

Evoluce parazitických výtrusovců z fotosyntetického předka

Malárie a toxoplazmóza jsou patrně nejnebezpečnější onemocnění člověka způsobená parazity z kmene výtrusovci (Apicomplexa). První jmenovaná parazitóza má na svědomí statisíce obětí každý rok, druhá je možná ještě více devastující, pokud je hypotéza o ovlivnění psychiky člověka infikovaného toxoplazmou správná. Oba původci zmíněných onemocnění, prvoci rodů *Plasmodium* a *Toxoplasma*, obsahují ve svých buňkách zbytkový, nefotosyntetický plastid – organelu původně zodpovědnou za fotosyntézu, tedy biologickou přeměnu (asimilaci) sluneční energie, vody a oxidu uhličitého na cukry, biochemický proces známý u sinic, rostlin a řas (viz také Živa 2018, 1: 26–28). Je tedy naprosto zřejmé, že se tyto obligátní paraziti živočichů vyvinuli z fototrofní řasy. Jak k tomu došlo?

Apikoplast – zbytkový plastid výtrusovců

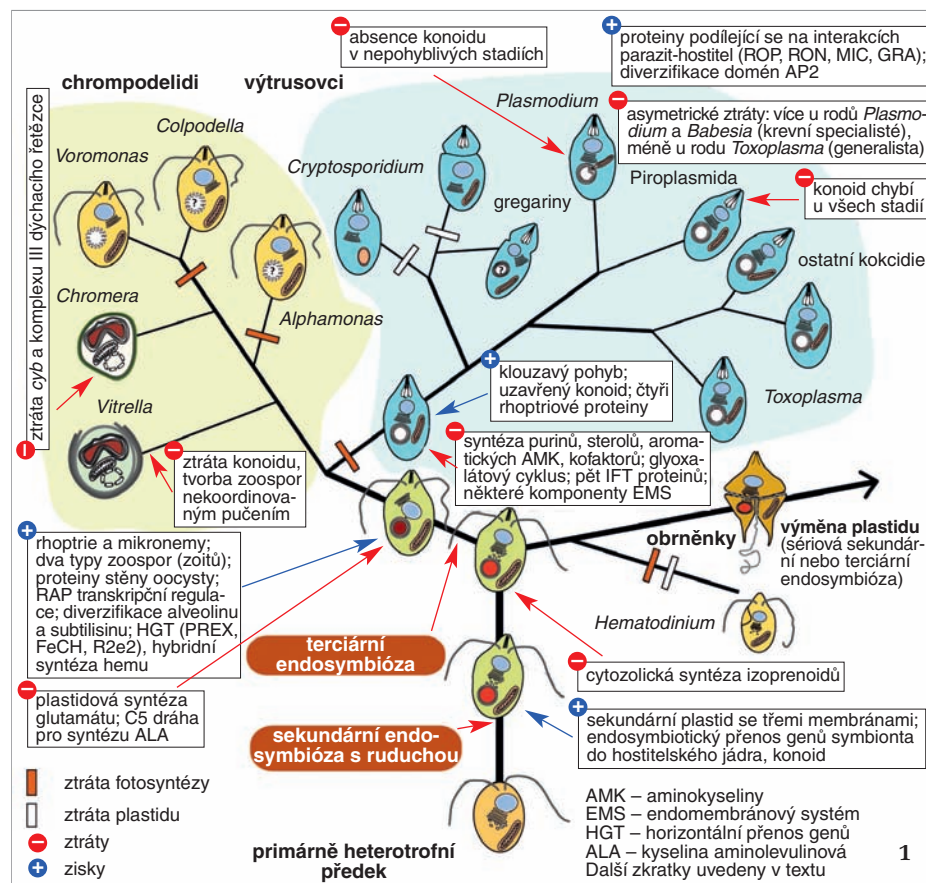
Výtrusovci jsou jednobuněční prvoci infikující snad všechny skupiny živočichů od mořských červů přes hmyz až po savce. Najdeme mezi nimi i původce závažných onemocnění člověka, jako již zmíněné malárie (rod *Plasmodium*) a toxoplazmózy (*T. gondii*), i mnoha chovaných zvířat – např. kryptosporidiózy (rod *Cryptosporidium*) nebo piroplazmózy (rody *Babesia* a *Theileria*). Jsou typičtí přítomností specifických vnitrobuněčných struktur, jako je např. apikální komplex, kortikální alveoly

nebo zbytkový plastid. Plastidu výtrusovců, prapodivně mnohomembránové struktury v buňkách těchto parazitů, si biologové všimli s příchodem elektronové mikroskopie v druhé polovině 20. století. Její identita, funkce a původ však zůstávaly dlouho utajeny. Již první sekvence specifické organelární DNA získané začátkem 90. let americkým molekulárním biologem Malcomem J. Gardnerem ale naznačovaly, že by mohlo jít o plastid. Tuto hypotézu, včetně lokalizace plastidové DNA právě ve známé mnohomembránové struktuře, nezávisle potvrdily dvě vědecké skupiny,

Geoffrey I. McFaddena (1996) a Davida Roose (1997). Počet membrán (čtyři) obalujících plastid ukazuje na jeho původ v endosymbióze s eukaryotickou řasou. Genom plastidu výtrusovců, také označovaného apikoplast, je kruhový, o velikosti přibližně 35 kb (kb – kilobase, tisíc bází), se strukturou typickou pro plastidové genomy. Pořadí genů v plastidovém ribozomálním superoperonu (části genomu, která sdružuje geny kódující plastidové ribozomální proteiny) pak jasně ukazuje na původ apikoplastu v endosymbióze s ruduchou. Přítomnost plastidu v buňkách výtrusovců vedla k jednoznačnému závěru: tito paraziti jsou vlastně modifikované řasy. Jak se ale mohla autofototrofní buňka energeticky závislá výhradně na slunečním světle stát parazitem?

Dnes už víme, že ztráta fotosyntézy je u plastidů relativně častá, zejména u komplexních plastidů řas ze skupiny Alveolata, kam patří i výtrusovci (např. Živa 2019, 5: 220–223). Jen asi polovina výtrusovců příbuzných obrněnk (Dinophyta) s komplexním plastidem je autotrofní, ostatní fotosyntézu ztratily a žijí většinou jako dravci nebo paraziti. Některé obrněnky si dokonce fotosyntetický nefunkční nebo málo efektivní plastid vyměnily za nový, jiné pak kombinují fototrofii a lov – jsou mixotrofní. Proč si ale výtrusovci a heterotrofní obrněnky ponechávají plastid, který ztratil schopnost fotosyntetizovat? Ukázalo se, že zbytkový plastid je pro přežití sekundárně heterotrofního prvoka nezbytný, protože hostí řadu metabolických drah, které již samotná hostitelská buňka ztratila. V plastidu výtrusovců tak byly nalezeny dráhy pro syntézu hemu, mastných kyselin a izoprenoidů. Právě parazitické výtrusovci a obrněnky ukazují, že v extrémních případech může být zcela ztracen i samotný plastid. Týká se to některých gregarin, evolučně bazálních výtrusovců parazitujících na bezobratlých, a také medicínsky známého rodu *Cryptosporidium*. Plastid ztratily rovněž parazitické obrněnky rodu *Hematodinium* (obr. 1).

Nicméně fototrofní řasa, která by blízce sdílela společný původ s výtrusovci, nebyla dlouho známa. Obrněnky a jejich plastidy jsou totiž natolik odlišné, že jejich smysluplné porovnání s výtrusovci nebylo prakticky možné. V r. 2008 byl publikován objev nové skupiny řas izolovaných z korálů, které se ukázaly být blízce příbuzné parazitickým výtrusovcům. Tyto řasy, nazývané podle jednoho ze dvou dosud popsaných druhů různých rodů, *Chromera velia*, chromeridní řasy (chromeridi), jsou plně fototrofní, vybavené komplexním plastidem obaleným čtyřmi membránami a zmíněný druh dokonce obsahuje modifikovanou formu apikálního komplexu – buněčné struktury, kterou výtrusovci používají k penetraci buňky hostitele. Přestože první druh byl objeven již v r. 2008 (uvedená *C. velia*) a druhý v r. 2012 (*Vitrella brassicaformis*), nebyl žádný další druh chromeridů od té doby formálně popsán



1 Schéma evoluce chromopelidů a výtrusovců. Ve fylogenetickém stromě jsou vyznačeny důležité ztráty a akvizice genů a struktur, včetně ztráty fotosyntézy a samotného plastidu. Orig. M. Oborník

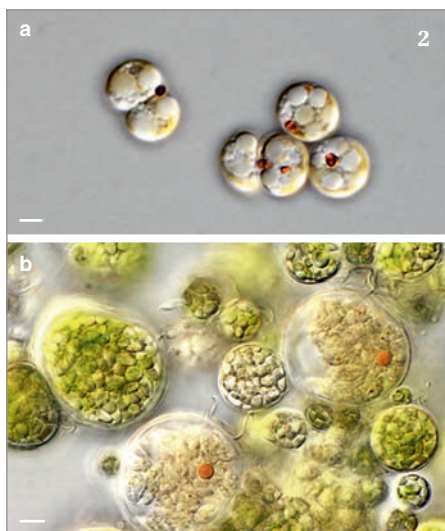
a není ani k dispozici v kultuře. Že ale řada příbuzných druhů existuje, je zřejmé ze sekvencí environmentálních vzorků, a velmi zajímavá skupina příbuzných organismů označovaných jako koralikolidi byla zcela nedávno nalezena v korálech. Tyto organismy s plastidy však zjevně nemohou žít volně a zcela jistě nejsou fototrofní.

Chromeridi

Řasy *C. velia* (česky jsem ji pojmenoval korálnatka ukrytá) a *V. brassicaformis* (skleněnka zelnotvará) se navzdory příslušnosti ke stejné skupině výrazně liší morfologicky, ultrastrukturou, životním cyklem, pigmentací, strukturou genomu nebo složením mitochondriálního dýchacího řetězce. Dokonce i jejich fylogenetická pozice je trochu jiná a fakt, že netvoří sesterské druhy, ale větví se ve fylogenetickém stromě v rámci jednobuněčných predátorů řas a prvoků – kolpodelidů (někdy je celá skupina označována chromodelidi), vedl až k formální neplatnosti původně popsaného kmene Chromerida. Jinými slovy, chromeridi jsou vlastně fototrofními kolpodelidy, organismy zařazovanými některými taxonimy (např. Thomasem Cavalierem-Smithem) do skupiny Apicomonada v rámci kmene Apicomplexa. Dravé kolpodely standardně obsahují apikální komplex, který používají k průniku buněčným povrchem své kořisti, a zřejmě hostí také nefotosyntetický zbytkový plastid. Apikální komplex je přítomen u korálnatky, i když redukovaný do podoby prekonoidu, u skleněnky však podobná struktura nalezena nebyla. Skleněnka velmi pravděpodobně žije jako epibiontní řasa na povrchu korálů a do jiných symbiotických vztahů (včetně parazitismu) s nimi patrně nevstupuje. Přítomnost apikálního komplexu u korálnatky rezonuje s její schopností infikovat larvy korálů (např. rodu *Acropora*), na nichž zjevně parazituje – zřejmě je fakultativním parazitem, možná dokonce náhodným. Fakt, že se nepodařilo najít korálnatku uvnitř dospělých korálů, naznačuje, že infekce je pro jejich larvy nejspíše letální.

Organely chromeridů a výtrusovců

Evoluce organel značně vypovídá o způsobu výživy daného organismu a tím i o přechodu fototrofního předka výtrusovců z fotoautotrofie k parazitismu. Sekundární (získaná) heterotrofie je logicky spojována se ztrátou schopnosti fotosyntetizovat. Musím konstatovat, že plastidy a plastidové genomy chromeridních řas by patrně nemohly být navzájem odlišnější. Plastid skleněnky obsahuje klasický kruhový genom, který má pro plastidy typickou strukturu s počátkem replikace a invertovanými opakováními genů kódujících ribozomální RNA (rRNA). Plastidové kódované geny skleněnky jsou krátké a překvapivě bohaté na páry bází guanin–cytosin (GC), genom je kompaktní a relativně malý (85,5 kb), s velkým počtem a vysokou hustotou genů. Plastidový genom korálnatky je naprosto bezprecedentní svou lineární topologií s krátkými invertovanými opakováními genů pro ORF1 (otevřený čtecí rámec s neznámou funkcí), psbA (součást fotosystému II) a atpH (podjednotka plastidové ATP syntázy) na koncích.



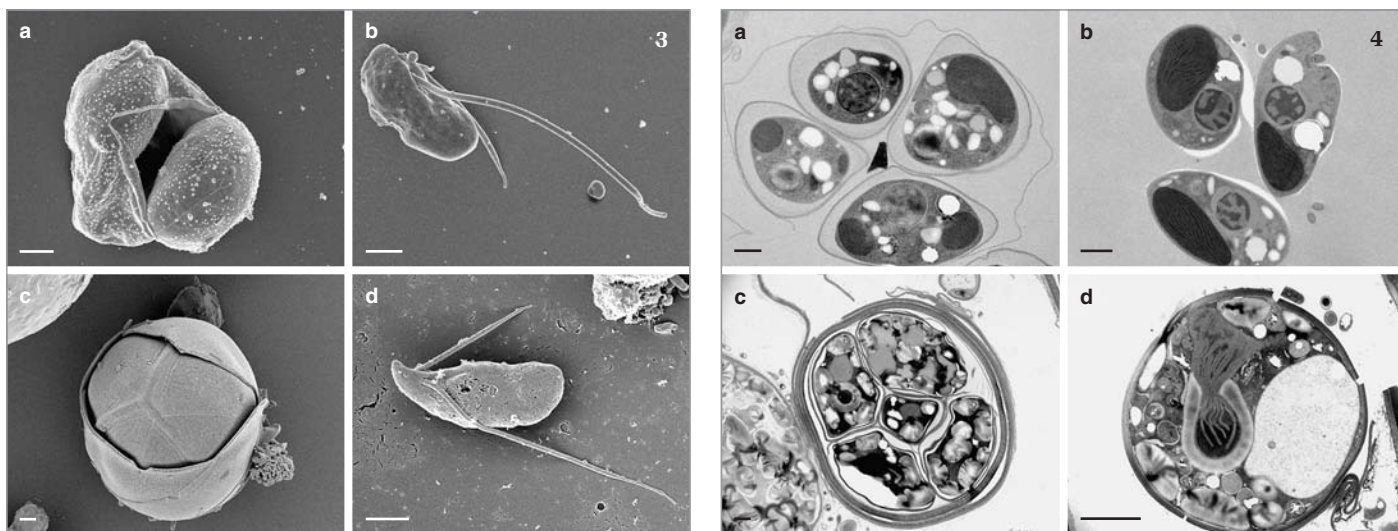
Obsahuje jen jednu sadu genů pro rRNA. Genom je relativně velký (121,2 kb), bohatý na páry adenin–thymin (AT) a obsahuje méně genů než plastidový genom skleněnky. Plastid korálnatky používá alternativní kód pro tryptofan (UGA místo UGG; U – uracil) v některých proteinech, podobně jako apikoplasty kokcií (skupina výtrusovců obsahujících *T. gondii*). Stejně jako obrněnky používají obě chromeridní řasy bakteriální enzym RuBisCO (ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxylázu/oxygenázu; odpovědný za fixaci CO₂ v Calvinově cyklu temnostní fáze fotosyntézy, a oxidaci substrátu CO₂ pro fotosyntézu při fotorespiraci). Fylogenetická analýza postavená na genech kódovaných plastidem jasně ukazuje příbuznost plastidů chromeridů a výtrusovců.

Zajímavou a evolučně významnou metabolickou podobnost lze pak nalézt u syntézy tetrapyrrolů u výtrusovců a chromeridů. Tetrapyrroly (porfyriny; hlavně chlorofyl a hem) jsou organické sloučeniny složené ze čtyř pyrolových jader často koordinovaných kovovým iontem. Tyto látky se podílejí na konverzi světelné energie na chemickou vazbu prostřednictvím fotosyntézy stejně jako na oxidativní fosforylaci a fungují jako kofaktory mnoha enzymů. Víme, že výtrusovci syntetizují hem hybridní dráhou, která kombinuje prvky známé z heterotrofů (C4 dráha pro syntézu prvního prekursoru – kyseliny aminolevulinové, ALA) a fototrofů (část dráhy lokalizovaná v plastidu). Syntetická dráha je pak u parazitů ukončena posledními dvěma kroky katalyzovanými protoporphyrinogen oxidázou (PPOX) a ferochelátázou (FeCH) v mitochondrii. Chromeridi (a kolpodelidi) syntetizují ALA stejně jako výtrusovci C4 dráhou pomocí mitochondriální ALA-syntázy (ALAS). ALA je následně importována do plastidu, kde syntéza hemu pokračuje. Protože stejná dráha slouží pro syntézu chlorofylu, jsou chromeridi jedinými známými fototrofy, kteří syntetizují chlorofyl z glycinu (substrát pro ALA syntázu v C4 dráze), a ne z glutamátu (substrát pro C5 dráhu), jak to dělají ostatní fototrofové. Původ zúčastněných enzymů je mozaikový, u chromeridů i výtrusovců je tak enzymový aparát poskládaný z proteinů mitochondriálního (ALAS, porfobilinogen deamináza), plastidového (ALA-dehydratáza, uroporphyrinogen dekarboxyláza, PPOX, FeCH)

a eukaryotického původu (ALA-dehydratáza, uroporphyrinogen dekarboxyláza, koproporphyrinogen oxidáza, PPOX). Některé enzymy jsou u chromeridů přítomny ve více kopiích, a to ve formě tzv. pseudoparalogů získaných horizontálním přenosem genů (Horizontal Gene Transfer, HGT; např. Živa 2018, 3: 117–120) z různých endosymbiotických partnerů (ALA-dehydratáza, uroporphyrinogen dekarboxyláza, koproporphyrinogen oxidáza, PPOX, FeCH).

Chromeridní řasy používají nejredukovnější známé fotosystémy, molekulární multienzymové „továrny“ zodpovědné za vlastní proces fotosyntézy. Fotosystémy chromeridů obsahují zhruba o 30 % proteinových podjednotek méně než obdobné komplexy u „vynálezců“ oxygenní fotosyntézy – sinic. Přesto (nebo možná právě proto) jsou chromeridní fotosystémy vysoce flexibilní a dokážou se přizpůsobit intenzitě a složení dopadajícího světla. Kromě toho, že jim řada podjednotek chybí, jiné mají navíc. Např. fotosystém I (PSI) korálnatky trvale obsahuje dvě superoxid dismutázy (SOD), enzymy zodpovědné za detoxifikaci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Navíc tato řasa sice ztratila několik podjednotek fotosystému, ale tři další, zcela nové, získala. Sekvence těchto nových podjednotek se neliší od ničeho v databázích a jejich funkce je tak neznámá.

Mitochondriální genomy výtrusovců (s výjimkou kryptosporidií, které mitochondriální genom nemají) měly až dosud nejmenší známou kódovací kapacitu. Obsahují totiž pouze tři geny kódující proteiny (*cox1*, *cox3*, *cyb*) a sadu fragmentů genů pro rRNA. Jsou organizovány jako sada homogenních, lineárních molekul (stejně dlouhé molekuly kódující stejné geny). Mitochondriální genomy chromeridů však do jisté míry připomínají genomy obrněnek – jde o heterogenní změť různě dlouhých lineárních molekul kódujících celé geny, fragmenty genů, fúzané geny a kombinace genových fragmentů i celých genů. Do RNA jsou prepisovány pouze kompletní geny. Kódovací kapacita korálnatky a skleněnky se liší. Zatímco mitochondrie skleněnky kóduje stejný set tří genů jako u výtrusovců a obrněnek, mitochondriální genom korálnatky obsahuje jen dva geny kódující proteiny *cox1* a *cox3*, gen pro cytochrom *b* chybí. Tento fakt se také odráží ve struktuře dýchacího řetězce u korálnatky, který je silně redukovaný. Zatímco skleněnka obsahuje více méně kanonický dýchací řetězec, až na absenci komplexu I, chybějícího i u výtrusovců a obrněnek a nahrazeného alternativní NADH dehydrogenázou, korálnatka nemá ani komplex III (cytochrom *c* reduktázu). Dýchací řetězec je tedy rozdělen na dva nenavazující podřetězce. V tom prvním komplex II (sukcinát dehydrogenáza), alternativní NADH dehydrogenáza a další enzymy (např. dihydroorotát dehydrogenáza, glycerol-3-fosfát dehydrogenáza) generují elektrony, které jsou přijímány ubiquinonem a posílány dál na alternativní oxidázu. Druhý podřetězec je pak tvořen komplexem IV (cytochrom *c* oxidáza), „krmeným“ elektrony produkovanými L-galaktono-1,4-lakton dehydrogenázou, D-laktát: cytochrom *c* oxidoreduktázou a L-laktát: cytochrom *c* oxidoreduktázou (cytochrom *b2*). Komplex IV tak



2 Chromeridní řasy korálnatka ukrytá (*Chromera velia*, obr. a) a skleněnka zelno-tvará (*Vitrella brassicaformis*, b) v optickém mikroskopu. Nepohyblivé vegetativní buňky korálnatky měří 5–7 µm v průměru, sporangia skleněnky až 30 µm. Zelená autosporangia obsahují desítky autospor, nezelená zoosporangia s oranžovým tělískem desítky zoospor. Měřítka 2 µm. Foto D. Modrý

3 Autosporangium korálnatky se dvěma autosporami obalenými membránou sporangia (a). Zoospora korálnatky (b) má dva nesterpné dlouhé bičíky, s malým prstovitým výběžkem na kratším bičíku. Vegetativní buňka skleněnky (c) je obalena laminární buněčnou stěnou připomínající hlávku zelí. Její zoospora (d) se dvěma nesterpné dlouhými bičíky připomíná zoosporu korálnatky, ale nemá výběžek na kratším bičíku. Skenovací elektronový mikroskop. Měřítka 1 µm

4 Korálnatka – řez autosporangiem (a) a zoosporami (b), skleněnka – řez autosporangiem (c) a autosporou (d) s viditelným pyrenoidem, proteinovým tělískem obsahujícím RuBisCO (ribulóza-1,5-bis-fosfát karboxylázu/oxygenázu), enzym zodpovědný za fixaci CO₂ v temnostní fázi fotosyntézy. Transmisní elektronový mikroskop. Měřítka 1 µm. Foto M. Oborník (obr. 3 a 4, příprava vzorků M. Vancová)

zůstává jediným komplexem dýchacího řetězce korálnatky (z tří v kanonickém řetězci), jenž pumpuje protony do mezimembránového prostoru mitochondrie a může tak generovat membránový potenciál nezbytný pro funkci ATP syntázy (schéma dýchacích řetězců najdete na webu Živy).

Reduktivní evoluce

I když se zdá, že ztráta fotosyntézy by měla být prvotním impulzem k evoluci parazitismu u výtrusovců, příklad korálnatky naznačuje, že tomu tak být nemusí. Nález larev korálů infikovaných korálnatkou byl nejdříve interpretován jako důkaz mutualistického vztahu, podobně jako u obrněnek rodu *Symbiodinium*. Bez symbiotických (mutualistických) obrněnek, zooxantel, by totiž korál nepřežil. Úhyn korálů v posledních letech je způsoben po zvýšení teploty vody právě vypuzením zooxantel z hostitelského korálu – dochází k jeho vybělení (bleaching) a vyhladovění. Nedávná analýza

za transkriptomu larev korálů infikovaných korálnatkou ale ukázala, že transkriptomový profil (sada genů se specificky zvýšenou či sníženou mírou transkripce) vypadá jinak než u korálů obsazených symbiotickými řasami a daleko více připomíná profily korálů infikovaných patogeny. To znamená, že korálnatka je patrně schopná žít jako parazit, i když si zachovává schopnost fotosyntézy, tedy může jedinečným způsobem kombinovat parazitický a fotoautotrofní způsob života. V takovém případě je možné, dokonce pravděpodobné, že parazitismus vznikl u fototrofních organismů a schopnost fotosyntézy byla ztracena až poté, co ji už prvok jako parazit nepotřeboval.

Sekvenční analýza jaderných genomů chromeridů ještě podtrhla výrazné rozdíly mezi oběma popsánymi zástupci. Zatímco korálnatka má, podobně jako v plastidu, velký a rozvolněný genom o velikosti 193,6 Mb (Mb – megabase, milion bází), jádro skleněnky obsahuje kompaktní genom o pouhých 72,7 Mb. Počet predikovaných proteinů (26 112 u korálnatky, 22 817 u skleněnky) ukazuje na daleko větší hustotu genů skleněnky, opět analogickou plastidovému genomu. Rozdíly ve velikosti genomů obou řas jsou způsobeny velikostí intronů a hlavně různou přítomností DNA repetice a transponovatelných elementů. Korálnatka obsahuje čtyři chromozomy a je známa pouze haploidní forma bez přítomnosti sexuálního rozmnožování. U skleněnky byla prokázána fúze zoospor, a zjevně tak sexuálním rozmnožováním prochází. Analýza jaderných genomů výtrusovců a chromeridů ukazuje, že evoluční přechod z fototrofie na parazitismus provázela obrovská ztráta genů. Odhaduje se, že v první fázi ztratil chromeridům podobný předek výtrusovců přes 3 800 genů, zatímco jich pouze kolem 80 získal. Tak malá akvizice nových genů naznačuje, že řada genů používaných k autotrofii byla adaptována pro účely parazitismu. Přechod fototrofa na parazitismus tedy zahrnoval nejen získání nových genů, ale také masivní ztrátu genů spojenou i se ztrátou již nepotřebné fotosyntézy (např. genů kódujících proteiny fotosystémů, chlorofylu, plastidově lokalizovanou syntézu glutamové kyseliny, syntézu purinů, steroidů, aromatických aminokyselin) a modifikaci genů používaných fototrofním předkem (proteiny rhoptrií, apikálního komplexu,

klouzavý pohyb buňky apod., viz obr. 1). V jednotlivých liniích výtrusovců pak docházelo k dalším ztrátám a získům genů odrážejícím prostředí parazitů (např. u krevních parazitů) a hostitelskou specifitu.

Z pohledu reduktivní evoluce je zajímavé i porovnání životních cyklů chromeridů. Korálnatka má cyklus extrémně omezený na asexuální formy množící se jednoduchým binárním dělením (mateřská buňka se dělí na dvě stejně velké dceřiné buňky), tvoří omezený počet životních stadií (vegetativní buňky, autosporangium s maximálně čtyřmi autosporami, zoosporangium s maximálně 10 zoosporami). Životním cyklem připomíná heterotrofní kolpodely, pouze s tím rozdílem, že dominantní fázi tvoří fototrofní vegetativní buňky, zatímco zoospory jsou potlačeny. Sporangia skleněnky obsahují desítky spor, a hlavně řasa tvoří dva typy zoosporangií a zoospor. V jednom typu mají zoospory uvnitř sporangia skryté bičíky (intracytoplasmatické axonemy), k jejichž vysunutí dochází až po uvolnění spor do prostředí. Tento typ sporogeneze připomíná gametogenezi u prvoků rodu *Plasmodium*. V druhém typu zoosporangií jsou bičíky viditelné již uvnitř sporangia a zoospory se tvoří pučením z mnohojaderné mateřské buňky. Tento způsob se podobá gametogenezi u kokidií (*Toxoplasma*, *Hammondia*, *Eimeria*). Vypadá to, že společný předek chromeridů a výtrusovců měl komplexní životní cyklus, který se reduktivní evolucí přizpůsobil v jednotlivých liniích predaci (kolpodeli), příležitostnému parazitismu (korálnatka) nebo obligátnímu parazitismu (výtrusovci).

Chromeridi jako modelový organismus

Studium evoluce parazitismu u výtrusovců je důležité zejména pro pochopení chování současných výtrusovců. Chromeridní řasy představují ideální model. Lze je snadno pěstovat, jsou dostupné v čisté kultuře a známe jejich organelární i jaderné genomy. Navíc obě reprezentují evolučně výrazně odlišné formy, které v něčem připomínají klasické řasy, v jiném parazitické výtrusovce nebo predátory. Skleněnka nabízí i jedinečnou kombinaci fototrofního stylu s příležitostným parazitismem.

Práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt 18-13458S).