

P4. Mutace a evoluční změny

Velikost prvních genomů s informací v molekulách RNA omezoval informační práh, závislý na frekvenci replikačních chyb (Eigen and Schuster 1979). Cestu z tohoto problému by v prebiotických podmínkách umožnila kooperativní slučování RNA-hypercyklů. Definitivní řešení přineslo převzetí informační úlohy molekulou DNA a dělba práce mezi DNA genomy a odvozeným transkripčně-translačním aparátem.

Přechod od replikativních molekul RNA k DNA genomům vyžadoval vznik proteosyntézy a metabolismu, umožňujícího syntézu prekursorů DNA (Riera, Robb et al. 1997; Poole, Logan et al. 2002). Principiální inovací byly enzymy nutné pro efektivní syntézu DNA, ribonukleotid reduktáza a tymidylát syntáza. Pak se mohly zrodit i opravné mechanismy, které dnes udržují replikační šum v mezích, přijatelných pro velké genomy.

Podle Darwinovy teorie je genetická variabilita základní podmínkou evoluce a předpokladem pro působení selekce. Zaměříme se proto nyní na mechanismy vedoucí k mutacím a vzniku genetické variability.

☞ Na základní úrovni, při replikaci DNA, dochází k mutacím hlavně v důsledku chyb při párování bází (Ohno 1969; Bernardi and Ninio 1978; Kunkel 1992).

Replikaci zpochybňujícího se řetězce DNA iniciuje enzym primasa (nepochybně evoluční relikt); jde o kondenzaci deoxyribonukleosid-trifosfátů s 3'-konci RNA primerů. Tento krok je zdrojem značného mutačního šumu a podléhá následně opravě „spolehlivou“ („high-fidelity“) DNA polymerasou.

- Průměrná frekvence mutací v genomu bakterie *E. coli*, vztažená na jeden pár bází a replikaci, F , odpovídá hodnotě 7×10^{-10} ; frekvence mutací na genom a replikaci, $(F \times v)$, odpovídá hodnotě $3,3 \times 10^{-3}$, při velikosti genomu *E. coli*, $v = 4,7 \times 10^6$.

- V případě bakteriofágů *E. coli* M13, λ , T4, $(F \times v)$ odpovídá hodnotám $4,6 \times 10^{-3}$, $3,8 \times 10^{-3}$, $3,3 \times 10^{-3}$;
 F : 7×10^{-7} , 8×10^{-8} , 2×10^{-8} ;
 v : $6,4 \times 10^3$, $4,8 \times 10^4$, $1,7 \times 10^5$.

- Pro eukaryontní genomy - kvasinky, neurospory a člověka, $(F \times v)$ je blízká hodnotě $3,5 \times 10^{-3}$;
 F : 3×10^{-10} , 1×10^{-10} , 1×10^{-12} ;
 v : $1,4 \times 10^7$, $4,2 \times 10^7$, 3×10^9 .

Ve všech uvedených případech jde o objekty s DNA genomy.

Mutační rychlosti na jednu replikaci v liniích nepohlavně se rozmnožujících organismů odpovídají mutační rychlosti na generaci. U pohlavně se rozmnožujících organismů jsou evolučně významnými mutacemi zatíženy již generace buněk germinální linie; například v případě genomu drosofilu (*Drosophila melanogaster*), na základě empirických hodnot 0.8 mutací na jednu pohlavní generaci, 40 buněčných dělení předcházejících oplodnění vajíčka a 2×10^8 párů bází pro velikost haploidního genomu, dojdeme k průměrné rychlosti, F , 10^{-11} replikačních chyb na jeden pár bází a jednu replikaci.

Zcela jiná situace je u virů s genomy RNA:

Hodnoty ($F \times \nu$) jsou v intervalu 1,3 - 0,2;

F je v intervalu 3×10^{-4} - 3×10^{-5} a velikosti genomů ν v intervalu $4,2 \times 10^3$ - 15×10^3 pb.

Hodnoty ($F \times \nu$) pro genomy na bázi RNA jsou tedy tisícínásobné ve srovnání s hodnotami pro DNA genomy (data podle Eigena; Eigen 1993). Velmi vysoké hodnoty ($F \times \nu$) vysvětlují mimořádnou proměnlivost RNA virů (např. pro virus HIV-1, ($F \times \nu$) = 1,0;

$F = 1 \times 10^{-4}$, $\nu = 1 \times 10^4$ pb).

☞ Reálné hodnoty pro frekvence mutací se liší od průměrných hodnot v závislosti na biologickém druhu, životních podmínkách (úroveň radiace, znečištění prostředí atd.) a poloze lokusů v genomu.

☞ V různých místech téhož genomu nebo genu můžeme pozorovat mnohonásobné rozdíly ve výskytu spontánních mutací, jak názorně ukazuje topografie mutací v lokusu *rII* bakteriofága T4 (viz dále).

Uvedené údaje dokumentují význam opravných mechanismů, které sledují spolehlivost replikace DNA a upravují práh spontánních replikačních chyb tak, že nedochází k degradaci informace genofondu; přitom není vyloučena určitá úroveň genetické variability, která je pro evoluci nezbytná.

V genomech často probíhají genetické změny i během reparačních oprav DNA, tedy mimo základní, programovanou replikaci DNA.

Genetikům i darwinistům první poloviny 20. století připadalo samozřejmé, že jednotlivé mutace jsou v genech distribuovány náhodně.

☞ Dnes víme, že frekvenci i distribuci genetických změn ovlivňuje lokální struktura genomu a omezení, daná funkční integritou organismu.

Komplementarita vláken dvouzávitnice DNA je výsledkem specifických interakcí bází, které zprostředkují vodíkové vazby sdílením protonů mezi atomy dusíku a kyslíku: adenin a thymin běžně sdílejí dva protony, zatímco guanin a cytosin běžně sdílejí tři protony. Kromě těchto situací vzácně existuje možnost přesunu protonů a elektronů v rámci dané báze, jejímž důsledkem je *tautomerizace*. Tím

se ovšem změni i podmínky pro tvorbu vodíkových můstků. Vznikají nové možnosti párování: adeninu s tautomerizovaným cytosinem sdílením dvou protonů, a tautomerizovaného thyminu s guaninem sdílením tří protonů. Tímto způsobem se v následných replikacích může fixovat *bodová mutace* (mutace postihující jeden nukleotidový pár), tzv. *transice*,

AT \Rightarrow (AC) \Rightarrow AT, GC;
CG \Rightarrow (TG) \Rightarrow TA, CG; atd.

vidíme, že v případě *transic* původní způsob párování purinu s pyrimidinem zůstává zachován. Vzhledem k tomu, že výskyt tautomerie sám o sobě není náhodný, ani výskyt a frekvence *transic* nejsou náhodné.

Pravděpodobnost tautomerie pro vznik páru A-C je jiná, než pro vznik páru G-T, protože závisí na kvantových stavech jednotlivých bází a na vlivu okolí - působení sousedních párů bází a působení lokálního prostředí. Faktorem ovlivňujícím tautomerizaci může být integrace neobvyklé báze. Takto byl studován analog thyminu 5-bromuracil, který se chybně páruje s guaninem a indukuje *transice*: GC \Rightarrow (GBrU) \Rightarrow (ABrU) \Rightarrow GC, AT.

Transice mohou vznikat v důsledku ionizace způsobené absorpcí kvanta záření. Častým zdrojem *transic* jsou působení chemických mutagenů a deaminační produkty bází: deaminace adeninu v hypoxantin (*transice* AT \Rightarrow (HT) \Rightarrow (HC), AT \Rightarrow GC; a deaminace 5-metylcytosinu (MeC) v thymin, tedy *transice* MeCG \Rightarrow (TG) \Rightarrow TA, CG (Lindahl 1993).

Metylovaný cytosin, 5-MeC, je přirozenou součástí genomů, zejména eukaryotických; jeho přítomnost ovlivňuje vazebné vlastnosti DNA, nikoli však kodování aminokyselin. *Rozložení 5-MeC v genomech je nenáhodné a souvisí s kontrolou funkcí některých genových klastrů a s lokálním uspořádáním DNA do vyšších struktur* (Bird 1986).

Metylace cytosinu se dědí „epigenetickým“ mechanismem; ztráta informace o poloze 5-MeC vede k metylačním defektům v následných replikačních cyklech tak, že místo MeCG vznikají páry CG.

Deaminací 5-MeC dochází při evoluci genomů k jejich postupnému ochuzování o CG dublety (ve srovnání s dublety GC); thymin, vznikající deaminací 5-MeC, je přirozenou součástí DNA a proto uniká pozornosti opravných mechanismů. *Postupné ochuzování genomů o dublety CG se nazývá CG suprese* (Bird 1980).

Další častou příčinou bodových mutací jsou tzv. transverse, které jsou důsledkem chybného párování purin-purin (A-G) nebo pyrimidin-pyrimidin (T-C) např:

AT \Rightarrow (AG) \Rightarrow AT, CG;
AT \Rightarrow (TT) \Rightarrow TA, AT; atd.

Na rozdíl od transic zde v daném páru dochází k záměně purinu za pyrimidin a naopak.

Vznik transversí nelze popsat jednotným mechanismem jako je tomu je případě transic.

K transversím může dojít chybným párováním standardních bází, chybným párováním s neobvyklou, chemicky modifikovanou nebo poškozenou bází, v důsledku ztráty báze, např. depurinací DNA nebo deaminační konverzí cytosinu v uracil. Vzhledem k tomu, že uracil není přirozenou bází DNA (na rozdíl od T, vznikajícího deaminační konverzí 5-MeC), může být zcela excidován uracil-N-glykosylasou a ve vzniklé mezeře jsou podmínky pro různé substituce, tedy i pro transverse CG ⇒ AT nebo GC. V určitých případech může uracil v DNA uniknout reparaci glykosylasou; může se tak stát při působení kyseliny dusité a deaminaci mnoha cytosinových zbytků. Pak může dojít i k transicím

GC ⇒ (GU) ⇒ GC, (AU) ⇒ AT;

☞ *Můžeme tedy shrnout: na úrovni jednotlivých bází a replikace DNA se vznik a distribuce mutací neřídí statistikou náhodných jevů.*

Dělení mutací podle typu a mechanismu vzniku, klasifikace bodových na transice a transverse, též mechanismy působení základních typů mutagenů, viz Drake 1969.

Až dosud jsme uvažovali mutace z chemického hlediska, tj. bez ohledu na sémantický význam sekvencí DNA.

Nyní budeme uvažovat vliv těch faktorů, které rozhodují o stabilitě a funkčnosti biologického systému jako celku, vycházejíce z vlastností tripletového genetického kódu.

Genetický kód je redundantní (degenerativní): 64 (=4³) možným tripletovým kodonům odpovídá 61 kodonů pro 20 aminokyselin; kromě toho množina kodonů obsahuje tři terminační tripletety (ve standardních genomech UAA, UAG, UGA), které jsou signálem pro tzv. „release“ faktory, ukončující polymeraci peptidového řetězce.

Díky redundanci kódu může být většina aminokyselin kódována více než jedním tripletem (s výjimkou methioninu a tryptofanu).

POČET TRIPLETŮ	KÓDOVANÉ AMINOKYSELINY
1	Met, Trp
2	Phe, Tyr, His, Glu, Asp, GluN, AspN, Lys, Cys
3	Ileu
4	Val, Pro, Thr, Ala, Gly
6	Leu, Arg, Ser

☞ *Bodové mutace v kodonech se budou lišit účinkem na fenotyp v závislosti na redundanci, poloze a významu kodonu.*

Mutace, které změny kodon pro některou z aminokyselin (např. UAC pro tyrosin) v terminační kodon (zde transverse UAC \Rightarrow UAA, nebo UAC \Rightarrow UAG) mají zpravidla fatální důsledky, protože nedovolují dokončit syntézu funkční bílkoviny (zcela zruší smysl genetické zprávy).

Většina jiných mutací sice smysl zprávy nutně nezruší, ale změny její obsah; důsledkem jsou více nebo méně přijatelné záměny aminokyselin v molekule bílkoviny.

Jiné mutace, zaměňující kodony v rámci redundance genetického kódu, i když nevyvolají záměny aminokyselin, mohou ovlivnit účinnost syntézy dané bílkoviny na úrovni výběru z množiny isoakceptorových t-RNA. Mutace nepostihující bezprostředně kodony ale geny pro t-RNA mohou ovlivnit proteosyntézu nejednoznačností v interpretaci kodonů.

Projevy genetické variability jsou filtrovány podle účinku na integritu organismu a jeho schopnost přežití. Již zmíněné distribuce mutačních ohnisek („hot spots“) v lokusu *rII* bakteriofága T4 (Benzerova mutační topografie *rII*), ale svědčí o tom, že *rozdíly mutačních frekvencí nelze vždy vysvětlit jen negativní selekcí*: mutace typu *rII* totiž *neomezují životaschopnost* (negativní selekci), naopak, v daných selekčních podmínkách *zvyšují lytickou účinnost* fága (pozitivní selekce)

Prudký rozvoj genetiky bakteriálních virů (fágů) těžil v padesátých a šedesátých letech 20. století z jednoduchosti experimentů. Volbou poměru mezi počtem infikujících částic a počtem hostitelských buněk v infikované kultuře lze dosáhnout toho, aby byly buňky s danou pravděpodobností infikovány jednou, dvěma, nebo více virovými částicemi současně (podle Poissonovy distribuce náhodných jevů). Tato skutečnost umožňuje konat genetická křížení smíšenou infekcí jedné buňky dvěma různými mutanty fága. Výsledně jsou pak sledovány fenotypové projevy potomstva - schopnost tvořit plaky na určitém spektru hostitelů a změny plakové morfologie (plaky jsou kruhové lytické zony na povrchu tenké vrstvy hostitelských bakterií, způsobené radiální difuzí virů, vycházejících z jednotlivých infekčních center).

Benzer zvolil fága T4, množícího se na různých kmenech *E.coli*, např. na laboratorním kmeni *E.coli* B; kromě běžného typu plaků vznikají občas mutanty, tvořící na *E.coli* B nápadně velké plaky. Ty byly označeny jako fenotyp *r* („rapid lysis“).

Benzer definoval tři různé lokusy *r*: *rI*, *rII*, *rIII*. Obzvlášť vhodným pro další jemnou genetickou analýzu se ukázal lokus *rII*, složený ze dvou komplementujících subjednotek, *rIIA*, *rIIB*, (v tomto smyslu lze lokus *rII* brát jako jeden gen kodující dvě funkční domény *a*, *b*, jednoho proteinu, angažovaného v lytickém mechanismu fága). Experimentální výhodou mutant *rII* pro genetické experimenty je možnost selekce rekombinant na *E. coli* s profágem λ (např. na laboratorním kmeni K12(λ)). Tato specifická vlastnost mutant *rII* umožňuje mapování jejich vzájemné polohy a vzdálenosti, neboť pouze rekombinanty s genotypem *r+* (tj. parentální typ) tvoří viditelné a počítatelné plaky na K12(λ). Takto technika Benzerovi umožňovala testovat populace obsahující desítky milionů fágových částic v jednom experimentu genetického křížení a nacházet rekombinanty s dosud nepřekonanou úrovní rozlišení.


Vraťme se však z kouzelných, a asi nenávratných časů klasické fágové genetiky, ke stručnému souhrnu:

1. Benzer byl schopen určit a definovat nejmenší, základní jednotku mutace (muton) jako 1 nukleotidový pár.
2. Jednotlivé spontánní i indukované bodové mutace se velmi výrazně (v několika řádech) lišily schopností revertovat k r⁺ typu (pro konstrukci jemné genetické mapy lokusu rII byly přirozeně použity jen ty mutanty, jejichž frekvence reverzí byly nižší, než očekávané frekvence vzájemných rekombinací).
3. Smíšenou infekcí (tzv. *cis-trans* testem) bylo možno klasifikovat mutace podle funkční kooperativity (funkční komplementací v nepřítomnosti rekombinací); *cis-trans* testem Benzer definoval základní funkční genetickou jednotku jako „cistron“ (gen, nebo strukturní komponenty genu, kódující samostatné funkční domény či subjednotky proteinu). *Aplikace cis-trans testu přinesly první experimentální důkazy mozaikové struktury genů.*
4. Při měření vzdálenosti sousedních mutací Benzer dosáhl rozlišení 1-6 nukleotidových párů a definoval nejmenší rekombinační jednotku (rekon) jako interval mezi dvěma sousedními nukleotidovými páry.
5. Hlavním, a v té době naprosto neočekávaným byl poznatek, že frekvence výskytu spontánních bodových mutací v jednotlivých bodech lokusu rII (Benzer hovořil o topografii rII) je neobyčejně různorodá: některá místa, tzv. hot-spots, jsou hypermutabilní, jiná jsou jakoby zcela stíněná (tato skutečnost byla od té doby mnohásobně potvrzena i na dalších experimentálních objektech).

Benzerovy práce umožňují hluboký vhled do problému genetické variability. Např. topografie bodových mutací indukovaných mutageny nebyla totožná s topografií spontánních mutací a navíc, pro různé mutageny byly zjištěny různé charakteristiky rozložení hot-spots a výskytu stíněných míst.

Vysvětlení těchto faktů nenajdeme na úrovni výběru z možností, daných degenerativitou kódu a/nebo sémantického významu genetické informace. Obsáhnout všechny pozorované jevy jednotnou hypotézou (i na této zdánlivě elementární úrovni fágového mikrokosmu) dosud zůstává výzvou: uvažují se, kromě lokálních rozdílů v distribuci párů AT, GC, i vlivy okolních bází a změny (fluktuační) konformací genomu v interakci s prostředím hostitelské buňky.

Výsledky Benzerových výzkumů z let 1951 - 1961 jsou shrnuty v klasických monografiích Stentové a Hayesové (Stent 1963; Hayes 1964).

 *Zvláštní kategorií genetických změn jsou nenáhodné změny většího rozsahu v důsledku defektů replikace, rekombinačních a transposičních procesů a rovněž změny v důsledku integrace cizorodé genetické informace „horizontálním“ (mezidruhovým) přenosem.*

„Vertikálním“ přenosem rozumíme mezigenerační dědičnost.

Extrémním případem horizontálního přenosu je *symbiogeneze* (L. Marguliusová, 2004), kdy splývají celé organismy a jejich genomy (takto byly integrovány organely v eukaryotických buňkách a patrně vzniklo i buněčné jádro).

Genetických defektů většího rozsahu jsou především *inserce*, *delece* a *inverze*.

Kratší inserce nebo delece bází zpravidla vznikají v lokusech s monotónními (opakovanými) sekvenčními motivy. V těchto místech je během replikace možný vzájemný posun vláken DNA v důsledku nepřesného párování. Tím vznikají podmínky pro lokální prodloužení nebo zkrácení repliky; mutace vznikající tímto způsobem jsou tedy svým mechanismem „posunové“

V literatuře je pojem „posun“, „frameshift“, často užíván v užším slova smyslu: jako inserční nebo deleční posun čtecího rámce v genech kódujících proteiny, s následným vznikem nebo korekcí terminačních kodonů.

Každé zdvojení buňky je doprovázeno jedním zdvojením genomu; kromě tohoto standardního procesu může, v tomtéž buněčném cyklu, dojít k opakované replikaci některých úseků genomu a k lokálnímu vzrůstu genetické redundance- k duplikacím a amplifikacím sekvencí DNA. Amplifikované sekvence mohou být cílem rekombinačních enzymů a zdrojem rozsáhlých delecí (v případě stejnosměrné orientace sekvencí: ----↔----↔----) nebo inverzí (v případě protisměrné orientace sekvencí:----↔----↔----).

Na delecích a inverzích se účinně podílí zmožení a excise mobilních genetických elementů, neboť právě jejich kopie mohou v genomech zaujímat stejnosměrné i protisměrné orientace.

Různorodé genetické změny v důsledku reciprokových i n reciprokových výměn charakterizujeme jako *makromutace*. Makromutacím často předcházejí amplifikace sekvencí, duplikace genomů, horizontální přenos DNA a hybridizace příbuzných druhů (Ohno 1975).

Makromutace tedy ve svých důsledcích umožňují rychlou (skokovou) evoluci genů: mutační diverzifikaci zmožených sekvencí a vznik nových genů přeskupováním sekvenčních modulů („shuffling“). Rozsáhlejší restrukturační genomů mohou vyústit i v úplné genetické oddělení a vznik nových biologických druhů. Makromutace však mají pro vysoce komplexní organismy (s výjimkou rostlin) zpravidla fatální důsledky.

☞ *V ranných etapách však asi měly makromutace klíčový význam pro vznik evolučních inovací. Srovnání homologních domén v chromosomech různých druhů savců (O'Brien, Seuánez et al. 1988) ukazují, že docházelo k jejich rozsáhlým proměnám při vzniku evolučních linií: štěpením, translokacím, amplifikacím a inverzím; jsou doklady o podílu makromutací na oddělení linie *homo* od ostatních primátů.*

Touto cestou mohou vznikat i nové regulační geny a regulační obvody. Srovnávací studie struktury lokusů kódujících regulační proteiny a transkripční faktory dovolují rekonstruovat události, které

v kambriu, asi před 600 miliony let, umožnily vznik všech dnešních 35-37 základních typů tělních plánů živočichů (Raff 1996; Ervin, Valentine et al. 1997). Tato ojedinělá, relativně rychlá událost - ranná diversifikace metazoi (uskutečnila se rozmezí cca 40 milionů let), bývá označována jako *kambrická evoluční exploze*.

Mikroevoluce a makroevoluce jsou historicky podmíněné, vágní pojmy. Různí specialisté je chápou různě. *Paleontologové a taxonomové*, konfrontovaní s evoluční diskontinuitou a výraznými změnami forem, chápou makroevoluci jako evoluci vedoucí k různosti druhů a vyšších taxonomických jednotek; *embryolog* v mikroevoluci viděl příčinu druhotných morfologických modifikací, zatímco v makroevoluci příčinu vzniku nových archetypálních struktur. *Genetik* mezi mikroevolucí a makroevolucí neviděl jiný rozdíl, než rozdíl měřitelný počtem a rozsahem změn ve struktuře DNA.

Rozdílné chápání pojmů mikroevoluce/makroevoluce také souvisí s různými představami co je vlastně předmětem selekce. Jsou to odlišní jedinci v rámci vnitrodruhové variability (případ „mikroevoluce“), nebo jednotlivé populace jako celek v důsledku hromadně převládajících adaptivních znaků (případ „makroevoluce“)?

Molekulární biolog či *molekulární genetik* zpravidla vztahuje mikroevoluci k vnitrodruhové variabilitě a morfologickým modifikacím, makroevoluci ke genetickým, funkčním a fenotypovým inovacím v důsledku makromutací. Příkladem by mohl být vznik členitého těla a kambrické rozrůznění živočichů v důsledku amplifikace a modifikace určitých regulačních genů. V tomto smyslu C. de Duve dává přednost termínům *horizontální evoluce* (vznik biodiverzity menšími evolučními modifikacemi ontogenetických programů) a *vertikální evoluce* (vznik zásadních evolučních inovací, nových typů a linií) – ale pozor, nezaměňovat s pojmy horizontální a vertikální přenos genetické informace, o kterých jsme se zmínili výše.

Existuje několik dobře prostudovaných případů, které dokazují existenci mozaikové struktury genomů a jejich mozaikovou evoluci. Jedním z nich je studie struktury lokusu *glue* drosofilů (Martin and Meyerowitz 1988). V případě lokusu *glue* je exprese genů kontrolována hormonem ekdysteronem a vyvolává produkci lepivého proteinu (glue), který umožňuje fixaci pupáří na pevný podklad. Ačkoli dvě sousedící subdomény lokusu *glue* jsou oddělené ne více než 50 páry bází, liší se frekvencí substitučních mutací v poměru 1:10. Pokud jde o akumulaci bodových mutací, mohly tedy evolvovat odlišnou rychlostí. Obě subdomény se však neliší pokud jde o výskyt malých delecí a inzercí. Existují v podstatě dvě možná vysvětlení:

a) rozdílem v *působení selekčních tlaků* - mutačně a evolučně konzervativní subdoména však paradoxně nekóduje ani proteinový produkt ani neobsahuje regulační sekvence, funkční omezení jsou proto málo pravděpodobná;

b) nebo *rozdíly v produkci a/nebo fixaci substitučních bodových mutací*; v tomto případě si lze představit řadu ovlivňujících faktorů - od rozdílné účinnosti reparačních a rekombinačních procesů, efektu genové konverze, po lokální vlivy díky rozdílnému uspořádání chromatinu. Další studie jiných autorů, srovnávající 20 různých

lokusů drosofil, potvrdily *existenci výrazných rozdílů v akumulaci mutací v jednotlivých lokusech* a naznačily další možné příčiny těchto rozdílů: fixace evolučně významné mutace vyvolává ve svém bezprostředním okolí vznik zóny (okénka), chráněné před akumulací následných mutací, nebo vliv selekce jednoho lokusu i na přilehlý, neselektivní lokus - „hitch-hiking“ efekt, či „selective sweeps“ (Ridley 2004). Ukazuje se, že velikost chráněné zóny souvisí s rekombinační aktivitou. Lokusy s nízkou rekombinační frekvencí (zde se patrně uplatňují vlivy lokální struktury chromatinu) mívají rozsáhlá okna bez genetického polymorfismu.

Lze tato pozorování zobecnit i pro genomy obratlovců? Srovnávací analýzou různých lokusů genomů hlodavců a genomu lidského byly zjištěny tři základní typy divergence sekvencí: výrazná divergence v nekódujících sekvencích klastru genů β -globinu a γ -krystalinu, vysoce konzervativní sekvence receptoru $C\alpha-C\delta$ T buněk, a v sekvencích genů pro těžké řetězce α - a β -myosinu, a konečně smíšený typ divergence v doménách $C\mu-C\delta$ imunoglobulinu *IgH*. Tato mezidruhová srovnání divergencí genomových bloků znovu potvrzují, že jednotlivé domény mohou divergovat různými rychlostmi.

☞ *Strukturní přestavby genomů nejsou náhodné; jejich vznik podléhá složitým regulačním vlivům (Koop 1995).*

Pokročme ještě dále otázkou, zda se tyto regulace mohou chovat deterministicky, tj. být specifickou odpovědí na určitý externí podnět. Zde vstupuje do hry lamarckistická idea *adaptivních mutací*, odvozená ze zdánlivě cílevědomého chování mikroorganismů v určitých limitujících podmínkách. Tuto otázku otevřel na konci 80. let minulého století americký genetik J. Cairns (Cairns, Overbaugh et al. 1988).

Následující prostinká modelová situace by měla vysvětlit, co je míněno adaptací dle Lamarcka a co dle Darwina:

Představme si prostor, rozdělený přepážkou s kruhovým otvorem na dvě části, A, B. V části A, s dostatkem potravy i vody, žijí kulové bytosti („fenotyp koule“), jejichž průměr je větší, než průměr otvoru v přepážce. Vnější pozorovatel v této situaci nepozoruje žádné makroskopické změny, dokud se nezmění životní podmínky: v části A je nyní potrava ale nedostatek vody, v části B naopak. „Koule“ jsou nyní vystaveny existenčnímu problému.

„Lamarckovské bytosti“ účelně změni svůj tvar, aby mohly procházet oběma směry; v souladu s potřebou potravy i vody se účelově stanou elipsoidem. Tuto *cílenou, změnu nazveme změnou lamarckovsky adaptivní*. Bude přenesena do následujících generací a může být evolučně relevantní. *Lamarckovské bytosti mají schopnost cílenou, účelnou adaptací měnit dědičné vlastnosti na základě podmínek v prostředí.*

„Darwinovské bytosti“ (původně „fenotyp koule“) se v jakémkoli prostředí postupně spontánně rozrůžňují (v populaci narůstá genetická a fenotypová variabilita); během reprodukčního cyklu a replikace genetického základu vznikají nejrůznější dědičné změny, mezi jinými i ty, které vedou k fenotypu „elipsoid“. „Fenotyp elipsoid“ se stává adaptivním v důsledku selekce, mutanti získávají reprodukční výhodu a postupně vytlačí ostatní.

Darwinovské bytosti nemohou účelně měnit svůj genotyp, protože neexistuje cílevědomá komunikace ve směru [prostředí ⇌ soma ⇌ germinální linie], či na úrovni molekulární, [prostředí ⇌ protein ⇌ RNA]. Komunikační bariéra prvního typu je tzv. Weismannovou bariérou, druhá bariéra plyne z Crickova centrálního teorému („dogmatu“) molekulární biologie o jednosměrnosti toku genetické informace od nukleových kyselin k proteinům.

Obě bariéry mají mezi sebou příčinnou souvislost.

V Cairnsových experimentech s *E. coli* se jevílo, že určité mutace se objevují častěji, jestliže je buňka podrobena selekci ve prospěch jejich vzniku, jinak řečeno, jsou cíleně indukovány vlivem prostředí. Tyto experimenty byly v rozporu s paradigmatem z let 1943 -1952, plynoucím z klasických experimentů Lurii a Delbrucka a laboratoře Lederbergovy (z tzv. flukтуаčního testu); jejich studie totiž ukazovaly, že genetická variabilita vzniká darwinovsky, rovnoměrně v čase, nezávisle na působení prostředí. Práce Cairnse a spolupracovníků oživily diskuse o možnosti návratu lamarckovského pojetí biologické evoluce díky neortodoxní hypotéze, že *selekční podmínky instruuji* buňku, jakou *cílenou mutaci* má vytvořit nebo fixovat.

Jaký byl zásadní rozdíl v uspořádání experimentů výše zmíněných klasiků a Cairnsovy skupiny? Luria, Delbruck i Lederbergovi studovali mutace v podmínkách *letální selekce*, kdy pouze preexistující mutace měly šanci přežít. Naopak Cairns zvolil pro měření frekvencí a typu mutací *neletální podmínky*- kontraselektované buňky byly pouze omezeny v množení (selekcí přežívaly ve stacionární fázi růstu, typicky vyvolanou hladověním). Následně právě tyto buňky jevíly, podle Cairnse, „cílené“ mutace. Tento závěr byl ale zdrojem řady kritických argumentů (jedny z prvních uvádí (Foster 1992).

I když se Cairns sám, i jeho následovníci, původní „lamarckovské“ interpretace nakonec vzdali, jejich experimenty podnítily další bádání v tomto směru. Výsledkem byl závěr, který předpověděl již v 70. letech M. Radman:

☞ bakterie nesou genetický program, který generuje mutace; znovu se potvrzuje základní fakt: *genomy z hlediska mechanismu vzniku, frekvence a distribuce mutací, nejsou statickým souborem genů.*

Bakterie mohou ve stresujících podmínkách uspíšit svou evoluci tím že aktivují mechanismy generující variabilitu. Víme již, že existují lokusy náchylné i chráněné vzhledem k hypermutacím. Na této úrovni

se může uplatnit standardní role darwinovské selekce, která roztrídí mutace na vyloučené, selektované nebo v daných podmínkách skryté (neutrální).

Na příklad *E. coli*, nesoucí mutovaný laktózový (*lac*) operon, skutečně vykazovaly významně zvýšenou frekvenci spontánních reverzí v podmínkách, kdy jediným zdrojem uhlíku a energie byla právě laktóza. Ale na rozdíl od původní Cairnsovy představy, že tyto mutace jsou specificky směřovány právě jen do *lac* operonu, byla nalezena i jiná ohniska neselektovaných hypermutací: např. současně s „adaptivními“ *lac*⁺ reverzemi vznikaly mj. i „neadaptivní“, neselektované mutace, umožňující utilizaci maltózy.

Výsledky posledního desetiletí dávají Radmanovi za pravdu: Kandidáty na funkci mutátorů u *E. coli* jsou „chybující“ („error-prone“) DNA polymerasy, doprovázejících SOS reparační proces. I pouhé hladovění může indukovat SOS proces a mutátorovou aktivitu. Nedávno objevená polymerasa IV (*E. coli*) je považována za hlavní generátor mutací v podmínkách stresu. Pokud jde o eukaryontní genomy, významný podíl na genetické variabilitě, kromě lokálních replikačních poruch, mají nespecifické makromutace v důsledku genových a genomových přestaveb (Thaler 1994). Zdrojem hypermutací mohou být i důsledky poruch v „choreografii DNA“ při iniciaci transkripce (Wright 2000) v podmínkách stresu - i defektní gen může být v nouzi indukován k transkripci, byť jeho produkt je také defektní. Transkripce defektního genu však může vyvolat zvýšenou frekvenci lokalizovaných mutací, z nichž některé mohou vést k reverzi či supresi původní mutace. Připomeňme si, že toto vysvětlení „adaptivních“ mutací postuloval již v r. 1993 J. Maynard Smith v předmluvě k prvnímu vydání své knihy „*The Theory of Evolution*“ vydané v edici Canto (Maynard Smith 1995).

A. Neodarwinistickou představu evoluce můžeme znázornit cykly

[1] ⇌ [2] ⇌ [3] ⇌ [1']

organismy, [1], [1']; spontánní (náhodná) variabilita, [2]; selekce, [3];

B. Dle současné, „post-neodarwinistické“, představy lze evoluční cykly a vzájemné vztahy mezi organismy a prostředím zobrazit takto (upraveno z Thalera):

[1] ⇌ [2] ⇌ [3] ⇌ [4] ⇌ [5] ⇌ [1']

organismus, [1], [1']; regulace metabolismu DNA, fixace spontánních mutací; indukce mutací, rekombinací a reparací, [2]; variabilita genotypu, [3]; variabilita fenotypu, [4]; selekce, [5];

- *Vstupy:*

a) {P} ⇌ {M} ⇌ [2] ⇌ [3] ⇌ [4] ⇌ [5]

b) {P} ⇌ {M} ⇌ {T} ⇌ [3] ⇌ [4] ⇌ [5]

c) {P} ⇌ [3] ⇌ [4] ⇌ [5]

vnímání prostředí, {M}; iniciace transkripce, {T};

-*Pětná vazba k prostředí {P}: [4] ⇌ {P}*

☞ V tomto schématu, na rozdíl od neodarwinistického pojetí, je zahrnut i *podíl regulované genomové dynamiky na evolučních událostech*.

Prostředí skrze mechanismy percepce vstupů z prostředí může působit a) na nastavení regulací metabolismu DNA, b) na regulace fenotypových projevů a epigenetickou dědičností, c) na iniciaci transkripce s následnou lokální indukcí mutací. Ale vliv prostředí na genomy může být i přímý, d), jako je tomu v případě působení záření a některých mutagenů. Fenotypová variabilita je nakonec to, co je vystaveno selekci. Organismy skrze své fenotypy vykonávají zpětný vliv a postupně mění své prostředí.

Porovnáme-li obě výše uvedená schémata pozorujeme, že v obou je zahrnut podíl náhody i význam selekce. Jde však o „různé náhody“ (pro něž nemáme v jazyce vhodné rozlišení). Zatím co v případě **A** jde při vzniku variability o náhodu stejného druhu, jakou pozorujeme při rozpadu atomového jádra nebo při vrhu ideální kostky, v případě **B** jde o kumulovaný, nepředvídatelný výsledek velkého počtu vzájemně propojených, vesměs regulovaných dějů; v odlišení od předchozího případu lze hovořit o *regulované nahodilosti*.

☞ Schéma **B**, spolu s poznatky o modulárním uspořádání genomů, *otevřít nový pohled na evoluční děje: genomy a jejich nositelé nejsou pasivními objekty vzhledem ke vzniku variability, ale aktivně, byť necíleně, se podílejí na akceleraci své evoluce*. Mutační rychlost a spektrum mutací je do značné míry pod kontrolou genetických faktorů.

Část evolučních biologů váhá přijmout hypotézu o aktivní roli organismů v evoluci-hypotézu evolvability (nebo hypotézu o evoluci evolvability). Uvažují, že pokud připustíme existenci „generátorů mutací“ a budeme je chápat jako konstitutivní selekční znak, musíme přijmout i logické důsledky: takové „generátory“ by musely být samy o sobě adaptivní, posilovat reprodukční úspěšnost, preferovat prospěšné mutace a omezovat mutace škodlivé, v rozporu s principy darwinismu.

☞ Fakta, řadu z nich shrnula Barbara McClintock ve své nobelovské přednášce (McClintock 1983), však dokazují, že *schopnost ovlivňovat rychlost své evoluce je genomům vlastní*, souvisí s nelinearitou genomové dynamiky. Organismy procházejí kritickými situacemi, kdy vzrůst genetické variability může být nespecificky (necíleně) ovlivněn působením vnějších faktorů přes nastavení parametrů, kontrolujících rekombinogenní procesy.

☞ Změny mutačních rychlostí stejně jako změny topografie mutací jsou nepředvídatelné, nesouvisejí s lamarckovskou adaptivitou- nejsou změnami nenáhodnými vzhledem k funkci.

Evolvabilita (a její evoluce) tedy není v kontradikci s darwinovským principem nezacílenosti evoluce. Mechanismy, které evolvabilitu generují, jsou samy o sobě i navzájem neustále pod kontrolou selekce.

Doporučná četba:

Přehled mechanismů mutací, rekombinací (dynamika genomů) a transkripce, klasické učebnice: „*Základy buněčné biologie*“, Bruce Alberts a spol., český překlad Espero Publishing Ústí n. Labem; „*Genes*“ Benjamína Lewina, např. „*Genes V*“, Oxford Univ. Press, 1994, nebo vynikající poslední verze „*Genes IX*“ z r. 2008 (Jones and Bartlett Publishers), která obsahuje nejaktuálnější doplnění.

Populárně podaná diskuse poznatků molekulární genetiky, zejména konformační dynamiky genomů, ve vztahu ke vzniku genetické variability, z pohledu 90. let minulého století: J. Rennie, „*DNA'S new twists*“, Scientific American, March 1993, 88-96; a dále pro srovnání pohled z roku 2001, např.: M. Chicurel, „*Can organisms speed their own evolution?*“, Science 292,1824-1827, 2001.

Nestárnoucí, inspirativní dílem je monografie S. Ohno, „*Evoluce Genovou Duplikací*“, Academia, Praha, 1975, která exponuje problem genomových přestaveb a relevance makromutací pro evoluci.

Doplňková literatura:

Bernardi, F. and J. Ninio (1978). "The accuracy of DNA replication." Biochimie **60**: 1083-1095.

Bird, A. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**: 209-213.

Bird, A. P. (1980). "DNA methylation and frequency of CpG in animal DNA." Nucleic Acids Res. **8**: 1499-1504.

Cairns, J., J. Overbaugh, et al. (1988). "The origin of mutants." Nature **335**: 142-145.

Drake, J. W. (1969). The Molecular basis of Mutation, Holden-Day.

Eigen, M. (1993). "The origin of genetic information: viruses as models." Gene **135**: 37-47.

- Eigen, M. and P. Schuster (1979). The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- Ervin, D., J. Valentine, et al. (1997). "The origin of animal body plans." American Scientist **85**: 126-137.
- Foster, P. L. (1992). "Directed mutation: Between unicorns and goats." J. Bacteriol. **174**: 1711-1716.
- Hayes, W. (1964). The Genetics of bacteria and their viruses. Studies in Basic Genetics and Molecular Biology, Blackwell.
- Koop, B. F. (1995). "Human and rodent DNA sequence comparisons: a mosaic model of genomic evolution." Trends in Genet. **11**: 367-371.
- Kunkel, T. A. (1992). "DNA replication fidelity." J. Biol. Chem. **267**: 18251-18254.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**: 709-715.
- Martin, C. H. and E. M. Meyerowitz (1988). "Mosaic evolution in the *Drosophila* genome." BioEssays **9**: 65-69.
- Maynard Smith, J. (1995). The Theory of Evolution. Cambridge, Cambridge Univ. Press.
- McClintock, B. (1983). "The significance of responses of the genome to challenge." Science **226**(792-801).
- O'Brien, S. J., H. Seuáñez, et al. (1988). "Mammalian genome organization: An evolutionary view." Annu. Rev. Genet. **22**: 323-351.
- Ohno, s. (1969). "The spontaneous mutation rate revisited and the possible principle of polymorphism generating more polymorphism." Can. J. Genet. Cytol. **11**: 457-467.
- Ohno, S. (1975). Evoluce Genovou Duplikací.
- Poole, A. M., D. T. Logan, et al. (2002). "The evolution of the ribonucleotide reductases: Much ado about oxygen." J. Mol. Evol. **55**: 180-196.
- Raff, A. R. (1996). The Shape of Life. Genes, Development, and the Evolution of Animal Form, The Univ. of Chicago Press.
- Ridley, M. (2004). Evolution, Blackwell.
- Riera, J., F. T. Robb, et al. (1997). "Ribonucleotide reductase in the archaeon *Pyrococcus furiosus*: A critical enzyme in the evolution of DNA genomes?" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 475-478.
- Stent, G. S. (1963). Molecular Biology of Bacterial Viruses, Freeman.
- Thaler, D. S. (1994). "The evolution of genetic intelligence." Science **264**: 224-225.

Wright, B. (2000). "A biochemical mechanism for nonrandom mutations and Evolution." J. Bacteriol. **182**: 2993-3001.