

Úspěch spočívá v kooperaci

Martin Kuthan, Zdena Palková

Z historických důvodů je zvykem rozdělovat živé organismy na jedno- a mnohobuněčné. Má však toto dělení skutečné opodstatnění? Ukážeme vám, že pomyslná hranice rozdělující tyto 2 skupiny v mnoha případech téměř neexistuje. Některé jednobuněčné organismy jsou schopny tvořit za určitých růstových podmínek organizované mnohobuněčné struktury — povlaky, biofilmy a kolonie, které jsou v přírodních podmínkách převládající formou výskytu mnoha mikroorganismů. O některých těchto strukturách a jejich „chování“ jsme se zmiňovali v našem předchozím článku (Živa 2000, 1: 5–8). V něm jsme se zaměřili především na komunikaci a signalizaci na dlouhou vzdálenost a vliv této komunikace na vznik a vývoj mnohobuněčných struktur. Nyní se pokusíme ukázat, že i mezi buňkami uvnitř samotných kolonií musí probíhat čilá výměna signálů. Třebaže tyto signální mechanismy budou jistě mnohem jednodušší než mechanismy uplatňující se při ontogenezi savců, věříme, že znalost těchto signálů by mohla pomoci k rozpoznání podobných mechanismů u savčích tkání. Vývoj a diferenciace buněk tvořících tkáně vyšších organismů včetně člověka jsou provázeny přenosem signálů mezi jednotlivými buňkami i mezi specializovanými skupinami buněk. Poruchy v těchto signálech a v diferenciaci s nimi spojené mohou vést k patologickým změnám, jako je např. nádorový růst.

Jaké výhody mají mikroorganismy ze života v mnohobuněčných strukturách? Máme-li užít nějaké velmi přenesené přírovnání, tak jsou výhody stejné jako výhody života lidí ve státech, městech či společenstvích — dělba práce, možnost specializace či společná obrana. Sebekriticky je nutno dodat, že mikroorganismy tyto výhody znají a užívají mnohem dříve než my.

Nejlépejší možností pro sledování mnohobuněčného chování mikroorganismů v laboratoři jsou kolonie. Když se dostane jediná bakteriální buňka na povrch vhodného živného média, začne se brzy dělit a po krátké době vytvoří kolonii čítající několik miliard bakterií. Na první pohled by se mohlo zdát, že vše je dílem náhody

a že kolonie je pouhá hromádka buněk ležících bez jakékoli organizace na jednom místě. Samozřejmě, že tomu tak není. Např. běžná bakterie *Escherichia coli*, osídlující v obrovských počtech naši trávicí soustavu, začíná s koordinovaným vývojem kolonie hned od prvopočátku jejího vzniku. Již první dvě sourozenecké buňky vzniklé dělením jediné bakterie začínají spolu interagovat. Druhé dělení totiž není nahodilé, ale buňky se rozdělí tak, aby potomstvo bylo spolu v maximálním fyzickém kontaktu: vznikají tedy dvě dvojice buněk, ležících podélně vedle sebe. Následná dělení si stále uchovávají určitý řád a jeho výsledkem je jedna vrstva bakterií ležících těsně vedle sebe. Ukázalo se, že bakterie se snaží maximalizovat kontakt

buňka-buňka a vyhýbají se situaci, kdy by buňky zůstaly osamoceny na povrchu média. Dokonce dvě mikrokolonie rostoucí v těsné blízkosti nejdříve srostou dohromady a až takto vzniklá větší kolonie začne posléze růst do šířky. V určitém čase se na monovrstvě buněk objeví další a další vrstvy buněk, takže kolonie má výsledně čočkovitý tvar. Je vidět, že mezibuněčné interakce v kolonii *E. coli* si v ničem nezadají s mezibuněčnými interakcemi v tkáních vyšších organismů. Pokud kolonie vzniká z jediné buňky, všechny buňky v kolonii mají vlastně monoklonální původ — ale aby to nebylo tak úplně jednoduché, bakteriální buňky nezůstávají v průběhu vývoje kolonie stejné. Postupně se organizují a diferencují do neklonálních populací, jak podrobněji ukážeme na koloniích kvasinek. Zde se přímo nabízí paralela mezi vývojem embrya z jediné buňky — zgoty. I v tomto procesu jsou nesmírně důležité signály, mezibuněčné kontakty a interakce, jistě však mnohem složitější a bohatší než v koloniích mikroorganismů. V průběhu embryogeneze tak buňky s monoklonálním původem svým dalším dělením a neklonální diferenciací (ovlivňovanou množstvím signálů) dávají vzniknout makroskopickému embryu komplikovaného tvaru s velkým množstvím různých typů specializovaných buněk. Aby však paralela s embryogenezí nebyla úplně dokonalá, mají bakterie kromě dělení buněk ještě jinou možnost pro ovlivnění vývoje a tvorby kolonie — aktivní pohyb buněk. Mnohé bakterie mají vyvinutý pohybový aparát, který buňkám umožňuje pohyb v polotekutém či tekutém prostředí.

Jestliže zaočkujeme bakterie *E. coli* do jednoho bodu na polotekutém živném médiu s nízkou koncentrací agaru, začnou tyto bakterie vytvářet na povrchu média koncentrické kruhové vzory. Vznikají společným pohybem mnohobuněčných rojů bakterií sledujících gradienty tzv. chemoatraktantů. Chemoatraktanty jsou látky, které bakterie přitahují a jimi vyvolaný pohyb se nazývá chemotaxe. Mnohem propracovnější vzory vytvoří bakterie na médiu s malým množstvím nějakých toxických látek (např. antibiotik). Bakterie začnou v těchto stresových podmínkách samy produkovat chemoatraktanty sloužící jako signály pro shlukování buněk. Buňky se postupně spojí do agregátů viditelných na Petriho misce pouhým okem a většina z nich ztratí možnost dalšího pohybu. Na misce vzniknou nádherné geometricky pravidelné vzory z bodů tvořených nepohyblivými shluky bakteriálních buněk. Shlukování buněk je pro bakterie výhodné, protože mnohobuněčné agregáty odolávají toxickým látkám mnohem lépe než osamocené bakteriální buňky.

Hledání genů variabilně zapínaných a vypínaných při vývoji kolonie

Hlavním projektem naší laboratoře Centra pro výzkum buněčného stresu a adaptace je studium vývoje a chování kvasinkových kolonií, mnohobuněčných

Obr. 1 Detailní záběry morfologie kolonií různých druhů kvasinek: *Schwanniomyces occidentalis* (nahoře), *Saccharomyces cerevisiae* (vlevo dole), *Rhodotorula glutinis* (vpravo dole). Zvětšení 4x

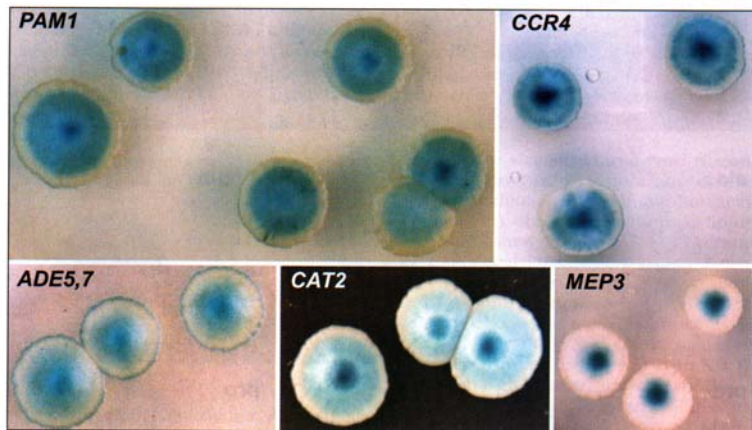
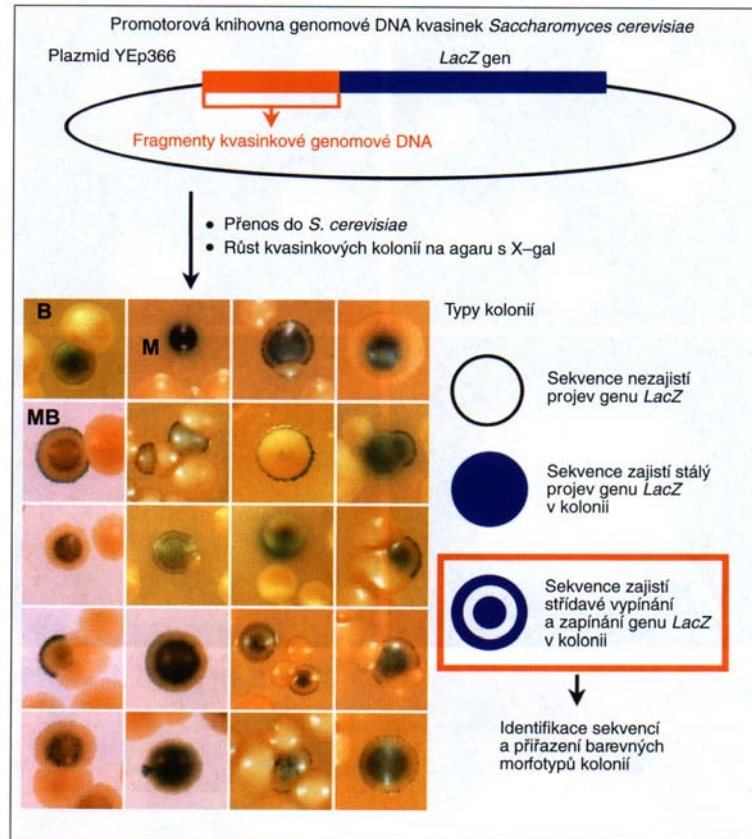


Obr. 2 Schéma metody pro izolaci genů variabilně exprimovaných v průběhu vývoje kolonie. Tato metoda byla vyvinuta autory na pracovišti Centra pro výzkum buněčného stresu a adaptace Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Na fotografiích jsou vyznačeny příklady všech tří typů kolonií (B — bílá, M — modrá, MB — modrobílá)

organizovaných struktur vznikajících výlučně dělením buněk. Zajímají nás jednak signály, které ovlivňují jednotlivé kolonie na dlouhou vzdálenost (Živa 2000, 1: 5-8), jednak mechanismy a signály, které hrají roli při vlastní tvorbě struktury kolonií. Ty by měly být odpovědné za to, že se kvasinkové buňky během svého růstu mohou uspořádat i do složitých a pravidelných struktur (viz obr. 1). Svým způsobem připomínají i některé struktury pravých mnohobuněčných organismů.

Při diferenciaci buněk tkání savců a jiných mnohobuněčných organismů dochází ke změnám projevu (exprese) řady genů, které se při těchto buněčných změnách uplatňují. Důležité je si uvědomit, že ve většině případů mají diferencované buňky, i přesto, že plní různé funkce, stále identickou genetickou informaci ve své genomové DNA. To, v čem se jednotlivé diferencované buňky liší, je různý projev této informace. Položili jsme si proto otázku, zda i v průběhu vývoje kvasinkové kolonie dochází v jednotlivých buňkách ke změně exprese určitých genů, a zda bude možné sledovat nějaké zákonitosti těchto změn. Vzhledem k tomu, že o vývoji kolonií dosud víme velmi málo, nebylo na začátku možné pro sledování vybrat konkrétní geny. Rozhodli jsme se proto provést necílené široké vyhledávání těch genů, jejichž exprese se mění v průběhu vývoje kolonie běžné pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Předpokládali jsme, že některé z těchto genů by se mohly podílet na řízení vývoje struktury kolonie (Mináriková a kol. 2001).

Pro vyhledávání jsme zavedli speciální metodu (viz obr. 2). Základem této metody je tzv. promotorová knihovna genomu kvasinek *S. cerevisiae*. Pod pojmem genomová knihovna se rozumí velký soubor kruhových pomocných molekul DNA — plazmidů, z nichž každý obsahuje náhodnou část DNA pocházející původně z genomu kvasinky. Specialitou promotorové knihovny je, že genomové fragmenty kvasinkové DNA jsou do plazmidu vloženy do místa před genem *LacZ*. Tento gen kóduje enzym β -galaktosidázu, který je schopen štěpit substrát (nazývaný X-gal), čímž vznikne modrý, dobře detekovatelný produkt. Vzhledem k tomu, že *LacZ* gen v plazmidu původně nemá před sebou tzv. promotorovou sekvenci, která by umožnila jeho projev po vnesení plazmidu do hostitelské kvasinkové buňky, nedochází k produkci β -galaktosidázy ani štěpení X-gal substrátu a rostoucí kolonie zůstává bílá. V případě naší knihovny se před *LacZ* sekvencí nacházejí náhodné úseky kvasinkové genomové DNA. S určitou pravděpodobností může proto nastat situace, že takový fragment obsahuje sekvence, které umožní expresi sousedního genu, tj. genu *LacZ*. V takovém případě, je-li příslušný plazmid vnesen do kvasinkové buňky, dojde k produkci β -galaktosidázy, štěpení substrátu X-gal a modrému zabarvení

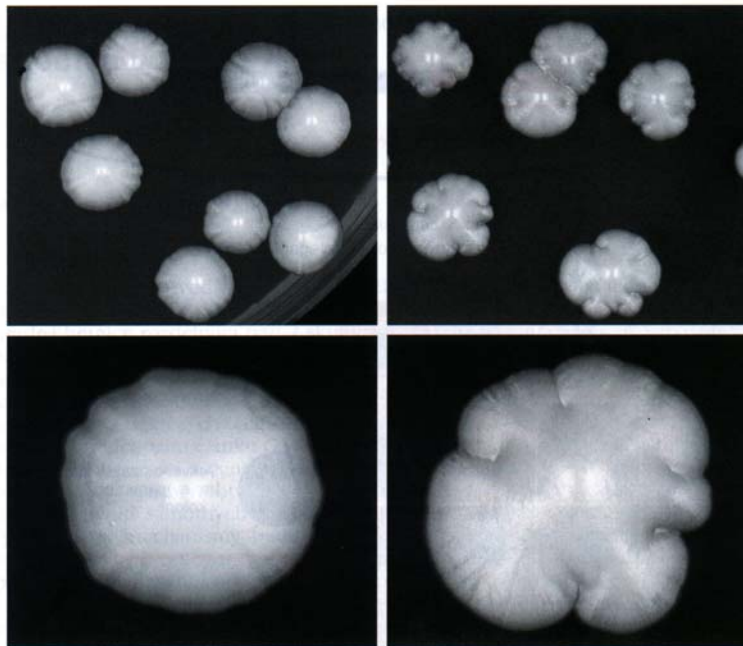


buněk rostoucí kolonie. Samozřejmě to, za jakých podmínek může docházet k expresi *LacZ* genu, závisí na konkrétních sekvencích, které se před genem vyskytují a liší se v jednotlivých plazmidech promotorové knihovny. V našem případě jsme předpokládali, že pokud se před *LacZ* genem budou nacházet sekvence, které původně patřily některému z genů, jehož exprese se mění při vývoji kolonie, budou tyto sekvence zajišťovat stejným způsobem variabilní expresi genu *LacZ* a tím i odlišné vybarvení jednotlivých částí kolonie.

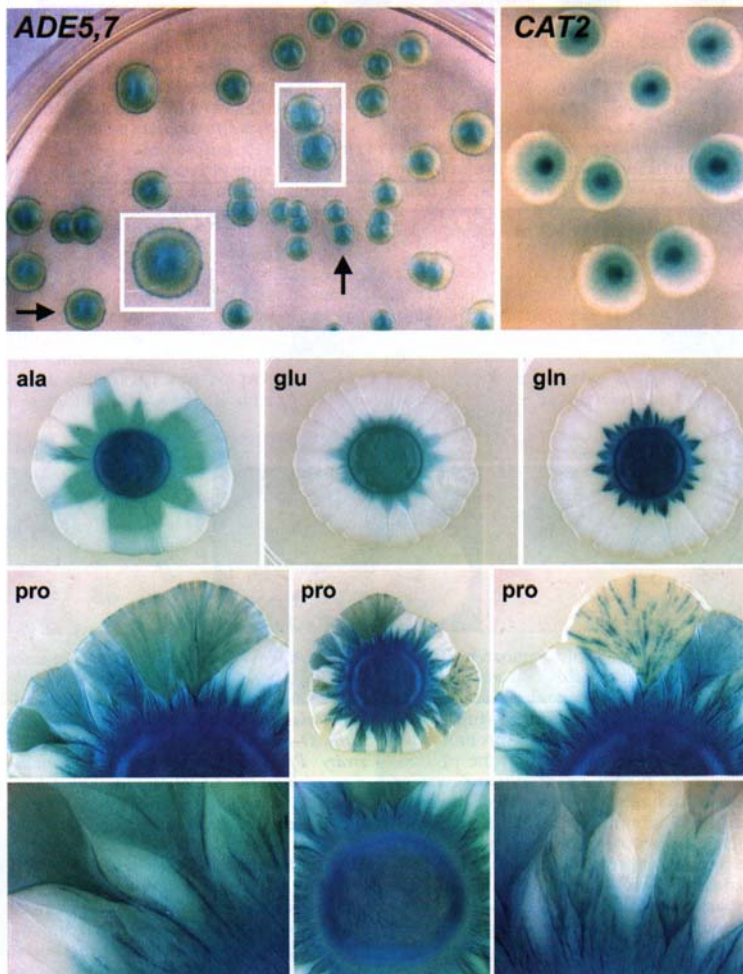
Soubor plazmidů promotorové knihovny jsme vnesli do kvasinek *S. cerevisiae* a buňky jsme vyseli na agarové médium

Obr. 3 Modrobílé kolonie kvasinek nesoucích plazmidy s regulačními sekvencemi uvedených genů vloženými před upravený *LacZ* gen postrádající vlastní regulační sekvence. *CAT2* (karnitin *O*-acetyltransferáza), *PAM1* (supresor ztráty *Pp2A* fosfatázy), *MEP3* (permeáza amonných iontů), *CCR4* (transkripční faktor) a *ADE5,7* (glycinamid ribotid syntáza a aminimidazol ribotid syntáza). Zvětšení 2,5 \times

obsahující substrát X-gal tak, aby každá z buněk dala vznik jedné kolonii. Při tomto uspořádání by mělo být s vysokou pravděpodobností zajištěno, že každá z rostoucích kolonií obsahuje plazmid promotorové knihovny s jiným náhodným genomem



Obr. 4 Vlevo morfologie kolonií rodičovského kmene (BY4742) a od něj odvozené mutanty *ccr4* (vpravo), která má ve srovnání s rodičovským kmenem zřetelně nepravidlejší strukturu. Skutečná velikost (naboře), detail zvětšení 3×



vým fragmentem. Podle očekávání jsme získali 3 základní typy kolonií (viz obr. 2): 1. Kolonie bílé, vyrostlé z kvasinkové buňky, která neobsahovala plazmid s genomovým fragmentem schopným zajistit expresi *LacZ* genu. 2. Kolonie modré, tvořené buňkami obsahujícími plazmid s genomovým fragmentem, který zajistil trvalou expresi genu *LacZ* v kvasinkové kolonii. 3. Kolonie modrobílé, pocházející z kvasinky nesoucí plazmid s fragmentem, který byl odpovědný za střídavé vypínání a zapínání exprese *LacZ* genu v rostoucí kolonii. Právě poslední typ kolonií byl ten, který jsme hledali. Nejprve jsme izolovali jejich plasmidy a identifikovali genomové fragmenty, které obsahují. Velkou výhodou přítom bylo, že u kvasinek *S. cerevisiae* je známá kompletní genomová sekvence a bylo jednoduché zjistit, odkud fragmenty pocházejí a jaké geny původně regulovaly. Ověřili jsme a jednoznačně přiřadili odpovědnost za specifický barevný morfortyp příslušné kolonie určité regulační sekvenci (viz obr. 3). Při sledování modrobílého vybarvení kolonií jsme pozorovali dva základní vzorce — modrobílé vějířovité sektory a modrobílé soustředné kruhy. Výskyt modrých nebo bílých sektorů znamená, že v určité fázi vývoje kolonie došlo ke změně exprese genu *LacZ* v jedné nebo více buňkách a tato skutečnost se udržela i v jejich potomstvu. Jinými slovy, bílý sektor tvoří buňky, u nichž je projev genu *LacZ* vypnut, zatímco modrý sektor tvoří buňky se zapnutým genem *LacZ*. Biologicky vzato je každý sektor vlastně klon kvasinek pocházejících z jednoho společného předka. Mnohem zajímavější je existence modrobílých, centrálně symetrických kruhů, jejichž výskyt už nelze vysvětlit jednoduše pouhým dělením buněk pocházejících ze společného předka. Modrobílé kruhy znamenají, že se gen *LacZ* projevil (nebo naopak vypnul) v buňkách, které sice nepocházejí ze stejných předků, ale které se vyskytují v určitém místě kolonie v určitém čase jejího vývoje. Tato situace již velmi připomíná živočišné tkáně a specifickou expresi určitých genů v jejich diferencovaných buňkách.

Nález genu ovlivňujícího morfologii kolonií

Zajímalo nás, zda by se alespoň některý z identifikovaných genů mohl uplatňovat

Obr. 5 Regulační sekvence genů *ADE5,7* a *CAT2* vložené před gen *LacZ* zajistí jeho synchronizovanou expresi v populaci různě velikých kolonií (uprostřed). Zvětšení 1,2× ♦ Obr. 6 Změny exprese *LacZ* genu, kontrolované promotorem genu *MEP3*, v koloniích rostoucích na různých zdrojích dusíku (dole). Do minimálního média byly jako jediný zdroj dusíku přidány aminokyseliny (*ala* — alanin, *glu* — kyselina glutamová, *gln* — glutamin, *pro* — prolin). Kolonie rostoucí na médiu s prolinem, který je pro kvasinky chudým zdrojem dusíku, tvoří sektory s velmi komplikovanými vzory, jejichž složitost svědčí o vysoké metabolické různorodosti buněk v kolonii. Zvětšení 2,5×, detail 6×. Snímky M. Kuthana

v regulaci vývoje kolonie. Otázkou bylo, jaké kolonie budou tvořit kvasinky, které mají poškozené, a tudíž nefunkční geny, regulované námi identifikovanými sekvencemi. Když jsme porovnali morfologii kolonií těchto mutovaných kmenů s kmenem původním, rodičovským, zjistili jsme, že kolonie kvasinek s nefunkčním genem označovaným *CCR4* mají narozdíl od kmene rodičovského mnohem nepravidlejší strukturu (viz obr. 4). O genu *CCR4* je známo, že jeho proteinovým produktem je tzv. transkripční faktor (*Ccr4*), který se uplatňuje při zapínání a vypínání exprese jiných genů. Je tedy možné, že právě *Ccr4* protein by mohl být jedním z faktorů regulujících vývoj kvasinkových kolonií. V buňkách savců i jiných mnohobuněčných organismů se nacházejí faktory podobné svou strukturou proteinu *Ccr4* a je otázka, jestli některý z nich ne reguluje geny důležité pro mnohobuněčný vývoj.

Sledování exprese genu

Protože jsme měli v ruce nástroj, který umožňoval relativně jednoduché sledování regulace exprese genu *LacZ* vybranými genomovými fragmenty, zajímalo nás, jestli nebude docházet k nějakému ovlivnění této regulace v koloniích rostoucích v těsné blízkosti. Inspirovala nás k tomu i naše již zmíněná dřívější pozorování, kdy se kolonie vzájemně ovlivňovaly produkcí amoniaku. Sledovali jsme proto, jakým způsobem se vybarví kolonie různé velikosti (s různým počtem buněk) rostoucí na stejné agarové misce. Kolonie tvořené kvasinkami nesoucími plazmid obsahující regulační sekvence genu *ADE5,7* nebo *CAT2* se vybarvují stejným způsobem, tj. obsahují stejný počet modrých a bílých kruhů, nezávisle na své velikosti (viz obr. 5). Toto pozorování znamená, že vznik jednotlivých kruhů v tomto případě nezávisí na tom, do

jaké velikosti kolonie dorostla. Naopak může být důsledkem existence mechanismu, který zaznamenává čas vývoje jednotlivé kolonie, nebo je vývoj kolonií rostoucích v sousedství nějakým způsobem synchronizován. Taková synchronizace by mohla být pro populaci kolonie výhodná, protože by umožňovala všem koloniím současně se např. adaptovat na měnící se okolní podmínky, kterými jsou mimo jiné zdroje živin.

Námi popisovaný systém je možné využít i pro přímé sledování změn genové exprese v kvasinkové kolonii v závislosti na měnících se podmínkách okolního prostředí. Kvasinky, jako ostatně všechny živé organismy, důkladně monitorují množství potravy ve svém okolí a v případě změn její kvality či dokonce nedostatku živin mění výrazně svoje chování a metabolismus. Rozhodli jsme se kvasinkovým koloniím nabídnout v médiu různé aminokyseliny a sledovat, jak se bude měnit projev genu *LacZ* kontrolovaného promotorem sekvencí genu *MEP3* (viz obr. 6), o němž je známo, že je regulován množstvím dusíkatých živin. Vzhledem k zatím poměrně malému množství informací o kvasinkových koloniích není interpretace výsledků těchto experimentů jednoznačná a jednoduchá. Ale přesto nás zaujaly a potěšily zejména složité modrobílé vzory na koloniích rostoucích na médiu s prolinem, který je pro kvasinky chudým zdrojem dusíku. Tyto komplikované vzory svědčí o tom, že kvasinková kolonie je skutečně složitý mnohobuněčný útvar složený z navzájem kooperujících, ale metabolicky velmi různorodých buněk.

Na několika příkladech jsme se pokusili ukázat, že kvasinkové kolonie jsou mnohobuněčně organizované struktury tvořené buňkami, v nichž dochází k diferencovanému projevu řady genů a některé z těchto genů mohou být odpovědné za jisté atraktivní vzhled kolonií. Z praktické-

ho hlediska jsou proto kolonie dobrým modelem pro studium obecných vývojových principů: buněčné diferenciace, proliferace a dokonce programované buněčné smrti, jak naznačují nejnovější výzkumy (Scherz, Shinder, Engelberg 2001). Neméně zajímavá je i možnost získání odpovědí na klasické otázky vývojové biologie týkající se tvorby tvarů v živých organismech. A nejenom v nich. Kolonie mikroorganismů totiž slouží teoretickým fyzikům jako vynikající modelový systém pro studium tvorby tvarů a samospořádání složitých systémů. Využívají k tomu především kolonie půdní bakterie *Bacillus subtilis* kultivované na pevném médiu s nízkým obsahem živin. Za určitých podmínek mají kolonie *B. subtilis* větvený fraktálový tvar, připomínající fraktálové tvary pozorované v neživých systémech. Takže se na první pohled zdá, že morfologie kolonií je ovlivněna vylučně limitovanou difúzí živin. Ale protože jde o živé systémy, nic není tak prosté, jak by se na první pohled zdálo. Např. při použití extrémně nízkých koncentrací živin totiž vznikají kompaktní nevětvené kolonie. Předpokládá se, že bakterie zde produkují nějaký inhibiční signál a regulují tak svoje chování v zájmu přežití celé populace. Na koloniích tedy lze studovat jak vliv okolního prostředí, tak i vliv geneticky podmíněných faktorů na jejich morfologii.

V současné době, kdy je světová věda doslova zahlcena přemírou detailních informací, začíná být v mnoha oborech kladen důraz na jejich syntézu do jakési vyšší hierarchické úrovně, která již nesleduje vlastnosti jednotlivých nejmenších částí systému, ale systém jako celek. A právě v tomto úsilí budou mít kolonie mikroorganismů a jejich mnohobuněčné struktury obecně stále větší význam a možná budou využity pro porozumění uspořádávání, kooperativitě a chování tak složitých systémů, jako je zemská biosféra.

Tajemný virus chřipky

Marie Otavová, Jan Kynčl

Chřipka (influenza) je vysoce nakažlivé virové onemocnění dýchacího ústrojí. Již od starověku postihuje lidstvo v epidemiích, někdy dokonce v pandemiích (tj. epidemiích, která se rozšíří po celém světě). Epidemie, resp. pandemie chřipky je charakteristická náhlým nástupem viru částečně, resp. zcela odlišných vlastností, než vykazovaly předchozí varianty viru. Chřipka může ochromit zejména průmyslové oblasti s velkou hustotou obyvatelstva a má vážné socioekonomické následky. Jenom v průběhu pandemie v letech 1918–1919 onemocněla chřipkou jedna čtvrtina světové populace a více než 20 milionů lidí v souvislosti s chřipkou zemřelo. Způsobila tedy větší ztráty na životech než 1. světová válka a lze ji srovnávat s epidemiemi moru, cholery nebo pravyých neštovic.

Struktura a vlastnosti viru

Chřipkové viry se řadí do čel. *Orthomyxoviridae*. Z epidemiologického hlediska rozlišujeme tři odlišné typy viru (A, B a C), které taxonomicky představují tři rody —

Influenzavirus A, B a C (viz Živa 2000, 6: 245–248).

Virové částice (viriony) mají tvar sférický, elipsoidní nebo nepravidelný o průměru 80–120 nm, ale mohou se vyskytovat i ve formě vláknité, dlouhé několik μm .

Chřipkové viry strukturně tvoří ribonukleoproteinové jádro uspořádané do helikální nukleokapsidy a mnohotvárný (pleomorfní) obal, který obsahuje lipidy a glykozylované (s navázanou cukernou složkou) a neglykozylované proteiny. Z obalu vyčnívají glykoproteinové výběžky dlouhé 10–14 nm, o průměru 5 nm (viz obr.). Tyto výběžky jsou u viru chřipky typu C uspořádány do pravidelné hexagonální struktury a tím se liší od virů typu A a B. Největším z glykoproteinových výběžků je hemaglutinin (HA). Strukturně jde o trimer, kde každý z monomerů se skládá ze dvou polypeptidových řetězců — HA1 a HA2. HA1 se uplatňuje při vazbě viru k receptorům na povrchu cytoplazmatické membrány hostitelské buňky a HA2 během splývání (fúze) virové a endozomální membrány při průniku virového genomu do cytoplazmy buňky. Další významný povrchový glykoprotein — neuraminidáza (NA) tvoří výběžky dlouhé 10 nm, na jejichž konci je tetramerní globule. Podjednotky tetrameru jsou navzájem spojeny disulfidickými můstky. Účastní se štěpení vazby HA k receptoru buňky v časných fázích průniku viru a především v pozdních fázích při uvolňování nově vytvořených virionů z povrchu infikované buňky. V současnosti známe 15 různých hemaglu-