

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lukáš Novák

Laterální genový přenos a jeho využití ve fylogenetice eukaryot

Lateral gene transfer and its utilisation for the phylogeny of eukaryotes

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl Ph.D.

Praha, 2011

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 05. 05. 2011

.....

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli, Vladimíru Hamplovi, za neocenitelné rady a připomínky během psaní této práce. Zvláštní dík patří též Elišce Majorové za jazykovou korekturu mého textu. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, svým spolužákům a přátelům za jejich trpělivost, pomoc i rozptýlení, bez kterých bych tuto práci jen s těžší mohl dokončit.

OBSAH

Abstrakt	1
Úvod	2
1. LGT a jeho identifikace	2
2. LGT u prokaryot	3
3. LGT u eukaryot	4
3.1. Endosymbiotický genový přenos	4
3.1.1. EGT z mitochondrií	5
3.1.2. EGT z plastidů	6
3.1.3. EGT z chlamydií	6
3.2. Anomální laterální genový přenos	8
3.2.1. Využití LGT ve fylogenetice	9
4. Příklady komplikované distribuce eukaryotických genů	12
4.1. Citrátsyntáza bakteriálního původu u 3 linií eukaryot	12
4.2. Mozaikovitě rozšíření pyruvát formiát lyázy	13
4.3. Mnohonásobná náhrada elongačního faktoru	15
4.4. Alternativní tubulin opisthokontního typu u zástupců Excavata	18
5. Příklady využití LGT ve fylogenetice eukaryot	20
5.1. Příbuznost diplomonád a parabazalidů 1	20
5.2. Příbuznost diplomonád a parabazalidů 2	22
5.3. Monofylie skupiny Opisthokonta	23
5.4. Společný původ Viridiplantae a Rhodoplantae	24
5.5. Příbuznost plastidů haptofytů a skrytěnek	26
5.6. Jsou Jakobida nejbazálnější linií eukaryot?	27
Závěr	28
Použitá literatura	30

ABSTRAKT

K laterálnímu genovému přenosu dochází u eukaryot relativně vzácně. Proto může být přítomnost konkrétního laterálně přeneseného genu u více linií eukaryot považována za jejich společnou synapomorfii, která je definuje jako monofyletickou skupinu. Na rozdíl od běžných fylogenetických postupů dokáže tento přístup potenciálně odhalit i směr evoluce a pozici kořene evolučního stromu. V první části této práce diskutuji různé aspekty využití laterálního genového přenosu ve fylogenetice eukaryot včetně výhod a nevýhod oproti běžným postupům. Ve druhé části pak představuji jednotlivé studie, které v minulosti tuto metodu využily.

Klíčová slova: Laterální genový přenos, vzácné genomové změny, artefakt přitahování dlouhých větví, endosymbióza, fylogenetika, eukaryota, protista.

ABSTRACT

Lateral gene transfer is a relatively rare event in eukaryotes. Presence of a specific gene acquired by lateral transfer in multiple lineages can be therefore considered to be their common synapomorphy, defining them as a monophyletic group. In contrast to usual phylogenetic methods, this approach can potentially shed light even on the direction of evolution and therefore find the position of a root of a given group of organisms. In the first part of this work I discuss various aspects of lateral gene transfer utilisation in eukaryote phylogeny including advantages and disadvantages against common approaches. In the second part I present particular studies that have recently used this method.

Key words: Lateral gene transfer, rare genomic changes, long branch attraction artefact, endosymbiosis, phylogeny, eukaryots, protists.

ÚVOD

Molekulární fylogenetika je obor, který se snaží odhalovat reálné příbuzenské vztahy mezi organizmy na základě podobnosti jejich informačních biopolymerů – nukleových kyselin a proteinů. Nejprímějším a nejužitečnějším zdrojem znaků pro molekulárně fylogenetické analýzy je primární struktura těchto biopolymerů, tedy sekvence za sebou následujících nukleotidů nebo aminokyselin. Za znak se zde považuje jedna pozice v sekvenci, která může u různých organizmů nabývat čtyř (u nukleotidů) respektive dvaceti (u aminokyselin) hodnot.

Takový přístup má oproti klasické fylogenetice, pracující s fenotypovými znaky, hned několik jasných výhod. Zprvė poskytuje nesrovnatelně více znaků, jelikož genom naprostě většiny organizmů obsahuje mnoho milionů nukleotidů. Zadruhé jsou takto získané znaky mnohem méně navzájem závislé a méně podléhají selekci než znaky fenotypové. V neposlední řadě pak sekvenční, tedy digitální, povaha molekulárních znaků výrazně usnadňuje jejich automatické zpracování a nevyžaduje žádnou, potenciálně neobjektivní, interpretaci ze strany člověka.

Na druhou stranu jsou zde pochopitelně i nevýhody. Zprvė je třeba zmínit stále ještě značnou technickou a finanční náročnost získávání sekvencí. Další velkou překážkou při aplikaci molekulární fylogenetiky je všudypřítomná hrozba tzv. artefaktu přitahování dlouhých větví. Tento těžko eliminovatelný artefakt způsobuje, že taxony s velkou substituční rychlostí se v molekulárně fylogenetických studiích jeví být navzájem příbuznější, než ve skutečnosti jsou.

Jednou z možností, jak omezit tento artefakt, je využití jiného typu molekulárních znaků, tzv. vzácných genomových změn. Tyto znaky jsou představovány delšími úseky sekvence, jejichž odlišnost u různých organizmů je vysvětlitelná pouze málo pravděpodobnými událostmi. Jde například o inserce či delece v sekvencích, duplikace genů, fúze genů do jednoho čtecího rámce nebo naopak rozdělení jednoho genu na více kratších. V posledních letech se stále častěji v těchto souvislostech hovoří i o laterálně přenesených genech, kterým se budu věnovat dále.

1. LGT A JEHO IDENTIFIKACE

Jako laterální genový přenos (LGT, někdy také „horizontální genový přenos“ – HGT) označujeme přesun genu, genového fragmentu nebo i celé skupiny genů mezi různými genomy, přičemž takový pohyb dědičné informace překračuje běžné reprodukční bariéry a děje se prakticky nezávisle na míře příbuznosti donora a recipienta.

Takto přenesené elementy lze v genomu příjemce identifikovat více způsoby. Například na základě zastoupení GC párů, které je netypické pro daný taxon, nebo díky odlišnému užívání

jednotlivých kodónů. Nejspolehlivějším dokladem je ale odlišná topologie fylogenetického stromu konkrétního genu od topologie stromu vytvořeného na základě konsenzu více genů stejného organismu. To totiž znamená, že studovaný gen má jinou evoluční historii než většina genomu. Pečlivá fylogenetická analýza a konstrukce solidně podpořeného stromu je zde skutečně nutná, protože jednodušší metody, jako je poměrování příbuznosti podle podobnostních skóre získaných algoritmem BLAST, jsou příliš hrubé a mohou poskytovat zavádějící výsledky.

Nejsnáze se identifikují geny přenesené mezi různými doménami. Najdeme-li například v eukaryotickém genomu takový gen, který jeví velkou příbuznost eubakteriálním nebo archebakteriálním homologům, ale malou nebo žádnou příbuznost eukaryotickým genům, můžeme si být téměř jisti dokonce i směrem jeho přenosu. Naopak u intradoménového LGT je situace často složitější. Zvláště pak u eubakterií, kde zdaleka neznáme vzájemné vztahy jednotlivých velkých skupin a nemůžeme tedy vyloučit, že podezřelý gen není pozůstatkem nějaké příbuznosti, která dosud nebyla odhalena. Také si nikdy nemůžeme být jisti, že nečekaná topologie stromu daného genu je výsledkem LGT a ne dávné duplikace následované mnohonásobnými ztrátami jedné z kopií u různých taxonů. Musíme se spoléhat na odhad pravděpodobnosti takové sekvence událostí, přičemž ale nejsme schopni určit, jak snadno k duplikacím, ztrátám nebo přenosům daných genů může dojít.

2. LGT U PROKARYOT

U prokaryotických organismů je LGT známý již od dvacátých let minulého století (Griffith 1928), kdy mj. umožnil identifikaci DNA jako nosiče dědičné informace (Avery et al. 1944). Brzy se ukázalo, že jde o jeden z nejvýznamnějších činitelů evoluce prokaryot. K laterálnímu přenosu u nich nedochází jen pasivně – prostřednictvím virů a náhodného přijímání zlomků DNA, ale i aktivně a „záměrně“ – prostřednictvím konjugace, jakési bakteriální obdoby sexu, která ovšem není svázána s fylogenetickou příbuzností. Kromě této adaptace je LGT mezi prokaryoty usnadněn i skutečností, že jejich geny jsou organizovány ve funkčních celcích – operonech a plazmidech. To umožňuje přenést najednou celou metabolickou dráhu nebo všechny geny potřebné k výstavbě konkrétní buněčné struktury, která tak může v buňce příjemce okamžitě začít fungovat a poskytovat mu selekční výhodu (Longstaff et al. 2007).

Sdílení genů je mezi prokaryoty dokonce tak intenzivní, že některé bakteriální skupiny nesou většinu genů cizího původu a ponechávají si jen malé množství vlastních, nejdůležitějších genů (Zhaxybayeva et al. 2009). To je pochopitelně jen jedna z interpretací. Možná by tomu mohlo být i naopak – většina genů je v organismu původní, jen ty nejdůležitější přišly odjinud. Takovéto

vysvětlení ale také nijak nesnižuje význam LGT, neboť předpokládá relativně snadnou výměnu esenciálních genů.

Jak je z předchozího příkladu patrné, častý LGT může značně ztěžovat rekonstrukci evoluční historie organismů. Je to jeden z důvodů, proč dodnes nemáme jasnější představu o dávné evoluci prokaryot. Podle některých biologů ani není možné dávnou fylogenezi zrekonstruovat pro její příliš síťovitou strukturu. Jiní se naopak domnívají, že LGT se odehrává přednostně mezi blíže příbuznými liniemi a může tak sloužit k vymezení vyšších taxonů (Andam et al. 2010).

3. LGT U EUKARYOT

Tématem této práce nejsou ovšem prokaryota, a proto se jim nebudu dále věnovat. U eukaryotických organismů je situace značně odlišná. V jejich případě byla role LGT jako důležitého evolučního mechanismu přehlížena až do konce devadesátých let minulého století. Jednak pro obtížnější studium eukaryotického genomu, který je typicky mnohem rozsáhlejší než prokaryotický, jednak kvůli vzácnějšímu výskytu LGT. U eukaryotických organismů totiž není znám žádný mechanismus podobný konjugaci a k laterálnímu přenosu tak může docházet pouze náhodně.

V případě eukaryot je třeba rozlišovat dva typy LGT podle toho, zda donorem genu je genom trvale existující uvnitř buňky recipienta, nebo genom nějakého cizího nezávislého organismu.

3.1. ENDOSYMBIOTICKÝ GENOVÝ PŘENOS

Nejpřirozenějším zdrojem genů jsou buňce vlastní semiautonomní organely – mitochondrie, případně plastidy. Ty, podle dnes široce uznávané, endosymbiotické teorie (Sagan 1967) byly kdysi volně žijícími eubakteriemi. V důsledku intracelulární symbiózy s eukaryotickou buňkou byly ale pozměněny a redukovány natolik, že dnes již nejsou schopné samostatného života. Mezi tyto modifikace patří i masivní přenos genů z genomu endosymbionta do jaderného genomu hostitele.

Tento jev se nazývá endosymbiotický (EGT) nebo intracelulární (IGT) genový přenos. Pro odhalování evoluční historie má význam především tehdy, kdy se zabýváme organizmy, u kterých danou organelu (mitochondrii, plastid nebo jejich deriváty) nejsme s to fyzicky nalézt. Existence většího množství genů původem z organely v jaderném genomu se tak může stát jediným dokladem její dávné přítomnosti v předkovi studovaného organismu.

3.1.1. EGT Z MITOCHONDRIÍ

Za největší úspěch tohoto přístupu můžeme považovat silné důkazy proti hypotéze Archezoa. Tato hypotéza, formulovaná v osmdesátých letech (Cavalier-Smith 1983 in Cavalier-Smith 1993), předpokládala, že některé žijící linie protist, u kterých nebyla objevena mitochondrie, tuto organelu ani nikdy v minulosti neměly. To by znamenalo, že se od linie vedoucí k běžným aerobním eukaryotům musely oddělit ještě před získáním mitochondrie. Představa archezoí, primárně amitochondriálního, parafyletického taxonu na bázi eukaryot, byla po celá devadesátá léta nesmírně vlivná, zejména díky podpoře, kterou jí poskytly první fylogenetické analýzy provedené na sekvencích rRNA malé ribozomální podjednotky (Woese 1990, Sogin 1991, Sogin & Silberman 1998).

Na konci devadesátých let se objevily názory, že bazální pozice archezoí na fylogenetickém stromu eukaryot neodráží realitu, ale je výsledkem artefaktu přitahování dlouhých větví (Philippe & Laurent 1998). Prvními faktickými „hřebíčky do rakve“ hypotézy Archezoa byly pak nálezy několika genů přesvědčivě mitochondriálního původu v jaderných genomech některých domnělých archezoí. Jde především o Heat shock proteiny HSP10 v trichomonádě *Trichomonas vaginalis*; HSP60 v *T. vaginalis*, mikrosporidii *Nosema apis*, diplomonádě *Giardia intestinalis* a amébě *Entamoeba histolytica* a HSP70 v *T. vaginalis* a *N. apis* (Clark & Roger 1995, Bui et al. 1996, Garmot et al. 1996, Roger et al. 1996, Horner et al. 1996, Peyretailade et al. 1998, Roger et al. 1998). Dalším příkladem může být gen pro valyl-tRNA syntetázu mitochondriálního původu, nalezený v genomech *T. vaginalis* a *G. Intestinalis* (Hashimoto et al. 1998).

Interpretace podobných nálezů ale nemusí být tak jednoznačná, jak se zdá. Zvláště u fagotroficky se živících organismů, jakými s největší pravděpodobností byli předci všech těchto taxonů, lze očekávat velkou tendenci k přijímání eubakteriálních genů (Doolittle 1998). Nelze tedy vyloučit, že pozorovaný stav je výsledkem náhodného LGT z volně žijících proteobakterií, a ne dávné endosymbiózy. V tomto případě ale můžeme oněm dokladům důvěřovat, zvláště díky velkému množství dalších studií, které je nezávisle podporují. Jde především o přímé nálezy redukovaných mitochondrií ve většině domnělých archezoí (Tovar et al. 1999, Ghosh et al. 2000, Tovar et al. 2003, Hrdy et al. 2004).

Dnes je hypotéza Archezoa všeobecně považována za vyvrácenou a o primárně amitochondriálních eukaryotech se soudí, že buď nikdy neexistovali, dávno vyhynuli, nebo se dosud kdesi skrývají a unikají naší pozornosti. Za tento významný posun v chápání evoluce eukaryot můžeme vděčit mimo jiné i endosymbiotickému genovému přenosu.

3.1.2. EGT Z PLASTIDŮ

Někteří vědci tvrdí, že jednotlivé geny plastidového nebo sinicového původu, nalezené v mnohých nefotosyntetických organizmech, přesvědčivě ukazují na dávnou endosymbiózu (Yuan et al. 2010). Taková pozorování podle nich podporují tzv. Plastid-early hypotézu (Nozaki 2005), která předpokládá přijetí sinicového endosymbionta, budoucího plastidu, ještě před oddělením jednotlivých linií eukaryot. Tedy že všechna žijící eukaryota jsou primárně fotosyntetická, jen některé linie, například ta vedoucí k živočichům a houbám, plastid nadobro ztratily.

Zmiňují například 16 takových genů, nalezených v kinetoplastidech *Trypanosoma brucei* a *Leishmania major* (Hannert et al. 2003), 7 v hlence *Dictyostelium discoideum* a po jednom v amébě *Entamoeba histolytica* a trichomonádě *Trichomonas vaginalis* (Yuan et al. 2007, 2008). Všechny tyto organizmy jsou obecně považovány za primárně aplastidické a nikdy v nich nebyla nalezena žádná organela, která by mohla být redukováným plastidem.

Nálezů několika málo genů, navíc bez solidní fylogenetické analýzy, ale není možné vydávat za doklad této evoluční hypotézy, může se totiž jednat o geny získané LGT z potravy nebo jiným způsobem nezahrnujícím endosymbiózu. Tuto studii zde uvádím zejména jako „odstrašující příklad“ slepé uličky, kam nás mohou dovést příliš zjednodušující interpretace LGT.

Mnohem střízlivější přístup k domněle plastidovým genům předvádí jiný tým, který se zaměřil na trubénku (Choanoflagellata) rodu *Monosiga*. V jejím jaderném genomu našli více než 100 genů pocházejících z fotosyntetických eukaryot, zejména skupin Haptophyta, Bacillariophyceae a Viridiplantae. Autoři ale přistupují ke svým objevům opatrně. Upozorňují, že pozorovaný stav může být stejně dobře výsledkem LGT z potravy nebo nedávné volné symbiózy s eukaryotickou řasou (Sun et al. 2010). Zvláště vzhledem k tomu, že zmiňované řasové skupiny patří k nejhojnějším zástupcům planktonu vůbec, je první možnost více než pravděpodobná. Podezřelá je i samotná skutečnost, že nalezené geny spadají do několika různých, málo příbuzných, fotosyntetických linií. Pokud by jejich přítomnost byla důsledkem dávné endosymbiózy, dalo by se předpokládat, že naprostá většina z nich bude jevit příbuznost genům jednoho konkrétního taxonu.

3.1.3. EGT Z CHLAMYDIÍ

Semiautonorní organely nejsou jedinými potenciálními zdroji genů pro EGT. Obligátní intracelulární parazité také žijí v dlouhodobé těsné asociaci s hostitelem a mohou obohacovat jeho genom. Je dokonce možné, že v jejich případě je úspěšný přenos pravděpodobnější než u organel. K přenosu genů totiž může nejsnáze dojít po poškození endosymbionta a vylití jeho obsahu do

cytoplazmy hostitele. Po poškození nebo úplné ztrátě užitečné organely se ale radikálně snižuje životaschopnost hostitele a s tím i pravděpodobnost, že předá získané geny další generaci. U intracelulárního parazita je situace pochopitelně zcela opačná.

Mezi nejrozšířenější intracelulární patogeny eukaryot patří chlamydie (Chlamydiae), gramnegativní eubakterie parazitující v cytoplazmě buněk živočichů i rozličných protist. Nikdy ale nebyly nalezeny v buňkách fotosyntetických eukaryot. Bylo proto velkým překvapením, když se v genomech mnohých řas jak z „říše“ Plantae, tak Chromista (*sensu* Cavalier-Smith 2010) našlo několik desítek genů blízce příbuzných svým chlamydiálními homologům. Podrobnější fylogenetická analýza pak ukázala na 39 genů, z nichž každý tvoří monofyletickou skupinu s chlamydiálními geny (Becker et al. 2008). Naprostá většina těchto genů je kódována jaderným genomem, ale jejich produkty jsou směřovány do plastidu, kde se zapojují do nejrůznějších metabolických drah zahrnujících jak chlamydiální, tak původní plastidové proteiny.

Objev takových genů sám o sobě mnoho neznamená, je možné jej interpretovat více způsoby. Mimo jiné může jít stejně dobře o LGT z chlamydií do eukaryot jako naopak. Navíc vzhledem k tomu, že se tyto geny našly, až na vzácné výjimky, pouze u fotosyntetických eukaryot, může jejich podobnost s chlamydiálními sekvencemi odrážet blízkou příbuznost sinic (Cyanobacteria), předků plastidů, s chlamydiemi. Takové vysvětlení vůbec nevyžaduje LGT. Za předpokladu, že vůbec došlo k LGT, je otázkou, zda se odehrál mezi chlamydiemi a přímo eukaryotickým jaderným genomem, nebo zprostředkovaně přes genom sinicového endosymbionta. Pokud platí druhá možnost, vyvstává další otázka, jestli přenos genů nastal před, nebo až po vzniku symbiotického vztahu s eukaryotickou buňkou. Takové nejasnosti pochopitelně nesmírně ztěžují jakékoli další úvahy, které by měly z nálezů těchto genů vycházet. Odpovědi pomohla nalézt další fylogenetická analýza.

Pro 30 z oněch 39 genů se podařilo nalézt homology v genomech sinic. S nimi ale nejeví žádnou významnou příbuznost. V některých případech dokonce sinicové geny tvoří solidně podpořené monofylum s geny jiných bakterií, které ovšem nezahrnuje geny chlamydií, ani ty nalezené v eukaryotech. To sice nevylučuje možnost nějaké hluboké příbuznosti mezi chlamydiemi a sinicemi, znamená to ale, že podezřelé geny nalezené v genomech fotosyntetických eukaryot nejsou pouhými modifikacemi těch sinicových. Nepocházejí tedy ze sinic, ale z chlamydií. Fylogenetická analýza také umožnila odhadnout směr, kterým byly geny přeneseny. Homology hned v několika velkých skupinách bakterií má 36 z nich. Vzhledem k tomu, že z celé široké diverzity eukaryot se nacházejí pouze u Plantae a Chromista (kam byly nejspíše zaneseny spolu se sekundárním plastidem), je více než pravděpodobné, že byly původně přeneseny z chlamydií do

eukaryot a ne naopak. Všechny 5 genů, které sdílejí všechny 3 linie Plantae, tedy Viridiplantae, Rhodoplantae i Glaucophyta, jeví sesterské postavení Chlamydií a Plantae. Z toho plyne, že k jejich přenosu z chlamydií došlo ještě před oddělením těchto 3 linií.

Autoři navrhují vysvětlení, že dávný předek Plantae byl hostitelem parazitických chlamydií, ze kterých získal nezanedbatelné množství nových genů. Později ale z neznámého důvodu chlamydie ztratily schopnost infikovat zástupce Plantae nebo linie, která na rostlinách dokázala parazitovat, zcela vyhynula.

Výsledky této studie poskytují další nezávislou podporu pro předpokládanou monofylii Plantae, která byla nedávno zpochybněna (Nozaki et al. 2007). Autoři se také pokusili na základě chlamydiálních genů zrekonstruovat vztahy mezi 3 hlavními liniemi této „říše“, které jsou dodnes značně nejasné. Bohužel ale ani jedna ze tří možných topologií nebyla podpořena dostatečnou bootstrapovou hodnotou a proto není zatím možné rozhodnout, která odpovídá realitě. To je nejspíše způsobeno nedostatečným zdokumentováním genomů Glaucophyta.

3.2. ANOMÁLNÍ LATERÁLNÍ GENOVÝ PŘENOS

Na rozdíl od endosymbiotického genového přenosu nevyžaduje druhý typ eukaryotického LGT žádnou dlouhodobou těsnou asociaci donora s recipientem. Takový jev můžeme nazývat anomální laterální genový přenos (Katz 2002), nebo jednoduše laterální genový přenos *sensu stricto*. Byly navrženy dva mechanismy, které za něj mohou být zodpovědné. U fagotroficky se živících organismů je dominantní příjem fragmentů DNA z kořisti, zatímco u ostatních, například autotrofních nebo saprotrofních, nejspíše převládá přenos prostřednictvím virů (Gogarten 2003).

Princip přenosu genů z kořisti, prokaryotické či eukaryotické, do fagotrofického eukaryota popisuje hypotéza „You are what you eat“ (Doolittle 1998). Podle ní prakticky nezáleží, jak málo pravděpodobné je úspěšné zainkorporování cizího genu do vlastního genomu, protože spolu s přijímáním potravy nastávají další a další příležitosti pro přenos. Nezáleží ani na tom, jak málo pravděpodobná je ztráta konkrétního vlastního genu z jaderného genomu. Pokud je jednou ztracen, je ztracen nadobro, protože organizmus nemá žádnou „nouzovou zásobu“ vlastních genů. Zato organizmy sloužící jako potrava představují nevyčerpátnou a stále dostupnou zásobu genů cizích, které mohou onen původní gen nahradit. Tento model představuje jakousi evoluční rohatku, která by v neomezeném čase a při neomezeném přísunu potravy vedla k výměně všech původních genů za geny pocházející z kořisti. Realita je samozřejmě daleko složitější, neboť žádný organizmus nemá k dispozici neomezený čas ani neomezené množství kořisti, a protože nejsou všechny geny

takto nahraditelné. Ty, které představují evoluční inovaci fagotrofa, a tedy nemají žádný analog v kořisti, nemohou být nahrazeny a jejich ztráta bývá letální.

Zdá se, že četnost LGT u různých linií eukaryot se zásadně liší. Je samozřejmě potřeba ještě provést velké množství fylogenetických studií různých genů, než to budeme schopni objektivně zhodnotit, dosavadní analýzy ale relativně přesvědčivě ukazují, že u fagotrofních eukaryot je míra LGT zcela srovnatelná s volně žijícími prokaryoty (Andersson et al. 2004), zatímco u ostatních, zejména hub a živočichů, je výrazně nižší. Vzácný výskyt LGT u mnohobuněčných organismů lze vysvětlit přítomností Weismannovy bariéry, bránící přenosu informace, tedy i nově získaných genů, ze somatických buněk do další generace. Ta se uplatňuje nejvíce u živočichů, méně pak u rostlin a hub, které nemají přísně oddělenou germinální linii buněk. Zajímavý je případ nálevníků (Ciliophora), kteří sice mají oddělenou germinální linii, mikronukleus, ale k LGT u nich dochází relativně často. To je vysvětlitelné nejspíše faktem, že jsou jednobuněční a tedy je terminální mikronukleus přítomen v každé buňce. Dalším faktorem zvyšujícím pravděpodobnost přenosu genů do nálevníků je jejich fagotrofický způsob přijímání potravy.

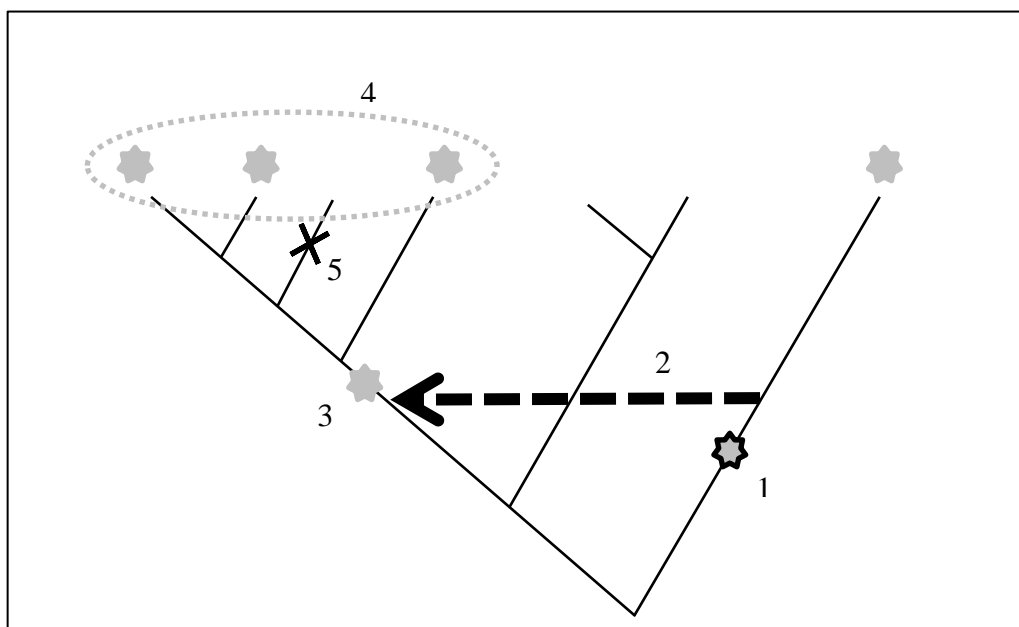
3.2.1. VYUŽITÍ LGT VE FYLOGENETICE

Úspěšné zapojení jednoho konkrétního laterálně přeneseného genu do genomu recipienta lze považovat za vzácnou evoluční událost a takový gen může být využit jako znak definující taxonomickou skupinu.

Pro případné fylogenetické využití LGT je zásadní s jistotou identifikovat nejen organizmy, které daný přenesený gen mají, ale i ty, které nemají. To ovšem může být problematické, protože dokázat nepřítomnost nějakého znaku je vždy obtížnější, než dokázat jeho přítomnost. Nově přichozí gen může v genomu recipienta hrát dvě odlišné role. Jednou možností je, že funkčně nahradí nějaký původní gen, ztracený před, nebo častěji až po přenosu toho nového. Takovéto případy jsou velice užitečné, protože můžeme jasně definovat, které taxony cizí gen mají a které ne. Ty, které jej nikdy nezískaly, si totiž pravděpodobně zachovávají svou původní verzi. Ta pak může sloužit jako pozitivní doklad nepřítomnosti přeneseného genu. Na druhou stranu, pokud cizí gen přináší do organismu zcela novou funkci, tak neumožní ztrátu žádného genu původního. V takovém případě nelze využít výše popsaný postup a rozhodnutí o nepřítomnosti genu je třeba podpořit jinými, méně přesvědčivými, doklady. Například konzistentními výsledky více různých nezávislých metod, které byly použity k jeho hledání.

Na rozdíl od EGT, který slouží zejména k odhalení dávné endosymbiózy, může anomální LGT pomoci hlavně s definováním monofyletických taxonů. Nalezneme-li u dvou eukaryotických

linií tentýž gen laterálně přenesený ze stejného cizího organismu, je nejpravděpodobnějším vysvětlením, že tyto dvě linie si jsou blízce příbuzné a jejich poslední společný předek již tento gen obsahoval. Tvoří tedy společně jeden monofyletický taxon (Huang & Gogarten 2006).



Obr. 1: Schéma popisující logiku využití laterálně přeneseného genu coby fylogenetického znaku. 1) Gen vzniká běžným způsobem u jedné linie organismů. 2) Dochází k laterálnímu přenosu genu do jiné, vzdálené, linie. 3) Gen je úspěšně zapojen do genomu recipienta. 4) Všechny organismy z této linie, u kterých daný gen nalezneme, můžeme označit za potomky jediného společného předka a tedy členy monofyletické skupiny. 5) Organismy, které tento gen sekundárně ztratily, můžeme do nově ustaveného monofyla začlenit na základě blízké příbuznosti s jinými, které si jej dosud zachovaly.

Výhodou takového postupu oproti klasické fylogenetické analýze je, že dokáže odhalit nejen vzájemnou příbuznost organismů, ale i směr evoluce. Pokud při zkoumání eukaryotického taxonu narazíme na několik zástupců, kteří sdílejí stejný prokaryotický gen a zároveň ostatní zástupci této skupiny mají jeho původní, eukaryotickou variantu, víme, že onen laterálně přenesený gen je evoluční inovací – synapomorfii. Kořen celé skupiny pak zákonitě musí ležet někde mimo organismy obsahující tento přenesený gen. Zmapujeme-li pečlivě výskyt více takových genů, můžeme vylučovací metodou teoreticky lokalizovat pozici kořene velmi přesně.

Tradičním přístupem k hledání kořene je metoda outgroupů. Při fylogenetické analýze se k sekvencím ze zástupců zkoumané skupiny přidá několik sekvencí z organismů mimo tuto skupinu. Místo, kde se na výsledném stromu tyto cizí sekvence větví, se pak prohlásí za pozici kořene.

Využití alternativní přístup pomocí laterálně přenesených genů je užitečné zejména u taxonů, které nemají žádné blízké příbuzné. Při použití klasické fylogenetické analýzy a metody outgroupů k nalezení kořene totiž hrozí artefakt přitahování dlouhých větví. Linie, které v rámci taxonu tvoří

dlouhé větve, mohou být uměle přitahovány ke vzdálenému outgroupu a dostanou se tak blíže ke kořeni, než by odpovídalo realitě. To byl koneckonců i případ archezoí, o kterých jsem se zmiňoval v kapitole o EGT. Většina domnělých archezoí je anaerobní a parazitická. Takové organizmy bývají silně odvozené, aby se přizpůsobily nezvyklým podmínkám. Je pro ně typické zrychlené tempo evoluce a tedy i velká odlišnost jejich sekvencí od příbuzných volně žijících organismů. Proto byly na stromech sestrojených jednoduchými metodami přitahovány k dlouhým větvím vedoucím k prokaryotům.

Jedna skupina bývalých archezoí, Parabasalia, je zároveň vhodným cílem pro hledání kořene pomocí LGT. Až na několik vzácných výjimek jsou všechna Parabasalia paraziti nebo komenzálové hmyzu a obratlovců. Všichni jsou anaerobové a jeví některé unikátní buněčné rysy jako například axostyl, hydrogenozómy nebo charakteristicky modifikovaný Golgiho komplex, tzv. parabazální aparát, který dal celé skupině jméno. Jejich nejbližší příbuzní jsou Fornicata, taxon obsahující mj. i diplomonády. Fornicata mají také velké množství unikátních adaptací, ale zcela odlišných od těch u Parabasalia. Obě skupiny, Parabasalia i Fornicata, tedy na fylogenetických stromech vytvářejí dlouhé větve. Proto jsou si navzájem velmi nevhodnými outgroupy. Dělí je totiž mnohem více změn genomu, než by odpovídalo stejné časové vzdálenosti u pomaleji se vyvíjejících skupin. Jakékoli vzdálenější taxony jsou pak pochopitelně ještě horšími kandidáty.

Řada fylogenetických analýz prováděných na alignmentu více genů a používající jako outgroup zbytek eukaryot ukázala se solidní statistickou podporou, že kořen tohoto taxonu leží na větví vedoucí k Trichonympha (Keeling et al. 1998, Ohkuma et al. 2007). Jenomže Trichonympha jsou jednou z nejodvozenějších linií Parabasalia vůbec. Řadí se k polyfyletické skupině „Hypermastigida“ s obrovskými buňkami (až 500 μm), silně zmnoženými bičíky (tisíce) a mnoha kopiemi jaderného genomu, které žijí v těsné symbióze s nižšími termity. Je dosti podezřelé, i když samozřejmě ne vyloučené, že by právě tak extrémně odvozená skupina měla být nejbazálnější linií v rámci Parabasalia. Ještě podezřelejší ale je, že po odstranění sekvencí všech vzdálených eukaryot z alignmentu a ponechání pouze těch nejbližších, podpora takové pozice kořene klesá (Čepička et al. 2010). To totiž může znamenat, že za podstatnou část signálu umisťujícího kořen k Trichonympha je zodpovědný artefakt přitahování dlouhých větví.

Právě na Parabasalia bych se proto rád zaměřil ve své budoucí diplomové práci. Chtěl bych na ně aplikovat výše popisovaný postup hledání kořene pomocí mapování výskytu LGT. Jako výchozí zdroj sekvenčních dat může sloužit kompletně osekvenovaný genom jednoho ze zástupců této skupiny, lidského parazita *Trichomonas vaginalis*, ve kterém bylo identifikováno několik desítek genů potenciálně prokaryotického původu (Carlton et al. 2007).

4. PŘÍKLADY KOMPLIKOVANÉ DISTRIBUCE EUKARYOTICKÝCH GENŮ

V následujících kapitolách uvedu příklady konkrétních genů s distribucí mezi eukaryoty, jejíž evoluční vznik je problematické vysvětlit a je možné, že zahrnuje LGT.

4.1. CITRÁTSYNTÁZA BAKTERIÁLNÍHO PŮVODU U 3 LINIÍ EUKARYOT

Citrátsyntáza je enzym, který katalyzuje první reakci Krebsova cyklu v lumen mitochondrie. U některých organismů se nachází i v peroxizómu, respektive glyoxyzómu, kde se účastní velmi podobného glyoxylátového cyklu. Kromě eukaryot ho najdeme i v mnohých prokaryotech.

Při výzkumu genové exprese u nálevníka *Tetrahymena thermophila* byly objeveny dvě odlišné varianty genu pro tento enzym (Mukai & Endoh 2003). Jedna je směřována do mitochondrie a její sekvence je příbuzná ostatním klasickým eukaryotickým variantám tohoto genu. Aminokyselinová sekvence kódovaná druhou variantou je podobná mnoha prokaryotickým homologům a několika málo sekvencím z eukaryot. Konkrétně jde o dvě rostliny - huseníček (*Arabidopsis thaliana*) a tykev (*Cucurbita*) a buněčnou hlenku *Dictyostelium discoideum* z „říše“ Amoebozoa. O enzymu z tykve je známo, že je lokalizován v peroxizómu. To naznačuje, že i jeho homolog v tetrahymeně se účastní glyoxylátového cyklu.

Fylogenetická analýza příbuznost těchto čtyř sekvencí potvrdila. Společně tvoří perfektně podpořenou monofyletickou skupinu větvcí se uvnitř skupiny eubakterií, která zahrnuje mnohé proteobakterie a jednu zelenou sirnou bakterii (*Chlorobium*).

Pro zmapování výskytu této nové varianty citrátsyntázy mezi ostatními nálevníky byla využita metoda „Southern blot“. Podařilo se ji najít ale pouze u jediného dalšího druhu, *Tetrahymena malaccensis*, který je považován za velmi blízce příbuzný *T. thermophila*.

Autoři studie nabízejí tři možná vysvětlení takto mozaikovitě distribuce citrátsyntázy bakteriálního typu mezi eukaryoty.

První možnou interpretací je, že došlo ke třem nebo čtyřem nezávislým LGT z jedné eubakterie nebo několika blízce příbuzných eubakterií do různých eukaryotických linií. Společný předek dvou druhů nálevníků, předek dictyostelia a společný předek huseníčku a tykve (nebo alternativně tyto dvě linie nezávisle) získali nový gen kódující citrátsyntázu skrze laterální přenos, pouhou náhodou, z jediného zdroje. Sami autoři tuto variantu nepovažují za pravděpodobnou.

Druhý scénář předpokládá jediný LGT z eubakterie do eukaryota. Tento hypotetický eukaryot si původně prokaryotický gen upravil přidáním signální sekvence, která jeho produkt směřuje do peroxizómu. Takto doplněný gen byl posléze laterálně přenesen do dalších eukaryot.

Ze známých dat není možné rozhodnout, která z eukaryotických linií byla tím prvotním recipientem prokaryotického genu. Není ani jisté, zda jím byla jedna ze tří (či čtyř) zmíněných linií nebo nějaký hypotetický další eukaryot, u kterého tento gen dosud nebyl objeven.

Podle třetí alternativní hypotézy mohlo k získání oné varianty genu dojít prostřednictvím LGT z eubakterií do společného předka všech eukaryot. Takový scénář ale předpokládá velké množství ztrát tohoto genu u různých linií eukaryot. Pro možnost mnohonásobných ztrát mluví pozorování z jiného nálevníka téhož rodu, *T. pyriformis*. Ten přišel o několik glyoxyzomálních genů, ale byl schopný je funkčně nahradit geny, původně určenými do mitochondrie. Zřejmě tedy neexistují silné funkční bariéry, které by bránily úspěšné ztrátě jednotlivých enzymů glyoxylátového cyklu.

4.2. MOZAIKOVITÉ ROZŠÍŘENÍ PYRUVÁT FORMIÁT LYÁZY

Pyruvát formiát lyáza (Pfl) je enzym katalyzující neoxidativní přeměnu pyruvátu a CoA na formiát a acetyl-CoA. Pro aktivaci potřebuje druhý protein – Pfl aktivující enzym (Pfla). Geny pro tuto dvojici proteinů se nacházejí, pospolu v jednom operonu, v genomech široké škály eukaryot. Donedávna ale byly známy pouze u dvou eukaryotických linií – anaerobních chytridií (Chytridiomycota) a zelené řasy (Chlorophyta) *Chlamydomonas reinhardtii*.

Letos, v roce 2011, vyšla studie odhalující přítomnost těchto dvou genů u mnoha dalších eukaryot (Stairs et al. 2011). Autoři s pomocí bioinformatických metod našli hned 16 homologů Pfl ve skupinách Plantae, Opisthokonta, Amoebozoa, Stramenopila a Haptophyta. Nových homologů Pfla bylo nalezeno 7 v Plantae, Amoebozoa a Stramenopila; všechny v genomech obsahujících zároveň i Pfl. Většina z nových sekvencí byla identifikována jak v genomových, tak v EST datech, což zvyšuje důvěryhodnost těchto nálezů. Navíc byly v jejich genomových sekvencích nalezeny spliceozomální introny, jejichž přítomnost efektivně vylučuje původ z případné eubakteriální kontaminace v genomových sekvencích.

Fylogenetická analýza ukázala, že eukaryotické sekvence obou genů tvoří monofyletické skupiny větvící se sestersky ke svým eubakteriálním homologům ze skupin Firmicutes a *Bacteroides*. Topologie stromu se nezměnila ani po odstranění 50 % eukaryotických linií s nejdelšími větvemi. Je tedy nepravděpodobné, že by za ni byl zodpovědný artefakt přitahování dlouhých větví. Analýza též neukázala žádnou signifikantní podporu blízké příbuznosti eukaryotických Pfl a Pfla jejich homologům z α -proteobakterií ani sinic. To efektivně vylučuje jejich potenciální původ v mitochondriích nebo plastidech.

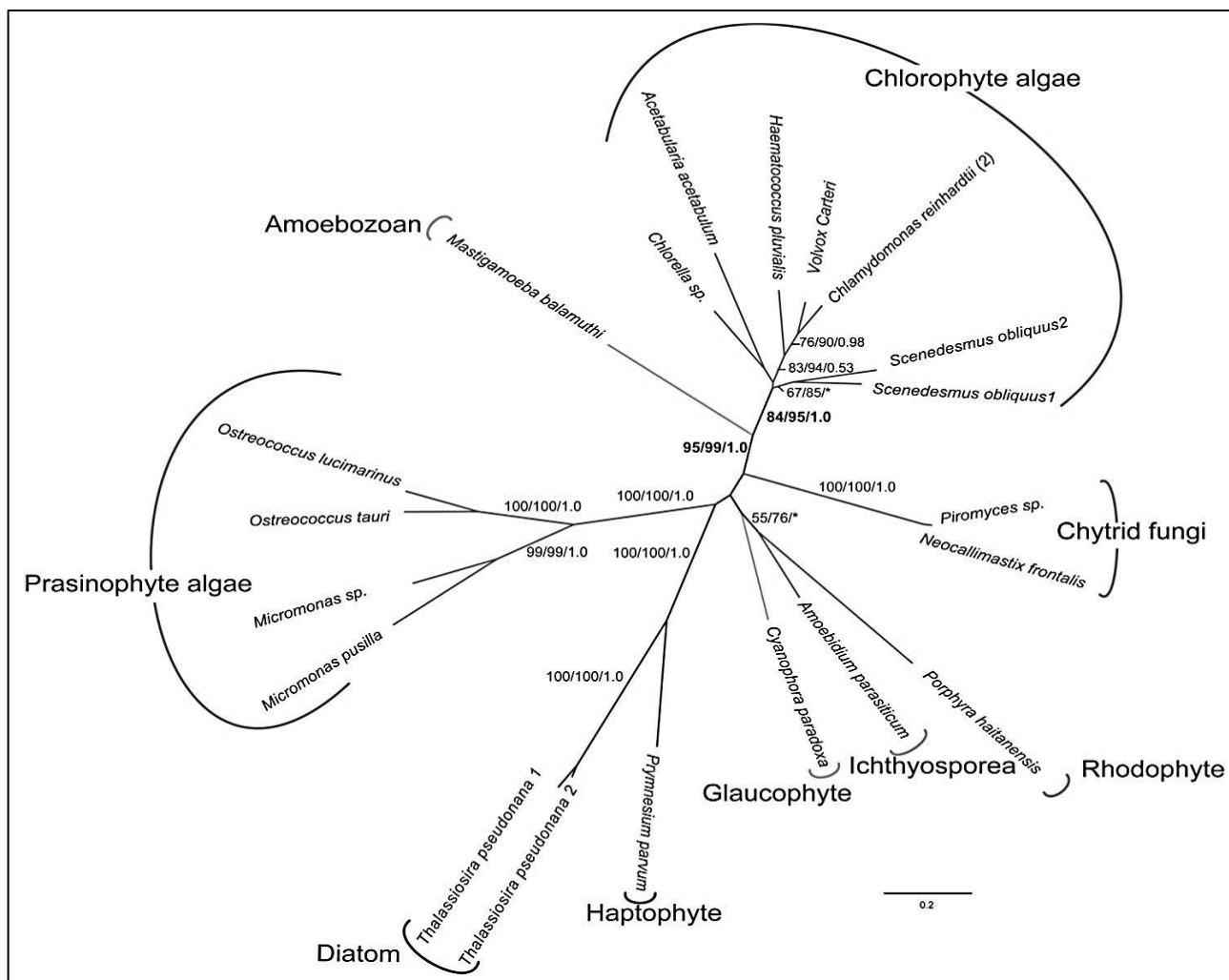
Autoři nabízejí 3 hypotézy k vysvětlení pozorované distribuce obou genů. Zaprvé může jít o výsledek několika nezávislých LGT do eukaryot, a to z jediného eubakteriálního zdroje nebo několika zdrojů navzájem blízké příbuzných. Druhá hypotéza počítá s jediným LGT z eubakterií do linie vedoucí ke společnému předkovi všech eukaryot. Přítomnost Pfl a Pfla by tedy byla původním eukaryotickým znakem, který byl mnohonásobně sekundárně ztracen u různých linií, ale zachován u fakultativní a obligátních anaerobů. Za třetí, oba geny mohly být relativně nedávno přeneseny do jediné eukaryotické linie a následně rozšířeny do dalších linií několikanásobným intradomenovým LGT.

První hypotéza nemůže být formálně testována, dokud nebude k dispozici větší množství genomů ze skupiny Firmicutes. Je ale nepravděpodobné, aby všechny taxony, které by ji vyvracely, byly již vymřelé nebo dosud nebyly osekvenovány. Autoři tedy tuto hypotézu považují za málo pravděpodobnou.

Kdyby platila druhá hypotéza, tedy ancestrální původ obou genů u eukaryot a následné mnohanásobné ztráty, dalo by se předpokládat, že fylogenetické studie Pfl a Pfla ukáží podobnou topologii, jako je předpokládaná topologie eukaryotického stromu. Oba geny by totiž měly sdílet stejnou evoluční historii se svými eukaryotickými nositeli. Fylogenetické stromy obou genů ale ukazují všechno možné, jen ne klasickou eukaryotickou topologii. Asi nejvíce zarážející je, že „říše“ Plantae se zde rozpadá na dvě linie, oddělené od sebe všemi ostatními eukaryoty. Ani druhá hypotéza tedy nevypadá příliš přesvědčivě.

Zbývá tedy třetí hypotéza, jediný LGT z prokaryot následovaný více LGT mezi různými eukaryoty. Pro tuto hypotézu hovoří i fakt, že v mnoha eukaryotických genomech jsou oba geny těsně svázány, v jednom případě dokonce fúzovány, což usnadňuje jejich společný přenos. Lze si představit hned několik scénářů zahrnujících různé primární recipienty prokaryotických genů i různé sekvence následujících sekundárních LGT mezi eukaryoty. Rozhodnout mezi nimi bude možné ale až s daleko rozsáhlejší databází eukaryotických genomů.

Případ těchto dvou genů může mít potenciálně velký dopad na naše úvahy o samém vzniku eukaryotické buňky. Pokud jsou závěry autorů této studie správné, tak do jisté míry oslabují pozici tzv. vodíkové hypotézy (Martin & Müller 1998). Ta totiž počítá s ancestrálním původem eukaryotických genů anaerobního metabolismu, který je, alespoň v případě Pfl a Pfla velmi nepravděpodobný.



Obr. 2: Strom konkatovaných proteinů Pfl a Pfla; dle Stairs et al. 2011, upraveno.

4.3. MNOHONÁSOBNÁ NÁHRADA ELONGAČNÍHO FAKTORU

Elongační faktor 1 α (EF-1 α) je jedním z nejdůležitějších enzymů účastnících se proteosyntézy. Jde o GTPázu, jejímž hlavním úkolem je dopravovat aminoacyl-tRNA k ribozómu. Má ale i řadu dalších funkcí nesouvisejících s proteosyntézou. Pro svou velkou konzervovanost a zdánlivě ubikvitní rozšíření byl tento enzym používán jako model při studiu evoluce na molekulární úrovni i coby fylogenetický marker. Nedávný objev proteinu, který u mnohých organismů zastupuje jeho funkci, ale naznačil, že propříště s ním budeme muset být opatrnější.

U 7 nezávislých eukaryotických linií (Chlorophyta + Trebuxiophyta, Dinoflagellata, Chlorarachniophyta, Haptophyta, Zygomycetes, Chytridiomycota, Choanofalgellata) byl objeven protein, který je kanonickému EF-1 α sice podobný, ale rozhodně s ním není totožný (Keeling & Inagaki 2004). Objevitelé tento nový enzym pojmenovali EF-like protein (EFL).

EFL je mezi eukaryoty rozšířen velmi široce, zato ale sporadicky. Organismy, které ho mají, jsou typicky blízce příbuzné organismům bez něj. Dalším pozoruhodným jevem je, že přítomnost EFL prakticky u všech zkoumaných organismů znamená nepřítomnost EF-1 α a naopak.

Předpovězené aminokyselinové sekvence EFL jsou od EF-1 α jasně odlišitelné 6 specifickými insercemi a na fylogenetickém stromě nadrodiny GTPázových transkripčních faktorů tvoří dobře podpořenou větev vzdálenou od všech ostatních členů této nadrodiny. Fylogenetická analýza homologů EFL z jednotlivých organismů neposkytuje signifikantní podporu pro žádnou topologii eukaryotického stromu. Z jejich vzájemné příbuznosti tedy není možné vyvozovat žádné závěry o evoluční historii EFL.

Jak autoři přesvědčivě dokazují, EFL může přebírat většinu funkcí EF-1 α . Navíc fylogenetická analýza ukazuje, že tyto dva proteiny jsou navzájem homologní.

Prvním možným vysvětlením takového stavu je dávná paralogie. V raných fázích evoluce eukaryot mohlo dojít k duplikaci ancestrální GTPázy, která dala vzniknout dvěma paralogům, EF-1 α a EFL, se stejnou nebo podobnou rolí v proteosyntéze. Přítomnost EFL by tedy byla ancestrálním znakem většiny nebo dokonce všech eukaryot. Mozaikovitě rozšíření obou paralogů u dnešních eukaryot by pak bylo vysvětlitelné pouze velkým množstvím ztrát jednoho nebo druhého u různých linií. Autoři toto vysvětlení nepreferují z více důvodů. Zaprvé upozorňují, že k dlouhodobému udržení dvou paralogů v jednom genomu dochází, když tyto paralogy mají odlišné funkce. To ale není případ EF-1 α a EFL. Druhým a závažnějším argumentem proti dávné paralógii je neexistence organismů, které by stále měly oba geny a to ani ve skupinách obsahujících některé linie s EF-1 α a jiné s EFL.

Druhým možným vysvětlením podivné distribuce EFL mezi eukaryoty je vícenásobný intradoménoový LGT tohoto genu. Tento scénář je jednodušší než dávná paralogie, protože vyžaduje několikanásobné ztráty pouze jednoho genu a to EF-1 α . Takové ztráty jsou navíc snadno vysvětlitelné přítomností nově získaného EFL, který převzal funkce EF-1 α a umožnil tak jeho postupnou degeneraci a vyřazení z genomu.

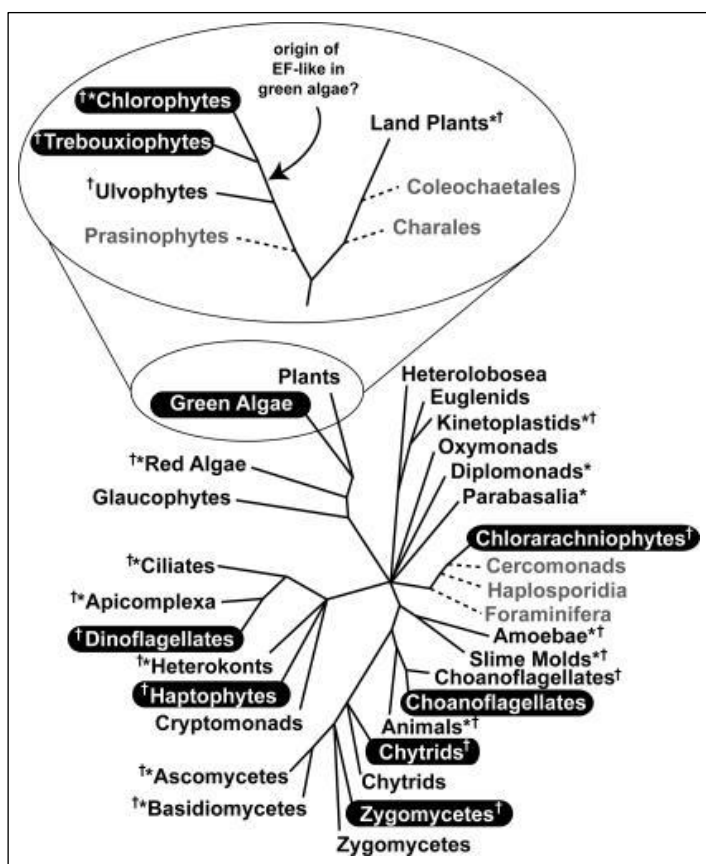
Autoři tuto možnost preferují, upozorňují ale na některé přetrvávající nejasnosti. Tak například zatím není možné odhalit, kde se EFL vlastně poprvé objevil. Může být odvozený od EF-1 α , který v jedné z eukaryotických linií prodělal rychlou radikální změnu. Stejně dobře ale může být odvozený od nějaké jiné podrodiny GTPázových transkripčních faktorů. Pozorovaná distribuce ani fylogenetická analýza nevylučuje jednu ani druhou možnost.

Záhadou také zůstává, proč se EFL úspěšně rozšířil do tak velkého množství taxonů. Pokud se EFL v populaci fixuje náhodně, tak muselo k jeho LGT docházet ve skutečně masivním měřítku.

Alternativní možností je, že EFL představuje jakýsi „super-gen“, který má velkou šanci nahradit kanonický elongační faktor, když se s ním ocitne v jednom genomu. To by znamenalo, že svému nositeli poskytuje nějakou dosud neznámou, ale podstatnou, selekční výhodu.

Do jisté míry proti závěrům autorů výše citované studie mluví letos publikovaný článek (Szabová et al. 2011) shrnující výsledky experimentů s koexistencí EF-1 α a EFL v jednom genomu. S pomocí genového inženýrství a umlčování genů RNA-interferencí autoři ukázali, že tyto dva geny jsou schopné bez problémů fungovat ve stejném genomu, ale EFL nedokáže funkčně nahradit EF-1 α . To, zdá se, podporuje hypotézu dávné paralogie.

Je ovšem teoreticky možné, že zde pravda leží někde na půli cesty. Lze si představit jakýsi hybridní scénář, kdy by došlo k několika málo LGT alternativního elongačního faktoru do předků větších eukaryotických skupin a jeho následnému dlouhodobému soužití s EF-1 α . V některých dceřiných liniích by po delší době vznikla adaptace umožňující ztrátu EF-1 α a jeho náhradu EFL, v jiných by naopak došlo ke ztrátě EFL.



Obr. 3: Rozšíření EF-1 α a EFL mezi eukaryoty; dle Keeling & Inagaki 2004. Černě jsou označeny taxony s EFL, ostatní mají EF-1 α .

4.4. ALTERNATIVNÍ TUBULIN OPISTOKONTNÍHO TYPU U ZÁSTUPCŮ EXCAVATA

Dalším příkladem budiž člen eukaryotické „říše“ Excavata, bičíkovec *Andalucia* a jeho α -tubulin. Ultrastukturní znaky tohoto organismu jsou podobné těm známým ze zástupců exkavátní skupiny Jakobida a skutečně, i fylogenetická analýza založená na těchto znacích poskytuje jasnou podporu pro zařazení andalucie mezi Jakobida. Molekulárně fylogenetické analýzy rRNA malé ribozomální podjednotky (SSU rRNA), jednoho z nejužívanějších taxonomických markerů, ale takové umístění nijak nepodporují (Lara et al. 2006).

Jiným často používaným taxonomickým markerem je gen pro cytoskeletární protein α -tubulin. Fylogenetické analýzy založené na tomto genu ukazují zajímavou anomálii. S velkou podporou totiž řadí parabazalidy a diplomonády k „říši“ Opisthokonta. Mezi ostatními zkoumanými geny je ale α -tubulin zcela osamocen. Žádný z nich na takovéto umístění neukazuje. Sekvence SSU rRNA pak umísťují, byť s malou podporou, Parabasalia spolu s Diplomonadida ke skupině Preaxostyla, zahrnující oxymonády a rod *Trimastix* (Hampl et al. 2005, Hampl et al. 2009). Společně jsou tyto tři skupiny nazývány Metamonada (Cavalier-Smith 2003) a řazeny mezi Excavata.

V roce 2007 byly publikovány výsledky fylogenetické analýzy 7 konzervovaných genů, včetně α -tubulinu, na vzorku 47 taxonů ze všech významných eukaryotických skupin (Simpson et al. 2008). Mezi těmito taxony byly i dva druhy rodu *Andalucia*. Strom vytvořený na základě kombinace všech 7 genů je, byť se slabou podporou, přiřadil sestersky k jakobidům a spolu s nimi k dalším exkavátním taxonům Euglenozoa, Heterolobozoa a *Malawimonas*. Při analýzách jednotlivých genů nebyl žádný ve významném konfliktu s takovou topologií. Až na α -tubulin. Ten řadí andalucii do jedné skupiny s diplomonádami, parabazalidy a opisthokonty, a to specificky jako sesterské diplomonádám.

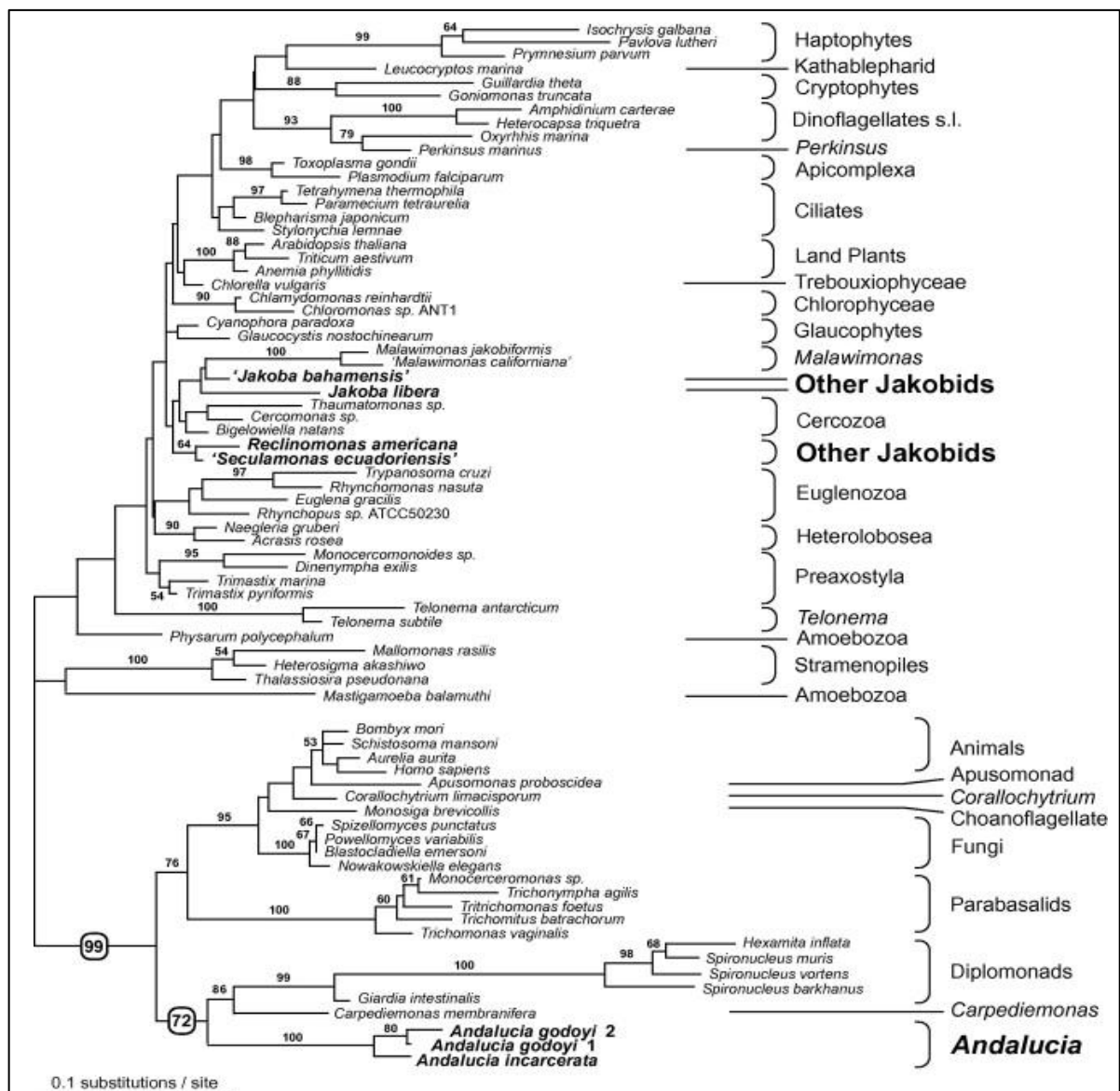
Tato analýza je první, která řadí andalucii specificky k jakobidům, kam by měla podle ultrastrukturních znaků patřit. Podpora takového umístění je ale i po odstranění α -tubulinu velmi slabá. Je-li to pravda, je *Andalucia* pravděpodobně jedním z nejbazálnějších jakobitů, pokud ne tím vůbec nejbazálnějším.

Nejpravděpodobnějším vysvětlením odlišné topologie stromu α -tubulinu je LGT. Vzhledem ke specifické podobnosti sekvence andalucie s těmi z diplomonád jsou právě Diplomonadida nejlepším kandidátem na donora genu.

V té samé analýze, po odstranění α -tubulinu, také nečekaně vychází silná podpora pro příbuznost Diplomonadida, Parabasalia a Preaxostyla, přičemž tyto skupiny nejeví žádnou

specifickou příbuznost k opisthokontům. Autoři z toho vyvozují, že i u diplomonád a parabazalidů má gen pro α -tubulin původ v LGT, a to konkrétně z Opisthokonta. Že k přenosu nedošlo opačným směrem, lze odhadnout z jiných fylogenetických analýz. Mnohé ukazují, že opisthokontům je blíže příbuzná další eukaryotická „říše“ Amoebozoa. Zástupci amoebozoí s krátkými větvemi mají tendenci větvit se na stromech α -tubulinu blízko opisthokontům, diplomonádám a parabazalidům. Je tedy pravděpodobné, že ona laterálně přenesená varianta genu pochází původně od Opisthokonta.

Gen pro α -tubulin opisthokontního typu tedy mohl prodělat dva a více LGT. Jeden by proběhl z Opisthokonta do společného předka Diplomonadida a Parabasalia, druhý z diplomonád do předka rodu *Andalucia*. Alternativním, možná stejně pravděpodobným, vysvětlením, které nevyžaduje LGT, je vznik dvou paralogů α -tubulinu u společného předka všech eukaryot a jejich následné ztráty u různých eukaryotických linií.



Obr. 4: Strom α -tubulinu vytvořený metodou Maximum likelihood; dle Simpson et al. 2008.

5. PŘÍKLADY VYUŽITÍ LGT VE FYLOGENETICE EUKARYOT

V poslední části své rešerše představím několik studií, které s úspěchem použily laterálně přenesené geny coby fylogenetický znak definující monofyletickou skupinu organismů.

5.1. PŘÍBUZNOST DIPLOMONÁD A PARABAZALIDŮ 1

Základní dráha anaerobního katabolizmu sacharidů, glykolýza, je mezi eukaryoty silně konzervovaná. Tato uniformita naznačuje, že celá glykolytická mašinerie byla eukaryoty získána pouze jednou a byla přítomna již u jejich posledního společného předka. Přesto se ale mezi glykolytickými drahami jednotlivých eukaryot najdou podstatné rozdíly, způsobené především výměnou jednotlivých enzymů za enzymy stejné funkce, ale odlišného původu. Největší variace v zastoupení glykolytických enzymů najdeme u anaerobních eukaryot, pro které je glykolýza hlavním zdrojem energie.

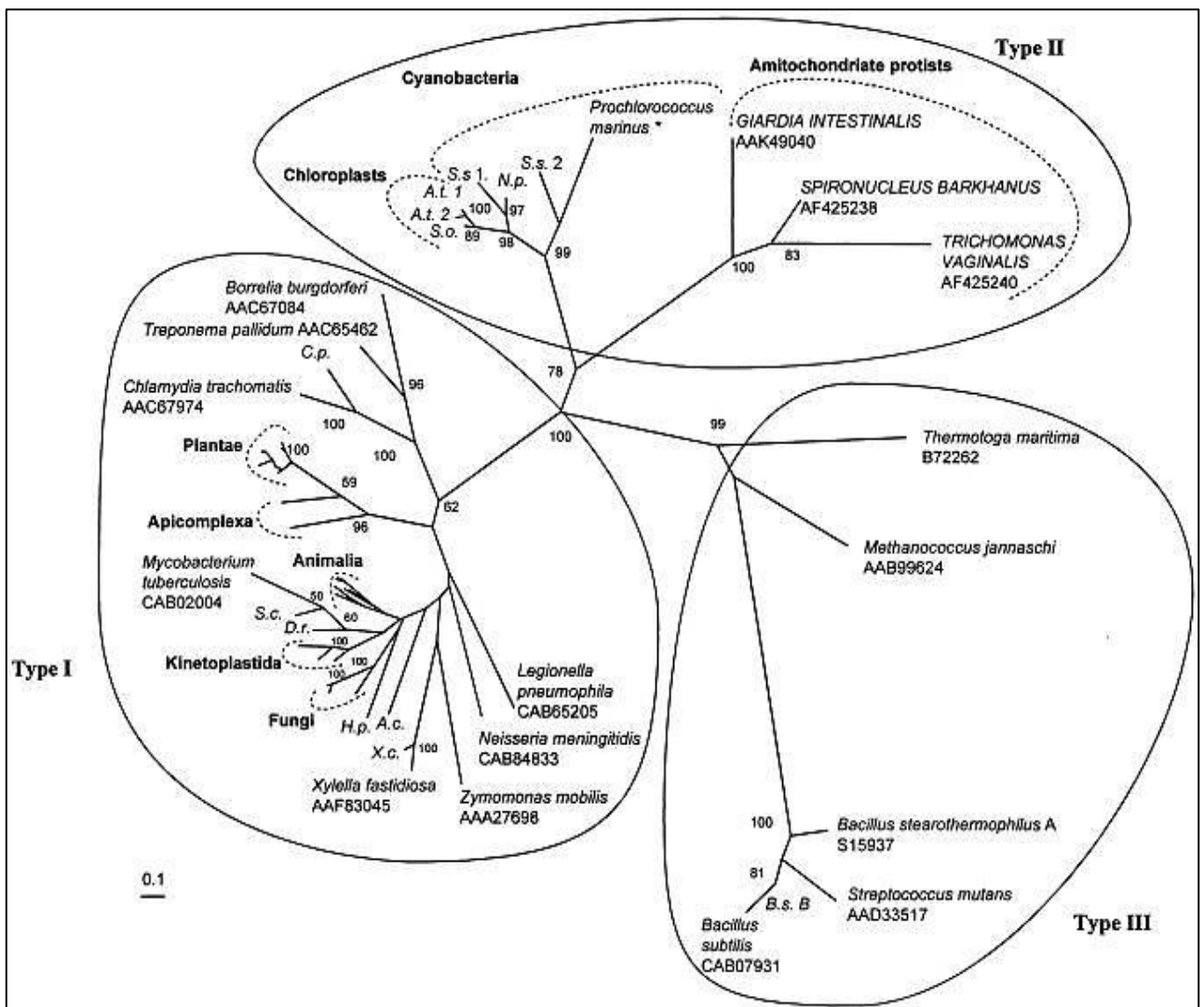
Zajímavým příkladem takové výměny jsou první dva enzymy glykolýzy u skupin Diplomonadida a Parabasalia, jejichž původ lze vystopovat k LGT z eubakterií. V roce 2001 vyšla studie (Henze et al. 2001) shrnující výsledky fylogenetické analýzy těchto dvou enzymů u dvou diplomonád (*G. Intestinalis*, *Spironucleus barkhanus*) a jednoho parabazalida (*T. vaginalis*).

Fylogenetická analýza prvního enzymu, glukokinázy, jasně ukázala, že varianty nalezené v diplomonádách a parabazalidech patří k podrodině glukokináz nacházejících se v proteobakteriích a sinicích. Zároveň tyto enzymy nejeví žádnou příbuznost svým homologům z ostatních eukaryot, včetně anaerobních (*Entamoeba histolytica*).

Druhý článek glykolýzy je katalyzován enzymem Glukóza-6-fosfát izomeráza. Sekvence jeho homologů od různých organismů se sdružují ve třech jasně odlišených skupinách. Typ I zahrnuje eukaryotické a některé prokaryotické homology, typ II představuje homology přítomné v sinicích a plastidech a v typu III se sdružují všechny zbylé prokaryotické varianty. Alespoň taková panovala představa, dokud nebyly do analýz zahrnuty homology z diplomonád a parabazalidů.

Sekvence z obou diplomonád a trichomonády se ukázaly tvořit monofyletickou skupinu sesterskou sekvencím ze sinic a plastidů. Větví se tedy jako typ II daleko od všech ostatních eukaryotických homologů. Analýza neposkytla žádnou podporu bližší příbuznosti plastidům než volně žijícím sinicím, což efektivně vylučuje jejich původ v EGT z plastidů.

Tři anaerobní protista ze dvou, pravděpodobně blízké příbuzných, skupin tedy sdílejí dva enzymy, které nejeví žádnou podstatnou příbuznost svým homologům u ostatních studovaných eukaryot. Zároveň ale varianty každého z těchto enzymů tvoří solidně podpořenou monofyletickou skupinu, větvící se mezi eubakteriálními homology. Nejparsimonnějším výkladem takového pozorování jsou dva dávné případy LGT z eubakterií do společného předka diplomonád a parabazalidů, který nebyl předkem žádného jiného studovaného eukaryota. Výsledkem této studie jsou tedy dva nové znaky, synapomorfie, které definují monofyletický taxon, sdružující obě skupiny.



Obr. 5: Tři typy glukóza-6-fosfát izomerázy; dle Henze et al. 2001.

5.2. PŘÍBUZNOST DIPLOMONÁD A PARABAZALIDŮ 2

Další doklad blízké příbuznosti těchto dvou skupin, navržený díky studiu LGT, se objevil o 4 roky později.

Aminoacyl-tRNA syntetázy (AARS) jsou jedny z mála proteinů, účastnících se proteosyntézy, které snadno podléhají LGT. Pravděpodobně je to způsobeno jejich extrémní konzervovaností napříč doménami, která umožňuje snadné zapojení do procesů v kontextu cizího genomu. AARS také interagují s ostatními složkami buňky jen velmi volně a nemusí proto s nimi být tak přesně sladěny jako jiné typy proteinů (Woese et al. 2000).

Autoři článku publikovaného r. 2005 již dříve identifikovali dvě aminoacyl-tRNA syntetázy (proS, alaS) přenesené do předka diplomonád z archebakterií. Když se pokusili svou analýzu zopakovat se zastoupením více eukaryotických linií, výsledné fylogenetické stromy jim ukázaly hned několik dalších kandidátů na LGT (Andersson et al. 2005).

Mezi nově přidanými organizmy byl i parabazalid *T. vaginalis* a právě u něj se podařilo najít stejné dva geny archebakteriálního původu jako u diplomonád. Sekvence obou proteinů si jsou u diplomonád a *T. vaginalis* blízce příbuzné a se silnou podporou tvoří monofyla, větvící se mezi archebakteriálními homology. S identifikací konkrétní archebakteriální linie, které by mohly být příbuzné, to je ale složitější. Sekvence alaS jednoznačně ukazuje na druh *Nanoarchaeum equitans*, zatímco výsledky různých metod u proS se do jisté míry rozcházejí a neumožňují tak důvěryhodnou identifikaci. Ani ty ovšem *Nanoarchaeum* jako donora genu nevyklučují.

Je možné, že oba geny byly přeneseny do předka diplomonád a parabazalidů najednou. V genomu *N. equitans* se totiž nacházejí velice blízko sebe, odděleny jen jediným dalším genem. K přenosu obou do eukaryotické buňky tedy stačilo pohlcení pouhého jednoho fragmentu DNA. Skutečnost, že *N. equitans* je jediným známým zástupcem archebakterií s těmito dvěma geny v těsném sousedství, ještě více podporuje domněnku o jejich přenosu z předka tohoto organismu.

Tato studie, kromě dalších dvou synapomorfí, poskytuje i možný nepřímý doklad o životním stylu společného předka diplomonád a parabazalidů. Většina existujících linií archebakterií, včetně *N. equitans*, obývá prostředí chudá na kyslík, podobná těm vyhledávaným volně žijícími diplomonádami a parabazalidy. K LGT tedy pravděpodobně došlo u organismu, který již nastoupil cestu k anaerobnímu způsobu života.

5.3. MONOFYLIE SKUPINY OPISTHOKONTA

Největší eukaryotická „říše“ Opisthokonta, zahrnující mj. živočichy (Metazoa) a houby (Fungi), byla navržena v osmdesátých letech na základě ultrastrukturních znaků. Od té doby byla mnohokrát silně podpořena molekulárně fylogenetickými analýzami a podařilo se dokonce najít jednu vzácnou genomovou změnu, která Opisthokonta definuje jako monofylum, inzerci 12 aminokyselin v genu pro elongační faktor 1 α (Baldauf & Palmer 1993). Na druhou stranu existují i studie, které monofylii opisthokont nepodporují a některé detaily posttranskripční modifikace mRNA dokonce řadí Metazoa do jedné skupiny s Plantae, která ale nezahrnuje Fungi (Hausmann et al. 2005).

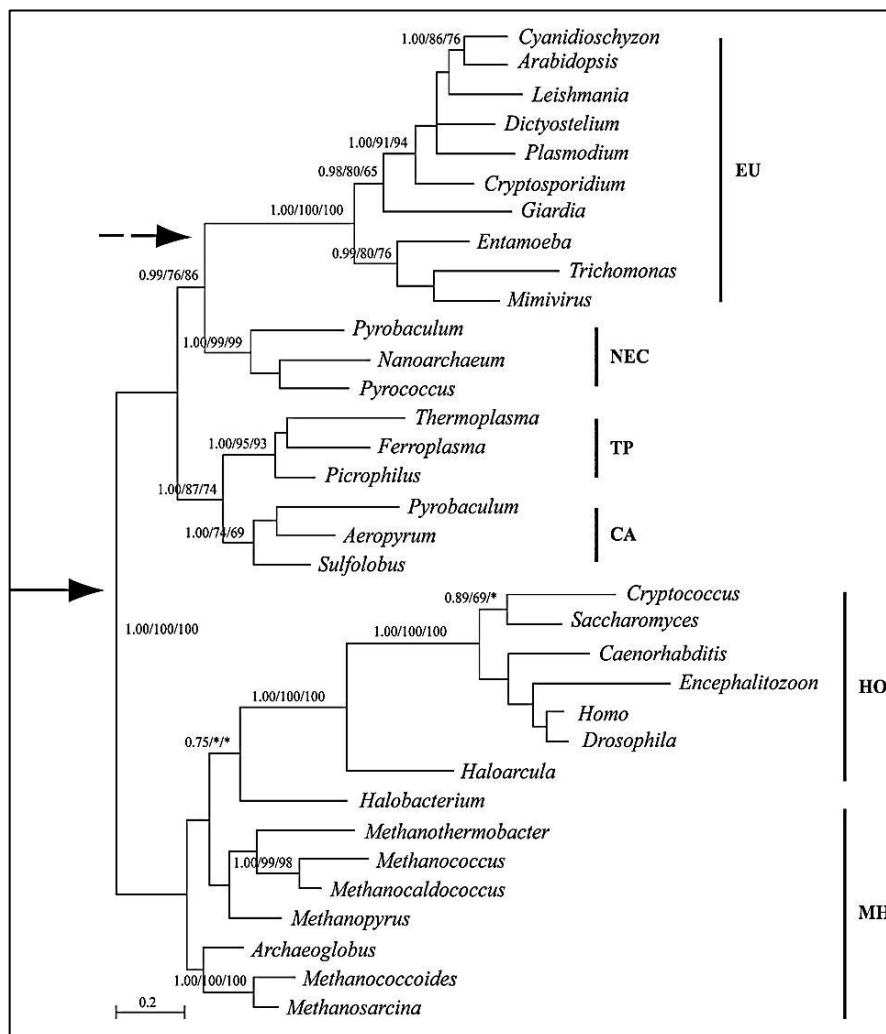
I zde by mohl pomoci LGT aminoacyl-tRNA syntetázy, tentokrát tyrRS. Ve většině eukaryot se gen pro tento protein vyskytuje ve dvou variantách. Jedna se při fylogenetických analýzách větví mezi eubakteriálními sekvencemi a její přítomnost je vysvětlitelná EGT z mitochondrie nebo plastidu. Druhá varianta je vzdáleně příbuzná sekvencím z archebakterií, což je konzistentní s předpokládanou bližší příbuzností eukaryot k archebakteriím než eubakteriím. Tato druhá varianta je tedy považována za původní eukaryotickou, pocházející ještě od jejich společného předka s archebakteriemi.

Fylogenetická analýza homologů tyrRS z organismů vybraných napříč celou diverzitou eukaryot ale ukázala, že i tato druhá, domněle původní eukaryotická varianta, se rozpadá do dvou nepřibuzných skupin (Huang et al. 2005). Sekvence tyrRS získané z opisthokont, z živočichů i hub, jsou blízké příbuzné homologům z jedné konkrétní skupiny archebakterií. Některé unikátní sekvenční znaky je řadí dokonce přímo k druhu *Haloarcula marismortui*. Sekvence ze všech ostatních eukaryot tvoří dobře podpořenou větev umístěnou na zcela jiném místě mezi archebakteriálními homology.

Jelikož není žádný důvod předpokládat pozici kořene eukaryot mezi opisthokonty a zbytkem eukaryot nebo dokonce uvnitř opisthokont, je nejpravděpodobnějším vysvětlením přenosu genu pro tyrRS z archebakterie příbuzné haloarcele do výlučného předka opisthokont. Všechna ostatní Eukaryota si na rozdíl od opisthokont zachovala svou původní varianatu, nejspíše zděděnou od jejich prokaryotických předků.

Alternativní interpretací je dávná duplikace genu a následné mnohočetné ztráty jednoho z paralogů u různých archebakteriálních a eukaryotických skupin. To je ale vzhledem k velkému počtu potřebných ztrát podstatně méně parsimonní hypotéza než jediný LGT. I kdyby tomu tak

skutečně bylo, přítomnost unikátního paralogu v opisthokontech by stále představovala znak podporující monofylii této skupiny.



Obr. 6: Strom aminokyselinových sekvencí tyrRS; dle Huang et al. 2005.

5.4. SPOLEČNÝ PŮVOD VIRIDIPLANTAE A RHODOPLANTAE

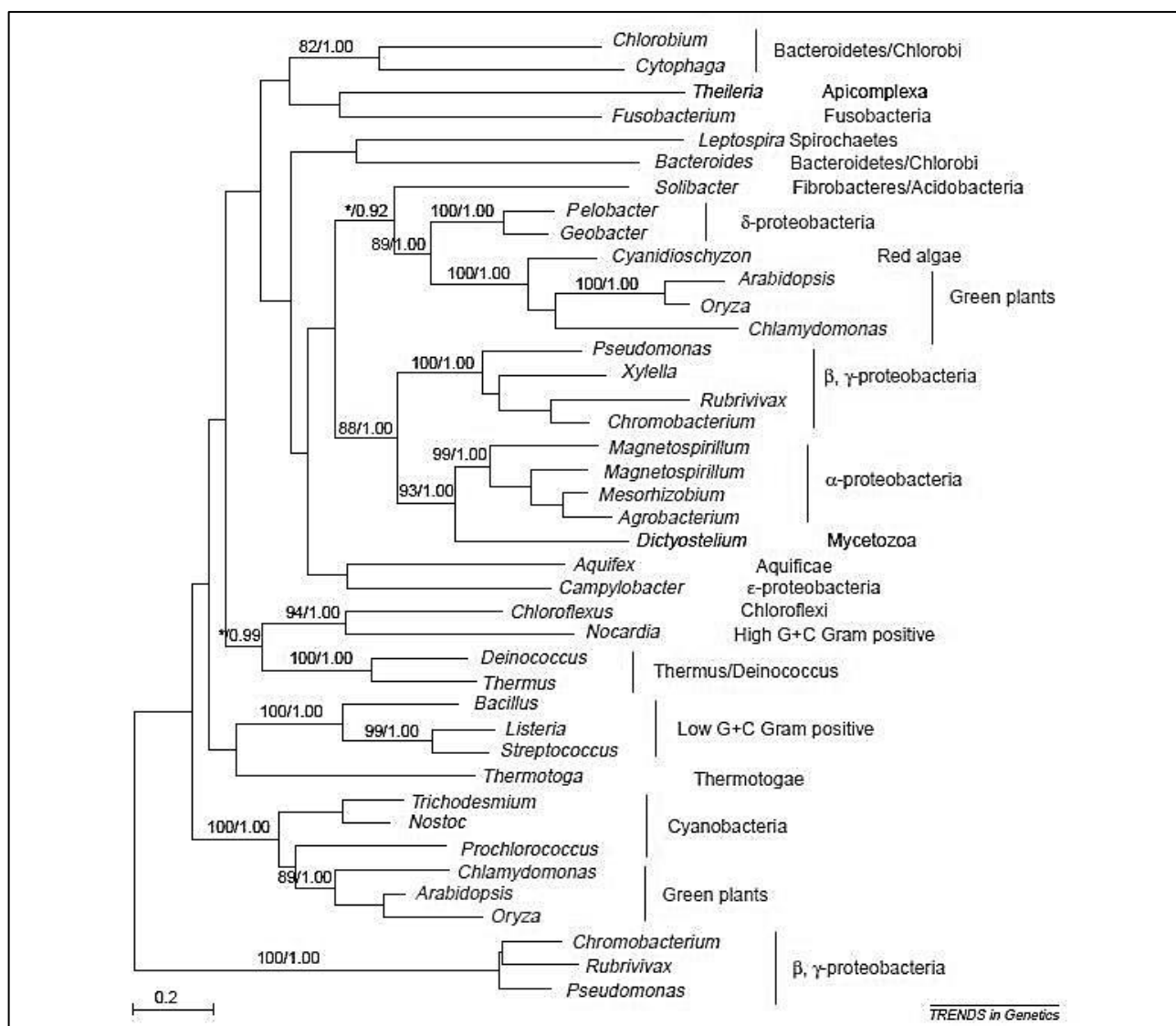
Jak jsem psal v kapitole o EGT, status Plantae jako monofyletické skupiny byl několika studiemi nedávno zpochybněn. Kromě chlamydiálních genů víme i o dvou genech přenesených anomálním LGT, které jejich monofylii naopak podporují (Huang & Gogarten 2006).

Prvním je β -podjednotka topoizomerázy VI (TOP6B). Její homology známe pouze z archebakterií, Viridiplantae, Rhodoplantae a několika izolovaných δ -proteobakterií. Fylogenetická analýza silně podporuje společný původ homologů z ruduch i zelených rostlin, stejně jako jejich blízkou příbuznost sekvencím z archebakteriální skupiny Crenarchaeota. Sinice ani α -proteobakterie homolog tohoto genu nemají, proto nelze předpokládat původ jeho

eukaryotické varianty v plastidu nebo mitochondrii. Nejlepším vysvětlením je tedy LGT z archebakterií, kde je nejvíce rozšířen, do společného předka Rhodoplantae a Viridiplantae.

Složitější historii má gen pro rezistenci na širokospektrální antibiotikum florfenikol. Je poznamenána mnoha duplikacemi, ztrátami, EGT i LGT. Najdeme jej u mnohých eubakterií i eukaryot, ale dosud není znám jeho výskyt u archebakterií. Zelené rostliny mají dvě kopie tohoto genu. Jednu plastidového původu a druhou, která se větví s homology z ruduch a δ -proteobakterií. Je pravděpodobné, že společný předek dvou linií Plantae získal tuto kopii genu od δ -proteobakterie.

Distribuce obou genů poskytuje jasné doklady o blízké příbuznosti Rhodoplantae a Viridiplantae. Nepřímo tak podporuje monofylii celé „říše“ Plantae s výjimkou glaukofytů, i když pochopitelně ne nutně.



Obrázek 7: Strom proteinu Frp; dle Huang & Gogarten 2006.

5.5. PŘÍBUZNOST PLASTIDŮ HAPTOFYTŮ A SKRYTĚNEK

V plastidu skrytěnky (Cryptophyta) *Guillardia theta* byl nalezen gen pro ribozomální protein rpl36, který je velmi odlišný od všech svých homologů do té doby známých z jiných plastidů a sinic (Rice & Palmer 2006). Zásadně se od nich liší nejen celkovou primární strukturou, ale i třemi konkrétními indely (dvě inserce a jedna delece).

Stejnou variantu genu se pak podařilo najít i v plastidech dalších čtyř skrytěnek, jednoho zástupce skupiny Haptophyta – *Emiliana huxleyi* a jedné obrněnky (Dinophyta) – *Karlodinium micrum*, která jej zřejmě získala terciální endosymbiózou s haptofytem. Obě varianty jsou přítomny také u nejrůznějších zástupců volně žijících eubakterií; u některých existují dokonce obě dvě zároveň.

Ve fylogenetické analýze vycházejí sekvence z emilianie a karlodinia jako sesterské. Jimi tvořená větev je pak sesterská sekvencím ze skrytěnek. Oba uzly jsou dobře podpořené.

Takové pozorování lze nejnázve vysvětlit laterálním přenosem genu pro netypický rpl36 do výlučného společného předka skrytěnek a haptofytů. To by byl vůbec první solidní doklad sesterského postavení těchto taxonů, které bylo dosud ve fylogenetických analýzách podpořeno jen velmi slabě (Harper et al. 2005).

Lze si představit i jiná vysvětlení. Ta jsou v tomto případě ale dosti nepravděpodobná. Zejména díky velké podobnosti genů z Cryptophyta a Haptophyta, jejich sesterskému postavení a předpokladu, že byly do genomu zařazeny velmi nepravděpodobnou rekombinací.

Proč nepravděpodobnou? Obě varianty genu se nacházejí na stejném místě genomu, konkrétně mezi geny *secY* a *rps13*, a navíc ve stejné orientaci. Přirozeně se nabízí vysvětlení náhrady jednoho druhým prostřednictvím homologní rekombinace. Sekvence dvou variant rpl36 jsou si ale velice vzdálené (pouze 49% podobnost) a k jejich rekombinaci může dojít jen velmi obtížně. Je tedy značně nepravděpodobné, že by se tak stalo vícekrát.

Taková pozice v genomu také efektivně vylučuje možnost dávnějšího LGT a následných ztrát jedné z variant u různých eukaryotických linií. Tento scénář by totiž vyžadoval, aby se přenesený gen zařadil náhodou právě do těsné blízkosti své druhé varianty v recipientově genomu.

Jistou komplikací je, že distribuce tohoto genu může poskytovat informaci pouze o fylogenezi plastidů, ne jejich hostitelů. Podle hypotézy seriální endosymbiózy (Bachvaroff et al. 2005) totiž mohou být plastidy skrytěnek a haptofytů blízce příbuzné, jejich jaderné genomy a ostatně i celý zbytek buňky ale nikoliv. Plastid skrytěnek by byl sekundární, původem z červené řasy (Rhodoplantae). Haptophyta by ale měla plastid terciální, získaný pohlcením skrytěnky.

5.6. JSOU JAKOBIDA NEJBAZÁLNĚJŠÍ LINIÍ EUKARYOT?

V druhé polovině devadesátých let, v době kdy se hypotéza Archezoa stále těšila velké podpoře, byl osekvenován mitochondriální genom drobného sladkovodního bičíkovce *Reclinomonas americana* (Lang et al. 1997). Většina ultrastrukturních znaků řadila *Reclinomonas* ke skupině Retortamonadida. Jedinou významnou výjimkou byla právě přítomnost mitochondrie, protože retortamonády byly v té době považovány za primárně amitochondriální a řazeny mezi Archezoa. To také podnítilo zájem o *Reclinomonas*. Pokud je nějaký organismus blízce příbuzný jedné ze skupin archezoí a přesto má mitochondrii, mohl by představovat vůbec první linii, která se odvětvila po jejím získání. Analýza mitochondriálního genomu toto podezření zdánlivě potvrzovala.

Ze všech známých mitochondriálních genomů je ten u *Reclinomonas americana* vůbec nejpodobnější genomům volně žijících eubakterií. S počtem 97 genů je nejobsáhlejším mitochondriálním genomem a obsahuje celkem 18 genů, které byly u všech ostatních známých eukaryot přeneseny do jádra prostřednictvím EGT nebo zcela zanikly. Asi nejvýznamnějším objevem je přítomnost typicky eubakteriální vícepodjednotkové RNA polymerázy. Všechny ostatní známé mitochondrie totiž místo ní používají jednodušší polymerázu kódovanou jaderným genomem, která byla získána LGT z bakteriofágů (Gray & Lang 1998 in Lang et al. 1999).

Dnes se nacházíme v dosti odlišné situaci. Hypotéza Archezoa je považována za definitivně vyvrácenou. Retortamonády jsou, coby parafoyletická skupina, řazeny spolu s diplomonádami a karpediemonádami do exkavátní skupiny Fornicata a znaky, zdánlivě je řadí k *Reclinomonas*, jsou považovány za pleziomorfní celé „říše“ Excavata. Samotná *Reclinomonas americana* je pak řazena do exkavátní skupiny Jakobida (Cavalier-Smith 2003).

Již známe kompletní sekvence mitochondriálních genomů od 7 různých jakobidů. Všechny mají prakticky uniformní obsah genů a stejně jako u *R. americana* silně připomínají genomy volně žijících eubakterií (Burger et al. unpublished in Gray et al. 2004).

Zdá se tedy, že mitochondriální genomy eukaryot se rozpadají do dvou jasně odlišených typů. První je představován mitochondriemi jakobidů, které mají zachovanou původní eubakteriální RNA polymerázu a 18 dalších unikátních genů. Druhý typ je představován mitochondriemi všech ostatních eukaryot, u kterých došlo k nahrazení původní RNA polymerázy virovou verzí a k EGT oněch 18 genů do jaderného genomu.

Nejjednodušším vysvětlením tohoto stavu je, že kořen eukaryotického stromu leží mezi jakobidy a všemi ostatními eukaryoty; případně uvnitř jakobidů. Podobných, stejně přesvědčivých, důvodů pro odlišná umístění eukaryotického kořene je ovšem více a při současné úrovni znalostí není možné mezi nimi definitivně rozhodnout.

ZÁVĚR

K úspěšnému laterálnímu genovému přenosu do eukaryotického genomu dochází relativně výjimečně, a proto můžeme jeho jednotlivé případy považovat za vzácné genomové změny a jako takové je využívat v roli znaků určujících monofyletické skupiny organismů. Na druhou stranu ale k LGT dochází dostatečně často, aby mělo smysl se jím systematicky zabývat.

Specifickým typem LGT je endosymbiotický genový přenos, při kterém je donorem dědičné informace genom existující dlouhodobě uvnitř buňky recipienta. V typickém případě jde o semiautonomní organely, tedy mitochondrie a plastidy. Velmi podobně se ale chovají i méně závislí endosymbionti, například intracelulární parazité. Geny přenesené z endosymbionta do jaderného genomu jsou užitečné zejména pro odhalení dávné endosymbiózy, která kromě nich nezanechala žádné jiné stopy; případně takové stopy dosud neznáme.

Tento přístup ale rozhodně nelze brát za bezproblémový. Nálezy jednotlivých genů původem z potenciálního endosymbionta v genomu zkoumaného organismu není možné automaticky považovat za doklad dávné endosymbiózy. Především je třeba pomocí fylogenetické analýzy jejich sekvencí prokázat, že pocházejí skutečně z jediného zdroje a že tímto zdrojem je genom potenciálního endosymbionta. Také je třeba spolehlivě vyloučit možnost, že byly získány z potravy nebo nějakou jinou neendosymbiotickou interakcí s donorem.

Z příkladů, které jsem uvedl, je patrné, že geny přenesené z endosymbionta mohou být velmi užitečnými svědky evoluční minulosti svých nositelů. Jejich nálezy ale vždy musí být interpretovány v širších souvislostech. Jako doklad dávné endosymbiózy by neměly být používány, pokud tato není podpořena i jinými indiciemi. Může jít například o nálezy organel odvozených od endosymbionta nebo blízkou příbuznost zkoumaných organismů jiným liniím, které si endosymbionta dosud zachovaly.

K přenosu dědičné informace z donora, který nežije v těsné symbióze s recipientem, dochází pouze sporadicky a množství přenesených genů z konkrétního organismu bývá výrazně nižší. Je velmi nepravděpodobné, aby k přenosu jednoho konkrétního genu z jednoho konkrétního taxonu došlo několikrát nezávisle na sobě. Proto, s jistou mírou opatrnosti, můžeme nález takového genu u více taxonů považovat za jejich společnou synapomorfii, která je všechny sdružuje do monofyletického taxonu. Vycházíme při tom z předpokladu, že daný gen byl v minulosti přenesen právě jednou do společného předka organismů, u kterých jsme jej našli.

Problémy ale vyvstávají již při identifikaci laterálně přenesených genů. Nalezneme-li ve více genomech sekvenci, jejíž fylogeneze neodpovídá fylogenezi jejich nositelů, může jít stejně dobře

o případ LGT jako o výsledek dávné paralogie. Totéž platí pro vysvětlení ostrůvkovité distribuce genu mezi organizmy. U linie vedoucí ke společnému předku zkoumaných organismů mohlo dojít k duplikaci genu a následným ztrátám jedné či druhé varianty u různých dceřiných linií. Další komplikací je možnost seriálního přenosu. K němu zřejmě dochází zejména u genů, které svým nositelům poskytují výraznou selekční výhodu. Typicky jde o geny kódující enzymy anaerobního metabolismu, které svým nositelům umožňují osidlovat nové neobsazené niky.

Vždy je třeba mít na paměti i možnost sekundární ztráty laterálně přeneseného genu. Taxony definované na základě přítomnosti laterálně přenesených genů tedy nemusejí být monofyletické, ale parafyletické. Navíc si nikdy nemůžeme být jisti, zda nenalezení daného genu v nějakém genomu skutečně odráží jeho nepřítomnost, nebo je pouze výsledkem nedokonalé metodiky našeho pátrání po něm. Tyto komplikace se ale týkají prakticky jakýchkoli znaků, genotypových i fenotypových; nejde o výlučný problém znaků založených na laterálně přenesených genech.

Ani geny získané anomálním LGT tedy nemohou sloužit k rekonstrukci fylogeneze samy o sobě, ale vždy jen v kontextu jiných znaků. Oblastí, kde ale mohou znaky vzniklé LGT poskytnout neocenitelnou pomoc, je odhalování směru evoluce a pátrání po kořenech fylogenetických stromů. Ze své podstaty jsou totiž tyto znaky polarizované, mají vždy nějakého donora a nějakého recipienta, a proto je relativně snadné odhalit, který stav genomu je původní a který odvozený. Z toho vyplývá mj. i fascinující možnost dát do souvislosti časovou posloupnost kladogenetických událostí v liniích donora a recipienta.

Využití LGT ve fylogenetice eukaryot je dosud nepříliš doceňovanou možností, o čemž svědčí zejména malý počet studií, které na něm byly dosud založeny. Do budoucna, zvláště se stále rychleji přibývajícími sekvenčními daty, ale může představovat mocný nástroj k rozkrývání velkých evolučních záhad, jakými jsou například pozice kořene stromu eukaryot nebo pořadí odvětvení jednotlivých prokaryotických linií.

POUŽITÁ LITERATURA

- 1) ANDAM, C., WILLIAMS, D. & GOGARTEN, J. 2010. Natural taxonomy in light of horizontal gene transfer. *Biology & Philosophy*, 589-602.
- 2) ANDERSSON, J., SARCHFIELD, S. & ROGER, A. 2005. Gene transfers from Nanoarchaeota to an ancestor of diplomonads and parabasalids. *Molecular Biology and Evolution*, 85-90.
- 3) AVERY, O., MACLEOD, C. & MCCARTY, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine*, 137-158.
- 4) BACHVAROFF, T., SANCHEZ PUERTA, M. & DELWICHE, C. 2005. Chlorophyll c-containing plastid relationships based on analyses of a multigene data set with all four chromalveolate lineages. *Mol Biol Evol*, 22, 1772-82.
- 5) BALDAUF, S. & PALMER, J. 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11558-62.
- 6) BECKER, B., HOEF-EMDEN, K. & MELKONIAN, M. 2008. Chlamydial genes shed light on the evolution of photoautotrophic eukaryotes. *Bmc Evolutionary Biology*, -.
- 7) BUI, E., BRADLEY, P. & JOHNSON, P. 1996. a common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9651-9656.
- 8) BURGER ET AL. Unpublished in GRAY, M. W., LANG, B. F. & BURGER, G. 2004. Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet*, 38, 477-524.
- 9) CARLTON, J., HIRT, R., SILVA, J., DELCHER, A., SCHATZ, M., ZHAO, Q., WORTMAN, J., BIDWELL, S., ALSMARK, U., BESTEIRO, S., SICHERITZ-PONTEN, T., NOEL, C., DACKS, J., FOSTER, P., SIMILLION, C., VAN DE PEER, Y., MIRANDA-SAAVEDRA, D., BARTON, G., WESTROP, G., MULLER, S., DESSI, D., FIORI, P., REN, Q., PAULSEN, I., ZHANG, H., BASTIDA-CORCUERA, F., SIMOES-BARBOSA, A., BROWN, M., HAYES, R., MUKHERJEE, M., OKUMURA, C., SCHNEIDER, R., SMITH, A., VANACOVA, S., VILLALVAZO, M., HAAS, B., PERTEA, M., FELDBLYUM, T., UTTERBACK, T., SHU, C., OSOEGAWA, K., DE JONG, P., HRDY, I., HORVATHOVA, L., ZUBACOVA, Z., DOLEZAL, P., MALIK, S., LOGSDON, J., HENZE, K., GUPTA, A., WANG, C., DUNNE, R., UPCROFT, J., UPCROFT, P., WHITE, O., SALZBERG, S., TANG, P., CHIU, C., LEE, Y., EMBLEY, T., COOMBS, G., MOTTRAM, J., TACHEZY, J., FRASER-LIGGETT, C. & JOHNSON, P. 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 207-212.
- 10) CAVALIER-SMITH, T. 1983. in CAVALIER-SMITH, T. 1993. KINGDOM PROTOZOA AND ITS 18 PHYLA. *Microbiological Reviews*, 953-994.
- 11) CAVALIER-SMITH, T. 2003. The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozooa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1741-1758.
- 12) CEPICKA, I., HAMPL, V. & KULDA, J. 2010. Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species. *Protist*, 400-433.

- 13) CLARK, C. & ROGER, A. 1995. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in entamoeba-histolytica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6518-6521.
- 14) DOOLITTLE, W. 1998. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics*, 307-311.
- 15) GERMOT, A., PHILIPPE, H. & LEGUYADER, H. 1996. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14614-14617.
- 16) GHOSH, S., FIELD, J., ROGERS, R., HICKMAN, M. & SAMUELSON, J. 2000. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infection and Immunity*, 4319-4322.
- 17) GOGARTEN, J. 2003. Gene transfer: Gene swapping craze reaches eukaryotes. *Current Biology*, R53-R54.
- 18) GRAY, M. W., LANG, B. F. 1998 in LANG, B. F., GRAY, M. W. & BURGER, G. 1999a. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 33, 351-97.
- 19) GRIFFITH, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, 113-159.
- 20) HAMPL, V., HORNER, D., DYAL, P., KULDA, J., FLEGR, J., FOSTER, P. & EMBLEY, T. 2005. Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for Metamonada and Excavata. *Molecular Biology and Evolution*, 2508-2518.
- 21) HAMPL, V., HUG, L., LEIGH, J., DACKS, J., LANG, B., SIMPSON, A. & ROGER, A. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3859-3864.
- 22) HANNAERT, V., SAAVEDRA, E., DUFFIEUX, F., SZIKORA, J., RIGDEN, D., MICHELS, P. & OPPERDOES, F. 2003. Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1067-1071.
- 23) HARPER, J., WAANDERS, E. & KEELING, P. 2005. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 487-96.
- 24) HASHIMOTO, T., SANCHEZ, L., SHIRAKURA, T., MULLER, M. & HASEGAWA, M. 1998. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6860-6865.
- 25) HAUSMANN, S., ALTURA, M., WITMER, M., SINGER, S., ELMENDORF, H. & SHUMAN, S. 2005. Yeast-like mRNA capping apparatus in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, 280, 12077-86.
- 26) HENZE, K., HORNER, D., SUGURI, S., MOORE, D., SANCHEZ, L., MULLER, M. & EMBLEY, T. 2001. Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes *Giardia intestinalis*, *Spironucleus barkhanus* and *Trichomonas vaginalis*. *Gene*, 123-131.
- 27) HORNER, D., HIRT, R., KILVINGTON, S., LLOYD, D. & EMBLEY, T. 1996. Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1053-1059.
- 28) HRDY, I., HIRT, R., DOLEZAL, P., BARDONOVA, L., FOSTER, P., TACHEZY, J. & EMBLEY, T. 2004. *Trichomonas hydrogenosomes* contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature*, 618-622.

- 29) HUANG, J. & GOGARTEN, J. 2006. Ancient horizontal gene transfer can benefit phylogenetic reconstruction. *Trends in Genetics*, 361-366.
- 30) HUANG, J., XU, Y. & GOGARTEN, J. 2005. The presence of a haloarchaeal type tyrosyl-tRNA synthetase marks the opisthokonts as monophyletic. *Mol Biol Evol*, 22, 2142-6.
- 31) KATZ, L. 2002. Lateral gene transfers and the evolution of eukaryotes: theories and data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1893-1900.
- 32) KEELING, P. & INAGAKI, Y. 2004. a class of eukaryotic GTPase with a punctate distribution suggesting multiple functional replacements of translation elongation factor 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15380-5.
- 33) KEELING, P., POULSEN, N. & MCFADDEN, G. 1998. Phylogenetic diversity of parabasal symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 643-650.
- 34) LANG, B. F., BURGER, G., O'KELLY, C. J., CEDERGREN, R., GOLDING, G. B., LEMIEUX, C., SANKOFF, D., TURMEL, M. & GRAY, M. W. 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387, 493-7.
- 35) LARA, E., CHATZINOTAS, A. & SIMPSON, A. 2006. Andalucia (n. Gen.) - the deepest branch within jakobids (Jakobida; Excavata), based on morphological and molecular study of a new flagellate from soil. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 112-120.
- 36) LONGSTAFF, D., LARUE, R., FAUST, J., MAHAPATRA, A., ZHANG, L., GREEN-CHURCH, K. & KRZYCKI, J. 2007. a natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1021-1026.
- 37) MARTIN, W. & MULLER, M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 37-41.
- 38) MUKAI, A. & ENDOH, H. 2004. Presence of a bacterial-like citrate synthase gene in *Tetrahymena thermophila*: Recent lateral gene transfers (LGT) or multiple gene losses subsequent to a single ancient LGT? *Journal of Molecular Evolution*, 540-549.
- 39) NOZAKI, H. 2005. a new scenario of plastid evolution: plastid primary endosymbiosis before the divergence of the "Plantae," emended. *Journal of Plant Research*, 247-255.
- 40) NOZAKI, H., ISEKI, M., HASEGAWA, M., MISAWA, K., NAKADA, T., SASAKI, N. & WATANABE, M. 2007. Phylogeny of primary photosynthetic eukaryotes as deduced from slowly evolving nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution*, 1592-1595.
- 41) OHKUMA, M., SAITA, K., INOUE, T. & KUDO, T. 2007. Comparison of four protein phylogeny of parabasal symbionts in termite guts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 847-853.
- 42) PEYRETAILLADE, E., BROUSSOLLE, V., PEYRET, P., METENIER, G., GOUY, M. & VIVARES, C. 1998. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Molecular Biology and Evolution*, 683-689.
- 43) PHILIPPE, H. & LAURENT, J. 1998. How good are deep phylogenetic trees? *Current Opinion in Genetics & Development*, 616-623.
- 44) RICE, D. & PALMER, J. 2006. An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol*, 4, 31.

- 45) ROGER, A., CLARK, C. & DOOLITTLE, W. 1996. a possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 14618-14622.
- 46) ROGER, A., SVARD, S., TOVAR, J., CLARK, C., SMITH, M., GILLIN, F. & SOGIN, M. 1998. a mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 229-234.
- 47) SAGAN, L. 1967. On origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 225-274.
- 48) SIMPSON, A., PERLEY, T. & LARA, E. 2008. Lateral transfer of the gene for a widely used marker, alpha-tubulin, indicated by a multi-protein study of the phylogenetic position of *Andalucia* (Excavata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 366-377.
- 49) SOGIN, M. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 1, 457-63.
- 50) SOGIN, M. & SILBERMAN, J. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal For Parasitology*, 11-20.
- 51) STAIRS, C., ROGER, A. & HAMPL, V. 2011. Eukaryotic pyruvate formate lyase and its activating enzyme were acquired laterally from a firmicute. *Mol Biol Evol*.
- 52) SUN, G., YANG, Z., ISHWAR, A. & HUANG, J. 2010. Algal Genes in the Closest Relatives of Animals. *Molecular Biology and Evolution*, 2879-2889.
- 53) SZABOVÁ, J., RUZICKA, P., VERNER, Z., HAMPL, V. & LUKES, J. 2011. Experimental examination of EFL and MATX eukaryotic horizontal gene transfers: co-existence of mutually exclusive transcripts predates functional rescue. *Mol Biol Evol*.
- 54) TOVAR, J., FISCHER, A. & CLARK, C. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology*, 1013-1021.
- 55) TOVAR, J., LEON-AVILA, G., SANCHEZ, L., SUTAK, R., TACHEZY, J., VAN DER GIEZEN, M., HERNANDEZ, M., MULLER, M. & LUCOCQ, J. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 172-176.
- 56) WOESE, C., KANDLER, O. & WHEELIS, M. 1990. Towards a natural system of organisms - proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4576-4579.
- 57) WOESE, C., OLSEN, G., IBBA, M. & SOLL, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 202-236.
- 58) YUAN, S., GUO, J., DU, J. & LIN, H. 2008. Phylogenetic Analyses of Plastid-Originated Proteins Imply Universal Endosymbiosis in Ancestors of Animals and Fungi. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences*, 903-908.
- 59) YUAN, S., GUO, J., DU, J. & LIN, H. 2010. Plant-Like Proteins in Protozoa, Metazoa and Fungi Imply Universal Plastid Endosymbiosis. *Rivista Di Biologia-Biology Forum*, 71-87.
- 60) YUAN, S., SUN, X., MU, L., LEI, T., LIU, W., WANG, J., DU, J. & LIN, H. 2007. Nuclear-localized plastid DNA fragments in protozoa, metazoa and fungi. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 123-132.

- 61) ZHAXYBAYEVA, O., SWITHERS, K., LAPIERRE, P., FOURNIER, G., BICKHART, D., DEBOY, R., NELSON, K., NESBO, C., DOOLITTLE, W., GOGARTEN, J. & NOLL, K. 2009. On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5865-5870.