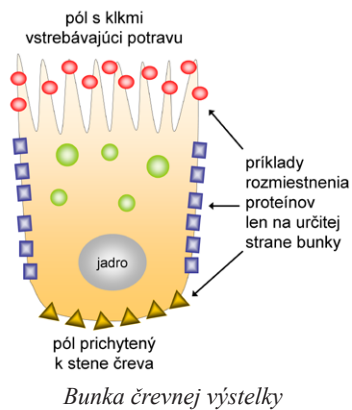


VZNIK USPORIADANIA V BUNKE II. AKO HĽADAŤ ZODPOVEDNÉ GÉNY?

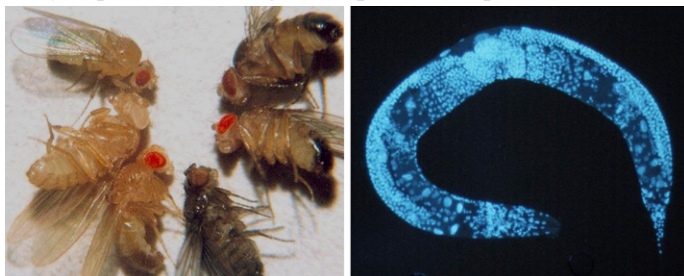
Vznik štruktúr z pôvodne neštruktúrovaného útvaru prebieha aj pri vývine embrya. Prvé delenia zygoty sú symetrické a vznikajúce bunky na pohľad nerozoznateľné. Konečným výsledkom je však niekoľko stoviek rozmanitých typov buniek, tvarom a vnútorným usporiadaním prispôbujúcich svojej funkcii. Z pôvodne guľatej bunky v procese diferenciácie vznikajú napríklad bunky vnútornej výstelky čreva. Ich póly majú natoľko rozdielne funkcie, že sa výrazne odlišujú vzhľadom aj proteínovým zložením. Vytvarovaním jedného z pólův do početných klkov sa plocha vstrebávajúca potravu zvýši až 4 000-krát. Za všetkým stojí dokonalá časová a priestorová koordinácia zapínania a vypínania stoviek génov.



Bunka črevnej výstelky

Modelové organizmy pomáhajú odhaľovať základné princípy bunkových dejov

Biológovia sa často držia pravidla, že určitý fenomén je výhodné študovať najskôr v čo najjednoduchšom systéme, v ktorom sa ešte vyskytuje. Platí to aj o odhaľovaní funkcií génov a proteínov. Hoci sú mnohé výskumy zamerané napríklad na myši či potkany, tieto cicavce sú ešte stále veľmi zložitými organizmami a techniky ich štúdiá sú relatívne náročné. Najviac poznatkov o molekulárnej úrovni dejov v živých organizmoch máme zo štúdiá niekoľkých modelových systémov. Z mnohobunkovcov sú to muška octomilka, mimochodom zvláštna neobvyklými názvami svojich génov (ako Torpedo, Oskar či Cactus), a háďatko. Telo tohto drobného červíka pozostáva z 959 alebo 1031 buniek (podľa pohlavia), ktorých poradie vzniku je dnes presne zmapované.



Dva najviac preštudované mnohobunkové modelové organizmy – octomilka (vľavo) a háďatko (vpravo, zafarbené fluorescenčnou farbičkou)

Všetky základné procesy prebiehajúce v bunke, ako duplikácia DNA, prepis a preklad genetickej informácie, biochemické reakcie, no i veľké množstvo ďalších, boli alebo stále sú objasňované najskôr v jednobunkových organizmoch.

Z prokaryotov, teda bezjadrových buniek, je najštudovanejším modelovým organizmom *Escherichia coli*. Práve tejto baktérii médiá nedávno venovali zvýšenú pozornosť kvôli smrtiacej nákaze vyvolanej jedným jej novým kmeňom,

avšak väčšina jej kmeňov je neškodná. V črevách nám naopak pomáha tráviť potravu a v laboratóriách vďaka nim napreduje výskum. Dokonca nie sú iba objektom bádania, ale často aj jedným z jeho nástrojov umožňujúcim určité experimenty.

Z eukaryotov, čiže buniek s jadrom a ďalšími organelami, je najviac preskúmaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, stáročia používaná na výrobu vína, piva a kysnutého cesta.

Hoci tvary modelových jednobunkových organizmov nebývajú zložité, zväčša nie sú iba „fádne guľaté“. Porušenie bunkovej symetrie, ba i vznik špecializovaných buniek, môžeme pozorovať dokonca už u niektorých baktérií: V nepriaznivých podmienkach vytvorí bunka na jednom zo svojich pólův odolnú spóru, prispôbenú dlhému čakaniu „na lepšie časy“, a sama potom odumrie.

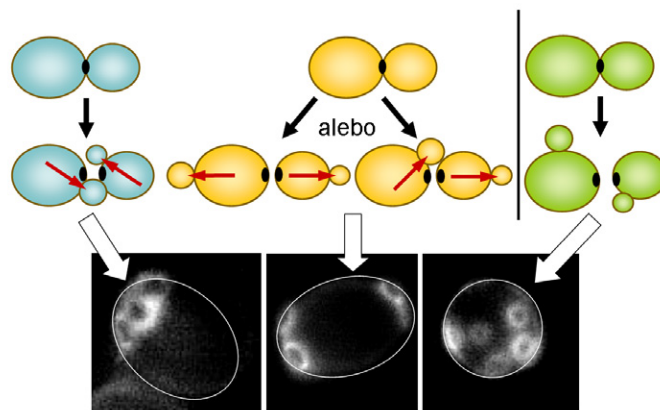
Pozrime sa však bližšie na to, čo sa deje pri delení kvasinky *S. cerevisiae* a ako poznatky o jeho priebehu umožňujú lepšie spoznať napríklad aj ľudské bunky.

Ako zistiť, čo určuje miesto pučania kvasinky?

Kvasinka sa delí pučaním: Na nenáhodnom mieste materskej bunky vznikne puk, ktorý rastie a napokon sa oddelí. Ide o polarizovaný proces zahŕňajúci výber miesta delenia, organizáciu príslušných proteínov na tomto mieste a nakoniec vznik a morfogézu (tvarovanie) puku.

Na povrchu materskej bunky ostane v mieste delenia už doživotne jazva. Kde presne začne kvasinka pučať, závisí od polohy týchto jaziev, ba dokonca aj od toho, či obsahuje dve sady chromozómov (rovnako ako bunky nášho tela) alebo iba jednu (ako napríklad pohlavné bunky).

Všimnime si, že už tento jednoduchý príklad umožňuje rozoznať dva základné typy porušenia symetrie: Pri prvom delení sa bunka musí rozhodnúť pre jedno miesto svojho povrchu viac-menej náhodne, pri ďalších už potrebuje zohľadniť rôzne faktory. Skutočne ide o dve principiálne odlišné schopnosti. Druhá z nich sa výraznejšie prejavuje, keď sa bunka polarizuje vzhľadom na vonkajšie podnety, ktorými môžu byť rôzne rastové faktory či signály od susedných buniek.



Rozloženie jaziev po pučaní prezrádza, či ide o bunky s jednou sadou chromozómov (modré), s dvomi sadami (oranžové) alebo o mutanty (zelené) neschopné puk správne nasmerovať. Jazvy sú zafarbené a pozorované pod fluorescenčným mikroskopom.

Nahliadnime teraz do „laboratórnej kuchyne“ molekulárnych biológov. Keď sa jazvy zafarbia špeciálnou fluorescenčnou farbičkou, môžeme mikroskopicky pozorovať ich rozmiestnenie na povrchu bunky. Pri zisťovaní, ktoré gény sú zodpovedné za tento charakteristický vzor jaziev, skúmame, ktorý gén treba poškodiť na to, aby sa bunka začala deliť náhodne.

Obrázok schematicky zachytáva princíp experimentu, ktorý umožňuje nájsť odpoveď. Najskôr by sme si pomocou chemického mutagénu alebo UV žiarenia pripravili množstvo náhodných mutantov (buniek s poškodenou DNA). Spomedzi nich by sme vybrali tie, ktorých jazvy by boli rozmiestnené celkom náhodne. Ďalej by sme sa snažili zistiť, ktorý gén je v týchto bunkách porušený, a to podľa celkom jednoduchého princípu: Ak má bunka niečo poškodené a my jej to dodáme neporušené, prejav poškodenia zmizne. (Platí to však iba v prípade tzv. recesívnych mutácií, teda nie dominantných, ktoré by sa prejavili aj v prítomnosti nepoškodeného génu.)

Ostáva iba zistiť, po prijatí ktorého génu sa bunka vráti do pôvodného stavu. Do každej kvasinky preto vložíme jeden z nepoškodených génov a hľadáme, v ktorej z nich sa vďaka vnesej DNA obnoví štandardný spôsob pučania. Keďže génov pekárskkej kvasinky je približne 6 000, z toho zhruba 4 000 takých, ktorých stratu (vždy len jedného) dokáže za bežných podmienok prežiť, táto úloha pôsobí náročne minimálne z časového hľadiska. Našťastie už pred pár desaťročiami vedci vypracovali postup, ktorý to umožňuje elegantne a rýchlo.

Potrebujeme mať k dispozícii súbor všetkých génov „v skúmavke“ – tzv. *génovú knižnicu*. Každý gén v nej je vložený do „nosičového“ kúska DNA navrhnutého špeciálne pre účely knižnice. Tento kružnicový nosič napríklad zabezpečí, aby sa gén v bunke udržal. (Každú „bezprizornú“ DNA totiž všetky bunky rýchlo zničia.) Vnesenie súboru „knižničných“ úsekov DNA do buniek prebieha naraz a nazýva sa *transformácia*.

Všeobecne sa pri hľadaní génov zodpovedných za určitý proces využíva transformácia mutantov s poruchou tohto procesu génovou knižnicou. Keď potom medzi transformovanými bunkami nájdeme takú, ktorej jazvy opäť tvoria pôvodný nenáhodný vzor, vyberieme z nej gén, ktorý sme do nej vložili z genómovej knižnice, aby sme sa pozreli, „čo je zač“. Identifikujeme ho na základe jeho sekvencie porovnaním s databázou všetkých génov kvasinky.

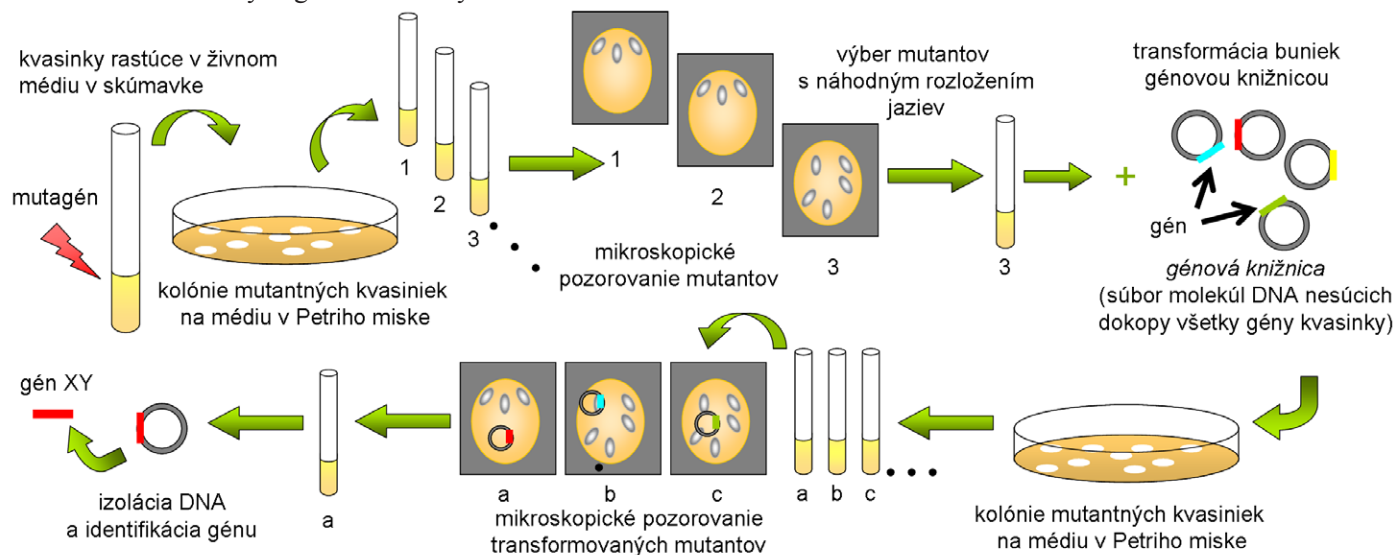
Čo priniesli výsledky tohto pokusu?

Vedci týmto spôsobom získali zoznam 127 génov, z ktorých stačí, aby iba jeden bol poškodený, a bunka už viac nedokáže nasmerovať rast puku do štandardnej polohy vzhľadom na ostatné jazvy. Fascinujúce je predovšetkým ich množstvo a rôznorodosť procesov, v ktorých vystupujú nimi kódované proteíny. Niektoré z nich zabezpečujú iba polaritu pučania, mnohé iné však už boli identifikované ako účastníci prepisu či prekladu genetickej informácie, údržby bunkovej steny, metabolizmu lipidov a podobne. Funkcia niektorých je však stále neznáma.

Tieto informácie sa môžu zdať zaujímavé iba pre úzky okruh vedcov skúmajúcich pučanie kvasiniek. Na získanom zozname génov sú však i mnohé také, ktoré majú gény s podobnou sekvenciou (homológy) v bunkách živočíchov vrátane ľudí, hoci tie sa nedelia pučaním. O viacerých sa už vedelo, že proteíny, ktoré kódujú, sa zúčastňujú dejov súvisiacich s polarizáciou a narúšaním symetrie. Keďže v ľudských bunkách by bol spomínaný proces mutagenézy a transformácie genómovou knižnicou neporovnateľne náročnejší (nielen pre asi 3,5-násobne vyšší počet génov), tomuto kroku sa dalo vyhnúť použitím kvasiniek. Namiesto hľadania kandidátov medzi veľkým množstvom ľudských génov sa stačí zamerať na tie, ktorých homológy sú na „kvasinkovom zozname“, a pozrieť sa, či niektoré ďalšie neplnia podobné funkcie napríklad v kontexte diferenciácie. Týmto spôsobom umožňujú jednoduché modelové organizmy odhaľovať zákonitosti mnohých procesov, ktoré sa potom ľahšie dajú vystopovať v komplexnejších organizmoch.

Ako sme videli, pri štúdiu nejakého deja sa často postupuje tak, že sa získajú mutanty s poruchou tohto procesu a testuje sa, ktoré gény sú schopné ho obnoviť. V posledných desaťročiach sa vďaka *cielenej mutagenéze* stále častejšie uplatňuje opačný prístup, teda cieľené vyradenie študovaného génu a pozorovanie jeho dopadu. Takto namiesto dlhého zoznamu génov získame neraz pomerne dlhý zoznam „príznakov“. Veľmi často totiž neplatí, že jeden gén ovplyvňuje iba jediný proces, ani že za jeden proces je zodpovedných len niekoľko málo génov. Preto ani zdanlivo veľké množstvo poznatkov nezaručuje pochopenie princípov. Avšak i jediná myšlienka či informácia navyše môže niekedy znamenať prelom...

Lenka Abelovská



Stratégia umožňujúca identifikáciu génov nevyhnutných pre správnu voľbu miesta pučania kvasinky