

## Úspěch spočívá v komunikaci

Martin Kuthan, Zdena Palková

Když se řekne mikroorganismus, většina z nás si zřejmě představí nějakého jednobuněčného tvora několik mikrometrů velkého, žijícího v obrovských počtech kolem nás, případně k naší pramalé radosti přímo uvnitř našeho těla. Mikroorganismy ovlivňují pozitivně i negativně náš každodenní život a i když nejsou tak populární jako velká zvířata afrických savan či orchideje tropických pralesů, jsou minimálně stejně zajímavé a dokonce i krásné. Pojďte s námi nahlédnout do království bakterií a kvasinek z trochu netradičního úhlu pohledu.

### Bakterie a kvasinky jako mnohobuněčné organismy

Ještě donedávna převládá i mezi odborníky názor, že bakterie a kvasinky žijí téměř výlučně jako jednobuněčné mikroorganismy. Tyto názory pramení z metodických přístupů tradiční mikrobiologie, založené na Kochových postulátech a studiu čistých kultur. Mnohobuněčné struktury u některých bakterií, známé již poměrně dlouho, však byly vnímány spíše jako speciální případy adaptace určitých skupin bakterií na různé podmínky prostředí. Před 12 lety publikoval J. A. Shapiro v časopise *Scientific American* článek *Bacteria as Multicellular Organisms*, ve kterém byly popsány především různé vzorce chování a organizace buněčné diferenciace v koloniích některých bakteriálních druhů, včetně modelové bakterie *Escherichia coli*. Přes tento článek a řadu dalších publikací mnoho badatelů dlouho odmítalo přiznat bakteriím (a obecně mikroorganismům) status mnohobuněčného chování.

Výjimku tvořily myxobakterie, zástupci řádu *Myxobacterales*, jejichž nejprostudo-

vanějšími druhy jsou *Myxococcus xanthus* a *Stigmatella aurantiaca*. U této skupiny bakterií najdeme mnoho dravých půdních druhů doslova lovcích jiné druhy bakterií. Myxobakterie jsou schopny aktivně se pohybovat v rojích a společně vyhledávat svou kořist. Při nedostatku potravy a hladovění jsou schopny organizovat se do pozoruhodně tvarované mnohobuněčné plodnice, často keříčkovitého tvaru. V plodnicích vznikají z vegetativních buněk odolné spory přezívající nepříznivé podmínky. Modelovými eukaryotickými mikroorganismy, vytvářejícími rovněž za podmínek hladovění mnohobuněčné útvary, se staly hlenky (*Myxomycota*) a především jejich nejznámější zástupce *Dictyostelium discoideum*.

Teprve během posledních let se začíná obecně uvažovat o principu mnohobuněčnosti jednobuněčných organismů, a to především bakterií (Shapiro 1998). Zájem se obrací na jejich schopnost mezibuněčné komunikace, koordinovaného a účelného chování, diferenciace v rámci mnohobuněčné struktury i apoptózy (tj. programované buněčné smrti), atributů dříve přisuzovaných pouze „pravým“ mnohobuněčným

organismům. Nejvíce jsou prozkoumány procesy uplatňující se při mnohobuněčném chování jednobuněčných organismů u dnes již tradičních modelů — myxobakterií a hlenek. Zájem se však stále více obrací i na chování bakterií v rámci jiné organizované mnohobuněčné struktury — kolonie. Společným znakem mnohobuněčných plodnic myxobakterií a hlenek je, že vznikají agregací nedělicích se pohyblivých buněk. Při vývoji bakteriálních kolonií a jejich přeskupování je sice pohyb jednotlivých bakteriálních buněk také důležitý, ale uplatňují se zde i procesy související s jejich buněčným dělením. Mnohobuněčnou strukturou tvořenou buňkami, které nemají pohybový aparát a schopnost aktivního pohybu, je kvasinková kolonie (obr. 1 a 2).

Organizace (a struktura) kvasinkových kolonií se musí vytvářet již během jejich růstu a musí být zajištěna především signály mezi dělicími se buňkami, které určí polaritu buněčného dělení (popř. i změnu tvaru buněk) a tím i jejich distribuci v rámci vznikajícího mnohobuněčného útvaru. Zde je tedy situace analogická k embryogenezi vyšších eukaryotických organismů (živočichů i rostlin), kde právě určování polarity buněčného dělení představuje velmi důležitý vývojový parametr. Vzhledem k tomu, že bylo v mnoha případech prokázáno, že základní buněčné regulační mechanismy



Obr. 1 a 2 Obří kolonie kvasinek: *Saccharomyces cerevisiae* na médiu s metylénovou modří (vlevo dole), *Candida mogii* na médiu s bromkresolovým purpurem (nahoře)

jsou velmi konzervativní a že znalosti získané na kvasinkových (nebo i bakteriálních) buňkách lze aproximovat na vyšší eukaryota, je pravděpodobné, že i poznání signálů uplatňujících se při vývoji kvasinkových kolonií může přispět k nalezení podobných mechanismů u pravých mnohobuněčných organismů.

Lze předpokládat, že při vývoji morfologie kvasinkových kolonií jsou důležité především signály na krátkou vzdálenost mezi jednotlivými buňkami (např. dané kontaktem buňka-buňka). Nalezení molekul specificky se vyskytujících na povrchu buněk v jednotlivých oblastech kolonie může mít proto velký význam pro určení signálních molekul.

Existence mezibuněčných signálů umožňujících koordinaci chování byla postupně objevena i u mnoha jiných skupin bakterií, včetně nejrozšířenější modelové bakterie *E. coli*. Buňky *E. coli* jsou schopny autoagregace (samoseskupení), která je odpovědí na produkci chemoatraktivních signálů — aspartátu a glutamátu. Obě tyto





aminokyseliny slouží jako signál pro změnu populační hustoty v situacích, kdy to může být výhodné. Chemická škála bakteriálních signálů obecně je ohromně široká. Kromě aminokyselin slouží jako signální látky i oligopeptidy, proteiny, nukleotidy, antibiotika a dokonce i látky lipidické povahy. A právě tato obrovská variabilita signálů se zdála být překážkou pro vyvození nějakého všeobecného závěru.

Pro změnu názorů na bakteriální mnohobuněčnost (multicelularitu) měl obrovský vliv objev signálního systému gram-negativních bakterií, nazvaného quorum sensing (Fuqua et al. 1994). Bakterie jsou schopny pomocí tohoto systému doslova cítit svůj počet, resp. populační hustotu. Schopnost získat odpověď na otázku: Kolik nás tu vlastně žije? je v mnoha případech velmi výhodná a umožňuje bakteriím regulovat expresi (projevy) specifických genů v závislosti na populační hustotě. Taková koordinace je nevyhnutelná pro život bakterií v podmínkách, v nichž by jedna bakteriální buňka neměla šanci na přežití. Quorum sensing je u gram-negativních bakterií velmi rozšířený (ne-li všudypřítomný) a hraje významnou úlohu v nejrozmanitějších oblastech života bakterií. Objev tohoto poměrně univerzálního signálního systému definitivně potvrdil, že výskyt mnohobuněčných útvarů a mezibuněčná komunikace jsou všeobecnými vlastnostmi bakterií a nejsou pouze výsadou určitých specializovaných skupin. Podívejme se spolu na nějaké univerzální příklady mnohobuněčnosti.

### Bakteriální film — uspořádaná společnost

Ve vodních ekosystémech převládají bakterie a jiné mikroorganismy ve formě biofilmů dosahujících tloušťky až desítek mikrometrů. Biofilmy osídlující povrchy a rozhraní různých prostředí jsou navzájem metabolicky a fyzicky propojené bakteriální populace uzavřené ve hmotě nazývané extracelulární matrix. To je sice výstižná odborná definice, ale asi nepřilíží přitažlivá. Jak tedy biofilmy vypadají a jaká je jejich architektura?

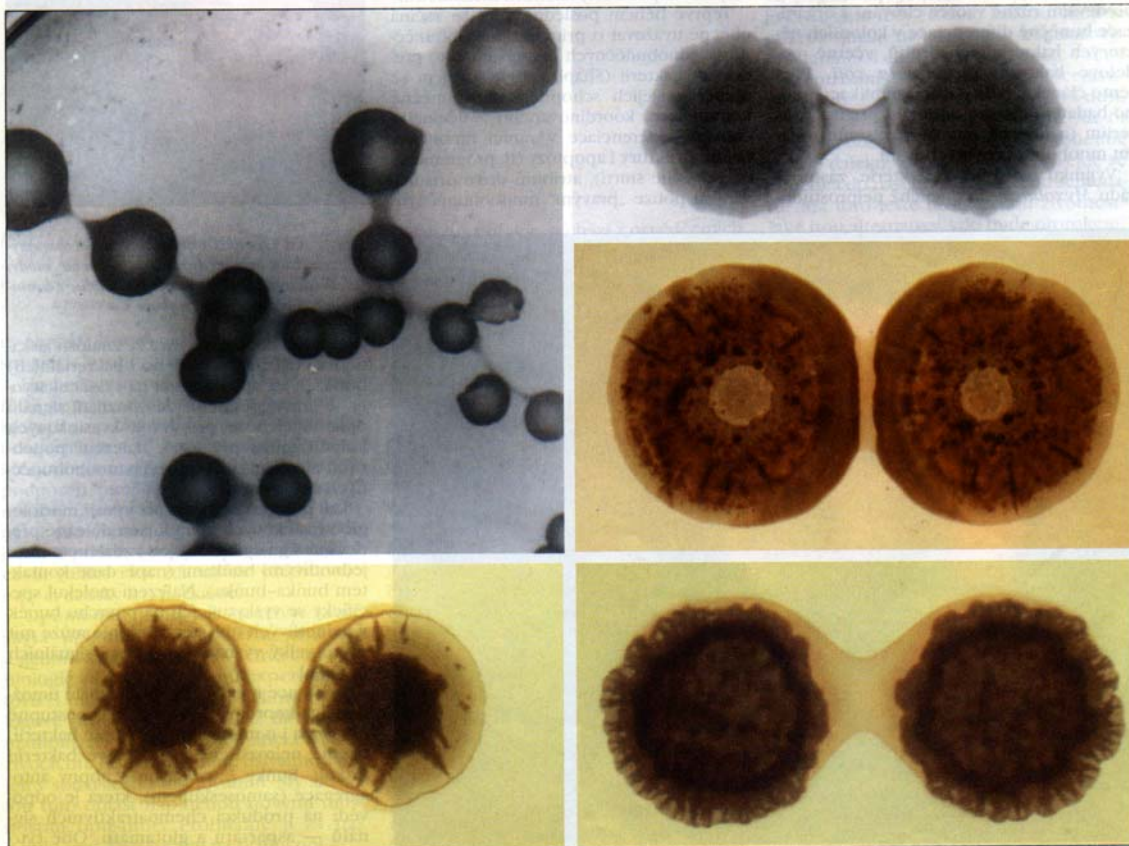
V první řadě je třeba upozornit, že biofilmy nejsou pouze náhodně a neuspořádané povlaky bakterií. Naopak, mají poměrně vysoce organizovanou strukturu umožňující bakteriím žijícím v biofilmech fungovat daleko efektivněji než smíšené populace planktonických buněk. Architektura biofilmů je velmi proměnlivá a závislá na mikroorganismech tvořících biofilm. Podstatnou část biofilmu (dokonce 50-90 %) zabírá buď extracelulární matrix (mimobuněčná hmota), nebo volné prostory vyplněné kapalinou z okolního prostředí. Extracelulární matrix se skládá z vysoce hydratovaných polysacharidů (tvořících síť) produkovaných mikroorganismy. Tyto polysacharidy hrají významnou úlohu při iniciaci tvorby biofilmu a jeho dalším růstu, jakož i při ochraně

před škodlivými látkami a predátory. Množení bakterií spojené s produkcí polysacharidů do vnějšího prostředí vede k tvorbě mikrokolonií obklopených (uzavřených) v extracelulární matrix. Mikrokolonie mohou mít nejrozmanitější tvar: od jednoduchých kuželovitých útvarů až po složitější hříbovité struktury. Celý biofilm je možné si představit jako houbovitý porézní útvar s kuželovitými a hříbovitými mikrokolonie-mi a množstvím navzájem propojených kanálků. Kanálky vyplněné kapalinou z okolního prostředí hrají v biofilmech velmi důležitou úlohu. Zjistilo se totiž, že umožňují proudění kapaliny, a tedy i transport živin a kyslíku až do nejspodnějších vrstev biofilmu. Kanálky tvořící propojenou síť jsou dokonce tak velké, že umožňují pohyb až 0,3 μm velkých latexových kuliček.

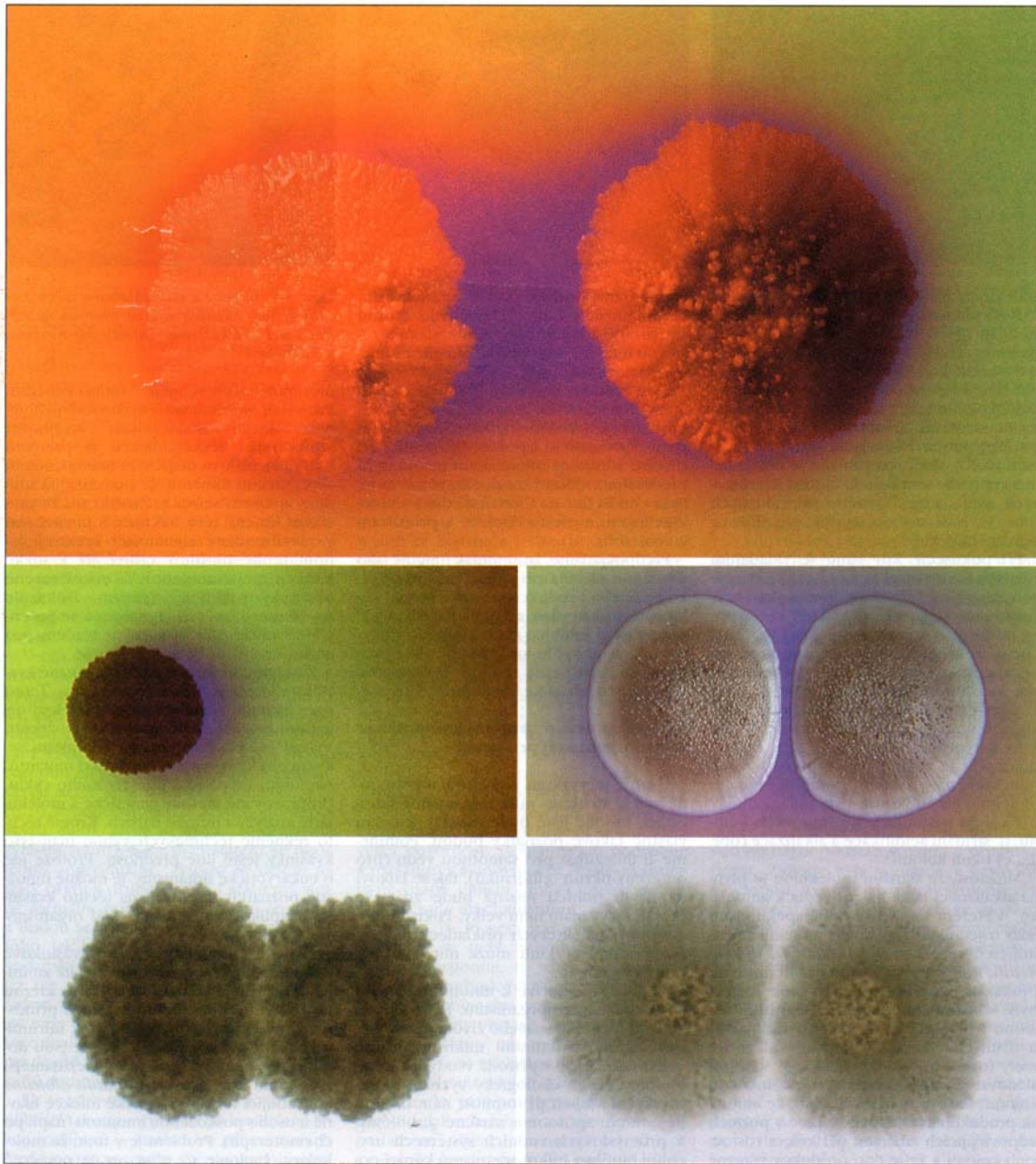
Svou strukturou tak biofilmy častěji připomínají tkáň vyšších organismů. Mikrokolonie jsou stavebními jednotkami biofilmu a jejich vnitřní prostředí je ovlivněno metabolickou aktivitou bakterií a chráněno extracelulární matrix. Biofilmy mají primitivní úroveň homeostáze a primitivní oběhový systém tvořený sítí kanálků. Taková poměrně složitá struktura biofilmů dává tušit, že i pro jejich vznik a vývoj jsou potřebné mezibuněčné signály, umožňující koordinaci růstu a metabolických aktivit.

Kromě definované struktury a organizace je další charakteristickou vlastností mnohobuněčných organismů jejich vzájemná komunikace jako celku. Přitom komunikační mechanismy mohou být velmi různorodé: chemické signály (feromony hmyzu aj.), zvukové (komunikace savců, ultrazvukové

Obr. 3 Orientované zóny mezi koloniemi různých kvasinek. (a) monokolonie *Kluyveromyces lactis*; (b) obří kolonie: (b) *Cryptococcus albidus*; (c) *Saccharomyces cerevisiae*; (d) *Rhodosporidium toruloides*; (e) *Kluyveromyces marxianus*







signály), světelné (medúzy, hmyz) apod. Stále více se ukazuje, že i nepravé mnohobuněčné struktury tvořené jednobuněčnými organismy, se mohou chovat koordinovaně a produkovat signály jako celek. Dokonce byly publikovány důkazy naznačující existenci ultrazvukové signalizace mezi bakteriálními koloniemi (Matsushashi et al. 1995). V naší laboratoři jsme nedávno objevili existenci chemických signálů mezi rostoucími kvasinkovými koloniemi (Palková et al. 1997).

#### Kvasinkové kolonie spolu komunikují

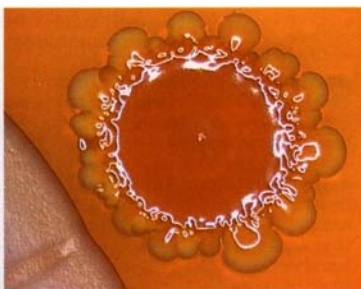
K výzkumu kvasinkových kolonií nás přivedla náhoda, jak už to bývá u zajímavých

**a** Obr. 4 **a** — Alkalizace okolí obřích kolonií různých druhů kvasinek na médiu s pH indikátorem — bromkresolovým purpurem, který se v alkalickém prostředí — tedy i v prostředí hydroxidu amonného — barví fialově; *Candida mogii*. **b** — Obřít kolonie těžké kvasinky *C. mogii*, kde byla partnerská kolonie nahrazena umělým zdrojem amoniaku (umístěným vpravo od kolonie). **c** — Obřít kolonie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. **d** — Na minimálním médiu bez aminokyselin se kolonie kvasinky *Candida mogii* prorůstají. **e** — Na totéž médiu, ale s přidávkou aminokyselin se kolonie téhož druhu kvasinky vzájemně neprorůstají a dokonce se inhibují v růstu v přilehlých částech kolonií

objevů. Ze zcela jiných důvodů jsme použili pro výsev kolonií kvasinek druhu *Kluyveromyces lactis* pevná agarová média se zvýšenou koncentrací různých iontů, mezi nimi i  $\text{Ca}^{2+}$ . Když jsme pak po delší době prohlíželi narostlé kolonie, s překvapením jsme zjistili, že právě na médiu s  $\text{Ca}^{2+}$  se mezi koloniemi objevily zóny, tvořené sraženinou v povrchové vrstvě agaru, směřující od jedné kolonie k druhé (obr. 3a). Vznik těchto zón naznačoval fascinující možnost jakési komunikace mezi individuálními koloniemi.

V následujících letech jsme se pokoušeli zjistit, co je příčinou tvorby směřovaných zón, zda jde skutečně o komunikaci, a pokud ano, jaký má pro kolonie význam.





Důležitým zjištěním, které umožnilo řadu dalších pokusů, bylo, že orientované zóny vznikají nejen mezi tzv. monokoloniami (kolonie vzniklé z jedné buňky), ale i mezi tzv. obřími koloniami (vzniklými z kapky buněčné suspenze) (obr. 3b-e). Stejně jako monokolonie mají i obří kolonie organizovanou strukturu (morfologii), specifickou pro daný kmen. Navíc jsme zjistili, že fenomén tvorby směrovaných zón je univerzální a vyskytuje se u kolonií mnoha kvasinkových rodů, a to i značně nepřibuzných (obr. 3). Naši snahou se stala identifikace signální molekuly.

Při pokusech, kdy jsme se vkládáním různých bariér mezi kolonie snažili tvorbu zón zabránit a případnou komunikaci přerušit, jsme stále více docházeli k názoru, že může jít o komponentu šířící se vzduchem. Tuto teorii definitivně potvrdil experiment, kdy jsme umístili dvě partnerské kvasinkové kolonie na agar, každou samostatně tak, aby byly odděleny vzduchovou vrstvou. I v tomto případě docházelo k tvorbě směrovaných zón. Dalším důležitým (a rovněž překvapivým) zjištěním, které nám nakonec pomohlo signální molekulu identifikovat, byly pulzní změny pH kolem rostoucích kvasinkových kolonií, tj. střídání acidifikace a alkalizace (obr. 4a, c) okolí kolonií.

Možnost, že signální molekulou je plynná alkalizující látka nás přivedla k amoniaku, o kterém se již v té době spekulovalo jako o jedné ze signálních molekul uplatňujících se při vývoji hlenek *D. discoideum*. Roli amoniaku jsme pak definitivně prokázali experimenty, kdy jsme jednak byli schopni amoniakem substituujícím jednu z partnerských kolonií indukovat u druhých tvorbu orientované alkalické zóny (obr. 4b), jednak jsme byli schopni sledovat produkci amoniaku kvasinkovou kolonií. Časové měření ukázalo, že amoniak produkují kvasinkové kolonie v pulzech odpovídajících změnám pH kolem rostoucích kolonií a že je tato produkce výrazně zesílena (indukována) u partnerských kolonií. V té době jsme rovněž zjistili, že výsledkem zesílené produkce amoniaku je zastavení (inhibice) růstu okraje sousedních kolonií a orientace růstu kolonií do volného prostoru.

Paralelní experimenty analýzy chování kvasinkových kolonií na různých médiích ukázaly, že se směrované zóny netvoří na tzv. minimálním agarovém médiu bez aminokyselin. Kolonie rostoucí na tomto médiu neprodukují amoniak v pulzech a nedochází k jejich vzájemné inhibici růstu — po delší době kultivace se kolonie prorůstají (obr. 4d). Podobně se chovaly na standardním médiu, tj. s aminokyselinami, kolonie mutantních kmenů *S. cerevisiae*, které pozbyly schopnost aminokyselinou do

buňek transportovat. Dodání aminokyselin do minimálního média obnovilo tvorbu směrované zóny, produkci amoniaku a růstovou inhibici mezi partnerskými koloniemi kvasinek (obr. 4e).

Tyto výsledky potvrdily, že inhibice růstu mezi kvasinkovými koloniemi je aktivní proces, nejen důsledek pouhého vyčerpání živin. Potvrzuje to i pokus, při němž jsou růstové zdroje na minimálním médiu, a to především v oblasti mezi koloniemi, mnohem chudší než na tomže médiu s aminokyselinami, a přesto dochází k prorůstání kolonií (obr. 4d).

Předpokládáme, že amoniak funguje jako signální molekula při vývoji kvasinkových kolonií, jeho produkce je partnerskými koloniemi indukována a jejím důsledkem je asymetrická inhibice růstu sousedících kolonií. Kvasinkové kolonie tak mohou orientovat svůj další růst směrem k oblastem, v nichž nedochází ke konkurenci o živiny.

#### Význam poznání způsobu komunikace mikroorganismů pro praxi

I když je výzkum signálů a mnohobuněčných struktur mikroorganismů fascinující, mnohé jistě bude zajímat, k čemu vlastně takové poznatky budou. Pomíne-li důležitost pro samotnou vědu (pro omezený okruh odborníků), tak se laikovi na první pohled možná bude zdát, že praktický význam není velký. Pokusíme se alespoň na některých příkladech ukázat, že podobný výzkum může mít i značný praktický dopad.

Vratme se nejříve k mnohobuněčným strukturám mikroorganismů. Je až s podivem, kolik oblastí našeho života je mnohobuněčnými strukturami mikroorganismů ovlivněno. Např. v přírodě všudypřítomné biofilmy. Jejich ekologický význam je obrovský, ale jejich přítomnost nám na druhé straně způsobuje značné problémy. V průmyslových vodních systémech urychlují biofilmy mikroorganismů korozi potrubí a kovových zařízení, dokonale ucpávají filtrační systémy a výrazně snižují účinnost výměníků tepla. S biofilmy se setkáme i v medicíně — mikrobiální biofilmy se významně podílejí na vzniku zubního kazu, osidlují endoprotézy, kardiostimulátory a jiné implantáty, které se tak mohou stát latentními zásobárnami patogenů pro chronické infekce. Odolávají přítom běžným dávkám antibiotik a tak je jejich kontrola — tj. omezení počtu — velice obtížná. Pro pacienty s poruchami imunity představují biofilmy dokonce smrtelné nebezpečí.

Už dlouho se předpokládalo, že pro vývoj mikrobiálních biofilmů je potřebná mezibuněčná signalizace. Teprve nedávno získané výsledky potvrdily důležitou roli

Obr. 5–7 Imprese z mikrobiálního světa. Detaily kolonií různých mikroorganismů na médiu s pH indikátorem. Snímky M. Kuthana a Z. Palkové

mezibuněčných signálů v tomto procesu. Pro vývoj biofilmů tvořených všudypřítomnou bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (způsobující těžké infekce u pacientů s HIV či s těžkým dědičným onemocněním — cystickou fibrózou) je potřebný již zmíněný quorum sensing. Zjistilo se, že mutantní kmeny této bakterie s poruchami v mezibuněčné signalizaci vytvářejí jenom tenké biofilmy citlivé již k nízké koncentraci detergentů. To má přirozeně obrovský praktický význam. Dokazuje to, že mezibuněčná signalizace se potenciálně může stát výborným terčem pro antimikrobiální látky.

Zastavme se ještě u naší studované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tento dnes již tradiční eukaryotický modelový organismus skýtá stále obrovské možnosti. Výhod je celá řada: známá kompletní sekvence celého genomu, množství mutantů, haploidní i diploidní fáze životního cyklu, propracované metody genetické a molekulární analýzy a mnoho dalších. Kromě těchto řekněme technických výhod mají tyto kvasinky ještě jiné přednosti. Protože jde o eukaryotické organismy, je možné množství poznatků získaných na těchto kvasinkách aplikovat přímo na vyšší organismy včetně člověka.

O paralelách mezi vývojem kvasinkové kolonie a embryogenezí jsme se již zmínili, ale je zde ještě další oblast, pro kterou může být výzkum těchto kvasinek přínosný. Ne všechny kvasinky jsou tak mírumilovné jako *S. cerevisiae*, některé jsou dokonce významnými patogeny. Nejzávažnější patogení kvasinkou je *Candida albicans* způsobující těžké systemické infekce hlavně u osob s poškozenou imunitou (např. po chemoterapii). Problém je v tom, že molekulární biologie *C. albicans* je poměrně málo prozkoumaná, což ztěžuje vývoj účinných terapií. A právě zde mohou výrazně pomoci výsledky výzkumu modelové kvasinky *S. cerevisiae*.

Doufáme, že náš další výzkum komunikace mezi kvasinkovými koloniemi přinese informace nejen pro biologii kvasinek, ale stane se i dalším podnětem pro studium signalizace v embryogenezi či při přenosu signálů mezi nervovými buňkami (dokonce i v centrální nervové soustavě má amoniak zatím bohužel málo prozkoumanou signální roli).

Již v úvodu příspěvku jsme se zmínili o tom, že mikroorganismy mohou být i krásné — makrofotografie mikrobiálních kolonií jistě nepotřebují žádný komentář (obr. 5–7).