

La convergencia predecible en la función de la hemoglobina tiene bases moleculares impredecibles

Chandrasekhar Natarajan,¹ Federico G. Hoffmann,² Roy E. Weber,³ Angela Fago,³ Christopher C. Witt,⁴ Jay F. Storz^{1*}

Para investigar la predictibilidad de la adaptación genética, examinamos las bases moleculares de la convergencia en la función de la hemoglobina en comparaciones que involucran 56 taxones aviares que tienen límites de rango altitudinal contrastantes. Los aumentos convergentes en la afinidad de la hemoglobina-oxígeno fueron generalizados entre los taxones de gran altitud, pero pocos de esos cambios fueron atribuibles a las sustituciones paralelas de aminoácidos en los residuos clave. Por lo cual, cambios predecibles en el fenotipo bioquímico no tienen una base molecular predecible. Los experimentos con proteínas ancestrales resucitadas revelaron que las sustituciones históricas tienen efectos dependientes del contexto, lo que indica que las posibles soluciones adaptativas dependen de la historia previa. Las mutaciones que producen un cambio adaptativo en una especie pueden representar posibilidades excluidas en otras especies debido a las diferencias en las bases genéticas.

Una cuestión fundamental en genética evolutiva se refiere a la medida en que la convergencia adaptativa en el fenotipo es originada por cambios convergentes o paralelos a nivel de secuencias moleculares. Esta pregunta tiene implicaciones importantes para comprender la repetibilidad inherente (y, por lo tanto, la previsibilidad) de la adaptación molecular. Un enfoque especialmente poderoso para abordar esta cuestión implica el examen de los cambios replicados filogenéticamente en la función de la proteína que se pueden rastrear hasta los reemplazos de aminoácidos específicos. Si los cambios adaptativos en la función de la proteína solo

pueden ser producidos por un pequeño número de posibles mutaciones en un pequeño número de sitios clave -que representan "movimientos forzados" en el espacio del genotipo-, entonces los resultados evolutivos pueden ser altamente predecibles. Alternativamente, si los cambios adaptativos se pueden producir por numerosas mutaciones, -que involucran diferentes mecanismos estructurales o funcionales, pero logran resultados igualmente útiles-, entonces los resultados evolutivos pueden ser más idiosincrásicos e impredecibles. La probabilidad de que una sustitución sea replicada en el mismo sitio en especies

diferentes puede reducirse aún más por los efectos mutacionales dependientes del contexto (epistasis), porque una mutación dada sólo contribuirá a la convergencia

adaptativa si conserva un efecto beneficioso a través de antecedentes genéticos divergentes.

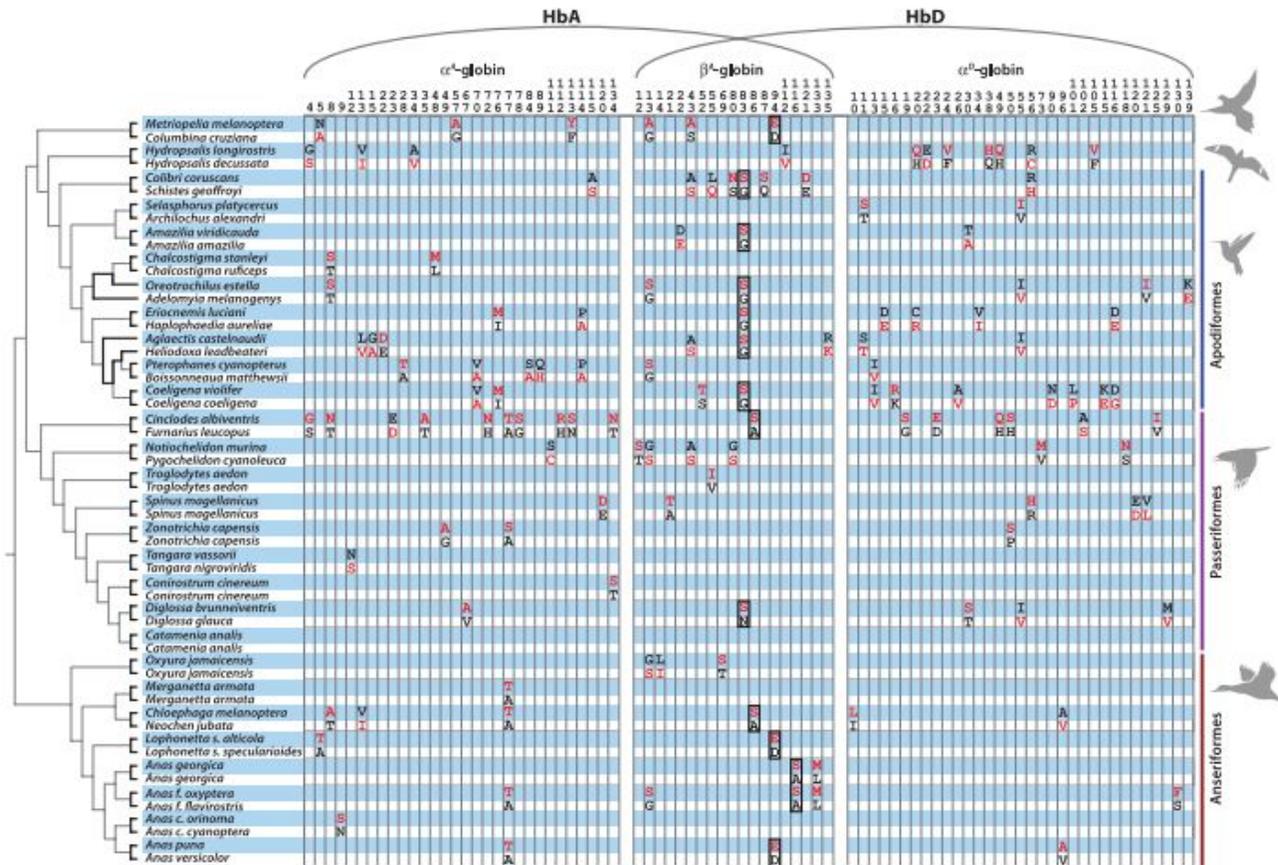


Fig. 1. Amino acid differences that distinguish the Hbs of each pair of high- and low-altitude taxa. Derived (nonancestral) amino acids are shown in red lettering, and rows corresponding to high-altitude taxa are shaded in blue. Subunits of the major HbA isoform are encoded by the α^A - and β^A -globin genes, whereas those of the minor HbD isoform are encoded by the α^D - and β^D -globin genes. Phylogenetically replicated β -chain replacements that contribute to convergent increases in Hb-O₂ affinity (N/G83S, A86S, D94E, and A116S) are outlined. Single-letter abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; and Y, Tyr.

Para evaluar la omnipresencia de la evolución molecular paralela, examinamos los cambios replicados en las propiedades de oxigenación de la hemoglobina (Hb) de múltiples especies de aves que han colonizado independientemente ambientes de gran altitud. Específicamente, probamos si los taxones de gran altitud evolucionaron de manera convergente y aumentaron la

afinidad de la Hb-O₂, y evaluamos el grado en que dichos cambios son atribuibles a las sustituciones paralelas de aminoácidos. Realizamos comparaciones de la función Hb en 56 taxones aviares que componen 28 pares de linajes de alta y baja altitud (tabla S1). Las comparaciones involucraron pares de especies o poblaciones conespecíficas que son nativas de diferentes altitudes.

Bajo hipoxia severa, un aumento en la afinidad de Hb-O₂ puede ayudar a mantener el suministro de O₂ en los tejidos al proteger la saturación arterial de O₂ y al mismo tiempo mantener el gradiente de presión para la difusión de O₂ desde la sangre capilar a las mitocondrias del tejido, por lo que los cambios relacionados con la altitud en la función de Hb probablemente tengan relevancia adaptativa (5,6). Los aumentos evolutivos en la afinidad de Hb-O₂ pueden ser causados por mutaciones de aminoácidos que aumentan la afinidad intrínseca de O₂ y/o mutaciones que suprimen la sensibilidad de Hb a los efectos inhibitorios de los efectores alostéricos como los iones Cl⁻ y los fosfatos orgánicos (5, 7). En un artículo muy influyente sobre los mecanismos biofísicos de la evolución de las proteínas, Perutz (7) predijo que los cambios adaptativos en las propiedades funcionales de la Hb de los vertebrados son típicamente atribuibles a "algunos reemplazos en posiciones clave". Según Perutz, las sustituciones de aminoácidos que pueden esperarse para hacer contribuciones especialmente importantes a los cambios evolutivos en la afinidad de Hb-O₂, se incluyen contactos de proteína hemo (que afectan la reactividad intrínseca del hemo), contactos entre subunidades (que afectan la transición alostérica ligada a la oxigenación en la estructura cuaternaria) y sitios de unión para efectores alostéricos (7). Si Perutz tiene razón en que las modificaciones adaptativas de la función de Hb son típicamente atribuibles a un pequeño número de sustituciones en posiciones clave, entonces se deduce que las mismas mutaciones se fijarán preferentemente en diferentes especies que han desarrollado Hbs independientemente con propiedades funcionales similares. Por ejemplo, en vertebrados de gran altitud que han desarrollado convergentemente afinidades

elevadas de Hb-O₂, la hipótesis de Perutz predice que las sustituciones paralelas de aminoácidos deberían ser generalizadas. La mayoría de las especies de aves expresan dos isoformas de Hb tetraméricas ($\alpha_2\beta_2$) en glóbulos rojos adultos: (i) las principales isoformas de hemoglobina A (HbA), que incorpora productos de la cadena α del gen α^A -globina, y (ii) la isoforma menor de HbD, que incorpora productos del gen α^D -globina estrechamente relacionado. Ambas isoformas comparten las mismas subunidades de cadena β . Al clonar y secuenciar los genes de globina expresados en adultos, identificamos todas las diferencias de aminoácidos que distinguen los Hbs de cada par de taxones de altura y baja altitud. Los datos de secuencia comparativa revelaron reemplazos replicados filogenéticamente en numerosos sitios en las globinas α^A , α^D y β^A (Fig. 1 y Figs. S1 y S2).

Después de identificar el conjunto completo de sustituciones de Hb que distinguen cada par de taxones de alta y baja altitud, evaluamos experimentalmente cuántos de los reemplazos de aminoácidos replicados contribuyeron realmente a cambios convergentes en la función de Hb. Para caracterizar los mecanismos funcionales que son responsables de los cambios en la afinidad de Hb-O₂, medimos P_{50} (la presión parcial de O₂ a la cual la Hb está saturada al 50%) de Hbs purificado en presencia y ausencia de iones Cl⁻ y de inositol de fosfato orgánico hexafosfato (IHP) (8). Nos centramos en las medidas de P_{50} en presencia de Cl⁻ y IHP, porque este tratamiento experimental es más relevante para las condiciones in vivo en los glóbulos rojos de las aves. La HbD exhibió afinidades de O₂ uniformemente más altas que la HbA en todos los taxones examinados (tabla S2), de acuerdo con los resultados de estudios previos (9-13). Este patrón constante de diferenciación de isoformas sugiere que la

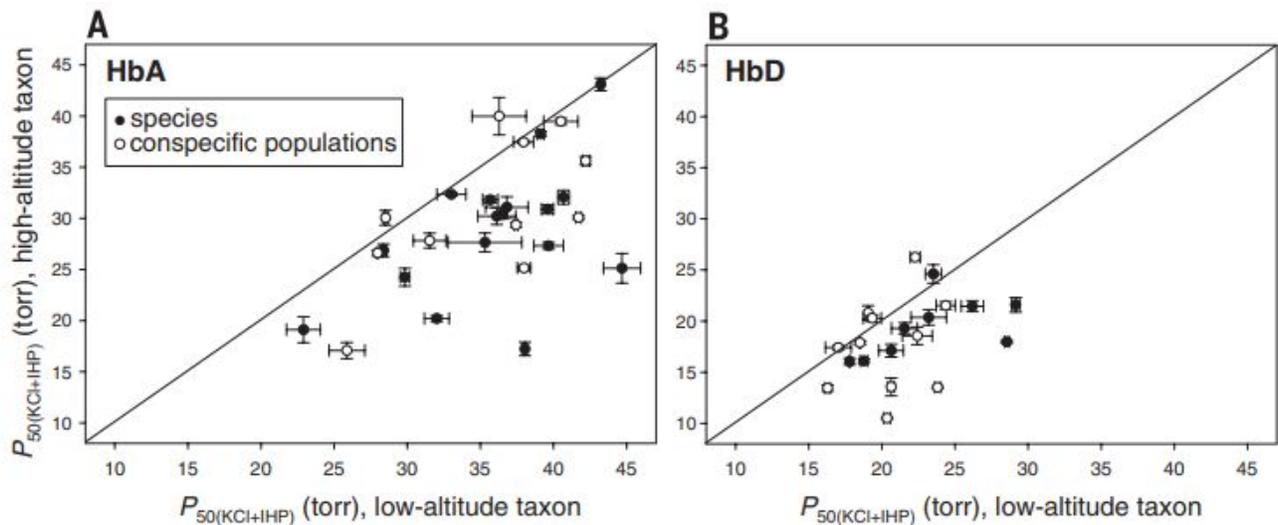


Fig. 2. Convergent increases in Hb-O₂ affinity in high-altitude Andean birds. (A) Plot of $P_{50(KCl+IHP)}$ (± 1 SE) for HbA in 28 matched pairs of high- and low-altitude taxa. Data points that fall below the diagonal line ($x = y$) denote cases in which the high-altitude member of a given taxon pair possesses a higher Hb-O₂ affinity (lower P_{50}). Comparisons involve replicated pairs of taxa, so all data points are phylogenetically independent. **(B)** Plot of $P_{50(KCl+IHP)}$ (± 1 SE) for the minor HbD isoform in a subset of the same taxon pairs in which both members of the pair express HbD. $P_{50(KCl+IHP)}$, O₂ partial pressure at which Hb is 50% saturated in the presence of chloride and inositol hexaphosphate.

regulación positiva de la expresión de HbD podría proporcionar un medio listo para aumentar la afinidad de O₂ en sangre. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que este mecanismo regulador no desempeña un papel general en la adaptación a la hipoxia, ya que no hubo una tendencia constante de aumento de la expresión de HbD entre taxones de gran altitud (prueba de Wilcoxon de rango con signo, $Z = -0.775$, $P = 0.441$, $n = 26$; tabla S3 y fig. S3).

Las comparaciones independientes filogenéticamente que involucran a los 28 pares de taxones revelaron que organismos que viven en tierras altas generalmente han desarrollado una mayor afinidad de Hb-O₂ en relación con la de sus contrapartes de las tierras bajas, un patrón que es consistente para ambos HbA (prueba de rango con signo de Wilcoxon, $Z = -4.236$, $P < 0.0001$, $n = 28$; Fig. 2A y tabla S2) y HbD ($Z = -2.875$, $P =$

0.0041 , $n = 20$; Fig. 2B y tabla S2). En todas las comparaciones por pares en las que los taxones de gran altitud exhibieron afinidades de Hb-O₂ significativamente más altas ($n = 22$ pares de taxones para HbA y 15 pares de taxones para HbD), las diferencias medidas se atribuyeron casi por completo a las diferencias en la afinidad intrínseca por O₂, en lugar de diferencias en la sensibilidad a Cl⁻ o IHP (tabla S4). Por lo tanto, los aumentos genéticos en la afinidad de Hb-O₂ generalmente no se asociaron con una disminución de la capacidad reguladora alostérica (es decir, la afinidad de O₂ aún podría ser modulada por cambios eritrocíticos en las concentraciones de aniones), en contraste con algunos mamíferos de gran altitud (5, 4, 15). Los resultados de los experimentos basados en variantes de Hb nativas y mutantes diseñados de Hb recombinantes revelaron que un solo subconjunto de reemplazos replicados en

realidad contribuyó a aumentos convergentes en la afinidad de Hb-O₂ en taxones de gran altitud (tabla S5). Estos incluyen reemplazos replicados en solo cuatro sitios de cadena b: N/G83S, A86S, D94E y A116S. β 116 es un contacto entre subunidades α 1 β 1, y β 94 juega un papel clave en la unión alostérica de protones; ninguno de los otros reemplazos replicados, y pocos de los reemplazos no replicados que aumentan la afinidad, involucraron contactos hemo, contactos entre subunidades o sitios de unión canónica para efectores alostéricos. Nuestro experimento

reveló un patrón sorprendente de convergencia en las propiedades de oxigenación de Hb en organismos de gran altitud (Fig. 2, A y B), y, en varios casos, los aumentos convergentes en la afinidad de Hb-O₂ fueron causados por sustituciones paralelas en residuos clave que median alosterio de proteínas (p. ej., D94E en las cadenas b de palomas terrestres de gran altitud y aves acuáticas; Fig. 1 y tabla S5). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los aumentos convergentes en la afinidad de Hb-O₂ fueron atribuibles a sustituciones no replicadas y/o sustituciones paralelas en sitios que no se consideran "residuos clave" (ej., N/G83S en las cadenas b de colibríes y otras aves de gran altitud; Fig.1).

Claramente, los incrementos evolutivos en la afinidad de Hb-O₂ pueden ser producidos por sustituciones de aminoácidos en numerosos sitios.

Estos hallazgos exponen una clara demarcación entre los reinos del azar y la necesidad en diferentes niveles jerárquicos. A nivel de fenotipo bioquímico, e incluso a nivel de mecanismo funcional, los cambios evolutivos son altamente predecibles. En el nivel de aminoácidos, en contraste, la previsibilidad se rompe.

Además del mapeo desde genotipo al fenotipo, la distribución filogenética de las sustituciones paralelas que aumentan la

afinidad sugiere otra posible explicación de la contribución limitada de tales sustituciones a los cambios funcionales convergentes en los Hbs de especies relacionadas de forma distante. El paralelismo funcional más llamativo a nivel de aminoácidos se concentró en el clado colibrí. Las sustituciones replicadas de G83S contribuyeron a aumentos convergentes en la afinidad de Hb-O₂ en múltiples especies de colibríes a gran altitud (tabla S5 y fig. S4) (16), y se produjo una sustitución convergente en el mismo sitio (N83S) en otras especies de altura (colibrí): el piquero de flores de garganta negra, *Diglossa brunneiventris*. Una posible explicación para este patrón de paralelismo filogenéticamente concentrado es que el efecto fenotípico de la mutación está condicionado al trasfondo genético, por lo que la misma mutación produce diferentes efectos en diferentes especies.

Para probar esta hipótesis, utilizamos la reconstrucción de una secuencia ancestral en combinación con mutagénesis dirigida al sitio para probar el efecto de las sustituciones de β ⁸³ en un conjunto de antecedentes genéticos distintos. Primero resucitamos la HbA del ancestro común de los colibríes ("Colibrí Anc") (figs. S5 a S7), y confirmamos que G83S tiene un efecto significativo de mejora de la afinidad en este antecedente genético ancestral (Fig. 3A). Este resultado es consistente con el efecto de mejora de la afinidad de G83S en numerosos linajes descendientes de colibríes de alta altitud (tabla S5 y fig. S4). De manera similar, resucitamos la HbA del ancestro común de los floristas de alta y baja altitud ("Anc flowerpiercer") para probar el efecto de N83S (fig. S7). Las Hbs de los dos flowerpiercers diferían en dos sitios debido a las sustituciones en el linaje de *D. brunneiventris* (V67A en α^A -globina, además de N83S en β^A -globina; Fig. 1). Por lo tanto, sintetizamos un

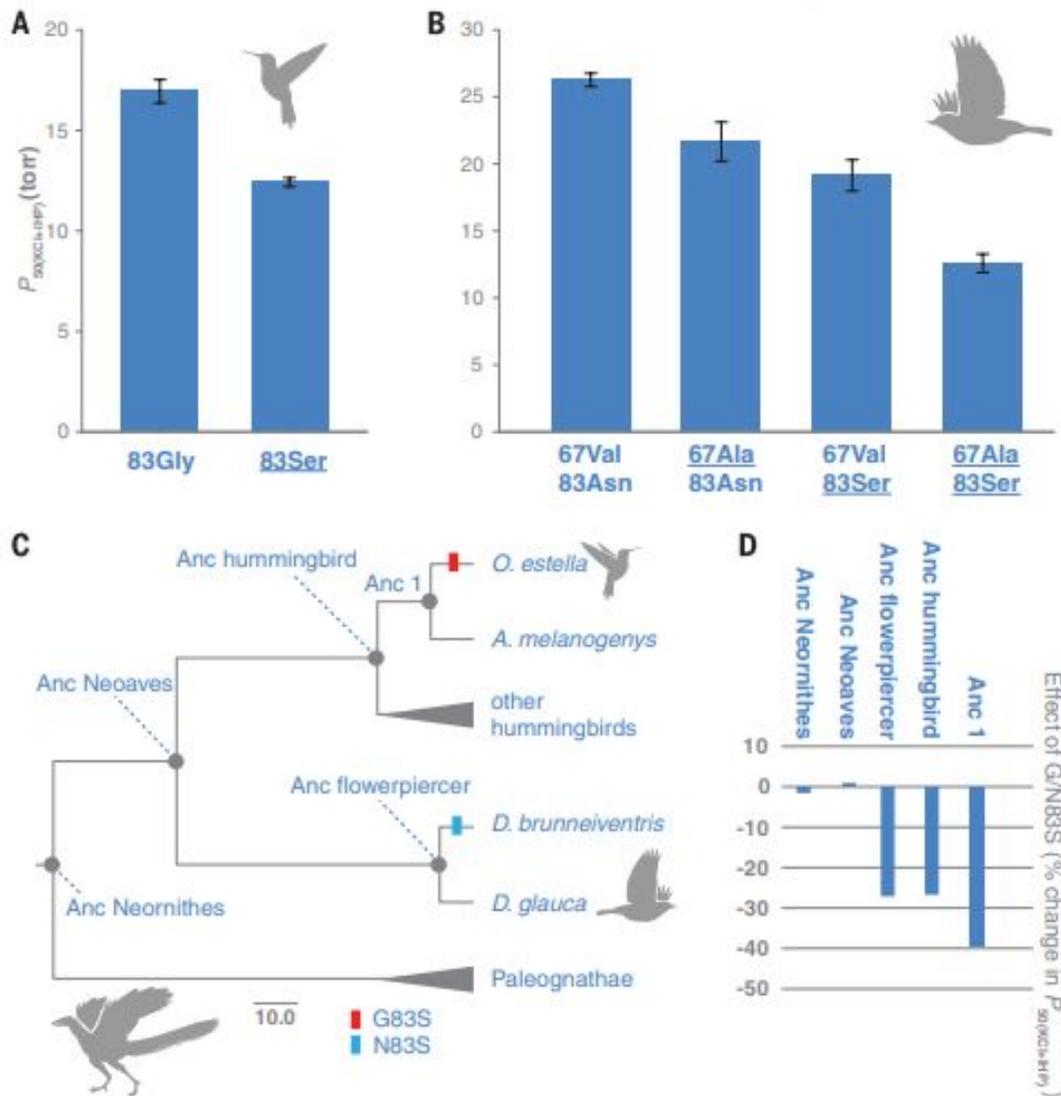


Fig. 3. Phenotypic effects of substitutions at $\beta 83$ are conditional on genetic background. (A) The engineered G83S mutation produced a significant reduction in $P_{50(KCI+IHP)}$ (increase in Hb- O_2 affinity) in the reconstructed Hb of the hummingbird ancestor. (B) The engineered A67V and N83S mutations produced additive reductions in $P_{50(KCI+IHP)}$ in the reconstructed Hb of the flowerpiercer ancestor. Underlining indicates derived (nonancestral) amino acids. (C) Diagrammatic tree with time-scaled branch lengths showing internal nodes that we targeted for ancestral protein resurrection. Scale bar, 10 million years. (D) N/G83S mutations produced significant increases in Hb- O_2 affinity (expressed as reductions in $P_{50(KCI+IHP)}$) in the ancestors of hummingbirds and flowerpiercers. Substitutions at the same site produced no detectable effects in Anc Neoaves or Anc Neornithes.

total de cuatro mutantes de Hb recombinante, que representan cada combinación genotípica posible de los dos sitios sustituidos, para medir las contribuciones relativas de V67A y N83S al aumento evolucionado de la afinidad de Hb- O_2 en D.

brunneiventris (tabla S2 y fig. S4). Las pruebas mostraron que ambas mutaciones aumentaron la afinidad de Hb- O_2 de forma aditiva (Fig. 3B). Luego diseñamos la misma mutación N83S en Hbs ancestrales resucitados que representan dos nodos

mucho más antiguos en la filogenia aviar: el ancestro común reconstruido de Neoaves ("Anc Neoaves") y el ancestro común de todas las aves existentes ("Anc Neornithes") (Fig. 3C e higos. S5, S7, S8 y S9). En contraste con los efectos altamente significativos de N/G83S en colibrí y flor de Hbs, N83S no produjo ningún efecto detectable en Anc Neoaves o Anc Neornithes (Fig. 3D y tabla S6). El colibrí ancestral y el picador de flores Hbs contenían 18 y 32 estados de aminoácidos, respectivamente, que no estaban presentes en Anc Neornithes (fig. S7), lo que representa diferencias de secuencia netas que se acumularon durante un período de tiempo de ~100 millones de años. Los efectos dependientes del contexto de N/G83S indican que las sustituciones específicas de linaje en la ascendencia de los colibríes y los cazadores de flores produjeron un fondo genético en el que las mutaciones en β^{83} podrían contribuir a un aumento adaptativo de la afinidad de Hb-O₂. Aparentemente, esta solución adaptativa no era una opción en la ascendencia más profunda de las aves y también puede representar una posibilidad excluida en los miembros contemporáneos de alta altitud de otros linajes aviares. Estos hallazgos revelan un papel potencialmente importante de contingencia en la evolución de la proteína adaptativa. En diferentes especies que se están adaptando a la misma presión de selección, el conjunto de aminoácidos posibles en un sitio dado que tienen efectos beneficiosos incondicionales puede depender del conjunto de sustituciones antecedentes que se han acumulado independientemente en la historia de cada linaje. En consecuencia, las posibles opciones para el cambio adaptativo en una especie pueden ser opciones excluidas en otras especies.