Rana evolucija Metazoa

Radečić, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:898622

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Rana evolucija Metazoa

The early evolution of Metazoa

ZAVRŠNI RAD

Karlo Radečić
Preddiplomski studij biologije
Mentor: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević
Zagreb, 2016.

OKVIR: Rječnik. Pojmovi dani u ovom rječniku u tekstu rada pri prvom su spomenu označeni plavo.	
Kladistička terminologija (prema HÖRANDL & STUESSY, 2010)	
monofiletska skupina	skupina koja potječe od zajedničkog pretka; monofiletske skupine uključuju holofiletske i parafiletske skupine (monofiletska skupina često se koristi kao sinonim za holofiletsku skupinu)
holofiletska skupina	skupina koja potječe od zajedničkog pretka i uključuje sve potomke tog zajedničkog pretka; holofiletska skupina isključuje osnovnu (*stem*) liniju od koje je potekao njezin zajednički predak
parafiletska skupina	skupina koja potječe od zajedničkog pretka, ali ne uključuje sve potomke tog zajedničkog pretka; prije nastanka mlađih članova parafiletske skupine, ona je bila holofiletska (npr. prije nastanka tetrapodnih kralježnjaka, parafiletske *ribe* bile su holofiletska skupina)
polifiletska skupina	skupina koja potječe od tri ili više, a ne jednog zajedničkog pretka; za skupine koje potječu od dva pretka prikladan je termin difiletska skupina
Strukturna i funkcionalna obilježja	
Tjelesne šupljine	
celom	šupljina omeđena epitelom mezodermalnog podrijetla
acelomati	životinje koje nemaju primarnu ili sekundarnu tjelesnu šupljinu (celom), tj. u kojih su sve mezodermalne stanice međusobno sa svih strana u kontaktu s drugim stanicama; strukturom (ne evolucijom) definirana, polifiletska skupina
pseudocel	primarna tjelesna šupljina; tjelesne šupljine omeđene ECM-om, a ne epitelom; pseudocelomati: strukturom (ne evolucijom) definirana, polifiletska skupina
Ostala obilježja	
apikalni organ	1. u Ctenophora, „apikalni“ organ statocist je na aboralnoj strani tijela koji upravlja osam traka s ktenama koje pokreć u tijelo rebraša; u epitelu ispod njega nalazi se bogata živčana mreža; MOROZ *et al.* (2014) nazivaju „apikalni“ organ „elementarnim mozgom“, ali nema naznaka da integrira informacije iz drugih živčanih mreža (DUNN *et al.*, 2015) 2. cilijatni, vjerojatno osjetni organ mnogih cilijatnih ličinki u Cnidaria i Bilateria (NIELSEN, 2015a); nije homologan s „apikalnim“ organom rebraša
lecitotrofne ličinke	ličinke koje se ne hrane aktivno, već se prehranjuju žumanjkom
planktotrofne ličinke	ličinke koje se hrane aktivno
palintomija	palintomska faza u ontogenezi; zigota se prestaje hraniti i prolazi seriju sukcesivnih dioba koristeći resurse nakupljene tijekom hipertrofnog rasta (MIKHAILOV *et al.*, 2009)

POPIS KRATICA

ECM	ekstracelularni matriks
EvoDevo	evolucijska razvojna biologija (*evolutionary developmental biology*)
Signalni putovi:	
Hh	Hedgehog
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (Janus kinaza/pretvornik signala i aktivator transkripcije)
Wnt	wingless-related
TGF-β	transforming growth factor β (transformirajući faktor rasta β)

SADRŽAJ

1. U potrazi za modernom definicijom životinja i pitanja koja ta potraga otvara 5

2. Rana evolucija Metazoa: vremenski kontekst i kambrijska „eksplozija“ 10

2.1. Kambrijska eksplozija *sensu stricto* 10

2.2. Metazoa u prekambriju 13

2.3. *Rana* evolucija Metazoa: koliko rana? 14

3. Izazovi u filogeniji Metazoa 15

3.1. Galerija Ctenophora, Porifera, Placozoa i Cnidaria 15

3.2. Filogenetski odnosi između četiri nebilaterijska koljena i Bilateria: Ctenophora i Porifera glavni su kandidati za mjesto najbazalnijeg koljena ... 25

3.3. Filogenija Bilateria: stabilnost osnovnih odnosa 27

4. Evolucija prema mnogostaničnosti 32

4.1. Choanoflagellata su sestrinska skupina Metazoa 32

4.2. Filasterea i Ichthyosporea srodnici su Metazoa 35

4.3. Kako nam jednostanični srodnici Metazoa pomažu u rasvjetljavanju podrijetla njihove mnogostaničnosti? 35

4.4. Epitel – evolucijska inovacija Metazoa 37

4.5. Stanično signaliziranje u Metazoa 38

5. Ideje o nastanku Metazoa 41

5.1. Kolonijalne teorije: gastreja teorija i njezine adaptacije 41

5.1.1. *Hoanoblasteja teorija* 41

5.1.2. *Od hoanoflagelatnog protista do Metazoa prema Adamskoj* 42

5.1.3. *„Nova plakula teorija“* 43

5.1.4. *Sinzoosporna teorija* 43

5.2. Sincicijalna (celularizacijska) teorija 44

5.3. Odnos ontogenije i filogenije i filotipski stadij 46

6. Sudbina blastopora i podrijetno usnog i analnog otvora u Eubilateria te podrijetlo zametnih listića i gastrulacije 47

6.1.Sudbina blastopora i podrijetlo usnog i analnog otvora u Eubilateria 47

6.2. Podrijetlo zametnih listića i gastrulacije 50

7. Evolucija živčanog sustava 55

8. Iz genskog repertoara rane evolucije Metazoa: evolucija ANTP gena **57**
8.1. Filogenetski *potpis* Hox gena 60
9. Zaključak **62**
10. Zahvale **64**
11. Literatura **65**
12. Sažetak **73**
13. Summary **74**

1. U potrazi za modernom definicijom životinja i pitanja koja ta potraga otvara

Skup organizama koje zoolozi nazivaju *životinjama* i konceptualna podloga odgovorna za njegovo ustanovljivanje nisu uvijek bili jednaki današnjima. Kad je LINNAEUS (1735) u prvom izdanju svog utjecajnog djela *Systema Naturae* podijelio bića u prirodi u tri carstva (kraljevstva), kamenje/minerale (Regnum Lapideum) koji *rastu*, biljke (Regnum Vegetabile) koje *rastu i žive* te životinje (Regnum Animale) (Tablica 1.) koje *rastu, žive i osjećaju*, samo je formalizirao ono što je u svijesti obrazovana čovjeka bilo još od antičkih vremena. Do posljednjeg izdanja toga djela što ga je uredio za života (VON LINNÉ, 1766) zadržao je izvorni koncept, dodavši kao odliku životinjskoga carstva i *pokretljivost*. Ipak, polovicom 19. stoljeća, u svjetlu Darwinovih ideja o evoluciji, prirodoslovci počinju uviđati nedostatnost stoljetne dihotomije *biljke – životinje* (SCAMARDELLA, 1999). Jedan od njih bio je i Britanac John Hogg koji je, svjestan kako se prirodoslovci ne mogu usuglasiti oko definiranja granica između ovih dvaju carstava, formalno utemeljio četvrto carstvo koje je nazvao Regnum Primigenum ili Protoctista (prema grč.; „prva živa bića“) (HOGG, 1860) s kojima je obuhvatio „i Protophyta i Protozoa“. Ono što je upečatljivo u njegovoj publikaciji objavljenoj godinu dana poslije prvog izdanja Darwinova *Podrijetla vrsta* jest dijagram u boji (Sl. 1A) na kojem su carstva životinja i biljaka prikazana kao dvije piramide koje imaju zajedničku bazu (Protoctista) što ukazuje kako je Hogg smatrao da životinje i biljke imaju zajedničko podrijetlo od Protoctista koji su organizmi koji su se prvi pojavili u evolucijskom vremenu (SCAMARDELLA, 1999). Haeckel, „najenergičniji njemački apostol Darwina“ (MINELLI, 2009, str. 110.), objavio je prvo filogenetsko stablo životinjskog carstva (NIELSEN, 2012a) u sastavu filogenetskog stabla živih bića („Monophyletischer Stammbaum der Organismen“) (HAECKEL, 1866) (Sl. 1B) kojim je za 19 skupina (*phyla*, koljena) živih bića koja prepoznaje dao tri mogućnosti: da su neovisnog podrijetla, da potječu od tri neovisne arheskupine (Plantae, Protista, Animalia) ili da, pak, sva živa bića potječu od jedinstvenog zajedničkog pretka. Haeckel je u svojim publikacijama osmislio cijeli niz neologizama izvedenih iz grčkih korijena od kojih su neki, kao što su *phylum*, *phylogenie*, *phylogenesis*, *ontogenie*, *monophyletischer* i *polyphyletischer*, i danas neizostavni dio biološkog vokabulara (DAYRAT, 2003). Premda je isprva (HAECKEL, 1866) spužve svrstao u Protista (Spongiae na Sl. 1B), upravo je Haeckel taj koji je u kontekstu svoje gastreja teorije (vidi 5. poglavlje) prvi izrekao modernu definiciju životinja (HAECKEL, 1872, 1874).

HAECKEL (1874) se oštro protivio teoriji tipova koju su utemeljili neovisno G. Cuvier i C. E. Baer, a prema kojoj su životinjsko carstvo podijelili u četiri u svakom smislu neovisne skupine (Vertebrata, Mollusca, Articulata, Radiata), definirane jedinstvenim „planom građe“ (Tablica 1.); što je bilo nespojivo s njegovim filogenetskim razmišljanjem. Nasuprot tomu, HAECKEL (1874) je životinjsko carstvo (Animalia) podijelio u dvije skupine, Protozoa i Metazoa (= Blastozoa = Gatrozoa) jasno definirajući Metazoa („od spužvi do čovjeka“) kao monofiletsku skupinu (holofiletsku *sensu* → Okvir: Rječnik), s primarnim zametnim listićima, endodermom i ektodermom i pravim probavilom endodermalnog podrijetla, koja potječe od zajedničkog pretka, gastreje (Gastraea), koja je evolucijska poveznica između polifiletskih Protozoa i holofiletskih Metazoa. Iako formulacije poput „od spužvi do čovjeka“ ukazuju na neki oblik linearnog razmišljanja, HAECKEL (1874) se jasno usprotivljuje „pogrešnom mišljenju kako cijelo životinjsko carstvo predstavlja jednu neprekinutu *scalu naturae*“. Upravo suprotno, on izrijekom predlaže da su se od zajedničkog pretka Metazoa, gastreje, odvojile dvije grane, Protascus i Pothelmis, što je izniman rani primjer dihotomskog filogenetskog razmišljanja. Prva je grana, prema Haeckelu, napustila karakter plivajuće gastreje te se aboralnim polom pričvrstila za dno, što je mehanički razlog radijalnom tipu građe potomaka te grane (Zoophyta = Coelenterata), dok je druga grana zadržala pokretljivost zamijenivši plivanje puzanjem morskim dnom, što je mehanički razlog bilateralnom tipu građe potomaka te grane (koje Haeckel u izvornom njemačkom tekstu objedinjuje nekoliko puta pod nazivom Bilaterien, a jednom i formalno imenuje skupinu – Bilateria) (Sl. 1C, D; Tablica 1.). Haeckel je svoj koncept životinja kao holofiletske skupine koju formalno definira kao Metazoa (HAECKEL, 1874) adaptirao iz ranije publikacije (HAECKEL, 1872) u kojoj prvi put iznosi gastreja teoriju i daje filogenetsko stablo životinja (str. 465.) divergencijske (i dihotomske) naravi na kojem iz gastreje izvodi dvije spomenute evolucijske grane, Protascus i Prothelmis.

I dok su i Linné, i Cuvier i Haeckel više-manje isti skup organizama smatrali *životinjama* (Haeckelove Metazoa, što su i životinje kako ih i danas shvaćamo), konceptualna podloga na kojoj počiva obuhvaćanje ovih organizama u jednu skupinu te njihova daljnja dioba potpuno je različita. Linné je bio prirodoslovac predevolucijskog vremena koji u prvom izdanju *Systema Naturae* (LINNAEUS, 1735) izrijekom izvodi argument kako nove vrste ne nastaju, dok je Cuvier svoje četiri skupine životinja smatrao izoliranim *tipovima građe*. Haeckel, pak, definira Metazoa u kontekstu evolucijskog i filogenetskog promišljanja ustanovljujući kako se radi o holofiletskoj skupini organizama.

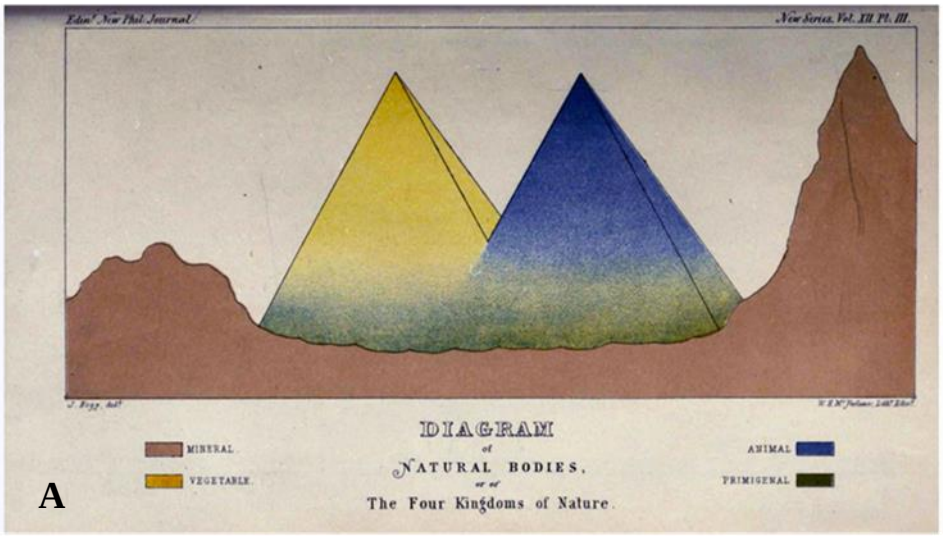
Gotovo stoljeće i pol nakon, zoolozi su uvjereni kako su Metazoa holofiletska skupina (npr. SCHMIDT-RHAESA, 2007; MINELLI, 2009; NIELSEN, 2012a). Ono oko čega su njihova mišljenja i

danas suprostavljena jest narav njihove evolucije (NIELSEN, 2008; 2012a), unatoč razvoju molekularne biologije. Usprkos stajalištima nekih molekularnih biologa kako morfološki podaci nisu primjenjivi u izvođenju filogenetskih analiza, najbolji mogući način kombinacija je molekularnih i morfoloških podataka (SCHMIDT-RHAESA, 2007; NIELSEN, 2012a).

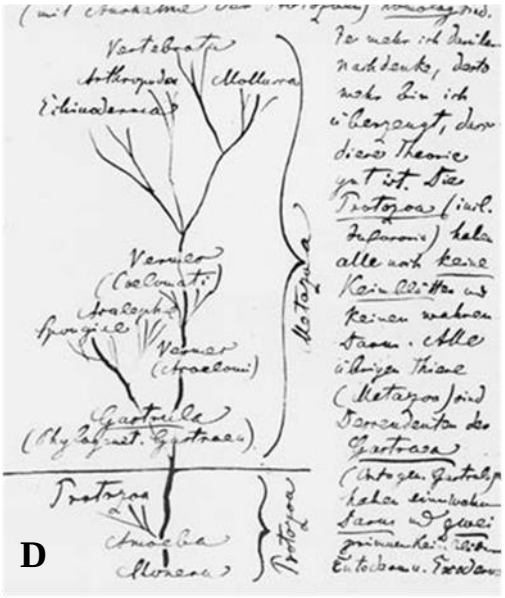
Tablica 1. Koncept životinjskog carstva različitih autora od 18. do 21. stoljeća.

Linné razlikuje šest skupina od kojih su četiri kralježnjaci; Cuvier razlikuje četiri skupine koje predstavljaju neovisne *tipove građe*; Haeckel od zajedničkog pretka Metazoa, gastreje, izvodi dvije evolucijske grane (Zoophyta i Bilateria), a među Bilateria razlikuje životinje bez celoma i s celomom; Hatschek preuzima Coelenterata i Bilateria te potonje dalje dijeli na način koji se održao i u filogeniji 21. stoljeća; Grobben Zygoneura naziva Protostomia i uvodi takson Deuterostomia; današnje stabilno poimanje Bilateria (preciznije, Eubilateria) na primjeru Nielsena i Dunna *et al.*; svjetlije osjenčeno: filogenetska taksonomija Bilateria; tamnije osjenčeno: filogenetska taksonomija Bilateria kao misinterpretacija Hymanove. Poslije Hatscheka, u tablici su tretirani samo Bilateria. Polja iste topografije, a različitih imena u svijetlo osjenčenom području označavaju iste evolucijske skupine (to se ne odnosi na Haeckelove acelomate i celomate). Valja imati na umu kako i Haeckel i današnja biologija prepoznaju Bilateria kao holofiletsku skupinu koja uključuje iste organizme, kao i to da je Haeckel, na osnovi filogenetskog razmatranja, radijalno simetrične bodljikaše uvrstio u Bilateria (a ne Zoophyta), dok ih je Cuvier, na temelju „tipa građe“, u neevolucijskom sustavu, uvrstio u Radiata. Preuzeto od autora kako je navedeno u vrhu tablice, s napomenama: tipovi građe Cuviera preuzeti posredno iz: HATSCHEK (1888); Haeckelovo poimanje Metazoa = Zoophyta + Bilateria prilagođeno prema značenju njegova rada (HAECKEL, 1874); Grobbenovo poimanje Bilateria = Protostomia + Deuterostomia te filogenija Bilateria kao misinterpretacija Hymanove preuzeti posredno iz: NIELSEN (2010).

<table>
<tr><th>LINNAEUS (1735)</th><th>CUVIER (1812)</th><th colspan="2">HAECKEL (1874)</th><th colspan="2">HATSCHEK (1888)</th><th>GRO-BBEN (1908)</th><th colspan="2">NIELSEN (2012a); DUNN et al. (2014)</th><th>misint. nakon HYMAN (1940)</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Quadrupedia (sisavci)
Aves (ptice)
Amphibia (vodozemci i gmazovi)
Pisces (ribe)
Insecta (člankonošci)
Vermes (ostali beskralježnjaci)</td><td rowspan="2">Vertebrata (kralježnjaci)
Mollusca (mekušci i drugi beskralje-žnjaci)
Articulata (kolutićavci i člankonošci)
Radiata (bodljikaši, rebraši, žarnjaci, spužve, neki protozoa)</td><td colspan="2">Zoophyta = Coelenterata
Spongiae (spužve)
Acalephae (žarnjaci, rebraši)</td><td colspan="2">Protaxonia = Coelenterata
Sponginaria
Cnidaria (žarnjaci)
Ctenophora (rebraši)</td><td colspan="4">/</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Bilateria</td><td>Acoelo-mi
Plathel-minthes (plošnjaci)</td><td rowspan="2">Heteraxonia = Bilateria</td><td>Zygoneura</td><td>Protostomia</td><td>Protostomia</td><td>Spiralia (Lopho-trochozoa)
Ecdyso-zoa</td><td rowspan="2">Acoelo-mata
↓
Pseudo-coelo-mata
↓
Eucoe-lomata</td></tr>
<tr><td>Coelo-mati
svi ostali Bilate-ria</td><td>Ambu-lacra-lia
Chordonii</td><td>Deuterostomia</td><td>Deuterostomia</td><td>Ambu-lacraria
Chordata</td></tr>
</table>

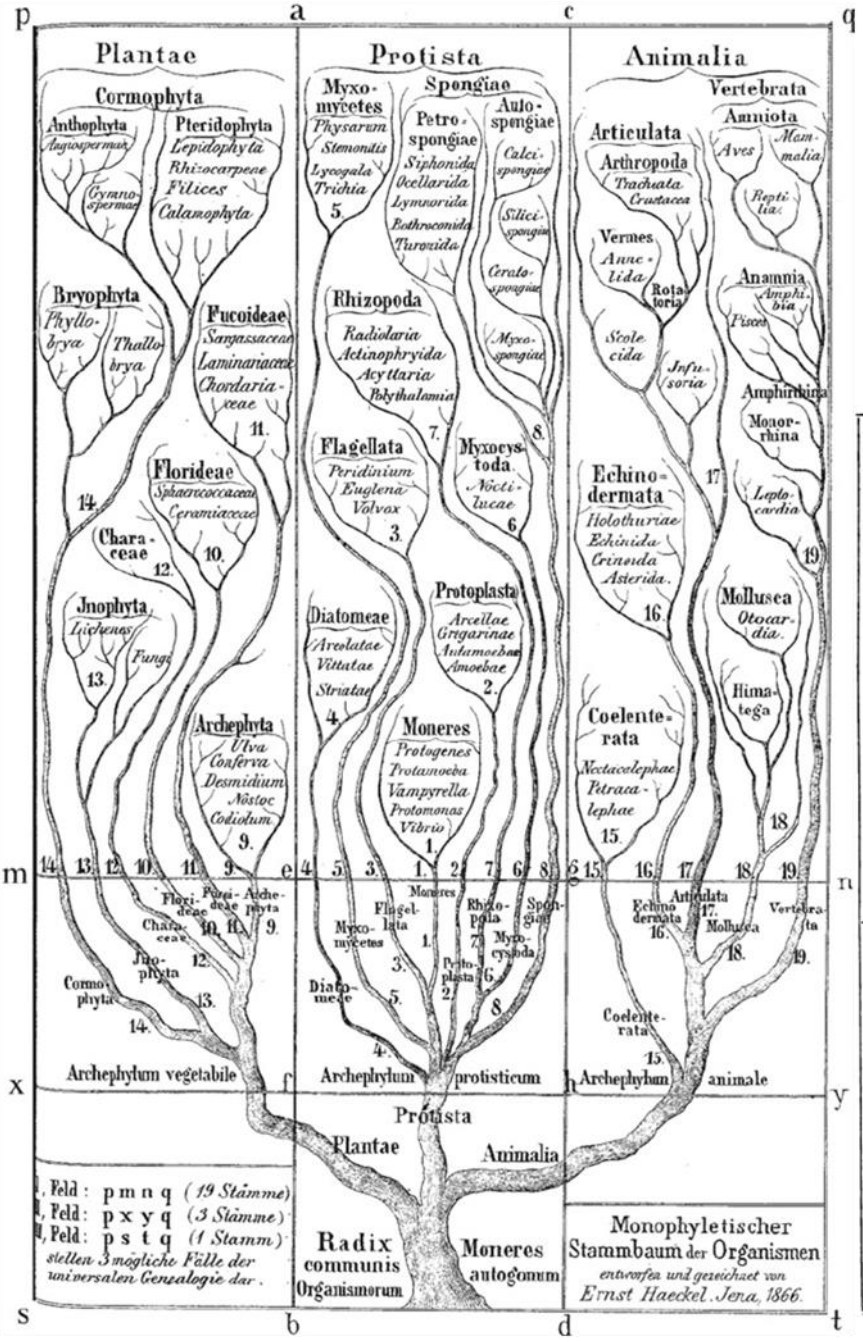

Edin. New Phil. Journal.
New Series. Vol. XII. Pl. III.
DIAGRAM
of
NATURAL BODIES,
or of
The Four Kingdoms of Nature.
MINERAL.
VEGETABLE.
ANIMAL.
PRIMIGENAL.

A

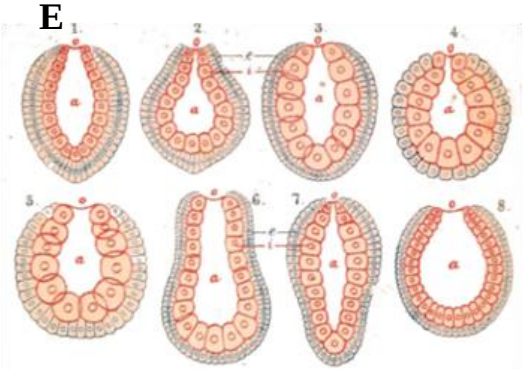

Vertebrata
Arthropoda
Mollusca
Echinodermata
Vermes
(Coelomati)
Spongiae
Vermes
(Acoelomi)
Gastraea
(Phylogast. Gastraea)
Protozoa
Amoeba
Protozoa

D

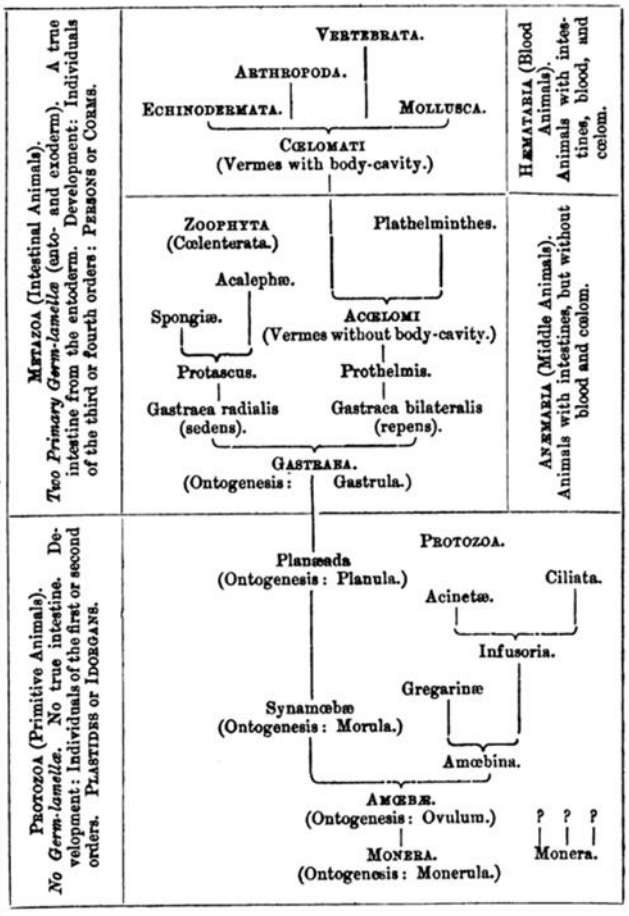
B


Plantae
Protista
Animalia
Cormophyta
Myxomycetes
Spongiae
Vertebrata
Amniota
Articulata
Arthropoda
Rhizopoda
Flagellata
Diatomeae
Moneres
Protoplasta
Myxocystoda
Echinodermata
Coelenterata
Mollusca
Archephylum vegetabile
Archephylum protisticum
Archephylum animale
Protista
Plantae
Animalia
Radix communis Organismorum
Moneres autogonum
Monophyletischer Stammbaum der Organismen
entworfen und gezeichnet von
Ernst Haeckel. Jena, 1866.

E



C


METAZOA (Intestinal Animals). Two Primary Germ-lamellæ (ento- and exoderm). A true intestine from the entoderm. Development: Individuals of the third or fourth orders: PERSONS or COENOBIA.
VERTEBRATA.
ARTHROPODA.
ECHINODERMATA.
MOLLUSCA.
CŒLOMATI (Vermes with body-cavity.)
HÆMATARIA (Blood Animals). Animals with intestines, blood, and cœlom.
ZOOPHYTA (Cœlenterata.)
Plathelminthes.
Acalephæ.
Spongiæ.
ACŒLOMI (Vermes without body-cavity.)
ANÆMARIA (Middle Animals). Animals with intestines, but without blood and colom.
Protascus.
Prothelmis.
Gastraea radialis (sedens).
Gastraea bilateralis (repens).
GASTRÆA. (Ontogenesis: Gastrula.)
PROTOZOA (Primitive Animals). No Germ-lamellæ. No true intestine. Development: Individuals of the first or second orders. PLASTIDES or IDIOGENS.
PROTOZOA.
Planæada (Ontogenesis: Planula.)
Ciliata.
Acinetæ.
Infusoria.
Gregarinæ
Synamœbæ (Ontogenesis: Morula.)
Amœbina.
AMŒBÆ. (Ontogenesis: Ovulum.)
MONERA. (Ontogenesis: Monerula.)
? ? ?
Monera.

Slika 1. Prema modernoj definiciji životinja

A – Hoggov *Dijagram prirodnih tijela četiriju carstava Prirode*. Biljno (žuta piramida) i životinjsko carstvo (plava piramida) izranjaju iz zajedničke baze (Protoctista). Preuzeto iz: HOGG (1860). **B** – Haeckelovo filogenetsko stablo s 19 skupina (koljena) živih bića koje su neovisnog podrijetla (polje pmnq)/potječu od tri arhetipske skupine (polje pxyq)/potječu od jedinstvenog zajedničkog pretka (polje pstq). Preuzeto iz: HAECKEL (1866). **C** – Haeckelovo holofiletsko stablo životinjskog carstva. Gastreja je zajednički predak svih Metazoa te predstavlja evolucijsku vezu s polifiletskim Protozoa. Valja primijetiti dvije grane koje se odvajaju od gastreje: Protascus (= Zoophyta) i Prothelmis (= Bilateria). Preuzeto iz: HAECKEL (1874). **D** – Ranija rukopisna inačica filogenetskog stabla iz (**C**) iz pisma što ga je Haeckel napisao Charlesu Darwinu 8. X. 1873. Preuzeto iz: RICHARDS (2008). **E** – Haeckelovi crteži gastrula nekoliko skupina Metazoa; prva gastrula pripada spužvi. Iz: HAECKEL (1874), preuzeto posredno.

Unatoč iznimnom napretku koji su znanstvenici postigli u rekonstruiranju filogenije Metazoa posljednjih godina (DUNN *et al.*, 2014), zoolozi i danas pokušavaju odgovoriti na brojna pitanja, primjerice: kako su Metazoa nastale; kakva je njihova filogenija; koje su njihove apomorfije te objasniti pojavu određenih važnih struktura i obilježja u njihovoj evoluciji.

U središtu interesa ovoga rada jest rana evolucija Metazoa, uključujući i njihov nastanak. Kad odgovorimo na pitanje što je to *rana* evolucija Metazoa (2. poglavlje), pokušat ćemo se približiti odgovorima ili barem podcrtati najvažnija pitanja na sljedećim područjima: kakva je filogenija Metazoa (3. poglavlje); što je bilo važno za evoluciju njihove mnogostaničnosti (4. poglavlje); kako su Metazoa nastale (5. poglavlje); kad su se u njihovoj evoluciji pojavili zametni listići (ektoderm, endoderm i mezoderm) i gastrulacija te kako je nastalo prohodno probavilo Eubilateria (6. poglavlje); kada se i koliko puta u njihovoj evoluciji pojavio živčani sustav (7. poglavlje); kako se odvijala evolucija homeobox gena u Metazoa (8. poglavlje). Raspon interesa u tomu traganju bit će od klasičnih autora druge polovice 19. stoljeća do novijih paradigmi važnih za razumijevanje njihove evolucije i filogenije.

2. Rana evolucija Metazoa: vremenski kontekst i kambrijska „eksplozija“

Charles Darwin u prvom je izdanju *Podrijetla vrsta* (DARWIN, 1859), u vrijeme kad su najstariji poznati fosilni nalazi bili oni iz slojeva silura, nastojao shvatiti zašto se u najstarijim slojevima nalazi dijapazon različitih životinjskih oblika koji se u njima pojavljuju odjednom i zajedno. Njegovo gradualističko poimanje evolucije odredilo je njegov zaključak kako su skupine kojima pripadaju ti nalazi morale nastati davno prije i kako je njihova evolucija bila spora. Na pitanje zašto nisu sačuvani potencijalni stariji fosili nije iznašao odgovor premda je bio svjestan nekompletnosti fosilnih nalaza općenito.

Danas su najstariji fosili Metazoa, iako njihov životinjski karakter nije univerzalno prihvaćen od strane paleontologa, oni iz razdoblja ediakarija, stari 610 – 550 milijuna godina (Sl. 2A–C). I dok ovi fosili, s dvama najvećim nalazištima u južnoj Australiji (Ediacara Hills) i duž obale Bijelog mora u sjevernoj Rusiji, različito interpretirani (od pridruživanja različitim skupinama Metazoa do razmatranja posebne skupine neovisne o njima), ostaju kontroverzni, najstariji fosili koji se sa sigurnošću mogu smatrati pripadnicima Metazoa nisu stariji od početka kambrija (MINELLI, 2009). Tada se, u jedinstvenoj epizodi Zemljine prošlosti, poznatoj kao kambrijska „eksplozija“ (Sl. 2A), pojavljuju u fosilnim nalazima predstavnici gotovo svih životinjskih koljena (MARSHALL, 2006). Premda se od Darwinova vremena starosna granica za najstarije fosile značajno pomaknula, nesigurnost oko njihova iznenadnog procvata u tim najstarijim slojevima ne izostaje ni danas. MINELLI (2009, str. 26.) problem podcrtava ovako: „Kako interpretirati iznenadnu pojavu raznolikih životinjskih skupina, uključujući mnoga 'koljena' tradicionalno prepoznata u recentnoj bioti? Hoćemo li to uzeti kao dokaz iznenadne radijacije Metazoa, s eksplozivnom evolucijom raznolikosti građevnih planova, ili jednostavno kao posljedicu iznenada promijenjenih uvjeta za fosilizaciju, tako da se jedva možemo nadati pronalaženju fosilnih dokaza o postojanju životinja starijih od kambrija, unatoč tome što možda postoje stotinama milijuna godina?“

2.1. Kambrijska eksplozija *sensu stricto*

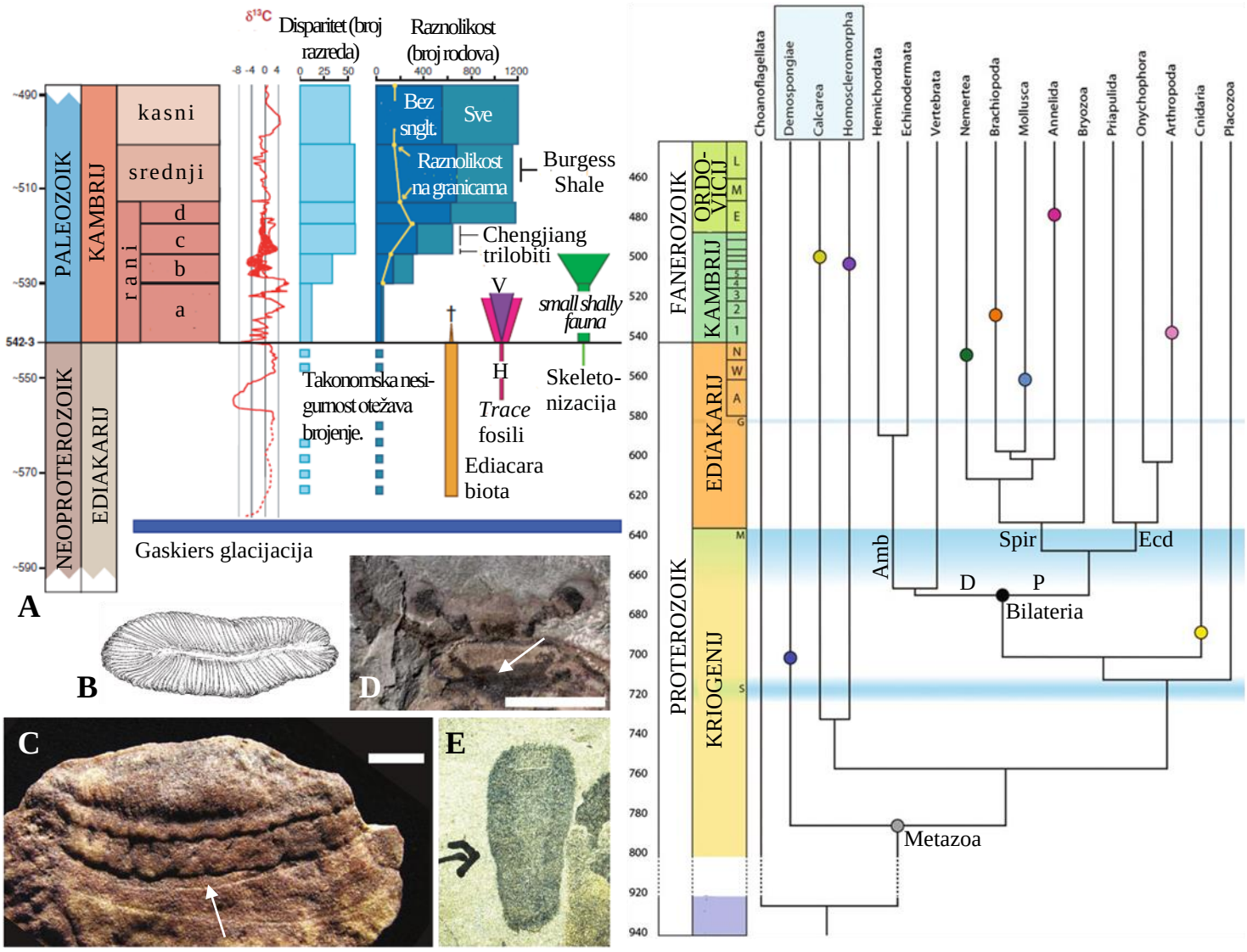
Kambrijska eksplozija *sensu stricto* počela je prije oko 542 milijuna godina s pojavom vertikalnih rupa nastalih djelovanjem životinja i pojavom skeletnih komponenti višedijelnih skeleta poznatih kao *small shelly fauna* (Sl. 2A) (TWEEDT & ERWIN, 2015). Općenito, kambrijsku faunu odlikuju tri načina sačuvanosti organizama; uz faunu skeletnih komponenti i same kompletne fosile, to su i mineralizirani organski skeleti (VALENTINE & MARSHALL, 2015). Dva najznačajnija nalaza ranije kambrijske faune jesu lokaliteti Chengjiang u Kini

(starosti oko 520 mil. godina) i Burgess Shale u Britanskoj Kolumbiji u Kanadi (starosti oko510 mil. godina) s iznimno dobro sačuvanim fosilima (Sl. 2C, D) (MINELLI, 2009; VALENTINE & MARSHALL, 2015). Uspoređena s razdobljem između kambrija i današnjice, kambrijska radijacija odvila se brzo, no ipak je riječ o razdoblju od nekoliko desetaka milijuna godina (Sl. 2A) (MARSHALL, 2006) zbog čega se pojam *eksplozija* često nalazi u navodnicima. U razmatranju kambrijske biote valja razlikovati dvije kategorije: disparitet (*disparity*) i raznolikost (*diversity*) (MARSHALL, 2006; VALENTINE & MARSHALL, 2015), pri čemu se prva kategorija odnosi na brojnost viših, a druga na brojnost nižih taksonomskih kategorija (npr. odnos koljeno/razred; razred/rod).

Ideja o uzrocima kambrijske eksplozije nikad nije nedostajalo, no većina se može svrstati u tri kategorije: (1) promjene u abiotskom okolišu; (2) promjene u genskom ili razvojnom kapacitetu; i (3) ekološke promjene; od kojih se sve čine važnima, a ni jedna sama za sebe ne objašnjava eksploziju dispariteta (MARSHALL, 2006). Iz prve spomenute kategorije obično se navode teorije o povećanju koncentracije kisika i tzv. *Snowball Earth* teorija (PETERSON *et al.* 2005; MARSHALL, 2006). Prva znanstvenicima daje ideju o značajnijem aerobnom oslobađanju energije važne za životinjske inovacije kao što su mišići, živčani sustav, alati za obranu i predatorstvo (FOX, 2016), iako neka novija istraživanja (npr. ZHANG *et al.*, 2015) pokazuju kako je dovoljno kisika za respiraciju bilo mnogo prije evolucije samih Metazoa. Druga ukazuje na mogućnost ekološkog oporavka nakon masivne ekstinkcije uzrokovane glacijacijom (PETERSON *et al.*, 2005). Premda su povoljni uvjeti abiotskog okoliša svakako bili predujet za pojavu Metazoa (MARSHALL, 2006), morfološke inovacije mogle su potaknuti najznačajnije eksplozivne pojave u njihovoj ranoj evoluciji (NIELSEN & PARKER, 2010). Za PETERSONA *et al.* (2005) to je evolucija makrofagije (popraćna evolucijom većih životinja i skeletonizacije kao odgovora na predatorski pritisak na dnu), a za NIELSENA & PARKERA (2010) kombinacija pojave prvo mozga i prohodnog probavila, a kasnije oka koja je potaknula mnoge inovacije koje su uslijedile.

VALENTINE & MARSHALL (2015) predlažu *top – down* princip popunjavanja morfoprostora u ranoj evoluciji Metazoa koja je isprva obilježena velikim disparitetom, a malom raznolikošću: najstariji članovi taksona definiraju cijeli morfološki prostor u kojemu kasniji članovi (nižih taksonomskih kategorija) okupiraju morfoprostore između već ustanovljenih. Ovaj ekološki pristup odgovara idejama G. G. Simpsona koji je zamišljao okoliš kao adaptivne zone međusobno odijeljene adaptivnim barijerama. Ovaj ekološki pristup s jedne i promišljanja o kompleksnim genskim mrežama s druge strane dva su različita, iako ne

međusobno isključiva načina odgovaranja na pitanje jesu li promjene u genomu aktivni uzroci ili više pasivni sudionici evolucijskih promjena (VALENTINE & MARSHALL, 2015).



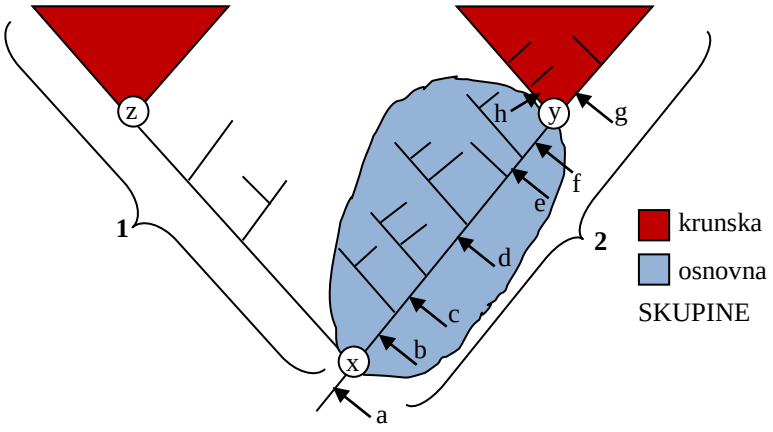
Slika 2. Kambrijska „eksplozija“, ediakarijska biota i kambrijska fauna te nastanak životinja prema analizama molekularnog sata.

A – Anatomija kambrijske „eksplozije“ (prilagođeno prema MARSHALL, 2006). Dan je vremenski kontekst pojave (i ekstinkcije) ediakarijske biote; kambrijskih nalazišta Chengjiang (Kina) i Burgess Shale (Kanada); skeletonizacije (zeleno); pojave horizontalnih (H) i vertikalnih (V) fosila tragova (ružičasto i ljubičasto). Dani su i podaci o disparitetu i raznolikosti kambrijske faune (bez snglt. = uklonjeni *singletons*). Lijevo od toga dana je krivulja izotopa karbonatnog ugljika (crveno). Slovima a – d označena su, ovdje neimenovana, pojedina razdoblja ranog kambrija; **B** – *Dickinsonia*, predstavnik ediakarijske biote, mekani organizam koji neki smatraju životinjom (preuzeto iz: BRUSCA & BRUSCA, 2003); **C** – *Kimberella* iz južne Australije, ediakarijski organizam koji neki autori imenuju osnovnim (*stem*) mekušcem; fosil se nalazi iznad strelice (preuzeto iz: BRIGGS, 2015); **D** – Fosilizirana glava kambrijskog člankonošca *Fuxianhuia protensa* s vidljivim okom, mozgom (strelica) i drugim živčanim tkivom (Chengjiang, Kina) (preuzeto iz: BRIGGS, 2015); **E** – Fosil spužve *Hazelia delicatula* iz srednjeg kambrija (Burgess Shale, Kanada), duljine oko 9 mm, autor fotografije: Joe Botting (preuzeto iz: BUDD, 2013); **F** – Nastanak Metazoa i njihovih većih skupina prema analizama molekularnog sata (prilagođeno prema: TWEEDT & ERWIN, 2015). Sivi kružić označava postanak Metazoa, a crni Bilateria. Postanak krunskih skupina

pojedinih koljena naznačen je kružićima u boji. Horizontalna plava polja označavaju glacijacije: S – Sturtian, M – Marinoan, G – Gaskiers. P predstavlja Protostomia, a D Deuterostomia. Naznačene su i sestrinske skupine koje čine Protostomia: Spiralia (Spir) i Ecdysozoa (Ecd) te jedna od dviju sestrinskih skupina Deuterostomia: Ambulacraria (Amb). Druga, Chordata, predstavljena je s Vertebrata. Plavim pravokutnikom objedinjene su spužve, ovdje prikazane kao parafiletska skupina. Ovaj prikaz predstavlja osnovne skupine spužava, Cnidaria, Placozoa i Bilateria kao postojeće od kriogenija. Ctenophora nisu uzeti u obzir. U (**A**) i (**F**) brojke slijeva predstavljaju milijune godina od danas.

2.2. Metazoa u prekambriju

Korištenje metode molekularnog sata redovito ukazuje na dugi period diverzifikacije Metazoa prije početka kambrija (MINELLI, 2009). TWEEDT & ERWIN (2015) na taj način predlažu postanak Metazoa prije oko 780 milijuna godina i ranu divergenciju glavnih skupina tijekom kriogenija, nakon čega slijedi diversifikacija koljena u kasnom ediakariju i kambriju (Sl. 2F). Tako su tijekom ediakarija već postojale osnovne (*stem*) skupine svih koljena Metazoa, dok se većina krunskih skupina pojavila do kraja kambrija (vidi Sl. 3. za tumačenje osnovnih i krunskih skupina). Razmak od oko 100 do 200 milijuna godina između ustanovljenja životinjskog razvojnog programa i pojave krunskih skupina u fosilnim nalazima implicira da evolucija nije uvijek oportunistička i da može proći mnogo vremena između postanka neke skupine i trenutka kad ona postaje ekološki i evolucijski važna (TWEEDT & ERWIN, 2015). Drugim riječima, „iako fosilni nalazi obično ne prate ranu evoluciju velikih skupina, oni ipak daju mnogo precizniju informaciju o tome kad neka skupina, koja se može fosilizirati, postaje ekološki važna“ (MARSHALL, 2006). Valja primijetiti kako hipoteze o diverzifikaciji Metazoa u kriogeniju impliciraju da su rane životinje morale preživjeti geografski raširene glacijacije u neoproterozoiku (DUNN *et al.*, 2014) (Sl. 2F).



Slika 3. Koncept krunske (*crown group*) i osnovne (*stem group*) skupine prema CRASKE & JEFFERIES (1989).

Skupine 1 i 2 su sestrinske skupine (*sister groups*) koje sadrže (i) recentne predstavnike, a potječu od zajedničke predačke vrste x. Skupina (1 + 2) je holofiletska. Svi recentni predstavnici linije 1 potječu od zajedničke

predačke vrste z i čine krunsku skupinu (*crown group*) linije 1. Svi recentni predstavnici linije 2 potječu od zajedničke predačke vrste y i čine krunsku skupinu linije 2. Krunske skupine su holofiletske skupine koje svojeg najbližeg zajedničkog pretka ne dijele ni s jednom drugom holofiletskom skupinom. Valja primijetiti kako u sastavu krunske skupine mogu biti i izumrle skupine, koje također potječu od zajedničkog pretka krunske skupine (pr. mamuti su izumrle životinje iz krunske skupine sisavaca; MINELLI, 2009). Dio evolucijske linije koji isključuje recentne predstavnike (krunsku skupinu) jest osnovna skupina (*stem group*), koja je parafiletska skupina. Plavom je bojom naznačena osnovna skupina linije 2. Ona isključuje populacije vrsta x i y. Strelicama od a do h označene su osobine koje se pojavljuju u evoluciji. Osobina a, koja se pojavila u osnovnoj skupini linije (1 + 2), autoapomorfija je skupine (1 + 2) i sinapomorfija skupina 1 i 2. Osobine b – f, koje su se javile u osnovnoj skupini linije 2 bit će, ako su zadržane u populacije y, autoapomorfije skupine 2. Precrtano i prilagođeno prema CRASKE & JEFFERIES (1989).

2.3. *Rana* evolucija Metazoa: koliko rana?

Bez obzira na točnost metode molekularnog sata i točno vrijeme nastanka Metazoa i njihovih glavnih ogranaka, rana evolucija Metazoa u svakom slučaju počinje procesom njihova nastanka. Dokad traje ta *rana* evolucija, pitanje je praktične prirode. Evolucijske pojave o kojima se govori u ovome radu u pravilu ne obuhvaćaju razdoblje nakon kambrija.

3. Izazovi u filogeniji Metazoa

> „Srodstveni odnosi između recentnih koljena Metazoa predmet su kontroverzi cijelo stoljeće i predstavljaju izazov i u morfološkom i u molekularnom pogledu.“ (BOURLAT *et al.*, 2008)

Sve recentne životinje pripadaju jednoj od sljedećih pet skupina: Ctenophora (rebraši), Porifera (spužve), Placozoa, Cnidaria (žarnjaci) i Bilateria (DUNN *et al.*, 2014). Sve se među njima, i na temelju morfologije i u novijim molekularnim analizama, smatraju holofiletskima, osim spužava za koje neke molekularne filogenije sugeriraju parafiliju (SCHMIDT-RHAESA, 2007; MINELLI, 2009; NIESLEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014). Kao uvod u predstavljanje glavnih izazova u filogeniji Metazoa i naglašavanje stabilnih dijelova njihova filogenetskog stabla poslužit će galerija kratkih portreta četiri nebilaterijska koljena s naglaskom na neke krive postavke ili fenomene koji će biti od interesa u drugim poglavljima ovoga rada.

3.1. Galerija Ctenophora, Porifera, Placozoa i Cnidaria

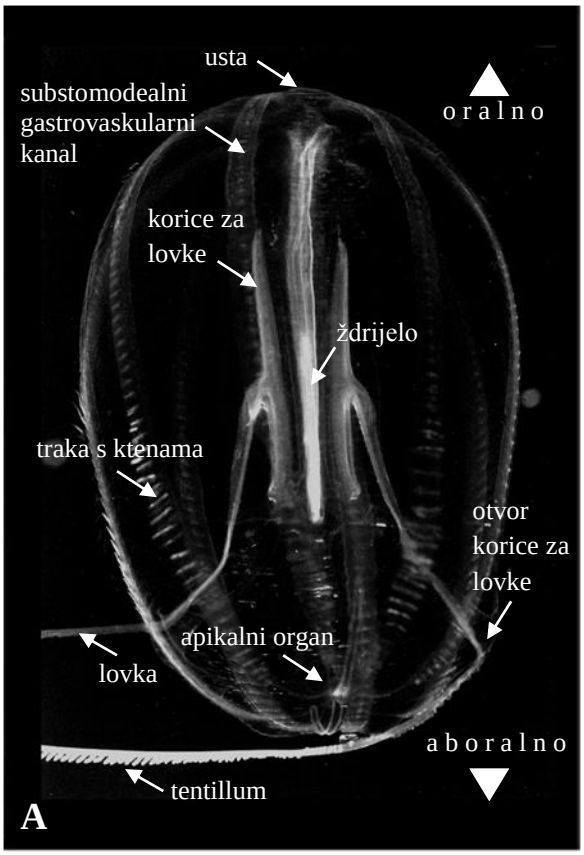
O Ctenophora i Porfiera još uvijek ne znamo dovoljno jer je najveća pažnja znanstvenika usmjerena na Bilateria, a u nebilaterijskih skupina na proučavanje osobina koje dijele s Bilateria, dok mnoga jedinstvena obilježja ovih skupina ostaju nezamijećena (DUNN *et al.*, 2015).

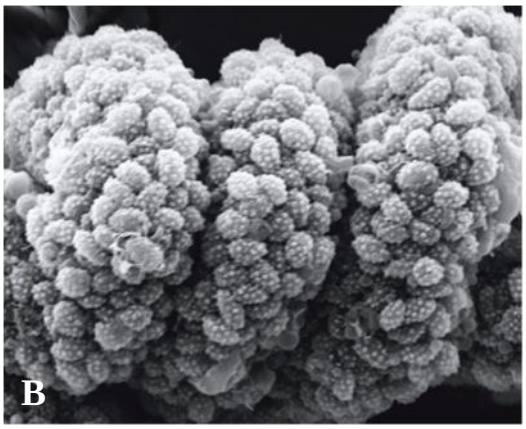
Ctenophora (Sl. 4.) isključivo su morske životinje s oko 190 vrsta, većinom pelagičkih, iako ima i bentičkih (DUNN *et al*., 2014, 2015). Ktene (grč. *ctena*, češalj), čijih se osam traka pruža duž tijela (Sl. 4A, D, G–I, K) i jedinstveni „apikalni“ organ na aboralnoj strani tijela (Sl. 4A, G–I, K) apomorfne su osobine (NIELSEN, 2012a). Naziv skupine znači „nosači ktena“. Svaka je ktena sastavljena od tisuća trepetljiki (Sl. 4D) koje rebrašima omogućuju plivanje (MARTINDALE & HENRY, 2015). Naziv „apikalni“ organ potječe od krive postavke koja se provlači po udžbenicima, a prema kojoj rebraši cidipidnog tipa plivaju s ustima prema dolje, dok zapravo plivaju s ustima naprijed, a odmaraju se s ustima prema gore (Sl. 4A) (DUNN *et al*., 2015). „Apikalni“ je organ statocist s četiri složene cilije, nazvane balanserima, koje pridržavavaju statolit, a epitel ispod samog organa sadrži veliku koncentraciju neurona (NIELSEN, 2012a). Preko osam trepetljikavih brazdi balanseri su povezani s trakama s ktenama te na taj način statocist njima upravlja (BRUSCA & BRUSCA, 2003). „Apikalni“ organ Ctenophora nije homolgan istoimenom organu ličinki Spiralia (DUNN *et al.*, 2015; MARTINDALE & HENRY, 2015). Jedinstveno obilježje jesu i koloblasti koji dolaze na dvjema lovkama (Sl. 4A), adhezivne stanice koje koriste za hvatanje plijena (Sl. 4B, C) (FRANC, 1978). Živčani sustav (Sl. 4E, F) im je tipa živčanih mreža (NIELSEN, 2012a). Svi rebraši imaju

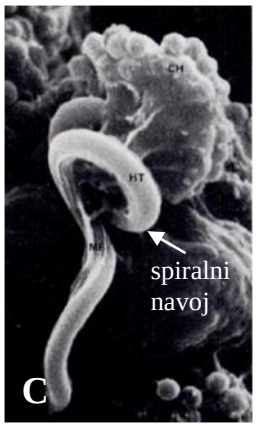
direktni razvoj (cidipidna „ličinka“ je zapravo mlada minijaturna inačica odrasle jedinke), a većina su samooplodni hermafroditi (MARTINDALE & HENRY, 2015). U njihovu ranom razvoju nakon formiranja prvih dviju brazdi (prva definira tentakularnu, a druga ždrijelnu ravninu) nastaju četiri blastomere koje izgledaju identično (Sl. 4J). Ipak, po dvije blastomere EM\ i EM/, od kojih potječu četiri kvadranta odraslog rebraša, imaju različitu razvojnu sudbinu (Sl. 4J, K). Samo dvije EM\ blastomere doprinose razvoju dvaju dijagonalno postavljenih kvadranata koji imaju analne pore, komunikacije probavila s okolišem na aboralnoj strani tijela, dok EM/ blastomere daju liniju za razvoj njima susjednih kvadranata (MARTINDALE & HENRY, 2015). Zbog takvog rasporeda analnih pora njihovo se tijelo ne može ravninom simetrije podijeliti u dva zrcalno jednaka dijela te je njihova simetrija rotacijska (ravnina simetrije ih dijeli na jedan dio i drugi koji je okrenut za 180º) (DUNN *et al.*, 2015; MARTINDALE & HENRY, 2015), suprotno uobičajenim navodima kako imaju tzv. biradijalnu simetriju (npr. u BRUSCA & BRUSCA, 2003; NIELSEN, 2012a). U nekih je rebraša uočena pojava disogonije, spolna zrelost u stadiju mlade cidipidne „ličinke“ i u odraslom stadiju što je odvojeno razdobljem reduciranih gonada (NIELSEN, 2012a). Danas su poznati genomi dviju vrsta, *Mnemiopsis leidy* i *Pleurobrachia bachei* (JÉKELY *et al.*, 2015).

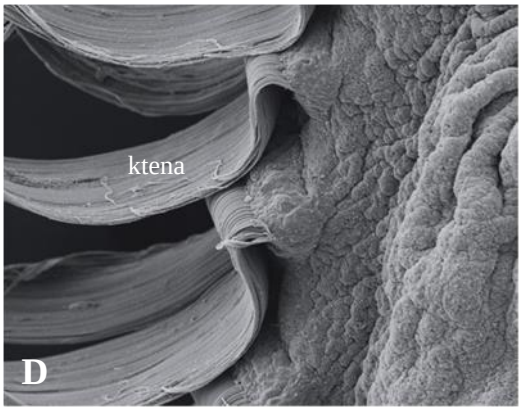
Porifera (Sl. 5.) obuhvaćaju oko 8500 poznatih vrsta, većinom morskih, dok je jedna skupina slatkovodna i nastanjuje špilje, pustinje i jezera diljem svijeta (DUNN *et al.*, 2014, 2015). Nedostatak struktura, prisutnih u ostalih životinja, kao što su mišići, živci i specijalizirane gonade stvara krivi dojam njihove jednostavnosti (DUNN *et al.*, 2015). Spužve su odvojene od okoliša epitelnim slojem, egzopinakodermom. Pore (ostije) u njemu, definirane porocitima, vode u sustav kanala obloženih endopinakocitima i hoanocitnih komorica obloženih hoanocitima (Sl. 5A–C, L; Sl. 12.). Pumpanje vode u tijelo spužve, koje nastaje djelovanjem hoanocita, opskrbljuje spužve, filtratore, hranom, a omogućuje i respiraciju i izlučivanje. Između egzo- i endopinakoderma nalazi se sloj kolagenskog mezohila (Sl. 5A, C) u kojemu se često nalaze pluripotentni arheociti te sklerociti koji proizvode skeletne elemente, spikule od silicijeva dioksida ili kalcijeva kabronata (Sl. 5I–K) (DEGNAN *et al.*, 2015). Voda koja ulazi kroz ostije izlazi iz tijela spužve kroz oskulum (Sl. 5Q). Ovaj plan građe mlade ili odrasle spužve rezultat je dramatične reorganizacije ličinki tijekom metamorfoze (DEGNAN *et al.*, 2015) koje pokazuju veću sličnost s građom ostalih Metazoa negoli postlarvalne spužve (MALDONADO, 2004). Ličinke spužava isključivo su lecitotrofne (JÄGERSTEN, 1972; NIELSEN, 2012a). Često se navodi kako spužve nemaju „pravi“ epitel. Spužve imaju epitel, *sealing* tipa te im epitel omogućuje regulaciju protoka iona (LEYS *et al.*, 2009; LEYS & RIESGO, 2012; LEYS & HILL, 2012; DUNN *et al.*, 2015). U spužava dolaze različiti oblici međustaničnih spojeva (Sl.

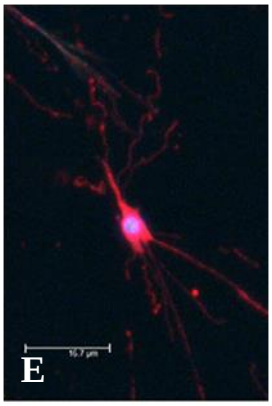
5D–G) adherentnog i okludentnog tipa (LEYS & HILL, 2012). Jedna skupina spužvi, Homoscleromorpha, ima bazal-nu membranu s kolagenom tipa IV (Sl. 5H) (npr. ERESKOVSKY, 2010; NIELSEN, 2012a). Osim da nemaju tkiva, redovito se navodilo kako nemaju ni senzorne strukture ni mišićne stanice. LUDEMAN *et al.* (2014) pokazuju kako se u unutarnjem epitelu oskuluma spužve nalaze kratke nepokretne cilije koje su senzorni organ uključen u koordinaciju jednostavnog ponašanja (Sl. 6M). Mnoge ličinke imaju fotosenzitivni pigmentni prsten (DEGNAN *et al.*, 2015). Osim toga, spužve pokazuju i kontraktilnost. U sfinkterima oko kanala kontraktilnost pokazuju pinakociti (LEYS & HILL, 2012), a opisane su i stanice mezohila, miociti, koje sadrže aktin i koje mogućno sudjeluju u kontrakciji (ERESKOVSKY, 2010; LEYS & HILL, 2012). Zanimljiv primjer iz evolucije spužava, iznimka u odnosu na njihovu filtraciju, jesu dubokomorske karnivorne spužve koje spikulama hvataju rakove (Sl. 5P) (DUNN *et al.*, 2015). Spužve, za koje postoje mišljenja i o holofiliji i o parafiliji, obuhvaćaju četiri skupine. To su (razredi) Demospongiae (s najviše vrsta), Calcarea, Homoscleromorpha i Hexactinellida. Posljednja navedena razlikuje se od ostalih spužvi po tome što su u cijelosti sincitijalne (DEGNAN *et al.*, 2015) te su to jedine spužve s električnim signaliziranjem, u kojih akcijski potencijal ovisi o kalciju i kaliju (LEYS, 2015), dok ostale spužve koriste glutamatergično signaliziranje (DUNN *et al.*, 2015). Homoscleromorpha su jedina skupina u koje je elektronskom mikroskopijom utvrđena bazalna membrana, iako je kolagen IV koji tipično dolazi u njezinu sastavu nađen i u Calcarea, dok je u Demospongiae nađen *spongin short chain collagen* (SSCC), molekularno sličan kolagenu IV, a koji bi svojom strukturom, poput njega, mogao ostvarivati interakcije s epitelom (LEYS & HILL, 2012). Dvije vrste s najbolje poznatom ekspresijom razvojnih gena u spužava jesu *Amphimedon queenslandica* (Demospongiae) i *Sycon ciliatum* (Calcarea) (DEGNAN *et al.*, 2015). U spužava su nađeni geni za mnoge porodice sekretornih molekula koje su specifične za živčani sustav drugih Metazoa, iako same nemaju živčani sustav (DUNN *et al.*, 2015).

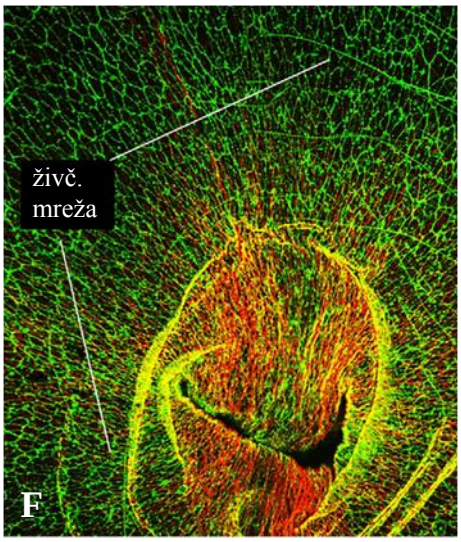

usta
substomodealni gastrovaskularni kanal
oralno
korice za lovke
ždrijelo
traka s ktenama
otvor korice za lovke
apikalni organ
lovka
aboralno
tentillum
A

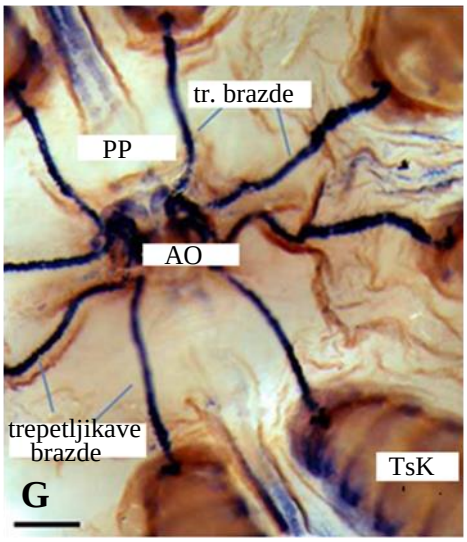

B

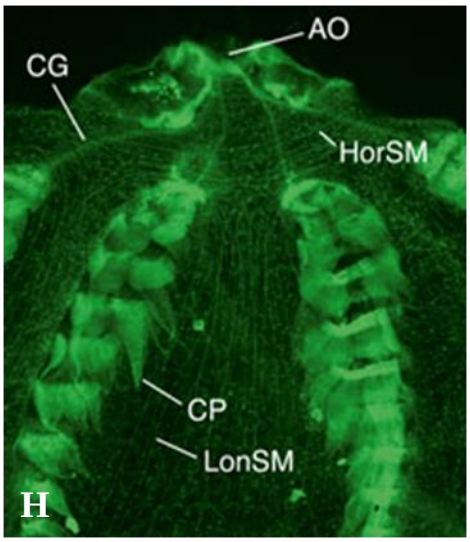

spiralni navoj
C

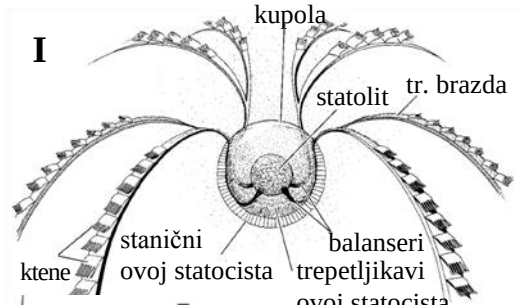

ktena
D

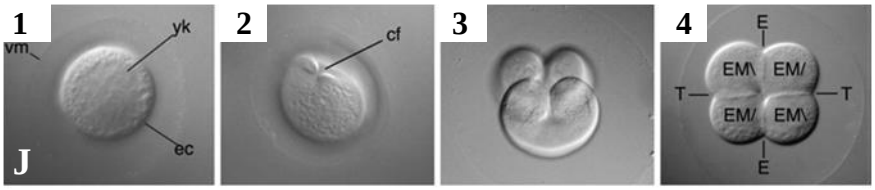

E

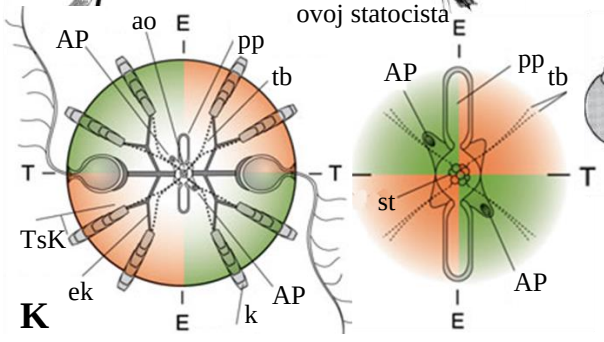

živč. mreža
F

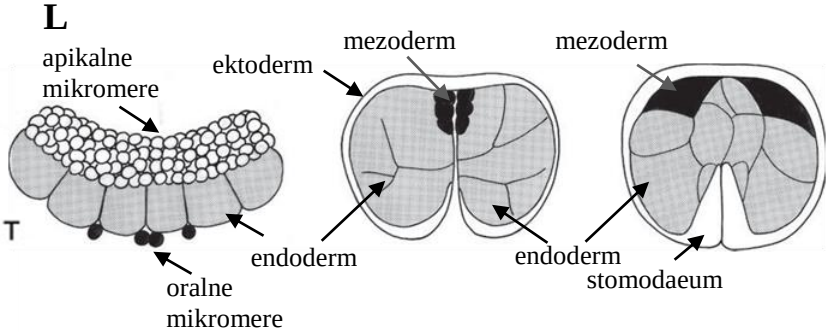

tr. brazde
PP
AO
trepetljikave brazde
TsK
G


AO
CG
HorSM
CP
LonSM
H


I
kupola
statolit
tr. brazda
ktene
stanični ovoj statocista
balanseri trepetljikavi ovoj statocista

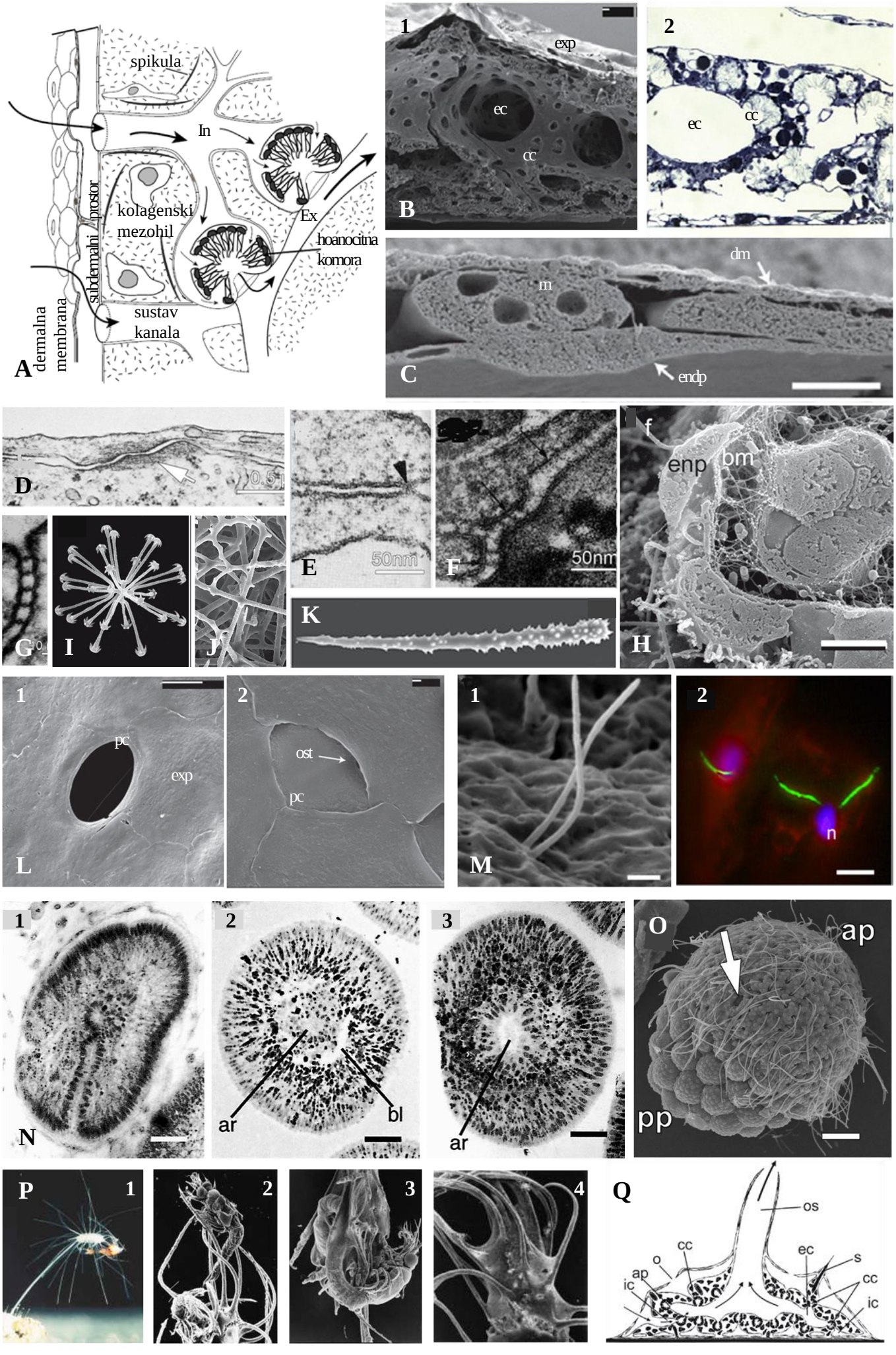

1
vm
yk
ec
J
2
cf
3
4
E
EM\
EM/
T
EM/
EM\
E


AP
ao
E
pp
tb
T
TsK
ek
E
k
AP
K
AP
pp
tb
T
st
E
AP


L
apikalne mikromere
ektoderm
mezoderm
mezoderm
endoderm
endoderm
stomodaeum
oralne mikromere

Slika 4. Portret koljena Ctenophora

A – Vanjski izgled vrste *Hormiphora californensis* orijentirane onako kako rebraše nalazimo u moru (prilagođeno prema: DUNN *et al.* 2015); **B** – Koloblasti rebraša (SEM) (preuzeto iz: MOROZ *et al.*, 2014); **C** – Koloblast dijelom pomaknut s lovke (SEM) (prilagođeno prema: FRANC, 1978); **D** – Trepetljikave ktene (SEM) (preuzeto iz: MOROZ *et al.*, 2014); **E** – Neuron iz mezogleje (crveno: imunobojenje tironiziranim α-tubulinom) (preuzeto iz: MOROZ, 2015); **F** – Živčana mreža oko usta (zeleno: imunobojenje tironiziranim α-tubulinom; crveno: faloidin) (prilagođeno prema: MOROZ, 2015); **G** – Apikalni organ (AO), trepetljikave brazde, polarna polja (PP) i trake s ktenama (TsK) (*in situ* hibridizacija; ekspresija gena WntX) (prilagođeno prema: MOROZ *et al.*, 2014); **H** – Lateralni konfokalni mikrograf prikazuje apikalni organ (AO), trepetljikave brazde (CG) i trake s ktenama (s njihovim tepretljikama, CP) te longitudinalna (LonSM) i horizontalna (HorSM) glatka mišićna vlakna u rebraša *Beroe ovata* (preuzeto iz: MARTINDALE & HENRY, 2015); **I** – Odnos apikalnog organa (statocista) i osam traka s ktenama (prilagođeno prema: BRUSCA & BRUSCA, 2003); **J** – Mikrografi ranog razvoja rebraša: 1, oplođena zigota unutar viteline membrane (vm), ektoplazma (ec) okružuje žumanjčanu masu (ym); 2, početak brazdanja i stvaranja prve brazde (cf); 3, dvije stanice dijele se u četiri; 4, četverostanični stadij s dva tipa determiniranih kvadranata (EM\ i EM/) (T – tentakularna, E – ždrijelna/sagitalna ravnina) (preuzeto iz: MARTINDALE & HENRY, 2015); **K** – Prikaz doprinosa četiriju blastomera vidljivih na slici **J4** odraslom planu građe rebraša (zeleno: doprinos EM\; narančasto: doprinos EM/ blastomera) (prilagođeno prema: MARTINDALE & HENRY, 2015). Samo EM\ blastomere daju razvoj dvama kvadrantima na kojima su analne pore (AP). Lijevo: odrasli rebraš s aboralne strane; desno: detalj aboralne strane tijela s vidljivim analnim porama. Oznake: ao, apikalni organ; pp, polarno polje; tb, trepetljikava brazda; k, ktena; ek, endodermalni kanal; TsK, traka s ktenama; st, statolit); **L** – Embriologija rebraša (lijevo: *Mnemiopsis leidyi*, 128-stanični stadij; u sredini i desno: *Callianira bialata*, rana i kasna gastrula) (prilagođeno prema: NIELSEN, 2012a). Ako nije naznačeno drugačije, svi primjerci potječu od rebraša roda *Pleurobrachia*. Na crtežima I i K prikazan je rebraš općenito.

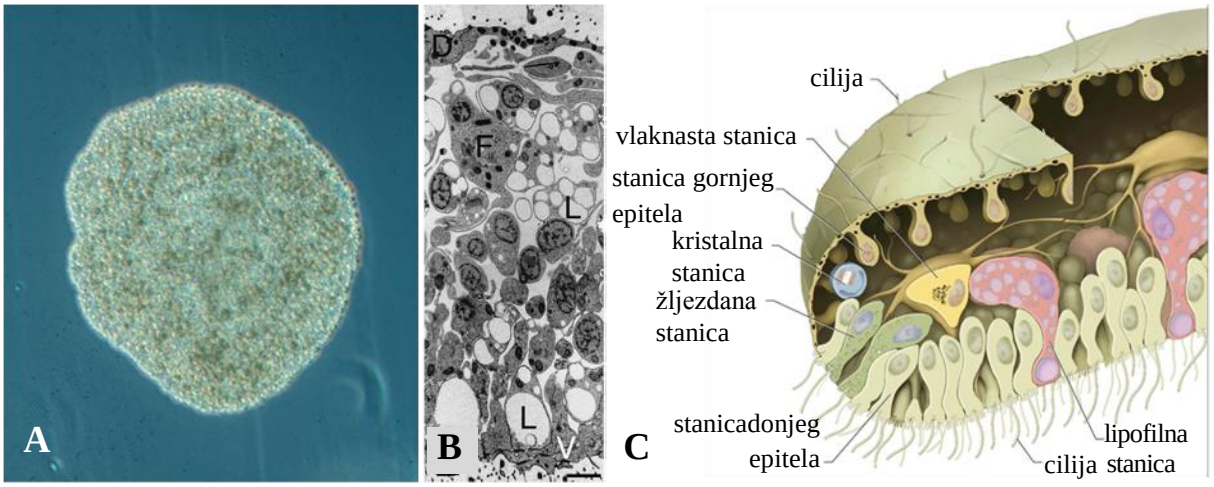

A
spikula
In
Ex
kolagenski mezohil
subdermalni prostor
hoanocitna komora
sustav kanala
dermalna membrana
1
exp
ec
cc
B
2
ec
cc
C
dm
m
endp
D
E
50nm
F
50nm
f
enp
bm
H
G
I
J
K
1
pc
exp
L
2
ost
pc
1
M
2
n
1
N
2
ar
bl
3
ar
O
ap
pp
P
1
2
3
4
Q
os
cc
ec
o
s
ap
ic
cc
ic

Slika 5. Portret koljena Porifera

A – Shematski prikazan filtratorski sustav spužve (Demospongiae) s glavnim tkivima. In – ulazak, Ex – izlazak vode. Prilagođeno prema: DUNN *et al.* (2015). **B** – SEM poprečnog prereza kroz *Ephydatia muelleri* (Demospongiae): exp, egzopinakoderm; ec, izlazni kanal; cc, hoanocitna komora. Preuzeto iz: LEYS & HILL (2012). **C** – Dermalna membrana *E. muelleri*, SEM: dm, dermalna membrana; m, stanica mezohila; endp, endopinakoderm. Preuzeto iz: LEYS & HILL (2012). **D – G**: (među)stanični spojevi Porifera; **D** – Dezmosomu nalik spoj između dvije epitelne stanice u *Ephydatia* sp.; **E** – Vrlo približene membrane dviju epitelnih stanica *Aplysina cavernicola* (Demospongiae); **F** – Septe u spoju između hoanocita u *Clathrina* sp. (Calcarea); **G** – Septirani spoj (*septate junction*) između stanica u *Sycon ciliatum* (Calcarea). TEM, preuzeto iz: LEYS *et al.* (2009). **H** – SEM endopinakocita (enp) ispod kojih je bazalna membrana (bm) u *Oscarella tuberculata* (Homoscleromorpha). Preuzeto iz: ERESKOVSKY (2010). **I – K**: anorganski skelet spužvi; **I, J** – *Oopsacas minuta* (Hexactinellida); **K** – *Artemisina arcigera* (Demospongiae). TEM, preuzeto iz: ERESKOVSKY (2010). **L** – Dinamika otvaranja i zatvaranja pora (ostija) u *E. muelleri*: 1, otvoreno; 2, zatvoreno; pc, porocit; exp, egzopinakocit; ost, pora (ostija). Pore su otvori u porocitima; u (2) je pora skrivena ispod egzopinakocita. Preuzeto iz: LEYS & HILL (2012). **M** – Osjetne nepokretne cilije na epitelu koji oblaže oskulum u *E. muelleri*: 1, dvije cilije dolaze po jednoj stanici; 2, cilije obilježene protutijelima za α-tubulin (zeleno), jezgre obojene plavo (Hoechst), aktin faloidinom (crveno); n, jezgra stanice. Preuzeto iz: LUDEMAN *et al.* (2014). **N** – Razvoj spužve *Halisarca dujardini* (Demospongiae): 1, uzdužni prerez prikazuje postero-lateralnu invaginaciju; 2, poprečni prerez kroz stadij disferule s arhenteronom (ar) i uskim blastocelom (bl); 3, kasna ličinka u kojoj je blastocel obliterirao, a arhenteron preostao. Preuzeto iz: MALDONADO (2004). Maldonado smatra stadij (1) gastrulacijom embolijom. **O** – Ličinka amfiblastula roda *Sycon* s anteriornom cilijatnom hemisferom (ap) i posteriornom hemisferom (pp) s velikim globularnim granularnim stanicama. Preuzeto iz: LEYS & EERKES-MEDRANO (2005). **P** – Predacija u karnivorne spužve *Asbestopluma* (Demospongiae) koja se hrani rakom (1, fotografija, 2 – 4, SEM). Preuzeto iz: BRUSCA & BRUSCA (2003). **Q** – Mlada spužva leukonskog tipa: ap, apopila; cc, hoanocitna komora; ec, izlazni kanal; ic, ulazni kanal; o, ostija (pora); os, oskulum; s, spikula. Preuzeto iz: ERESKOVSKY (2010).

Placozoa (Sl. 6.) koljeno su koje uključuje samo jednu formalno opisanu vrstu, *Trichoplax adhaerens* (Sl. 6A), no stvarna raznolikost Placozoa vjerojatno uključuje nekoliko desetaka genetički, razvojno i ekološki razlučivih vrsta koje se morfološki ne razlikuju (SCHIERWATER & EITEL, 2015). *Trichoplax* dolazi u tropskim, suptropskim i nekim morima umjerenih temperatura diljem svijeta. Ne posjeduje oralno-aboralnu os, organe, živčane ili mišićne stanice, bazalnu membranu ili ekstracelularni matriks, ali posjeduje (među)stanične spojeve. Odlikuje se „sendvič" organizacijom u kojoj se vlaknaste stanice (*fiber cells*) nalaze između donjeg i gornjeg epitela (Sl. 6B, C) (SCHIERWATER & EITEL, 2015). U Placozoa je opisano šest vrsta stanica (Sl. 6B, C): stanice donjeg epitela, stanice gornjeg epitela, vlaknaste, žljezdane, lipofilne i kristalne stanice, od kojih su dvije posljednje nedavno otkrili SMITH *et al.* (2014). Stanice donjeg epitela produžene su u ventralno-dorzalnom smjeru, nose po jednu ciliju i brojne mikrovile, čime podsjećaju na stanice probavne cijevi drugih životinja. *Trichoplax* se hrani tako da uzdigne središnji dio, na kojem se taj epitel nalazi, i oblikuje vanjsku probavnu šupljinu (SCHIERWATER & EITEL, 2015). Žljezdane stanice nalaze se uz rub životinje. Navodi se kako su vjerojatno važne za ekstracelularnu probavu, no budući da ne dolaze u središnjem dijelu donjeg epitela, to vjerojatno nije njihova primarna uloga (SMITH *et al.*, 2014). SMITH *et al.* (2014) otkrili su u središnjem dijelu donjeg epitela lipofilne stanice koje vjerojatno

sudjeluju u probavi, a predlažu da su žljezdane stanice sekretorne stanice koje izlučuju neuropeptidu FMRFamidu slične tvari. Budući da imaju ciliju, moguće je da su osjetljive te da regulirano, u slučaju podražaja (npr. hrane), djeluju u parakrinoj signalizaciji okolnih stanica, cilijatnih i probavnih (cilije donjeg epitela omogućuju im pokretanje). Otvorena je mogućnost da kristali u malobrojnim kristalnim stanicama smještenim na rubu životinje iznad žljezdanih imaju ulogu osjetila za ravnotežu ili fotoreceptora. Vlaknaste stanice imaju nastavke koji se pružaju do svih ostalih tipova stanica (SMITH *et al.*, 2014). Životni ciklus nedovoljno je poznat, no izgleda da uz nespolno razmnožavanje pokazuju i spolno te su hermafroditi (SCHIERWATER & EITEL, 2015). Iako ECM nije nađen, posjeduju gene za kolagen IV i druge njegove proteine (NIELSEN, 2012a).

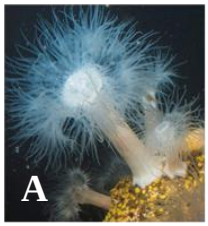


Slika 6. Portret koljena Placozoa

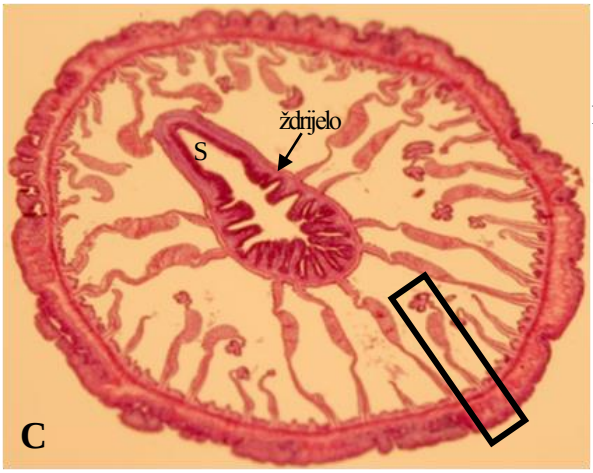
A – *Trichoplax adhaerens*. Preuzeto iz: SCHIERWATER *et al.* (2010). **B** – Prerez kroz središnji dio životinje. D, dorzalni epitel; F, vlaknasta stanica (*fiber cell*); L, lipofilna stanica; V, ventralni epitel. **C** – Plan građe životinje. Nastavci vlaknastih stanica u kontaktu su sa svim ostalim vrstama stanica. (B) i (C) preuzeto i prilagođeno prema: SMITH *et al.* (2014).

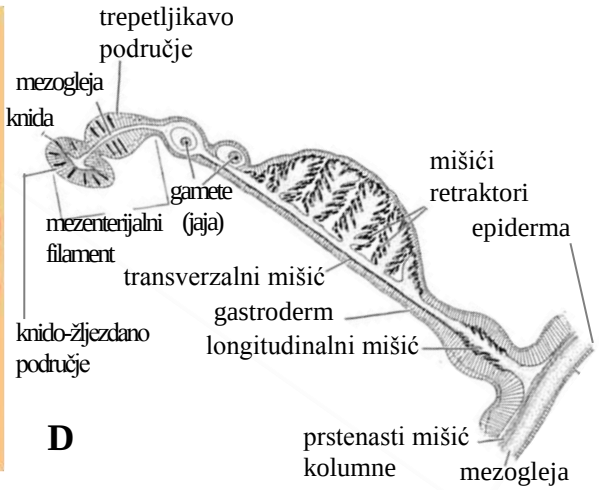
Cnidaria (Sl. 7.) obuhvaćaju oko 13000 poznatih vrsta, većinom morskih, dok su neke slatkovodne (DUNN *et al.*, 2014). Dvije sestrinske skupine koje potječu od zajedničkog pretka Cnidaria su Anthozoa (koralji) i Medusozoa, kojima pripadaju Hydrozoa (obrubnjaci), Scyphozoa (režnjaci), Cubozoa (kubomeduze) i Staurozoa (ranije smatrane režnjacima) (TECHNAU *et al.*, 2015). Apomorfne osobine Medusozoa jesu stadij meduze u životnom ciklusu i linearna mtDNA (NIELSEN, 2012a), dok koralji kao plesiomorfnu osobinu imaju uobičajenu kružnu mtDNA. Jedina druga poznata životinja s linearnom mtDNA jedna je vrsta spužve (DUNN *et al.*, 2014). COLLINS *et al.* (2006) imenuju Staurozoa, koje nemaju meduzu, sestrinskom skupinom ostalih Medusozoa. Najočitija apomorfija Cnidaria jesu nematociste

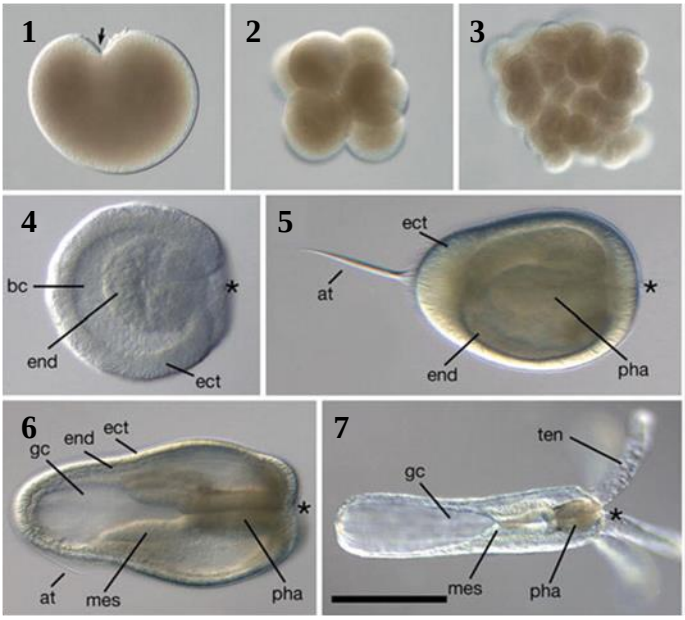
(knide), kompleksne strukture koje se formiraju unutar posebnih žarnih stanica, nematocita (knidocita) (Sl. 7J, K) (NIELSEN, 2012a). Žarnjaci su diploblastične životinje (npr. SCHMIDT-RHAESA, 2007; NIELSEN, 2012a; TECHNAU *et al.*, 2015) koje imaju ektoderm i endoderm, ali ne i treći zametni listić, mezoderm (prisutan u svih Bilateria), premda se u njih, ali u drugačijem kontekstu, eksprimiraju geni koji imaju očuvanu ekspresiju u mezodermu Bilateria (TECHNAU *et al.*, 2015). Ektoderm i endoderm u žarnjaka ostaju tijekom cijelog života epitelni jednoslojevi tvoreći epiderm, odnosno gastroderm koji oblaže probavnu (gastrovaskularnu) šupljinu (Sl. 7C, D). Između ova dva sloja dolazi mezogleja (Sl. 7C, D), koja nema veze s mezodermom, a u kojoj se mogu naći stanice koje potječu iz ekto- ili endodermalnog epitela koji stvara i ekstracelularni matriks mezogleje (NIELSEN, 2012a). U njoj se nalaze laminin, fibronektin i kolagen IV, vrlo slično bazalnoj membrani Bilateria (TECHNAU *et al.*, 2015). Živčani je sustav difuznoga tipa, bez jasne centralizacije, iako neuroni mogu biti posebno koncentrirani u nekim područjima i tvoriti npr. živčane prstenove (Sl. 7G–I) (TECHNAU *et al.*, 2015). Cubozoa i Scyphozoa (COLLINS *et al.*, 2006) posjeduju ropalije, osjetilne centre koji sadrže koncentraciju epidermalnih neurona, par kemoreceptornih jamica, statocist i često ocelu (Sl. 7H) (BRUSCA & BRUSCA, 2003). Cubozoa posjeduju složene oči (COLLINS *et al.*, 2006). U meduza se mogu pronaći poprečno-prugasti mišići sa sarkomerama (TECHNAU *et al.*, 2015). Ličinka žarnjaka, planula (Sl. 7E, F) lecitotrofna je i plana građe gastrule (NIELSEN, 2012a). U žarnjaka su nađeni praktično svi načini gastrulacije poznati u Bilateria (TECHNAU *et al.*, 2015). Na Sl. 7E prikazan je razvoj koralja *Nematostella vectensis* koji je, uz vrste roda *Hydra*, najčešće korišteni modelni organizam u EvoDevo istraživanjima (TECHNAU *et al.*, 2015). U udžbenicima zoologije žarnjaci se redovito obilježavaju kao radijalno simetrični (BAGUÑÀ, 2008). Koralji, koji imaju samo polip, što je plesiomorfno stanje za Cnidaria, imaju bilateralnu simetriju (TECHNAU *et al.*, 2015). Ona je određena položajem mišića retraktora u septama (pregradama) probavne šupljine (Sl. 7C, D) i sifonoglifa, trepetljikavog žlijeba na jednom ili obama krajevima ždrijela koralja (Sl. 7C). Tako se u žarnjaka (koralja) mogu razlikovati oralno-aboralna os (Sl. 7A) i na nju okomita os, nazvana direktivna, koja prolazi kroz sifonoglif koralja (Sl. 7C) (TECHNAU *et al.*, 2015). DOMAZET-LOŠO *et al.* (2014) pronašli su tumorsko tkivo u epidermi hidre (Sl. 7L) te su žarnjaci najstarija skupina Metazoa u koje su trenutno poznati tumori.

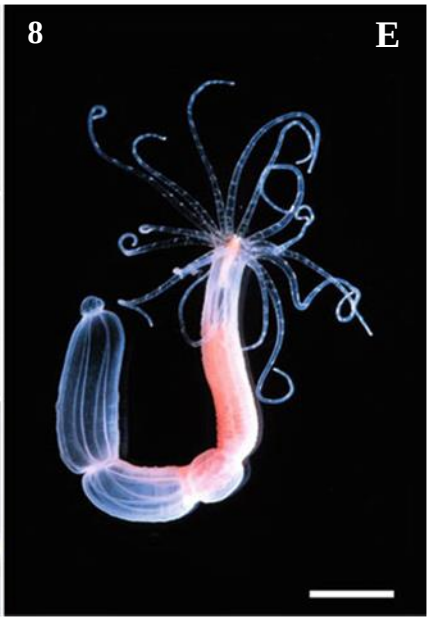

A

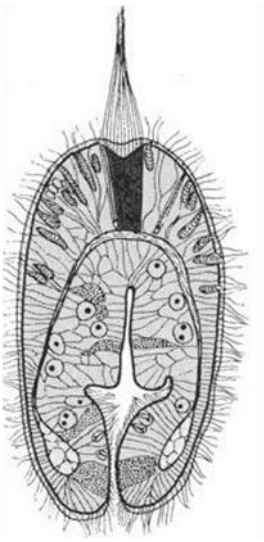

B

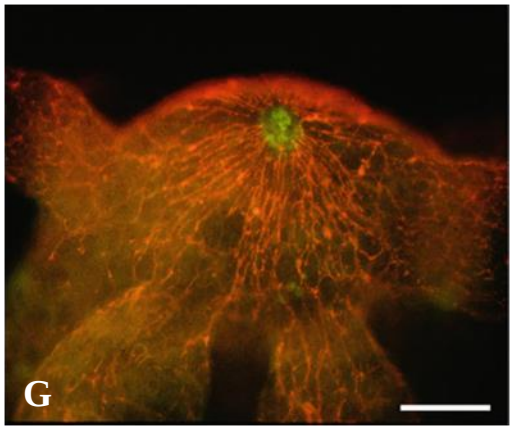

ždrijelo
S
C

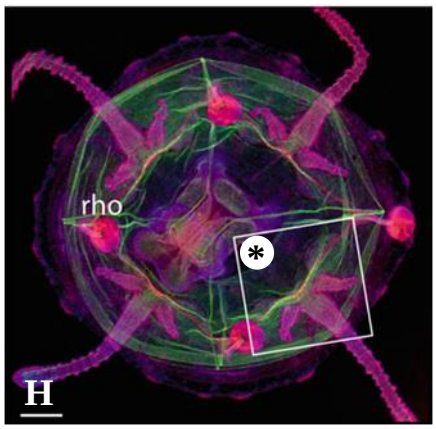

trepetljikavo područje
mezogleja
knida
mišići retraktori
epiderma
gamete (jaja)
mezenterijalni filament
transverzalni mišić
gastroderm
longitudinalni mišić
knido-žljezdano područje
prstenasti mišić kolumne
mezogleja
D

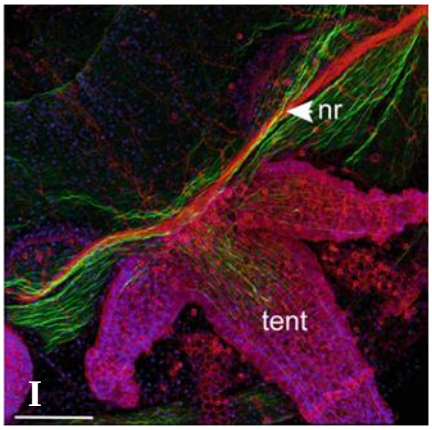

1
2
3
4
bc
end
ect
*
5
ect
at
end
pha
6
gc
end
ect
at
mes
pha
7
ten
gc
mes
pha

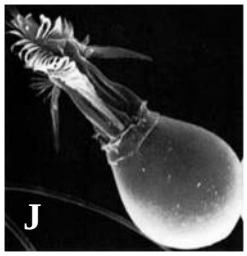

8
E


F

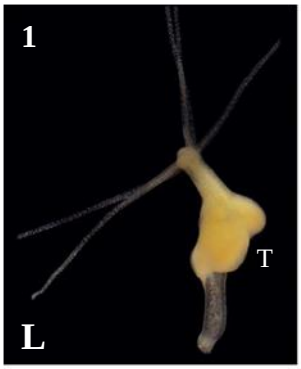

G

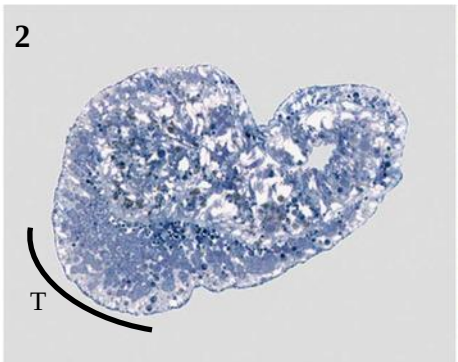

rho
*
H

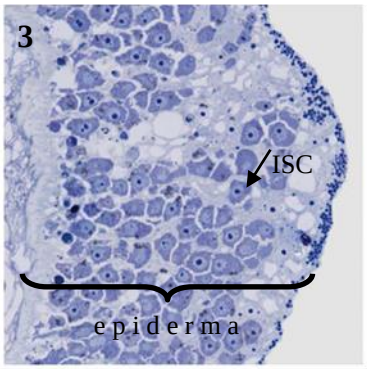

nr
tent
I


J


K


1
T
L


2
T


3
ISC
epiderma

Slika 7. Portret koljena Cnidaria

A – Koralj *Metridium senile* (Gerald and Buff Corsi © California Academy of Sciences); **B** – Sklerit iz polipa koralja *Muricea fruticosa* (preuzeto iz: BRUSCA & BRUSCA, 2003); **C** – Poprečni prerez koralja *Metridium* u razini ždrijela čiji je sifonoglif (S) naznačen. Valja primijetiti bilateralnu simetriju polipa određenu građom ždrijela (preuzeto sa: www.flickr.com). Uokvirena struktura je mezenterij (septa) čija je građa prikazana na slici D. Septe prvog reda spajaju se sa ždrijelom, a septe viših redova (kakva je uokvirena na mikrografu) završavaju slobodno mezenterijalnim (gastralnim) filamentima; **D** – Građa mezenterija koralja reda Actiniaria (iz podrazreda Hexacorallia) (prilagođeno prema: BRUSCA & BRUSCA, 2003). Mezenterij je orijentiran poput uokvirenog na slici C; **E** – Embrionalni i ličinački razvoj koralja *Nematostella vectensis*, što je vrsta žarnjaka koja se uz vrste roda *Hydra* danas najviše koristi kao modelni organizam (preuzeto iz: TECHNAU *et al.*, 2015): 1, početak brazdanja i nastanak prve brazde (strelica pokazuje animalni pol); 2, osmostanični embrij; 3, morula; 4, gastrula; 5, planula; 6, kasna planula u metamorfozi; 7, primarni polip; 8, odrasli polip. Kratice: ect,ektoderm; end, endoderm; bc, blastocel; pha, ždrijelo; at, apikalni čuperak trepetljika; mes, mezenterij; gc, gastrovaskularna šupljina; ten, lovka. Zvjezdica označava blastopor. Skala u (7) predstavlja 200 μm i vrijedi i za prethodne stadije, dok skala u (8) predstavlja 1 cm; **F** – Prerez planule koralja *Aiptasia mutabilis* s osjenčenim apikalnim organom (preuzeto iz: NIELSEN, 2012a); **G** – Živčani sustav hidre: RFamid-pozitivna živčana mreža lovki i hipostoma (narančasto) pruža se prema usnom otvoru označenom endodermalnim stanicama (zeleno) (preuzeto iz: TECHNAU *et al.*, 2015); **H** – Oralna strana mlade kubomeduze *Tripedalia cystophora* obojene faloidinom za F-aktin (zeleno), trioniziranim tubulinom za neurone (crveno) i bojom DAPI za jezgre (plavo), rho, ropalij. Uokvireno područje označeno zvjezdicom prikazano je uvećano na slici I (skala: 200 μm) (preuzeto iz: TECHNAU *et al.*, 2015); **I** – Brojni neuriti u velariju i živčani prsten (nr) koji povezuje sve ropalije s bazom tentakula (tent) (skala: 100 μm); **J** – Izbačena nematocista hidre (preuzeto iz: BRUSCA & BRUSCA, 2003); **K** – Potpuno izvrnuta nematocista koralja *Corynactis californica* (preuzeto iz: BRUSCA & BRUSCA, 2003); **L** – Tumorsko tkivo (T) hidre *H. oligactis* nastaje akumulacijom intersticijskih stanica (ISC) (prilagođeno prema: DOMAZET-LOŠO *et al.*, 2014): 1, morfologija polipa; 2, poprečni prerez polipa pokazuje oticanje ektodermalnog tkiva; 3, intersticijske stanice akumuliraju se u epidermi ektodermalnog podrijetla.

3.2. Filogenetski odnosi između četiri nebilaterijska koljena i Bilateria: Ctenophora i Porifera glavni su kandidati za mjesto najbazalnijeg koljena

Rasvjetljavanje filogenetskih odnosa između četiri nebilaterijska koljena (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria) i Bilateria od fundamentalnog je značenja za razumijevanje rane evolucije Metazoa i pojavu njihovih kompleksnih obilježja (PISANI *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2015). Ili drugim riječima, kao parafraza Dobzhanskog, tvrdnja „ništa u evoluciji nema smisla osim u svjetlu filogenije“ osobito vrijedi za nebilaterijski dio životinjskog filogenetičkog stabla (WÖRHEIDE *et al.*, 2012). Otkad su, od vremena HAECKELA (1872), spužve dobile svoje mjesto u svijetu Metazoa, povijesno su, u razmatranjima koja su ih izvodila iz zajedničkog pretka s ostalim životinjama, najčešće bile smatrane najbazalnijom skupinom na temelju usporedbi njihove morfologije s ostalim životinjama. Postojale su i ideje o neovisnom podrijetlu spužava u odnosu na ostale životinje (npr. HYMAN, 1940; HADŽI, 1963) koje su danas od povijesnog interesa. Slika holofiletskih spužvi dobro definiranih morfologijom, s hoanocitima koji iznimno nalikuju hoanoflagelatima (Sl. 12.) (sestrinskoj skupini Metazoa; vidi 4. poglavlje) u našem se stoljeću promijenila nalazima nekih molekularnih filogenija među kojima su se pojavile dvije iznenađujuće mogućnosti: (1) da su

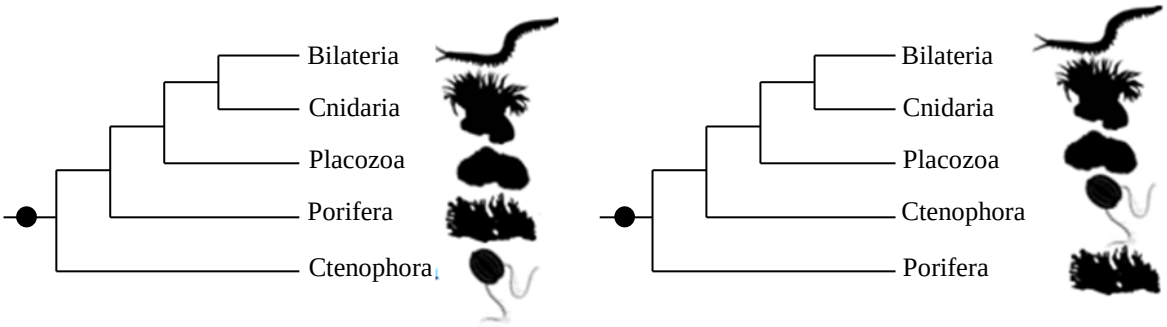
Porifera parafiletska, a ne holofiletska skupina; (2) da su Ctenophora, a ne Porifera, sestrinska skupina svih ostalih Metazoa.

Premda je holofilija četiriju ranije spomenutih skupina spužava (Demospongiae, Calcarea, Homoscleromorpha, Hexactinellida) dobro podržana (WÖRHEIDE *et al.*, 2012), manje je jedinstvenosti znanstvenika u posljednje vrijeme bilo oko pitanja holofilije/parafilije Porifera. Analizirajući molekularne analize koje su podržale parafiliju spužava, WÖRHEIDE *et al.* (2012) zaključuju kako je većina njih obilježena nedovoljnom statističkom podrškom i/ili neadekvatnim uzorkovanjem svojti i/ili metodološkim manama te favoriziraju holofiliju spužvi sa sestrinskim skupinama (Homoscleromopha + Calcarea) + (Hexactinellida + Demospongiae). Novije molekularne studije također potvrđuju holofiliju spužava (PISANI *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2015). Od spužava kao holofiletske skupine polaze i npr. DUNN *et al.* (2014) u preglednom radu o filogeniji Metazoa i JÉKELY *et al.* (2015) u filogenetskoj raspravi o živčanom sustavu. Spužve će se, stoga, u daljnjem tekstu uzimati kao holofiletsko koljeno.

Veći problem predstavlja mjesto najbazalnijeg koljena Metazoa, sestrinske skupine svih ostalih životinja. Filogenomska studija PHILIPPEA *et al.* (2009), koja je potvrdila holofiliju spužava, smješta ih na to mjesto, a istovremeno podržava i skupinu Coelenterata u kojoj sestrinske skupine čine Ctenophora i Cnidaria, što je zapravo ponovno rađanje jedne tradicionalne ideje (usporedi s konceptom HAECKELA, 1874 i HATSCHEKA, 1888 u Tablici 1.). PISANI *et al.* (2015) dobivaju Coelenterata, ali sa slabom podrškom. Budući da ova skupina općenito nije dobro podržana (TECHNAU *et al.*, 2015) i da nije definirana nikakvim sinapomorfijama (NIELSEN, 2012a), o njoj se neće dalje raspravljati. MOROZ *et al.* (2014) na temelju genoma rebraša *Pleurobrachia* i *Mnemiopsis* dobivaju Ctenophora kao najbazalnije koljeno, a WHELAN *et al.* (2015) navode kako *Porifera–prve* hipotezi nedostaje kritičke ocjene te njihova molekularna analiza robustno podržava Ctenophora kao najbazalnije koljeno. Nasuprot tomu, PISANI *et al.* (2015), analizirajući neke od setova podataka koji su iznjedrili Ctenophora kao najbazalnije koljeno (uključujući i one WHELANA *et al.*, 2015), dolaze do zaključka kako su ti nalazi artefakti koji potječu od uzimanja preudaljenih vanjskih skupina (*outgroups*) i neadekvatnih modela supstitucije te, otklanjajući ih, dobivaju potvrdu za Porifera kao najbazalnije koljeno. CANNON *et al.* (2016) dvama različitim modelima (najveće vjerodostojnosti/*maximum likelihood* i bajezijanskom zaključivanjem, inferencijom/ *Bayesian ineference*) dobili su Ctenophora, odnosno Porifera kao sestrinsku skupinu ostalih Metazoa. Iz navedenoga slijedi kako je pitanje jesu li Ctenophora ili Porifera posjednici tog položaja i dalje otvoreno (DEGNAN *et al.*, 2015). Budući da je „najtraženije mjesto“ u

filogenetskom stablu Metazoa i dalje „slobodno“, u ovom će se radu uzimati u obzir obje mogućnosti.

Sestrinski položaj Cnidaria + Bilateria redovito je dobro podržan (npr. PISANI *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2015; CANNON *et al.*, 2016) i uobičajeno prihvaćen u literaturi (npr. SCHMIDT-RHAESA, 2007; NIELSEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014; ADAMSKA, 2016a). Placozoa se često smještaju kao sestrinska skupina s (Cnidaria + Bilateria) (npr. rezultati u: PISANI *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2015; CANNON *et al.*, 2016). Iz navednoga se srodstveni odnosi između četiri nebilaterijska koljena i Bilateria mogu prikazati kao na Sl. 8. (usporedi sa Sl. 2. u JÉKELY *et al.*, 2015). Iako ove dvije mogućnosti nisu jedine u novije vrijeme predložene u literaturi, najstabilnije su i stoga će se na ovoj osnovi temeljiti daljnji tekst.



Slika 8. Dvije najstabilnije filogenije četiri nebilaterijska koljena i Bilateria

Ctenophora (rebraši) i Porifera (spužve) mogući su posjednici položaja sestrinske skupine ostalih recentnih Metazoa, što se u ovom radu navodi kao *Ctenophora–prvi*, odnosno *Porifera–prve*. Kako su ove filogenije dobivene, opisano je u tekstu. Siluete životinja preuzete su s www.phyopic.org.

3.3. Filogenija Bilateria: stabilnost osnovnih odnosa

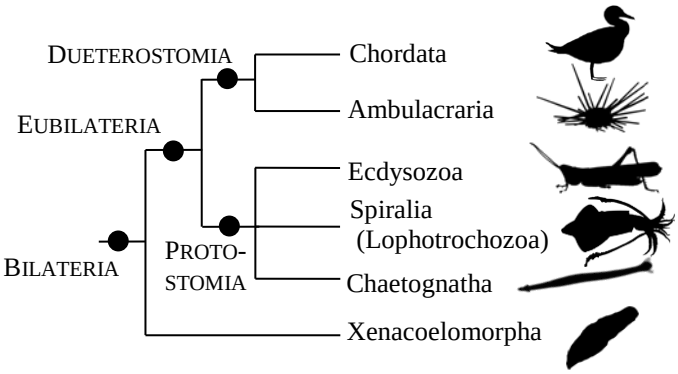
Holofiletsku skupinu koja uključuje sve bilateralno simetrične organizme prvi je definirao HAECKEL (1872) (potomci grane Prothelmis na Sl. 1C; vidi 1. poglavlje i Tablicu 1.). Premda i MINELLI (2009; Tablica 4.1.) i NIELSEN (2012a, str. 62.) pripisuju HATSCHEKU (1888) ustanovljenje skupine Bilateria, upravo ju je Haeckel kao takvu prvi zamislio i tim imenom formalno nazvao (HAECKEL, 1874) (u tekstu, ne i na stablu prikazanom na Sl. 1C). Haeckelove skupine Coelenterata (vidi Tablicu 1.; kasnije će Coelenterata, nazvani Radiata, obuhvaćati samo žarnjake i rebraše, npr. u HYMAN, 1940) i Bilateria preuzeo je HATSCHEK (1888) podijelivši Bilateria u tri evolucijske grane, Zygoneura, Ambulacralia i Chordonii (Tablica 1.). Grobben je 1908. Zygoneura nazvao Protostomia, a druge dvije skupine objedinio kao Duterostomia (Tablica 1.). Od tada, pojmovi Protostomia i Duterostomia nikad nisu izašli iz uporabe. Danas se Protostomia i Deuterostomia neupitno smatraju sestrinskim

skupinama (npr. SCHIMDT-RHAESA, 2007; MINELLI, 2009; NIELSEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014), što se uvijek dobiva u molekularnim filogenijama. Mnogi su radovi na području molekularne filogenije nazvali bifurkaciju Protostomia/Deuterostomia „novom filogenijom životinja" kao kontrast „tradicionalnoj filogeniji utemeljenoj na morfologiji" uzimajući kao primjer posljednje kategorije koncept „Acoelomata – Pseudocoelomata – Coelomata" (NIELSEN, 2010). Nasuprot tomu, očito je kako razlikovanje tih dviju grana potječe s početka 20. stoljeća, dok su Protostomia pod drugim imenom zamišljeni još u 19. stoljeću, i to upravo metodologijom „tradicionalne filogenije utemeljene na morfologiji". S druge strane, koncept „Acoelomata → Pseudocoelomata → Coelomata", kao evolucijski slijed životinja bez tjelesnih šupljina, s pseudocelomom i s celomom pogrešan je, a nastao je kao pogrešna interpretacija HYMANOVE (1940) (SCHMIDT-RAHESA, 2007; NIELSEN, 2010b) (Tablica 1.). HYMAN (1940) je, naime, u prvom svesku svoje utjecajne serije *Invertebrates* uvela navedena imena kao stupnjeve građe, više praktične kategorije, no na njezinu originalnom filogenetskom stablu (Sl. 5. u HYMAN, 1940) ti se pojmovi ne pojavljuju, ali se zato pojavljuju Protostomia i Deuterostomia.

Hatschekov koncept Ambulacralia + Chordonii preživio je, kao i Grobbenov Protostomia + Deuterostomia, eru molekularne filogenije, u kojoj su stabilnost očuvale i skupine Lophotrochozoa (HALANYCH *et al.*, 1995) (= Spiralia) i Ecdysozoa (AGUINALDO *et al.*, 1997) tako da je danas filogenija Protostomia (= Spiralia/Lophotrochozoa + Ecdysozoa) + Deuterostomia (= Ambulacraria + Chordata) stabilna (npr. NIELSEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014) (Tablica 1.).

Jedno od ključnih pitanja filogenije Metazoa jest i položaj skupine Xenacoelomorpha (DUNN *et al.*, 2014). Riječ je o skupini koja u nekim novijim molekularnim analizama obuhvaća Acoela (nekoć smatrane virnjacima), Nemertodermatida i životinju *Xenoturbella* (pet vrsta; ROUSE *et al.*, 2016) od kojih su većina morske životinje koje žive u intersticiju (HEJNOL, 2015). Živčani sustav im je u obliku baziepidermalne živčane mreže. *Xenoturbella* i Nemertodermatida imaju epitelni probavni sustav, a u Acoela je to sincitij bez šupljine. Filogenomske studije stavljaju ih ili kao sestrinsku skupinu ostalih Bilateria ili unutar Deuterostomia (HEJNOL, 2015). Rezultati CANNONA *et al.* (2016), s pažnjom u vezi mogućih artefakata, snažno podržavaju Xenacoelomorpha kao sestrinsku skupinu preostalih Bilateria, Nephrozoa. NIELSEN (2012a) Xeanacoelomorpha naziva Acoelomorpha te im daje isto mjesto u filogeniji, a Nephrozoa naziva Eubilateria. Iz navedenog proizlazi opća filogenija Bilateria kao na Sl. 9. (vidi Tablicu 2. za apomorfije pojedinih skupina prema NIELSENU, 2012a, 2015b te DUNNU *et al.*, 2014). Koljeno Chaetognatha, koje se zbog sudbine blastopora ranije

smatralo pripadnikom Deuterostomia (vidi 6. poglavlje), danas ima stabilno mjesto u Protostomia (npr. NIELSEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014 koji Chaetognatha smještaju u trihotomiju sa Spiralia i Ecdysozoa jer je točno određivanje odnosa triju skupina problematično) (Sl. 9.).

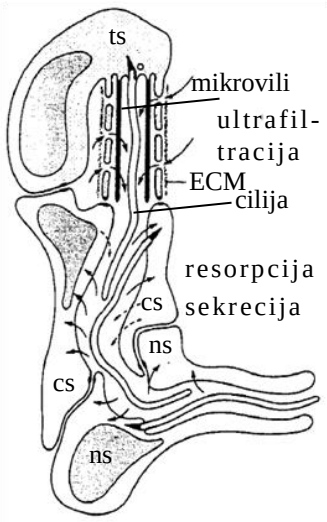


Slika 9. Stabilna filogenija osnovnih odnosa Bilateria

Xenacoelomorpha i Eubilateria (Nephrozoa *sensu* JONDELIUS *et al.*, 2002) sestrinske su skupine Bilateria. Protostomia i Deuterostomia sestrinske su skupine Eubilateria. Protostomia čine Spiralia (Lophotrochozoa), Ecdysozoa i Chaetognatha čiji međuodnos nije stabilno razlučen pa je ovdje predočen trihotomijom (vidi tekst). Ambulacraria i Chordata sestrinske su skupine Deuterostomia. Za povijesnu perspektivu, vidi Tablicu 1. Siluete životinja preuzete su s www.phylopic.org.

Pojedinosti filogenetskih odnosa unutar pojedinih većih skupina Bilateria prikazanih na Sl. 9. i imenovanih u Tablici 2. nadilaze okvir ovoga rada. Valja, ipak, uočiti još nekoliko fenomena. Cuvier je jedan od svojih četiriju *tipova građe* nazvao Articulata i u njih uključio segmentirana koljena Annelida (kolutićavce) i Arthropoda (člankonošce) (Tablica 1.). Povijesno su Annelida i Arthropoda dugo smatrani filogenetski bliskim skupinama te je i nakon predložene skupine Ecdysozoa krajem 20. st., kojom su Annelida odvojeni od Arthropoda (koji pripadaju Ecdysozoa), postojala dilema „Ecdysozoa ili Articulata?“ SCHMIDT-RHAESA (2007) tako nalazi konačno opredjeljenje za jednu ili drugu opciju preuranjenim. No, kako smo vidjeli, osnovna filogenija Bilateria, kako je prikazana na Sl. 9., doživjela je stabilnost te su Annelida (Spiralia) i Panarthropoda (Ecdysozoa) jasno evolucijski odvojeni. Proizlazi zaključak kako Articulata koncept više nije aktualan i kako se segmentiranost u ovih dviju skupina, jedinih koje pokazuju *pravu* segmentiranost, javila odvojeno (DUNN *et al.*, 2014). DUNN *et al.* (2014) navode mezoderm kao apomorfiju Bilateria, no njegovi derivati, kao što su celom i vaskulatura (krvožilni sustav) javili su se nekoliko puta neovisno u evoluciji Bilateria (SCHMIDT-RHAESA, 2007; DUNN *et al.*, 2014). Što se ekskrecijskih organa tiče, BARTOLOMAEUS & AX (1992) predložili su kako su se protonefridiji javili u osnovnih Bilateria, dok su se metanefridiji morali javiti više puta u evoluciji Bilateria. Inače, metanefridiji su uvijek vezani uz celom, koji se pojavio nekoliko puta u evoluciji Eubilateria (SCHMIDT-RHAESA, 2007). BARTOLOMAEUS & AX (1992) predlažu kako su se protonefridiji pojavili jednom kao jedan par organa ektodermalnog podrijetla s tri stanice koje

su sve monocilijatne. Ultrafiltracija odvija se u terminalnoj stanici kroz ECM koji dolazi na šupljem, prorezanom cilindru s osam mikrovila (Sl. 10.). U vrijeme publikacije BARTOLOMAEUSA & AXA (1992), koljeno Phoronida, čija ličinka ima protonefridije, ubrajalo se u Deuterostomia. Budući da je danas jasno da se nalazi unutar Protostomia (NIELSEN, 2012a; DUNN *et al.*, 2014), ne postoje Deuterostomia s protonefridijima pa ih NIELSEN (2015b) i označava kao apomorfiju Protostomia, a ne (Eu)Bilateria (Tablica 2.). Osim toga, vjerojatna sestrinska skupina Eubilateria, Xenacoelomorpha, nema nefridija (JONDELIUS *et al.*, 2002). Na Sl. 9. favorizirano je ime Eubilateria (a ne Nephrozoa JONDELIUSA *et al.*, 2002 koji im pripisuju apomorfno protonefridije) jer je parsimoničnije rješenje da su protonefridiji apomorfija Protostomia.



Slika 10. Funkcionalna morfologija ishodišnog oblika protonefridija.

Ultrafiltracija se odvija pri prolazu tekućine kroz ekstracelularni matriks (ECM) koji prekriva pukotine u cilindru terminalne stanice (ts). Krug od 8 mikrovila održava lumen stalnim što omogućava neometano pokretanje cilije. Cjevasta (cs) i nefridioporna (ns) stanica modificiraju ultrafiltrat procesima sekrecije (isprekidane strelice) i resorpcije (pune strelice). Nefridioporna stanica u sastavu je epiderme. Prilagođeno prema BARTOLOMAEUS & AX (1992).

Tablica 2. Apomorfije skupina označenih na Sl. 9. prema NIELSENU (2012a, 2015b) i DUNNU *et al.* (2014).

Neke od Nielsenovih apomorfija u kontekstu su njegove troheja teorije (vidi 6. poglavlje).

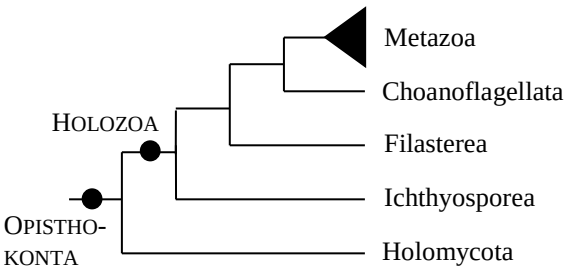
SKUPINA	NIELSEN (2015b)	DUNN *et al.* (2014)
BILATERIA	bilateralna simetrija (NIELSEN, 2012a)	mezoderm, bilateralna simetrija, cefalizacija, cirkularna i longitudinalna muskulatura
EUBILATERIA / *NEPHROZOA (*JONDELIUS *et al.*, 2002)	Eubilateria: probavilo u obliku cijevi, prugaste mišićne stanice, dugi kolinerni Hox klaster (NIELSEN, 2012a)	Nephrozoa: izdvojeni ekskretorni organi tipa nefridija. *Parsimoničnije je uzeti protonefridije kao apomorfiju Protostomia (vidi tekst).*
PROTOSTOMIA	protonefridiji, D-kvadrantno brazdanje, zametne stanice od D-kvadranta	glavni živčani snopovi lokalizirani ventralno
SPIRALIA	spiralno brazdanje, Hox-*potpis* Spiralia (NIELSEN, 2012a)	spiralno brazdanje
ECDYSOZOA	gubitak cilijatnog epitela i primarnih ličinki, presvlačenje (ekdizis), Hox-*potpis* Ecdysozoa (NIELSEN, 2012a)	presvlačenje kutikule, troslojna kutikula
DEUTEROSTOMIA	cilijatne škržne pukotine; endostil; arhimerija (dijelovi tijela s celomskim vrećicama): prosoma s protocelom, mezosoma s mezocelom i metasoma s metacelom; Hox geni 6 – 7	enterocelni postanak celoma, ždrijelo s cilijatnim škržnim pukotinama, arhimerija

AMBULACRARIA	planktotrofne ličinke tornarije s cilijarnim prugama s monocilijatnim stanicama, ekskretorni aksijalni kompleks, Hox geni 9/11, 11/13abc	dipleurula ličinka
CHORDATA	direktni razvoj, kompleks chorda (svitak) + neuralna cijev; segmentirana tjelesna muskulatura, Hox geni 9–13	notochord (svitak)

4. Evolucija prema mnogostaničnosti

> „Jedino razumijevajući njih [jednostanične srodnike Metazoa] bit ćemo sposobni dodatno rasvijetliti i shvatiti kako se razvila mnogostaničnost životinja.“
> (RUIZ-TRILLO, 2016)

Revizijom ranije taksonomije eukariota (ADL *et al.*, 2005), ADL *et al.* (2012) definirali su pet velikih holofiletskih klastera eukariota: Amoebozoa, Opisthokonta, Excavata, Sar i Archaeplastida. U svih se, osim Excavata, mogu naći mnogostanični predstavnici (SHARPE *et al.*, 2015). Mnogostaničnost se u eukariota pojavila više puta neovisno, u skupina poput miksomiceta („gljiva“ sluznjača), algi parožina (i njihovih potomaka, kopnenih biljaka), crvenih, zelenih i smeđih algi, gljiva (Fungi), Metazoa i drugih (SHARPE *et al.*, 2015; VALENTINE & MARSHALL, 2015; RUIZ-TRILLO, 2016). Cijanobakterije su jedna od rijetkih skupina prokariota u kojih se pojavila mnogostaničnost (SHIRRMESITER *et al.*, 2011). Interes za mnogostaničnost životinja usmjerit će nas u klaster Ophistokonta, definiran apomorfno jednom posteriornom cilijom (ADL *et al.*, 2012) (u životinja: bič spermija), kojima pripadaju dobro poznate skupine Fungi i Metazoa. U ovom će poglavlju od interesa biti Choanoflagellata, Filasterea i Ichthyosporea, najbliži jednostanični srodnici Metazoa, koji s njima zajedno čine holofiletsku skupinu Holozoa (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015; RUIZ-TRILLO, 2016) (Sl. 11.).



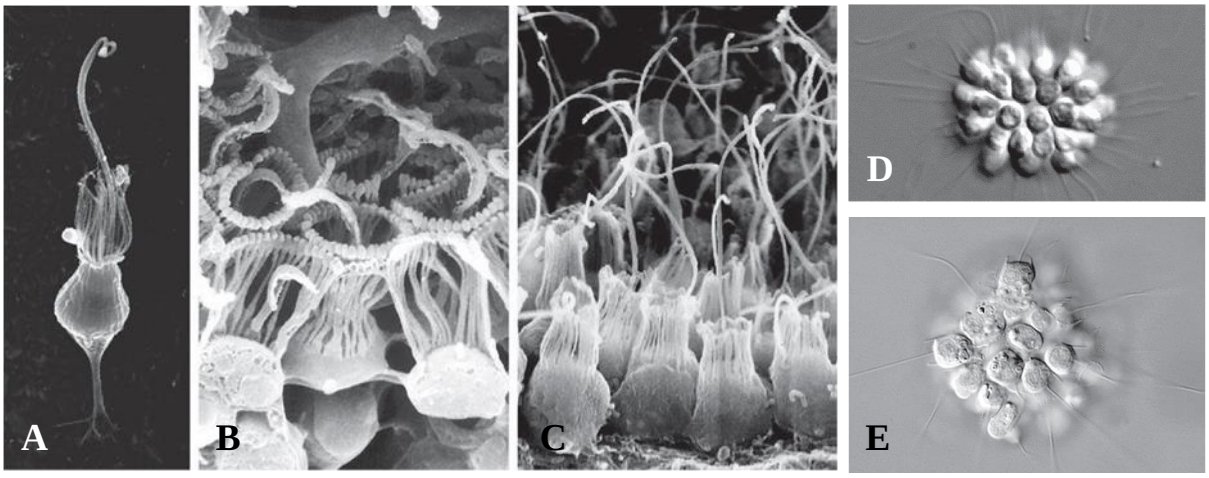
Slika 11. Holozoa su holofiletska skupina unutar holofiletskog klastera Opisthokonta.

Opisthokonta su podijeljeni u Holozoa i Holomycota. Filogenija Holomycota, koji uključuju gljive (Fungi) i njihove srodnike, ovdje nije naznačena. Skupini Holozoa pripadaju Metazoa i njihovi jednostanični srodnici: Choanoflagellata (sestrinska skupina Metazoa), Filasterea i Ichthyosporea. Ove tri skupine Holozoa važne su za razumijevanje podrijetla mnogostaničnosti u evoluciji Metazoa. Precrtano i prilagođeno prema: RUIZ-TRILLO (2016).

4.1. Choanoflagellata su sestrinska skupina Metazoa

Choanoflagellata su sestrinska skupina Metazoa (npr. MIKHAILOV *et al.*, 2009; MINELLI, 2009; NIELSEN, 2012a, FAIRCLOUGH, 2015; SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015; VALENTINE & MARSHALL, 2015). Poveznicu između hoanoflagelata i životinja, na temelju usporedbe njihove morfologije s hoanocitima spužvi, prvi je učio H. James-Clarck 1866. (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015). Hoanoflagelati su heterotrofni organizmi pelagičke i bentičke zone mora, slatkih i bočatih voda. Dijele se u dvije skupine, Craspedida, koja sadrži sve poznate

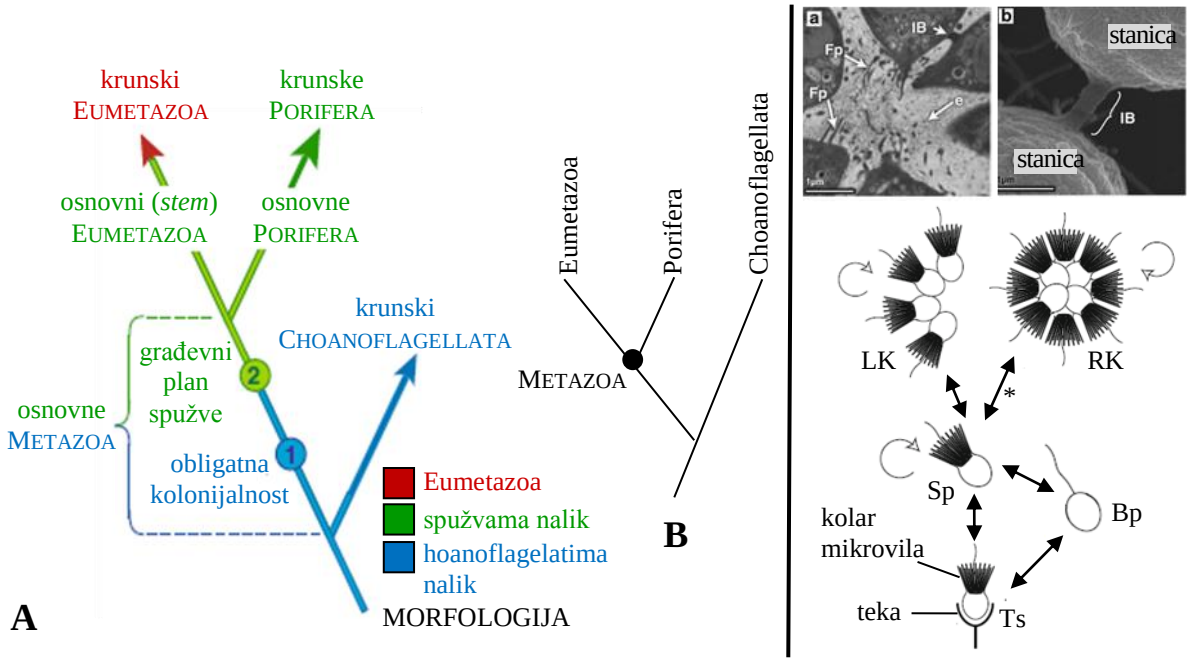
kolonijalne vrste, i Acanthoecida, koji imaju loriku. Ovodino ili sferično tijelo stanice i jedna apikalna cilija okružena kolarom od 30–40 mikrovila obilježavaju njihovu morfologiju (FAIRCLOUGH, 2015), čime iznimno nalikuju hoanocitima spužava (MALDONADO, 2004; NIELSEN, 2008) (Sl. 12.). MAH *et al.* (2014) uspoređujući hoanoflagelata *Monosiga brevicollis* i hoanocite spužve *Spongilla lacustris* (i sami svjesni da rezultati ne mogu biti indikativni za cijele skupine), nalaze, uz značajne morfološke sličnosti, i neke razlike, ali i razlike u filtratorskoj aktivnosti, zbog čega ističu da homologiju između njih, iako je moguća, ne treba uzimati zdravo za gotovo. Homologija se uobičajeno razmatra u kontekstu *Porifera–prve* ideje, koja je do nedavno bila i jedina dobro podržana (sada su ozbiljan kandidat za najbazalnije koljeno i Ctenophora, kako je objašnjeno u 3. poglavlju). Tvrdnja da od dviju skupina, hoanoflagelata i spužvi, nijedna nije potekla od druge jer su obje holofiletske (MAH *et al.*, 2014) odnosi se na krunske skupine Choanoflagellata i Porifera, no to ne znači da se da se osnovni Metazoa (građevnog plana spužve) (i krunski Choanoflagellata) nisu mogli odvojiti od oblika hoanoflagelatne morfologije (vidi Sl. 13.) Prvi osnovni Metazoa, u kontekstu *Porifera–prve*, nisu bili ni spužve ni mnogostanični (VALENTINE & MARSHALL, 2015) (Sl. 13.). Evolucijski scenariji koji objašnjavaju prijelaz od hoanoflagelatnih oblika do spužava predstavljeni su u 5. poglavlju. *Porifera–prve* implicira gubitak hoanocita u Eumetazoa, a *Ctenophora–prvi* njihov gubitak u Ctenophora i zajedničkog pretka (Placozoa + Cnidaria + Bilateria) (HALANYCH, 2015).



Slika 12. Hoanoflagelati i hoanociti spužava pokazuju iznimnu morfološku sličnost.

Hoanoflagelati i hoanociti imaju po jednu ciliju okruženu kolarem mikrovila. **A** – solitarni hoanoflagelat *Salpingoeca* sp.; **B** – Hoanocitna komorica spužve *Callyspongia diffusa* (Demospongiae); **C** – Hoanocitna komorica spužve *Sycon* sp. (Calcarea). A – C (SEM) preuzeto iz: NIELSEN (2012a). **D** – rozeta kolonija hoanoflagelata *S. rosetta*; **E** – izolirani živi hoanociti spužve *Sycon ciliatum* (Calcarea). D – E preuzeto iz: ADAMSKA (2016a).

Najbolje proučena vrsta koja stvara kolonije, *Salpingoeca rosetta*, u životnom ciklusu ima barem pet morfološki i po ponašanju različitih stanica; tri solitarna stanična tipa i dvije vrste kolonija u kojima su stanice međusobno povezane citoplazmatskim mostovima i ECM-om (Sl. 14.). Kolonije u nje nastaju staničnim diobama, a ne agregacijom stanica (FAIRCLOUGH, 2015).



Slika 13. (lijevo). Morfološke promjene vode prema postanku Metazoa.

A – Morfologije (u bojama) i morfološke promjene u filogeniji oslikavaju podrijetlo Metazoa. Linija s morfologijom nalik hoanoflagelatima (plavo) dijeli se i daje krunske hoanoflagelate i osnovne (*stem*) Metazoa. Na liniji osnovnih Metazoa javlja se obligatna kolonijalnost (1), preduvjet da bi se kasnije uspostavio građevni plan spužve u mnogostaničnom organizmu (2). Od osnovnih Metazoa građevnog plana spužve odvajaju se osnovne Porifera i osnovni Eumetazoa. Osnovne Porifera daju krunske Porifera, a osnovni Eumetazoa krunske Eumetazoa kojima pripadaju sve recentne životinje osim spužvi. Osnovni Metazoa obojeni plavo biološki su (funkcionalno) bili hoanoflagelati. Osnovne Metazoa bile su, dakle, građevnog plana spužve. Kad bi spužve bile parafiletske, više od jedne grane vodilo bi do živućih spužvi. Ovaj koncept polazi od Porifera kao sestrinske skupine svih ostalih Metazoa. **B** – Kladogram prikazuje srodstvene odnose između recentnih hoanoflagelata, spužvi i Eumetazoa (*Porifera–prve* hipoteza). Mogući evolucijski scenarij prikazan na slici A i hoanoflagelatna narav prvih osnovnih Metazoa na njemu se ne mogu jasno pojmiti. Prilagođeno prema: VALENTINE & MARSHALL (2015).

Slika 14. (desno). Tipovi stanica i kolonija u hoanoflagelata *Salpingoeca rosetta*

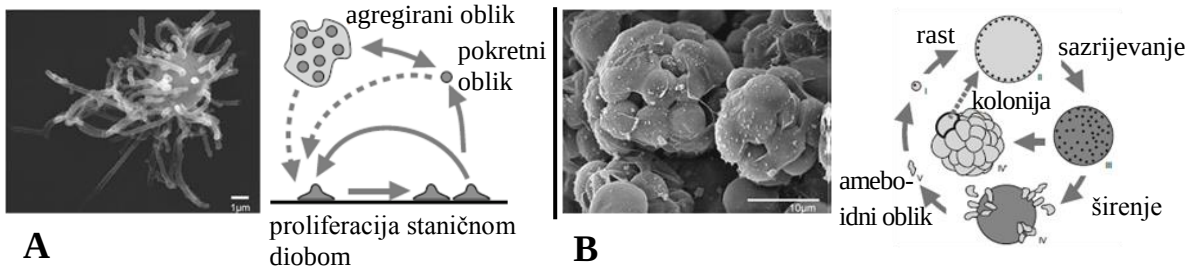
Dolje – Tekatne stanice pričvršćene za supstrat (Ts) mogu dati solitarne plivajuće (Sp) ili brzoplivajuće (Bp) stanice, staničnom diobom ili napuštanjem teke. Solitarne plivajuće stanice mogu se dijeliti potpuno i producirati stanice kćeri ili ostati zajedno nakon nepotpune citokineze producirajući lančaste kolonije (LK) ili kolonije u obliku rozete (RK). Za ovo posljednje potrebna je bakterija *Algoriphagus machipongonensis* (*). **Gore** – Međustanično povezivanje u rozeta kolonijama. **(a)** tanki prrez kroz rozetu prikazuje filopodije (Fp) koji se protežu u zajednički ECM (e) i međustanični most (IB) koji povezuje susjedne stanice (TEM). **(b)** SEM međustaničnog mosta (IB). Prilagođeno prema: FAIRCLOUGH (2015).

4.2. Filasterea i Ichthyospoera srodnici su Metazoa

Nakon hoanoflagelata, sestrinske skupine Metazoa, skupine Filasterea i Ichthyosporea najbliži su jednostanični srodnici Metazoa (Sl. 11.) (RUIZ-TRILLO, 2016).

Opisane su dvije vrste Filasterea, *Capsaspora owczarzaki* i *Ministeria vibrans* (RUIZ-TRILLO, 2016). U laboratoriju je proučen životni ciklus *C. owczarzaki*, endosimbionta jedne vrste slatkovodnog puža. On uključuje agregirani oblik u kojem se stanice aktivno okupljaju i formiraju mnogostaničnu (koloniji nalik) strukturu (Sl. 15A), što je prvi primjer agregacijskog mnogostaničnog ponašanja opisan u jednostaničnih srodnika Metazoa (RUIZ-TRILLO, 2016).

Ichthyosporea obuhvaćaju desetine opisanih vrsta od kojih su mnoge životinjski paraziti (RUIZ-TRILLO, 2016). Biologija dviju vrsta, *Creolimax fragrantissima* i *Sphaeroforma arctica*, proučena je u kulturi *in vivo*. Životni ciklus *C. fragrantissima* uključuje faze rasta, sazrijevanja, širenja i ameboidni oblik (Sl. 15B). U fazi rasta nekoliko ciklusa diobe jezgre bez diobe stanice dovodi do stvaranja sincicija čijom se celularizacijom mogu osloboditi ameboidni oblici ili nastati kolonija koja na prvi pogled podsjeća na životinjsku morulu (Sl. 15B) (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015).



Slika 15. Filasterea i Ichthyosporea

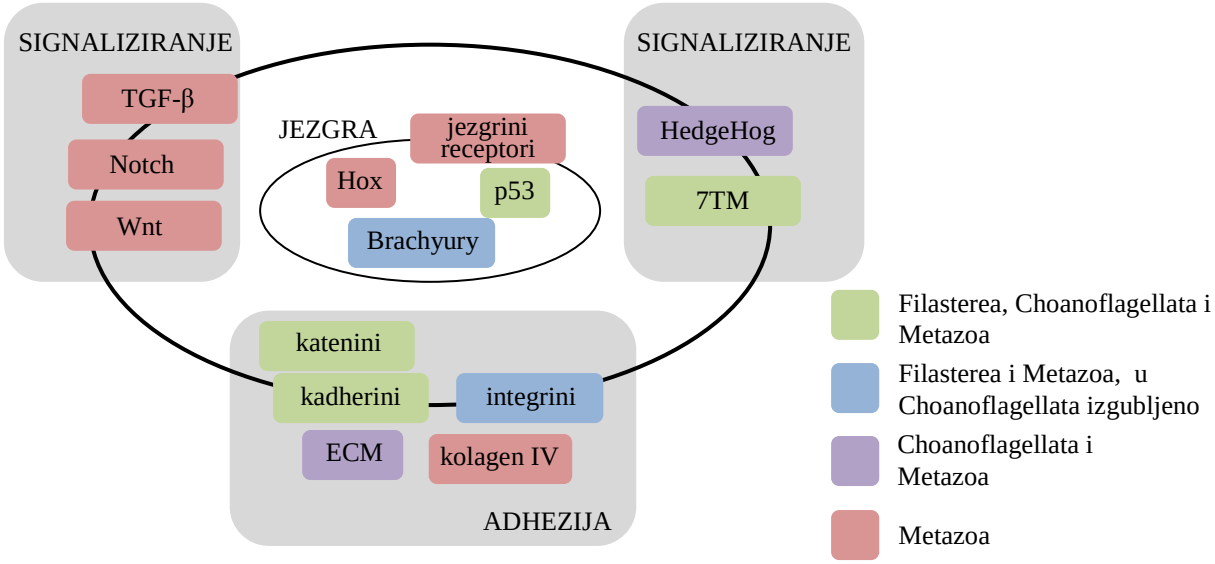
A – Filasterea: *Capsaspora owczarzaki*. Lijevo: SEM; desno: shematski prikaz životnog ciklusa. Koloniji nalik tvorba nastaje agreagcijom stanica. **B** – Ichthyosporea: *Creolimax fragrantissima*. Lijevo: SEM kolonijalnog stadija; desno: shematski prikaz životnog ciklusa. Kolonija nastaje celularizacijom sincitija. Prilagođeno prema: SUGA & RUIZ-TRILLO (2015).

4.3. Kako nam jednostanični srodnici Metazoa pomažu u rasvjetljavanju podrijetla njihove mnogostaničnosti?

Sve se ideje (teorije) o postanku mnogostaničnosti Metazoa mogu povezati s tri osnovna načina ostvarivanja mnogostanične strukture: nepotpunom staničnom diobom, agregacijom prethodno nezavisnih stanica i celularizacijom sincicija (WILLMER, 1990). Od ovdje ukratko portretiranih jednostaničnih srodnika Metazoa, hoanoflagelat *Salpingoeca* formira kolonije nepotpunom staničnom diobom, *Capsaspora* (Filasterea) agregacijom stanica, a *Creolimax* (Ichthyosporea) celularizacijom sincicija. Druga od spomenutih triju mogućnosti manje je

vjerojatna jer implicira za Metazoa nekarakterističnu gensku heterogenost stanica (WILLMER, 1990; MIKHAILOV *et al.*, 2009; SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015). Činjenica da hoanoflagelati mogu stvarati kolonije staničnim diobama na razvojno kontrolirani način podcrtava njihovu relevantnost za razumijevanje podrijetla mnogostaničnosti, dok činjenica da su bakterije potrebne za formiranje rozeta-kolonija u *S. rosetta* (Sl. 14.) ukazuje da je u tom procesu bakterijski okoliš mogao igrati važnu ulogu (FAIRCLOUGH, 2015). S druge strane, jedini način postanka kolonije u vrste *Creolimax*, celularizacija sincicija, ukazuje da bi se i taj mehanizam trebao smatrati mogućim načinom postanka životinjske mnogostaničnosti (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015).

Istraživanja genoma Choanoflagellata, Filasterea i Ichthyosporea u posljednje vrijeme pokazalo je da njihovi predstavnici posjeduju gene za koje se ranije smatralo da su prisutni isključivo u Metazoa (FAIRCLOUGH, 2015; SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015; RUIZ-TRILLO, 2016). Najprije su počela istraživanja u hoanoflagelata, sestrinske skupine Metazoa, a istraživanje genoma *C. owczarzaki* (Filasterea) pokazalo se važnim jer su pronađeni geni za koje se smatralo da su specifični za Metazoa, a nisu nađeni u hoanoflagelata u kojih su, dakle, sekundarno izgubljeni (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015). Repertoar gena koji Metazoa dijele sa svojim jednostaničnim srodnicima obuhvaća gene uključene u staničnu adheziju, staničnu signalizaciju i regulaciju transkripcije (gene za transkripcijske faktore) (Sl. 16.) (RUIZ-TRILLO, 2016). Za što su točno ti geni u jednostaničnih srodnika Metazoa odgovorni često (još) nije jasno, no takav karakter njihova genskog repertoara ukazuje da postanak Metazoa nije trebao biti popraćen osobitim genskim inovacijama. Novi podaci ukazuju da su, uz gensku inovaciju, ova četiri procesa bila važna u postanku Metazoa: miješanje eksona (*exon shuffling*), duplikacija gena, kooptacija predačkih gena i usložnjavanje genske regulacije (RUIZ-TRILLO, 2016).



Slika 16. Shematski prikaz stanice pretpostavljenog jednostaničnog pretka Metazoa

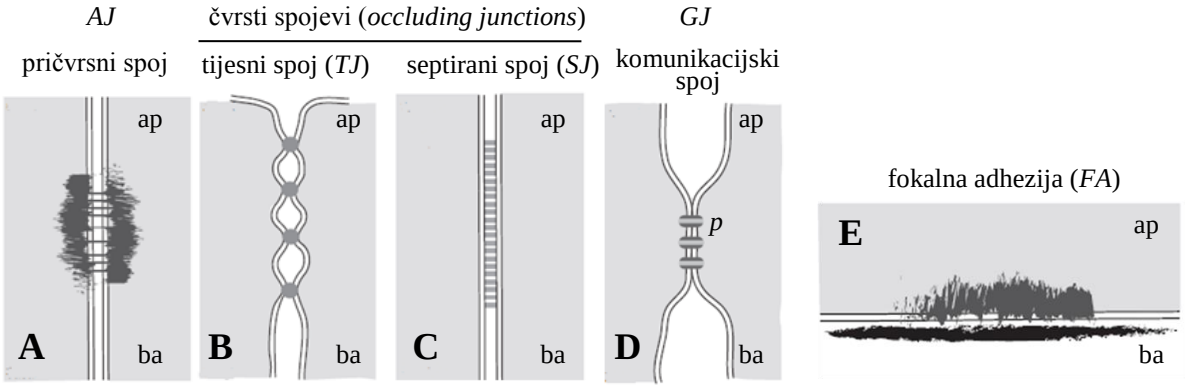
Naznačeni su genski repertoar ili putovi za staničnu adheziju, stanično signaliziranje i regulaciju transkripcije. Legenda prikazuje distribuciju pojedinih gena/signalnih putova prisutnih u zajedničkog pretka Filasterea, Choanoflagellata i Metazoa (zeleno; plavo je označeno što je sekundarno izgubljeno u Choanoflagellata); zajedničkog pretka Choanoflagellata i Metazoa (ljubičasto) i onih koji su trenutno poznati isključivo u Metazoa (crveno). Ova distribucija dobivena je na temelju usporedbe genoma predstavnika Metazoa s genomom hoanoflagelata *Salpingoeca rosetta* i *Monosiga brevicollis* te genomom *Capsaspora owczarzaki* (Filasterea). Očito je kako jednostanični srodnici Metazoa imaju genski repertoar čije su se mnoge sastavnice donedavno smatrale specifičnima samo za Metazoa. TGF-β, Notch, Wnt i HedgeHog stanični su signalni putovi; 7TM: G-protein vezujući receptori koji sedam puta prolaze citoplazmatskom membranom; p53 – tumor protein 53 (tumor supresor); Brachyury – transkripcijski faktor; Hox – Hox geni. Precrtano i pojednostavljeno (smanjen izbor gena/putova) prema: RUIZ-TRILLO (2016).

4.4. Epitel – evolucijska inovacija Metazoa

Mnogostaničnost je najočitija apomorfija Metazoa (NIELSEN, 2012a). Kako je prikazano na Sl. 13., prve, osnovne Metazoa nisu bile mnogostanične (VALENTINE & MARSHALL, 2015). Formiranje epitela koji ograđuje i kontrolira unutarnji *milieu* bio bi prvi događaj koji razlikuje individualnu životinju od kolonije (LEYS & RIESGO, 2012). Ili, drugim riječima: „rana evolucija Metazoa u osnovi je evolucija mogućnosti stanica da se organiziraju u epitel“ (MAGIE & MARTINDALE, 2008).

Formiranje epitela omogućeno je postojanjem (među)staničnih spojeva (*cell junctions*). Mogu se razlikovati četiri skupine: pričvrsni spojevi (*adherens junctions*, AJs), čvrsti spojevi (*occluding juntions*), komunikacijski spojevi (*gap junctions*, GJs) i fokalne adhezije (*focal adhesions*, FAs) (Sl. 17.) (MAGIE AND MARTINDALE, 2008). Pričvrsni spojevi (AJs) definirani su prisustvom kadherina, glikoproteina ovisnih o kalciju koji posreduju u stanica–stanica interakciji vezujući se za molekulu kadherina na susjednoj stanici. Kadherini se vezuju za citoskelet putem proteina iz porodice katenina. Čvrsti spojevi obuhvaćaju septirane (SJs) i tijesne (TJs) spojeve (Sl. 17.) i ograničavaju paracelularnu difuziju molekula kroz epitel. Komunikacijski spojevi (GJs) odlikuju se blisko pridruženim membranama s kanalima koji sadrže proteine iz porodica koneksina i paneksina. Fokalne adhezije (FAs) omogućuju interakciju između ECM-a i stanice, a definirane su transmembranskim proteinima iz porodice integrina (MAGIE & MARTINDALE, 2008). Budući da spužve posjeduju pričvrsne i septirane spojeve (Sl. 5D–G) koji omogućuju adheziju, odnosno ograničavaju paracelularnu difuziju kroz epitel, imaju „pravi“ epitel koji nije obilježje samo preostalih Metazoa, nego evolucijska inovacija Metazoa (LEYS & RIESGO, 2011). Valja primijetiti kako su spomenute molekule važne u (među)staničnim spojevima, kadherini, katenini i integrini bili prisutni već u zajedničkog pretka Filasterea, Choanoflagellata i Metazoa (Sl. 16.).

Regulacija adhezije stanica po njezinu uspostavljanju od najveće je važnosti za korištenje adhezije u morfogenezi. Rasklapanje apikalnih spojeva između stanica važno je za proces EMT (tranzicija epitel → mezenhim), odnosno napuštanje epitela i odlazak stanica u mezenhim. Primjer važnosti ovog procesa, među ostalima, jest gastrulacija ingresijom pri kojoj stanice napuštaju epitel blastule i migriraju u embrij kao individue (MAGIE AND MARTINDALE, 2008).



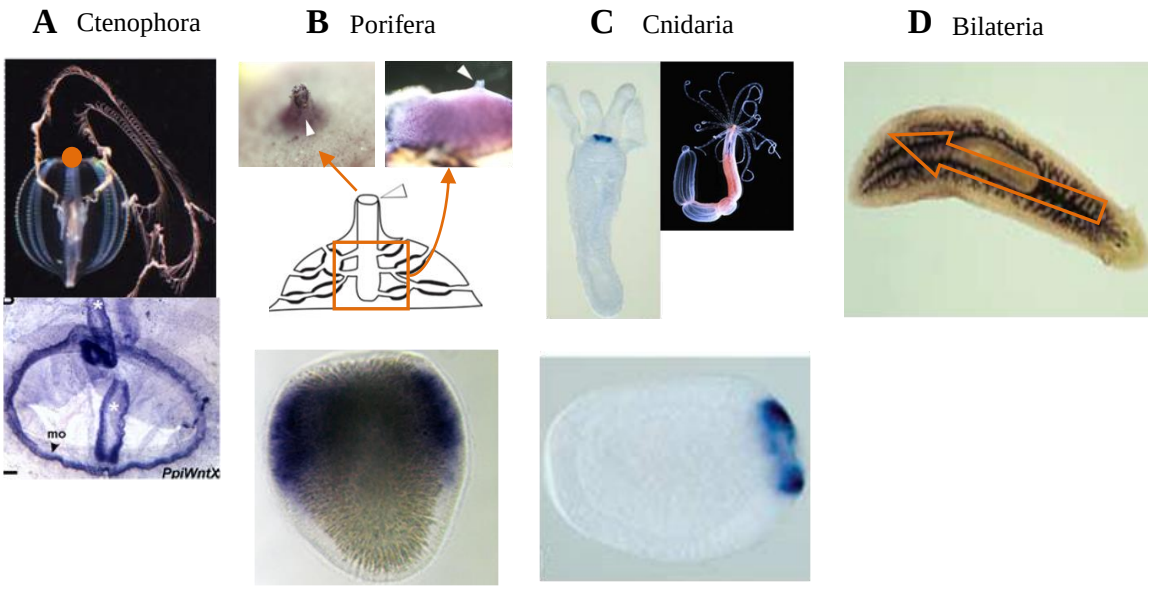
Slika 17. (Među)stanični spojevi epitela Metazoa
Anatomija (među)staničnih spojeva na temelju TEM mikroskopije (ba – bazalno; ap – apikalno). **A** – U pričvrsnim spojevima (*adherens junctions*, AJs) membrane su udaljene stalnim razmakom, a elektronski gusto područje može se vidjeti u stanici sa strane spoja. Aktinski mikrofilamenti ponekad se mogu nazrijeti. AJs definirani su prisustvom kadherina. **B i C** – Čvrsti spojevi ograničavaju paracelularnu difuziju molekula kroz epitel; **B** – Tijesni spojevi (*tight junctions*, TJs) karakteriziraju mjesta kontakta (kružići) između membrana susjednih stanica. Nalaze se samo u svitkovaca (Chordata) na apikalnom rubu stanica; **C** – Septirani spojevi (*septate junctions*, SJs) odlikuju se proteinskim ljestvama nalik septama i nalaze se bazalno u odnosu na AJs u epitelima koji ih sadrže. **D** – Komunikacijski spojevi (*gap junctions*, GJs) odlikuju se blisko približenim membranama i porama (*p*), odnosno kanalima koji nastaju povezivanjem dvaju polukanala, svakog od jedne stanice. **E** – Fokalne adhezije (*focal adhesions*, FAs) omogućuju stanica–ECM interakcije u kojima se uspostavlja veza između ECM-a i citoskeleta stanice. Definirani su prisustvom proteina integrina. FAs izgledaju slično kao AJs, samo elektronski gusto područje ne pripada drugoj stanici, nego ECM-u. Prilagođeno prema: MAGIE & MARTINDALE (2008).

4.5. Stanično signaliziranje u Metazoa

Dugoročna stabilnost mnogostaničnog organizma ovisi o ravnoteži između prednosti dobivene od prisutnosti individualnih stanica na mnogostaničnom okupu i smanjenja individualne reproduktivne spreme (*fitness*). Kompeticija između stanica pomaže nam u razumijevanju nekih važnih obilježja životinjske organizacije, poput podrijetla tkiva i spolova. Zajedničko obilježje svih tih procesa stanična je signalizacija (MINELLI, 2009). Sedam je glavnih signalnih putova u Metazoa: Hh, Wnt, TGF-β, receptorske tirozin kinaze (RTK), Notch, JAK/STAT i jezgrini hormonalni receptori (MINELLI, 2009; LEYS & HILL, 2012; FAIRCLOUGH, 2015). Wnt, TGF-β, Notch i jezgrini receptori ne nalaze se izvan Metazoa (Sl. 16.) (RUIZ-TRILLO, 2016).

Wnt geni eksprimiraju se u svih pet skupina Metazoa (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria i Bilateria) te se čini kako imaju konzerviranu ulogu u osnom strukturiranju tijela diljem životinjskog carstva (Sl. 18.) (BORISENKO *et al.*, 2016; ADAMSKA, 2016b). Ipak, budući da nemamo funkcionalnih podataka o ulozi u uspostavljanju osi izvan Cnidaria i Bilateria, već samo topografske obrasce genske ekspresije, zaključan nije definitivan (Maja Adamska, osobna komunikacija).

Kako je rečeno u portretu Cnidaria, koralji, sestrinska skupina ostalih žarnjaka, imaju oralno-aboralnu i direktivnu os te bilateralnu simetriju. BAGUÑÀ *et al.* (2008), uzimajući da je oralno-aboralna homologna s antero-posteriornom, a direktivna s dorzo-ventralnom osi u Bilateria, predlažu da se bilateralnost pojavila prije odvajanja Cnidaria i Bilateria te korištenje imena Bilateria za skupinu (Cnidaria + Triploblastica) u kojoj su Triploblastica preostali Bilateria. Ovaj sistematski prijedlog nije doživio podršku. Postanak dviju osi u žarnjaka ima jasnu molekularnu podlogu. Za ustanovljenje oralno-aboralne polarnosti zaslužno je Wnt/β-katenin signaliziranje (Sl. 18C), dok je BMP signaliziranje odgovorno za probijanje simetrije i ustanovljenje direktivne osi (TECHNAU *et al.*, 2015). Ipak, jesu li i kako dvije osi u žarnjaka homologne s A-P i D-V osi u Bilateria, ostaje otvoreno pitanje (TECHNAU *et al.*, 2015).



Slika 18. Ekspresija Wnt gena u Ctenophora, Porifera, Cnidaria i Bilateria upućuje na moguću konzerviranu ulogu Wnt signaliziranja u organiziranju osi tijela.
A – Wnt geni u Ctenophora eksprimiraju se snažno oko usne margine (*mo*) na oralnom polu, što je indikativno za regulaciju uspostave primarne (oralno-aboralne) osi. U ranom razvoju odustan je (izgubljen) ovakav signal (JAGER *et al.*, 2013). Gore: *Pleurobrachia* s označenim ustima (preuzeto iz: MOROZ *et al.*, 2014); dolje: ekspresija gena *PpiWntX* oko usta (*mo*); preuzeto iz: JAGER *et al.* (2013). **B** – U odrasle spužve *Halisarca dujardini* (Demospongiae) zamjećuje se ekspresija duž bazalno-apikalne osi. Gore lijevo: transkripti gena *HduWntK* izraženi su oko „dimnjaka" oskuluma, koji je na crtežu naznačen bijelim vrhom strelice. Gore desno: *HduWntF* slabo je prisutan oko oskuluma i apikalno, ali je izražen bazalno. Dolje: *HduWntK* eksprimira se u posteriornom dijelu ličinke. Preuzeto i prilagođeno prema: BORISENKO *et al.* (2016). **C** – Wnt signaliziranje u

žarnjaka nužno je za uspostavu oralno-aboralne polarnosti (TECHNAU *et al.*, 2015). Prikazan je koralj *Nematostella*. Gore lijevo: ekspresija *NvWnt1* na oralnom polu primarnog polipa; dolje: ekspresija *NvWnt1* na posteriornom dijelu ličinke planule. Preuzeto iz: KUSSEROW *et al.* (2005). Gore desno: odrasli polip (preuzeto iz: TECHNAU *et al.*, 2015). **D** – Gradijent ekspresije Wnt gena duž antero-posteriorne osi Bilateria na primjeru virnjaka (Plathelminthes). Fotografija virnjaka preuzeta iz: BRUSCA & BRUSCA (2003).

5. Ideje o nastanku Metazoa

> „Siguran sam da će i teorija rekapitulacije i gastreja teorija preživjeti u izmijenjenu obliku.“
> (JÄGERSTEN, 1972; str. 257.)

Od vremena utjecaja Darwina na zoologe 19. stoljeća do danas mnogi su promišljali o tome kako su nastale Metazoa. Teorije koje su iznjedrili mogu se podijeliti u dva osnovna tipa: kolonijalna teorija i sincitijalna (celularizacijska) teorija (BRUSCA & BRUSCA, 2003; NIELSEN, 2012a). Kako je rečeno u prethodnom poglavlju, ideja o agregaciji nezavisnih genski heterogenih stanica nije podrživa. U ovom poglavlju naglasak je stavljen na ideje o nastanku Metazoa iznesene u recentnim publikacijama.

5.1. Kolonijalne teorije: gastreja teorija i njezine adaptacije

Istraživanja vapnenih spužava (Calcarea) i pronalazak stadija gastrule (Sl. 1E) u njih naveli su HAECKELA (1872), koji je zamijetio da se gastrula javlja u ranom razvoju svih životinja, da ustanovi svoju gastreja teoriju prema kojoj je dvoslojna gastreja, koja morfološki odgovara gastruli, ishodišni oblik iz kojeg su potekle sve životinje u čijem se embrionalnom razvoju taj evolucijski stadij rekapitulira kao gastrula. Za Haeckela je odnos filogenije i ontogenije definiran fenomenom rekapitulacije (npr. HAECKEL, 1874): „Ontogenija je kratka rekapitulacija filogenije, mehanički ovisna o funkcijama nasljeđivanja i adaptabilnosti.“ HAECKEL (1874) je, na temelju svojh opažanja definirao Metazoa kao holofiletsku skupinu koju definiraju dva primarna zametna listića, ektoderm i endoderm, koji oblaže probavilo. Iz zajedničkog je pretka životinja, gastreje, HAECKEL (1872, 1874), kako je opisano u 1. poglavlju, izveo dvije evolucijske grane, Protascus (= Zoophyta) i Prothelmis (= Bilateria u HAECKEL, 1874). Haeckel je svoju teoriju razrađivao u nizu publikacija, utemeljivši i stadij šuplje blasteje (čijom invaginacijom nastaje gastreja) našavši primjere kolonijalnih flagelata koji odgovaraju njezinom tipu građe (NIELSEN, 2012a). Premda je haeckelovska ideja rekapitulacije često povijesno bila opovrgavana (NIKLAS *et al.*, 2016) i inicirala alternativne teorije, mnoge su proizašle kao njezine adaptacije (MIKHAILOV *et al.*, 2009). Slijedi pregled njezinih recentnih adaptacija.

5.1.1. *Hoanoblasteja teorija*

NIELSEN (2008, 2012a) ustanovljuje hoanoblasteja teoriju (Sl. 19.) na temelju srodstvenih odnosa hoanoflagelata i Metazoa i strukturne sličnosti kolarnih jedinica hoanoflagelata i hoanocita uzimajući ih homolognima. Ancestralna životinja bila je pelagička mnogostanična

hoanoblasteja (Sl. 19B) s periferno položenim hoanocitima i spolnim razmnožavanjem. Odvedena hoanoblasteja (Sl. 19C) imala je periferne hoanocite te unutrašnje i periferne nehraneće stanice. Uspostavom polarnosti (posebne stanice bez kolara na anteriornom kraju) pelagički oblik mogao se anteriornim krajem spustiti na dno i dati ancestralnu spužvu (Sl. 19D) s hoanocitima koji stvaraju struju vode. Ancestralna spužva zadržala je pelagički oblik kao ličinački oblik te je uspostavljen pelagičko-bentički životni ciklus. Žlijeb se u odvedne spužve (Sl. 19E) zatvorio te je nastala hoanocitna komora. Razvojem većeg broja hoanocitinih komora spužva je mogla rasti, što je omogućilo ulaganje više žumanjka u jaja zbog čega su ličinke mogle postati lecitotrofne i izgubiti hoanocite. Polazeći od Homosleromorpha kao skupine najbliže ostalim Metazoa, u kontekstu *Porifera–prve* s parafiletskim spužvama, Nielsen dalje izvodi složenije građenu spužvu (Sl. 19F). Homoscleoromorpha nalik predak s disogonijom (vidi portret Ctenophora u 3. poglavlju) (Sl. 19G) i ličinkom s arhenteronom mogao je izgubiti bentički stadij; ličinka je postala spolno zrela, napušten je plan građe spužve i nastala je gastreja (Sl. 19H), predak Eumetazoa. Stadiju gastreje odgovara, u „spljoštenom" obliku, *Trichoplax*. Druga linija koja se odvojila od gastreje razvila je živčani sustav (Neuralia), a njezin predak je neurogastreja (Sl. 19H). Cnidaria su zadržali njezinu organizaciju, a u zajedničkog pretka Triploblastica (Ctenophora + Bilateria) razvio se mezoderm. Premda Nielsenova teorija polazi od parafiletskih spužava i rebraša kao sestrinske skupine Bilateria, u adaptiranu obliku funkcionira i s holofiletskim spužvama, ali se ne može primijeniti na *Ctenophora–prvi* koncept.

5.1.2. *Od hoanoflagelatnog protista do Metazoa prema Adamskoj*

ADAMSKA (2016a) također polazi od *Porifera–prve* ideje i hoanoflagelatnog oblika kao ishodišta za evoluciju mnogostaničnosti Metazoa (Sl. 20.) i predstavlja dijelom adaptaciju Nielsenove teorije. Adamska polazi od kolonijalnog hoanoflagelatu nalik protista s pelagobentičkim ciklusom (Sl. 20-1): sesilnim *odraslim* oblikom i pelagičkim oblikom širenja nalik rozeta-koloniji *S. rosetta* (Sl. 14.), polazeći od činjenice da je većina recnentih hoanoflagelata sedentarna. Drugi i treći *korak* (Sl. 20-2, 3) u procesu koji vodi od hoanoflagelatnog protista do Metazoa tipa građe žarnjaka odgovaraju stadijima ancestralne i odvedene spužve Nielsena (Sl. 19D, E). Odvedena spužva ima unutarnji sloj stanica, hoanoderm, i vanjski, pinakoderm. Za razliku od Nielsena, koji Eumetazoa izvodi iz gastreje koja je nastala neotenijom, Adamska smatra hoanoderm, odnosno pinakoderm spužvi homolognima endodermu (koji oblaže probavilo), odnosno ektodermu (epidermu) žarnjaka (pa tako i Eumetazoa) (Sl. 20-4) u čemu slijedi HAECKELA (1874) koji smatra endoderm i ektoderm

homolognim u svih Metazoa. Prijelaz prema planu građe žarnjaka implicira prijelaz s mikrofagije na makrofagiju, što je pojava poznata unutar samih Porifera (Sl. 5P). Adamska, čiji se evolucijski scenarij oslanja na podržavanje svakog hipotetskog stadija prirodnom selekcijom (kao i Nielsenov), podršku svojem scenariju nalazi u ekspresiji gena specifičnih za endoderm u hoanodermu spužvi što implicira njihovu moguću homologiju (vidi i ADAMSKA, 2016b te potpoglavlje 6.2.).

5.1.3. *„Nova plakula teorija“*

Otto Bütschli je 1884. godine iznio teoriju prema kojoj je predak Metazoa bio jednoslojna bentička kolonija protista s diferencijacijom stanica na donji, hraneći i gornji, lokomotorni dio. Delaminacijom je nastala dvoslojna mnogostanična „ploča“, plakula. Njezinim savijanjem nastao je gastruli nalik stadij s blastoporom i šupljinom za probavu hrane (MIKHAILOV *et al.*, 2009). SCHIERWATER *et al.* (2010) daju modernu interpretaciju plakula teorije (Sl. 21.). Plakula se transformira iz primitivnog diska koji sadrži donji i gornji epitel (Sl. 21-1) u oblik s vanjskom probavnom šupljinom između donjeg epitela i podloge (Sl. 21-2). To se ostvaruje podizanjem središnjeg dijela tijela, što je vidljivo i u vrste *Trichoplax* (Placozoa) pri hranjenju. Kad bi se ovaj proces nastavio, doveo bi do povećanja vanjske probavne šupljine (Sl. 21-3) uz promjenu oblika tijela iz više nepravilnog u više okrugli (Sl. 21, „oralno“). Naposljetku, ovaj proces dovodi do plana građe Cnidaria i Porifera (Sl. 21-4), pri čemu gornji epitel plakule ostaje „izvana“ i tvori ektoderm, a donji epitel postaje „unutarnji“ i tvori endoderm. Evolucijski stadiji 1., 2. i 4. na Sl. 21. imaju odgovarajuću strukturu u *Trichoplax* koji miruje, *Trichoplax* koji se hrani, odnosno polipu/meduzi žarnjaka. Valja primijetiti kako NIELSEN (2008, 2012a) doživljava *Trichoplax* kao „ispeglanu“ gastreju, a ovdje opisana „nova plakula hipoteza“ izvodi oblik gastrule iz savijanja plakule. SCHIERWATER *et al.* (2010) smatraju da bi jedan regulatorni gen bio dovoljan za razdvajanje gornjeg od donjeg epitela što odgovara pretpostavljenom ProtoHox/Parahox genu, *Trox-2*, u *Trichoplax* (ekspresija: crveno na Sl. 21.). Problem je „nove plakula teorije“, unatoč njezinoj legitimnosti, što molekularne filogenije praktično nikad ne dobivaju Placozoa kao sestrinsku skupinu ostalih Metazoa (JÉKELY *et al.*, 2015; ADAMSKA, 2016a).

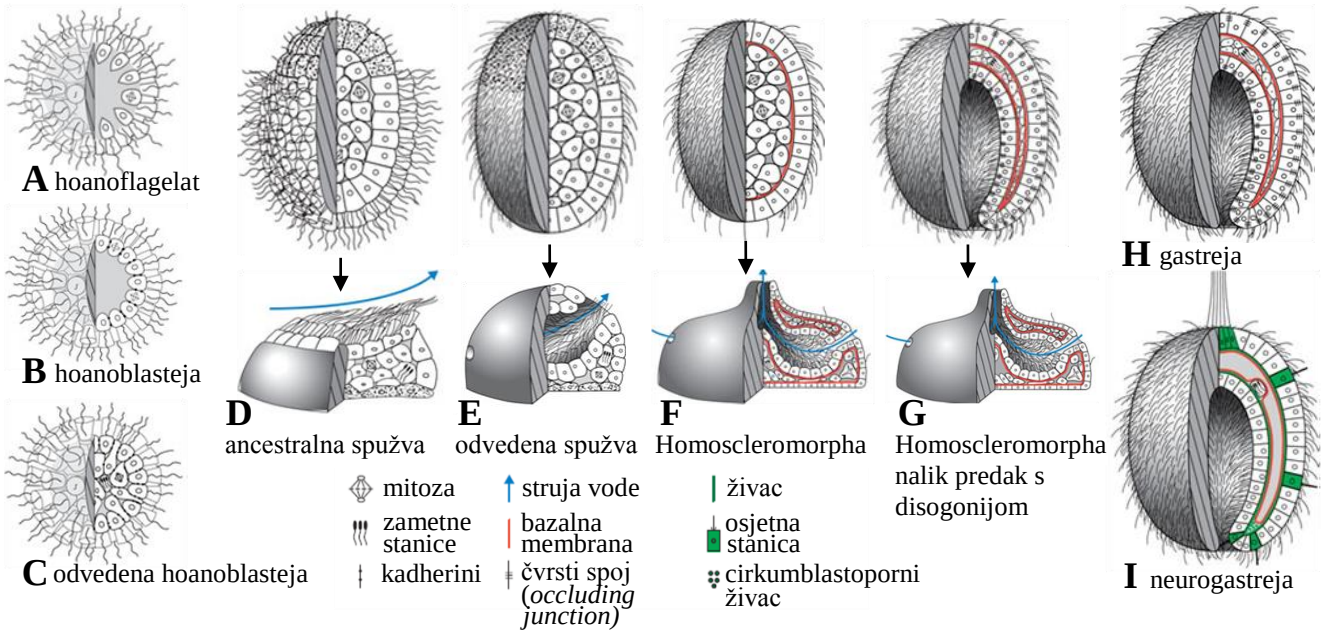
5.1.4. *Sinzoosporna teorija*

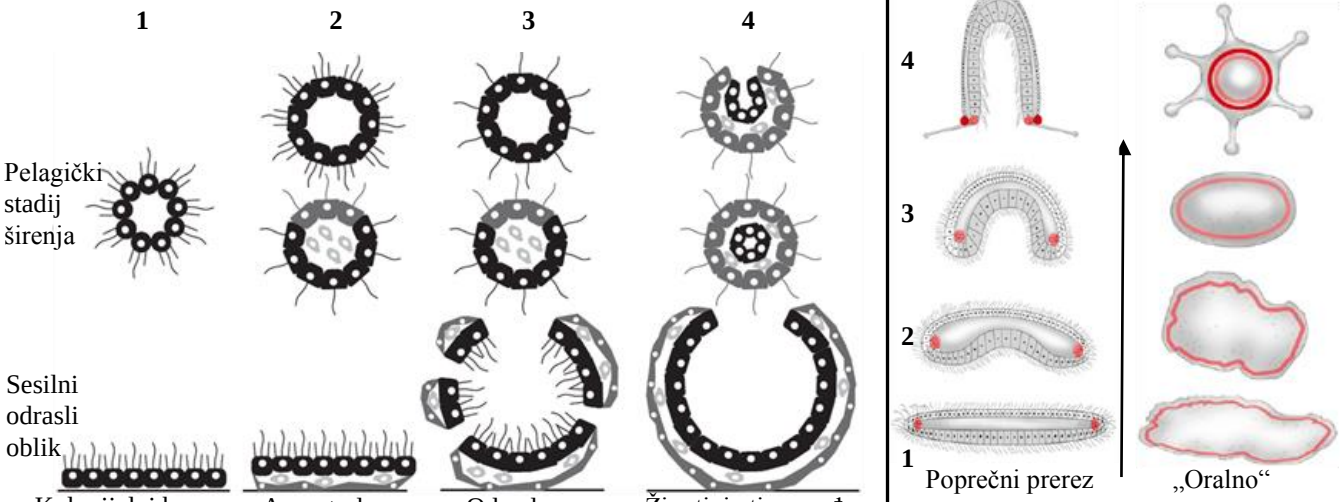
MIKHAILOV *et al.* (2009) oživjeli su zaboravljenu sinzoospornu teoriju (koju je 1949. iznio Aleksej Zakhvatkin) stavljajući je u kontekst s novijim saznanjima o jednostaničnim srodnicima Metazoa i njihovoj molekularnoj biologiji. Ona se može smatrati kontrastom, ali i

adaptacijom gastreja teorije. Prema ovoj teoriji (Sl. 22.), predak Metazoa bio je protist s kompleksnim životnim ciklusom koji uključuje zoospore koje nastaju palintomskom diobom i trofičke stanice ili agregate (Sl. 22A). Nastanak Metazoa podrazumijeva evolucijski prijelaz iz temporalne stanične diferencijacije prema prostornoj staničnoj diferencijaciji (Sl. 22-1). Sedentarni makroskopski kolonijalni stadij ancestralne Metazoa (Sl. 22B) zadržao je sinzoosporu, nastalu povezivanjem zoospora, kao stadij širenja nakon čega je životni ciklus Metazoa doživio interkalaciju blastule (Sl. 22C). Iz originalnog životnog ciklusa Metazoa MIKHAILOV *et al.* (2009) izvode životni ciklus spužvi u kojem se pojavljuje velika lecitotrofna ličinka (parenhimula) (Sl. 22E). U liniji Eumetazoa (Sl. 22D) primarna blastuli nalik ličinka doživjela je adaptacije prema predatorskom načinu života što je potaknulo evoluciju probavila, mišićnog i probavnog sustava. Gastrula Eumetazoa tako je odvedeno ličinačko stanje koje se pojavilo u oceanu kao potencijalni predator. Sjedilački filtratorski stadij izgubljen je neotenijom (Sl. 22D).

5.2. Sincicijalna (celularizacijska) teorija

HADŽI (npr. 1953; 1963) iznio je, nasuprot gastreja teoriji i njezinim adaptacijama, sincicijalnu teoriju prema kojoj su prve Metazoa bile tipa virnjaka (pripadnika koljena Plathelminthes), koji su nastali celularizacijom sincicija svojih predaka, trepetljikaša u kojih je došlo do brojnih dioba jezgre. Filogeniju životinja zamislio je kao linearni slijed organizacijskih tipova Ameria → Polymeria → Oligomeria → Chordonia utemeljen primarno na (ne)prisutnosti i naravi segmentacije, odbacujući dihotomiju Protostomia/Deuterostomia. Evoluciju spužvi smatra neovisnom o evoluciji Eumetazoa te ih izvodi iz hoanoflagelatnog pretka (usporedi Sl. 1. iz HADŽI, 1963 sa Sl. 19. iz ovog rada). Hadžijev klasifikacijski/ filogenetski sustav nikad nije bio dobro prihvaćen (vidi komentar HYMANOVE, 1964), ali je zbog jednostavnosti i političkih razloga neobjektivno usađen u nastavu zoologije bivše Jugoslavije (vidi npr. koncept udžbenika MATONIČKINA *et al.*, 1998). Same ideje o postanku Metazoa, do kojih su neovisno došli Hadži i Otto Steinböck (HADŽI, 1963) danas su isključivo od povijesnog interesa (NIELSEN, 2012a). Osim toga, trepetljikaši su pripadnici skupine Sar i nisu bliski srodnici Opisthokonta (ADL *et al.*, 2012). Ipak, narav životnog ciklusa *Creolimax fragrantissima* (Sl. 16B) baca novo svjetlo na potencijalnu važnost celularizacije sincicija u nastanku Metazoa (SUGA & RUIZ-TRILLO, 2015; vidi 4. poglavlje).



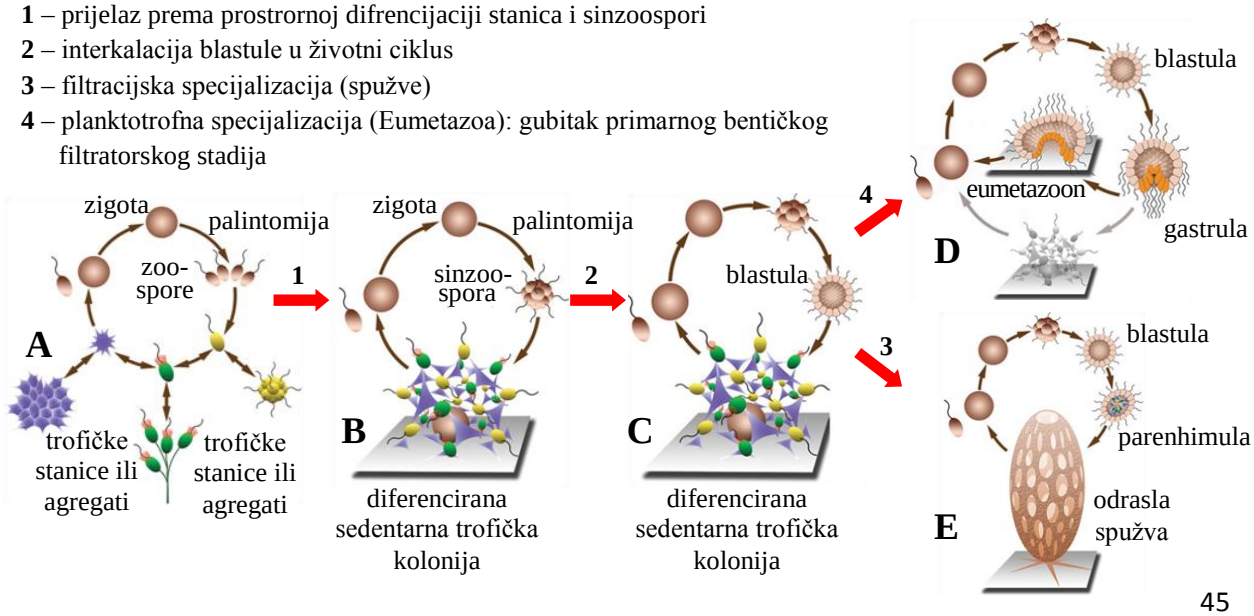


Slika 19.

Slika 20. | **Slika 21.**

Slika 22.

1 – prijelaz prema prostrornoj difrencijaciji stanica i sinzoospori
2 – interkalacija blastule u životni ciklus
3 – filtracijska specijalizacija (spužve)
4 – planktotrofna specijalizacija (Eumetazoa): gubitak primarnog bentičkog filtratorskog stadija

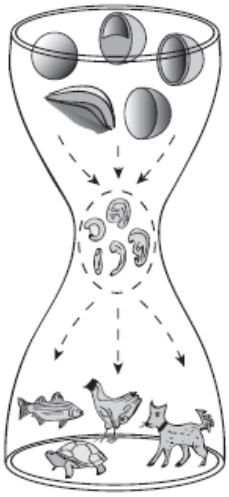


Slike 19. – 22. Slika 19. Hoanoblasteja teorija; Slika 20. Od hoanoflagelatnog protista do Metazoa prema Adamskoj; Sl. 21. „Nova plakula teorija“; Sl. 22. Sinzoosporna teorija.

Vidi tekst. Prilagođeno prema: NIELSEN (2008); ADAMSKA (2016a); SCHIERWATER *et al.* (2010); MIKHAILOV *et al.* (2009).

5.3. Odnos ontogenije i filogenije i filotipski stadij

Odnos ontogenije i filogenije nije prestao intrigirati znanstvenike od doba Haeckela. Jedan fenomen, isprva opisan na temelju komparativne embriologije, jest filotipski stadij, koji u ontogeniji „oblika pješčanog sata“ predstavlja suženje, konzervirani morfološki oblik u odnosu na dio ontogenije prije i poslije filotipskog stadija (Sl. 23.) (VALENTINE & MARSHALL, 2015). Počeci radijacije Metazoa bili su radijacija morfologija koje retrospektivno identificiramo kao filotipske stadije (VALENTINE & MARSHALL, 2015). Danas je postojanje filotipskog stadija u životinja dobro podržano (NIKLAS *et al.*, 2016). DOMAZET-LOŠO & TAUTZ (2010) našli su da se u filotipskom stadiju ribe zebrice (*Danio rerio*) eksprimiraju evolucijski stariji geni negoli prije i poslije filotipskog stadija tako da *pješčani sat* transkriptoma odgovara morfološkom. Ovu su korelaciju kasnije dobili i, npr., HASHIMSHONY *et al.* (2014). Fenomen filotipskog stadija prepoznat je i u biljaka (NIKLAS *et al.*, 2016).



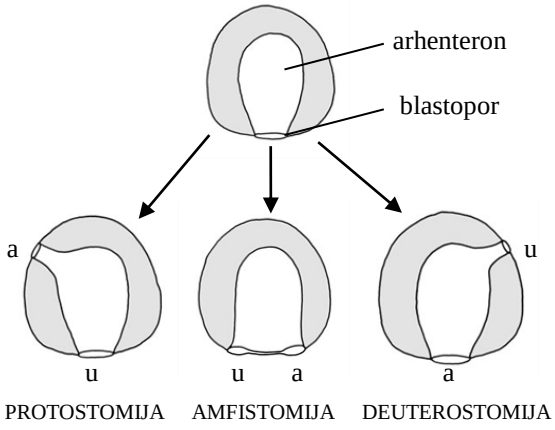
Slika 23. Filotipski stadij na primjeru kralježnjaka.

Filotipski stadij u suženom je dijelu *pješčanoga sata*. Preuzeto iz: NIKLAS *et al.* (2016).

6. Sudbina blastopora i podrijetlo usnog i analnog otvora u Eubilateria te podrijetlo zametnih listića i gastrulacije

6.1. Sudbina blastopora i podrijetlo usnog i analnog otvora u Eubilateria

Blastopor imaju Ctenophora i Cnidaria u kojih odgovara usnom otvoru i Bilateria u kojih je njegova sudbina predmet različitih interpretacija (HEJNOL & MARTINDALE, 2009). Sudbina blastopora i podrijetlo usnog i analnog otvora nisu prestali interesirati zoologe od 19. stoljeća (HAECKEL, 1874, npr., navodi kako je pitanje homologije usta i anusa u Metazoa „dosta nejasno“). Grobben je 1908. podijelio Bilateria u dvije evolucijske grane, Protostomia i Deuterostomia definirajući ih na temelju predložene sudbine blastopora; u prvih bi se iz blastopora trebala razviti usta, a u drugih analni otvor. Molekularna filogenija danas stabilno podržava sestrinski odnos ovih dviju skupina (vidi 3. poglavlje), no premda se ovakva definicija protostomičnih i deuterostomičnih životinja redovito i dalje navodi u udžbenicima zoologije, što se tiče Protostomia, riječ je o generalizaciji. Dok je u Deuterostomia sudbina blastopora uvijek proces deuterostomije, u Protostomia su, osim protostomije, zabilježene i deuterostomija i amfistomija (MARTÍN-DURÁN *et al.*, 2012; JANSSEN *et al.*, 2015; NIELSEN, 2015). Protostomija podrazumijeva nastanak usta, a deuterostomija anusa od blastopora, dok amfistomija podrazumijeva središnje suženje izduženog blastopora koje rezultira nastankom dvaju otvora, usta i anusa (Sl. 24.). Ovakva distribucija sudbine blastopora potaknula je različite teorije koje predlažu sva tri načina kao ancestralna stanja u zajedničkog pretka Protostomia i Deuterostomia.



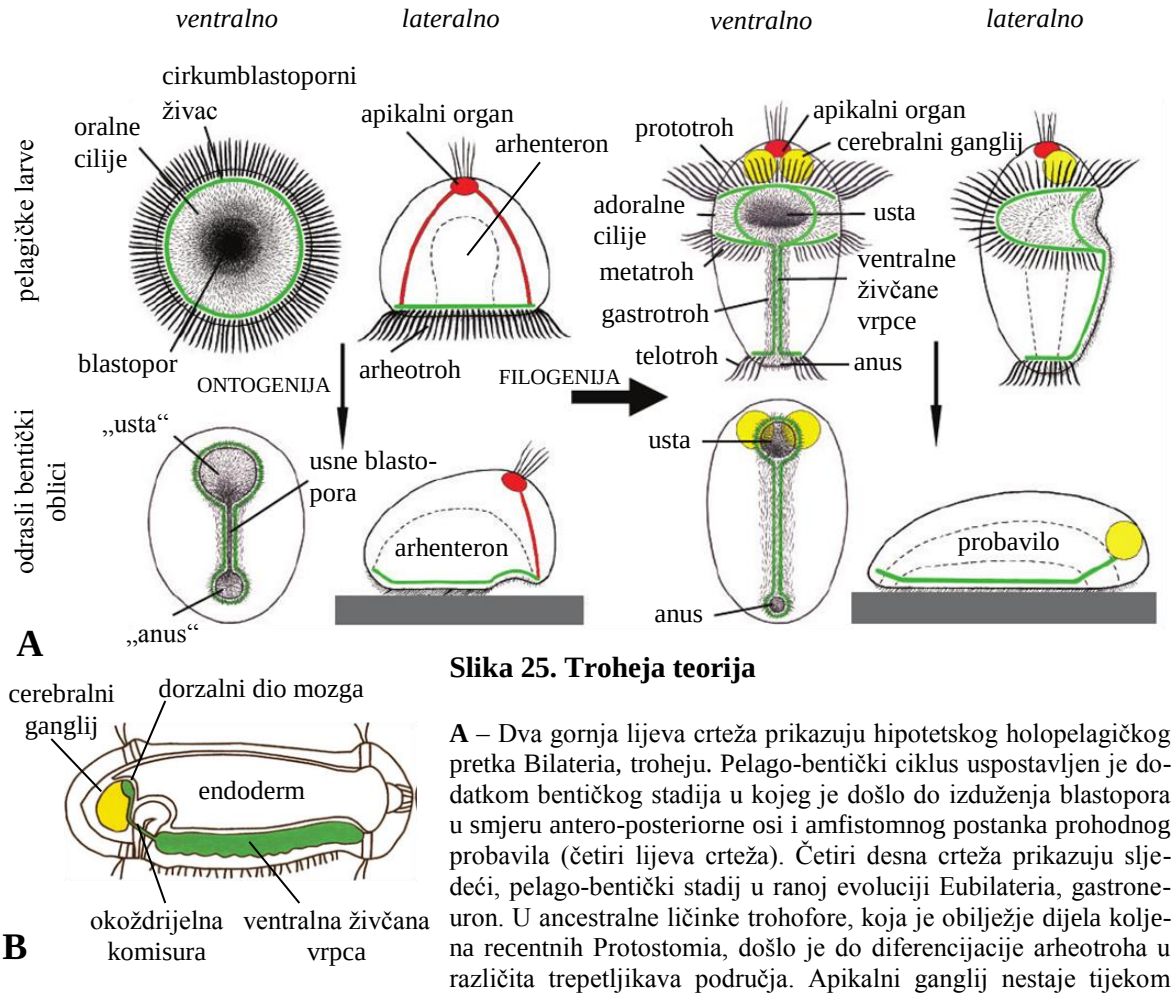
Slika 24. Tri moguće sudbine blastopora: protostomija, amfistomija i deuterostomija.

U Protostomia javljaju se sva tri fenomena, dok je za Deuterostomia karakteristična deuterostomija. Sve tri moguće sudbine blastopora predlagane su u literaturi kao ancestralno obilježje Eubilateria. u; usta, a, anus. Prilagođeno prema: SCHMIDT-RHAESA (2007).

Nielsen je (npr. NIELSEN 1985; 2012a,b; 2013; 2015b) integrirao ideju ancestralne amfistomije u svoju troheja teoriju koja objašnjava evoluciju životnog ciklusa Metazoa, a počiva na podacima iz embriologije, morfologije živčanog sustava i funkcije trepetljikavih

područja (Sl. 25.). Na početku je Nielsen predložio neovisno podrijetlo Protostomia i Deuterostomia od troheje (npr. NIELSEN, 1985), da bi u kasnijim publikacijama (npr. NIELSEN 2012a, b; 2012) uzeo troheju kao pretka Protostomia u kojih bi apomorfna osobina bila nastanak usta i anusa iz blastopora. U najnovijoj publikaciji o troheja teoriji (NIELSEN, 2015b) uzima troheju kao zajedničkog pretka Bilateria. Prema ovojm teoriji, holopelagička troheja s blastoporom i arhenteronom te prstenom lokomotornih cilija oko blastopora (arheotroh) dodala je bentički stadij u kojeg je došlo do izduženja blastopora duž nove, antero-posteriorne osi (Sl. 25A.). Sužavanjem usni blastopora preostaju samo usta i anus kao njezini anteriorni, odnosno posteriorni ostatak. Tako je amfistomijom nastalo prohodno probavilo u zajedničkog pretka Eubilateria. Cirkumblastoporni živac prati promjene blastopora te preostaje kao mali posteriorni dio mozga, par okoždrijelnih konektiva, par ventralnih živčanih vrpci te mala petlja oko anusa. Ovakva organizacija živčanog sustava može se prepoznati u Protostomia (Sl. 25B). U sljedećem je evolucijskom stadiju, koji Nielsen naziva gastroneuron, pelagički oblik zadržan kao ličinka u koje je došlo do promjena u skladu s promjenama odrasle morfologije, što je predloženi evolucijski mehanizam koji JÄGERSTEN (1972) naziva adultacijom. U gastroneronu došlo je do diferencijacije arheotroha u različita trepetljikava područja u ličinki (trohofori) u koje apikalni ganglij troheje nestaje tijekom metamorfoze (Sl. 25A). Na temelju spomenute distribucije triju mogućih sudbina blastopora u Bilateria, NIELSEN (2015b) zaključuje kako se ancestralna amfistomija, prisutna u tek nekoliko skupina Protostomia, zamijenila deuterostomijom u Deuterostomia i nekoliko skupina Protostomia (koji najčešće pokazuju protostomiju). Nielsen (npr. NIELSEN, 2012a) nalazi podršku teoriji ancestralne amfistomije u pretpostavljenoj amfistomiji opisanoj u nekoliko vrsta Annelida, Onychophora (crvonošci) i Nematoda. BIGGELAAR *et al.* (2002) drže da su interpretacije amfistomnog podrijetla usta i anusa u ovih skupina misinterpretacije njihove embriologije. JANSSEN *et al.* (2015) istraživali su ventralni žlijeb izdužen u smjeru usta – anus u crvonošca *Euperipatoides kanangrensis* u kojem se marker blastopora, gen *Brachyury* ne eksprimira, ali se eksprimira u jamici položenoj posteriorno od žlijeba što je čini vjerojatno blastoporom, zaključujući kako navedena vrsta ne pokazuje amfistomiju. U kolutićavca *Platynereis dumerillii* dobili su ekspresiju spomenutog gena u navedenom žlijebu što implicira da ova vrsta ima pravu amfistomiju. Na temelju distribucije deuterostomije u svih Deuterostomia i nekih Protostomia (češća pojava od amfistomije u ove skupine), MARTÍN-DURÁN *et al.* (2012) i JANSSEN *et al.* (2015) drže deuterostomiju vjerojatnim ancestralnim stanjem u Eubilateria. MARTÍN-DURÁN *et al.* (2012) interpretiraju ancestralnu deuterostomiju kao rezultat razdvajanja procesa razvoja usta od blastopora (dok je u Ctenophora i Cnidaria njihova veza očuvana). U literaturi je

predložena i mogućnost ancestralne protostomije za Bilateria, u kontekstu aceloidno-planuloidne teorije prema kojoj je zajednički predak Bilateria bio bentički organizam bez analnog otvora (HEJNOL & MARTINDALE, 2009). Premda je podrijetlo blastopora najelaborativnije objašnjeno u kontekstu troheja teorije, HEJNOL & MARTINDALE (2009) smatraju je slabo vjerojatnom jer implicira da se ancestralna amfistomija izgubila u gotovo svakoj skupini Protostomia.



Slika 25. Troheja teorija

A – Dva gornja lijeva crteža prikazuju hipotetskog holopelagičkog pretka Bilateria, troheju. Pelago-bentički ciklus uspostavljen je dodatkom bentičkog stadija u kojeg je došlo do izduženja blastopora u smjeru antero-posteriorne osi i amfistomnog postanka prohodnog probavila (četiri lijeva crteža). Četiri desna crteža prikazuju sljedeći, pelago-bentički stadij u ranoj evoluciji Eubilateria, gastroneuron. U ancestralne ličinke trohofore, koja je obilježje dijela koljena recentnih Protostomia, došlo je do diferencijacije arheotroha u različita trepetljikava područja. Apikalni ganglij nestaje tijekom metamorfoze, a cerebralni gangliji pridonose građi mozga odraslog oblika. Usporedi anecestralnu trohoforu prikazanu gore desno sa Sl. 297-1 u HATSCHEK (1888) te trohoforama nekoliko Protostomia i odraslog Rotifera (kolnjaka) na Sl. 22.5. u NIELSEN (2012a). Prilagođeno prema: NIELSEN (2015b). Ovaj je crtež, unatoč mijenjaju konteksta troheja teorije, praktički ostao nepromijenjen od NIELSEN (1985) do NIELSEN (2015b). **B** – Organizacija središnjeg živčanog sustava u mnogočetinaša (Annelida) *Capitella telata*. Prikaz slijeva. Dio živčanog sustava koji pretpostavljeno potječe od cirkumblastopornog živca troheje prikazan je zeleno a potječe od stanice 2d u spiralnom brazdanju. Prilagođeno prema: NIELSEN (2012a).

KRAUS *et al.* (2016), na temelju spoznaje kako usna blastopora u koralja *Nematostella* i kralježnjaka ima jednaku organizatornu aktivnost koja počiva na Wnt/β-katenin signaliziranju, predlažu da se takav blastoporni organizator javio u zajedničkog pretka Cnidaria i Bilateria.

Uobičajena je pretpostavka kako prohodno probavilo, s ustima i anusom, imaju samo Eubilateria (koji sa sestrinskom skupinom Xenacoelomorpha čine Bilateria; vidi 3. poglavlje), u kojih je anus sekundarno izgubljen u nekih skupina (npr. Plathelminthes, plošnjaka (NIELSEN, 2012a); Ophiuroidea, zmijača (BRUSCA & BRUSCA, 2003)). U 3. je poglavlju, u portretu Ctenophora, opisano embrionalno podrijetlo analnih pora, komunikacija probavila s okolišem. Premda se uobičajeno ne smatraju analognima anusu Eubilateria te se navodi kako rebraši izbacuju neprobavljene ostatke kroz usta, PRESNELL *et al.* (2016) nalaze da su takva opažanja rezultat neadekvatnog hranjenja životinja te opisuju funkcionalno trodijelno prohodno probavilo Ctenophora s analnim porama sfinkternog djelovanja. Na temelju ovog nalaza predlažu dva scenarija za evoluciju prohodnog probavila: ono je homologno u Ctenophora i Eubilateria (odnosno, postojalo je u zajedničkog pretka Metazoa); ili: anus je nastao konvergencijom u ove dvije skupine. Ipak, prva mogućnost implicira gubitak anusa u Cnidaria te gubitak probavila u Placozoa (i Porifera, u kontekstu *Ctenophora–prvi*), što je vrlo neparsimoničan scenarij.

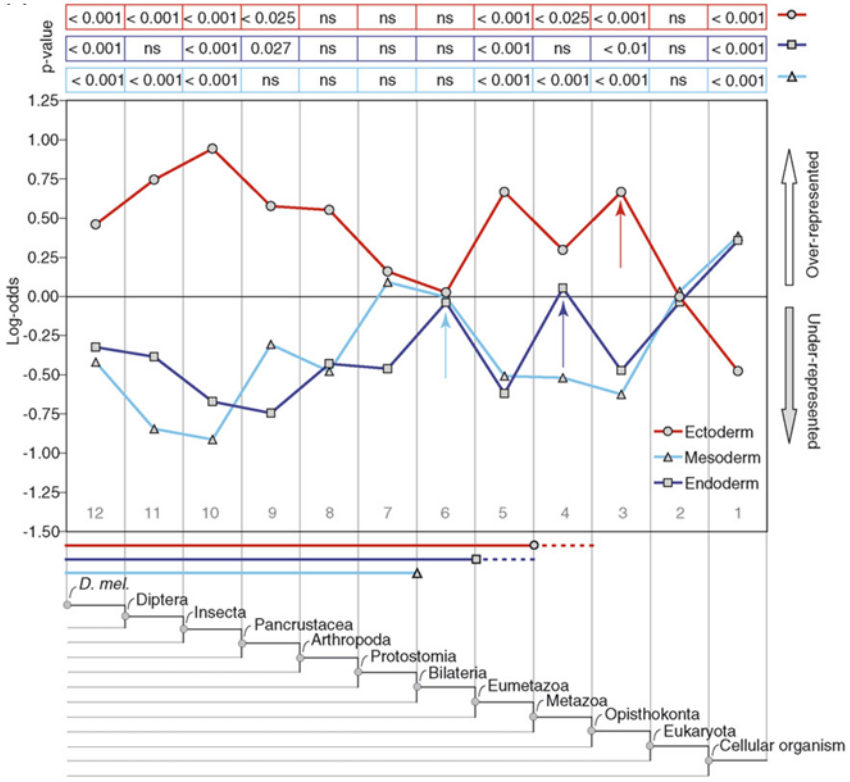
6.2. Podrijetlo zametnih listića i gastrulacije

Dok su spužve u tom pogledu problematične, ostale Metazoa imaju zametne listiće (SCHMIDT-RHAESA, 2007). *Trichoplax* (Placozoa) može se interpretirati kao „ispeglana“ gastrula/gastreja) (NIELSEN, 2008; 2012a). Ctenophora, Cnidaria i Bilateria imaju endoderm i ektoderm, a Ctenophora (Sl. 5L) (PHILIPPE *et al.*, 2009; NIELSEN, 2012a; MOROZ *et al.*, 2014; MARTINDALE & HENRY, 2015) i Bilateria i treći zametni listić, mezoderm. DUNN *et al.* (2014) označavaju mezoderm kao apomorfiju Bilateria, ali ne prepoznaju ga u Ctenophora. NIELSEN (2008; 2012a) je skupinu Ctenophora + Bilateria nazvao Triploblastica (triploblastične životinje imaju tri zametna listića, za razliku od diploblastičnih Cnidaria koji nemaju mezoderm), no takav je položaj Ctenophora danas neodrživ (Sl. 8.). MOROZ *et al.* (2014) drže mogućim konvergentni razvoj mezoderma u Ctenophora i Bilateria. U mezodermu Ctenophora ne eksprimiraju se geni konzervirani u formiranju endomezoderma u Bilateria (MARTINDALE & HENRY, 2015).

DOMAZET-LOŠO *et al.* (2007) predložili su novu statističku metodu za proučavanje makrovolucijskih trendova, genomsku filostratigrafiju, testirajući gene vezane za tri zametna listića. Ova metoda, koja počiva na principu nastajanja *gena osnivača* (*founder genes*) zasniva se na raspodjeli gena iz dobro poznatog genoma neke vrste u filostratume, odnosno područja internodija na filogenetskom stablu te opažanju statistički značajnog odstupanja ekspresije gena u pojedinim filostratumima u odnosu na cijeli uzorak gena (Sl. 26.). „Vrhovi“ (*peaks*) ukazuju

na podrijetlo *gena osnivača* vezanih uz određene strukture. Rezultate koji su dobili (Sl. 26.) DOMAZET-LOŠO *et al.* (2007) interpretirali su kao signale da je zajednički predak Ophistokonta „pokazivao neku vrstu mnogostaničnosti“ (zbog prvog „vrha“ za ektoderm u 3. filostratumu; crvena strelica na Sl. 26.); da je „vrh“ za endoderm (tamnoplava strelica na Sl. 26.) u skladu s ranim podrijetlom gastrulacije (interpretacije gastrulacije u Porifera; vidi dolje) i da je mezoderm inovacija Bilateria (zbog „vrha“ za mezoderm u 6. filostratumu; svijetloplava strelica na Sl. 26.). „Odabir filogenije od fundamentalnog je značenja za određivanje filogenetskog podrijetla gena.“ (DOMAZET-LOŠO *et al.*, 2007). No, iako su danas najstabilnije filogenije rane radijacije Metazoa one prikazane na Sl. 8., u vrijeme ove publikacije Porifera su se uobičajeno uzimali kao sestrinska skupina Metazoa te je od *Porifera–prve* krenula i filogenija koju autori koriste za određivanje filostratuma. U toj filogeniji Ctenophora nisu uopće uzeti u obzir. Budući da je za analizu genomskom filostratigrafijom potrebna stabilna filogenija, a konsenzus o srodstvenim odnosima četiri nebilaterijska koljena i Bilateria još nije postignut (vidi 3. poglavlje), ova metoda nije od velike pomoći za određivanje podrijetla gena (i struktura) u filogenetskom kontekstu divergencije od nastanka Metazoa do nastanka Bilateria (što pokrivaju, npr., pretpostavljene filogenije na Sl. 8.). Npr., čak i kad bismo bili sigurni u *Porifera–prve*, uz nepreciznu filogeniju Eumetazoa ne bismo mogli razlikovati jesu li se neki gen/struktura javili u internodiju koji vodi prema zajedničkom pretku (Placozoa + (Cnidaria + Bilateria)) ili u internodiju koji vodi prema zajedničkom pretku (Cnidaria + Bilateria) jer su obuhvaćeni istim filostratumom; npr., šestim u DOMAZET-LOŠO *et al.* (2007), sedmim u ŠESTAK & DOMAZET-LOŠO (2015). Genomska filostratigrafija trebala bi biti puno informativnija unutar samih Bilateria, u kojih su osnovni srodstveni odnosi stabilniji negoli oni između nebilaterijskih koljena i Bilateria (vidi 3. poglavlje). Još jedan fenomen upućuje kako rezultate dobivene metodom genomske filostratigrafije ne bismo smjeli uzimati zdravo za gotovo. Naime, ne procjenjuje se kad se određena struktura razvila, već kad je nastao njezin genski okvir (HOLLAND, 2015). DOMAZET-LOŠO *et al.* (2007) polaze od fenomena *gena osnivača* i pretpostavljaju razvoj genskog okvira i samih struktura u istim filostratumima, no s time se ne bi svi složili (npr. „Evolucija gena prethodi evoluciji morfologije“ (MINELLI, 2009; str. 31.); „Geni uključeni u organizaciju organa nastaju puno prije organa, a onda se kooptiraju u organiziranje organa (NIELSEN, 2012a; str. 11.)). Geni važni za staničnu adheziju i signaliziranje prisutni u jednostaničnih srodnika Metazoa (Sl. 16.), geni za sekretorne molekule specifične za živčani sustav u Porifera (u kontekstu *Porifera–prve*) (DUNN *et al.*, 2015) i ekspresija „mezodermalnih“ gena u Cnidaria koji nemaju mezoderm (TECHNAU *et al.*, 2015) primjeri su evolucije gena koja prethodi evoluciji struktura s kojima ih povezujemo. U jednoj od novijih

publikacija koja se bazira na ovoj metodi (ŠESTAK & DOMAZET-LOŠO, 2015; vidi 7. poglavlje), uzimaju se u obzir položaj Ctenophora te argument preadaptacije gena, kad filogenetski signali nisu u skladu s očekivanima. Osim toga, i bez preciznih filogenetskih signala u točno određenim internodijima, genomska filostratigrafija ipak može dati informaciju o relativnoj starosti gena. Rezultati DOMAZETA-LOŠE *et al.* (2007) tako impliciraju evolucijski slijed (gena za) ektoderm – endoderm – mezoderm. Koristeći filostratigrafski pristup, HASHIMSHONY *et al.* (2014) dobivaju endoderm kao najstariji zametni listić te predlažu da se javio s podrijetlom mnogostaničnosti Metazoa, zadržavajući prehrambeno djelovanje hoanoflaglatima nalik predaka.



Slika 26. Genomska filostratigrafija i podrijetlo zametnih listića.

Filostratigrafska mapa vinske mušice, *Drosophilla melanogaster* s 12 filostratuma koji odgovaraju internodijima na filogenetskom stablu. Geni vinske mušice iz pojedinačnog filostratuma jesu geni čiji *geni osnivači* (*founder genes*) potječu iz vremena pripadajućih internodija. Devijacije genske ekspresije u embriju pojedinih filostratuma u odnosu na frekvenciju ekspresije u cijelom uzorku prikazane su kao logaritmirane vrijednosti koeficijenta (*log-odds*) na y-osi. Vrijednost 0 tog parametra znači da se ekspresija u pripadajućem filostratumu i cijelom uzorku ne razlikuju, dok pozitivne, odnosno negativne vrijednosti impliciraju nadzastupljenost (*overrepresentation*), odnosno podzastupljenost (*underrepresentation*) ekspresije. Statistička važnost devijacija dana je kao p-vrijednost (*p-value*). Crvena, tamnoplava i svijetloplava strelica upućuju na značajne oscilacije u ekspresiji („vrhovi"; *peaks*) koje se mogu povezati s nastankom ektoderma (crveno), endoderma (tamnoplavo) i mezoderma (svijetloplavo). Pune crte ispod mape upućuju na tradicionalno viđenje podrijetla zametnih listića u odgovarajućem ključu boja (u kontekstu *Porifera–prve*), dok isprekidane crte upućuju na nastanak zametnih listića u evoluciji u skladu s dobivenim „vrhovima" (strelice). S interpretacijama dobivenim metodom genomske filostratigrafije valja biti oprezan (vidi tekst). Preuzeto iz: DOMAZET-LOŠO *et al.* (2007).

Ctenophora–prvi implicira postojanje gastrulacije u zajedničkog pretka Metazoa, no dosad nije predložen nijedan scenarij evolucije životnog ciklusa Metazoa koji polazi od Ctenophora kao sestrinske skupine ostalih recentnih Metazoa. Scenariji koji polaze od *Porifera–prve* predstavljeni u 5. poglavlju razlikuju se s obzirom na interpretaciju gasrtulacije/zametnih listića u Eumetazoa. Hoanoblasteja (Sl. 19.) i sinzoosporna teorija (Sl. 22.) polaze od gastreje u Eumetazoa (ne i Porifera), dok scenarij ADAMSKE (2016a) (Sl. 20.), u skladu s HAECKELOM (1874), uzima hoanoderm i pinakoderm spužvi homolognim s endodermom, odnosno ektodermom ostalih životinja. Za razumijevanje evolucije gastrulacije u Metazoa očito je središnji problem interpretacija gastrulacije i pojave zametnih listića u Porifera (NAKANISHI *et al.*, 2014). MALDONADO (2004) interpretira preuređivanje stanica u embriogenezi Porifera kao različite oblike gastrulacije (embolija, (selektivna) centrifugalna migracija, delaminacija, multipolarna ingresija, epibolija) (vidi Sl. 2. u MALDONADO, 2004). U razvoju spužve *Halisarca dujardini* (Demospongiae) prepoznaje blastocel koji kasnije obliterira i šupljinu koju interpretira kao arhenteron homologan onome u ostalih životinja (Sl. 5N). LEYS & EERKES-MEDRANO (2005) u spužve *Sycon* tražile su stadij gastrule „u potrazi za Haeckelovom gastrejom“ dajući (nakon četiri godine traganja!) prvi moderni nalaz invaginacije u vapnene spužve nakon HAECKELOVA (1872) opisa gastrule u spužvi (vidi Sl. 1E) i iznimnih fotomikrografa E. Hammera iz 1908. (vidi Sl. 6. u LEYS & EERKES-MEDRANO, 2005) koji su potvrdili postojanje tog stadija. Otvor koji nastaje invaginacijom ne odgovara kasnije uspostavljenom oskulumu niti šupljina koja nastaje invaginacijom odgovara „probavnoj šupljini“ spužvi te LEYS & EERKES-MEDRANO (2005) gastrulacijom ne smatraju uočenu invaginaciju tijekom metamorfoze, već diferencijaciju i organizaciju stanica tijekom embriogeneze koji dovode do uspostave ličinke, amfiblastule. Amfiblastula, karakteristična za Calcarea, sadrži kolumnarne cilijatne stanice na anteriornom te granularne necilijatne na posteriornom polu (Sl. 5O). Od anteriornih stanica nastaju svi unutarnji tipovi stanica (uključujući i hoanocite) te bazopinakoderm, a od posteriornih stanica egzopinakoderm (ERESKOVSKY, 2010). Na temelju svojih opažanja, LEYS & EERKES-MERDANO (2005) zaključuju kako je primarna uloga gastrulacije u uspostavljanju zametnih listića te da je formiranje probavila sekundarno uključeno u taj proces. S druge strane, morfogenezu u Porifera ERESKOVSKY & DONDUA (2006) ne smatraju gastrulacijom i predlažu da se morfogeneza staničnih slojeva javila u evoluciji Metazoa prije ustanovljivanja endoderma i ektoderma. NAKANISHI *et al.* (2014) također predlažu, na temelju nalaza nestabilnosti sudbine staničnih slojeva u *Amphimedon queenslandica*, evoluciju zametnih listića i gastrulacije u Eumetazoa od već postojećih razvojnih programa korištenih za aranžiranje stanica u prvih

Metazoa, ne smatrajući hoanoderm spužvi homolognim s endodermom, iako nalaze da se konzervirani marker endomezoderma, transkripcijski faktor GATA dosljedno eksprimira u unutarnjem sloju ličinki i mladih jedinki ove vrste. Sva ova razmatranja očito polaze od *Porifera–prve*. Problem gastrulacije u spužvi očito je pitanje definicije gastrulacije, odnosno je li to proces u kojem se formiraju zametni listići i probavilo ili proces u kojem se tijekom embriogeneze uspostavlja višeslojna građa organizma (ERESKOVSKY, 2010). Također, to je pitanje homologije/nehomologije staničnih slojeva spužvi i ostalih životinja. Valja imati na umu kako se u hoanocitima i njihovoj staničnoj liniji eksprimiraju geni koji imaju konzerviranu ekspresiju u endomezodermu što je mogućno indikativno za homologiju hoanoderma i endoderma (ADAMSKA, 2016b). Mogućnost *Ctenophora–prvi* otvara izazov u promišljanju evolucije morfogeneze spužvi od pretpostavljene gastrulacije u zajedničkog pretka krunskih Metazoa.

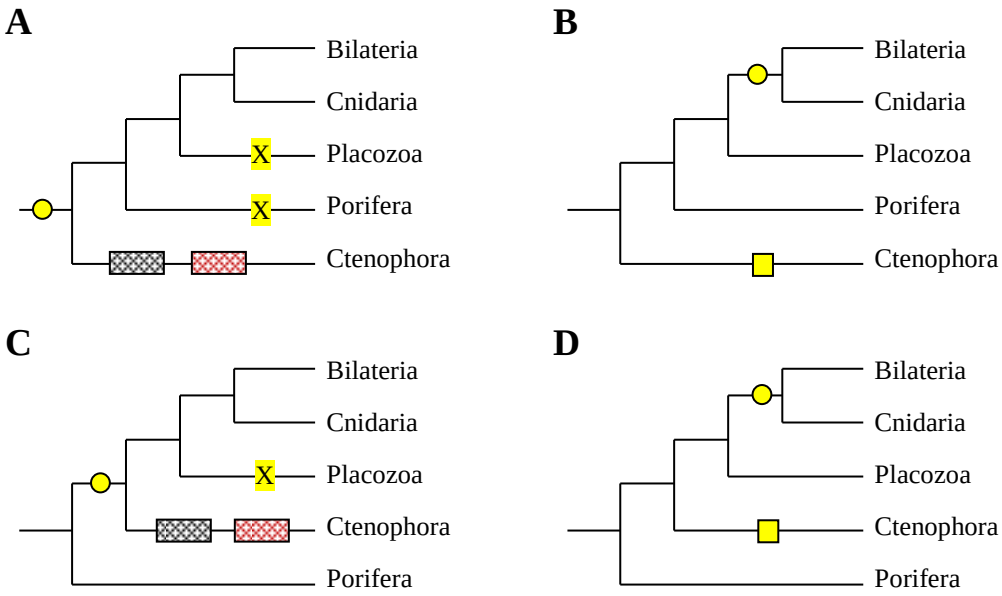
7. Evolucija živčanog sustava

Od pet skupina Metazoa (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria i Bilateria) živčani sustav imaju Ctenophora, Cnidaria i Bilateria. Tradicionalno polaženje od *Porifera–prve* implicira da se živčani sustav pojavio jednom u evoluciji Metazoa (npr. NIELSEN, 2008 uvodi naziv Neuralia za skupinu Cnidaria + Ctenophora + Bilateria, koja potječe od neurogastreje (Sl. 19.) i odlikuje se živčanim sustavom). Takav pogled više nije tako siguran zbog mogućnosti da su živčani sustavi Ctenophora i (Cnidaria + Bilateria) rezultat konvergentne evolucije. MOROZ *et al.* (2014) dobivaju Ctenophora kao sestrinsku skupinu ostalih Metazoa u koje se kao međustanični glasnici ne koriste serotonin, acetilkolin, dopamin, noradrenalin i drugi spojevi konzervirani kao neurotransmiteri u ostalih životinja sa živčanim sustavom. Osim toga, mnogi geni koji tipično sudjeluju u organizaciji živčanog sustava (među njima i Hox geni) nisu nađeni u Ctenophora. Hox geni ne eksprimiraju se ni u živčanim vrpcama Echinodermata (bodljikaša) (NIELSEN, 2015b). Na temelju navedene jedinstvenosti živčanog sustava u Ctenophora, grupa Moroza (MOROZ *et al.*, 2014; MOROZ, 2015) smatra da se živčani sustav u Ctenophora razvio neovisno od onoga u (Cnidaria + Bilateria). Zajedničko podrijetlo živčanog sustava u svih Metazoa impliciralo bi da su Ctenophora izgubili gene i neurotransmitere karakteristične za životinje te razvile vlastite neurotransmitere (MOROZ *et al.*, 2014). L-glutamat i sekretorni peptidi prvi su kandidati za neurotransmitere u Ctenophora (MOROZ, 2015). JÉKELY *et al.* (2015) oprezniji su u zaključivanju neovisnog podrijetla živčanog sustava na temelju osobitosti onoga u Ctenophora te favoriziraju jedinstveno podrijetlo s *Porifera–prve*. Na Sl. 27. dana su četiri evolucijska scenarija podrijetla živčanog sustava u kontekstu *Ctenophora–prvi* i *Porifera–prve*.

Jedna od važnih tema jest i evolucija živčanog sustava u Bilateria, odnosno pitanje homologije ili neovisne organizacije središnjeg živčanog sustava u Protostomia i Deuterostomia (SCHMIDT-RHAESA, 2007). ŠESTAK & DOMAZET-LOŠO (2015) metodom genomske filostratigrafije ribe zebrice (*Danio rerio*) nalaze tri glavne „faze“ u evolucijskom razvoju mozga kralježnjaka vezane za „Metazoa – Eumetazoa prijelaz“, postanak Chordata te postanak kralježnjaka. Najjači signali dobiveni za najveći dio dijelova mozga u filostratumu su koji vodi prema nastanku Chordata što implicira da je najveći dio organizacije mozga kralježnjaka bio prisutan u pretka Chordata. ŠESTAK & DOMAZET-LOŠO (2015) zaključuju kako se mozak kralježnjaka razvio neovisno o evoluciji središnjeg živčanog sustava u Protostomia. S druge strane, troheja teorija (Sl. 25.) (NIELSEN, 2015b) implicira homologiju središnjeg živčanog sustava Protostomia i Deuterostomia. Ventralne živčane vrpce položene uz izdužen i zatvoren blastopor s petljom oko usta i anusa ancestralno su stanje (Eu)Bilateria, prepoznatljivo u

mnogih Protostomia (NIELSEN, 2012a). NIELSEN (2015a, b) smatra neuralnu cijev kralježnjaka homolognu s ventralnim živčanim vrpcama Protostomia zbog čega bi oba središnja živčana sustava morfološki bila ventralna. Ovaj pogled ima podršku u usporedbi ekspresije gena (NIELSEN, 2015a). Očito je da konsenzus o usporedivosti živčanog sustava Protostomia i Deuterostomia nije dosgnut.

U 3. poglavlju u galeriji nebilaterijskih koljena dan je opis nekih senzornih struktura (uključujući i senzorne cilije u oskulumu spužvi), no evolucija različitih senzornih organa izvan je okvira ovoga rada.

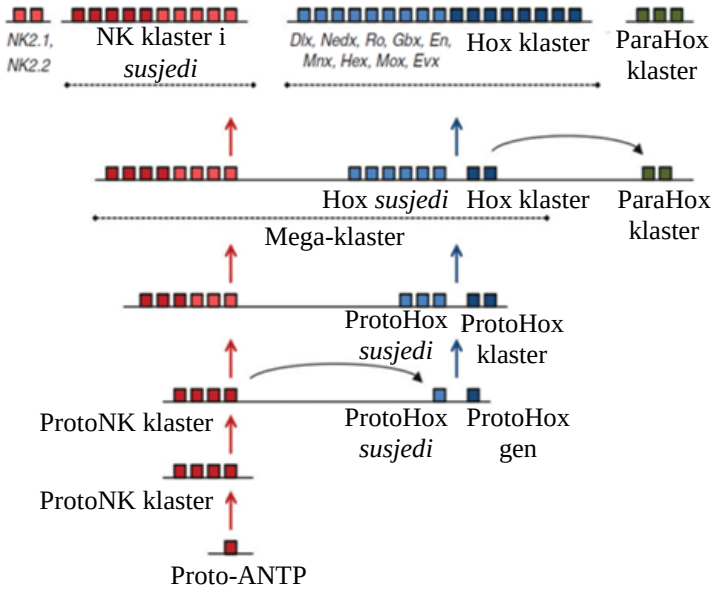


Slika 27. Četiri evolucijska scenarija nastanka živčanog sustava u Metazoa.
A i **B** – *Ctenophora–prvi*; **C** i **D** – *Porifera–prve*. **A** i **C** – homologija živčanog sustava svih Metazoa; **B** i **D** – neovisno podrijetlo živčanog sustava u Ctenophora i (Cnidaria + Bilateria). Prema **A** i **C**, živčani sustav bio je prisutan u zajedničkog pretka označenog s (○), što je u **A** zajednički predak krunskih Metazoa. To implicira da je u Ctenophora moralo doći do gubitka (▩) gena i neurotrasnmitera karakterističnih za živčani sustav ostalih Metazoa, a koji nisu nađeni u Ctenophora te do nastanka novih neurotransmitera u Ctenophora (▩) (MOROZ *et al.*, 2014). Scenariji **A** i **C** impliciraju gubitak živčanog sustava u Placozoa (**A** i **C**) i Porifera (**A**) (X). Usporedi s kladogramima na *proširenі podaci*-Sl. 10. u MOROZ *et al.* (2014) te Sl. 2. u JÉKELY *et al.* (2015).

8. Iz genskog repertoara rane evolucije Metazoa: evolucija ANTP gena

Dio genskog repertoara Metazoa za staničnu adheziju, stanično signaliziranje i regulaciju transkripcije stariji je od samih Metazoa te je prisutan i u jednostaničnih srodnika životinja, dok su neki geni obilježje isključivo Metazoa (Sl. 16.). Među posljednjima je i skupina ANTP gena, što je najveći od 11 razreda homeobox gena u Metazoa, kojima pripadaju Hox, ParaHox i NK geni (HOLLAND, 2013). Moguća evolucija ANTP gena i srodstveni odnosi Hox, ParaHox i NK gena prikazani su na Sl. 28. (GARCIA-FERNŔNDEZ, 2005; HOLLAND, 2013).

Filogenetska distribucija ANTP gena u pet skupina Metazoa dana je u Tablici 3. prema RYANU *et al.* (2010) i FORTUNATO *et al.* (2014). Sve skupine Metazoa imaju NK gene, dok Hox geni nisu nađeni u Ctenophora i Porifera. Uzimajući položaj najstarijeg recentnog koljena Metazoa neriješenim, RYAN *et al.* (2010) definirali su Placozoa + Cnidaria + Bilateria kao holofiletsku skupinu definiranu prisutnošću barem jednog Hox/ParaHox gena te predložili naziv ParaHoxozoa za tu skupinu. Taj prijedlog implicira da zajednički predak Metazoa nije imao Hox i ParaHox gene koji su se pojavili u zajedničkog pretka ParaHoxozoa (usporedi s predloženom evolucijom ANTP gena na Sl. 28.). RAMOS *et al.* (2012) postavili su hipotezu „duh lokusa" (*ghost loci*), nalazeći u genomu Placozoa (*Trichoplax*) i Porifera regije homologne homeobox regijama koje ne sadrže homeobox gene. Polazeći od *Porifera–prve*, predlažu da su Hox, ParaHox i NK geni bili prisutni u zajedničkog pretka Metazoa, dok su, npr. Hox i ParaHox geni izgubljeni u spužvi te na njihovim mjestima ostaju „duh lokusi". FORTUNATO *et al.* (2014) otkrili su jedan ParaHox gen u spužve *Sycon ciliatum* te, polazeći od Porifera kao „jakog kandidata" za najstariju recentnu skupinu Metazoa, podupiru hipotezu „duh lokusa". Nalazi RAMOS *et al.* (2012) i FORTUNATO *et al.* (2014) impliciraju da su sve tri glavne skupine ANTP gena postojale u zajedničkog pretka Metazoa, no ove publikacije ne uzimaju u obzir mogući položaj Ctenophora kao sestrinske skupine ostalih Metazoa. U skladu s navedenim nalazima i uzimajući u obzir obje filogenije prikazane na Sl. 8., dobivamo tri osnovna scenarija evolucije ANTP gena u Metazoa (Sl. 29.). Definiranje skupine ParaHoxozoa ima smisla samo u varijanti *Ctenophora–prvi* (Sl. 29A). Evolucijski scenariji na Sl. 29B, C impliciraju da se, ako se odvila kako je predloženo na Sl. 28., evolucija ANTP gena morala odviti u osnovnoj liniji Metazoa.

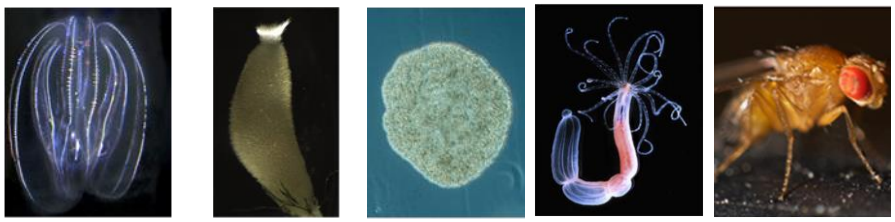


Slika 28. Moguća evolucija gena iz razreda ANTP, najvećeg razreda homeobox gena u Metazoa.

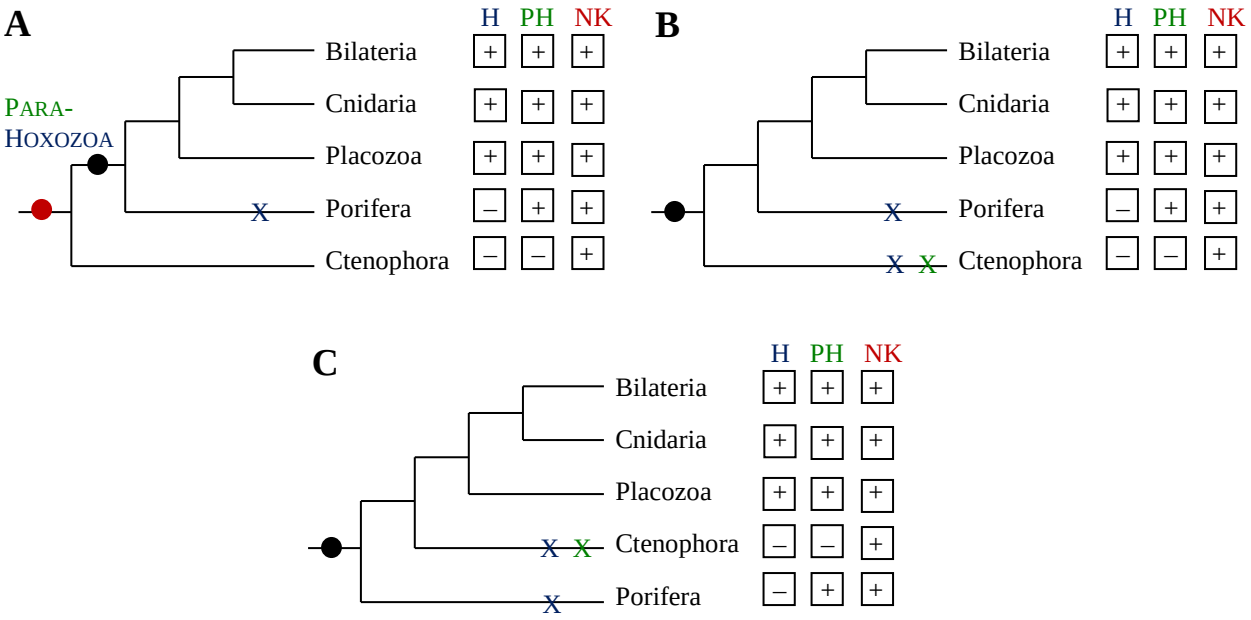
Ovaj evolucijski scenarij podrazumijeva zajedničko podrijetlo Hox, ParaHox i NK gena. Rezultat duplikacija ancestralnog (Proto-ANTP) gena jest nastanak ProtoNK klastera i ProtoHox klastera. Od ProtoNK klastera nastali su NK geni. Rezultat duplikacija ProtoHox gena jest pojava dva različita homeobox genska klastera, odnosno Hox klastera i ParaHox klastera. Ovaj evolucijski scenarij, dakle, predstavlja postanak Hox i ParaHox gena kao sestrinskih skupina gena od ProtoHox klastera, koji je mlađi od ProtoNK klastera. Prilagođeno prema: HOLLAND (2013); usporedi sa Sl. 3. u GARCIA-FERNÁNDEZ (2005).

Tablica 3. Distribucija pojedinih skupina ANTP homeobox gena (Hox, ParaHox i NK) u pet skupina Metazoa (Ctenophora, Porifera, Placozoa, Cnidaria, Bilateria).

„+“ označava prisutnost, a „–“ odsutnost pojedinih gena. Ancestralni eukarioti nisu imali ANTP gene koji su obilježje isključivo Metazoa. Placozoa, Cnidaria i Bilateria imaju sve tri skupine gena. Ctenophora imaju samo NK gene, a u spužve *Sycon* nađen je jedan ParaHox gen. U Porifera i Ctenophora nisu nađeni Hox geni. Napravljeno prema podacima iz: RYAN *et al.* (2010) (za sve osim *Sycon*); postojanje ParaHox gena u spužve *Sycon ciliatum* upisano prema: FORTUNATO *et al.* (2014).



ANTP	Ancestralni eukarioti	CTENOPHORA *Mnemiopsis*	PORIFERA *Amphimedon*[1] *Sycon*[2]	PLACOZOA *Trichoplax*	CNIDARIA *Nematostella*	BILATERIA *Drosophilla*/ čovjek
Hox	—	—	—	+	+	+
ParaHox	—	—	+[2] (—[1])	+	+	+
NK	—	+	+	+	+	+

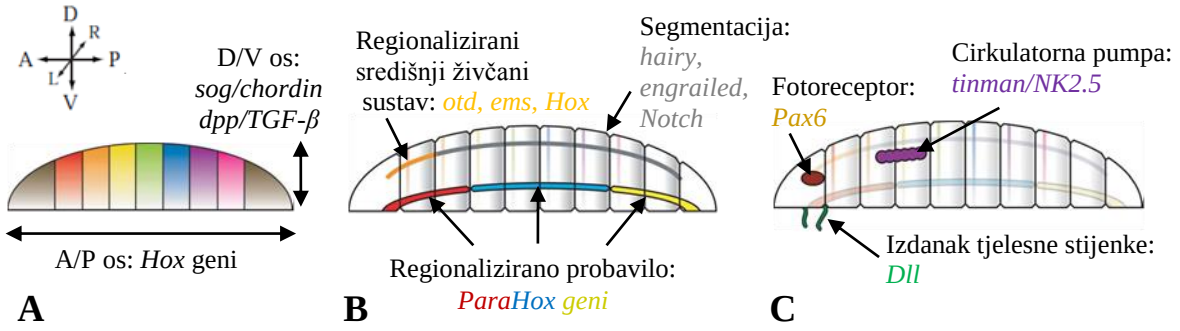


Slika 29. Tri scenarija evolucije ANTP gena u Metazoa.

Evolucijski scenariji utemeljeni su na dvjema mogućim filogenijama Metazoa prikazanim na Sl. 8. i distribuciji Hox, ParaHox i NK gena (H, PH i NK iznad stupaca s kvadratićima) u pet skupina Metazoa danoj u Tablici 3. „+" označava prisutnost, a „–" odsutnost pojedinih gena. Evolucijski scenariji polaze od pretpostavke da su Hox i ParaHox geni sestrinske skupine gena (vidi: GARCIA-FERNÁNDEZ; 2005 HOLLAND, 2013). X-evi u boji naznačuju gubitak Hox (plavo) i/ili ParaHox (zeleno) gena u odgovarajućim skupinama. **A** – *Ctenophora–prvi (I).* NK geni sinapomorfija su Metazoa, a Hox i ParaHox geni sinapomorfija su skupine koju se može označiti kao ParaHoxozoa, kojoj pripadaju i Porifera u kojih su izgubljeni Hox geni. Ovako definirana skupina ParaHoxozoa razlikuje se od one RYANA *et al.* (2010) (vidi tekst). **B** – *Ctenophora–prvi (II).* Hox, ParaHox i NK geni sinapomorfija su Metazoa. U Porifera su izgubljeni Hox, a u Ctenophora Hox i ParaHox geni. Pronalaženje duh-lokusa (*ghost loci*) ili *pravih* Hox i/ili ParaHox gena u Ctenophora ne smije se isključiti, na što ukazuje i nedavan (FORTUNATO *et al.*, 2014) nalaz ParaHox gena u spužvi (*Sycon*), u kojih su se smatrali odsutnima. **C** – *Porifera–prve.* Hox, ParaHox i NK geni sinapomorfija su Metazoa. U Porifera su izgubljeni Hox, a u Ctenophora Hox i ParaHox geni. Ukoliko se tri predložena evolucijska scenarija stave u kontekst s mogućom evolucijom ANTP gena prikazanom na Sl. 28., nastanak ProtoHox klastera morao se dogoditi prije divergencije ovdje označene skupine ParaHoxozoa (A), odnosno u osnovnoj liniji Metazoa, prije divergencije recentnih pet skupina Metazoa (B, C).

O ancestralnoj ulozi pojedinih skupina ANTP gena postoje različita mišljenja. Na temelju ekspresije pojedinih gena u trima zametnim listićima Bilateria moguće je postaviti hipotezu prema kojoj su rane bilateralno simetrične životinje koristile tri skupine ANTP gena za uspostavljanje građe tri glavna embrionalna organska sustava: živčane vrpce (Hox), probavila (ParaHox) i mezoderma (NK) što ugrubo odgovara trima zametnim listićima, pri čemu to ne bi bili jedini geni uključeni u spomenute procese (HOLLAND, 2013) (usporedi s „urbilateria" rekonstruiranim prema konzerviranosti gena i njihovih razvojnih funkcija u Protostomia i Deuterostomia prema CARROLLU *et al.*, 2005; Sl. 30.). Nasuprot tomu, za Hox gene, koji kodiraju za transkripcijske faktore koji aktiviraju različite razvojne programe uzduž antero-

posteriorne osi u Bilateria (MALLO & ALONSO, 2013), ARENAS-MENA (2010) predlaže da je ancestralna uloga Hox gena bila u formiranju gonada, a ne antero-posteriorne diverzifikacije.



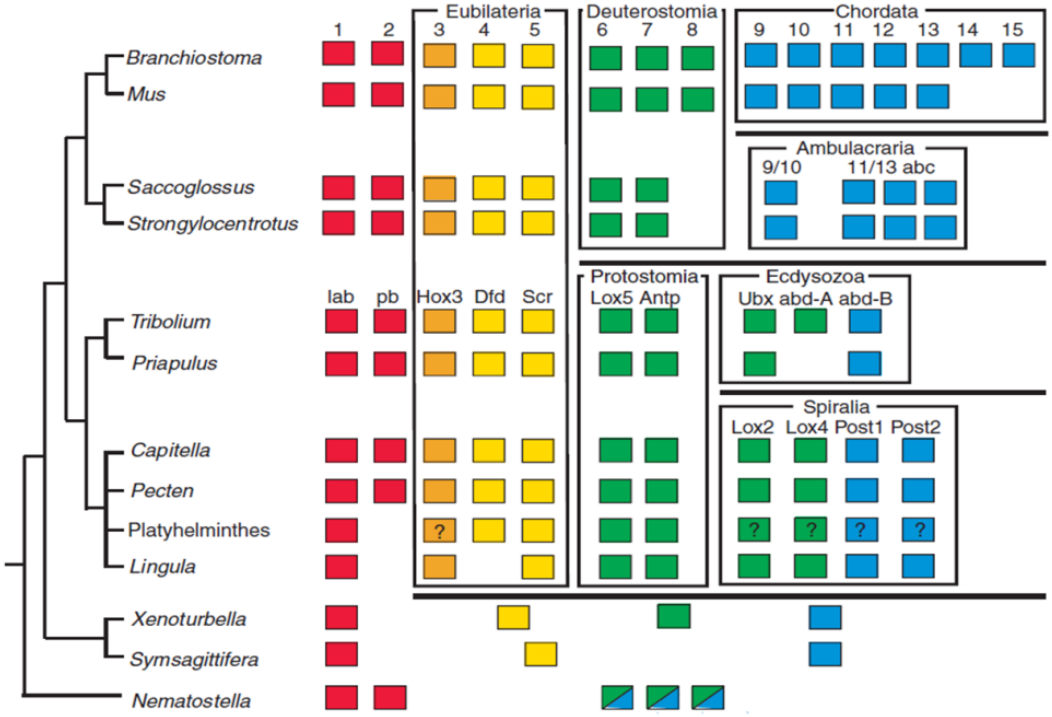
Slika 30. Moguće (i manje vjerojatne) osobine zajedničkog pretka (Eu)Bilateria („urbilateria“) dobivene na temelju konzerviranosti gena i njihovih razvojnih funkcija između Protostomia (Arthropoda: *Drosophila*) i Deuterostomia (Chordata: miš).

A – Kontrola D/V (dorzoventralne) i A/P (anteroposteriorne) osi. A/P os vjrojatno je podijeljena preklapajućim domenama ekspresije Hox gena; **B** – Različita tkiva regionalno su raspoređena duž A/P osi. U regionaliziranju probavila sudjelovali su ParaHox, a u regionaliziranju središnjeg živčanog sustava Hox geni. Naznačen je i genski repertoar uključen u segmentaciju. **C** – „Primitivne“ inačice fotoreceptora, cirkulatorne pumpe i izdanka tjelesne stjenke mogli su biti prisutni u pretka (Eu)Bilateria pod kontrolom gena Pax6, tinman, odnosno Dll. Kurzivom su u (A, B, C) naznačeni geni važni za navedene procese. Prilagođeno prema CARROLL *et al.* (2005). Napomena: Danas je stabilno mišljenje kako su se segmentacija i vaskularne strukture javljali više puta neovisno (npr. DUNN *et al.*, 2014) te je malo vjerojatno da je predak (Eu)Bilateria imao cirkulatorni sistem s kontraktilnom žilom; prisutnost gena u zajedničkog pretka ne mora nužno značiti postojanje strukture, gen je mogao imati različitu funkciju ili kontrolirati osnovne stanične procese (SCHMIDT-RHAESA, 2007). Što se fotoreceptora tiče, „višestruka *de novo* evolucija očiju ili homologija svih očiju nisu jedine mogućnosti i jasno je da se pravo stanje nalazi negdje između“ (SCHMIDT-RHAESA, 2007, str. 146.).

8.1. Filogenetski *potpis* Hox gena

Hox geni prisutni su u Placozoa, Cnidaria i svih Bilateria (RYAN *et al.*, 2010; vidi Tablicu 3.). U Placozoa poremećaj u njihovoj ekspresiji zaustavlja binarno dijeljenje/rast (TWEEDT & ERWIN, 2015), dok se u žarnjaka *Nematostella* većina Hox gena eksprimira u endodermu duž direktivne osi što upućuje da možda sudjeluju u definiranju položaja mezenterija (septi) (TECHNAU *et al.*, 2015). U Bilateria su instrument u organizaciji organa duž antero-posteriorne osi (NIELSEN, 2012a). „Puni“ klaster od 10 – 15 Hox gena imaju samo Eubilateria (Protostomia + Deuterostomia) (MINELLI, 2009; NIELSEN, 2012a). Evolucija Hox gena u Eubilateria uključuje (1) postanak novih gena duplikacijom, (2) duplikaciju cijelog genoma u kralježnjaka (preciznije, zajedničkog pretka Gnathostomata, čeljustoustih) te (3) gubitak određenih Hox gena (u Nematoda, oblića, primjerice, došlo je do značajnog gubitka) (MINELLI, 2009). Na Sl. 31. prikazani su Hox geni žarnjaka (*Nematostella*) i predstavnika

izabranih skupina Bilateria. Vidljivo je kako glavne skupine Eubilateria imaju karakteristične Hox genske „potpise“.



Slika 31. Evolucija Hox gena u Eubilateria i njihov filogenetski „potpis“

Hox geni iste ortologne skupine (homologni Hox geni) prikazani su istom bojom: anteriorni geni (crveno), skupina tri gena (narančasto/žuto), centralna skupina (zeleno) i posteriorna skupina (plavo). Hox filogenetski *potpis* Eubilateria čine skupina tri gena i dva najanteriornija gena centralne skupine. Protostomia i Deuterostomia te dvije grane Protostomia (Spiralia = Lophotrochozoa i Ecdysozoa) i Deuterostomia (Ambulararia i Chordata) (vidi Sl. 9.) također imaju svoj Hox *potpis* što je uočljivo na slici. U zajedničkog pretka Gnathostomata došlo je do dvostruke duplikacije cijelog genoma, no za miša (*Mus*na ovoj je slici prikazan samo jedan od četiri klastera. Priazani su Hox geni sljedećih Metazoa: Cnidaria (*Nematostella*), Acoelomorpha (*Symsagittifera* i *Xenoturbella*), Spiralia (Brachiopoda: *Lingula*; Plat(y)helminthes; Mollusca: *Pecten*; Annelida: *Capitella*), Ecdysozoa (Priapulida: *Priapulus*; Arthropoda: *Tribolium*), Ambulacraria (Echinodermata: *Strongylocentrosus*; Hemichordata: *Saccoglossus*), Chordata (Vertebrata: *Mus*; Cephalochordata: *Branchiostoma*). Preuzeto iz: NIELSEN (2012a).

9. Zaključak

Prva moderna definicija životinja potječe od HAECKELA (1872, 1874) koji je nacrtao prvo filogenetsko stablo Metazoa. Od njegova vremena, filogenija i evolucija Metazoa predmet su velikog interesa i suprostavljenih mišljenja. Danas je poznato i opće prihvaćeno da su Choanoflagellata i Metazoa sestrinske skupine, osnovna filogenija Bilateria stabilna je, a najveći izazov u filogeniji Metazoa predstavljaju srodstveni odnosi između četiri nebilaterijska koljena i Bilateria, s Ctenophora i Porifera kao najjačim kandidatima za mjesto sestrinske skupine ostalih Metazoa. Rezultati PISANIJA *et al.* (2015) sugeriraju kako bi *Porifera–prve* koncept ponovno mogao dosegnuti stabilnost, no pitanje je još uvijek otvoreno. Stabilna filogenija na *bazi* stabla Metazoa od najveće je važnosti za razumijevanje njihove rane evolucije i postizanje konsenzusa oko *bazalne* filogenije smanjilo bi broj trenutno predloženih evolucijskih scenarija.

Bilo da potječu od početka kambrija ili su stare 700 – 800 milijuna godina, kako sugerira metoda molekularnog sata, u ranoj evoluciji Metazoa važnu ulogu igrali su genski i razvojni *alat*, ekologija i interakcija s abiotskim okolišem. Dio genskog repertoara za staničnu adheziju, signaliziranje i regulaciju transkripcije Metazoa dijele sa svojim jednostaničnim srodnicima što implicira da je u ranoj evoluciji Metazoa bila važna kooptacija postojećih gena u nove funkcije, u skladu s primijećenim fenomenom da geni često prethode morfologiji koju oblikuju. Zbog toga je važno kritički pristupati interpretacijama o podrijetlu struktura u životinjskoj evoluciji temeljenih na metodi genomske filostratigrafije, jedne od novijih paradigmi utemeljenih u traganju za razumijevanjem evolucije životinja.

Evolucijski scenariji koji pokušavaju objasniti podrijetlo Metazoa uglavnom polaze od *Porifera–prve*, osim „nove plakula teorije“ koja implicira da su prve Metazoa bile slične recentnim Placozoa, što nije u skladu s novijim molekularnim filogenijama. Dosad nije predložen nijedan evolucijski scenarij koji polazi od *Ctenophora–prvi* koncepta, a prema kojemu bi najstarije poznate krunske Metazoa bile razmjerno složeni organizmi s gastrulacijom, živčanim i mišićnim sustavom te prohodnim probavilom.

Apomorfne osobine Metazoa jesu mnogostaničnost (NIELSEN, 2012a); stvaranje spolnih stanica mejozom (oogeneza i spermatogeneza) (DUNN *et al.*, 2014); epitel (LEYS & RIESGO 2012), (neki) (među)stanični spojevi (SCHMIDT-RHAESA, 2007) i kolagen IV (DUNN *et al.*, 2014) (4. poglavlje); signalni putovi Wnt i TGF-β (ADAMSKA, 2016b) (uz mogućnost osnog strukturiranja od strane Wnt gena kao apomorfije) (4. poglavlje); ineksini (MOROZ *et al.*, 2014) (7. poglavlje); ANTP geni (barem NK) (8. poglavlje).

Kada se i koliko puta u ranoj evoluciji Metazoa javio živčani sustav, kad se javila gastrulacija, a kad Hox i ParaHox geni još uvijek su neriješena pitanja koja djelomično ovise i o nestabilnosti *bazalne* filogenije. Budući da se u hoanodermu spužvi eksprimiraju „endomezodermalni“ geni, homologija građevnog plana spužvi i drugih životinja nije isključena.

Molekularna biologija, s paradigmama poput EvoDevo biologije, od iznimne je važnosti za razumijevanje evolucije i filogenije životinja. Ipak, ona nije svemoćna, što ilustrira i nepostojanje konsenzusa oko srodstvenih odnosa između nebilaterijskih koljena i Bilateria. S druge strane, činjenica da su autori poput Haeckela i Hatscheka u 19. stoljeću ustanovili neke evolucijske ili filogenetske ideje koje su danas prihvaćene ili o kojima se raspravlja i u recentnoj literaturi (uključujući i fenomen rekapitulacije i evolucijski stadij gastreje u nekim recentnim teorijama o podrijetlu Metazoa i evoluciji njihova životnog ciklusa), govori kako je proučavanje morfologije također jako važno, što zaboravljaju neki molekularni biolozi koji „novom filogenijom“ nazivaju neke odnose utemeljene prije više od stoljeća.

10. Zahvale

Zahvaljujem Dragici Laći Šuljak, nastavnici biologije iz osnovne škole, što je u meni probudila interes za zoologiju, a dr. sc. Milenku Miloviću, gimnazijskom profesoru biologije, što je kao strastveni botaničar strpljivo slušao moje besjede o Metazoa. Kolegi Josipu Skeji zahvaljujem što mi je na prvoj godini studija produbio interes za beskralježnjake i evoluciju Metazoa. Zahvaljujem izv. prof. dr. Renati Matoničkin Kepčija, dr. Maji Adamskoj i prof. dr. sc. Goranu Klobučaru na pomoći s pribavljanjem literature. Posebno zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Damjanu Franjeviću, svojemu mentoru, za vođenje ovoga završnog rada, a svojoj obitelji na iskazanom strpljenju.

11. Literatura

ADAMSKA, M. (2016a). Sponges as the Rosetta Stone of Colonial-to-Multicellular Transition. U: Multicellularity. Origins and Evolution. Cambridge, Massachusetts.

ADAMSKA, M. (2016b). Sponges as models to study emergence of complex animals. *Current Opinion in Genetics & Development*, *39*, 21-28.

ADL, S. M. *et al.* (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *59*(5), 429-514.

ADL, S. M. *et al.* (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *52*(5), 399-451.

AGUINALDO, A. M. A., TURBEVILLE, J. M., LINFORD, L. S., RIVERA, M. C., GAREY, J. R., RAFF, R. A., & LAKE, J. A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, *387*(6632), 489-493.

ARENAS-MENA, C. (2010). Indirect development, transdifferentiation and the macroregulatory evolution of metazoans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *365*(1540), 653-669.

BAGUÑÀ, J., MARTINEZ, P., PAPS, J., & RIUTORT, M. (2008). Back in time: a new systematic proposal for the Bilateria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *363*(1496), 1481-1491.

BARTOLOMAEUS, T., & AX, P. (1992). Protonephridia and Metanephridia-their relation within the Bilateria. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *30*(1), 21-45.

BIGGELAAR, J. V. D., EDSINGER-GONZALES, E., & SCHRAM, F. R. (2002). The improbability of dorso-ventral axis inversion during animal evolution, as presumed by Geoffroy Saint Hilaire. *Contributions to Zoology*, *71*, 29-36.

BORISENKO, I., ADAMSKI, M., ERESKOVSKY, A., & ADAMSKA, M. (2016). Surprisingly rich repertoire of Wnt genes in the demosponge Halisarca dujardini.*BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1.

BOURLAT, S. J., NIELSEN, C., ECONOMOU, A. D., & TELFORD, M. J. (2008). Testing the new animal phylogeny: a phylum level molecular analysis of the animal kingdom. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*(1), 23-31.

BRIGGS, D. E. (2015). The Cambrian explosion. *Current Biology*, *25*(19), R864-R868.

BRUSCA, R.C. AND BRUSCA, G.J. (2003). *Invertebrates*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA.

BUDD, G. E. (2013). At the origin of animals: the revolutionary Cambrian fossil record. *Current genomics*, *14*(6), 344-354.

CANNON, J. T., VELLUTINI, B. C., SMITH, J., RONQUIST, F., JONDELIUS, U., & HEJNOL, A. (2016). Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature*, *530*(7588), 89-93.

CARROLL S. B., GRENIER J. K.,WEATHERBEE S. D. (2005). *From DNA to Diversity*. 2nd ed. Blackwell Publishing.

COLLINS, A. G., SCHUCHERT, P., MARQUES, A. C., JANKOWSKI, T., MEDINA, M., & SCHIERWATER, B. (2006). Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic biology*, *55*(1), 97-115.

CRASKE, A. J., & JEFFERIES, R. P. S. (1989). A new mitrate from the Upper Ordovician of Norway, and a new approach to subdividing a plesion.*Palaeontology*, *32*(1), 69-99.

DARWIN, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection.* John Murray, London.

DAYRAT, B. (2003). The roots of phylogeny: how did Haeckel build his trees? *Systematic Biology*, *52*(4), 515-527.

DEGNAN, B. M., ADAMSKA, M., RICHARDS, G. S., LARROUX, C., LEININGER, S., BERGUM, B., CALCINO, A., TAYLOR, K., NAKANISHI, N., DEGNAN, S. M. (2015). Porifera. U: *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1* (pp. 65-106). Springer Vienna.

DOMAZET-LOŠO, T., KLIMOVICH, A., ANOKHIN, B., ANTON-ERXLEBEN, F., HAMM, M. J., LANGE, C., & BOSCH, T. C. (2014). Naturally occurring tumours in the basal metazoan Hydra. *Nature communications*, *5*.

DOMAZET-LOŠO, T., & TAUTZ, D. (2010). A phylogenetically based transcriptome age index mirrors ontogenetic divergence patterns. *Nature*, *468*(7325), 815-818.

DOMAZET-LOŠO, T., BRAJKOVIĆ, J., & TAUTZ, D. (2007). A phylostratigraphy approach to uncover the genomic history of major adaptations in metazoan lineages. *Trends in Genetics*, *23*(11), 533-539.

DUNN, C. W., LEYS, S. P., & HADDOCK, S. H. (2015). The hidden biology of sponges and ctenophores. *Trends in ecology & evolution*, *30*(5), 282-291.

DUNN, C. W., GIRIBET, G., EDGECOMBE, G. D., & HEJNOL, A. (2014). Animal phylogeny and its evolutionary implications. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, *45*, 371-395.

ERESKOVSKY, A.V. (2010). *The Comparative Embryology of Sponges.* Springer, Dordrecht.

ERESKOVSKY, A. V., & DONDUA, A. K. (2006). The problem of germ layers in sponges (Porifera) and some issues concerning early metazoan evolution. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, *245*(2), 65-76.

FAIRCLOUGH, S. R. (2015). Choanoflagellates: Perspective on the Origin of Animal Multicellularity. U: *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* (pp. 99-116). Springer Netherlands.

FORTUNATO, S. A., ADAMSKI, M., RAMOS, O. M., LEININGER, S., LIU, J., FERRIER, D. E., & ADAMSKA, M. (2014). Calcisponges have a ParaHox gene and dynamic expression of dispersed NK homeobox genes. *Nature, 514*(7524), 620-623.

FOX, D. (2016). What sparked the Cambrian explosion? *Nature, 530*(7590), 268-270.

FRANC, J. M. (1978). Organization and function of ctenophore colloblasts: an ultrastructural study. *The Biological Bulletin, 155*(3), 527-541.

GARCIA-FERNÀNDEZ, J. (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature Reviews Genetics, 6*(12), 881-892.

HADŽI, J. (1963). *The evolution of the Metazoa*. Pergamon Press.

HADŽI, J. (1953). An attempt to reconstruct the system of animal classification. *Systematic Biology, 2*(4), 145-154.

HAECKEL, E. (1866). *Generelle Morphologie der Organismen.* Georg Reimer, Berlin.

HAECKEL, E. (1872). *Die Kalkschwämme. Eine Monographie.* Georg Reimer, Berlin.

HAECKEL, E. (1874). Die Gastraea-Theorie, die phylogenetische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblatter. *Jena. Z. Naturw*. 8 : 1–55, 51 pl. [Pročitano u engleskom prijevodu E. P. Wrighta kao: HAECKEL, E. (1874). *The* Gastraea-Theory, *the* Phylogenetic Classification *of the* Animal Kingdom *and the* Homology *of the* Germ-Lamellae. *Quarterly journal of microscopical science*, 142-165; 223-247]

HALANYCH, K. M. (2015). The ctenophore lineage is older than sponges? That cannot be right! Or can it?. *Journal of Experimental Biology, 218*(4), 592-597.

HALANYCH, K. M., BACHELLER, J. D., AGUINALDO, A. M. A., & LIVA, S. M. (1995). Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science, 267*(5204), 1641.

HASHIMSHONY, T., FEDER, M., LEVIN, M., HALL, B. K., & YANAI, I. (2015). Spatiotemporal transcriptomics reveals the evolutionary history of the endoderm germ layer. *Nature, 519*(7542), 219-222.

HATSCHEK, B. 1888. *Lehrbuch der Zoologie, 1. Lieferung*, pp.1–144. Gustav Fischer, Jena.

HEJNOL, A. (2015). Acoelomorpha and Xenoturbellida. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1* (pp. 203-214). Springer Vienna.

HEJNOL, A., & MARTINDALE, M. Q. (2009). The mouth, the anus, and the blastopore—open questions about questionable openings. *Animal Evolution: Genomes, Fossils, and Trees*, 33-40.

HOGG, J. (1860). On the distinctions of a plant and an animal and on a Fourth Kingdom of Nature. *Edinburgh New Phil J*, NS 12:216–225

HOLLAND, L. Z. (2015). The origin and evolution of chordate nervous systems. *Phil. Trans. R. Soc. B*, *370*(1684), 20150048.

HOLLAND, P. W. (2013). Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *2*(1), 31-45.

HÖRANDL, E., & STUESSY, T. F. (2010). Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon*, *59*(6), 1641-1653.

HYMAN, L. H. (1964). The Phylogeny of the Lower Metazoa. *The Quarterly Review of Biology*, *39*(3), 276-279. [Osvrt na knjigu: HADŽI (1963)]

HYMAN, L.H. (1940). *The Invertebrates, vol. 1. Protozoa through Ctenophora.* McGraw-Hill, New York

JAGER, M., DAYRAUD, C., MIALOT, A., QUÉINNEC, E., LE GUYADER, H., & MANUEL, M. (2013). Evidence for involvement of Wnt signalling in body polarities, cell proliferation, and the neuro-sensory system in an adult ctenophore. *PLoS One*,*8*(12), e84363.

JÄGERSTEN, G. (1972). *Evolution of the Metazoan Life Cycle.* Academic Press, London.

JANSSEN, R., JÖRGENSEN, M., LAGEBRO, L., & BUDD, G. E. (2015). Fate and nature of the onychophoran mouth–anus furrow and its contribution to the blastopore. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *282*(1805), 20142628.

JÉKELY, G., PAPS, J., & NIELSEN, C. (2015). The phylogenetic position of ctenophores and the origin (s) of nervous systems. *EvoDevo*, *6*(1), 1.

JONDELIUS, U., RUIZ-TRILLO, I., BAGUÑÀ, J., & RIUTORT, M. (2002). The Nemertodermatida are basal bilaterians and not members of the Platyhelminthes. *Zoologica Scripta*, *31*(2), 201-215.

KRAUS, Y., AMAN, A., TECHNAU, U., & GENIKHOVICH, G. (2016). Pre-bilaterian origin of the blastoporal axial organizer. *Nature communications*, *7*.

KUSSEROW, A. *et al.* (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature*, *433*(7022), 156-160.

LEYS, S. P. (2015). Elements of a 'nervous system' in sponges. *Journal of Experimental Biology*, *218*(4), 581-591.

LEYS, S. P., & HILL, A. (2012). 1 The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues. *Advances in marine biology*, *62*, 1-56

LEYS, S. P., & RIESGO, A. (2012). Epithelia, an evolutionary novelty of metazoans. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.), 318(6)*, 438-447.

LEYS, S. P., NICHOLS, S. A., & ADAMS, E. D. (2009). Epithelia and integration in sponges. Integrative and comparative biology, icp038.

LEYS, S. P., & EERKES-MEDRANO, D. (2005). Gastrulation in calcareous sponges: in search of Haeckel's gastraea. *Integrative and comparative biology*, *45*(2), 342-351.

LINNAEUS, C. (1735). *Systema Naturć sive Regna Tria Naturć systematice proposita per Classć, Ordines, Genera, & Species*. Theod. Haack, Lugdunum Batavorum.

VON LINNÉ, C. (1766). *Systema naturae per regna tria naturae secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis; editio duodecima.-Holmiae, Salvius 1766-1768* (Vol. 1). Salvius.

LUDEMAN, D. A., FARRAR, N., RIESGO, A., PAPS, J., & LEYS, S. P. (2014). Evolutionary origins of sensation in metazoans: functional evidence for a new sensory organ in sponges. *BMC evolutionary biology*, *14*(1), 1.

MAGIE, C. R., & MARTINDALE, M. Q. (2008). Cell-cell adhesion in Cnidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis. *The Biological Bulletin*,*214*(3), 218-232.

MAH, J. L., CHRISTENSEN-DALSGAARD, K. K., & LEYS, S. P. (2014). Choanoflagellate and choanocyte collar-flagellar systems and the assumption of homology. *Evolution & development*, *16*(1), 25-37.

MALDONADO, M. (2004). Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebrate Biology*, *123*(1), 1-22.

MALLO, M., & ALONSO, C. R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development*, *140*(19), 3951-3963.

MARSHALL, C. R. (2006). Explaining the Cambrian "explosion" of animals. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, *34*, 355-384.

MARTÍN-DURÁN, J. M., JANSSEN, R., WENNBERG, S., BUDD, G. E., & HEJNOL, A. (2012). Deuterostomic development in the protostome *Priapulus caudatus*.*Current Biology*, *22*(22), 2161-2166.

MARTINDALE, M. Q., & HENRY, J. Q. (2015). Ctenophora. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1* (pp. 179-201). Springer Vienna.

MATONIČKIN, I., HABDIJA, I., PRIMC-HABDIJA, B. (1998). *Beskralješnjaci: biologija nižih avertebrata*. Školska knjiga.

MIKHAILOV *et al.* (2009). The origin of Metazoa: a transition from temporal to spatial cell differentiation. *Bioessays*, *31*(7), 758-768.

MINELLI, A. (2009). *Perspectives in animal phylogeny and evolution*. Oxford University Press.

MOROZ, L. L. (2015). Convergent evolution of neural systems in ctenophores. *Journal of Experimental Biology*, *218*(4), 598-611.

MOROZ, L. L. *et al.* (2014). The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature*, *510*(7503), 109-114.

NAKANISHI, N., SOGABE, S., & DEGNAN, B. M. (2014). Evolutionary origin of gastrulation: insights from sponge development. *BMC biology*, *12*(1), 1.

NIELSEN, C. (2015a). Larval nervous systems: true larval and precocious adult. *Journal of Experimental Biology*, *218*(4), 629-636.

NIELSEN, C. (2015b). Evolution of deuterostomy–and origin of the chordates. *Biological Reviews*.

NIELSEN, C. (2013). Life cycle evolution: was the eumetazoan ancestor a holopelagic, planktotrophic gastraea? *BMC evolutionary biology*, *13*(1), 1.

NIELSEN, C. (2012a). *Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla*, 3rd edn. (Oxford University Press: Oxford.)

NIELSEN, C. (2012b). How to make a protostome. *Invertebrate systematics*,*26*(1), 25-40.

NIELSEN, C., & Parker, A. (2010). Morphological novelties detonated the Ediacaran—Cambrian "explosion". *Evolution & development*, *12*(4), 345-345.

NIELSEN, C. 2010. The 'new phylogeny'. What is new about it? *Palaeodiversity* 3 (Suppl.) : 149–150.

NIELSEN, C. (2008). Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae?. *Evolution & development*, *10*(2), 241-257.

NIELSEN, C. (1985). Animal phylogeny in the light of the trochaea theory. *Biological Journal of the Linnean Society*, *25*(3), 243-299.

NIKLAS, K. J., COBB, E. D., & KUTSCHERA, U. (2016). Haeckel's Biogenetic Law and the Land Plant Phylotypic Stage. *BioScience*, biw029.

PETERSON, K. J., MCPEEK, M. A., & EVANS, D. A. (2005). Tempo and mode of early animal evolution: inferences from rocks, Hox, and molecular clocks. *Paleobiology*, *31*(S2), 36-55.

PHILIPPE, H. *et al.* (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Current Biology*, *19*(8), 706-712.

PISANI, D. *et al.* (2015). Genomic data do not support comb jellies as the sister group to all other animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(50), 15402-15407.

PRESNELL, J. S., VANDEPAS, L. E., WARREN, K. J., SWALLA, B. J., AMEMIYA, C. T., & BROWNE, W. E. (2016). The Presence of a Functionally Tripartite Through-Gut in Ctenophora Has Implications for Metazoan Character Trait Evolution. *Current Biology*.

RAMOS, O. M., BARKER, D., & FERRIER, D. E. (2012). Ghost loci imply Hox and ParaHox existence in the last common ancestor of animals. *Current Biology*,*22*(20), 1951-1956.

RICHARDS, R. J. (2008). *The tragic sense of life: Ernst Haeckel and the struggle over evolutionary thought*. University of Chicago Press.

ROUSE, G. W., WILSON, N. G., CARVAJAL, J. I., & VRIJENHOEK, R. C. (2016). New deep-sea species of *Xenoturbella* and the position of Xenacoelomorpha.*Nature*, *530*(7588), 94-97.

RUIZ-TRILLO, I. (2016). What Are the Genomes of Premetazoan Lineages Telling Us about the Origin of Metazoa? U: *Multicellularity: Origins and Evolution*, 171.

RYAN, J. F., PANG, K., MULLIKIN, J. C., MARTINDALE, M. Q., & BAXEVANIS, A. D. (2010). The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa.*EvoDevo*, *1*(1), 1.

SCAMARDELLA, J. M. (2010). Not plants or animals: a brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protoctista. *International Microbiology*, *2*(4), 207-216.

SCHIERWATER, B., & EITEL, M. (2015). Placozoa. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1* (pp. 107-114). Springer Vienna.

SCHIERWATER, B. *et al.* (2010). *Trichoplax* and Placozoa: one of the crucial keys to understanding metazoan evolution. *Key transitions in animal evolution*, *289*, 326.

SCHIRRMEISTER, B. E., ANTONELLI, A., & BAGHERI, H. C. (2011). The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC evolutionary biology*, *11*(1), 1.

SCHMIDT-RHAESA, A. (2007). *The Evolution of Organ Systems.* Oxford University Press, Oxford.

ŠESTAK, M. S., & DOMAZET-LOŠO, T. (2015). Phylostratigraphic profiles in zebrafish uncover chordate origins of the vertebrate brain. *Molecular biology and evolution*, *32*(2), 299-312.

SHARPE, S. C., EME, L., BROWN, M. W., & ROGER, A. J. (2015). Timing the origins of multicellular eukaryotes through phylogenomics and relaxed molecular clock analyses. In *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* (pp. 3-29). Springer Netherlands.

SMITH, C. L. *et al.* (2014). Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Current Biology*, *24*(14), 1565-1572.

SUGA, H., & RUIZ-TRILLO, I. (2015). Filastereans and Ichthyosporeans: Models to Understand the Origin of Metazoan Multicellularity. In *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* (pp. 117-128). Springer Netherlands.

TECHNAU, U., GENIKHOVICH, G., & KRAUS, J. E. (2015). Cnidaria. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1* (pp. 115-163). Springer Vienna.

TWEEDT, S. M., & ERWIN, D. H. (2015). Origin of metazoan developmental toolkits and their expression in the fossil record. In *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* (pp. 47-77). Springer Netherlands.

VALENTINE, J. W., & MARSHALL, C. R. (2015). Fossil and Transcriptomic Perspectives on the Origins and Success of Metazoan Multicellularity. In *Evolutionary Transitions to Multicellular Life* (pp. 31-46). Springer Netherlands.

WILLMER, P. 1990. *Invertebrate Relationships. Patterns in Animal Evolution.* Cambridge University Press, Cambridge

WHELAN, N. V., KOCOT, K. M., MOROZ, L. L., & HALANYCH, K. M. (2015). Error, signal, and the placement of Ctenophora sister to all other animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(18), 5773-5778.

WÖRHEIDE, G., DOHRMANN, M., ERPENBECK, D., LARROUX, C., MALDONADO, M., VOIGT, O., BORCHIELLINI, C. & LAVROV, D. V. (2012). 1 Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera). *Advances in marine biology*, *61*, 1.

ZHANG, S. *et al.* (2016). Sufficient oxygen for animal respiration 1,400 million years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(7), 1731-1736.

12. Sažetak

Prva moderna definicija životinja potječe od Haeckela koji je uveo ime Metazoa za holofiletsku skupinu koja potječe od gastreje. Od tada, mnogi su strastveno raspravljali o filogeniji i evoluciji Metazoa. U ovom radu dan je povijesni kontekst nekih filogenetskih i evolucijskih ideja o kojima se raspravlja ili su prihvaćene danas, kao i vremenski kontekst rane evolucije Metazoa u vezi s fenomenom kambrijske „eksplozije“. Galerija portreta četiri nebilaterijska koljena dana je za razumijevanje ideja o podrijetlu gena i struktura u ranoj evoluciji životinja, s naglaskom na neke pogrešne postavke i najnovija otkrića. Opće je prihvaćeno kako su hoanoflagelati sestrinska skupina Metazoa te su ovi i drugi jednostanični srodnici životinja važni za razumijevanje podrijetla životinjske mnogostaničnosti. Iako su osnovni srodstveni odnosi Bilateria dobro podržani, nema konsenzusa o srodstvenim odnosima između nebilaterijskih koljena, s Ctenophora i Porifera predloženima kao mogućim sestrinskim skupinama ostalih Metazoa, zbog čega je još teže razumjeti podrijetlo, primjerice, gastrulacije, živčanog sustava i ANTP gena. Dana je i rasprava drugih važnih tema, kao što su sam nastanak Metazoa od jednostaničnih (ili kolonijalnih) predaka i podrijetlo prohodnog probavila u Eubilateria. Dan je popis predloženih apomorfija Metazoa. Zaključeno je kako je molekularna biologija jako važan, ali ne i svemoguć alat za razumijevanje evolucije životinja te da morfologija, čiju raznolikost želimo objasniti, zaslužuje jednaki interes.

13. Summary

The first modern definition of animals goes back to Haeckel who introduced the name Metazoa for a holophyletic group descended from gastraea. Since then, many have passionately discussed the phylogeny and evolution of metazoans. In this paper, historical context for some phylogenetic and evolutionary ideas being discussed or accepted today is given, as well as temporal context for the early evolution of Metazoa dealing with the phenomenon of Cambrian "explosion". A gallery of portraits of four non-bilaterian phyla is given to understand the ideas about origin of genes and structures in early animal evolution, with emphasis on some misconceptions and most recent findings. It is universally accepted that choanoflagellates are sister group of metazoans, and these and other unicellular relatives of metazoans are important for understanding the origin of animal multicellularity. Although the main phylogenetic relationships of Bilateria are well suported, there is no general agreement on the relationships between non-bilaterian phyla, with Ctenophora and Porifera both proposed to be sister groups to all other metazoans, making it even more difficult to understand the origin of, for example, gastrulation, nervous system and ANTP genes. Discussion of other important topics, like the very origin of metazoans from their unicellular (or colonial) ancestors and the origin of through-gut in Eubilateria is also given. The list of proposed animal apomorphies is given. It is concluded that molecular biology is very important, but not omnipotent tool for understanding animal evolution, and that morphology, the diversity of which we want to explain, deserves equal interest.