

Jak parazitičtí prvoci přepisují učebnice molekulární biologie I.

Trypanosomatida jako vlajková loď

Trypanozoma spavičná je doslova prototypem parazita. Drobní bičíkovci, jen o málo větší než červené krvinky, proniknou při sání krve z mouchy tse-tse do člověka, uniknou imunitní odpovědi, následně zaplaví krevní oběh a nakonec proniknou i do mozku. Výsledkem je spavá nemoc, která je bez léčby téměř vždy smrtelná. Výzkum těchto parazitů však nakonec vedl k vývoji účinných léků a kombinace terapie nakažených osob a sofistikovaného boje s mouchami tse-tse přivedla spavou nemoc na hranici vymýcení, a tak v posledních letech klesl počet hlášených případů na pouhé stovky ročně. U nemoci, která byla před desetiletími schopná vyhladit celé oblasti subsaharské Afriky, jde o obrovský úspěch vědy a medicíny.

Jak už to ale bývá, podobný úspěch se zatím nedaří zopakovat u dalších, blízkých příbuzných parazitických bičíkovců, kteří vyvolávají u lidí v Jižní Americe Chagasovu chorobu, základnou svým pomalým a nenápadným průběhem, komplikujícím včasnou diagnózu a léčbu. Podobně nepříznivá situace panuje u leishmaniózy – skupiny nemocí vyskytujících se v tropech a subtropích, včetně jižní Evropy. Zatímco některé druhy leishmanií (rod *Leishmania*) způsobují „pouze“ nepříjemné kožní vředy, jiné mohou vést až k smrtelnému orgánovému selhání. Bohužel proti žádné z těchto nemocí dosud neexistuje cílená a dostatečně bezpečná léčba, a ačkoli jsou jejich původci předmětem intenzivního studia, onemocnění působených těmito prvoky neubývá.

Výzkum uvedených parazitických prvoků je dlouhodobě motivován především snahou vyvinout účinné léčebné metody. V této oblasti již po desetiletí vynikají bývalé koloniální mocnosti, jako jsou Velká Británie, Francie, Belgie a Nizozemsko. Přestože hlavním cílem výzkumu je boj proti parazitárním onemocněním, vedlo studium trypanozom i k zásadním objevům s širokým dopadem na buněčnou a molekulární biologii. Jaké jsou tyto revoluční objevy a jak jsme k nim došli?

Již před více než 100 lety si angličtí lékaři působící v subsaharské Africe všimli zvláštního jevu: počet trypanozom v krvi pacientů se spavou nemocí výrazně kolísal v pravidelných vlnách. Byly to ale až metody molekulární biologie, které pomohly záhadně a pravidelně zesilování a zeslabování infekce rozluštit. Ukázalo se, že i když náš imunitní systém dokáže parazity velmi účinně ničit, trypanozomy mají jedinečnou schopnost dlouhodobě unikat totální likvidaci. Jak to dělají? Díky obměnám svého vysoce imunogenního glykoproteinového povrchového pláště, který se vždy po několika generacích kompletně vymění,

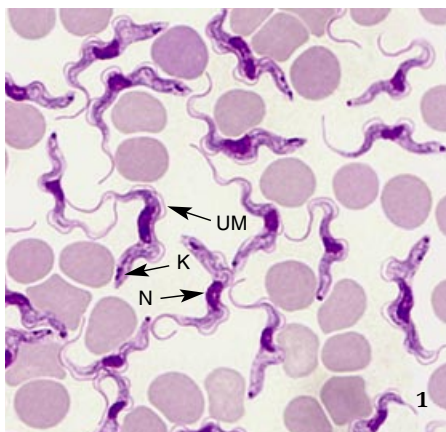
dokážou na určitou dobu uniknout pozornosti imunitního systému, což vede k jejich prudkému namnožení v krvi hostitele. Exponenciální růst je však jen dočasný. Jakmile se imunitní systém přenastaví a začne útočit na „převlečené“ trypanozomy, naprostá většina z nich je usmrcena. V tu chvíli už ale malá subpopulace parazitů s opět pozměněným povrchem čeká na svou příležitost. Tímto způsobem mohou trypanozomy stále dokola unikat imunitnímu systému, a protože parazit kóduje ve svém genomu více než tisíc genů pro různé varianty povrchového proteinu, má k dispozici prakticky nevyčerpatelnou zásobu „převleků“. Popsaný nekonečný boj nakonec může vést k vyčerpání a smrti hostitele.

Teprve později bylo zjištěno, že podobné změny povrchového pláště jsou poměrně běžným způsobem, jak paraziti obcházejí imunitní systém hostitele. Trik nevyužívají jen paraziti v užším slova smyslu, ale také další patogenní organismy jako houby, bakterie a viry. U trypanozomy spavičné (*Trypanosoma brucei*, obr. 1) je však schopnost „převlékání“ tak výrazně vyvinutá, že nám právě u ní tento fenomén poprvé padl do oka. Podobně je to i s řadou jiných specifických molekulárních znaků, které byly poprvé objeveny právě u trypanosomatid (čeleď Trypanosomatidae) a až později se ukázalo, že jde o mnohem univerzálnější jevy, prostupující celou biologii.

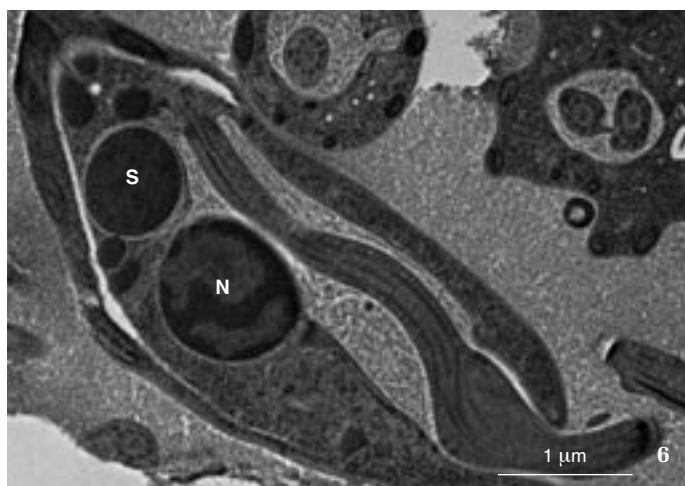
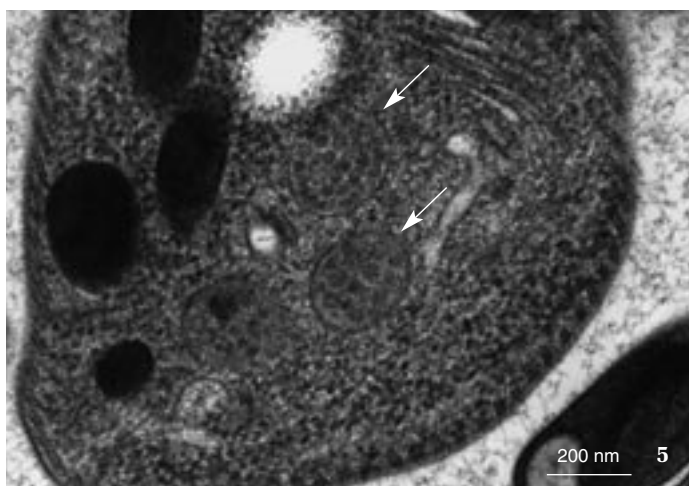
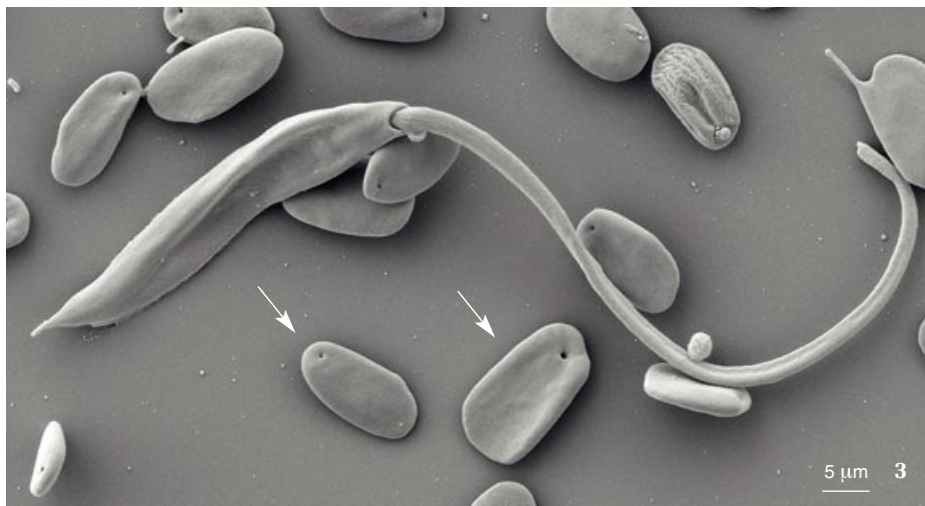
Trypanozomy mají i řadu dalších zvláštností (více v Živě 2003, 3: 101–102), které mimo jiné naznačují, že se během posledních několika set milionů let příliš nezměnily. Unikátní je např. přítomnost kinetoplastu – struktury představované velkým množstvím DNA v jediné, zato rozsáhlé mitochondrii. Tato DNA je dobře barvitelná, což umožňuje její snadné pozorování i pomocí světelného mikroskopu. Kinetoplast se nachází v blízkosti bazálního tělíska bičíku a dostal jméno podle slova kinesis, což odkazuje na pohyb, ale ve skutečnosti s pohybem nesouvisí (obr. 8). Kinetoplastová DNA je tvořena kruhovými molekulami – velkými makrokroužky, obsahujícími klasickou mitochondriální DNA, a obrovským množstvím minikroužků, které nesou geny pro guide (vedoucí) RNA (obr. 9). Ty hrají klíčovou roli v procesu editování RNA.

Právě tento složitý proces (blíže v Živě 2010, 6: 249–253) je jednou z největších podivností, která byla, tak jako mnoho dalších, poprvé popsána právě u trypanozom. Editování (úprava) RNA spočívá ve vkládání a vyjímání uridinů (U) do mediátorové RNA (mRNA). Uridin je jednou ze čtyř bází RNA – U (uridin), C (cytozin), A (adenin) a G (guanin); v DNA je místo U přítomen thymin (T). Tímto způsobem se mění původní informace, která byla přepsaná z DNA. Později se ukázalo, že k posttranskripční úpravě RNA dochází u mnoha dalších organismů, včetně člověka.

Právě v editování RNA a v dalších podobných procesech spočívá zásadní přínos trypanozom pro molekulární a buněčnou biologii. Jednou z hlavních výhod je jejich schopnost snadného množení v laboratorních podmínkách a genetická manipulovatelnost. Do genomu trypanozom můžeme vkládat nebo z něj odstraňovat úseky DNA, což je klíčové pro postupné rozluštění komplexního fungování eukaryotické buňky.



1 Trypanozoma spavičná (*Trypanosoma brucei*) je v oblastech subsaharské Afriky původcem onemocnění u člověka (chronická a akutní spavá nemoc) i domácích zvířat (Nagana). Přenašečem jsou mouchy tse-tse (*Glossina* spp.), které se zde vyskytují v tzv. glosinovém pásmu. Šipky označují jádro (N), kinetoplast (K) a undulující membránu (UM).
2 Přenašeči trypanozomy *T. cruzi*, která způsobuje Chagasovu chorobu u lidí v Latinské Americe, jsou zákeřnicovitě ploštic z podčeledi Triatominae, anglicky poeticky zvané kissing bugs. Foto D. Modrý



Většina molekulárněbiologického výzkumu se dosud soustředila na modelové organismy. Díky koncentrovanému úsilí byly pro každý z vybraných organismů vytvořeny podrobné a rozsáhlé protokoly. Vědci přečetli jejich DNA i RNA, identifikovali všechny bílkoviny, rozkládali metabolismus, chování, rozmnožování a další vlastnosti. Mezi tyto modelové organismy patří bakterie *Escherichia coli*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, hádátka *Caenorhabditis elegans*, rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), octomilka *Drosophila melanogaster*, ryba dánío pruhované (*Danio rerio*), myš domácí (*Mus musculus*) a samozřejmě i člověk. Jednobuněčná eukaryota zastupuje právě trypanozoma spavičná, která patří k nejlépe prostudovaným prvkům vůbec a stala se klíčovým modelem výzkumu jednobuněčných organismů.

Od modelu k modelu

V posledních letech jsme však svědky snah uvedený dlouholetý trend změnit, což bylo do jisté míry přijato i Evropskou organizací pro molekulární biologii (EMBO), která dosud představovala jakousi pevnost modelových organismů. Stále více molekulárních biologů se totiž snaží neomezovat výzkum jen na výše jmenované tradiční modelové organismy, jež navíc často nejsou nejtýpějšími ani nejhodnějšími zástupci své skupiny. Klasickým příkladem je octomilka, která se v mnoha ohledech výrazně liší od ostatního hmyzu. Zásluhou systematické biologie a morfologických oborů je dnes většinou lidí – snad jen s výjimkou některých laboratorních „geeků“ a lidí bez vztahu

k přírodě – zřejmá neuvěřitelná rozmanitost života na Zemi. Environmentální sekvenování mořských organismů např. odhalilo existenci desítek milionů dosud neznámých genů. Ještě dlouho bude platit, že u většiny těchto genů neznáme ani jejich funkci, ani organismy, z nichž pocházejí.

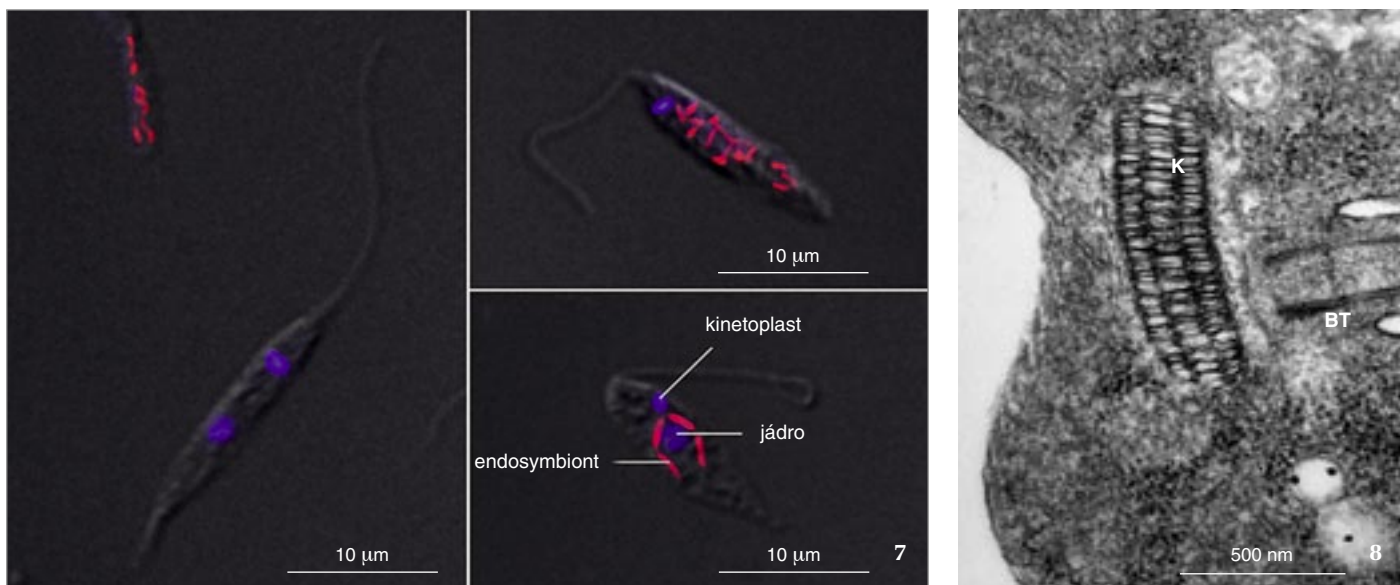
Před námi tudíž stojí nový důležitý úkol: rozšířit molekulárněbiologický výzkum, zejména funkční studie, i mimo tradiční modelové organismy. U parazitických bičkovců to znamená zaměřit se nejen na nslavně proslulé rody *Trypanosoma* a *Leishmania*, jejichž zástupci způsobují závažná onemocnění u lidí a zvířat, ale také na jejich méně známé a ekonomicky i zdravotně bezvýznamné příbuzné, kteří nikomu a ničemu neškodí – často ani svým hostitelům. Jde hlavně o jednohostitelská trypanosomatida, parazitující ve stěvě ploštic, much a dalšího hmyzu. Až donedávna se o tyto organismy zajímal jen malý počet vědců, spočítatelných na prstech obou rukou. To se však v poslední době změnilo, a to z několika důvodů. Především se ukázalo, že trypanozomy a leishmanie byly původně parazity hmyzu, kteří „přeskočili“ ze svých šestinohých hostitelů na obratlovce víceméně náhodně při sání krve.

Podle dat z molekulární fylogeneze se odhaduje, že trypanosomatida existují na Zemi již minimálně půl miliardy let. Tento údaj však pravděpodobně navždy zůstane spekulativní. Jistá je skutečnost, že fosilizovaná trypanosomatida nalezená v komárech, kteří se živili krví dinosaurů a byli polapeni do jantaru před více než 100 miliony let, jsou morfologicky nerozlišitelná od současných

zástupců. Dnešní druhy jsou tedy fascinujícím modelem pro studium mechanismů, které těmto nenápadným prvkům umožňují nejen přežít masivní útok imunitního systému člověka nebo jiného savce, ale také se v něm úspěšně množit a zajistit svůj přenos na dalšího hostitele (obr. 3–5).

Některá jednohostitelská trypanosomatida pocházející z ploštic či much pak upoutala vědce díky přítomnosti relativně velké endosymbiotické bakterie (obr. 6 a 7). Pokud bychom převedli měřítko mikroskopického světa do toho našeho, bylo by jejich soužití srovnatelné se situací, kdybychom v těle trvale nosili tlustý půlmetrový válec. Vzhledem k tomu, že vzájemné soužití trvá již miliony let a trypanosomatida se dělí několikrát denně, vytvořila si s „domácí“ bakterií velmi úzký, až intimní vztah. Bičkovec vždy hostí jednu bakterii, která se rozdělí těsně před dělením hostitelské buňky, aby se zajistilo, že každá dceřiná buňka získá právě jednu bakterii. V rámci partnerství se dokonce vyvinuly specifické bílkoviny, které přesně kontrolují umístění bakterie v buňce a zřejmě skrývají i mnohá další tajemství. Endosymbiotické vztahy mezi eukaryotickými hostiteli a bakteriemi, jako je tomu např. u mitochondrií, mají zcela zásadní význam pro vývoj života na Zemi. Popsaný druh soužití přitahuje pozornost vědců (viz Živa 2018, 1: XIX–XXIII; Vesmír 2023, 6: 307) a lze očekávat, že i trypanosomatida a jejich bakterie se v budoucnu stanou předmětem intenzivního zkoumání.

Zatím nejzajímavějším parazitickým bičkovcem u hmyzu je rod *Blastocrithidia* (obr. 10). Ačkoli se pod mikroskopem nijak



3 a 4 Nedávno popsany obskurní jednohostitelský trypanosomatid *Obduromonas oborniki* je schopen vytvářet odolná cystická stadia (šipky). Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM, obr. 3, foto M. Tesařová) a preparát barvený Giemsou (4)

5 Dvě dobře viditelná uskupení virových partikulí (označeno šipkami) v cytoplasmě buněk jednohostitelského trypanosomatida rodu *Blechnomonas*, pocházejícího, jak název naznačuje, z blech.

6 Symbiotická bakterie *Candidatus Kinetoplastibacterium sorsogonicus* (S), přítomná v jediném exempláři v cytoplasmě poblíž jádra (N) jednohostitelského trypanosomatida *Kentomonas sorsogonicus*. Transmisní elektronová mikroskopie

7 Vznik endosymbiotického vztahu v přímém přenosu. Neustálený počet bakterií *Candidatus Pandoraea novymonadis* v cytoplasmě nedávno popsaného rodu jednohostitelského trypanosomatida *Novymonas esmeraldas*. Foto D. Tashyreva

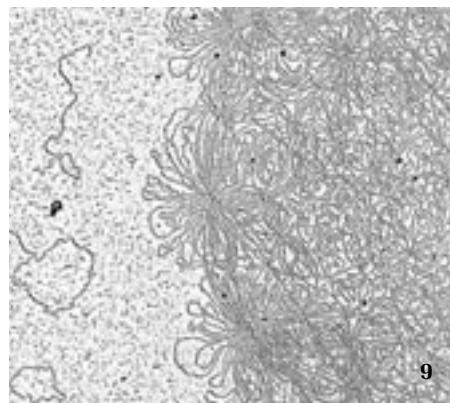
8 Trypanosomatida a další zástupci kinetoplastid mají v buňkách nápadnou a dobře barvitelnou strukturu zvanou kinetoplast (K), která byla mylně spojována s pohybem kvůli její vazbě na bazální tělísko (BT), kinetozom. Jde o zmnoženou mitochondriální DNA, která mimo jiné umožňuje editování RNA (blíže v textu).

9 Rozvolněná, avšak vzájemně propletená síť makro- a mikroučků tvořící kinetoplast. Foto O. Benada

10 Obyčejná buňka s neobyčejnými vlastnostmi – *Blastocrithidia nonstop*, na kterou se zaměříme v druhém dílu tohoto seriálu. Snímky: autoři článku, není-li uvedeno jinak

zvláště neliší od jiných rodů trypanosomatid, jeho jedinečnost je z molekulárněbiologického hlediska fascinující. Tito nenápadní bičíkovci totiž provedli změnu ve svém genetickém kódu, která byla donedávna vědci považována za neslučitelnou se životem (viz Vesmír 2023, 3: 158–161).

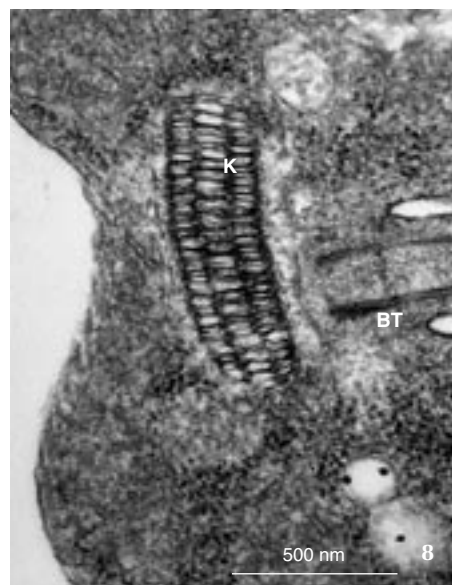
Abychom lépe porozuměli této zvláštnosti, je třeba stručně popsat standardní kód, který využívá více než 99,99 % organismů na naší planetě. Jak již bylo zmíněno, veškerá genetická informace je v DNA zapsána ve formě čtyř bází – A, T, C a G. Při



přepisu DNA do RNA zůstává „jazyk“ víceméně stejný, jen T je nahrazeno U. Skutečná změna nastává až při překladu sekvence RNA do sekvence aminokyselin, tvořících bílkoviny. Čtyři báze RNA mohou být kombinovány do 64 různých kodonů (tripletů), přičemž každý kodon je tvořen třemi bázemi (4 × 4 × 4). Na rozdíl od vysokého počtu kodonů však bílkoviny sestávají pouze z 20 aminokyselin. Nepoměr je vyřešen existencí redundantního kódu, kdy je většina aminokyselin kódována více než jedním kodonem, některé dokonce až šesti. Z celkových 64 kodonů jich 61 kóduje některou z 20 aminokyselin, zatímco tři zbylé (UAA, UAG a UGA) slouží jako stop kodony, ukončující proces překladu RNA do bílkoviny. Nejsou tedy přiřazeny žádné aminokyseliny.

Co se stalo u blastocritidií?

Z nějakého dosud neznámého důvodu před více než 100 miliony let (podle našich fylogenetických analýz) provedl předek tohoto rodu radikální změnu ve svém genetickém kódu, která od té doby zůstala stabilní. Spočívá v přiřazení aminokyselin ke všem třem existujícím stop kodonům. Zároveň si však jeden z překódovaných stop kodonů, UAA, zachoval i původní funkci a buňka ho používá jako jediný univerzální stop kodon. Radikální změna kódu na první pohled naprosto nedává smysl, protože nepřináší žádnou zjevnou selekční výhodu. Naopak, „přesmyknutí“ kódu by mělo být pro jakýkoli organismus smrtelné – ztráta kontroly nad ukončováním syntézy všech bílkovin by ho měla zabít.



Na živé přírodě je fascinující, že během miliard let, které měla evoluce k dispozici, se uskutečnily kvintiliony evolučních hrátek, a občas se stanou události, které z našeho pohledu nejsou možné nebo se zdají být nesmyslné. Steven Jay Gould tuto náhodnost evolučních procesů trefně přirovnal k „opilcově cestě“. Přestože některé z událostí působí absurdně, staly se, jejich nositelé přežili a jejich potomci se dožili současnosti. Zdá se, že uvedený paradox platí i pro rod *Blastocrithidia*. Přesto tito bičíkovci mohou mít i jednu skrytou selekční výhodu. Díky „ulétlému“ genetickému kódu mohou být odolní vůči virům. Viry totiž používají standardní genetický kód a v hostitelských buňkách s pozměněným kódem by neměly být schopny vyrábět vlastní bílkoviny. Jestli je tomu tak, určitě stojí za ověření, protože by pak změna kódu znamenala odolnost vůči všem virům, což je vlastnost, kterou bychom v koronavirové éře uvítali.

Lidstvo, byť si to většina lidí zatím neuvědomuje, vstupuje do nové technologické revoluce. Spočívá v překódování genetického kódu a tvorbě nových, geneticky de facto umělých organismů. Poznatky získané z bičíkovců, kteří fungují s pozměněným genetickým kódem, budou proto velmi cenné. Díky tomu se tito nenápadní paraziti ze stejně nenápadných ploštíc, kteří teprve nedávno upoutali velkou pozornost, rozhodně neztratí ze zorného pole vědeckého výzkumu. Jak se dozvíte v pokračování článku, některé jedinečné vlastnosti bičíkovců rodu *Blastocrithidia* mají značný potenciál pro léčbu řady dosud neléčitelných lidských onemocnění.