

Horizontální přenos genetické informace Evoluce bakteriálních genomů

Petr Šíma, Ilja Trebichavský

Autoři věnují honorář Nadaci Živa

„Objevy se vnutily člověku“
Franz Kafka (Deník)

Jak jsme si minule slíbili (Živa 2006, 2: 50–52), zůstaneme ještě u bakterií, u nichž se výměna genetické informace podmiňující vznik evolučních novinek děje z velké části horizontální cestou. Po miliardy let bakterie získávaly zásadní podíl na své genetické odlišnosti schopností předávat a přijímat geny nebo jejich celé úseky horizontálním přenosem od příbuzných i nepříbuzných bakteriálních druhů. Tuto vlastnost si zachovávají i v současném živém světě, který sdílí s eukaryotickými organismy a který se nám zdánlivě jeví jako by patřil jen mnohobuněčným makroorganismům.

Za co může horizontální výměna genů

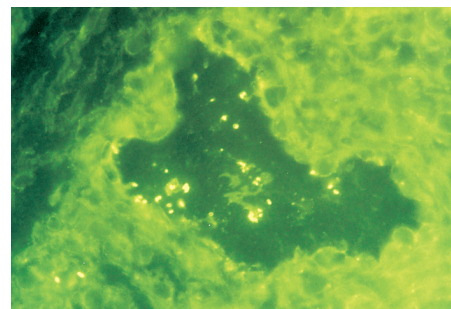
Téměř do konce 80. let minulého století se tvrdilo, že horizontální přenos genetické informace ke změnám bakteriálních genomů nepřispívá vůbec, nebo jen nepatrně. V posledních letech však mikrobiologové získali nespočetné důkazy svědčící o pravém opak. Bakterie si genetickou informaci vyměňují, některé genové sekvence získávají, jiné ztrácejí. Genomy však nefosilizují, a tak nezbyvá, než se pokusit o rekonstrukci jejich evoluce srovnáváním genomů bakterií současných. Tyto rekonstrukce však bývají nepřesné, někdy nesprávné, protože zatím máme k dispozici jen málo údajů z genomových analýz. Určit, zda se změny v genomech daly postupně, nebo k nim docházelo najednou náhodně, je obtížné, protože je třeba uvažovat o obdobích, ve kterých k těmto změnám docházelo v rozsahu stovek milionů let.

Biochemici na Arizonské univerzitě v Tucsonu odhadují, že podíl genetického materiálu přejatý od jiných bakterií dosahuje až 90 %. H. Ochman z výše zmíněné univerzity spolu s francouzskými mikrobiology V. Daubinem a E. Leratovou zjistili, že pouze 200 z celkových 7 000 genů tzv. γ -proteobakterií, k nimž patří mnoho původců závažných střevních chorob (např. tyfu, úplavice nebo cholery), se vyskytuje u všech těchto bakte-

rií, z čehož vyplývá, že více než 97 % genů muselo být získáno horizontálním přenosem (tab. 1).

Tento poznatek má velmi závažný význam pro objasnění mechanismů vzniku rezistence na antibiotika a jejího předávání na jiné bakterie. Kvůli stále probíhajícímu předávání genů jsou hranice mezi jednotlivými bakteriemi velice zastřené a stanovení bakteriálních druhů je tudíž velmi problematické. „Abychom mohli účinně léčit a vyvíjet nová antibiotika, je důležité zjistit, jakým způsobem a jak rychle tento horizontální přenos genů probíhá,“ konstatuje H. Ochman a dodává: „Pokud nebudeme umět klasifikovat bakterie kvůli tomu, že získávají odevšad nejrůznější geny, lékaři nebudou znát původce infekce a nebudou vědět, který lék nasadit.“

Jako názorný příklad obtížnosti definovat a taxonomicky zařadit bakteriální druhy lze uvést dvě příbuzné střevní bakterie, *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*, které se přizpůsobily různým hostitelům a nikám v jejich vnitřním prostředí a dnes zahrnují tisíce kmenů a typů. Předpokládá se, že *E. coli* i *S. enterica* vznikly ze společného předka asi před 150 miliony let. První se adaptovala především na střevní trakt obratlovců, kdežto druhá se stala nitrobuňčným parazitem. Sérologicky lze rozlišit salmonely na tři tisícovky různých typů. Některé z těch-



Fluorescentní průkaz bakterií v plicích plodu, kam se dostaly z infikované plodové vody. Zvětšení 1 000x

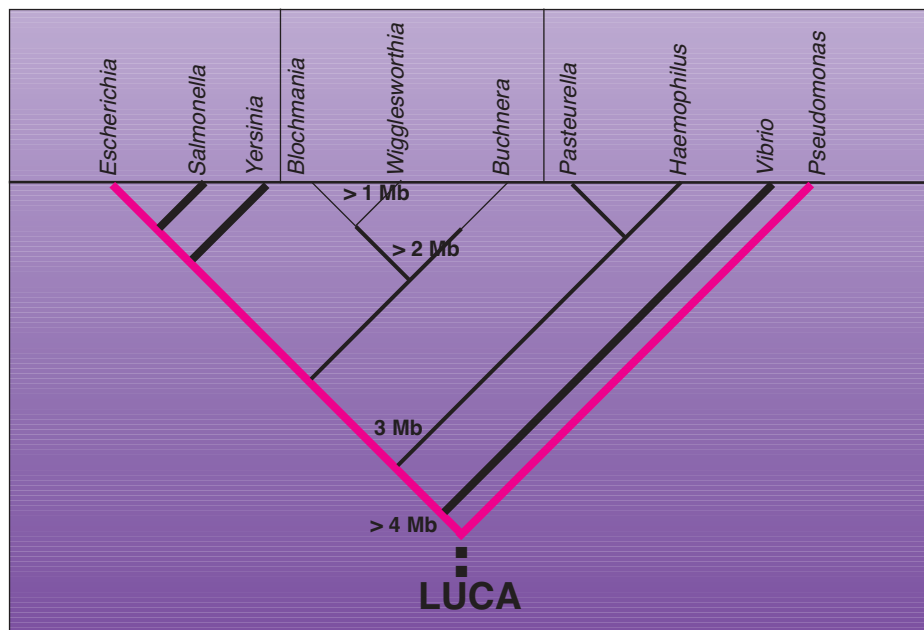
to sérotypů obsahují více než 10^6 bazí (1Mb) DNA, které u jiných nelze vůbec identifikovat. Podobně proměnlivý je i genom *E. coli*. Ze srovnávacích studií proteinových sad u tří kmenů těchto střevních tyčinek (první kmen vyvolává infekce močového ústrojí, druhý způsobuje střevní krvácení a třetí je nepatogenní) vyplynulo, že společných proteinových sad pro tyto projevy odlišné kmene je pouze 40 %. Např. bakterie infikující močové cesty obsahují geny pro adhezivní molekuly, které jim umožňují přichycení na buňky výstelky močových cest, ale chybějí jim geny důležité pro adhezi na epitel střeva, které naopak má ve svém genomu kmen infikující střevo. Je zřejmé, že oba kmene musely své specializované geny získat horizontálním přenosem. Takové geny se často prozradí upomínkou na jejich dávnou integraci, ať už to jsou zbytky plazmidů nebo fágů.

Množství horizontálně získané DNA kolísá podle bakteriálního druhu od nuly (u bakterií s malým genomem, jako jsou mykoplazmy — původci zánětů plic a ženských pohlavních cest) nebo malé části (3 % u původce tuberkulózy, 6 % u infekčního původce žaludečního vředu) až po velkou část genomu (16 % u některých kmenů střevní tyčinky *E. coli*).

Bakteriální genomy se zmenšují

Předpokládá se, že všechny dnes i v minulosti existující genomy měly na počátku posledního univerzálního společného předchůdce nazývaného LUCA (Last Universal Common Ancestor). Jejich současná různorodost je výsledkem modifikací genomu LUCA a genomů jeho následných potomků. Tyto modifikace byly zapříčiněny buď pomalými změnami sekvence genů „vlastní“

Obr. 1 Reduktivní evoluce γ -proteobakterií. Proteobacteria získaly své jméno podle řeckého boba Prótea, který velmi často měnil svoji podobu. Zahrnují tvarové i funkčně velmi rozmanité druhy gramnegativních bakterií (G⁻), které jsou dále roztrženy do pěti skupin označovaných písmeny řecké abecedy (α , β , γ , δ , ϵ). Náleží mezi ně druhy volně žijící, fixující dusík i patogenní. Nejvíce genomových sekvencí je prozkoumáno u γ -proteobakterií (k současnému datu 53). Molekulárně-fylogenetické analýzy prokázaly, že rozsah genomu se v průběhu reduktivní evoluce od bakterií schopných samostatné existence k endosymbiotickým postupně zmenšoval. Jako příklad lze uvést porovnání genomů *Pseudomonas aeruginosa* (5 540 kb) a *Salmonella* sérotypu *Typhimurium* (4 900 kb) s endosymbiotickými bakteriemi *Buchnera aphidicola* (600 kb), *Blochmannia floridanus* nebo *Wigglesworthia glossinida* (oba 700 kb). Orig. P. Šíma



DNA (např. mutacemi nebo přeskupováním genů), anebo prostřednictvím horizontálního přenosu, v jehož důsledku muselo dojít k daleko rychlejšímu a revolučnějšímu proměněnám genomů a který hrál podstatnou roli akceleračního jinak pomalé (hypobradytelicke) evoluce prokaryot. Horizontální výměna genů byla pravděpodobně nejfrekvencovanější mezi prvními potomky LUCA a byla příčinou toho, že genomy jsou synologní (Živa 2006, 1: 3, obr. 2).

Většina evolučních genetiků i mikrobiologů je dodnes přesvědčena, že se bakteriální genomy vyvinuly postupným zdvojováním velmi malých genomů svých dávných předchůdců, potomků LUCA. Nedávno uveřejněná studie A. I. Nilssona a jeho výzkumné skupiny z Karolinska Institutu ve Stockholmu však dokazuje opak: z rekonstrukce fylogenetických trendů vyplynulo, že bakterie s velikostí genomu menší než 2 Mb se vyvinuly z bakterií, které měly genomy podstatně rozsáhlejší. Takovouto reduktivní evoluci prošly zejména ty bakteriální druhy, které se staly endosymbionty eukaryotických organismů. Ztratily až 80 % genů, dokonce i geny, které jsou nutné pro nezávislé a samostatné přežití. Jak výstižně říká H. Ishikawa z Tokijské univerzity, který zmapoval genomovou evoluci endosymbiotických bakterií rodu *Buchnera* obsahujících jedny z nejmenších bakteriálních genomů: „Genový repertoár *Buchnera* je tak specializovaný na nitrobuněčný život, že tyto bakterie vně eukaryotické buňky nemohou přežít.“

Ztráta nefunkčních a tudíž nepotřebných genů však není jednoduchou záležitostí. Např. genom člověka si stále zachovává stovky takových pseudogenů pro čichové receptory, u některých z nich lze vysledovat původ až k dobám prvotních čtvernožců. Bakteriální pseudogeny jsou rovněž po nějakou dobu uchovávány, avšak mutační procesy je postupně eliminují, až nakonec z genomu vymizí docela. U bakteriálních genomů se často stane, že jsou erodovány

Nahoře: Symbiotická mikroflóra mléčných bakterií chrání poševní sliznici zdravé ženy. Elektronová mikroskopie, zvětšení 15 000x. ♦ Bakterie Escherichia coli přisedající k poškozené buňce střevní výstelky. Její geny virulence byly získány horizontálním přenosem. Elektronová mikroskopie, zvětšení 10 000x. Snímky I. Trebichavského



Tab. 1 Potenciální dárci genetické informace do genomů některých zástupců bakterií

Bakterie	Genom [Mb]	Počet atypických oblastí	Taxon	Dárci z taxonu [%]
<i>Bacillus subtilis</i>	4,21	51	eubakterie	69
			G+ bakterie	50
			viry	16
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,91	7	eukaryota	50
			eubakterie	25
			viry	25
<i>Campylobacter jejunii</i>	1,64	12	eubakterie eukaryota	50 38
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1,23	13	eubakterie	58
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,04	11	eukaryota	25
			eubakterie	58
<i>Escherichia coli</i>	4,64	84	eubakterie	87
			enterobakterie	56
			viry	10
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,83	13	eubakterie eukaryota	59 35
<i>Helicobacter pylori</i>	1,67	18	eubakterie	83
			G+ bakterie	33
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4,41	43	eubakterie	95
			γ-proteobakterie	50
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1,11	10	eubakterie	59
			eukaryota	30

i důležité funkční geny. Patogenní *Salmonella* sérotypu Typhimurium obsahuje všechny geny, které mají bakteriální endosymbionti mšic (*Buchnera*), mravenců (*Blochmannia*) i mouchy tse-tse (*Wigglesworthia*), což naznačuje vysokou pravděpodobnost, že všechny tyto bakterie mohly mít společného předka. Mechanismy, které genové ztráty na cestě k endosymbiotickému životu způsobují, však zatím neumíme vysvětlit (obr. 1).

Mechanismy horizontálního přenosu

Genetická informace se mezi bakteriemi přenáší buď volnou DNA, tzv. transformací (Živa 2006, 1: 2-4), nebo transdukcí, jak se označuje přenos části bakteriální DNA pomocí bakteriálních virů (fágů), anebo konjugací, speciálním parasexuálním procesem, při které se musí dvě bakterie dostat do fyzického kontaktu. Gramnegativní bakterie přitom vytvářejí jakýsi můstek — pilus (grampozitivní bakterie ho k přenosu nepoužívají), kterým přechází plazmidová i chromozómalní DNA z dárcе do příjemce.

Cizorodá DNA se do bakteriálního genomu včleňuje několika způsoby: rekombinací, jde-li o DNA blízce příbuzných druhů bakterií, nebo integrací, když jde o DNA fágů, která je do bakteriální DNA zabudována pomocí enzymů integráz. Jiným způsobem se připojuje DNA mobilních genetických elementů jako plazmidů, integronů anebo transpozónů (geny přeskakující na různá místa chromozomu), který uskutečňují enzymy transpozázy. Přenesená DNA může být rovněž využita při opravě zlomů dvoušroubovice DNA, anebo může uvnitř bakteriální buňky dočasně přetrvávat samostatně jako epizom (plazmid, který se může replikovat v chromozomu). Takto může být přenesen jakýkoli gen nebo genová sekvence, ať už je bakteriálního, archeobakteriálního, nebo eukaryotického původu.

Přenos genů fágy a plazmidy v přírodě je popisován a studován už dlouho. Avšak přenos volné DNA transformací byl donedávna považován za možný pouze v laboratorních podmínkách. Vědci si nedokázali představit, že by se v přírodě mohla vyskytovat mimobuněčná DNA, kterou by jiné organismy

mohly nějakým způsobem začlenit do svých genomů a využít genetickou informaci, kterou tam vnesla. Jakmile se však prokázalo, že transformace je obecným jevem a důležitým katalyzátorem evoluce, pozornost mikrobiologů se zaměřila na hledání volné DNA.

Trh informace

DNA se do životního prostředí neustále doplňuje z rozkládajících se buněk uhynulých zvířat a rostlin i z mrtvých mikroorganismů. Nevyčerpatelným zdrojem jsou vsudy přítomné viry. Je však také uvolňována nebo aktivně vylučována ze živých bakterií. Poprvé byla volná DNA ve velice nízkých koncentracích izolována z agarů, na kterém se kultivovaly bakterie v laboratoři. Ukázalo se však, že volnou DNA lze nalézt v biosféře všude, a to v množstvích pětsetkrát i vícekrát převyšujících laboratorní nálezy. Nejvyšší koncentrace obsahují vlhké biofilmy, které povlékají v přírodě neživé objekty i živá zvířata a rostliny. V nich žijí pospolu různé mikroorganismy, zejména bakterie a prvoci, ale i plísně, kvasinky a řasy. I na povrchu kůže velmi čistotného člověka žijí až desítky gramů různých druhů bakterií a jiných mikroorganismů (tab. 2). Po umytí sice jejich počet klesne, ale záhy dosáhne původních hodnot.

Rychlost rozpadu volné DNA v přírodě závisí na teplotě a přítomnosti enzymů či oxidačních činidel. Fragmenty bakteriální DNA mohou v rozkládajících se tělech zvířat nebo v exkrementech přetrvávat týdny a v rostlinných zbytcích celá léta. V teplotách nevystupujících nad bod mrazu, např. ve věčné zmrzlé půdě (permafrostu) v polárních šířkách, se volná DNA uchovává po stovky let.

DNA vstupuje do bakterií

Víme už, že v každé biocenóze se volná, mimobuněčná DNA nachází ve velkých množstvích. Ale může vůbec molekula DNA nebo její část vstoupit do nitra bakteriální buňky, když je u grampozitivních bakterií chráněno silným peptidoglykanovým obalem a když gramnegativní bakterie mají

Tab. 2 Nejdůležitější zástupci mikroflóry žijící na kůži zdravého člověka

<p><i>Acinetobacter</i>; <i>Aerococcus</i> bacily, klostridie, korynebakterie <i>Micrococcus</i>, <i>Peptostreptococcus</i> <i>Propionibacterium</i> stafylokoky, streptokoky houby: <i>Candida</i>, <i>Malassezia</i></p>
--

buněčnou stěnu navíc krytou další nepropustnou vnější membránou?

Ve skutečnosti volná DNA přichází otevřenými dveřmi. Na povrchu bakterií byly objeveny desítky receptorů, které mimo buněčnou DNA zachycují a vážou. Bakteriální obaly jsou navíc opatřeny zvláštními póry, kterými DNA aktivně přechází na vnitřní membránu, kde už je soustředěna speciální mašinerie zajišťující přenos genetické informace, která dá pokyn k rozvinutí dvoustranně pronikající DNA. Jedno vlákno DNA je bezprostředně zničeno enzymem nukleázou, druhé přechází do cytoplazmy a hned se začleňuje do chromozomu. Některé druhy bakterií jsou schopny integrovat řádově jenom tisícinu transportované DNA, jiné až desítky procent. Snadněji se rekombinují geny podobné s geny příjemce. Integrují se však i geny ze zcela nepřibuzných genomů. Některé bakterie (např. původce kapavky) mohou přijímat cizí DNA trvale, jiné to dovedou jen v určitém období svého života.

Jak bakterie získávají rezistenci k antibiotikům

Gramnegativní bakterie se brání vstupu antibiotik do buňky do velké míry svou přirozenou výbavou, nepropustnou vnější membránou. Jiné získají odolnost genetikou cestou — buď mutacemi, nebo horizontálním přenosem genů rezistence od bakterií, které už odolnost k antibiotikům získaly. Při reakci bakterií na setkání s antibiotikem se také zvyšuje frekvence mutací nebo se počnou uvolňovat plazmidy nesoucí geny pro rezistenci k antibiotikům, případně další mobilní genetické elementy jako jsou integrony.

Protinádorové vakcíny II. Terapeutické vakcíny

Vladimír Vonka

V předchozí části přehledu o protinádorových vakcínách jsme se věnovali vakcínám profylaktickým. Ukázali jsme, že takové preparáty jsou zaměřeny aspoň prozatím výhradně proti nádorům vyvolaným viry. Podobají se klasickým očkovacím látkám. Jejich cílem je zabránit infekci, která by mohla vyvolat zhoubné bujení. Přes 80 % nádorů je však nevírového původu a při jejich případné imunoterapii se musíme spolehnout na vakcíny terapeutické.

Jak bylo řečeno v první části (Živa 2006, 2: 53–54), většina nádorů — a možná, že všechny — obsahuje antigeny, které je odlišují od normálních tkání. Mnoho stoupenců má hypotézu, že nádory za přirozených podmínek vznikají proto, že organismus není s to imunologicky rozpoznat nové antigeny nádorové buňky. I když tomu tak někdy

Tab. 3 Příklady horizontálního přenosu kompletních chromozomálních genových sekvencí kódujících metabolické aktivity u eukaryot

Geny pro	Vektory	Původ
glukozofosfátovou izomerázu	<i>Escherichia coli</i>	dvouděložné rostliny lokanka lepá (<i>Clarkia unguiculata</i>)
Fe superoxidovou dismutázu	<i>Entamoeba histolytica</i>	prokaryota
aldolázu	kvasinky	<i>Escherichia coli</i>
cytochrom c	huseniček Thalův (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	houby
xylanázu	<i>Rumomococcus</i>	houby
thioredoxin	rostliny	prokaryota
glyceraldehydovou dehydrogenázu	<i>Escherichia coli</i> sinice (<i>Anabaena</i>)	eukaryota

Bakterie využívají různé mechanismy rezistence. Např. dokážou zamezit navázání antibiotik na bakteriální buňku (tak se dnes brání až 60 % zlatých stafylokoků antibiotiku methicilinu), nebo je enzymaticky rozloží (tak vyřazují ze hry peniciliny bakteriální β-laktamázy), anebo mohou zpátky vyčerpávat antibiotika, která už do buněk pronikla (to dělají rezistentní pseudomonády).

Sít informace

Geny pro množení, prepis a překlad genetické informace se ve srovnání s geny rezistence šíří horizontálním přenosem daleko pomaleji. V přírodě dochází k přenosu genů také mezi taxonomicky velmi vzdálenými druhy. Vytvářejí se velmi komplikované funkční sítě, po nichž probíhá mnohásměrný tok genetické informace. Příklady přenosů celých chromozomálních sekvencí pro geny regulující některé metabolické reakce jsou uvedeny v tab. 3.

Mnoho takových výměn se odehrává přímo pod našima nohama, v půdě. Půda není jen neživá hmota, je to složitý superorganismus, komplexní biocenóza, v níž se převrtávají mrtvá těla rostlin a živočichů do jiných živých forem. Plocha pastviny, která užívá jednoho koně, skrývá v podzemí tolik živých organismů, že by vyvážili 8 koní. Polovinu z tohoto množství tvoří mikroorganismy, zejména bakterie. Jediný gram půdy

jich obsahuje na 10⁹. Je překvapující, jak jsou druhově pestré. Britští molekulární genetici T. P. Curtis a W. T. Sloan z univerzity v Newcastlu odvodili z databází bakteriální RNA, že v jediném gramu půdy žije na 7 000 druhů bakterií, zatímco ve stejném množství mořské vody jen 160.

Jedny z nejvýznamnějších půdních mikroorganismů jsou bakterie rodu *Rhizobium* (Živa 2006, 1: 9–12), které žijí v těsné symbióze s rostlinami. Jejich obří plazmidy nesou kompletní genetickou informaci, která rhizobiím nejen umožní invazi do kořenových buněk, ale obsahuje také pokyny pro přeměnu těchto buněk na výrobní haly, v nichž pak tyto bakteriální symbionti vyrábějí ze vzdušného dusíku amonnié ionty.

Množství vektorů genetické informace v přírodě je neuvěřitelné. V jediné kapce vody existují miliony nosičů genů. Např. geny pro fotosyntézu mořských bakterií jsou vneseny řády. Řády jsou na naší Zemi nejpočetnější. Odhaduje se, že existuje 10³⁰ řádových partikul, které každou vteřinu infikují 10²⁵ bakteriálních buněk. DNA je v biosféře všudypřítomná, ať už volná nebo jako součást živých organismů, a vytváří obří web — světovou pavučinu, po níž se přenáší genetická informace.

Věnováno našemu učiteli Prof. Ctiradu Jobnovi.

vakcín byly již testovány ve stovkách klinických studií. Navzdory skvělým úspěchům s experimentálními vakcínami v dobře definovaných zvířecích modelech a přes povzbudivé výsledky řady klinických studií se v humánní medicíně dosud nenaplnila očekávání spojená s terapeutickými protinádorovými vakcínami. Problémy, s nimiž se imunoterapie lidských nádorů potýká, vyplývají do značné míry z biologie nádorové buňky a z vlastností buněčných populací, kterými je nádor tvořen. Na rozdíl od mnoha experimentálních zvířecích nádorů, jejichž buněčné populace jsou víceméně homogenní, je složení přirozených nádorů silně heterogenní. Navíc se buněčná skladba nádoru mění s jeho růstem a rovněž v důsledku terapeutických zásahů. Nehomogenost se týká i přítomnosti nádorových antigenů a jejich množství. Aby mohl i méně zasvěcený čtenář pochopit současnou těžkosti týkající se terapeutických protinádorových vakcín a orientovat se ve strategiích používaných k jejich konstrukci, musíme se zmínit o některých poznatcích novodobé nádorové imunologie, které mají bezprostřední vztah k diskutované problematice.