

Sekvenování jednotlivých buněk: odhalení diplomem, neznámých, a přesto početných prvoků

Asi nikdo nezapochybuje nad tvrzením, že sekvenování DNA dramaticky proměňuje biologii. Když na přelomu tisíciletí oznámil z Bílého domu prezident Bill Clinton a dva prominentní molekulární biologové, že čtení lidské sekvenční DNA je dokončeno, bylo jasné, že jde o skutečný milník (viz článek v Živě 2016, 5: 203–206). Ten ovšem stál několik miliard dolarů, čtení nukleotidů DNA a RNA zůstávalo velmi drahé a omezené na dobře vybavené molekulárněbiologické laboratoře. To se ale v následujících letech změnilo. Cena určení jednoho nukleotidu („písmene DNA“) klesla díky novým metodám sekvenování DNA (Next Generation Sequencing, NGS) na neuvěřitelnou stotisícinu cen před 15 lety. Nyní se ve specializovaných firmách sekvenuje na přístrojích, které přechtí miliony „písmen“ za hodinu. Každý z nás si už může za přijatelnou cenu nechat přečíst vlastní genom nebo třeba genom mikrobu, kteří v nás žijí – tzv. mikrobiom (viz např. v Živě 2015, 3: 106–107). Není však naším cílem rozebírat možnosti, které čtení genetické informace přináší (např. objevování příčin chorob, genetické pozadí znaků, ožívování vyhynulých organismů, manipulace s lidským mikrobiomem), ale zamyslet se nad jedním z limitů této dominující metody molekulární biologie.

Omezujícím faktorem je nutnost značného množství DNA či RNA pro následné sekvenování, a tudíž nezbytnost izolace nukleových kyselin alespoň z tisíců buněk. Toto množství sice nepředstavuje žádný problém při analýzách lidské DNA nebo jiných vícebuněčných organismů, ale výrazně omezuje použitelnost sekvenování v případě jednobuněčných organismů, jež se z nějakého důvodu nedají laboratorně namnožit, jako jsou např. některé bakterie a prvoci.

V případě bakterií, které mají většinou malé genomy, se tento problém podařilo vyřešit tzv. masivním sekvenováním. DNA izolovaná ze směsi desítek až stovek různých druhů se při něm sekvenuje tzv. do

hloubky (anglicky deep sequencing), což znamená, že se přečtou miliony krátkých úseků. Z nich se posléze, za využití sofistikovaných programů, poskládají genomy jednotlivých druhů bakterií, pocházející původně z nepřehledné směsi. Jde o počítačově velmi náročnou záležitost, ale díky tomuto přístupu už nejsou pro molekulární biologie nekultivovatelné bakterie nedostupné.

Zcela s jinou situací se setkáváme u prvoků (jednobuněčných eukaryotických organismů s jádrem), majících většinou obrovské genomy, které proto nelze tímto přístupem sestavit. Jejich studium se tedy zatím omezilo na pouhých několik stovek druhů, které máme k dispozici v kultuře,

v dostatečném množství pro izolaci nukleových kyselin a jejich následné sekvenování. Tato situace je však značně omezující, protože, jak bude zřejmé z dalších řádků, význam prvoků v současné biologii výrazně stoupá.

Díky environmentálnímu sekvenování, což je sekvenování DNA všech organismů nacházejících se v daném vzorku odebraném na určitém stanovišti nebo v určitém prostředí, jsme se teprve v posledních letech dozvěděli, že přibližně tři čtvrtiny rozmanitosti eukaryotického života na naší planetě se ve skutečnosti ukrývají mezi prvoky (protisty). Znamená to, že diverzita veškerého živého světa viditelného pouhým okem, od drobných mechů nebo ráčků až po sekvoje nebo plejtváky, pokrývá jen zbývající jednu třetinu rozmanitosti eukaryot. To je bezpochyby velké překvapení pro ty, kteří znají prvoky pouze z několika počátečních stránek přírodovědeckých učebnic, v nichž navíc bývají zmiňovány většinou jen parazitické trypanozomy (původci spavé nemoci) a plazmodia (původci malárie), možná doplněné o volně žijící krásnoočka a nálevníky. Až molekulární biologie odhalila, že rozdíl mezi prvoky, kteří se navzájem liší třeba jen počtem bičků či způsobem pohybu, a proto byli řazeni maximálně do jiné čeledi nebo řádu, jsou mnohem větší, než jsme tušili (viz také Živa 2016, 1: 27–30). Jejich skutečná odlišnost může být bez nadsázky srovnatelná s rozdílem mezi kukuřicí a slonem. Při nepatrné velikosti prvoků a hrstce znaků rozeznatelných pod světelným nebo elektronovým mikroskopem nám jejich diametrální odlišnosti unikaly až do chvíle, kdy jsme odhalili obrovské rozdíly na úrovni nukleových kyselin. A tak bychom mohli říci, že prvoci dosud žili své životy „pod svícnem“, kde je, jak známo, největší tma.

Pozornost vědců a lékařů se ze zřejmých důvodů soustřeďuje především na parazitické prvoky, kteří způsobují závažné choroby, zatímco jejich neškodní příbuzní zůstávali vesměs přehlíženi jako celkem bezvýznamný „šlem“, o němž se zajímá jen několik extrovertních vědců ze základního výzkumu. Díky novým technikám a současným objevům je skutečně nejvyšší čas náš velmi omezený pohled na prvoky změnit. Cílem dalších výzkumů by se mělo stát objasnění rozmanitých principů v molekulárním uspořádání, díky kterým se těmto nejstarším eukaryotickým organismům



1



2

1 Polská loď Oceania. Během měsíční expedice byly odebírány na pobřeží souostroví Špicberky vzorky mořské vody z hloubky 50 až 1 000 m.

Foto O. Flegontova (Parazitologický ústav Biologického centra AV ČR)

2 Přístroj CTD (Conductivity, Temperature and Depth), měřící vodivost, teplotu vody a hloubku, slouží k odebírání vzorků vody. Na CTD systém je připojena rozeta vybavená 8 dvanáctilitrovými a čtyřmi dvoulitrovými Niskin lahvemi (slouží přímo k odběru vody z určité hloubky).

Foto O. Flegontova

3 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu ukazuje ultrastrukturu dosud nepopsaného zástupce rodu *Diplonema* (prozatím označovaného číslem 1603).

V přední části buňky si všimněte vystupujícího hltanu (pharynxu), v zadní části tří endosymbiontů. Mitochondrie jsou uloženy na okrajích buňky, v níž se nachází i množství vakuol sloužících k trávení potravy.

4 Další dosud nepopsaný druh diplomemida (zatím pouze s číslem 1605) patří do rodu *Diplonema*. Také tento prvok obsahuje uvnitř buněk endosymbionty. Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu

5 Nepopsaný diplomemid s číslem 1515 z rodu *Rhynchopus* ve skenovacím elektronovém mikroskopu. Snímky: G. Prokopchuk, není-li uvedeno jinak

6 Druh izolovaný ze vzorku mořské vody na východním pobřeží USA v r. 1986. Pojmenovali jsme ho *Flectonema neradi* (a vytvořili tak nový rod). Buňka na obr. ze světelného mikroskopu je asi 10 μm dlouhá. Foto D. Tashyreva

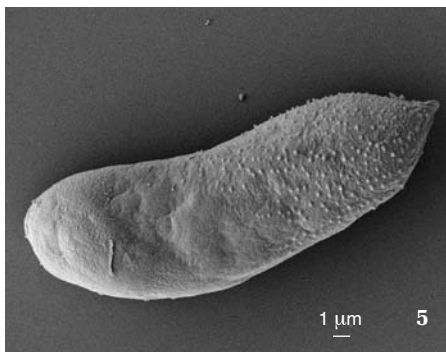
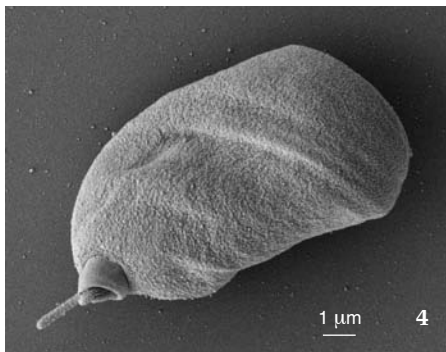
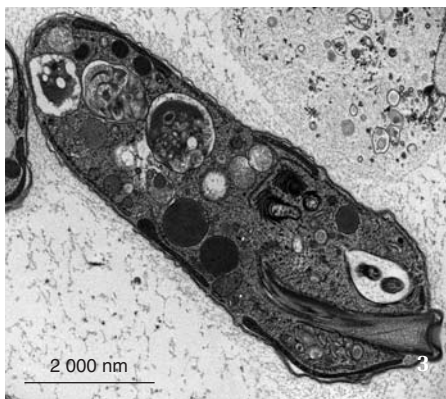
naší planety podařilo nejen úspěšně překonat všechny nástrahy poslední miliardy let, ale po většinu času též nevídaně prosperovat.

Základním problémem práce s prvky je už zmíněný fakt, že naprostou většinu druhů nelze kultivovat a množit, a tudíž získat dostatečné množství jejich nukleových kyselin potřebných pro sekvenování. Tuto kritickou situaci řeší nová průlomová metoda, která umožňuje sekvenovat genom či transkriptom jednotlivých buněk. Metoda nese označení SCS (Single Cell Sequencing). V navazujícím kulérovém článku na str. LXXIII–LXXVI této Živy je podrobně vysvětleno, že spočívá v izolaci pouhých pikogramů DNA/RNA z jediné buňky a následném elegantním namnožení takto získané DNA/RNA vedoucí po složení jednotlivých fragmentů k přečtení (ideálně) celého genomu nebo transkriptomu.

Metoda SCS pomohla vyřešit již několik zapeklých biologických problémů. Následující příklad se týká specifické situace, kdy bylo nutné odhalit vizuální podobu jedné z dominantních skupin organismů na Zemi, která přes překvapivě početné zastoupení (jak jedinců, tak i druhů) zcela unikala našemu poznání. Jde o hon na mořské prvky diplomemy (řád Diplonemida), na kterém jsem měl možnost se podílet.

Nečekaně všudypřítomné diplomemy

Mezinárodní expedice pod francouzským vedením TARA Oceans sbírala v letech 2011–15 vzorky mořského planktonu po



celém světě. Jedním z nejpозорuhodnějších biologických nálezů bylo zjištění, že se v naprosté většině vzorků hojně vyskytovali zástupci dosud téměř neznámé skupiny prvoků zvaných diplomemy. Sekvence těchto heterotrofních prvoků sice byly před několika lety objeveny v hlubokomořských vzorcích a v literatuře lze rovněž najít několik morfologických popisů diplomem, ale to je zhruba všechno, co o nich víme. Diplomemy patří do příbuzenstva nechvalně proslulých trypanozom, ale na rozdíl od těchto krevních bičíkovic věděla o jejich existenci dosud jen hrstka specialistů. To však dramaticky změnila právě expedice TARA Oceans. Ze získaných vzorků byly zmnoženy a následně velmi pečlivě analyzovány miliony částí genů pro 18S rRNA (genů kódujících malou ribozomální podjednotku) příslušejících právě k diplomemám (de Vargas a kol. 2015), kte-

ré se tak náhle zařadily mezi nejběžnější mořské prvky (Lukeš a kol. 2015). Tyto výsledky přinesly opravdu velké překvapení, jež se setkalo se značnou nedůvěrou, protože mnoho vědců nevěřilo, že by tyto prvci byli tak všudypřítomní a přítomni přehlížení. Další nové poznatky údiv ještě vystupňovaly. V databázích se objevily miliony sekvencí diplomem, takže počet jejich druhů byl odhadnut na neuvěřitelné desítky tisíc s tím, že se některé druhy vyskytují ve světovém oceánu prakticky všude (Flegontova a kol. 2016). Kolem diplomem začalo být opravdu rušno. Celá věc měla však jeden podstatný háček. Nositele inkriminovaných sekvencí, tedy živé, nebo alespoň fixované buňky diplomem dosud nikdo neviděl! Nevíme tedy nic o jejich morfologii, chování ani životních cyklech. Ačkoli byly provedeny všemožné testy a různé kontroly dokazující správnost získaných sekvencí, existoval pouze jeden způsob, jak přetrvávající pochybnosti rozptýlit. Bylo nutné diplomemy opravdu chytit. Řekli bychom „Wanted – Dead or Alive“. Úkol spočíval v ulovení alespoň několika buněk a získání genetické informace z každé z nich. Tento přístup by jednoznačně potvrdil běžnou přítomnost ve světovém oceánu i jejich nesmírnou druhovou rozmanitost. Byl to celkem snadný plán, ale realizace vyžadovala spoustu peněz a úsilí.

Hon na diplomemy začal vlastně nedávno, při plavbě výzkumné lodi Western Flyer v Tichém oceánu (2014), asi 800 km od kalifornského pobřeží. Studenti z laboratoře prof. Patricka Keelina z Univerzity Britské Kolumbie v kanadském Vancouveru se zaměřili na získání buněk heterotrofních bičíkovic z hloubky 50–160 m. I přes náročné podmínky na houpající se lodi se jim nakonec podařilo oddělit do 90 mikrozkuumavek vždy jednu jedinou buňku, kterou předtím vyfotografovali pod mikroskopem. Z jednotlivých prvoků izolovali DNA, zmnožili pomocí polymerázové řetězové reakce gen pro 18S rRNA a ukázali, že čtvrtina chycených buněk náleží mezi diplomemy. To bylo zcela zásadní zjištění a definitivní důkaz, který nejen potvrdil obrovskou početnost diplomem v mořích (díky dosud nepublikovaným datům dnes víme, že jejich množství stoupá s hloubkou), ale zároveň poprvé dalo těmto záhadným prvokům tvář. Jejich velikost se pohybuje od 7 do 20 μm a všichni pozorovaní zástupci mají protáhlý tvar a dva různé dlouhé (heterokontní) bičíky. Velice zajímavý byl i další poznatek. Zatímco většina kalifornských diplomem se v globálních vzorcích z expedice TARA vyskytovala v desítkách až tisícovkách sekvencí, mezi oněmi 20 buňkami byly i dva protichůdné extrémy. Diplomema označovaná pracovně „buňka 37“ byla zachycena v 6,5 milionech sekvencí. Byla nalezena na téměř všech sběrných místech, a patří tak mezi několik nejčastěji zaznamenaných a ve světovém oceánu všudypřítomných druhů prvoků. Naopak její bližce příbuzná „buňka 13“ se v datech expedice TARA vůbec neobjevila, jde patrně o druh s geograficky silně limitovaným výskytem. Nález potvrzuje předchozí domněnku, která vychází z analýzy 850 vzorků expedice TARA sebraných z celého světa: u diplomem zatím nebylo dosaženo tzv. saturace druhů. To znamená,

že dostupná data zdaleka neobsahují všechny existující druhy, a lze proto předpokládat, že počet druhů (v současnosti mluvíme o desítkách tisíc) ještě poroste.

To však není jediný problém. Další se týká množení celých genomů jednotlivých buněk diplomem metodou SCS. Přes všechnu snahu kalifornské expedice neproběhl tento krok ideálně. Studentům z Vancouveru a jejich kolegům z amerických, britské a také české laboratoře se podařilo získat pouze nenavazující úseky jaderných genomů. Navíc se většinu genomů nepovedlo téměř vůbec zmnožit (počet sekvenovaných bází kolísá mezi 16 a 303 miliony,

což představuje jen část genomů; Gawryluk a kol. 2016). I přesto mezinárodní tým dokázal analyzovat více než 4 000 genů, které poskytují první vhled do metabolizmu a životních strategií diplomem.

Závěrem lze konstatovat, že se nám sice podařilo objevit pravděpodobně poslední velkou a téměř neznámou skupinu organismů na této planetě, na druhou stranu jsme nuceni si přiznat, že o této zřejmě druhově nejbohatší skupině mořských organismů stále nevíme skoro nic. Získané výsledky ale naznačují cesty, jak přijít na kloub ekologické funkci diplomem a jak studovat jejich molekulární zvláštnosti.

Jak už to v současném světě bývá, nárůst významu těchto dosud přehlížených prvků snad pomůže přilákat více finančních zdrojů a více vědců se nadchne pro studium záhad pozoruhodných, převážně hlubokomořských bičíkovic patřících do skupiny diplomem.

Tento výzkum je financován z projektu ERC CZ (LL1601), nadací Gordona a Betty Mooreových a Kanadským ústavem pro pokročilý výzkum (CIFAR).

Seznam citované literatury najdete na webové stránce Živy.

Martin Kolísko

K výuce

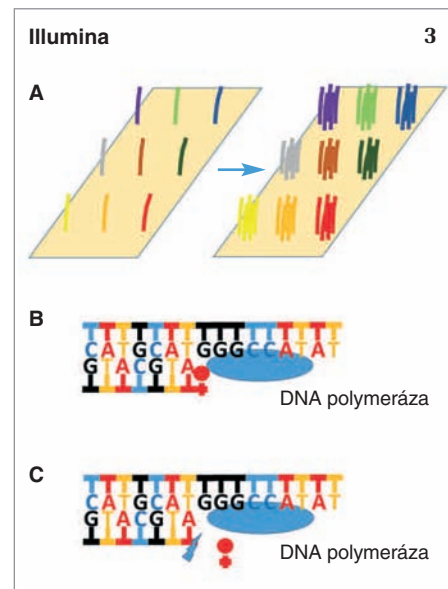
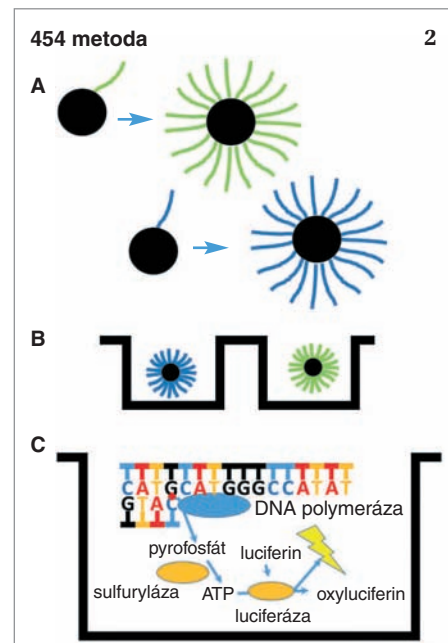
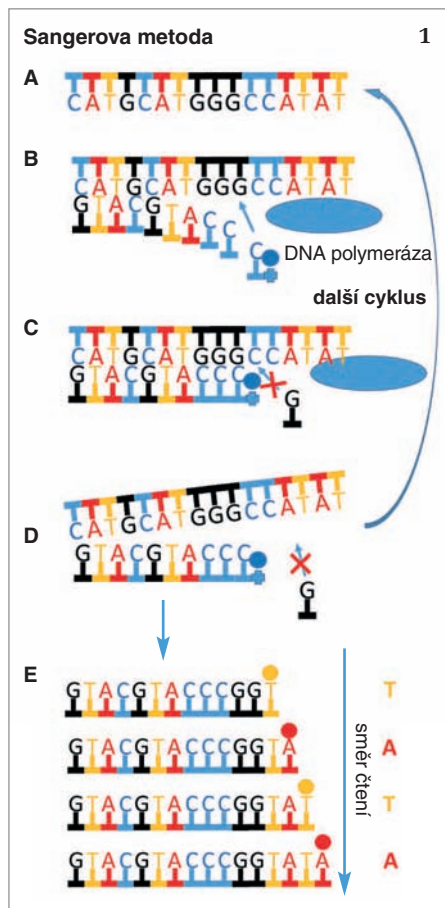
Principy sekvenování DNA vybranými moderními metodami

Sekvenování, které určuje pořadí nukleotidů („písmen“ – A, C, T, G) v molekule DNA, se stalo nedílnou součástí moderní biologie. Jeho metodika i využití jsou popsány v článku na str. LXXIII kuléru této Živy. Následující schémata ukazují základní principy, na nichž stojí jak tradiční Sangerova metoda, při které sekvenujeme jedinou molekulu DNA, tak i dvě vybrané metody tzv. druhé generace – 454 a Illumina sekvenování, kdy dochází ke čtení milionů molekul DNA najednou.

1 Sangerova metoda. Templátová DNA (A); DNA polymeráza přidává nukleotidy k rostoucímu řetězci DNA podle předlohy – templátu (B). Přidáním dideoxynukleotidu, který je označen fluorescenční značkou, dojde k zastavení syntézy nového řetězce DNA (C). Zahřátím se dva řetězce DNA oddělí (D) a proces syntézy nového řetězce polymerázou se může opakovat. Výsledné molekuly se seřadí podle velikosti a podle fluorescenčního značení se odvodí výsledná sekvence (E).

2 Mezi metody druhé generace patří 454 sekvenování. DNA se naváže na mikrokuličku, na níž je posléze enzymatickou reakcí namnožena (A). Mikrokuličky se vloží do komůrek na sekvenační destičce (B). Vždy jeden typ nukleotidu je přidán do reakční směsi. Jestliže DNA polymeráza zařadí daný nukleotid do nového řetězce, dojde k uvolnění pyrofosfátu (PPI), který je převeden sulfurylázou na adenosintrifosfát (ATP). Luciferáza pak za použití ATP převede luciferin na oxyluciferin, přičemž dojde k vyzáření světla, které zachytíme kamerou (C).

3 Další pokročilá metoda – Illumina. DNA je navázána na destičku a lokálně namnožena (A). Tím se vytvoří skupiny identických molekul, které jsou poté sekvenovány. DNA polymeráza přidá do rostoucího řetězce jeden modifikovaný



nukleotid značený fluorescenčním barvivem, jenž zároveň reverzibilně blokuje navázání dalšího nukleotidu (B). Kamera pak zachytí fluorescenční signál pro každou skupinu DNA molekul na destičce. Fluorescenční označení a blokace jsou odbourány a může dojít k připojení dalšího nukleotidu (C).
Všechny orig. M. Kolísko, některé části obrázků upraveny podle: J. M. Heather a B. Chain (2016)