

Dva „staré“ druhy trypanozom – petite mutanti trypanozomy spavičné

Většina čtenářů Živy patrně slyšela o trypanozomě spavičné (viz Živa 2003, 3: 101–102) způsobující africkou spavou nemoc, kterou přenáší neslavně proslulá moucha tse-tse (rod *Glossina*). Skutečnost je ale složitější, jelikož jsou známy nejméně tři odlišné formy tohoto parazita a také příslušné choroby: spavou nemoc u dobytka a volně žijících velkých savců, zvanou též nagana podle domorodého označení n'gana, způsobuje poddruh *Trypanosoma brucei brucei*, zatímco původcem nejvážnější formy spavé nemoci u člověka je *T. b. rhodesiense* (tzv. západoafrická horečka), která je pro svého neléčeného hostitele smrtelná během několika měsíců. Za třetí, trochu mírnější formu spavé nemoci (tzv. východoafrickou horečku) vyskytující se i u člověka, zodpovídá *T. b. gambiense*.

Toto rozdělení trypanozom popsané před několika desetiletími je stále platné. *T. b. brucei* není na člověka přenosná, jelikož je v lidském séru velice efektivně lyzována (tedy zničena). Tato účinná eliminace smrtelného parazita je umožněna přítomností lytického faktoru v naší krvi. Bohužel nás tento faktor už nechrání před východo- a západoafrickou horečkou, jelikož se jejich původci naučili lyzi uniknout. Avšak nedávno belgičtí a američtí vědci ukázali, že sérum šimpanzů (ale už ne goril) dokáže lyzovat i nejnebezpečnější *T. b. rhodesiense*. Pokud by se podařilo přenést gen pro příslušnou bílkovinu do lidského genomu, znamenalo by to trvalou ochranu našich potomků před tímto smrtelným prvokem. Ačkoli může leckomu znít toto konstatování jako sci-fi, jsem přesvědčen, že se v dohledné době bude brát vážně.

Cílem tohoto pojednání je ale seznámit čtenáře se dvěma dalšími členy této parazitické rodiny. Prvním z nich je *Trypano-*

soma equiperdum, více než 100 let známý původce tzv. duriny u koní, což je celosvětově rozšířená, ale v současnosti již nashť relativně vzácná choroba. Toto onemocnění přenášené pohlavním stykem je pro koně smrtelné a v rámci Evropské unie tudíž velmi pečlivě sledované. Veterináři musí u všech importovaných koní provádět sérodiagnózu a v případech zjištění patogenu je kuň neodkladně utracen, aniž by se hledělo na jeho cenu. Mnohem rozšířenější nemocí je surra, kterou způsobuje *T. evansi* u koní, velbloudů, vodních buvolů a patrně i oslů, a to na všech kontinentech s výjimkou Austrálie. Na rozdíl od výše popsaných onemocnění není nevyhnutelně smrtelná. Zato však kvůli svému širokému rozšíření a závislosti milionů lidí v chudých tropických zemích na velbloudech a vodních buvolích přináší obrovské škody.

Spolu s našimi kolegy v Číně a Spojených státech jsme se zabývali otázkou příbuznosti *T. evansi* a *T. equiperdum* s trypano-

nozomami ze skupiny *T. brucei*. Jelikož jsou na úrovni nukleotidových sekvencí řady běžně studovaných genů pouze zanedbatelné rozdíly, zaměřili jsme se na analýzu mitochondriální DNA.

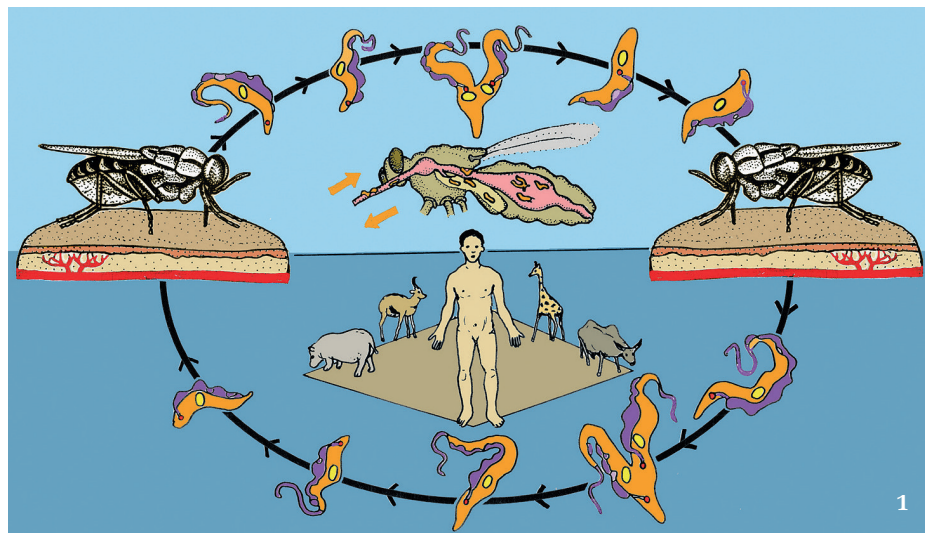
V každé eukaryotické buňce je většina DNA uložena v jádře, zatímco pouze malá část je obsažena v mitochondrii. Trypanozomy a příbuzní bičíkovci jsou mimořádně tím, že jejich mitochondriální DNA se skládá z tisíců malých kruhových molekul (tzv. minikroužků) a desítek velkých kruhů neboli maxikroužků. Všechny kroužky jsou vzájemně propojeny a tvoří jedinou velmi přesně organizovanou síť označovanou jako kinetoplastová (k) DNA. Vědci si dlouho lámali hlavu, proč se právě u trypanozom vyvinula nejsložitější známá mitochondriální DNA. Odpovědí na tuto otázku byl objev editování RNA, což je složitý proces, při němž se na úrovni RNA mění pořadí nukleotidů (blíže článek H. Hashimi a J. Lukeše v příštím čísle Živy).

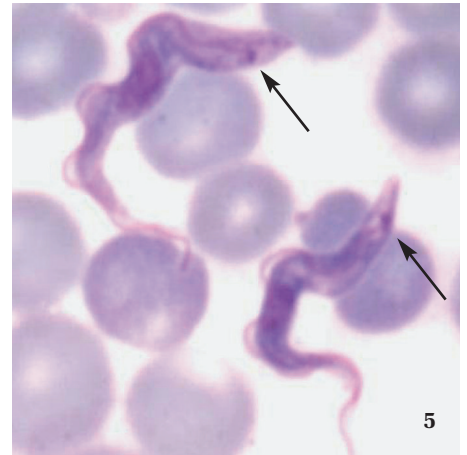
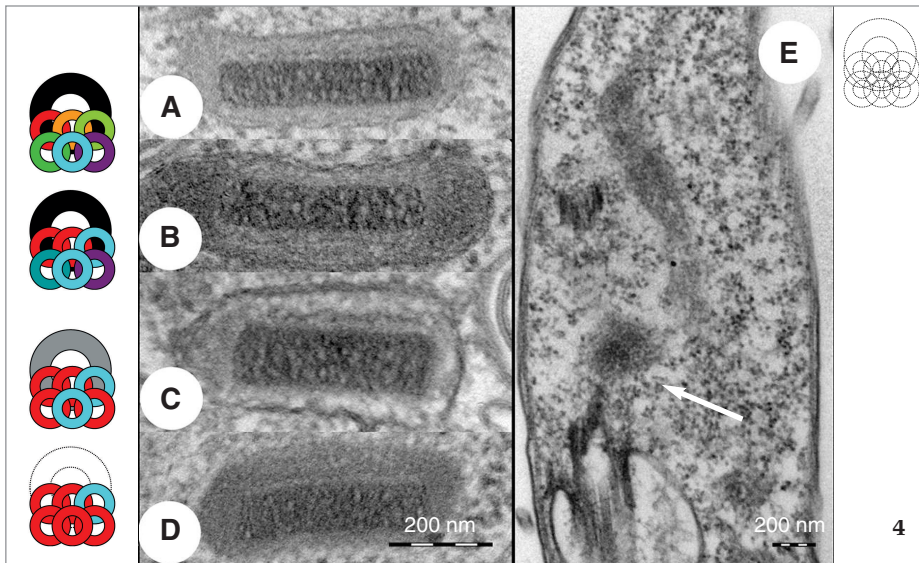
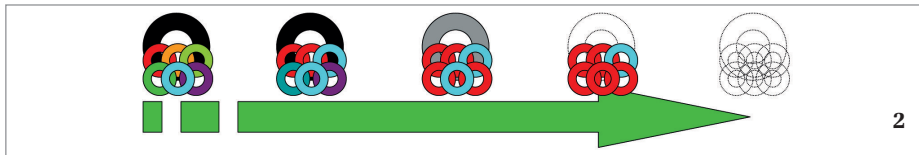
Naši laboratoř zajímalo, zda bičíkovci řazení do druhů *T. equiperdum* a *T. evansi* mají stejně uspořádanou kDNA jako zástupci vlajkového druhu *T. brucei*. K tomuto účelu jsme si z různých zdrojů pořídili širokou paletu kmenů řazených do obou výše uvedených druhů, pocházejících z různých světadílů a izolovaných z různých hostitelů, z nichž nejstarší kmeny byly získány z koňské krve již v r. 1907. I po desetiletích uložení v tekutém dusíku zůstávají všechny kmeny životaschopné a patogenní. Strukturu kDNA jednotlivých izolátů jsme studovali řadou molekulárně-biologických metod a získané výsledky byly značně překvapivé.

Dosud bylo známo, že *T. equiperdum* a *T. evansi* mají menší kDNA, jejíž některé části jim chybějí. Nám se ale podrobnou srovnávací analýzou mnoha kmenů podařilo ukázat, že všechny jsou na šikmé ploše, kdy různé poruchy kDNA vedou k jejím dalším poškozením, až posléze veškerou kDNA trypanozoma ztratí. Ze studovaných kmenů jsme vytvořili sérii (obr. 2 a 4) postupující od bičíkovců s kompletní kDNA (A), přes buňky, které ztratily část maxikroužku (B) a některé minikroužky (C), až k parazitům zcela bez maxikroužků (D). V další fázi se počet a sekvenční rozmanitost minikroužků z původních asi 5 000 snižuje, až tyto kruhové molekuly DNA zcela zmizí (E). Poslední stadium je akinetoplastické, neboli bez kinetoplastu.

Proč mohou tyto evolučně prastarší paraziti ztratit části a nakonec veškerou kDNA a takovou ztrátu vůbec přežít, natož stále ve velmi patogenní formě? Odpověď na tuto otázku najdeme v životním cyklu a metabolismu trypanozom. V mouchě tse-tse musí mít trypanozoma (která je zde ve formě tzv. procyklického stadia) aktivní mitochondrii, která podobně jako ve většině eukaryotických buněk vyrábí ATP (hlavní energetické platidlo) za spotřeby kyslíku. Po přenosu do krve se ale parazit proměňuje v metabolicky dramaticky odlišné tzv. krevní stadium. Jelikož se trypanozoma ocitla v prostředí s nadbytkem cukru

1 Schéma životního cyklu trypanozom ze skupiny *Trypanosoma brucei*. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) kreslila M. Chumchalová





glukózy, přestane vyrábět ATP mitochondriální respirací a přepne na jednodušší, i když méně efektivní produkci ATP glykolýzou. Dokáže se velmi rychle množit a díky pravidelné výměně své povrchové bílkoviny účinně unikat imunitní odpovědi hostitele (Vesmír 1997, 5: 257–263).

Jaký význam ale mají metabolické rozdíly mezi procyklickým a krevním stadiem *T. brucei* pro naše nálezy zmenšující se kDNA u původců surry a duriny? Lze bez přehánění říci, že zásadní. Podle naší teorie přišly *T. equiperdum* a *T. evansi* kvůli neopravené poruše složitě kDNA o možnost přenosu přes mouchu tse-tse, protože tím jejich mitochondrie ztrácí schopnost produkovat ATP. Kinetoplastová DNA kóduje, podobně jako každá mitochondriální DNA, klíčové podjednotky dýchacího řetězce, bez nichž organela ztrácí schopnost vyrábět ATP a v chudém prostředí střeva či slinných žláz mouchy se pak trypanozoma neživí. Za normálních okolností by to byl konec parazita, jelikož by se nemohl dál přenášet a se svým hostitelem by zahynul. Jenomže po stovkách milionů let evoluce našli i tito podivně poškození paraziti východisko. Začali se přenášet pohlavním stykem nebo pasivně na sosačku ovádů, kteří po sání na jedné krávi přeletí a napijí se krve i její sousedky. Touto strategií se ale „poškozené“ trypanozomy staly nezávislými na mouchě tse-tse, která se vyskytuje pouze v oblasti rovníkové Afriky. Takže porucha a poslední ztráta kDNA umožnily *T. equiperdum* a *T. evansi* šířit se tam, kde jejich hostitelé praktikují sex (tedy všude), či kde se vyskytuje krevsající hmyz, zejména ovádi (téměř všude).

Další zajímavé zjištění přineslo předběžné porovnání genomů *T. equiperdum*, *T. evansi* a *T. brucei*. Je z něj zřejmé, že mají velmi podobnou jadernou DNA a rozdíly mezi nimi spočívají právě v kDNA. Podobný případ byl dosud popsán pouze u kvasinek. Již více než 50 let je známo, že kvasinky, které ztratily svou mitochondriální DNA, přežijí pouze v médiu bohatém

na glukózu a jsou označovány jako petite (z francouzského malý podle velikosti jejich kolonií) mutanti. Logický závěr tudíž je, že *T. equiperdum* a *T. evansi* jsou petite mutanti *T. brucei*.

Toto elegantní vysvětlení situace popsané u afrických trypanozom však zakládá dva velké problémy, které je nutné diskutovat. Jedním z hlavních principů evoluční biologie je, že organismus dříve nebo později ztratí vše, bez čeho se může obejít (produkovat cokoli nepotřebné ho znevýhodňuje v soutěži s ostatními organismy). Proč se tedy *T. brucei* zatěžuje složitým cyklem přes mouchu tse-tse, k čemuž navíc potřebuje obrovskou kDNA, zatímco její petite mutanti se bez obojího nejen obejdu, ale mohou se díky této ztrátě paradoxně rozšířit z Afriky do celého světa? Druhým problémem je, že v různých kmenech trypanozom nacházíme všechny mezistupně od kmenů s kompletní kDNA přes kmeny, které jí část ztratily, až po ty, které o veškerou kDNA již přišly. Organismy, které pozorujeme, se však pravděpodobně vyvinuly před stovkami milionů let a je tedy prakticky vyloučené, že bychom kolem sebe měli všechny vývojové mezistupně. Do současnosti by měly přetrvat jen oba extrém – *T. brucei* s kompletní kDNA (zachovává si ji kvůli nějaké evoluční výhodě) a *T. evansi* zcela bez kinetoplastu, rozšířená všude, kde jsou její hostitelé.

Předkládáme laskavému čtenáři naše vysvětlení obou problémů. Kmeny *T. equiperdum* a *T. evansi* z evolučního hlediska po velmi krátkou dobu (zda roky či staletí zatím nelze rozhodnout) celkem úspěšně na svých hostitelích parazitují a šíří se po světě, ale postupující ztráta jejich kDNA vede nakonec k jejich eliminaci. V Africe ale neustále vznikají nové petite kmeny s poškozenou kDNA, které nemohou díky ztrátě přenosu přes mouchu tse-tse soutěžit s „rodičovskou“ *T. brucei*, a tak se nevyhnutelně a souvisle šíří mimo Afriku, kde jim už tato konkurence neohroží.

2 Schéma postupné ztráty mitochondriální (kinetoplastové; k) DNA. Z úplné kDNA *T. brucei* (zcela vlevo) se během její přeměny na *T. evansi* postupně ztrácí maximální počet (černě až šedě) a sekvenčně různorodé minikroužky (barevně) jsou homogenizovány, tj. vytrácí se jednotlivé třídy, až jsou přítomny jen 1–2 typy minikroužků. Poté dochází ke ztrátě maximálního počtu a nakonec i minikroužků (zcela vpravo). Ztracené maxi a minikroužky tečkované. Orig. J. Lukeš

3 Sající moucha tse-tse (*Glossina morsitans*). Foto D. Modrý
4 Postupná ztráta maxi a minikroužků se na ultrastruktuře kDNA neprojevuje (A–D), protože se vytrácí různorodost minikroužků, ale jejich celkový počet je zachován. Až při ztrátě minikroužků celá struktura zkolabuje (E). V této části je patrný kinetozom bičíku (šipka).
5 Původce spavé nemoci *T. brucei* v krevním roztěru. Šipky označují kDNA. Snímky J. Lukeše, není-li uvedeno jinak

Výsledkem je, že černý kontinent ovládá nepoškozená (evolučně „nejúspěšnější“) *T. brucei*, v jejíž buňkách se ale extrémně složitá kDNA poměrně často porouchává. Díky výše popsané strategii přenosu většinou takto porouchané buňky zahynou, ale někdy se jim podaří expandovat z Afriky jako tzv. *T. equiperdum* a *T. evansi*. Nakonec jsou však přece jen evolučními tlaky postupně eliminovány, a to pravděpodobně „nedostatkem sexu“ (resp. nemožností sexuálního rozmnožování a z něj plynoucích evolučních výhod), který si mohou užívat pouze jako *T. brucei* ve slinných žlázách much tse-tse.

Poučení z tohoto trochu spletitého případu je veskrze pozitivní. Naše zjištění totiž zakládají solidní naději, že léky blokující jakékoli jaderné bílkoviny *T. brucei* budou účinné i proti *T. equiperdum* a *T. evansi* a v optimálním případě bychom tak při boji proti těmto malým zabijákům mohli „zabít dvě mouchy jednou ranou“.