

Adaptivní fylogeografie: od molekulárních markerů k funkčním genům

Současné rozšíření rostlin a živočichů mírného pásu je výsledkem kolonizace během oteplení na konci poslední doby ledové přibližně před 10 tisíci lety, kdy druhy postupovaly z glaciálních refugií do dříve neobyvatelných oblastí, především ve vyšších zeměpisných šířkách. Paleontologie přinesla v tomto směru řadu důležitých informací, ale naše současná představa, které populace konkrétních druhů sloužily jako zdroj kolonizace Evropy, vychází zejména z poznatků získaných využitím genetických metod. Hlavní zásluhu má vědní disciplína fylogeografie, studující historické vztahy mezi populacemi na základě porovnání DNA jejich příslušníků. V průběhu posledních 25 let vycházely tyto studie z předpokladu, že genetické vlastnosti dnešních populací odrážejí vlastnosti té populace, která dané území kolonizovala jako první. Nové výsledky však ukazují, že v některých případech byla jedna populace po kolonizaci určité oblasti částečně nebo úplně nahrazena jinou, přicházející z odlišného refugia. Faktorem určujícím, která populace se šířila na úkor jiné, by pak byla schopnost zástupců jednotlivých populací obstát v konkurenci. Populace pocházející z konkrétního refugia tak mohou obývat určitá území ne z čistě geografických důvodů (jako je např. blízkost refugia nebo nepřítomnost migrační bariéry), ale proto, že podmínky a přírodní výběr v daném refugiu upřednostnily vlastnosti přinášející výhodu během kolonizace (např. vyšší reprodukční potenciál, efektivnější termoregulaci nebo odolnost vůči parazitům). Přístup zohledňující takové adaptivní rozdíly mezi populacemi označujeme jako adaptivní fylogeografie.

Vnitrodruhová fylogeografie

Principy fylogeografie poprvé formuloval americký přírodovědec John Avise se svými kolegy. V průkopnické práci zveřejněné v r. 1987 v časopise *Annual Reviews in Eco-*

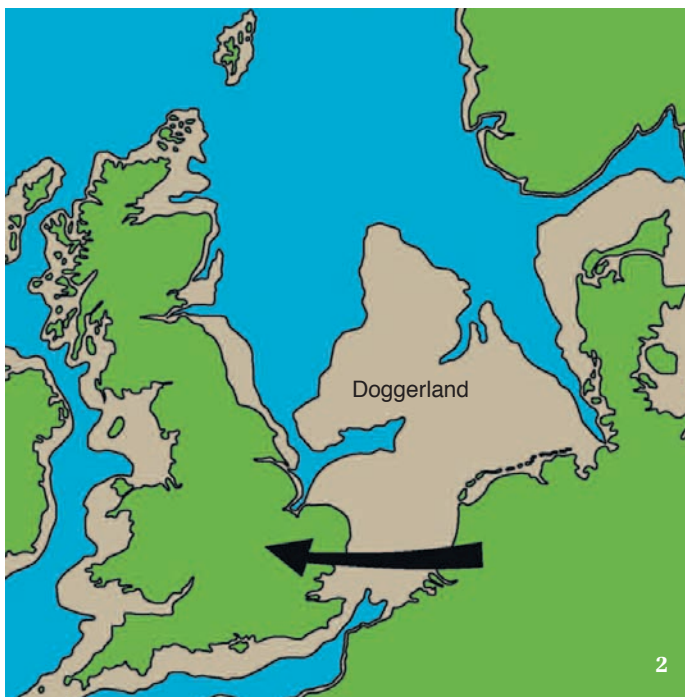
logy and Systematics charakterizují fylogeografii jako studium vztahů mezi rodokmenem zástupců stejného druhu a jejich geografickým původem. Vymezuji tak nový vědní obor vůči tradiční fylo genetice, je-

jmž cílem je rekonstrukce vztahů mezi různými druhy, často reprezentovanými pouze jediným zástupcem, jehož geografický původ navíc není rozhodující. Pro fylogeografické studie je naopak podstatná snaha o důkladné pokrytí areálu studovaného druhu, protože pouze zhodnocením příbuznosti jedinců a potažmo populací z různých oblastí – včetně glaciálních refugií a kolonizovaných území – lze získat ucelený obrázek o historii a šíření druhu.

Obvyklý postup zahrnuje určení nukleotidové sekvence vybraného úseku DNA – markeru – zvláště pro každého jedince a na základě podobnosti sekvencí zrekonstruování příbuzenských vztahů jejich nositelů v podobě genealogického stromu (sekvencování předcházelo určování rozdílů v DNA jednoduššími metodami, především štěpením restriktčními enzymy). Genealogie markeru představuje vlastně ekvivalent fylo genetického stromu, kde ale na konci větví jsou sekvence jedinců stejného druhu (alely genu). Území obývaná blízkými příbuznými jedinci, tedy se stejnou nebo velmi podobnou sekvencí DNA, potom byla s největší pravděpodobností kolonizována z jedné zdrojové populace – glaciálního refugia. Oblasti, kde se naopak potkávají geneticky odlišné populace (se značně odlišnými sekvencemi), zpravidla tvoří geografické bariéry nebo zóny, kde se setkaly kolonizační cesty z různých glaciálních refugií. Naprostá většina fylogeografických studií vychází z předpokladu, že faktory určující, které oblasti byly osídleny z kterého glaciálního refugia, nezáležely

1 Ostrov Raasay při západním pobřeží Skotska drobní savci kolonizovali ještě před jeho oddělením od Velké Británie. V pozadí ostrov Skye

2 Na konci doby ledové byla Velká Británie spojena s Evropou pevninským mostem nazývaným Doggerland, který sloužil jako kolonizační cesta. Tání pevninského ledovce mělo za následek vzestup mořské hladiny a přerušení pevninského mostu přibližně před 8,5 tisíci let. Podle: B. J. Coles (1998), upraveno

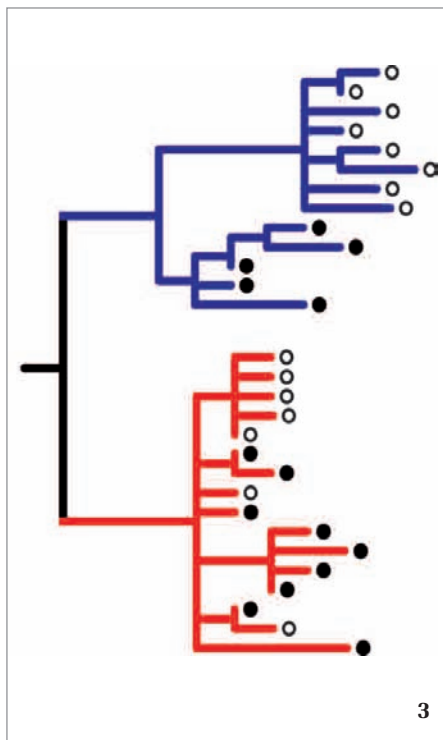


na genetických odlišnostech mezi populacemi. Rozdíly v sekvencích DNA tak závisejí pouze na tom, jestli jejich nositelé pocházejí ze stejné nebo z různých populací, přičemž v druhém případě přibližně odrážejí dobu, po kterou populace oddělovala geografická bariéra. Rozdíly v sekvencích DNA mezi různými zástupci téže populace pak závisejí na velikosti určité populace, jak současné, tak v minulosti. Takové markery, kde nositel jedné sekvence není zvýhodněn přírodním výběrem (selekcí) oproti nositeli jiné sekvence, označujeme jako neutrální. Neutrální markery mohou být úseky DNA neobsahující žádný gen, anebo takové, kde rozdíly mezi sekvencemi nemají vliv na funkci výsledného produktu kódovaného daným genem. Dříve nebylo příliš důvodů pochybovat, že fylogeografie většiny druhů skutečně neutrální je, a nebyla podstatně ovlivněna přírodním výběrem. Cílem přírodního výběru však může být kterýkoli gen v genomu bez ohledu na to, jaký jsme si zvolili marker. Není proto vyloučené, že mezi populacemi existovaly rozdíly přinášející během kolonizace některým z nich výhodu oproti jiným i v případě, že rozdíly v sekvencích markeru jsou výhradně neutrální.

Keltský lem rejsků a hrabošů ve Velké Británii

Tento pohled zcela změnil výsledky nedávného porovnání fylogeografie drobných savců ve Velké Británii. V práci zveřejněné v r. 2009 v časopise *Proceeding of the Royal Society of London* jsme s kolegy z Anglie, Skotska a Irsku ukázali, že v nejméně pěti případech – u dvou druhů rejsků a tří druhů hrabošů – byla Velká Británie krátce po sobě osídlena dvěma geneticky odlišnými populacemi, z nichž každá pocházela z jiného glaciálního refugia. Velkou Británií během poslední doby ledové pokrýval ledovec a byla součástí evropského kontinentu, s nímž ji spojoval pevninský most v místě dnešního Severního moře – tzv. Doggerland (obr. 2). S postupujícím oteplováním se táním pevninského ledovce začaly zvyšovat hladiny moří, až došlo k zatopení Doggerlandu a přerušení spojení s Británií, která se tak přibližně před 8,5 tisíci let stala ostrovem. Jako marker byla ve čtyřech z těchto pěti případů zvolena mitochondriální DNA (mtDNA), přesněji jeden z genů mtDNA – gen pro protein cytochrom *b*, který je součástí enzymatického komplexu tvořícího článek buněčného dýchacího řetězce (jen u rejska obecného byly porovnány chromozomy). Od samých počátků fylogeografie byla mtDNA jako marker první volbou – v na-prostě většině studií v uplynulých 25 letech vědci použili k rekonstrukci vnitrodruhových genealogických vztahů mtDNA.

U všech pěti druhů – rejska obecného a r. malého (*Sorex araneus* a *S. minutus*), hraboše mokřadního (*Microtus agrestis*), hryzce vodního (*Arvicola terrestris*) a norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*, obr. 6) – tvoří fylogeografii v Británii dvě hlavní genealogické linie (obr. 3). Jejich rozšíření se navzájem nepřekrývají a populace v okrajových částech Británie – ve Skotsku a jižní Anglii (v případě rejsků i Walesu), patří k jiné než populace v centrální části ostrova (obr. 4). Vysvět-



3 Genealogické vztahy norníků rudých (*Clethrionomys glareolus*) z Velké Británie (černé kroužky) a z kontinentální Evropy (prázdné kroužky) zrekonstruované porovnáním sekvencí mitochondriální DNA. Norníci v Británii patří ke dvěma genealogickým liniím, které obě přišly z kontinentu. Orig. P. Kotlík

4 až 6 Keltský lem norníka rudého (obr. 6) – jednoho z druhů, které na konci doby ledové kolonizovaly Velkou Británii ve dvou vlnách, přičemž druhí, později přichází kolonisté nahradili ty první. Blíže v textu. Rozšíření genealogických linií prvních (modře) a druhých (červeně) kolonistů je zobrazeno zvlášť pro mitochondriální DNA (obr. 4) a pro hemoglobin (obr. 5). Přerušované čáry na obr. 5 vyznačují hranice Skotska, Walesu a Cornwallu. Podle: J. B. Searle a kol. (2009), upraveno

7 V kulturní krajině Anglie (zde Cornwall) jsou typickým biotopem norníka zarostlé břehy cest (banks – odtud anglický název norníka bank vole). lením je scénář, kdy v případě každého z druhů byla první přichází populace v Anglii částečně nahrazena druhou přicházející z jiného refugia a nesoucí odlišnou mtDNA. Blízká podobnost rozšíření okrajových linií rejsků a hrabošů s oblastmi obývanými kulturně a geneticky svébytnými národy hovořícími keltskými jazyky (skotskou gaelštinou, irštinou, velštinou, manštinou a kornštinou) inspirovala označení fylogeografie britských drobných savců termínem Keltský lem.

Fylogeografie mtDNA rejsků a hrabošů ve Velké Británii ukázala, že populace určitého území nemusí nutně být tou populací, která dané území kolonizovala jako první. Vyvolává ale také především otázku, co bylo hnacím motorem, který způsobil, že později přichází na tak velkém území vytlačili a nahradili ty první. A byla skutečně první populace nahrazena tou druhou, nebo proběhla pouze výměna mtDNA?

Ať už šlo o nahrazení populace nebo jen několika genů, jakou úlohu mohl sehrát přírodní výběr upřednostňující vlastnosti zástupců populace pocházející z jednoho glaciálního refugia před zástupci populace z jiného refugia? Najít odpovědi na tyto otázky měl výzkumný projekt, v němž jsme se soustředili na jeden z pěti případů Keltského lemu – na norníka rudého.

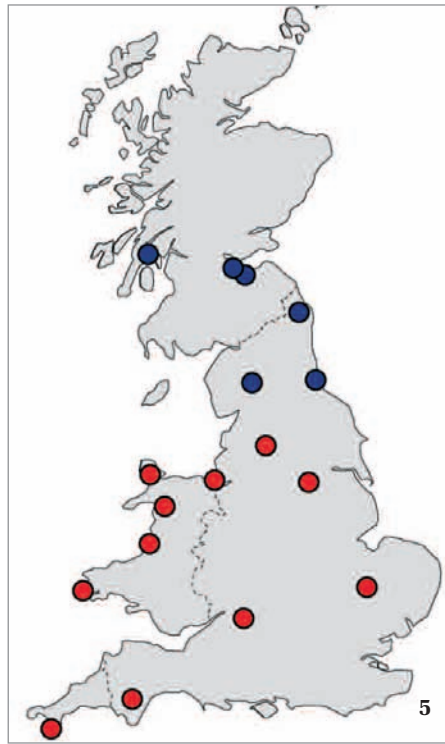
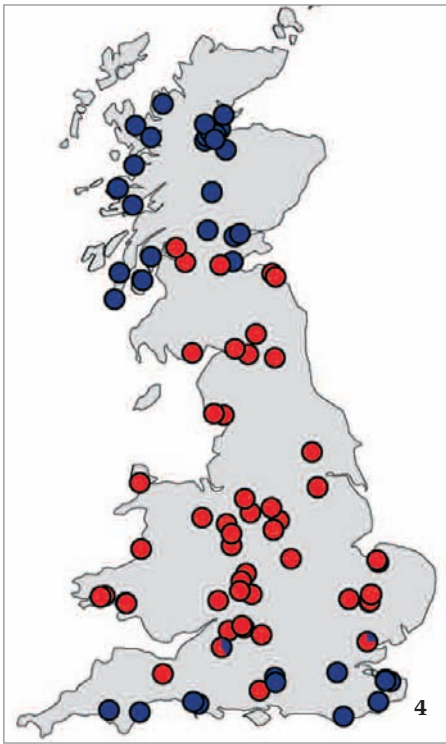
Evoluce mitochondriální DNA norníka rudého

Všech 37 genů obsažených v mtDNA tohoto druhu tvoří jednu vazebnou skupinu, protože mtDNA je předávána mezi generacemi jako celistvá molekula a dědí se jen od matky, aniž by docházelo k mísení s geny od otce (tzv. maternální a klonální dědičnost). To znamená, že pokud by některý z genů byl cílem přírodního výběru, bude jím ovlivněna celá mtDNA. Porovnáním sekvencí kompletního mitochondriálního genomu (více než 16 tisíc nukleotidů) několika zástupců obou britských populací norníka jsme však nezjistili žádné rozdíly, které by poukazovaly na funkční odlišnosti mezi mtDNA prvního a druhého kolonisty. Jejich mtDNA nevykazovala zvýšenou četnost záměn aminokyselin, jež by mohla být důsledkem přírodního výběru. Pouze na jedné pozici jediného genu – pro cytochrom *b* – jsme zjistili významnou změnu fyzikálně-chemických vlastností, konkrétně záměnu aminokyselin alanin za threonin, jejichž postranní řetězce se liší svým objemem (u alaninu je tvořen jedinou metylovou skupinou, zatímco u threoninu jednu hydroxylovou a jednu metylovou skupinou). Přestože tyto rozdíly mohou ovlivňovat funkci enzymatického komplexu, jehož je cytochrom *b* součástí (k záměně došlo v prostoru vazebného místa pro koenzym Q), mutace se vyskytovala v sekvencích zástupců jak prvního, tak druhého kolonisty, a není tak příliš pravděpodobné, že by při kolonizaci přinášela výhodu jedné populaci oproti druhé.

Genomický gradient

Fakt, že všechny geny mtDNA mají stejnou genealogii, také znamená, že pokud chceme zjistit, zda různé části genomu ukazují na stejnou historii nahrazení jedné populace druhou, musíme obrátit pozornost ke genům jaderné DNA. Ta obsahuje mnohonásobně větší počet genů než mtDNA (v genomu laboratorní myši odhadem přibližně 25 tisíc; genom norníka nebyl doposud popsán). Jaderné geny se dědí od matky i od otce, a to nejen nezávisle jeden na druhém, ale také na mtDNA. Bylo tak teoreticky možné, že po příchodu druhých kolonistů do té původní populace pronikla pouze jejich mtDNA a kromě ní žádný, nebo jen několik málo genů jaderné DNA. Nemuselo tedy jít o skutečné nahrazení jedné populace druhou, ale pouze o přenos genů. Vzhledem k vysokému počtu genů v jaderné DNA by nebylo příliš efektivní určit sekvenci jednoho genu po druhém a pro každý rekonstruovat genealogický strom. Na druhou stranu omezit se na jediný, nebo na několik genů by zase neposkytlo reprezentativní obrázek o historii celého genomu.

Zvolili jsme proto trochu jiný přístup, který využívá technologického pokroku



v sekvenování DNA. Tyto nové technologie, označované jako sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS), umožňují v jednom experimentu získat velké množství sekvencí (obvykle několik milionů) reprezentujících většinu genů z genomu daného druhu, a to hned pro několik různých jedinců najednou (jejich DNA se nejprve individuálně označí). Problém spočívá v tom, že dopředu nevíme, která sekvence pochází z kterého genu. Vstupním materiálem je totiž celková DNA (nebo RNA odpovídající genům aktivním v určitém orgánu, např. slezině, mediátorová RNA, viz dále), navíc z technických důvodů předem fragmentovaná na krátké úseky – kratší než většina genů. Je tedy nejprve nutné vzájemným porovnáním jednotlivých sekvencí určit, které náležejí ke stejnému genu, a z nich potom sekvenci genu sestavit. Tento velmi náročný postup se neobejde bez výkonného počítače. Při použití odpovídající výpočetní kapacity a moderních algoritmů je však docela dobře proveditelný, a tak v dalším kroku mohou být k získaným referenčním sekven-

cím jednotlivých genů zpětně přiřazeny původní krátké sekvence. Tentokrát jde vždy pouze o ty, které pocházejí z DNA konkrétního jedince, a celý postup se zopakuje pro každého jedince zvlášť. Pečlivým srovnáním sekvencí určitého jedince s referenční sekvencí příslušného genu je pak možné identifikovat rozdíly u daného jedince, i rozdíly mezi jedinci navzájem, a to pro každý z genů. Metody NGS tak umožňují poměrně rychle a s relativně nízkými náklady (v porovnání s tradičním sekvenováním jednoho genu po druhém) porovnat sekvence tisíců genů mezi desítkami jedinců stejného druhu. Takové množství dat posouvá fylogeografii na zcela novou úroveň, protože lze srovnávat populace skutečně v genomickém měřítku.

Vzhledem k množství genů a charakteru dat získaných technikami NGS již není praktické vztahy mezi různými jedinci a populacemi vyjadřovat formou genealogických stromů (pracovali bychom s tisíci různými genealogiemi). Stále častěji se proto uplatňují výpočetní metody, které namísto celých sekvencí genů pracují pouze s poly-

morfními nukleotidovými pozicemi, tedy těmi, kde se někteří jedinci odlišují od referenční sekvence genu, a tím od ostatních jedinců ze stejné nebo jiné populace. Tyto polymorfní nukleotidové pozice se označují SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Pro každého jedince potom můžeme porovnáním jeho genotypů na jednotlivých pozicích SNP s frekvencemi genotypů stejných SNP v různých populacích vypočítat příměs genů z těchto populací v jeho genomu. Tak lze např. v genomu jedinců z různých částí areálu určit podíl genů původem z jednotlivých glaciálních refugií, a tím i hranice mezi oblastmi kolonizovanými z konkrétních refugií, nebo také případy, kdy při kolonizaci došlo k promíchání genů mezi populacemi z více refugií.

V naší genomické studii Keltského lemu normíka rudého jsme tímto postupem zjistili genotypy na více než 10 tisících pozicích SNP, z nichž navíc každá leží v jiném genu, a to celkem pro 39 normíků z 6 různých lokalit. Takový počet markerů znamená, že máme možnost udělat si poměrně přesnou představu o podílu genů obou kolonizujících populací v genomu normíků z různých částí Británie. Na obr. 8 je pro každého z 39 normíků modře znázorněn podíl genů v jeho genomu s původem v populaci, která ostrov kolonizovala jako první, a červeně podíl genů z druhé příchozí populace. Na první pohled je zřejmé, že se podíl genů obou populací liší mezi normíky z různých lokalit. Genom jedinců z okolí skotského města Aberdeen, nejseverněji položené lokality v naší studii, neobsahuje žádné zjištělé stopy po příměsi genů pocházejících z druhé populace. Znamená to, že 100 % jejich genů je původem z populace, která Británii osídlila první. Oproti tomu přes 50 % genomu normíků z okolí Edinburghu na jihu Skotska již tvoří geny druhých kolonistů, a směrem k jihu podíl jejich genomu dále vzrůstá. V genomu normíků z anglických lokalit Doncasteru a Gloucesteru tak již převládají geny v pořadí druhé kolonizující populace, a na nejjihnějších lokalitách v hrabstvích Cornwall a Devon dokonce nenajdeme žádné stopy genomu populace příchozí do Británie jako první. Analýza markerů SNP tak ukazuje zřetelný severojižní gradient v příměsi genů druhé kolonizující populace –



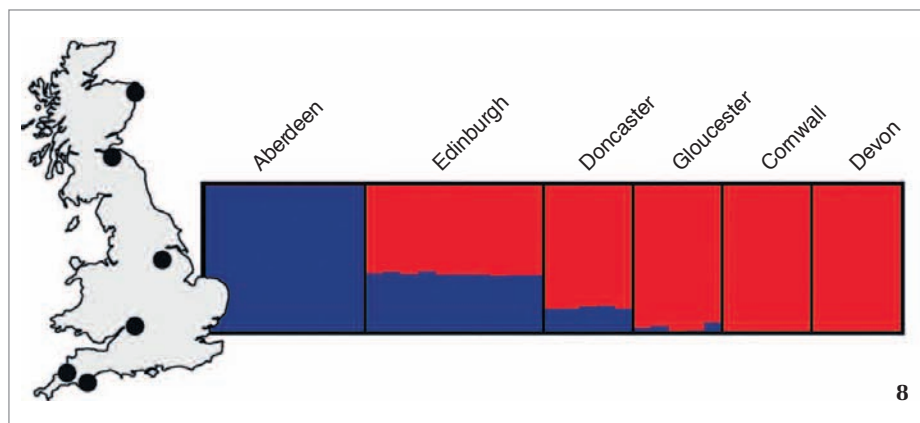
pouze nejsevernější populace si zachovala původní genom, zatímco v obou nejjižnější položených populacích už genom prvního kolonisty zcela nahradily geny druhého příchozího.

Genomická fylogeografie tak potvrzuje scénář, na který poukázala mtDNA, tedy že první příchozí populace norníků byla v Anglii skutečně nahrazena tou druhou, která se sem rozšířila později a přišla z jiného glaciálního refugia. Můžeme vyloučit možnost, že do genomu britských norníků po prvotní kolonizaci pronikla pouze mtDNA nebo maximálně několik málo jaderných genů druhých kolonistů. Fakt, že jde o skutečné nahrazení jedné populace druhou, nezbytně vyvolává otázku, jakou úlohu mohl sehrát přírodní výběr upřednostňující vlastnosti populace pocházející z jednoho glaciálního refugia před populací z jiného refugia. Protože již víme, že samotná mtDNA zdrojem selekční výhody nebyla, je třeba hledat funkční rozdíly zakódované v jaderném genomu. V tomto směru pomohla náhoda, která nás přivedla na stopu fyziologické odlišnosti norníků druhé kolonizující populace, která je za určitých podmínek mohla učinit z hlediska přírodního výběru úspěšnějšími.

Rozdíly v hemoglobinu

V r. 1979 publikoval student univerzity v Cambridge Stephen Hall vědeckou práci v časopise *Journal of Zoology*, ve které ukázal, že norníci ze Skotska a severní Anglie mají odlišný hemoglobin než norníci z jihu Británie (obr. 5). S. Hall, dnes emeritní profesor na univerzitě v Lincolnu v Lincolnshiru ve východní Anglii, tehdy porovnal pohyblivost hemoglobinu u zvířat z různých částí země, od Cornwallu po Edinburgh, metodou gelové elektroforézy, která oddělí varianty proteinů lišící se celkovým nábojem (součtem záporných a kladných nábojů jednotlivých aminokyselin, z nichž se protein skládá). Zjistil, že norníci z lokalit jižně od města Doncaster nesli elektronegativnější (více záporně nabitý, a tudíž při elektroforéze rychleji se pohybující) hemoglobin (HbF, z anglického fast – rychlý), než byl hemoglobin norníků ze severu (HbS, slow – pomalý). Pozoruhodné bylo, že se na žádné z lokalit v celé Británii nevyskytovaly oba typy hemoglobinu současně.

Přestože gelová elektroforéza neposkytla žádné informace o funkčních odlišnostech HbS a HbF, vyhraněná geografická rozšíření obou, strukturně zjevně odlišných typů hemoglobinu, vedla S. Halla k vyslovení domněnky, že rozdíly mezi populacemi na severu a na jihu Británie jsou výsledkem působení přírodního výběru, který z nějakého důvodu upřednostňuje HbS na severu a HbF na jihu. Kromě funkčních rozdílů mezi oběma typy hemoglobinu, a tím i možného cíle přírodního výběru, zůstal nevyjasněný původ tohoto polymorfismu – že Velkou Británii postupně kolonizovaly dvě populace norníka, jsme popsali o 30 let později. Stephen Hall ještě pracoval s hypotézou, že jedna z variant vznikla v Británii z té druhé (HbS z HbF, nebo opačně). My dnes víme, že norníci nesoucí HbF jsou potomky druhých kolonistů, kteří si HbF přinesli z kontinentu a na jihu ostrova vytlačili a nahradili ty



první, nesoucí HbS. Zajímalo nás proto, jaké rozdíly v molekulární struktuře hemoglobinu jsou zodpovědné za elektroforetické rozdíly mezi HbS a HbF a jaký význam mají z hlediska funkce a potažmo přírodního výběru.

Izolace genů pro hemoglobin

Hemoglobin je protein tvořený čtyřmi polypeptidovými řetězci (globinovými podjednotkami), dva jsou typu alfa a dva typu beta. Jde tedy o tetramerní protein, jehož molekulární strukturu primárně určuje složení jednotlivých podjednotek, přesněji jejich aminokyselinové sekvence. Klíčem k poznání rozdílů struktury HbS a HbF proto bylo určení rozdílů sekvencí genů kódujících jednotlivé globinové podjednotky. Hemoglobin savců je až na výjimky kódován čtyřmi geny – jedním párem genů pro podjednotky alfa a druhým pro podjednotky beta. Protože sekvence žádného z globinových genů norníka nebyla známa, stáli jsme před úkolem tyto geny nejprve izolovat. Předtím jsme však množinu cílových genů zúžili porovnáním elektrostatického náboje podjednotek alfa a beta HbS a HbF. Molekuly obou typů hemoglobinu jsme chemicky rozložili na podjednotky, které jsme od sebe oddělili elektroforézou. Tím se podařilo dokázat, že za rozdíly mezi HbS a HbF zodpovídá vyšší elektronegativita podjednotky beta HbF – podjednotky alfa obou typů hemoglobinů vykazovaly shodnou pohyblivost.

V následujícím kroku jsme proto přistoupili k izolaci a určení nukleotidové sekvence genů kódujících globinové podjednotky beta. Použili jsme k tomu metodu RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), která umožňuje izolovat vybrané geny, aniž známe jejich sekvenci. Stačí znát pouze sekvenci krátké oblasti uprostřed genu, což nepředstavovalo velký problém, protože některé úseky genů pro podjednotky beta klíčové z hlediska funkce jsou shodné mezi různými druhy savců. Východním materiálem byla mediátorová RNA (mRNA) získaná ze sleziny norníků, která u hlodavců patří mezi krevetvorné orgány. Při použití mRNA máme jistotu, že jsme získali jen skutečně funkční geny (nefunkční geny netvoří mRNA). Metodou RACE jsme izolovali oba geny kódující podjednotky beta u norníka, označované HBB-T1 a HBB-T2. Nukleotidové sekvence obou genů jsme potom porovnali mezi norníky z různých lokalit v Británii, abychom určili, který z genů a jaké konkrétní mutace zodpovídají za rozdíl mezi HbS a HbF.

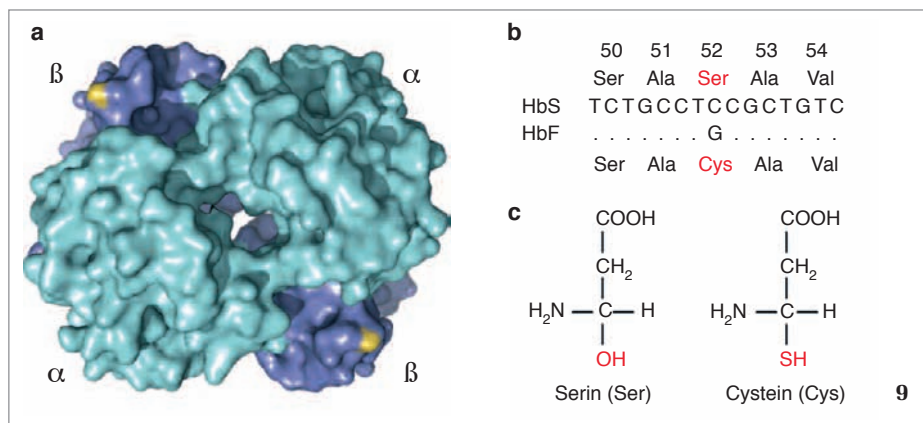
8 Genomický gradient. Graf znázorňuje pro každého z 39 norníků (svislé sloupce) modrou barvou podíl genů v jeho genomu majících původ v populaci, která Velkou Británii kolonizovala jako první; červená barva znamená podíl genů původem z druhé příchozí populace. Pouze nejsevernější populace z okolí skotského města Aberdeen si zachovala genom prvních kolonistů bez příměsi, zatímco v obou nejjižnější položených populacích, v anglických hrabstvích Cornwall a Devon, jsou geny prvního kolonisty již zcela nahrazeny geny druhého kolonisty. Orig. P. Kotlík

9 Model hemoglobinu HbF. Atomy síry (žlutě) cysteinů v podjednotkách beta jsou exponované na povrchu molekuly (obr. a). Hemoglobin HbF od HbS odlišuje záměna jediné aminokyseliny způsobená mutací kodonu pro serin (TCC) na kodon pro cystein (TGC, obr. b). Aminokyseliny serin a cystein se liší pouze v jediném atomu – přítomností síry (S) v cysteinu na místě, kde se v serinu nachází kyslík (O, obr. c). Podle: P. Kotlík a kol. (2014), upraveno

Mutace odlišující HbS a HbF

Vzhledem k rozdílnému elektrostatickému náboji HbS a HbF bylo zřejmé, že alespoň jeden ze dvou genů pro podjednotku beta bude kódovat dva různé proteiny odlišující se záměnou nejméně jedné aminokyseliny. K našemu překvapení jsme zjistili, že HbF se od HbS liší právě jedinou nesynonymní mutací (mutací v DNA kódující jinou aminokyselinu) v genu HBB-T1, a co víc, v genu HBB-T2 britští norníci nesou opět právě jen tu stejnou nesynonymní mutaci. Přitom tým vědců z univerzity v Nebraska vedený Jayem Storzem např. ukázal, že varianty hemoglobinu severoamerického křečka dlouhoocasého (*Peromyscus maniculatus*) přizpůsobené různým nadmořským výškám se liší pěti aminokyselinami v podjednotce alfa a čtyřmi v podjednotce beta. Fakt, že se hemoglobiny HbS a HbF norníka odlišují záměnou jediné aminokyseliny, přináší velkou výhodu při hledání podstaty funkčních rozdílů proti zmíněnému příkladu hemoglobinu křečka, kde bylo k určení funkčních dopadů záměn jednotlivých aminokyselin potřeba použít proteinového inženýrství (k vytvoření všech možných v přírodě se nevyskytujících kombinací jednotlivých aminokyselin).

Mutací, kterou jsme objevili v podjednotce beta hemoglobinu norníka, byla záměna aminokyseliny serin (Ser) na pozici



52 proteinové sekvence za cystein (Cys). Cystein může za určitých podmínek nést záporný náboj (viz dále) a způsobovat tak vyšší elektronegativitu proteinu oproti variantě obsahující serin, který je nenabitý, což by vysvětlovalo rozdíly HbS a HbF při elektroforéze. Kdybychom ovšem nezjistili, že někteří norníci s HbF nesli na pozici 52 v genu HBB-T2 kodon pro serin. Norníci s hemoglobinem HbS přitom opravdu vždy nesli pouze kodon pro serin v obou genech HBB-T1 i HBB-T2, stejně tak u norníků s HbF byl pokaždé kodon pro cystein v HBB-T1. Někteří však měli kodon pro cystein v HBB-T1 a současně pro serin v HBB-T2, přičemž ale elektroforéza jednoznačně určila jejich hemoglobin jako HbF. Jak je možné, že se elektroforézou u těchto norníků nezjistila také přítomnost HbS? Vysvětlení jsme našli v rozdílné míře exprese genů HBB-T1 a HBB-T2 norníka.

Velké množství sekvencí získaných metodou NGS, kde byla výchozím materiálem mRNA jako v naší studii genomického gradientu, lze kromě identifikace SNP použít také k porovnání úrovně exprese různých genů. V případě genů pro podjednotku beta hemoglobinu norníka jsme to provedli tak, že jsme porovnali počty sekvencí odpovídajících genu HBB-T1 s počtem sekvencí původem z genu HBB-T2. Protože jsme mRNA získali ze sleziny, počet sekvencí odpovídajících každému z obou genů odráží množství mRNA od toho genu odvozené a přítomné v krvetvorné tkáni, a může tak sloužit jako měřítko úrovně exprese jednotlivých genů. Tímto způsobem jsme prokázali, že u norníka je gen HBB-T1 více než 20x více exprimovaný než gen HBB-T2. Je to tedy gen HBB-T1, který se rozhodující měrou podílí na produkci mRNA, a tím na syntéze podjednotky beta hemoglobinu u norníka. Ani u jiných savců není neobvyklé, že jeden z dvojice globinových genů je tzv. majoritní gen, zodpovědný za syntézu převážně většiny proteinu, a druhý, minoritní gen se na syntéze podílí relativně velice málo. V případě podjednotky beta u norníka výrazné rozdíly v genové expresi vysvětlují, proč se přítomnost kodonu pro serin v minoritním genu HBB-T2 neprojevuje na vlastnostech hemoglobinu norníků s HbF nesoucích kodon pro cystein v majoritním genu HBB-T1, ale kodon pro serin v HBB-T2.

Funkční rozdíly

Ukázali jsme, že hemoglobin HbF od HbS odlišuje záměna jediné aminokyseliny. Existuje-li tedy mezi oběma typy hemo-

globinu nějaký funkční rozdíl, musí být způsoben právě touto záměnou serinu za cystein na pozici 52 podjednotky beta. Na první pohled jsou serin a cystein velmi podobné aminokyseliny, které odlišuje jediný atom – přítomnost síry v cysteinu na místě, kde se v serinu nachází kyslík (obr. 9). Rozdíl je však malý jen zdánlivě. Přítomnost sulfhydrylové nebo také thiolové skupiny –SH totiž cysteinu propůjčuje dramaticky odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti oproti hydroxylové skupině –OH serinu. Thiol –SH cysteinu totiž může poměrně snadno ionizovat (získat negativní náboj ztrátou vodíkového protonu) a změnit se na thiolátový anion –S⁻, který za vhodných podmínek představuje vysoce reaktivní funkční skupinu. Takový thiolátový anion potom snadno reaguje s jinou thiolovou skupinou za vzniku disulfidové vazby (kovalentní vazby mezi dvěma atomy síry).

Fyzikologicky významné jsou především mezimolekulové disulfidy, které se tvoří mezi thioley na povrchu proteinů a thioley, jež jsou součástí jiných molekul než proteinů – především glutationu (GSH). Jeho molekula se skládá ze tří aminokyselin, z nichž prostřední je cystein. Glutacion představuje nejdůležitější antioxidant chránící buňky před oxidačním stresem a poškozením volnými radikály a jinými reaktivními metabolity kyslíku, případně dusíku. V buňkách se vyskytuje ve dvou základních formách, redukován GSH a oxidován GSSG, která není ničím jiným než disulfidem ze dvou molekul GSH spojených disulfidovou vazbou. Disulfid glutationu vzniká reakcí GSH s reaktivními metabolity, kdy je thiol cysteinu v GSH oxidován a reaktivní metabolit naopak redukován – např. peroxid vodíku (H₂O₂) je reakcí se dvěma molekulami GSH redukován na dvě molekuly vody (H₂O), přičemž vzniká jedna molekula GSSG. Pro zachování oxidačně-redukční rovnováhy v buňce musí tedy následovat regenerace GSSG zpět na GSH, které se standardně dosáhne enzymaticky, redukcí glutation reduktázou.

Existují však důkazy, že reaktivní thiol cysteinu přítomný v některých typech hemoglobinu myši se může regenerace GSH účastnit. Děje se tak pravděpodobně prostřednictvím reakce hemoglobinu (HbSH) s GSSG, kdy z molekuly GSSG vzniká molekula glutationylovaného hemoglobinu HbSSG a molekula GSH. Vzhledem k vysoké koncentraci hemoglobinu v červených krvinkách, která je několikanásobně vyšší než koncentrace GSH, tedy může hemo-

globin kromě své úlohy přenašeče kyslíku hrát významnou roli v detoxikaci reaktivních metabolitů. Ovšem pouze za předpokladu, že obsahuje cystein s reaktivní thiolovou skupinou. Hemoglobin většiny savců však žádný reaktivní cystein neobsahuje, což platí také pro HbS norníka. Jestli je cystein přítomný navíc v HbF takovým reaktivním cysteinem, jsme zjišťovali sestrojením trojrozměrného molekulárního modelu.

Reaktivita cysteinu, resp. jeho thiolu, závisí jednak na jeho poloze v molekule – jen thiol cysteinu ležícího na povrchu proteinu se dostane do natolik těsného kontaktu s jinými molekulami, aby se mezi nimi mohla uskutečnit chemická reakce. Ne každý takto exponovaný cystein však lze automaticky považovat za reaktivní – jako určující faktor vystupuje rovněž ionizační stav thiolu. Pouze cystein přítomný v buňce ve formě thiolátového aniontu –S⁻ je reaktivní a jeho reaktivita záleží na poměrném zastoupení aniontové formy. Tu určuje disociační konstanta pK_a thiolu, vyjadřující pH, při němž jsou koncentrace nenabitého thiolu –SH a koncentrace thiolátového aniontu –S⁻ shodné. Čím nižší je potom pK_a konkrétního thiolu, tím vyšší zastoupení má reaktivní aniontová forma při konkrétním pH. Např. při fyziologickém pH okolo 7,3 bude cystein s pK_a výrazně vyšší než 7,3 v buňce přítomen především jako nenabitý thiol. Naopak cystein s pK_a výrazně nižší než fyziologické pH bude v buňce hlavně ve své aniontové formě.

Náš trojrozměrný model hemoglobinu HbF norníka jednoznačně ukázal, že cystein na pozici 52 podjednotky beta leží na povrchu molekuly HbF (obr. 9a). Na základě stejného modelu jsme potom vypočetali, že elektrostatické interakce atomu síry cysteinu s okolními atomy, jako např. vodíková vazba na kyslík serinu na pozici 50, pomáhají cystein stabilizovat v jeho aniontové formě, a výrazně tak snižují jeho disociační konstantu pK_a. Ta nezávisle na použité metodě výpočtu leží hluboko pod hodnotou fyziologického pH 7,3 (v blízkosti hodnot 5–6). Takové hodnoty disociační konstanty cysteinu znamenají, že převážná většina jeho buněčné populace (podle našich výpočtů až 94 %) bude tvořena aniontovou formou –S⁻, což z cysteinu na pozici 52 podjednotky beta HbF činí vysoce reaktivní funkční skupinu.

Reaktivitu cysteinu (schopnost tvořit mezimolekulové disulfidy) jsme následně otestovali. V laboratorních podmínkách lze vzájemnou reakci thiolů katalyzovat oxidačním činidlem. V případě hemoglobinu může oxidace thiolů mít za následek tvorbu polymerů hemoglobinu, a to v případě, že se cystein nachází na povrchu molekuly a jeho thiol je reaktivní. Nechali jsme proto na vzorky krve (hemolyzáty) norníků nesoucích HbF a norníků s HbS působit oxidační činidlo (diamid) a detekovali tvorbu polymerů pomocí elektroforézy. Výsledek jsme porovnali se vzorky, ke kterým bylo přidáno navíc ještě redukční činidlo (merkaptotanol). Na rozdíl od HbS vykazoval HbF po oxidaci jasné známky tvorby polymerů. Po redukci se však vzorky hemoglobinu HbS i HbF nelišily od příslušných kontrolních vzorků, což potvrzuje, že polymeraci HbF způsobily disulfidové vazby – obdobně se chovají

např. polymerující hemoglobiny myši obsahující reaktivní cystein.

Detoxikace volných radikálů

Pokud hemoglobin sehrál nějakou úlohu při nahrazení jedné populace britských normiků druhou, měly by funkční vlastnosti HbF svým nositelům přinášet výhodu. Zajímalo nás proto, jestli můžeme zjistit rozdíly ve schopnosti červenýchrvinek obsahujících HbS a HbF odolávat oxidačnímu stresu. Předpokládali jsme, že pokud HbF díky přítomnosti reaktivního cysteinu hraje roli v detoxikaci volných radikálů, budou červené krvinky normiků nesoucích HbF odolávat oxidačnímu poškození lépe než krvinky normiků s HbS.

V pokusu provedeném ve spolupráci s Pavlem Hyršlem a Liborem Vojtkem z Masarykovy univerzity v Brně, jehož výsledky jsme v r. 2014 zveřejnili v časopise *Proceeding of the Royal Society of London*, jsme k tomu použili luminometrickou metodu pro měření celkové anti-oxidační kapacity označovanou zkratkou TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Potential). Tato metoda využívá luminescence (světélkování) oxidačního produktu činidla luminolu k porovnání doby, po kterou jsou různé vzorky schopny vychytávat volné radikály. Signál, který luminol po své oxidaci volnými radikály vydává, lze měřit luminometrem, přičemž náhlý prudký nárůst luminescence znamená, že právě došlo k vyčerpání kapacity antioxidantů v daném vzorku. Proto čím delší doba uplyne mezi vystavením vzorku působení volných radikálů a nástupem chemiluminescence, tím větší je anti-oxidační kapacita vzorku. Červené krvinky normiků nesoucích HbF v našem experimentu vykazovaly trojnásobnou průměrnou hodnotu anti-oxidační kapacity (vztahenou ke standardu) než u normiků s HbS. Rozdíl byl nejen statisticky průkazný, ale všech 10 normiků s HbF zahrnutých v experimentu mělo anti-oxidační kapacitu vyšší než kterýkoli z 10 normiků s HbS. Vystavením červenýchrvinek oxidačnímu stresu se nám tak podařilo ukázat, že přítomnost reaktivního thiolu v hemoglobinu normiků průkazně zvyšuje schopnost jejich červenýchrvinek odolávat oxidačnímu poškození účinkem volných radikálů kyslíku.



Adaptivní fylogeografie

Jaký vliv ale mohl takový rozdíl ve fyziologii červenýchrvinek mít na relativní úspěšnost populací kolonizujících Británii v různou dobu a z různých glaciálních refugií? Fakt, že HbF zvyšuje odolnost červenýchrvinek vůči oxidačnímu stresu, znamená, že nositelé HbF budou ve výhodě za situace zvýšené potřeby antioxidantů. Produkce volných radikálů a jiných reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku významně vzrůstá během energeticky náročných fyziologických stavů, jako je zvýšená fyzická aktivita a investice do reprodukce, nebo při teplotním stresu či parazitární infekci. Není těžké si např. představit, že pokud jsou samice vychovávající větší počet potomků vystaveny vyššímu oxidačnímu stresu, bude mít populace s geneticky podmíněnou lepší schopností detoxikovat volné radikály vyšší reprodukční potenciál než jiné populace stejného druhu.

Fylogeografické studie dlouho předpokládaly, že populace obývající konkrétní území jsou populacemi, které ta území kolonizovaly jako první. Naše studie normika rudého však ukazuje, že v některých případech (a není důvod, abychom se domnívali, že jde jen o výjimky) byla jedna populace po kolonizaci určité oblasti částečně nebo úplně nahrazena jinou, přichá-

10 Pobřeží Skotska je protkáno řadou zálivů (ve skotské gaelštině označovaných jako lochs) zařezávajících se hluboko do pevniny, které tvoří přirozené migrační překážky. Loch Leven v oblasti Skotské vysočiny. Snímky P. Kotlíka

zející z odlišného refugia. Faktorem určujícím, která populace se rozšířila na úkor jiné a která naopak byla nahrazena, by potom byla schopnost zástupců jednotlivých populací obstát v konkurenci. Populace pocházející z určitého refugia tak mohou obývat určitá území ne z čistě geografických důvodů (jako blízkost refugia nebo nepřítomnost migrační bariéry), ale proto, že podmínky a přírodní výběr působící v daném refugiu upřednostnily vlastnosti přinášející výhodu během kolonizace (vyšší reprodukční potenciál, účinnější termoregulaci nebo odolnost vůči parazitům).

Adaptivní fylogeografie tedy znamená snahu porozumět úloze přírodního výběru. Naše studie hemoglobinu normika se na rozdíl od jiných fylogeografických prací neomezila na analýzu neutrálních molekulárních markerů, ale použili jsme integrovaný mezioborový přístup zahrnující evoluční molekulární genetiku, transkriptomiku, molekulové modelování, biochemii proteinů a buněčnou fyziologii. Jsme přesvědčeni, že podobný přístup je třeba aplikovat i v případě jiných druhů. Pokud je hlavním určujícím faktorem postglaciálního rozšíření populací adaptace a selekce, budou mít takové výsledky klíčový význam pro porozumění změnám v rozšíření druhů během současných i budoucích klimatických změn.

Vědecko-výzkumnou práci v laboratoři autora, jejíž výsledky článek představuje, podpořila Grantová agentura ČR (projekt P506-11-1872) a Grantová agentura Akademie věd ČR (projekty IAA600450701 a IAA600450901).

Kolektiv spoluautorů: Silvia Marková, Karolína Filipi, Michaela Stráznická a Jeremy B. Searle

Použitou literaturu uvádíme na webové stránce Živý.

