

Bakterie versus viry

aneb Když se dva perou, můžeme z toho mít užitek?

PETR ZOUHAR

Mgr. Petr Zouhar
viz s. 198.

Četné bakterie jsou známy svou schopností podlamovat lidské zdraví. Zároveň ale všechny bakterie trpí i vlastními zdravotními problémy. Jejich hlavními nepřáteli jsou různé viry (bakteriofágy či krátce fágy), které jsou mimochodem považovány za vůbec nejpočetnější mikroorganismy na Zemi.

Jako každý vir je i bakteriofág pouhý uzlíček proteinů a nukleových kyselin. Pod elektronovým mikroskopem sice vypadají některé fágy jako mrňavé přistávací moduly vesmírných korábů, bez hostitelské bakterie ale neprojevují žádné známky života. Teprve při kontaktu s určitými místy (antigeny) na bakteriální membráně fágové ožívají. Přitisknou se k bakterii a vstřelí do ní svou DNA nebo RNA*. S pomocí hostitelského replikačního a proteosyntetického aparátu pak v cytoplasmě vznikají nové virové částice. Když se jim nashromáždí dostatek, nešťastná bakterie praskne a uvolní do okolí novou várku nebezpečných virů. (V lepším případě fág nějakou dobu počká a množení zahájí až s jistým časovým odstupem.)

Fágy budí značnou pozornost biologické veřejnosti (viz také Hana Španielová, *Vesmír* 85, 750, 2006/12 a *Vesmír* 89, 180, 2010/3). Pro svou schopnost vnášet do bakterií cizorodou nukleovou kyselinu se časem staly užitečnými modely molekulární biologie a genového inženýrství. Dlouho také probíhají pokusy o jejich využití v boji s infekčními chorobami. Tzv. fágová terapie však vždy narážela na naše limitované znalosti biologie virů a uplatnila se proto dosud pouze okrajově. Bakteriofágy jsou ovšem důležitým tématem i pro biotechnologii, kteří se před nimi naopak snaží ochránit své kvasné bakteriální kultury. Jak vidno, porozumět vzájemnému působení bakterií a jejich parazitů je z mnoha důvodů vysoce žádoucí. Povšimněme si nyní jen několika zajímavých aspektů tohoto snažení.

Evoluce ve zkumavce

Bakterie si pochopitelně virové útoky nechťejí nechat jen tak líbit – jako každý napadený se všemožně brání. A protože se bakterie velice rychle množí a snadno mutují, často se jim podaří přijít s nějakou novinkou, kterou na viry vyzrají. Jenže bakteriofágy se množí a mutují ještě rychleji, takže mohou simultánně vyvíjet účinná protipatření. Vztah bakterií a jejich virů je tak krásným příkladem evolučních principů Červené královny přímo v praxi: Ač bakterie i jejich viry mutu-

jí o sto šest a neustále přicházejí s nějakými evolučními novinkami, nikdy nemohou získat dlouhodobější výhodu, protože jejich rival vzápětí přijde s protipatřením.

Bakterie se například snaží zakrývat fágové antigeny na svém povrchu různými maskujícími proteiny nebo polysacharidovými povlaky. Viry na to odpovídají produkcí vlastních enzymů ze skupiny hydroláz a lyáz, které polysacharidy štěpí a antigeny tak znovu zpřístupňují. Ani úspěšný průnik virové nukleové kyseliny do buňky však ještě není zárukou úspěchu. V cytoplasmě totiž na virovou DNA čekají štěpící enzymy, tzv. restriční endonukleázy. Ty jsou schopné rozpoznat konkrétní sekvence nukleotidů a v předem určeném restričním místě DNA rozštěpit. Aby endonukleázy nenapadaly vlastní bakteriální DNA, ve které by se dané sekvence mohly rovněž vyskytnout, označují si bakterie svoji nukleovou kyselinu (resp. určité cytosiny v ní) pomocí methylových značek. Methylační enzymy pracují v součinnosti s endonukleázami a bakterie spoléhá na to, že se jí podaří rozštěpit virovou DNA dříve, než bude rovněž namethylována.

Na to odpovídají některé viry hromaděním bodových mutací, až se jim nakonec podaří zbavit se všech restričních míst ve svém genomu. Jiné fágy si zase ukradly gen pro methylační enzym a mohou tak svou DNA chránit samy. Hotové závody ve zbrojení pak popisuje rámeček.

Je zřejmé, že restriční endonukleázy představují jen jednu etapu rozsáhlé války. Mnoho bakteriofágů se jim bez obtíží vymanilo. Ovšem pro výzkumníky představují endonukleázy naprosto nepostradatelný nástroj, který umožnil rozvoj genového inženýrství. Jejich objev na počátku sedmdesátých let odstartoval zcela novou etapu molekulární biologie a jako takový byl v r. 1978 oceněn Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu (získali ji Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton O. Smith).

Imunitní systém bakterie

V poslední době se ukazuje, že bakterie vlastní i jakýsi systém adaptivní imunity. Pokud se virus nepomnoží a nezničí buňku hned, může si bakterie uložit kousek jeho DNA a s jeho pomocí později účinně ničit všechny podobné sekvence. Stejně se lze bránit i invazivním plazmidům. Bakterie v obou případech používá speciálních malých RNA a celý proces tak vnějšími rysy připomíná fenomén RNA interference u eukaryot (např. *Vesmír* 86, 110, 2007/2).

* Mnohem hlubší jsou naše znalosti bakteriofágů s DNA než s RNA.

K DALŠÍMU ČTENÍ

Labrie et al.: *Nat Rev Microbiol.* 8, 317–327, 2010

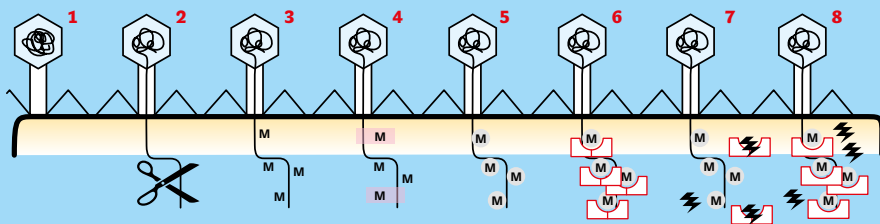
Brouns: *Science.* 337, 808–809, 2012

Jinek et al.: *Science.* 337, 816–821, 2012

Závody ve zbrojení

Escherichia coli se brání virům pomocí restrikčních endonukleáz štěpících určité sekvence s nemethylovaným cytosinem (nůžky, 2). Některým bakteriofágům T4 útočícím na *Escherichii coli* se podařilo na restrikční systém vyžrát tak,

že do své DNA zařazují místo cytosinu rovnou hydroxymethylcytosin (značený M, 3). Není jim to ovšem mnoho platné – *E. coli* vyvinula enzymy rozlišující i hydroxymethylcytosin (např. McrA, znázorněný obdélníkem, 4).



Na T4 fág si však jen tak nepřijdete: Pro jistotu ještě ověsil svou DNA glukosylovými zbytky (šedé kroužky, 5), čímž enzymu McrA unikl. Jeden z kmenů *E. coli* ovšem přišel s komplexem dvou proteinů (GmrS a GmrD, znázorněné červenou vaničkou, 6), které likvidují právě glukosylovanou DNA. T4 fágy zareagovaly vytvořením interního proteinu I (IPI, znázorněný bleskem, 7), který se do bakterie dostává spolu s virovou DNA a znemožňuje spojení obou složek likvidačního komplexu. I na to však existuje snadná pomoc: Část bakterií *E. coli* sloučila oba geny pro proteiny komplexu a začala vyrábět fúzní protein (spojená vanička, 8), proti němuž IPI pochopitelně nezabírá. Dočasným vítězem je však bakteriofág T4, který i toto opatření obešel, byť zatím není přesně popsáno, jak se mu to podařilo.

Už v osmdesátých letech byla u některých bakterií popsána zpočátku záhadná část genomu sestávající z opakujících se krátkých sekvencí a rozličných vymezených úseků. Tento úsek DNA byl poněkud krkolomně označen za „nahuštěná pravidelně prokládaná krátká palindromatická opakování“ (krátce CRISPR z *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). V těsné blízkosti této sekvence mívají bakterie uloženu kazetu genů kódující proteiny, které s CRISPR dále pracují.

O funkci CRISPR se dlouho spekulovalo. Poté se však ukázalo, že vymezené kusy DNA odpovídají sekvencím známým z různých bakteriofágů. Zdá se, že bakterie pomocí různých čas proteinů najde určité vhodné úseky virové DNA a ty si potom ne zcela dobře popsaným způsobem uloží do svých CRISPR. Přežije-li první setkání s virem, je na další návštěvníky již dobře připravena. CRISPR se přepisuje za vzniku tzv. crRNA, která se pak různě upravuje pomocí dalších cas enzymů a eventuálně ještě malé transkripční tracrRNA. Výsledná crRNA může párovat s dalšími příchozími viry. Pokud je identifikována virová DNA komplementární k crRNA, další komplex cas enzymů virus rozstříhá a zneškodní (viz obr.).

I proti takovému aparátu se bakteriofágy snaží bránit mutacemi. Pokud se jim podaří zmutovat části svého genomu, které mají bakterie uloženy v paměti, uniknou rozstípaní. Stále však mohou být začleněny do CRISPR dalších bakterií. Nejzazší metodou tedy je zbavit se všech úseků DNA vhodných k začlenění do CRISPR, což už je ovšem výrazně náročnější úkol.

Stejně jako v případě RNA interference, likviduje i systém CRISPR nukleovou kyselinu párující s malou RNA. Obě lze využít i v boji s viry, ovšem vlastní mechanismus se liší. Evoluce zde nezávisle dospěla k podobnému použití malých RNA u bakterií i eukaryot. Systém CRISPR se oproti eukaryotickým miRNA a siRNA vyznačuje vlastní adaptivní „pamětí“ a cílí na parazitickou DNA a nikoli RNA.

Nyní můžeme čekat, zda objev crRNA přinese praktické využití podobně jako kdysi

odhalení restrikčních endonukleáz. RNA interference je už nyní široce používána k umlčování různých genů (tím si vysloužili Andrew Z. Fire a Craig C. Mello Nobelovu cenu za fyziologii z roku 2006). Na crRNA je lákavé, že umožňuje štepit přímo DNA. Mohl by tu vznikat prostor pro cílené zásahy do genomu nemocných. Zatím se v oblasti genové terapie vkládají největší naděje do uměle připravených nukleáz s motivem zinkových prstů. Tato cesta ovšem vyžaduje náročné proteinové inženýrství, kdykoli se pokusíme začít na novou sekvenci. crRNA navržená tak, aby párovala se škodlivou alelou, naproti tomu teoreticky představuje výrazně jednodušší řešení. Zajímavý je v tomto směru zejména CRISPR systém typu II (známý např. z bakterie *Streptococcus pyogenes*), který štěpí cizorodou DNA pomocí jediného enzymu Cas9. Tento jednoduchý aparát sice vyžaduje vedle crRNA i zmíněnou tracrRNA, není však žádným problémem připravit chimérickou crRNA, která bude obsahovat nezbytné sekvence obou potřebných složek.

Odvěký boj bakterií a jejich virů, jako již mnohokrát v minulosti, nám možná již brzo přinese další důležitý nástroj, který znovu posune dále teoretickou biologii a snad časem i medicínu.

Schéma fungování bakteriálního imunitního systému CRISPR.
 1. Pomocí jednoho z cas proteinů dochází k vložení vhodné části virové DNA (modrý obdélník) do sekvence CRISPR.
 2. CRISPR je přepisován do podoby nezralé crRNA.
 3. Pomocí dalšího z cas proteinů dochází k úpravám crRNA.
 4. Při opakované virové infekci štípe poslední cas protein virovou DNA, která páruje s crRNA.

