

Co je nového v evoluční biologii Genom latimérií

Historie objevu latimérie podivné (*Latimeria chalumnae*) je známa z mnoha pramenů, v Živě o ní psal E. K. Balon (viz též Živa 2013, 6: CXXII–CXXIII) a za seriál Svědectví o vztahu se živou fosilií získal Cenu Antonína Friče (1999, 4–6). Nověji o lalokoploutvých rybách (*Crossopterygii*) pojednal v Živě také T. Příkrýl (2013, 6: 254–257). Fascinace těmito rybami má více důvodů. Především je to nápadná morfologická a osteologická shodnost se starobylým a bohatým fosilním záznamem – nejranější anatomicky moderní (tj. odpovídající latimérii) lebka lalokoploutvých pochází ze spodního devonu před více než 400 miliony let (Zhu a kol. 2012). To spolu s poměrně uniformní stavbou těla vede k názoru, že tempo evoluce je v linii lalokoploutvých ryb pomalé – názor, který byl v současnosti zpochybněn, jak uvidíme. Není tak divu, že latimérie a její genom byly a jsou středem zájmu evolučních biologů a genetiků.

Kurátorka přírodovědeckého muzea v East London v jižní Africe, Marjorie Courtenay-Latimerová objevila v r. 1938 v úlovku místního rybáře podivnou 1 m dlouhou rybu s masitými násadci párových ploutví připomínajícími končetiny čtvernožců (*Tetrapoda*). Následující rok pak J. L. B. Smith rybu popsal a správně rozpoznal, že jde o žijícího zástupce linie dříve velmi diverzifikovaných lalokoploutvých ryb známých jen z fosilního záznamu, o kterých se předpokládalo, že vyhynuly ve svrchní křídě před zhruba 70 miliony let. Africké latimérie se vyskytují v okolí Komorských ostrovů a úlovky pocházejí také z různých míst pobřeží východní Afriky. Stejně jako v předešlém případě byl překvapující nález živých latimérií v r. 1997 na severní straně indonéského ostrova Sulawesi, asi 10 000 km od dosud známých lokalit. Indonéské latimérie se molekulárně i morfologicky liší (rozdíl je nápadný např. ve tvaru ocasní ploutve) od afrických a druh byl popsán jako *L. menadoensis* (Pouyaud a kol. 1999). Tím ovšem historie druhové diverzity žijících latimé-

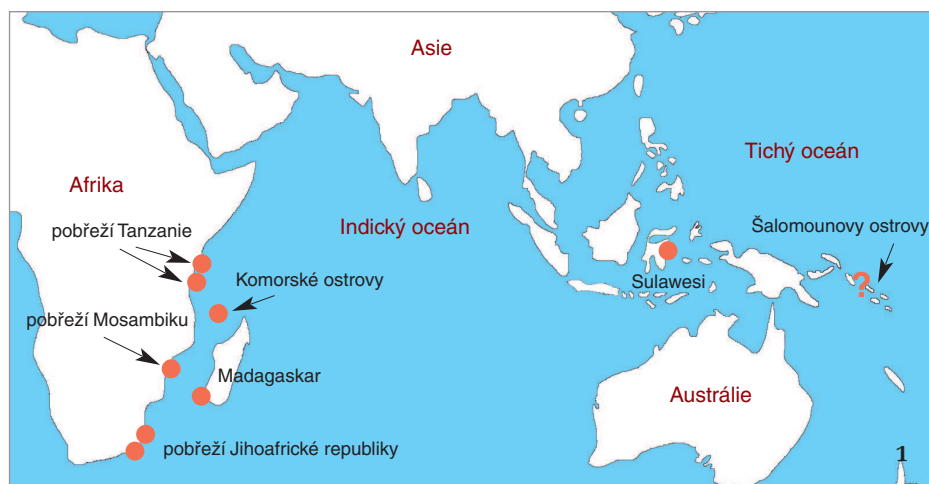
rií zdaleka nekončí. Mezinárodní skupina vědců (Nakaïdo a kol. 2011) analyzovala kompletní mitochondriální genom 23 jedinců z Komorských ostrovů i z nálezu od severní a jižní Tanzanie, Mosambiku až po jižní Afriku a zjistila, že jedinci z pobřeží severní Tanzanie jsou geneticky odlišní a tvoří pravděpodobně uzavřenou reprodukční skupinu. Je to zjištění opravdu překvapující, protože latimérie nalezené podél východoafrického pobřeží byly považovány za zbloudilce z jádrové populace u Komorských ostrovů. Oddělení této severní populace způsobily mořské proudy a odhaduje se nejméně na 200 tisíc let, spíše však daleko více. Objev dosud nebyl taxonomicky zhodnocen. Zprávy o nálezích živých latimérií pocházejí i z jiných míst světa. Expedice v letech 2007 a 2011 do severní Nové Guineje a oblasti Šalomounových ostrovů (www.dinofish.com) prokázaly, že místní rybáři latimérie občas chytají, dobře znají, umějí je identifikovat a navíc z nich mají pověřený strach. Zda jde o indonéskou *L. menadoensis* či jiný druh, není zatím známo. Za zmínku

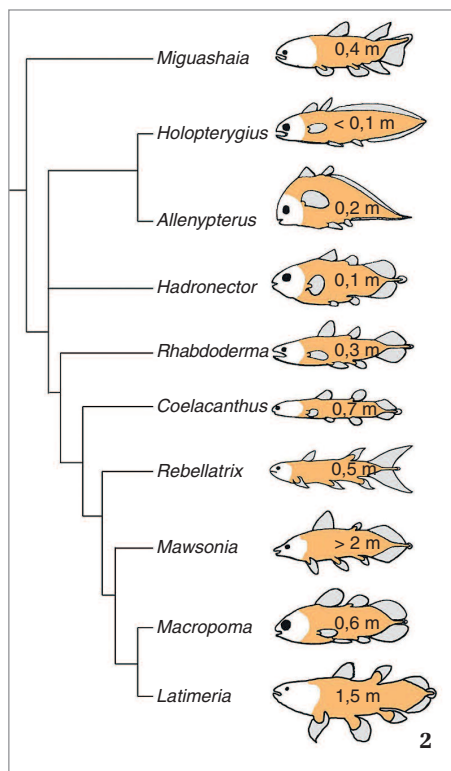
stojí i reliéf lalokoploutvé ryby vytesané na kamenném překladu dveří středověkého kostela na Kanárských ostrovech svědčící, že autor předlohu viděl. To vše ukazuje, že latimérie jsou a mohou být rozšířenější, než nyní víme. Každopádně jsou ale velmi vzácné a od doby objevu byl dokumentován nález 309 jedinců (Nulens a kol. 2010).

Závod o přečtení genomu

Již na začátku 90. let byly učiněny pokusy sestavit fylogenetické vztahy hlavních skupin obratlovců na podkladě sekvencí 18S a 28S ribozomálních genů, kde (nepřekvapivě!) byla pozice latimérie vždy vzdálenější tetrapodům než pozice bahníků (viz Živa 2013, 6: 257–260). S rozvojem sekvenčních technik se stal genom latimérie cílem zejména v posledních 15 letech. Byl studován kompletní mitochondriální genom (viz Zardoya a Meyer 1997), geny skupiny HOX (Amemiya a kol. 2010) a některé další genové rodiny, např. geny pro neuropeptidové receptory Y5 a Y6 (Larsson a kol. 2007) nebo protokaderinové genové rodiny (Noonan a kol. 2004). Jako rybí cytogenetik nemohu nedodat, že *L. chalumnae* má diploidní počet chromozomů $2n = 48$ a karyotyp složený z několika makrochromozomů, zbytek tvoří mikrochromozomy – další záhada, na jejíž vysvětlení zde bohužel není místo. Vyvrcholením těchto snah byl doslova závod dvou vědeckých skupin, kdo zveřejní celogenomovou sekvenci latimérie. V dubnu 2013 publikovala devadesátičlenná skupina vedená C. T. Amemiyou kompletní genom jedince *L. chalumnae* z Komorských ostrovů. Naopak závod o prioritu prohrála skupina 29 autorů vedená M. Nakaïdo, která zveřejnila výsledky v říjnu 2013; v tomto případě však byly založeny na sekvenování genomů exempláře *L. chalumnae* z Komorských ostrovů, tři jedinců ze severního pobřeží Tanzanie (tj. z té geneticky odlišné populace) a jedné *L. menadoensis* z Indonésie. Studie tedy zahrnovala oba taxonomicky známé druhy latimérií. V obou případech byl genom sekvenován technologií Illumina, výsledné krátké fragmenty srovnány pomocí programu ALL-PATHS-LG v první studii, resp. nově vyvinutým PLATANUS v druhé. V první studii první verze čtení poskytla 2,86 gigabází (Gb) složených z 2,18 Gb sekvencí plus mezer mezi kontigy (souvisle sekvenovaná část genomu, soubor překrývajících se sekvencí tvořících konsenzuální oblast DNA). Po testu kvality získaných kontigů byl genom anotován (porovnán) dvěma různými metodami s několika databázemi (Universal Protein Resource, omezené dostupné sekvence z genomu latimé-

1 Výskyt recentních zástupců rodu *Latimeria* podle doložených nálezů (červené body). Otazník značí místa výskytu podle zpráv domorodých rybářů. Upraveno podle: www.dinofish.com
2 Schematické znázornění velikostní a morfologické diverzity lalokoploutvých ryb (*Crossopterygii*) ve srovnání s recentní latimérií v jednoduchém fylogenetickém stromu. Za povšimnutí stojí morfologické rozdíly latimérie a nejbližšího rodu *Macropoma*. Upraveno podle: D. Casane a P. Laurenti (2013)





rie, data ze sekvenování RNA a dalších zdrojů). První metoda (Ensembl) poskytla více než 19 tisíc genů kódujících proteiny, druhá (MAKER) nabídla model s téměř 30 tisíci geny kódujícími proteiny, téměř 2 900 krátkých nekódujících RNA, přes 1 200 dlouhých nekódujících RNA a 24 tisíc konzervativních RNA sekundárních struktur. M. Nikaido a kol. dospěli k obdobným výsledkům – velikost 2,74 Gb a srovnatelná další data. Shodně tedy bylo zjištěno, že genom latimérie je asi 3× větší než genom průměrné kostnaté ryby (*Teleostei*). Obsahuje také ca 60 % repetitivních sekvencí, z nichž značnou část tvoří transpozony a některé jsou transkripčně aktivní. O úloze těchto component genomu při přechodu na souš (terrestrializaci) se pouze spekuluje. Předchozí informace jsou velmi zhuštěné, nutně fragmentární, ale podrobný popis není cílem tohoto příspěvku a asi by byl příliš technicky nezáživný. Pro čtenáře bude jistě zajímavější, jaké nové poznatky a otázky přečtení (které ještě neznamenají porozumění) genomu přineslo.

Vedle bahníků (dvojdyšní – *Dipnoi*), kteří mají gigantické genomy (50–100 Gb), a proto zatím zůstávají mimo dosah srovnávací evoluční genetiky, latimérie a její genom představuje klíčovou křižovátku mezi paprskoploutvými rybami (*Actinopterygii*) a čtvernožci. Zjevně nejzajímavějším momentem přečtení genomu latimérie je porovnání sekvencí zástupců jednotlivých skupin obratlovců pro zjištění, které geny (nebo regulační sekvence) byly ztraceny nebo získány během evoluce. Vzhledem k důležitosti tématu tomu C. T. Amemiya věnoval samostatnou esej (2014). Jednu skupinu představují sekvence ztracené v linii vedoucí ke čtvernožcům, ale zachované u kostnatých ryb a u latimérie. Takových genů bylo identifikováno nejméně 50 a souvisejí s vývojem ploutví, oka, vnitřního ucha, ledvin, mozku a axiálního struktury (trup, somity a ocas). Proč to tak je, nevíme, jedna z hypotéz

říká, že jsou maladaptivní (nepřizpůsobené novým životním podmínkám) pro suchozemské prostředí a ztráta jejich funkce mohla vést k adaptacím umožňujícím přechod na souš. Příkladem může být gen pro actinodin *And*, který souvisí s tvorbou lepidotrichií – vláknitých kolagenních struktur ve vyvíjejících se ploutvích, z nichž se stanou ploutevní paprsky, opora ploutví, tedy extrémně dobře adaptovaného orgánu (nejen k plavání). Zatímco latimérie má jediný gen *And*, u kostnatých ryb je jich vzhledem ke specifické duplikaci genomu více. Vyřazení těchto genů (knockdown) u modelového druhu dániya pruhovaného (*Danio rerio*) způsobí během ontogeneze strukturální zmatek ve vývoji prsních ploutví a následnou chybnou expresi genů důležitých pro terrestrializaci. Jinými slovy ztráta genů pro tvorbu lepidotrichií a ploutevních paprsků mohla umožnit vývoj vnitřních chrupavčitých skeletálních struktur, nezbytných pro pohyb na zemi.

Druhou skupinu představují sekvence přítomné v genomu latimérie a čtvernožců. Tyto analýzy nejsou ještě hotové, ale ukazují zajímavou okolnost. Geny kódující bílkoviny mají vedle dalších součástí mnohočetné kopie cis-nekódujících elementů (CNE), jejichž funkce spočívá v aktivaci a zesílení transkripce. Těch bylo v genomech obou skupin nalezeno velké množství a u latimérie zjevně svislejší s embryonální morfogenezí a diferenciací, regulací transkripce, vývojem mozku a endokrinního systému, párových končetin a zejména smyslových orgánů. Poslední skupina si vyžaduje podrobnější pozornost a věnovaly se jí obě studie genomu, a sice genům pro smyslové receptory (OR) a pro receptory feromonů (V1R). Vodní obratlovci včetně kostnatých ryb vnímají především látky ve vodě rozpustné, kdežto terestričtí obratlovci především látky rozptýlené ve vzduchu. Proto genový repertoár pro zjištění těchto typů sloučenin je mezi rybami a čtvernožci výrazně odlišný. Většina kostnatých ryb má 6 vzdáleně příbuzných V1R1 (fish-V1R1-6) genů, ale čtvernožci mají více než 20 blízké příbuzných V1R (t-V1R) genů. To nasvědčuje, že v linii čtvernožců došlo ke genové multiplikaci, která mohla přispět k adaptaci na vnímání vzduchem přenášených podnětů. V genomu latimérie byly přítomny nalezeny jak všechny rybí V1R geny, tak i několik kopií t-V1R genů. Podobně OR geny, které jsou pomnoženy u čtvernožců a několik je multiplikováno i v genomu latimérie. Tak bychom mohli pokračovat, ale uvedené příklady jsou, myslím, ilustrativní.

Přečtení genomu má význam i pro odhad evoluční divergence (rozdílení) mezi dvěma taxonomicky známými druhy latimérií. Ta byla předtím odhadována na základě rozdílů v jejich mitochondriálních genomech ve velmi širokém rozmezí 6 až 40 milionů let. Ale při porovnání genomových a genových (tj. expresních) profilů obou druhů se ukázala shoda na úrovni 99 % a 98 % (což je obdobné rozdílu mezi člověkem a šimpanzem), která umožnila zpřesnit čas divergence na 6 až 8 milionů let – tvrdí první studie. Druhá práce však argumentuje, že tento odhad byl založen na menším vzorku a že fylogenetická

vzdálenost obou recentních druhů (měřená odhadem rychlostí substitucí bází v genomu a aminokyselin v některých bílkovinách) je na úrovni o řád nižší, asi 0,18 %, což odpovídá variabilitě v rámci populace. Jak vidíme, otázka zůstává otevřená a asi musíme počkat na nález dalšího druhu latimérie.

Obě studie se rovněž zabývaly zjevným snížením evoluční rychlosti jak na úrovni substituce nukleotidů v genomu, tak substitucí v genech kódujících proteiny ve srovnání s ostatními obratlovci. Tím by mohla být vysvětlena zarážející morfologická podobnost současné latimérie a jejích vyhynulých příbuzných. Je ale nutné říci, že zde tápeme, vysvětlením by snad mohl být statický charakter prostředí jejich výskytu, vyhraněná adaptace na úzké rozmezí teplot a skutečnost, že jako velké ryby vlastně nemají predátory. To vše mělo za následek malé požadavky na evoluční adaptace. Přes řadu údajů o srovnatelně zpomalené genetické a morfologické evoluci latimérií ne všichni s uvedeným souhlasí. D. Casane a P. Laurenti (2013) ještě před zveřejněním obou výše zmíněných prací uvádějí hned několik argumentů – nízká vnitrodruhová molekulární diverzita nemusí znamenat nízkou mutační rychlost, studie nepotvrzující nízké rychlosti substituce nejsou brány ve zmíněných pracích v úvahu a zásadně nesouhlasí s tvrzením o evoluční morfologické stabilitě latimérií, protože to vyvracejí paleontologické doklady, které ukazují, že lalokoploutvé ryby byla skupina tvarově velice rozrůzněná (obr. 2). Zkrátka, vnitrodruhová molekulární diverzita, rychlost vzniku mezidruhových genetických rozdílů a morfologická evoluce mají zcela jiná evoluční omezení, která spolu nemusejí nutně korelovat.

C. T. Amemiya a kol. (2013) zakončili svou bezpochyby průkopnickou práci nešťastně formulovanou větou: „Uzavíráme, že nejbližší příbuzná ryba čtvernožcům je bahník a nikoli latimérie.“ Vzhledem k tomu, že jejich studie byla hojně probírána ve sdělovacích prostředcích, mnoho žurnalistů (jak to tak bývá) nepochopilo, co bylo vlastně cílem a komentáře ve smyslu citované věty to považovaly za velký objev. V ostré reakci zveřejněné časopisem *Zootaxa* (Bockman a kol. 2013) autoři poukázali, že C. T. Amemiya a kol. prakticky nezmínili „stovky publikovaných stránek“ z posledních let týkajících se sesterského vztahu bahníků a čtvernožců (také *Živa* 2013, 6: 257–260) a založených na paleontologických dokladech. C. T. Amemiya se vyjádřil takto: „Jako u všech celogenomových studií vždy existuje možnost přeceňovat získaná data. Genomy žijících druhů jsou však jen jejich snímky v současnosti a tyto snímky naprosto nemusejí vypovídat o minulých evolučních morfologických a fyziologických procesech. Mezi bohatě paleontologicky doloženými lalokoploutvými rybami by bezpochyby byly formy vhodnější ke genomickému studiu terrestrializace. Čtení genomů není konečným cílem, ale spíše startovací čarou pro další otázky a hypotézy.“ Nelze než s ním souhlasit.

Použitá literatura uvedena na webu *Živa*.