii. Syntézou molekulárnej, evolučnej a systematickej biológie vznikla ďalšia moderná biologická disciplína, ktorá sa nazýva molekulárna systematika organizmov. Za akúsi kuchársku knihu molekulárnej systematiky sa považuje celosvetovo rozšírená učebnica – „Molecular Systematics“ od Hillisa a spolupracovníkov (10). Niekedy sa takmer ako synonymum pre označenie tejto disciplíny používa termín – molekulárna fylogenetika (pozri 8).

### **Život v extrémnych podmienkach**

Vďaka využívaniu posledných výtvarných vedy a techniky (nové metodické postupy a izolačné techniky, netradičné materiály, počítačové spracovanie údajov, atď.) sa i tak málo prítlačivá disciplína, akou systematika organizmov spravidla vždy bola, razom stala poľom vzrušujúceho výskumu.

Výsledkom sú napr. objavy mikroorganizmov (tzv. extrémofilov), ktoré sú schopné života aj vo veľmi extrémnych podmienkach (teplota,

tlak, pH, radiácia, vysoké koncentrácie toxických látok), t. j. takých, ktoré sa donedávna pokladali za nezlučiteľné so životom (pozri napr. 11,25). Pretože voda, ako nevyhnutná podmienka pre život v podobe, v akej ho dnes poznáme, sa vyskytuje aj mimo Zeme (napr. na Marse a mesiacoch Jupitera – Európa a Callisto), existujú snahy dokázať stopy života prednostne na týchto mimozemských stanovištiach. Idey o extraterestrickom pôvode života sú teda stále živé i vďaka niektorým najnovším vedeckým poznatkom.

Stanovíť prítomnosť organizmov na najrozmanitejších stanovištiach je možné vďaka technikám PCR, ktoré vychádzajú z minimálneho množstva celkovej DNA vyzolovanej zo vzorky odobratej z danej lokality (napr. žriedlo horúcej vody; rezervoáre vody pod antarktickými ľadovcami; črevný trakt hmyzu atď.). Molekulárnu identifikáciu neznámych organizmov a ich zaradenie do jednej z troch primárnych domén umožňuje využitie tzv. univerzálnych primerov, ktoré sú špecifické pre zástupcov tej-ktorej domény (Archaea, Bacteria, Eukarya). Tak sa napr. ukázalo, že zástupcovia domény Archaea, archeóny, nie sú obyvateľmi len najextrémnejších ekologických stanovišť, na ktorých boli primárne zachytené, ale že sú prítomné prakticky všade a predstavujú veľmi významnú časť biomasy Zeme. Mnohé z takto identifikovaných organizmov zatiaľ bližšie nepoznáme, pretože nevieme pripraviť podmienky, ktoré by umožnili ich kultivovanie (23). Takéto sekvenčne unikátne PCR produkty zo zatiaľ bližšie neurčených, no existujúcich organizmov, nazývame „environmentálne sekvencie“. Bývajú označené číselným a písmenovým kódom, pod ktorým sú zaregistrované v databázach sekvenčných údajov. Sú známe prípady, kedy sa na základe znalosti environmentálnej sekvencie podarilo neskôr identifikovať a vykultivovať dovtedy neznámy druh mikroorganizmu.

## Starodávna DNA

Termín starodávna DNA (Ancient DNA) sa používa na označenie procesov a postupov spätých so získavaním a analýzou genetického materiálu z paleontologických a archeologických nálezov, muzeálnych exponátov, herbárov, a niekedy aj klinických vzoriek (prehľad 22). Starodávna DNA poskytuje úplne nový pohľad na evolúciu. Umožňuje analyzovať viacero aspektov mikroevolúcie a populačnej genetiky v reálnom čase. V súčasnosti najčastejšími príkladmi využitia starodávnej DNA je štúdium makroevolúcie – rekonštrukcia evolučnej histórie vyhynutých druhov organizmov (neandertálci, zebrovitá quagga, vták moa, mamuty, jaskynné medvede), alebo opätovné preskúmanie problémov donedávna dostupných len cez štúdium morfológie fosílií.

– 18 – Nosným nástrojom molekulárno-biologickej analýzy historického biologického materiálu je technika polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá umožňuje analyzovať minimálne množstvá východiskového materiálu. Vek skúmaných pozostatkov mŕtvych tiel organizmov sa

pohybuje v pomerne širokom časovom rozpätí – od niekoľkých rokov, cez desiatky tisíc rokov až po státisíce, výnimočne až milióny rokov. Úspešnosť analýzy spravidla klesá úmerne veku vzoriek, absolútny vek fosílií však nie je jediným limitujúcim faktorom. Veľký význam zohráva i zloženie, vlhkosť a teplota prostredia, v ktorom sa materiál uchoval. Je známe, že priebeh PCR reakcie môže inhibovať celý rad látok (napr. hém, cytochrómy a iné porfyríny, fenolické látky, polysacharidy) a rozkladom tiel organizmov, resp. podmienkami ich uloženia, či už priamo v zemi alebo napr. zabalzamovaním pozostatkov, sa paleta inhibítorov ešte rozširuje (napr. o humínové kyseliny, ktoré sa nachádzajú vo všetkých typoch pôd; asfalt, ktorý sa používal pri mumifikácii v starom Egypte). Na strane druhej, iné látky (napr. albumín hovädzieho séra) blokujú činnosť inhibítorov PCR reakcie. Preto neprekvapuje, že oblasť výskumu starodávnej DNA nielen využíva najnovšie molekulárno-biologické metódy, ale zároveň aj prispieva k ich ďalšiemu rozpracovávaniu, prednostne najmä k zvyšovaniu účinnosti techniky PCR.

Úspešnosť PCR analýzy starodávnej DNA závisí aj od počtu kópií príslušných génov. V jadre lokalizovaná genetická informácia je spravidla prítomná len v malom počte kópií (dve pri diploidných organizmoch). Na strane druhej genetická informácia sa v mitochondriách a v plastidoch nachádza vo veľkom počte kópií (niekoľko sto až tisíc). Z tohto dôvodu pravdepodobnosť jej rekonštrukcie je oveľa vyššia. Štúdium mitochondriových génov/genómov z mŕtvych tiel organizmov predstavuje dosiaľ azda najrozšírejší typ analýz na poli starodávnej DNA.

## Molekulárna paleontológia

Existuje viacero príkladov dokumentujúcich skutočnosť, že počet zmien (substitúcií aminokyselín) v bielkovine závisí len od času, a nie od evolučných foriem, ktorými daný gén do súčasnosti prešiel. Ak je vzdialenosť dvoch druhov organizmov od evolučného uzla približne rovnaká, potom počty substitúcií aminokyselín sú v podstate totožné, bez ohľadu na to, či jeden z organizmov predstavuje dlhodobu morfológicky nezmenenú, tzv. živú skamenelinu (napr. lalokoplutvú rybu – latimériu), resp., že vo vývojovej línii vedúcej k druhému organizmu dochádzalo k mnohorakým zmenám za vzniku nových biologických foriem. Molekulárna evolúcia „živých fosílií“ poskytuje teda pozoruhodný dokladový materiál nielen o konštantnej rýchlosti molekulárnej evolúcie, ale aj o vzájomnej nezávislosti medzi molekulárnou a morfológickou evolúciou. Za jednu zo živých fosílií sa považuje aj žralok *Heterodontus portus-jacksoni*, druh, ktorý veľmi pripomína svojich fosilizovaných predkov starých 300 miliónov rokov. Jeho molekuly sa vyvíjali veľmi odlišne od morfológie jeho tela. Predpokladá sa, že k zdvojeniu génov pre hemoglobín a od tohto momentu relatívne nezávislému formovaniu sa neidentických  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov, došlo ešte na stupni spoločného predka cicavcov a žralokov, na začiatku radiácie chordátov. Mapovanie

rozdielov v aminokyselinovom zložení  $\alpha$ - a  $\beta$ -globínových reťazcov môže slúžiť ako miera molekulárnej evolúcie vo vývojových líniách vedúcich k moderným druhom živočíchov (12). Čísla ukazujú, že rozdiely, ktoré sa počas evolúcie naakumulovali v aminokyselinovom zložení  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov hemoglobínu vo vývojovej línii vedúcej k človeku a tej, ktorá je reprezentovaná spomínaným archaickým žralokom, sú takmer identické, t. j. 147, resp. 150 nesynonymných substitúcií. To signalizuje, že rýchlosť molekulárnej evolúcie v oboch odlišných vývojových líniách je približne rovnaká, čo výrazne kontrastuje s rýchlosťou evolúcie tvaru v oboch líniách, počas ktorej sa žralok takmer vôbec nezmenil, kým človek sa od svojich ryby pripomínajúcich predchodcov značne vzdialil. Z príkladu vidno, že zatiaľ čo rýchlosti morfológických zmien sú medzi rôznymi evolučnými líniami stavovcov veľmi odlišné, rýchlosti evolúcie informačných makromolekúl sú pozoruhodne podobné.

### Rýchlosť molekulárnej evolúcie *versus* funkčnosť

Je však zrejmé, že celý rad mutácií na molekulovej úrovni nie je selekčne neutrálnych. Nielen medzi jednotlivými génmi, ale i medzi rôznymi štruktúrnymi a funkčnými časťami ich produktov, existujú rozdiely v miere, v akej sú schopné tolerovať substitúcie nukleotidov. Rýchlosť synonymných substitúcií je vyššia ako nesynonymných, t. j. takých, pri ktorých mutácia vedie k substitúcii príslušnej aminokyseliny. Vysvetľuje sa to tým, že synonymné zmeny majú vyššiu pravdepodobnosť, že budú selekčne neutrálne, a preto sa ich viac v populácii zafixuje. Pri nesynonymných substitúciách je pravdepodobnosť škodlivého účinku na funkciu proteínu vyššia, preto ich veľká časť býva z populácie eliminovaná negatívnou selekciou, čoho dôsledkom je znížená rýchlosť nesynonymných substitúcií. Rozdiel v rýchlosti medzi synonymnými a nesynonymnými substitúciami v príslušnom géne ukazuje, že čím silnejšia je v danej časti informačnej makromolekuly potreba zachovania jej funkcie, tým pomalšia je rýchlosť jej evolúcie. Ilustrovať to možno takmer klasicky na proinzulíne, ktorý sa skladá z troch segmentov A, B a C (12). V rámci posttranslačných úprav sa segment C vyštiepuje z daného peptidu a neparticipuje na hormonálnej aktivite inzulínu. Premieta sa to do rýchlosti nesynonymných substitúcií v oblasti kódujúcej segment C, ktorá je sedemkrát vyššia ako pri úsekoch DNA kódujúcich segmenty A a B. Obdobné odlišnosti možno pozorovať aj v rozdieloch evolučných rýchlostí medzi tzv. aktívnymi miestami bielkovín, ktoré zodpovedajú za ich funkciu a ostatnými oblasťami týchto molekúl. Príkladom môžu byť opäť oba reťazce hemoglobínu. Tie časti molekuly, ktoré viažu hém, predstavujú jej aktívne centrum. Rýchlosť aminokyselinových substitúcií je v nich desaťnásobne nižšia ako v povrchových častiach, ktoré sú pravdepodobne funkčne menej významné.

Rýchlosť nesynonymných substitúcií však značne varíruje i medzi rôznymi typmi génov, a to opäť v závislosti od ich funkcie. Vo vše-

obecnosti možno povedať, že gény, ktorých produkty sa zúčastňujú na základných metabolických procesoch bunky (tzv. prevádzkové, resp. konštitutívne gény) sa vyvíjajú pomalšie ako gény, ktoré majú viac špecializované funkcie a uplatňujú sa iba v niektorých špecializovaných bunkách, prípadne len v určitých vývinových fázach. V extrémnych polohách možno hovoriť o tzv. konzervatívnych alebo naopak variabilných génoch, resp. ich produktoch (Tab. 1). Príkladom jedného z najkonzervatívnejších bielkovín môže byť histón 3, ktorého väčšina aminokyselín interaguje pri tvorbe nukleozómu buď s DNA alebo s inými histónmi. To si vyžaduje zachovanie nielen príslušnej konformácie molekuly, ale aj jej vysokej bázičnosti (zásaditosti), a tak tolerovaný je len veľmi malý počet substitúcií, ktoré nerušia funkčnosť tohto proteínu. Rýchlosť nesynonymných substitúcií v géne pre histón 3 je až tisíckrát pomalšia ako v génoch pre apolipoproteíny, ktorých produkty sú hlavnými nosičmi rôznych lipidov v krvi stavovcov. Vysoká rýchlosť evolúcie génov pre apolipoproteíny zrejme súvisí so skutočnosťou, že väzobné domény pre lipidy sú zložené z hydrofóbných zbytkov aminokyselín (valín, leucín), ktorých substitúcia za inú hydrofóbnu aminokyselinu je pomerne voľná, t. j. len minimálne je obmedzovaná negatívnou selekciou.

**Tabuľka 1**

**Rýchlosť evolúcie niektorých proteínov cicavcov.** Rýchlosť je vyjadrená ako priemerný počet substitúcií aminokyselín na jednej pozícii za  $10^9$  rokov (12).

proteín	rýchlosť
fibrinopeptidy	8,3
ribonukleáza	2,1
lyzozým	2,0
$\alpha$ -globín	1,2
myoglobín	0,89
inzulín	0,44
cytochróm c	0,3
histón H4	0,01

### **Paleontologické kalibrovanie molekulárnych hodín**

Predstava molekulárnych hodín je významným prínosom pre evolučnú teóriu, a to napriek tomu, že má svoje úskalia, obmedzenia a niektoré otázky zostávajú stále nezodpovedané. Minimalizovať ich vplyv znamená dôsledne sa pridržovať istých zásad. Veľmi dôležité je napr. porovnávať funkčne ekvivalentné gény. Tieto sú vystavené počas evolúcie rovnakým selekčným tlakom. Pomocou fyzikálneho datovania vzniku hornín (východisko – premenlivý obsah izotopov niektorých prvkov) možno metódu fylogenetických hodín kalibrovať a získať tak údaje v obvyklej časovej škále. Výsledky prvých, pomerne komplexných porovnávacích štúdií signalizovali, že hodiny paleontológov a molekulárnych biológov netikajú rovnakou rýchlosťou. Najvýznamnejší rozdiel spočíval v datovaní počiatkov života na Zemi. Kým podľa všeobecne akceptovaných

názorov paleontológov sa život na Zemi objavil pred takmer štyrmi miliardami rokov, molekulárne hodiny ukazovali len polovičný čas, t. j. 2 miliardy rokov (4). Novšie, ešte rozsiahlejšie a metodicky korigované porovnávacie analýzy génov pre bielkoviny u vybraných zástupcov všetkých troch základných vývojových línií organizmov (Archaea, Bacteria, Eukarya) však poskytujú iný obraz. Rozdiely v sekvenciách aminokyselín (odvođených z poradia príslušných tripletov nukleotidov) v homologických génoch študovaných zástupcov archeónov (Archaea) a baktérií (Bacteria) naznačujú, že tieto dve vývojové línie sa mohli od seba oddeliť už veľmi dávno, v časovom intervale pred tromi až štyrmi miliardami rokov (5). Treba azda dodať, že k takejto zásadnej zmene v interpretácii molekulárnych údajov prispelo aj spoznanie úplných sekvencií nukleotidov z viacerých organizmov, ktoré sa medzičasom podarilo stanoviť a analyzovať (pozri 7). Akýsi ideál predstavuje rekonštruovanie jedného stromu života, a to takého, ktorý by bol prijateľný pre paleontológov, klasických (morfologických), ako aj molekulárnych systematikov a evolucionistov. Cesta k nemu vedie len cez starostlivé a vzájomne sa dopĺňajúce analýzy fosílií, morfologických kladogramov a molekulárnych fylogramov (1).

### Záverečné zhrnutie

Poznatky molekulárnej biológie svedčia v prospech Darwinovej predstavy, že všetky formy života sú navzájom viac či menej príbuzné a stupeň tejto príbuznosti možno znázorniť prostredníctvom vetviaceho sa stromu života, ktorého koreň siaha až k najstarším organizmom. Aj taxonomicky veľmi vzdialené druhy organizmov, napr. človek a baktéria *Escherichia coli*, majú veľa spoločných bielkovín (a génov). Množstvo rozdielov v sekvencii týchto molekúl je nepriamo úmerné stupňu príbuznosti. Ďalším zo série molekulárno-biologických dokladov evolúcie je existencia spoločného genetického kódu. Jeho univerzálnosť potvrdzuje, že všetky organizmy sú navzájom príbuzné, a to od najstarších foriem života. Úspešné prenášanie určitých úsekov genetickej informácie z jedného organizmu do druhého a jej realizácia v novom genetickom kontexte (genetické inžinierstvo a jeho praktický výstup - moderné, tzv. molekulárne biotechnológie), je možné len vďaka existencii spoločných základných životných princípov platných pre všetky organizmy. Popri poznatkoch iných biologických disciplín, teória i prax molekulárnej biológie zreteľne dokumentujú, že evolúcia je základom jednoty a diverzity života.

Biológovia si veľmi dobre uvedomujú, že evolúciu organizmov nemožno stotožňovať s vývojom sekvencií stavebných prvkov v informačných makromolekulách. Hoci vývoj sekvencií je len jedným z aspektov evolúcie života na Zemi, ich spoznávanie a porovnávanie sa všeobecne považuje za mimoriadne dôležité a veľmi inšpiratívne. Na strane druhej, spätne, evolučná biológia môže zohrávať veľmi významnú úlohu pri

interpretácii molekulárnych údajov, ktorých priam celá záplava je na obzore. Aby sekvenovanie génov a celých genómov nepredstavovalo len akúsi výrobu nových, nekonečných telefónnych zoznamov, práve evolučné analýzy a z nich vyplývajúce usmernenia by mohli pomáhať vytyčovať smer ďalšieho napredovania zberu molekulárnych údajov.

Molekulárna biológia prestupuje všetkými oblasťami biológie. Podstatným spôsobom tým ovplyvňuje nielen skúmanie života v jeho najrozmanitejších existujúcich (či vyhynutých) podobách, ale i život sám, vrátane jeho pretvárania.

## Literatúra

1. BENTON, M. J. - AYALA, F. J. Dating the tree of life. in *Science*. 2003. vol. 300, s. 1698 - 1700.
2. CARROLL, S. B. *The Making of the Fittest. DNA and the ultimate forensic record of evolution*, London, Qercus. 2006.
3. DAUBIN, V. - MORAN, N. A. - OCHMAN, H. Phylogenetics and the cohesion of bacterial genomes. in *Science*. 2003. vol. 301, s. 829 - 832.
4. DOOLITTLE, R. F. - FENG, D. F. - TSANG, S. - CHO, G. - LITTLE, E. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. in *Science*. 1996. vol. 271, s. 470 - 477.
5. DOOLITTLE, W. F. Fun with genealogy. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. vol 94, s. 12751 - 12753.
6. EBRINGER, L. - KRAJČOVIČ, J. *Cell Origin and Evolution*. Bratislava, VEDA. 1994.
7. EISEN, J. A. - FRASER, C. M. Phylogenomics: Intersection of evolution and genomics. in *Science*. 2003. vol. 300, s. 1706 - 1707.
8. FELSENSTEIN, J. *Inferring Phylogenies*. Sunderland, Sinauer Ass. Inc. Publishers. 2003.
9. GRAUR, D. - LI, W.-H. *Fundamentals of Molecular Evolution* Sunderland, Sinauer Ass. Inc. Publishers. 2000.
10. HILLIS, D.M. - MORITZ, C. - MABLE, B.K. *Molecular Systematics*. Sunderland, Sinauer Ass. Inc. Publishers. 1996.
11. HORIKOSHI, K. - GRANT, W. D. (Eds.) *Extremophiles - Microbial Life in Extreme Environments*. New York, Wiley-Liss. 1998.
12. KIMURA, M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge UK, Cambridge University Press, 1983.
13. KRAJČOVIČ, J. - VESTEG M. Bunka základ života - kde sa vzala? in: D. MAGDOLEN et al. *Hmota Život Inteligencia - Vznik*. Bratislava, Veda, 2008, s. 85 - 120.
14. LEWIN, R. *Patterns in Evolution. The New Molecular View*. New York, W. H. Freeman and Co. 1997.
15. LI, W.-H. *Molecular Evolution*. Sunderland, Sinauer Ass. Inc. Publishers. 1997.
16. MARTIN, W., MÜLLER, M. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. in *Nature*. 1998. vol. 392, s. 37 - 41.
17. MOREIRA, D., LÓPEZ-GARCIA, P. Symbiosis between methanogenic archaea and  $\delta$ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. in *J. Mol. Evol.* 1998. vol. 47, s. 517 - 530.

18. NEI, M., KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford, New York, Oxford University Press. 2000.
19. OU, C.-Y. – CIESIELSKI, C. A. – MYERS, G. – BANDEA, C. I. – LUO, C.-C. – KORBBER, B. T. M. – MULLINS, J. I. – SCHOCHETMAN, G. – BERKELMAN, R. I. – ECONOMOU, A. N. – WHITE, J. J. – FURMAN, L. J. – SATTEN, G. A. – MACINNERS, K. A. – CURRAN, J. W. – JAFFE, H. W. *Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice*. in *Science*. 1992. vol. 256, s. 1165 – 1171.
20. PAGE, R. D. M. – HOLMES, E. C. *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach*, Oxford, Blackwell Science. 1998.
21. PATTERSON, C. (Ed.) *Molecules and Morphology in Evolution*. Cambridge, Cambridge University Press. 1987.
22. PÄÄBO, S. – POINAR, H. – SERRE, D. – JEANICKE-DESPRES, V. – HEBLER, J. – ROHLAND, N. – KUCH, M. – KRAUSE, J. – VIGILANT, L. – HOFREITER, M. *Genetic analyses from ancient DNA*. in *Annu. Rev. Genetics*. 2004. vol. 38, s. 645 – 679.
23. RAPPE, M. S., GIOVANNONI, S. J. *The uncultured microbial majority*. in *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. vol. 57, s. 369 – 394.
24. SARICH, V. M. – WILSON, A. C. *Immunological time scale for hominoid evolution*. in *Science*. 1967. vol. 158, s. 1200 – 1203.
25. SECKBACH, J. (Ed.) *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. Dordrecht, Kluwer Acad. Publ. 1999.
26. VACULA, R. – KRAJČOVIČ, J. *Interakcia jadro – chloroplast: signalizácia a import*. in *Biologické listy*. 2001. vol. 66, s. 81 – 111.
27. WOESE, C. R., FOX, G. E. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. vol. 74, s. 5088 – 5090.
28. WOESE, C. R. – KANDLER, O. – WHEELIS, M. L. *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. vol. 87, s. 4576 – 4579.
29. ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. *Molecules as documents of evolutionary history*. in *J. Theor. Biol.* 1965. vol. 8, s. 357 – 366.

*Prof. RNDr. Juraj Krajčovič, CSc. je biológom, absolventom PriF UK v Bratislave, od roku 1998 riaditeľom Ústavu bunkovej biológie PriF UK. Experimentálne i teoreticky sa zaoberá rôznymi aspektmi biológie buniek, vrátane otázok ich pôvodu. Prednáša evolučnú biológiu (spolu s V. Ferákom), molekulárnu evolúciu a vybrané kapitoly z mikrobiológie. Hlavné oblasti vedeckého záujmu: bunková, molekulárna a evolučná biológia, mikrobiológia a genetika, najmä otázky pôvodu a evolúcie buniek, plastidy ako chemoterapeutické ciele, regulácia expzie génov, extrémofilné mikroorganizmy, DNA diagnostika organizmov a analýza fylogeny.*