



klíčového histonu H1. Nepotřebují vyštípnutí intronů, protože téměř žádné nemají, ani náročné posttranslační úpravy, neboť postrádají Golgiho aparát. Zvyšují svou produkční efektivitu také tím, že mají dvě jádra a genová exprese může běžet současně z obou – trofozoiti mají dvě jádra, cysty a excyzoiti dokonce čtyři. Genetickou informací si rozdělí mezi dvě dceřiné buňky za méně než pět minut, nezdržují se přílišnou kontrolou přesnosti práce dělicího aparátu nebo toho, že se při dělení občas nějaká chyba vyskytne, scházejí jim některá kontrolní stanoviště buněčného cyklu. Minimální je i dělicí aparát – ke každé z chromatid se napojuje pouze jediný mikrotubul, a to na kinetochor, který funguje i bez jinak klíčových proteinů pro běžné eukaryotické buňky. S imunitní obranou hostitele si lamblie příliš hlavu lámat nemusejí, dokážou ji zmást novými krecemi povrchových molekul; obměňující se vsp molekuly (variable surface proteins) navádějí protilátkovou odpověď na nové a nové cíle. Také nějaké zjevné sexuální chování není nic, čím by si buňky musely komplikovat život, i když příležitost srovnat si navzájem rozrůznující se jádra, nebo naopak poslat novou genetickou informaci do druhého jádra si lamblie užívají v cystách. Tam je čas a dostatečně těsnou takovou „autoerotiku“ neboli selfing. Cysta totiž vzniká pouze z jedné buňky a její jádra se v ní ochotně propojují malými kanálky. Když se lamblie rozhodne, že je třeba se ze střeva vydat za novým hostitelem, dokáže svůj metabolismus přeměrovat z běžného štěpení glukózy na syntézu cukru N-acetylgalaktosaminu pro stavbu cystové stěny a výpadek energie si kompenzuje trávením argininu. Tím, že o něj připraví hostitelské buňky, současně snižuje jejich produkci oxidu dusnatého coby součásti vrozené imunitní odpovědi. Všechna tato chytrá řešení a funkční zlepšení, jejichž výčet zde zdaleka není konečný, ukazují na úžasnou adaptabilitu parazita, který je ukázkou efektivní, byť minimalistické životní strategie.

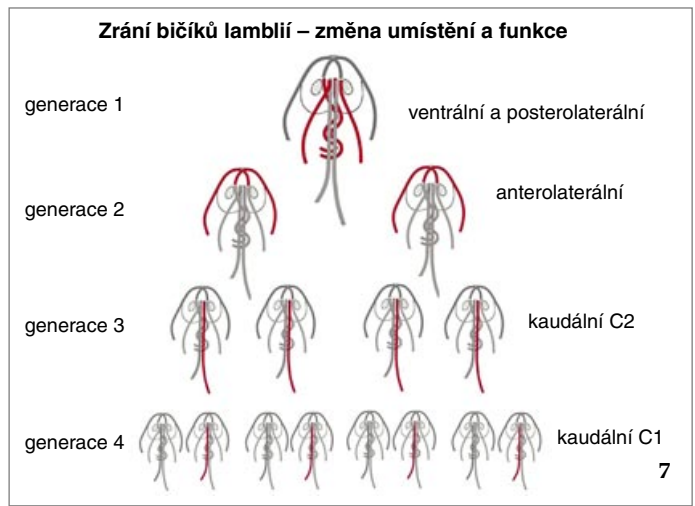
Kolik jader je potřeba?

Přítomnost dvou jader v jedné buňce, charakteristická pro řád diplomonád (Metamonada, Diplomonadida), kam lamblie patří, je jednou z pozoruhodností, která k této buňce přitahuje zájem vědků. Na první pohled nadbytečná věc: replikovat obsah dvou jader a zajišťovat jejich

6 Nativní preparát ze stolice pacienta s lambliózou – cysty (bílá šipka) a trofozoit (černá šipka). Zvětšeno 400×. Foto A. Perglerová

7 Jak funguje flagelární cyklus lamblí? Trofozoit nese 8 bičíků rozrůzněných na čtyři funkčně a strukturně odlišné páry – ventrální (V), posterolaterální (PL), anterolaterální (AL) a kaudální (C). Z nejmladších bičíků (V a PL) se v tomto přesně řízeném procesu stanou v další generaci bičíky AL. Těm je o generaci dál svěřena pozice juniorní (C2) a ve čtvrté generaci seniorní C pozice (C1). Rozchod bičíků do dceřiných buněk a tvorba nových bičíků probíhá semikonzervativním způsobem, kdy se v každé sadě bičíků – karyomastigontu – objeví dva mateřské a dorostou dva dceřiné bičíky. A to tak, že ten potom obsahuje vždy po jednom z bičíků z každé funkčně odlišné sady. Trofozoit v každém okamžiku obsahuje bičíky čtyř generací. Bičík C1, který je nejstarší, je pouze jeden a má v buňce přesně definované umístění – v levém karyomastigontu při dorzálním pohledu. Od něj je polymerován přísavný disk, kterým se trofozoit přichytí (adheruje) k mikrokvlkům enterocytů tenkého střeva. Podle: E. Nohýnková a kol. (2006)

integritu, když jiným buňkám stačí jádro jedno. Skutečně dvoujaderných organismů, které nemají v životním cyklu jednojaderné stadium, v přírodě mnoho není. Nese to s sebou vůbec nějakou výhodu? Jak již bylo zmíněno, genová exprese může běžet z obou jader současně. Zvýšení jaderného povrchu zrychluje nukleocytoplazmatický transport – náklad genových transkriptů směrem ven a proteiny, např. polymerázy, histony a transkripční faktory, směrem dovnitř. Jádra lamblí jsou rušnými křížovatkami, kde se toho v krátké době může hodně odehrát. Aby se jaderní aktéři nerozprchlí ani během dělení, jaderná membrána lamblí se v žádný jeho moment nerozpadá. Kontrolu nad jádry buňka drží i tak, že jsou definovaným způsobem ukotvena, každé k jedné sadě bičíků – tzv. karyomastigont. Ten má klíčovou roli při jejich dělení a každá polovina buňky (monáda) si své jádro rozdělí sama. Diplomonáda tedy pravděpodobně vznikla spojením dvou nebo nedostatečným rozdělením jedné monády – enteromonády. Ale vyloučit se nezdá ani možnost, že enteromonády vznikly až roz-



dělením diplomonád. Čeští vědci ukázali (Kolísko a kol. 2008), že tento proces mohl v evoluci proběhnout dokonce vícekrát, a to oběma směry. Jak tedy dvoujadernost diplomonád vznikla, zatím není zcela jasná.

Jádra lamblí, přestože morfologicky identická, vykazují strukturní odlišnosti. Jiný počet jaderných pórů, rychlost replikace i mitózy, a především jinou genetickou strukturu. Naše výzkumná skupina objevila, že jádra se liší, ať již v zastoupení některých genů, nebo celých chromozomů. Aneuploidie, která vychází ze základního stavu tetraploidie (čtyř sad chromozomů) v buňce, ale znamená přítomnost jiného počtu chromozomů než přesně čtyřnásobné sady, je tolerovaným jevem, který lamblími nevádí, a naopak jim rozšiřuje hrací pole pro vznik sekvenční diversity a genetických polymorfismů. Ty mohou přijít vhod v reakci na měnící se vnější podmínky, včetně účinků léčiv. Plasticita genomu sice komplikuje genetické manipulace s lamblími, dává jim ale do vínku dost záložních kopií pro vlastní genetické hrátky. Ukazuje se, že i v tom se značně liší různé skupiny lamblí – např. asambláž A je v nich mnohem umírněnější než asambláž B, vyznačující se velkou genetickou diverzitou.

Bičíky: řád a hierarchie

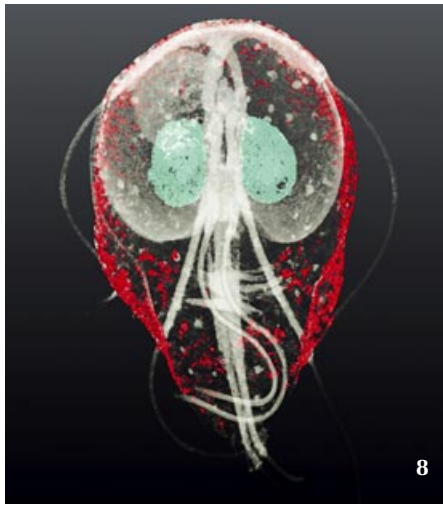
Pro mnoho buněčných procesů našly lamblie funkčně minimální eukaryotickou sestavu a způsob, jak věci zbytečně nekomplikovat. Přesto je zde oblast, která je na první pohled složitější, než se zdá být potřeba. Přicházíme opět na českou stopu, která složitost mikrotubulárního cytoskeletu pomohla pochopit. Popsali jsme systém zrání bičíků – flagelární cyklus. Přestože se pro tento fenomén, zjištěný původně u bičíkatých řas, používá termín cyklus, jde spíše o lineární hierarchický postup. S trochou nadsázky ho lze přirovnat ke kariévnímu růstu ve firmě. Čím výše v hierarchii postupujete, tím specifičtější úlohy dostáváte a je vás méně. Šéf je služebně nejstarší, a přestože si již vychovává nástupce, leží na něm nejdůležitější odpovědnost, v případě nejstaršího bičíku lamblí za hlavní morfologické rysy buňky. Zatímco ve firmě se do nejvyššího vedení propačujete obvykle za mnoho let, bičíky lamblí dozrají již za dva dny. Potřebují k tomu tři následující buněčné cykly, z nichž každý trvá zhruba 6 hodin. Bičíky si vyzkoušejí postupně všechny pozice a funkce (obr. 7).

Začátečníci se věnují především pohybu a tvorbě podtlaku pro přísátí – bičíky ventrální (V) a posterolaterální (PL). O generaci starším anterolaterálním (AL) bičíkům je svěřen kontakt s jádry, vyztužení anteriorní části buňky a kormidlování otáčení buňky kolem podélné osy. Další, juniorní C2 pozice pak již spolu se seniorem tvoří hlavní osu celé buňky a kontroluje ohýbání konce buňky. Také si spolu se seniorem střeží pomocí speciální fibrily mitozomy a jejich koordinovaný rozchod do dceřiných buněk. Vlastní C1 senior zaujal konečnou a nejdůležitější pozici v buňce, která mu umožňuje určit její ventrodorzální orientaci a zajistit schopnost adheze. Od bazálního tělíska C1 bičíku je polymerována zhruba stovka spirálně stočených a navzájem pospojovaných mikrotubulů, na které kolmo nasedají kontraktální raménka tvořená unikátní bílkovinou s názvem giardin. Tvoří tak základ mohutné organely – přísavného disku, který je pro lamblie v rámci diplomonád typický a důležitý díky možnosti odolat střevní peristaltice pevným přísátím na mikrokilky enterocytů. Pomocí experimentů s inhibítorem polymerace mikrotubulů jsme ukázali, že důležitým signálem pro buněčné dělení lamblíí je právě rozchod mateřských bičíků do dceřiných buněk, a nikoli rozdělení jejich jader. Vzniknout proto mohou buňky, které sice mají správně uspořádaný bičíkový aparát, nicméně pouze jedno nebo žádné jádro, což samozřejmě (de)terminuje jejich osud.

Lamblie jako výzkumná výzva

Od 70. let minulého století, kdy se podařila první axenická kultivace (bez jiných mikroorganismů), se lamblie staly v různých časových obdobích různě populárním modelovým organismem. Největší slávy dosáhly zřejmě v 90. letech, když byly mylně umístěné na bázi fylogenetického stromu eukaryot mezi evolučně nejstarší eukaryotické buňky, které ještě nemají mitochondrie. Mezitím se fylogenetické pohledy proměnily k současnosti, kdy jsou „primitivní“ vlastnosti lamblíí přisuzovány sekundárním ztrátám a adaptací na parazitický způsob života, a nikoli ranému evolučnímu odstěpení. Přesto zůstává v mnoha ohledech fascinující, kolik funkčních redukcí tato eukaryotická buňka ustojí. Dobře je to vidět na příkladu mitozomů, jejichž výzkum je v rukou dalších českých skupin. Mitozomy lamblíí jsou nejredukovanější mitochondrie, které byly dosud u eukaryot nalezeny. Asi 40 malých mitozomů v buňce lamblíí ztratilo vlastní DNA, komponenty elektron-transportního řetězce a schopnost vyrábět ATP. Je zajímavé sledovat, jakou službu nadále pro buňku vykonávají (tedy syntézu Fe-S center), a proto si je buňka drží a jejich rozchod do dceřiných buněk přísně kontroluje.

Lamblie je podobně jako jiné polyploidní organismy velkou výzvou i pro genetiky. Genové manipulace je potřeba provést rovnou na čtyřech chromozomech rozložených mezi dvě jádra. Přesto se první úspěšné knock-out a knock-down přístupy objevují (CRISPR/Cas9, CRISPRi, morfolina), i když k rutinnímu použití je zatím daleko. Single-cell přístupy v genomice a transkriptomice ukazují, že se různé alely nevyskytují pouze na úrovni populace, ale že i trofozoit



8 Rekonstrukce (3D) buňky trofozoita lamblie střevní. Buňka byla připravena metodou expanzní mikroskopie – fixována formaldehydem, zalita do akrylamidového gelu, čtyřnásobně expandována, struktury značeny amino-reaktivním esterem. Pozorována konfokálním mikroskopem s objektivem 63x. Optické řezy složeny a segmentace organel provedena v programu Amira. Jádra modře, periferní vakuoly červeně. Foto P. Tůmová a J. Soukup

nebo cysta může nést až čtyři různé alely genů. Genetická variabilita lamblíí je v posledních letech hojně využívána k detekci zoonotického přenosu, identifikaci zdrojů infekce v ohniscích nákazy (outbreaky) a obecně k molekulárně-epidemiologickým studiím. Důležitou otázkou je také, zda jsou genetické polymorfismy zdrojem rezistence k léčivům, především k metronidazolu a albendazolu, či zda by je šlo alespoň použít jako marker rezistence pro včasnou diagnostiku a volbu optimální léčebné strategie. I k tomu chtějí aktuálně čeští vědci přispět a zkombinovat dlouholeté „lambliové know-how“ s použitím nejnovějších metod, včetně sekvenování nové generace a genových manipulací. Problémů se selháním léčby lambliózy celosvětově spíše přibývá a i u nás každý čtvrtý pacient trpí tím, že mu léčba metronidazolem nezabírá.

Českou stopou k lepšímu poznání

I když to byl pro Viléma Lambla v podstatě okrajový objev, který zabral v jeho státi několik řádků a pravděpodobně za jeho života větší ohlasy nevyvolal, považují někteří čeští parazitologové lamblii tak nějak za „naši“. V tomto soupeří s jiným parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii*, kterého poprvé u člověka popsal český oční lékař Josef Janků z Nemocnice na Královských Vinohradech v r. 1923 (podrobněji v Živě 2023, 6: 274–278 a CLXXXII–CLXXXIV). Lamblie, graficky znázorněná mikrobiologem Jiřím Ludvíkem z Československé akademie věd, se stala logem vůbec prvního mezinárodního protozoologického kongresu (The First International Congress on Protozoology), který se konal v r. 1961 v Praze, i dalších ICOP kongresů.

Dlouholetá práce a erudice J. Kuldy a E. Nohýnkové na Univerzitě Karlově vedla kromě dalších objevů (mimo jiné izolace lamblíí asambláže E, které byly

použity pro genomový projekt) k napsání klíčových přehledových kapitol v prestižních edicích Parasitic Protozoa (Kreier, ed.) v letech 1978 a 1995, odkud lambliová komunita dosud čerpá cenné informace. Výzkumné portfolio E. Nohýnkové, nejprve ve spolupráci s Luborem Červou, potom v samostatné skupině na 1. lékařské fakultě UK, je z našich vědců zabývajících se lamblie mi největší a obsahuje studie týkající se cytoskeletu, buněčného cyklu a dělení, encystace a rezistence lamblíí. Podobně žáci J. Kuldy, Jan Tachezy a Pavel Doležal z Přírodovědecké fakulty UK a centra Biocev, mají v mezinárodní komunitě velké renomé díky výzkumu mitozomů a vývoji nových metod pro studium molekulární a buněčné biologie lamblíí. Českou stopou je i vůbec první zdokumentovaný přímý zoonotický přenos lamblíí na člověka, konkrétně od doma chované činčily na malé batole, který jsme popsali v naší laboratoři (naše publikace najdete na webové stránce GiardiaLab.lf1.cuni.cz). A přestože lamblíí v českých luzích a hájích evidentně ubývá a trochu škodolibě se v laboratoři radujeme z každého pozitivního vzorku, bude jistě díky dlouholeté tradici a výborné kvalitě oboru parazitologie v České republice českých stop v jejich výzkumu nadále přibývat.

Podpořeno grantem Agentury pro zdravotnický výzkum (NU23-05-00441).

Seznam použité literatury uvádíme na webové stránce Živý.

Slovník pojmů

CRISPRi – CRISPR interference. Technika genového inženýrství využívající systém CRISPR-Cas k selektivnímu potlačení genové exprese. Provádí se pomocí modifikované verze enzymu Cas9, která postrádá endonukleázovou aktivitu potřebnou pro štěpení DNA a blokuje transkripci určitého genu vazbou na jeho promotorovou oblast. Tento mechanismus umožňuje řídit úroveň exprese genu, aniž by se trvale změnila základní sekvence DNA (blíže také Živa 2017, 2: 70–72 a XLVII–XLIX).

Fe-S centra – struktury z atomů železa a síry. Vyskytují se v proteinech a enzymech účastnících se různých biologických procesů, jako je dýchání, fotosyntéza, syntéza DNA a fixace dusíku. V klastrech spolu interagují, usnadňují přenos elektronů a slouží jako aktivní místa pro redoxní reakce.

Morfolina – syntetické antisense oligonukleotidy navržené tak, aby se vážaly a blokovaly iniciační komplex translace sekvencí messengerové RNA (mRNA). Technologie slouží k testování úlohy specifických genů přechodným blokováním (knock-down).

Single-cell přístupy (jednobuněčná analýza) – studium genomiky, transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky na úrovni jedné buňky. Lze tak odhalit mechanismy, které se při studiu celé populace buněk neprojeví, vznik nové heterogenity a mutací.

Substrátová a oxidativní fosforylace – dva různé mechanismy, kterými se v buňkách syntetizuje adenosintrifosfát (ATP). Substrátová fosforylace zahrnuje přímý přenos fosfátové skupiny na adenosindifosfát (ADP), zatímco oxidativní fosforylace tvorbu ATP pomocí elektronového transportního řetězce a protonového gradientu.