

# Trypanosomatida jako nástroj k opravám poškozené knihy života? II.

„Přátele si drž blízko, nepřátele ještě blíž!“ Ano, jak bylo popsáno v první kapitole dvoudílného pojednání o trypanozomách, intenzivní výzkum těchto parazitů nakonec vedl k vývoji účinných léků a kombinace terapie nakažených osob a sofistikovaného boje s mouchami tse-tse dostala spavou nemoc na hranici vymýcení (Živa 2024, 6: 301–303). Tentýž výzkum úhlavních nepřátel subsaharské Afriky nás ale posunul ještě dál, do takových oblastí medicíny, kde bychom to ještě před několika lety vůbec nečekali. De facto šťastnou náhodou se totiž ukázalo, že jedinečné vlastnosti velmi unikátního rodu a druhu trypanosomatid *Blastocrithidia nonstop* mají reálný potenciál stát se základním kamenem vývoje nových léčebných postupů pro celou řadu vzácných lidských genetických onemocnění, dosud bohužel nevyčísitelných. V nadsázce řečeno, snad se tak blíží doba, kdy začne platit, že „Kam čert může, nastrčme trypanosomatidy!“

## Opravy poškozené knihy života?

Představte si, že čtete napínavou knihu, která čítá 20 tisíc vět. A někde v polovině knihy, která vám jinak nedá spát, se dočtete, že: „Nezvyklý šramot ji zvedl z postele, vykořčila k oknu, když v tom se jí za zády nečekaně objevil ..., a ona hned poznala, že už delší dobu správně tušila, kdo je vrah.“ Chybí slovo, v této klíčové větě chybí jedno jediné slovo, které by vás jasně nasměrovalo do druhé poloviny knihy. Knihtisk ale selhal, to slovo, zřejmě jméno, neznáte, a tak jste odsouzeni po zbytek textu jen tápat, zcela ztraceni v celém příběhu (obr. 1).

A teď si představte, že existují genetická onemocnění, s nimiž se to má velmi podobně. V celém genomu, tedy naší knize života, chybí v těch 20 tisících větách jen jediné slovo. Co slovo. Často chybí pouze jedno jediné písmeno! To stačí, aby z ní naše buňky nepřečetly klíčovou informaci pro dokonalé fungování těla v její jediné správné podobě. Kvalita našeho života tak utrpí fatální ránu. Nežijeme, pouze s vypětím všech sil přežíváme.

Náš výzkum s „bláznivou“ trypanozomou *Blastocrithidia nonstop*, o které jste se dočetli v prvním dílu, nám kromě dosud nepředstavitelné odchylky od běžného fungování buňky také možná ukázal cestu, jak se poměrně jednoduše vrátit do příběhu. Jinými slovy, jak odhalit chybějící slovo/písmeno a vrátit knize původní smysl, potažmo plně zdraví našemu životu.

## Ribozom jako továrna na bílkoviny

Pro začátek si připomeňme, že genetická informace uložená v DNA se přepisuje do mediátorové RNA (mRNA), která ji přenáší z jádra do cytoplazmy. Zde se mRNA setkává s ribozomem, buněčnou „továrnou na bílkoviny“. Ribozom funguje jako sofis-



1 „Nezvyklý šramot ji zvedl z postele, vykořčila k oknu, když v tom se jí za zády nečekaně objevil ..., a ona hned poznala, že už delší dobu správně tušila, kdo je vrah.“ Blíže v textu. Vytvořeno pomocí Chat GPT. Orig. Z. Paris

tikovaný molekulární dekodér, který překládá čtyřpísmenný kód mRNA (A – adenin, C – cytozin, G – guanin, U – uracil) na dvacetipísmenný jazyk bílkovin. Tento překlad umožňují molekuly transferové RNA (tRNA), jež ribozomu slouží jako „překladová příručka“.

Ribozom zahajuje proces překladu genetické informace nesené mRNA identifikací počátku genu. K tomu mu slouží celá řada pomocných proteinů, kterým se říká iniciační faktory. Jejich práce je zcela zásadní, neboť kdyby nebyl nalezen správný začátek překladu, nejenže by nevznikl protein, který buňka zrovna potřebuje, vznikl by úplně jiný protein, který by mohl být pro buňku velmi škodlivý. Poté ribozom

postupně pročítá mRNA vždy po trojicích bází – kodonech. Každý kodon odpovídá jedné konkrétní aminokyselině, která je následně připojena k rostoucímu řetězci bílkoviny. Molekuly tRNA hrají v tomto procesu zcela klíčovou roli – pro každý kodon buňka kóduje specifickou tRNA s antikodonem, který ho přesně rozpozná. Díky komplementárnímu párování mezi kodonem a antikodonem tRNA dopraví na ribozom jen tu správnou aminokyselinu, přesně podle instrukcí genetického kódu.

Proces překladu nekončí, dokud ribozom nenarazí na některý ze tří stop kodonů (UAA, UAG, UGA), signalizujících ukončení syntézy bílkoviny. Po dosažení stop kodonu se nově vytvořená bílkovina uvolní z ribozomu a začne vykonávat svou specifickou funkci v buňce. Ribozomální výrobní linka se tak vyprázdní, aby se vzápětí připravila na další směnu.

## Selhání knihtisku: chybějící slovo

Naprosto devastující vliv na syntézu bílkovin v buňce mohou mít bodové, nonsense, mutace v DNA, které způsobují záměnu často jen jednoho jediného písmene, jedné jediné báze. Nonsense se jim říká proto, že pokud se vlivem řady faktorů objeví v kódující oblasti genu (např. uprostřed) namísto kodonu, který za normálních okolností určuje specifickou aminokyselinu, vznikne předčasný terminační kodon (PTC, Premature Termination Codon). Tento proces je pro buňku vysoce škodlivý, neboť vede k syntéze zkrácených, a tedy nefunkčních bílkovin. A pokud jsou takto zasažené bílkoviny pro život buňky nepostradatelné, postižení jedinci se dostávají do neřešitelné situace a trpí mnoha zdravotními problémy. V přeneseném slova smyslu lze říci, že knihtisku se přechodně nedostává tiskařské černi, z knihy života se vytratilo klíčové slovo, a celý příběh ztratil na své původní dokonalosti.

PTC mutace nelze vůbec brát na lehkou váhu, neboť tvoří přibližně 11 % všech genových změn spojených s dědičnými genetickými onemocněními. Jedním z nejznámějších příkladů je cystická fibróza (CF), která vážně poškozuje plicí, trávicí systém a další orgány a je způsobena velkým počtem nonsense mutací v klíčovém genu kódujícím transmembránový regulátor. Dalším závažným onemocněním je Duchennova svalová dystrofie, jež postihuje zejména mladé chlapce. Způsobuje ji výskyt předčasných terminačních kodonů v genu pro dystrofin, nezbytném pro zajištění strukturální celistvosti svalových buněk. Mezi případy spojené s výskytem PTC patří také postižení očí pigmentovou retinitidou, Shwachmanův–Diamondův syndrom, postihující především slinivku břišní a kostní dřeň, a v neposlední řadě např. metabolické onemocnění mukopolysacharidóza prvního typu.

## Klíč k řešení: Jak vrátit chybějící slovo?

Nejjednodušším způsobem, jak pokračovat ve čtení napínavého příběhu, by bylo donutit ribozom, aby ignoroval přítomnost předčasných stop kodonů. Pokračovala by syntéza „postižené“ bílkoviny a její ukončení by nastalo až na skutečném konci genu, definovaném jediným správným stop kodonem. Touto myšlenkou se pochopitelně

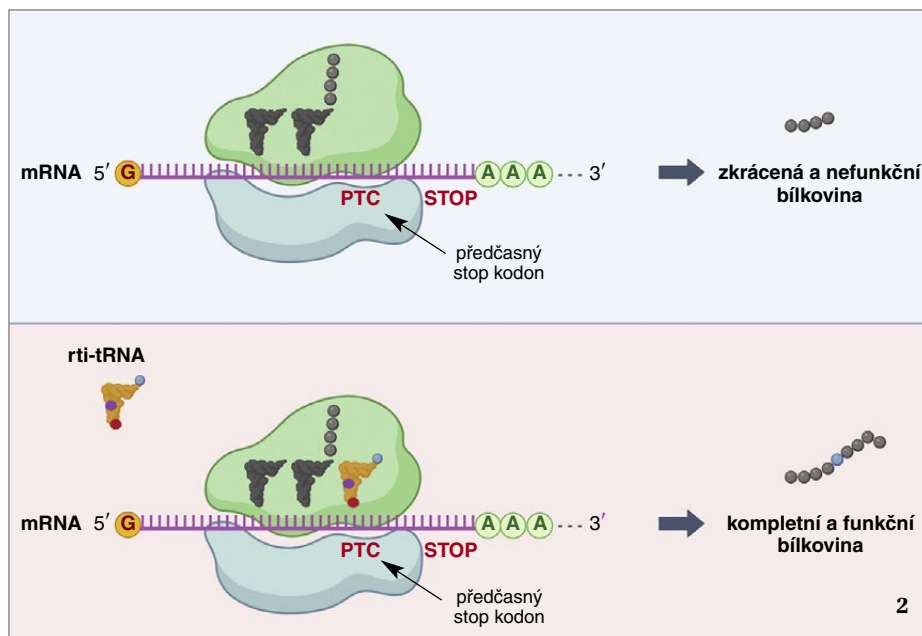
vědci zabývali již dříve. Zjistili, že toho lze docílit prostřednictvím snížení přesnosti translace. Jinými slovy, záměrným zvýšením chybovosti při čtení genetického kódu. Popsaný způsob, pro který se využívají různé chemické látky negativně ovlivňující „molekulární dekodér“ ribozomu, má ale jedno velké ALE. Zmíněné látky sice podporují „pročítání“ předčasných stop kodonů, což ribozomu umožňuje pokračovat v syntéze postižených bílkovin, ale nejenže neřeší, jakým slovem (aminokyselinou) se mezera vyplní (zpravidla jde o zcela náhodné „slovo“, což smysl příběhu nevrátí), navíc se zvýšenou frekvencí přiřazují náhodné aminokyseliny i tam, kde už syntéza opravdu končí. Následkem je zcela nesmyslné prodloužení příběhu – pro buňku a potažmo celý organismus to může být toxické a může vést až k buněčné smrti. V konečném důsledku mohou tyto látky napáchat více škody než užítka, a i když výzkum jde v tomto směru dál, zatím spíše „škobrtá“.

Mezi látky podporující pročítání stop kodonu, které mohou snížit přesnost translace, patří např. aminoglykosidová antibiotika. Vážou se na ribozom přímo do místa, kde dochází k dekodování. Geometrii daného místa, která je kritická pro správnost funkce, svou vazbou silně ovlivní, což zvyšuje pravděpodobnost, že ribozom bude pokračovat v syntéze bílkoviny i po přečtení předčasného stop kodonu. Změněná geometrie dekodovacího místa tak sice může přispět k dokončení syntézy některých bílkovin, současně ale nepodporuje základní princip genetického kódu – komplementární párování mezi kodonem mRNA a antikodonem tRNA, díky němuž ribozom zařadí do vznikající bílkoviny jen tu správnou aminokyselinu. Ribozom v podstatě využije jakoukoli tRNA nesoucí aminokyselinu, což může mít negativní vliv na správnou funkci výsledné bílkoviny.

Jiná skupina látek narušuje činnost terminačních faktorů, které za normálních okolností pomáhají ribozomu ukončit syntézu bílkovin tam, kde se nachází skutečný stop signál. Příkladem je lék vyvinutý k léčbě některých typů Duchennovy svalové dystrofie nazvaný ataluren, který přesně tento proces negativně ovlivňuje. I když tyto látky pomáhají překonat předčasný stop kodon, a tím zvýšit tvorbu bílkovin v jejich správné velikosti, mají také značné nevýhody vedoucí k nežádoucím účinkům. Zcela očekávatelně, když se ribozomu nedaří ukončit syntézu bílkoviny na PTC, bude ji hůře ukončovat i na skutečných stop kodonech. Zvýšené pročítání skutečných stop signálů pak vede k tvorbě včas neukončených, a tím pádem delších a potenciálně velmi škodlivých variant klíčových bílkovin.

Fakt, že tyto látky opravdu nejsou optimální, je zřejmý z řady klinických studií, kdy pacienti léčení takovými substancemi trpí důsledkem vážných vedlejších účinků, jako je ztráta sluchu nebo porucha rovnováhy. A tak i přes pokrok, který tyto postupy přinesly, se ukazuje, že jejich nedostatečná specifita, závažné vedlejší účinky a neúspěšné klinické studie vyžadují hledání jiných řešení.

Nedávný pokrok v technologii CRISPR-Cas9 (blíže o metodě v Živě 2017, 2: 70–72



a XLVII–XLIX, 4: 146–148), umožňující opravit chybu přímo ve zmutované DNA, nabízí potenciálně trvalé řešení pro nemoci způsobené nonsense mutacemi. Stále však existuje spousta překážek, které brání rychlému použití této technologie v léčbě, jako je doručení opravného systému do správného typu buněk v mnohobuněčném lidském organismu, efektivita opravy DNA a riziko nežádoucích úprav v jiných místech genomu. Dalším omezením jsou náklady na diagnostiku a léčbu, které by musely být ušité na míru každého pacienta zvlášť, a to kvůli konkrétním mutacím a genetickým rozdílům jednotlivých pacientů.

### Doplnění chybějícího slova pomocí upravených tRNA

Nejslibněji se zatím jeví použití upravených tRNA označovaných rti-tRNAs (readthrough-inducing tRNAs), tedy tRNA podporující pročítání stop kodonu. Ty mají buď upravené antikodony, aby byly schopné se dokonale párovat s konkrétním předčasným stop kodonem, nebo jsou upraveny

2 Princip použití upravených tRNA – rti-tRNA, které umožňují pročítání předčasných stop kodonů (readthrough-inducing tRNAs). Díky tomu může ribozom pokračovat v translaci a dokončit syntézu kompletní, funkční bílkoviny. Blíže v textu

3 Mechanismus účinného pročítání terminačních signálů. Pouze ty tRNA schopné vázat se na vybrané ribozomální proteiny tvořící jeho dekodovací centrum, např. eS25 a eS30, se stabilně v tomto centru „zahnízdí“. A i když je ribozom připraven syntézu ukončit, přítomnost speciálních rti-tRNA předčasnému ukončení zabrání, a umožní tak ribozomu celý protein dokončit.

A-site – ribozomální akceptorové místo, tedy místo, kam se na ribozom vážou nové přišedší tRNA, NTD – N-koncová doména proteinu. Upraveno pomocí bioRender.com podle: Z. Čapková Pavlíková a kol. (2025). Orig. L. S. Valášek

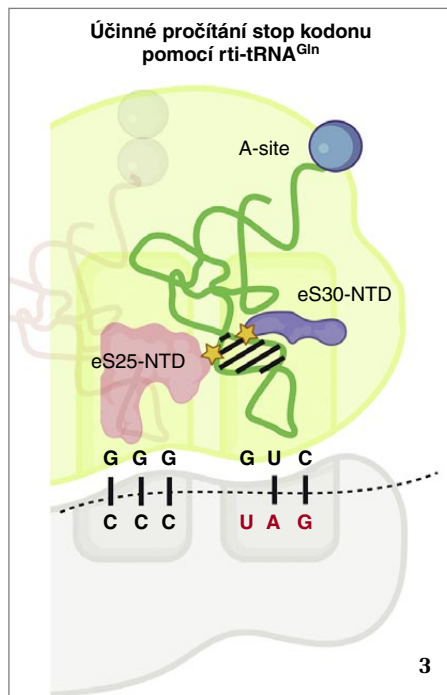
4 Schéma znázorňuje využití adenoviru nesoucího gen pro rti-tRNA. Adenovirus proniká povrchem buňky a dostává se do jádra, kde je jeho genetická informace přepsána do rti-tRNA. Ta je následně transportována do cytoplazmy a na ribozomu umožňuje pročítání předčasných stop kodonů.

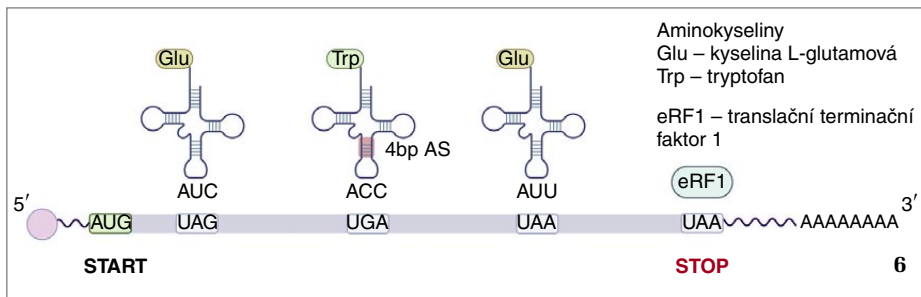
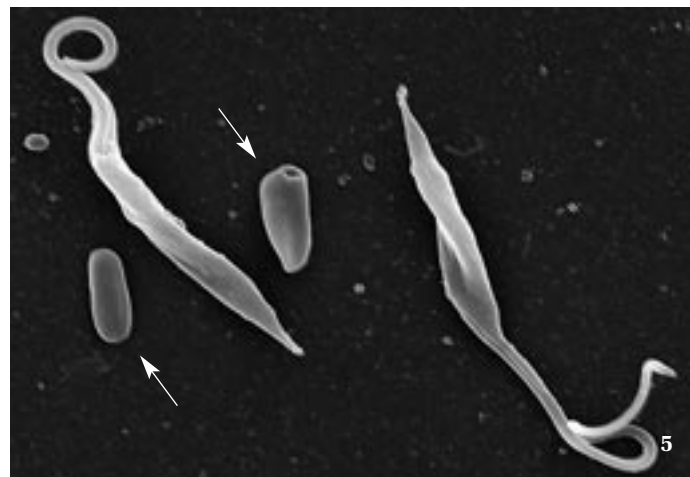
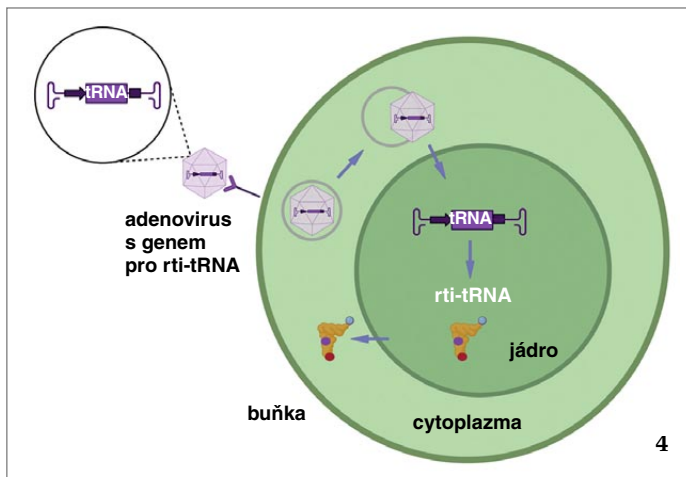
5 Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu jednohostitelského trypanosomatida *Blastocrithidia nonstop*, který je schopen vytvářet odolná cystická stadia (označena šipkami). Foto J. Votýpka

6 Tři úpravy tří různých tRNA, které umožňují *B. nonstop* dekodovat všechny tři stop kodony jako „sense kodony“. Vytvořeno pomocí bioRender.com. Orig. Z. Paris (obr. 2, 4 a 6)

v rámci primární sekvence mimo antikodon (obr. 2). V obou případech to umožňuje ribozomu ignorovat signál pro ukončení translace a pokračovat v syntéze bílkoviny až ke skutečnému stop kodonu, a to bez jakéhokoli narušení dekodovacího centra.

Jak jsme nedávno ukázali, trik rti-tRNA s upravenou primární sekvencí (tedy se





zachovaným, přirozeným antikodonem) spočívá v tom, že vytvářejí důležité kontakty s některými ribozomálními proteiny tvořícími dekódovací místo. Tyto kontakty jim pak umožní vytvořit stabilní vazbu, kterou terminační faktory, jinak zodpovědné za ukončení syntézy, nejsou schopné narušit (Čapková Pavlíková a kol. 2025; obr. 3).

Výhoda všech typů pročítacích rti-tRNA spočívá v tom, že představují přirozenou součást všech organismů, což znamená, že by měly být dobře tolerovány imunitním systémem, na rozdíl od genových editačních technologií, jako je např. CRISPR. Navíc tyto upravené tRNA jsou vysoce specifické pro jednotlivé stop kodony, což je výhodou oproti zmíněným chemickým látkám, které aminokyseliny do proteinů vkládají náhodně, čímž mohou narušit jejich funkci. Nade vše pochybnost tak rti-tRNA představují slibnou možnost pro personalizovanou medicínu s potenciálem dlouhodobých účinků.

Aby však bylo možné tuto technologii efektivně využít, je třeba vyřešit několik klíčových otázek. První výzvou je zajištění stabilní exprese a bezproblémového fungování rti-tRNA při translaci. Přesné připojení správné aminokyseliny ke konkrétní tRNA závisí na enzymech zvaných aminoacyl-tRNA syntetázy, což vyžaduje důkladnou optimalizaci těchto terapeutických tRNA nejen pro vysoce účinné pročítání, ale rovněž pro přesné připojení konkrétní aminokyseliny. Další výzvou je cílené a efektivní doručení tRNA do cílových buněk a tkání. Nedávné studie ukázaly, že rekombinantní adeno-asociované viry (rAAV) mohou bezpečně dodávat tyto terapeutické tRNA do poškozených buněk. To vedlo k obnově syntézy a funkce zmutovaných proteinů v myších modelech genetických onemocnění, jako je mukopolysacharidóza I a Duchennova svalová dystrofie.

V neposlední řadě musíme zmínit, že je třeba zajistit, aby speciálně upravené

rti-tRNA pročítaly jen předčasné stop kodony a zcela ignorovaly ty opravdové, které ukončují syntézu na správném místě, jak jsme se o tom zmínili výše, v souvislosti s různými chemickými látkami. Naštěstí mají rti-tRNA, díky jejich přirozenému výskytu v buňkách, oproti těmto umělým látkám jednu velkou výhodu. Říká se jí pozičně specifická terminace. Jde o to, že pravý stop kodon na konci kódující oblasti mRNA je označen jedinečnou mRNA sekvencí [poly(A)], na kterou se váže specifický protein PABP [poly(A)-Binding Protein]. Zdá se, že pomocí těchto dvou molekul jsou výše zmíněné terminační faktory, které syntézu proteinů ukončují, přesně pozičně umístěny pouze u pravých stop kodonů. De facto tam už čekají na ribozom, aby okamžitě ukončily syntézu. Tím pádem nemají rti-tRNA na pravých stop kodonech moc velkou šanci škodit. Tyto dvě molekuly u předčasných stop kodonů chybějí, takže tam tolik nepůsobí terminační faktory a upravené rti-tRNA mají mnohem větší šanci konat svou žádanou práci.

### Kam čert může, nastrčme trypanosomatidy!

A nyní se konečně dostáváme zpět k trypanozomám rodu *Blastocystis* (obr. 5 a na 2. str. obálky) a jejich dramatické odchylce od genetického kódu. Zatím stále nevíme jak a proč, ale už dobře chápeme, díky čemu dokážou i přes své – pro ostatní tvorstvo smrtelné – úpravy kódu tyto zvláštní prvoci normálně přežít. Co je pro pacienta zcela zásadní zdravotní problém, tedy výskyt PTC v genu klíčového proteinu, je pro tyto organismy zcela běžnou praxí. Jejich genom totiž PTC všech tří typů – UAA, UAG i UGA – doslova překypuje. Jak je to možné? Právě díky existenci speciálně upravených tRNA! Náš společný výzkum s Juliem Lukešem a Janem Votýpkou (autory prvního dílu v Živě 2024, 6) publikovaný v časopise Nature v r. 2023

ukázal, že přirozenou úpravou tRNA molekul kódujících tryptofan a glutamovou kyselinu umějí tyto bičíkovci snadno překonat jakýkoli PTC kdekoliv ve svém genomu. Ty úpravy jsou přesně tři a vzájemně se od sebe významně liší. Zatímco v případě dvou tRNA nezávisle na sobě kódujících glutamovou kyselinu, u nichž došlo v rámci evoluce ke změně jejich antikodonu tak, že je nyní plně komplementární s UAA, popřípadě UAG stop kodony, tryptofanová tRNA se vydala evolučně zcela jinou cestou. Ponechala svůj antikodon beze změny, jen jednou drobnou úpravou jej trochu přiblížila ke svému „tělu“. Vypadá to, jako by se o něco zmenšila, jak se říká, vrostla zpět do země. Tato drobná a v přírodě velmi ojedinělá úprava jí poskytla zcela jedinečnou vlastnost – nejenže stále dokáže překládat UGG kodon jako tryptofan, jako tryptofan dokonale dekóduje i UGA stop kodon. Nepředvídatelnost a rozmanitost světa tRNA jsou zkrátka nádherné!

A vzhledem k tomu, že, jak jsme si už řekli, rti-tRNA představují velmi nadějný směr výzkumu, který by mohl vyřešit problémy spojené s výskytem nonsense mutací, domníváme se, že inspiraci pro vývoj účinné léčby lidských genetických onemocnění, a to nejen těch způsobených PTC, mohou poskytnout organismy s alternativními genetickými kódy, jako jsou právě *Blastocystis* a různé typy nálevníků (Ciliates). Ač netušíme, z jakých důvodů se během svého vývoje odchýlili od univerzálního genetického kódu, který je obecně považován za dobře vyladěný, jedno je jasné. Musely snášet důsledky těchto „rozhodnutí“ a k tomu, aby přežily, musely vyvinout co nejchytřejší řešení, která přirozeně vznikla během dlouhého evolučního období. Teprve budoucí výzkum ukáže, co všechno se od těchto organismů můžeme naučit pro zlepšení zdraví člověka, resp. pro dočtení přetržených příběhů v knihách života těch méně šťastných z nás až do konce. A učit se beze sporu budeme, o tom dnes už nikdo nepochybuje.

*Výzkum probíhá s podporou Grantové agentury ČR (Lead Agency, DFG and CSF, grant 23-08669L) a Akademické prémie udělené L. S. Valáškoví v r. 2020.*

Seznam použité literatury uvádíme na webové stránce Živý.