

# INFORMAČNÍ LISTY



# OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM 21.5. 2009	1
K 90. výročí VFU a 190. výročí genetických zákonů v Brně (V. Orel)	2
Mohl Mendel ve svém výzkumu podvádět? (V. Orel)	4
Mendelovy reference k Darwinovu konceptu evoluce (A. Matalová)	6
Darwinismus včera a dnes (M. Bezděk)	8
Genetika na Přírodovědecké fakultě Ostravské univerzity v Ostravě (K. Malachová)	12
Evoluce asexuality – nový pohled na „stárnutí klonů“ (P. Drozd, K. Janko)	13
Molekulární taxonomie korýšů na oddělení zoologie (I. Horká, Z. Ďuriš)	16
Laboratoř molekulární biologie na KBE a její současné výzkumné zaměření (P. Pečinka, J. Červeň)	19
Využití klasických a molekulárně genetických metod při studiu taxonomie epifytických mechorostů (V. Plášek, J. Sawicki)	21
Využití plasmidové DNA pro detekci antioxidantního efektu látek rostlinného původu (Z. Rybková, K. Malachová)	22
Využití Amesova miniaturizovaného flukтуаčního testu pro detekci mutagenů (H. Sezimová)	25
O buňkách, nádorech a lidech (J. Šmardová)	29
Mendel forum 2009 (E. Matalová)	44
Společný vzdělávací projekt BFU, OU a MU (P. Pečinka, M. Fojta, C. Hofr)	45
Projekt pro zkvalitnění výuky biologie na Přírodovědecké fakultě MU v Brně: MOSSEB (R. Veselská, J. Šmarda)	47
Projekt integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe – od fyziologie k medicíně (J. Doubek, E. Matalová, I. Fellnerová)	48
Genetika česky (J. Relichová)	50
Mendel lectures (členové výboru GSGM)	50
Členské příspěvky 2009 (členové výboru GSGM)	51

.....

## INFORMAČNÍ LISTY

číslo 35, listopad 2009

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada - Výbor GSGM

Výkonný redaktor - prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

Kotlářská 2, 611 37 Brno

Zápis ze schůze výboru Genetické společnosti Gregora Mendela, která se konala dne 21.5.2009 na PřF MU v Brně

---

Místo konání: Seminární místnost pavilonu A2, Univerzitní kampus MU Brno - Bohunice, Kamenice 5, 625 00 Brno

Přítomni (bez titulů): Doškař, Fajkus, Kočová, Malachová, Miadoková, Relichová, Šmarda, Vlček, Zadražil, Zelený

Omluveni (bez titulů): Knoll, Pikálek, Vojtíšková, Slaninová

Zahájení: Prof. Doškař – zrekapituloval program schůze, bez připomínek. Projednávání jednotlivých bodů:

1. WWW stránky GSGM: bylo konstatováno, že stránky jsou opět funkční, ale některé údaje jsou zastaralé. Je třeba aktualizovat seznam členů dle stavu z března 2009 (o aktualizaci členů z ČR a kontaktních údajů se zasloužila Dr. Kočová). Tento seznam zašle neprodleně J. Fajkus A. Knollovi. Dále je třeba aktualizovat hypertextové propojení na zápisy a přidat vazbu na aktuální číslo IL.

2. Hodnocení obsahu minulého čísla IL – kvalitní náplň, ještě na základě příspěvků z konference GSGM, rovněž byla díky J. Šmardovi zkvalitněna formální úprava IL.

Financování IL je zatím zajištěno převážně ze sponzorských příspěvků.

Proběhla diskuze ohledně náplně příštího čísla IL: měla by pokračovat série představování pracovišť – na řadě je Ostravská univerzita, popř. další instituce v tomto regionu. V příštím čísle bude rovněž představena nová VŠ učebnice Genetiky, kterou pod vedením prof. Relichové překládá kolektiv odborníků z brněnských univerzit a pracovišť AVČR.

Budou rovněž vyzváni vědečtí pracovníci a končící studenti DSP, aby využili možnosti publikovat v IL přehledné články a autoreferáty disertačních prací. Členové výboru musejí toto aktivněji propagovat. Uzávěrka příštího čísla bude koncem října 2009.

3. Stav soutěže o cenu GSGM – byla vyhlášena, ale uzávěrka je až v r. 2010. Přihlášky sbírá dr. Vojtíšková, dr. Zelený potvrdil, že Cenu financuje firma MGP Zlín, s.r.o.

4. Informace o stavu účtu: na základě informace prof. Knolla byl k 31. 12. 2008 stav účtu 8430 Kč. Vzhledem k tomu, že za r. 2008 nebyl proveden výběr členských příspěvků, rozhodl výbor o tom, že platba za r. 2008 bude rovnoměrně rozdělena do let 2010-2012, kdy bude plný členský příspěvek činit 200 Kč na osobu. Obdobně se zařídí i slovenská část GSGM.

Různé: Na základě nabídky dr. Zeleného diskutovali členové výboru o možnosti účelného využití případného sponzorského příspěvku od firmy MGP Zlín, s.r.o. Bylo odsouhlaseno, že tyto prostředky budou využity k obohacení programu přednášek série Mendel Lectures od jara 2010 (jedna přednáška za semestr). Předběžné návrhy na pozvání špičkových zahraničních odborníků budou zaslány J. Fajkusovi do konce června 2009, následně provedou členové výboru výběr nejvhodnějších kandidátů na r. 2010.

Termín příští schůze výboru GSGM byl stanoven na začátek listopadu 2009.

Zapsal: Jiří Fajkus, tajemník výboru GSGM

## K 90. výročí VFU a 190. výročí genetických zákonů v Brně

### Vítězslav Orel

"Pro řadu mladých badatelů je budoucnost důležitější než minulost a historie vědy začíná zítřkem...., mnohá zjištění a teoretické názory slavně objevené byly známé již předtím. Proto se zdá být zajímavější věnovat pozornost dosaženým výsledkům dřívějších pracovníků a nové úsilí věnovat novým objevům. Navíc, je zajímavé poznat jak vznikaly nové problémy jak byly zkoumány a řešeny a jak a proč se rozvíjely naše ideje".

L. A. Lwoff 1953

Na citovaný výrok nositele Nobelovy ceny za objev v molekulární genetice v roce 1965 upozornil S. Zadražil v souvislosti s 200. výročím narození Charlese Darwina a 150. výročím vydání knihy *On the Origin of species* s přáním podnítit zájem genetiků o souvislost vzniku teorií evoluce a dědičnosti - i když se týkají 'jen historie vědy'. Nyní můžeme prokazovat úvahy o dědičnosti ve šlechtění ovcí již před Mendelovým narozením. Přispěl k tomu Charles Massy, australský genetik a majitel farmy pro šlechtění ovcí, ve své knize *The Australian Merino - the story of a nation*, vydané v roce 2007 v rozsahu 1262 stran. Vysvětluje projednávání problému dědičnosti ve šlechtění ovcí v Anglii a v dalších evropských zemích již ve druhé polovině 18. století. Vychází také z nových poznatků historického výzkumu, zveřejněných v roce 2001 v oxfordské knize R. J. Wooda a V. Orla *Genetic Prehistory in Selective Breeding a Prelude to Mendel*. Hlavní pozornost věnuje Massy šlechtění ovcí, dovážených z evropských zemí, především z Moravy, na produkci vlny v Austrálii.

Vyvolání zájmu o vědecké šlechtění ovcí připisuje J. Banksovi (1774-1820), prezidentovi londýnské akademie věd, kterého zaujaly velké změny v chovu ovcí v Anglii ve druhé polovině 18. století. V letech 1740-1770 vytvořil R. Bakewell (1725-1795) nové plemeno ovcí s poloviční hmotností kostí a dvojnásobkem svaloviny. O chov ovcí na produkci vlny neměl zájem. Chovatelé ovcí se tehdy domnívali, že se při chovu ovcí na produkci jemné vlny, které byly dováženy ze Španělska, zhoršuje ve změněných klimatických podmínkách jejich zdravotní stav a degenerují. Banks se domníval, že Bakewellův úspěch může být využit i pro šlechtění dovážených ovcí na produkci vlny. Odborníci ve Velké Británii, především A. Young (1741-1820) a záhy i zahraniční odborníci proto popisovali jím zavedený rodokmenový výběr rodičovských párů, spojený s kontrolou přenášení znaků rodičů a potomků a tehdy zásadně odmítané příbuzenské rozmnožování, označované jako *breeding-in- and-in*.

Po roce 1750 začali rozmnožovat a šlechtit ze Španělska dovážené ovce odborníci ve Francii, Sasku, Prusku a v zemích habsburské monarchie. Brzy začali vyvážet levnější vlnu do Anglie a britští nadšenci pro šlechtění ovcí na produkci vlny již neuspěli. Ve Francii měly velký vliv na úspěšné rozmnožování a chov španělských ovcí publikace Ch. P. Lasteurie (1759-1849), který již stručně popisoval zásady šlechtění na produkci vlny. V roce 1767 založil s podporou vlády přírodovědec L.J.M. Daubenton (1716-1802) pokusnou stanici pro šlechtění importovaných ovcí a v roce 1782 ve své knize vysvětloval význam jejich šlechtění, včetně Bakewellova postupu. Na území německých zemí bylo spojeno rozmnožování a šlechtění importovaných ovcí se jménem A. Thaera (1752-1826), který byl v roce 1809 jmenován profesorem kamerálních věd na berlínské univerzitě a ve své učebnici již podrobněji popisoval zásady chovu a šlechtění ovcí. Zvýšenou pozornost věnuje Massy vývoji rozmnožování a šlechtění ovcí na produkci vlny v zemích Habsburské monarchie. Jejich dovozem v letech 1768 a 1775 a rozšiřováním byl pověřen baron A. V. Kaschnitz (1744-1812), který se později také věnoval chovu ovcí na svém statku ve Zdoukách

nedaleko Kroměříže. V roce 1805 se v příručce o chovu ovcí zmínil o 'výzkumníkovi' F. Geisslernovi (1751-1824), kterému předal několik desítek dovezených ovcí. Na farmě s chovem 300 až 400 ovcí v nedalekých Hošticích vzniklo v období 1785 až 1805 nejušlechtlejší plemeno se stálou produkcí jemné vlny v Evropě.

V zemích střední Evropy byl záhy Geisslern známý jako *Moravský* nebo *Rakouský Bakewell*. Nové informace o šlechtění ovcí mohl získávat od hraběte L. Berchtolda (1759-1809), z asi 30 km vzdálených Buchlovic, kde měl výnosnou farmu s chovem ovcí na produkci vlny. V období 1788 až 1796 navštívil opakovaně Anglii a setkával se s J. Banksem. V roce 1798 zprostředkoval i setkání hraběte H. F. Salma-Reifferscheidta (1776-1836), průkopníka rozvoje textilního a strojírenského průmyslu na Moravě, s Banksem. Získané informace podnítily Salma ke spolupráci se vzdělaným přírodovědcem Ch. C. Andrém (1763-1831), který přišel do Brna v roce 1798 ze Saska jako učitel první evangelické školy. Společně změnili tehdy zaostávající Moravskou zemědělskou společnost na *Moravskoslezskou společnost pro zvelebení orby, přírodoznalství a vlastivědy* s programem zdokonalit zaostalé a válkou rozvrácené hospodářství. Měla působit jako akademie věd a zároveň hospodářská společnost. Objevy M. Koperníka (1473-1543) a I. Newtona (1642-1727) měly podněcovat zájem členů i o rozvíjení základního výzkumu, ze kterého může vzejít později na Moravě podobný objev.

V roce 1812 uváděl syn R. André (1792-1827) při hodnocení učebnice chovu a šlechtění ovcí A. Thaera, že na Moravě mají šlechtitelé mnohem větší zkušenosti než popisuje berlínský profesor. V roce 1814 André otec zorganizoval při zemědělské společnosti *Spolek přátel, znalců a podporovatelů chovu ovcí pro ještě větší a důkladnější povznesení tohoto hospodářského odvětví a na základě toho založeného vlnářského průmyslu v továrnách a obchodu*, zkráceně označovaný jako *Spolek šlechtitelů ovcí*. Jeho působnost významně ovlivňoval R. André, který po ročním studiu na Geisslernově farmě zveřejnil v roce 1816 knihu, ve které podrobně vysvětloval, že šlechtitelské umění spočívá v chovu čistých a nemíchaných zvířat a především v mistrovské schopnosti hodnocení a výběru rodičovských párů pro rozmnožování. Šlechtěná zvířata mají vrozenou schopnost pro zdokonalování a šlechtitel má jen asistovat přírodě při vytváření stále vyšší dokonalosti. V knize popisované hodnocení jakosti vlny mikrometrem a upraveným mikroskopem bylo oceňováno jako epochální krok umožňující využívání matematiky ve vědeckém šlechtění ovcí. Posuzovatel v Praze knihu označil jako nejdůležitější a nejnáročnější dílo pro zvelebování chovu ovcí na vlnu, které bylo dosud napsané.

V roce 1818 André podnítil šlechtitele ovcí k hledání teoretického vysvětlení přenášení znaků rodičů na potomky a problémů příbuznosti a zdravotního stavu ovcí, což na jeho podnět zevšeobecnil E. Festetics jako *genetické zákony*. Za své působnosti v Brně se André dostával do konfliktu s policií a v roce 1821 odešel do Stuttgartu. O další rozvíjení teorie šlechtění ovcí se zasloužil J. K. Nestler (1770-1841), jmenovaný profesorem zemědělské nauky a přírodopisu na univerzitě v Olomouci v roce 1821. V roce 1829 zveřejnil své přednášky o vědeckém šlechtění zvířat a rostlin, což byl i první pokus o vysvětlení problému dědičnosti, který tehdy pro neznalost podstaty oplození nebyl ještě vědeckým pojmem. Na výročních sjezdech šlechtitelů v letech 1836-1837 účastníci již projednávali návrh profesora Nestlera a F. C. Nappa (1792-1867), opata kláštera Augustiniánů v Brně, že se nejdříve musí vysvětlit *fyzilogický problém dědičnosti*. Vyvolaná diskuse podnítila Nestlera ke zveřejnění rozsáhlé studie o historii dědičnosti. Chassy prokazuje, že Spolek šlechtitelů ovcí v Brně byl v průběhu 25 let středoevropským střediskem setkávání až 300 odborníků ve šlechtění ovcí, kteří při vypracovávání šlechtitelských metod dospěli ke stanovení fyziologického problému dědičnosti před Mendelovým příchodem do Brna.

V roce 90. výročí založení VFU a 190. výročí zevšeobecnění empirických genetických zákonů v Brně se nabízí připomenout Nestlerovu úvahu o rozvíjení vědeckého poznání v širší

historické souvislosti zveřejněnou před stanovením vědeckého úkolu dědičnosti: *Historie vědy a umění je stejně poučná jako samotná věda. Nutí nás a naše současné vědění srovnávat s poznáním z předcházející doby a poněvadž se musí při každém srovnávání více přemýšlet než při pouhém jednostranném pozorování, nutí nás historie vědy často více přemýšlet, než nás poučuje samotná věda.* To by mohlo být podnětem k přehodnocení vývoje výuky dědičnosti a zdravotního stavu zvířat v širší historické souvislosti a k interdisciplinárnímu pojetí molekulární biologie a genomiky na VŠV se zvláštním zřetelem k zaváděné třístupňové úrovni a systému celoživotního vzdělávání.

Orel, V., Treu, M. (2009). 90. výročí VFU Brno a 190. výročí genetických zákonů v Brně, *Vita universitatis* 2:34.

Redakce *Vita universitatis* souhlasí se zveřejněním v *Informačních listech GSGM*.

27. 2. 2009

Za redakční radu Dr. Mirko Treu

## Mohl Mendel ve svém výzkumu podvádět?

### Vítězslav Orel

V roce 1965 při stém výročí zveřejnění Mendelova výzkumu s hybridizací rostlin byly Mendelovy vědecké úspěchy jednoznačně oslavované a spojované se vznikem a počátečním vývojem genetiky. Když ve třicátých letech prokázali genetické syntézy genetiky s evolucí anglický genetik R. A. Fisher (v roce 1936) upozornil na to, že genetické stále neví co Mendel objevil a jak ke svému výsledku dospěl. To podnítilo po roce 1950 historický výzkum, ve kterém autoři začali prokazovat, že Mendel rozpracoval metodu výzkumu a vysvětloval základy dědičnosti v souvislosti s objasňováním zákonitosti vývoje.



Sir Ronald Aylmer Fisher (1890-1962)

Novátorský přístup prokazoval Mendel v pokusech s mimořádně velkým počtem rostlin. Po roce 1965 se objevily úvahy, že upravoval číselné údaje ve prospěch předvídané zákonitosti. V roce 2008 vydalo nakladatelství university Pittsburgh 330 stránkovou knihu *Ending the Mendel - Fisher Controversy*, ve které přední američtí přírodovědci, A.W.T Franklin, D.J. Edwards, D.J. Fairbanks, D.L. Hartl a T. Seidenfeld v sedmi kapitolách podrobně vysvětlují jak genetické kriticky odmítali vysvětlování historiků věd, že Mendel své údaje upravoval ve prospěch očekávaných závěrů. V úvodní 76 stránkové studii *The Mendel Fisher Controversy: An Overview*, profesor fyziky na University Colorado A. Franklin uváděl: Před 140 lety Mendel zveřejnil svou plodnou (seminal) práci, před 70 lety vyšla Fisherova kritická studie a více než před 40 se objevují úvahy o úpravách číselných údajů z jeho pokusů. Označují se jako Mendel-Fisher controversies. Podle Franklina mohl dát podnět k rozporným závěrům v roce 1964 historik přírodních věd C. Zirkle, který ve své přednášce v New Jersey Academy of Science uváděl, že Mendelovy výsledky se zdají být

podle očekávání odpovídající. Někteří moderní statistikové, vyzbrojeni metodami moderní statistiky, začali upozorňovat, že Mendelovy číselné údaje byly až "too good" ve prospěch očekávání. Zirkle k tomu dodal: 'Kdyby nebyly tak dobré, Mendel by nemohl objevit mendelism'.

Později se autoři úvah o 'příliš dobrých' údajích odvolávali hlavně na Fishera. Franklin (s. 29) však upozornil, že Fisher především zdůrazňoval originální metodu výzkumu a vyhodnocení výsledků a jen přiznával, že některé údaje mohly být upravovány. Věřil však, že uváděné údaje nepřipouštěly vědomé falsifikování. Franklin připomněl studii *Will the story of too good results continue?* Byla zveřejněná v roce 1968 v Orlem v časopisu *Bio Science*. Zdůrazňuje se v ní, že před rokem 1964 nebyly publikovány žádné údaje o rozpornosti číselných údajů. K tomu se dodává, že J. Kříženecký a R. Olby patřili k autorům, kteří jen připouštěli, že když Mendel zjišťoval 'příliš dobré' výsledky, mohl ukončit další hodnocení. V závěru studie se zdůrazňuje, že také nejsou žádné důkazy o úpravách číselných údajů někým z Mendelových pomocníků. Pro ukončení diskuse navrhol Orel výrok amerického genetika T. Dobzhanského z roku 1967: 'Naopak, Mendel byl nejpečlivějším experimentátorem s nejpronikavěji myslícím duchem'.

Zveřejňování rozporných údajů o Mendelově výzkumu pokračovalo. Příspěvky historiků věd v roce 1990 kriticky hodnotil americký historik věd Jan Saap. Upozorňoval, že Fisher se nepokoušel diskreditovat Mendela, ale spíše 'oslavovat jeho sílu abstraktního myšlení'. Jako pátá kapitola (s. 167 - 207) je v pittsburghské knize zařazena kopie čtyřicetistránkové studie V. Orla a D. L. Hartla *Controversies in the interpretation of Mendel's discovery*, publikovaná již v roce 1994 v časopisu *History and Philosophy of Life Science*. Autoři podrobně vysvětlují původ a podstatu Mendelova objevu a v závěru jen poukazují na rozporné údaje o falsifikování číselných údajů.

Větší pozornost věnuje Franklin publikovaným měnícím se názorům italského historika věd Di Trocchio, který původně podrobně popisoval falsifikování Mendelových údajů. V roce 1991 však dospěl k závěru, že Mendelův výzkum zdaleka nebyl plodem metodických chyb nebo podvodů, ale je historickým mezníkem ve vývoji vědy a musíme Mendela hodnotit jako 'otce a zakladatele genetiky'. V závěru Franklin s odvoláním na spoluautory Hartla a Fairbankse uvádí, že všechny údaje o Fisherově tvrzení o Mendelových podvodech již mohou být na základě podrobných analýz odloženy.

V naší zemi je možno připomenout obvinění Mendela z podvodných číselných údajů v Brně v roce 1952 profesorem lékařské biologie univerzity v Brně, F. Herčíkem (1905-1966) v článku 'Chybné základy mendelismu', který byl zveřejněn v době odmítání genetiky jako *reakční vědy* a násilného ideologického prosazování dědičnosti získaných vlastností.



**Doc. MVDr. Vítězslav Orel, DrSc.** je významným badatelem v oboru historie vědy. Před svým odchodem do penze dlouhodobě působil jako ředitel Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně.

## Mendelovy reference k Darwinovu konceptu evoluce

Anna Matalová

Velká pozornost, která byla v Evropské unii věnována 160. výročí zveřejnění Darwinova stěžejního díla, vzbudila také zájem o vztah Mendela k Darwinovi. V literatuře se někdy mylně uvádělo, že se Mendel s Darwinem setkal v roce 1862 při své návštěvě světové výstavy v Londýně. V této souvislosti byly rozvíjeny různé spekulace, z nichž se žádná nepotvrdila. My se soustředíme na Mendelovy odkazy na Darwinovo dílo, se kterými se můžeme setkat v jeho práci o *Pisum*, *Hieracium* a odborné korespondenci s Nägelim. Darwinovo pojetí „descendenční teorie“ je ve své podstatě lamarckistické. Mendel zveřejnil svou koncepci přenosu dědičných jednotek šest let po Darwinově „Origin of Species“, kterému se dostalo u odborníků významné pozornosti. Laická veřejnost vkládala velká očekávání především do „dědičnosti získaných vlastností“, která schopnějším jedincům měla zajistit větší šanci v přírodním procesu přežívání „lépe vybavených“. Ve svém důsledku měla přispívat k „vzestupnému“ procesu zušlechťování ve vývoji druhů.

V takovéto atmosféře Mendel zveřejnil svou práci o pokusech s hybridy rostlin. Hlavní proud věd o živé přírodě se soustřeďoval na studium kreativity tlaků prostředí, které měly vyvolávat očekávané změny v dědičnosti a vzniku nových druhů. Účelnost těchto změn určovala „síla“ přírodního výběru. Vedle účelnosti se Darwin, na rozdíl od Mendela, který pracoval s náhodou, zaměřil zřejmě pod vlivem naturfilozofie také na účelovost změn.

V tomto spektru pozic Mendelovi nebylo neznámo, „že získaný výsledek není snadné uvést ve shodu se současným stavem vědy a že za těchto okolností může být zveřejnění tak osamocené experimentu dvojnásob nebezpečné, pro experimentátora stejně jako i pro věc, kterou zastává“ (Mendel Nägelimu, dále jen MN, 18. 4. 1867). Ve své práci se Mendel vyjádřil o jejím významu pro studium vývoje přírody: „ . . . nicméně se zdá, že je to jediná správná cesta, která nás může konečně přivést k řešení otázky, která má pro vývoj organických forem nezanedbatelný význam“ (*Pisum* 1865). Nepřekvapilo ho, že Nägeli o jeho pokusech mluvil s nedůvěřivou opatrností. Mendel ho ujistil, že sám by se „v podobném případě nezachoval jinak“ (MN 18. 4. 1867). Nemůžeme vinit Nägeliho ani další hybridizátory, že v Mendelově práci hned neobjevili logiku jeho systémového řešení, která sledovala detailní a postupný vývoj všech potomků hybridu po několik následujících generací. Na rozdíl od svých současníků Mendel studoval soustavu s pamětí, u níž stanovil výchozí podmínky: „Rozhodnutí však můžeme očekávat pouze od pokusů, u kterých bude diagnosticky doložen stupeň příbuznosti mezi hybridními formami a jejich kmenovými druhy a nebude hodnocen jen podle celkového dojmu“ (MN 31. 12. 1866). Mendel byl prvním experimentátorem, který prověřoval „paměť“ testováním na stabilitu jednotlivých znaků rostlin dříve, než je začal křížit. 34 více či méně rozdílných odrůd hrachu podrobil dvouleté zkoušce na konstantnost sledovaných znaků. Jako fyzik se soustředil na organizovanost prvků dědičnosti v zárodečné buňce, nikoliv na organismus jako celek. Litoval, že ani Gärtner, tento zasloužilý muž, nezveřejnil ani jeden podrobný popis svých jednotlivých pokusů, ani si nedal práci s dostatečnou diagnózou forem kříženců, jmenovitě těch, které pocházejí ze stejného oplození. Údaje jako „někteří jedinci se více blížili mateřskému, jiní otcovskému typu“, „nebo „potomci se vraceli víc k typu kmenové matky“ atd. jsou brány příliš obecně, příliš neurčitě, než aby se z nich dal odvodit jistý soud (MN 31. 12. 1866). Při studiu role hybridů v evoluci postupovali všichni tehdejší hybridizátoři stejně jako Gärtner.

V dopise Nägelimu z 18. 11. 1873 se Mendel vyjadřuje originálně k roli hybridů v kontextu Darwinova boje o/pro život na úrovni organizovanosti dědičných prvků: „Kdyby se věc měla vskutku tak, potom by spontánní vznik kříženců u *Hieracií* mohl být přičítán na vrub dočasným rušivým vlivům, které by při častém opakování nebo nepřetržitém trvání



musely nakonec přivodit zánik postiženého druhu, zatímco jednomu nebo druhému šťastněji o r g a n i z o v a n é m u potomku křížence, kterému právě trvající telurické a kosmické poměry vyhovují, by se mohlo podařit, aby zahájil boj o existenci a pokračoval v něm po dlouhá údobí, až by i jeho nakonec stihl stejný osud.“

Ve své přednášce o jestřábníku z roku 1869 se Mendel poprvé vyjádřil kriticky o Darwinově myšlence konstantních hybridů a podal své vysvětlení: „Otázka původu početných konstantních středních forem vyvolala v poslední době nemalý zájem poté, co jeden známý znalec Hieracií vyslovil v duchu Darwinova učení názor, že tyto formy se dají odvodit z transmutací zaniklých nebo ještě existujících forem.“ Mendel zastával názor, že „zprůměrované“ formy (Mittelformen) nemusí být transmutacemi, ale mohou vznikat jako přechodné formy při křížení mezi hlavními druhy (Übergangsformen, Zwischenformen), jak je popsal ve své práci.

Darwinovo pojetí permanentní soutěže jako podmiňujícího prvku životaschopnosti organismů, které potvrzoval i Naudin, podrobil Mendel experimentální zkoušce. „Jen jeden pokus se mi zdál tak důležitý, že jsem ho nemohl odložit na pozdější dobu. Týká se Naudinova a Darwinova mínění, že k dostatečnému oplození jednoho vajíčka nestačí jediné pylové zrno. Jako pokusnou rostlinu jsem použil, stejně jako Naudin, *Mirabilis Jalapa*. Výsledek mého pokusu je však zcela jiný. Z oplozování jediným pylovým zrnem jsem získal 18 dobře vyvinutých semen a z nich stejně tolik rostlin, ze kterých už 10 kvete. Většina těchto rostlin je stejně bujných jako ty, které vznikají volným opylením“ (MN 3. 7. 1870).

Mendel pochyboval o Darwinově tezi o vzniku „nových konstantních hybridů“, tj. takových, které v dalších generacích neštěpí a nabývají tak charakteru nových druhů. Problematiku „konstantních hybridů“ Mendel pečlivě sledoval ve svých pokusech s jinými rostlinami než *Pisum*, ale nikde se s nimi nesetkal. 3. 7. 1870 sdělil Nägelimu: „Z pokusů z dřívějších let jsem v minulém roce uzavřel pokusy s *Matthiola annua* a *glabra*, *Zea* a *Mirabilis*. Jejich kříženci se chovali přesně jako *Pisum*. To, co Darwin převzal z cizích sdělení o hybridech jmenovaných rodů v knize Variování zvířat a rostlin v domestikaci, je třeba v mnohém směru poopravit.“

V souvislosti s titulem Darwinovy knihy je dobré upozornit na to, že Mendel stejně jako Darwin studoval projevy variování (variieren, nověji variieren). Mendel pro ně našel vysvětlení v oddělování a sjednocování dědičných prvků na úrovni pohlavních buněk. „Nové“ ve fyzice je pouze novým uspořádáním či novou kombinací. Jak poukazuje Popper v Bídě historicismu: „Ve světě, který popisuje fyzika, se nemůže stát nic, co by bylo skutečně a v sobě nové.“ V chápání „novostí“ zeje mezi Mendelem a Darwinem propast, která je umocněna Mendelovým univerzitním vzděláním ve fyzice, které mu umožnilo vysvětlit přenos vloh pro znaky organismů jazykem exaktní vědy.

Mezi tehdejšími botaniky a Mendelem trval v polovině minulého století koncepční rozpor v hodnocení barvy květů, semen, listů atd. Botanikové popisovali barvy a jejich odstíny odvozovali od ředění a míšení ve smyslu „slité“ dědičnosti. Mendel jako fyzik znal Newtonovu Optiku, která říkala, že světlo je tvořeno hmotnými částicemi. V tomto smyslu Mendel pojednává škálu barev u květu *Phaseolus multiflorus* v kapitole o pokusech s hybridy jiných druhů rostlin ve své klasické práci: „Ale i tyto záhadné jevy by bylo možné pravděpodobně vysvětlit podle zákona platného pro *Pisum*, kdybychom směli předpokládat, že barva květů a semen u *Ph. multiflorus* se skládá ze dvou nebo více samostatných barev, které se jednotlivě chovají stejně jako každý jiný konstantní znak rostliny.“ Proti ředění a míšení staví také výsledek svého pokusu s *Mirabilis J.*: „Potomci hybridu karmínová + žlutá, kteří v první generaci získali kmenové barvy, prokázali také ve druhé generaci ze semen, že jsou v barvách stálí. Obě barvy se jeví tak čisté, jako kdyby nikdy nebyly spojeny křížením.“ Myšlenka „slité“ dědičnosti hrála významnou roli v darwinovském konceptu „descendenční nauky“ při tvorbě nových forem a barev. Mendela naopak zaujal vysoký

stupeň stability, kterou vykazovaly jednotlivé znaky. Pro svou hybridizační práci s hrachem byl Mendel motivován umělými oplozeními okrasných rostlin s cílem získání nových barvených odrůd. „Nápadná pravidelnost, s jakou se po oplození mezi stejnými druhy stále vracely tytéž hybridní formy, dala popud k dalším pokusům, které měly sledovat vývoj hybridů u jejich potomků.“ Mendela zajímalo, co přetrvává i co se mění, ale rozlišoval v tom, zda je změna dočasná (a končí smrtí organismu) nebo je trvalá (a přenáší se na potomky). „Převedení podstatného rozdílu ve vývoji hybridů, o které jsem se zde pokusil, na t r v a l é nebo p ř e c h o d n é s p o j e n í rozdílných elementů buňky může samozřejmě mít jen cenu hypotézy“ (*Pisum* 1865).

Trvalo 30 let, než darwinisté přijali Mendelovu ideu organizovanosti prvků v otevřeném systému. Průlomem v hlavním proudu vědy se stalo až prohlášení autora mutační teorie De Vriese z roku 1900, když ohlásil změnu vědeckovýzkumné práce: „Současné učení o křížencích považuje druhy, poddruhy a variety za jednotky, jejichž kombinací vznikají opět kříženci. Tento způsob myšlení je třeba ve fyziologickém výzkumu opustit. Postačí pro systematické a zahradnické účely, ale ne pro hlubší studium druhů. Na jeho místo je třeba dosadit princip křížení druhových znaků. Jednotky druhových znaků je třeba považovat a studovat jako samostatné veličiny.“ Tím byla cesta pro osvojení Mendelovy teorie volná. Trvalo dalších třicet let než neslučitelnost Mendelovy koncepce a Darwinova pojetí vývoje druhů byla překonávána novými objevy v genetickém výzkumu v prvních dekádách 20. století a muselo dojít k evoluční syntéze. Staré evoluční paradigma bylo radikálně pozměněno, aby mohlo pojmout monumentální stavbu mendelismu, jak byla tehdy genetika běžně označována.

Hnutí lisenkistů proti mendelismu po roce 1948 v prosovětsky orientovaných zemích bylo politicko-ideologickým tažením a není vinou ani zásluhou Darwina nebo Mendela, že se jejich jména dostala na standarty znesvářených táborů. Pro vědce je důležité, že i v 21. století jsou myšlenky Mendela a Darwina inspirativní.



**PhDr. Anna Matalová** je dlouholetou pracovnící Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně. Působila zde od jeho založení a po roce 1989 až do odchodu do důchodu jako vedoucí.

## **Darwinismus včera a dnes**

### **Milan Bezděk**

Někteří fyzikové hloubající o podstatě věcí věří, že je v základech světa jednotící princip, který bude odhalen a popsán „teorií všeho“. Většina badatelů zkoumajících živou přírodu je, spolu s klasiky Theodosiem Dobzhanskim, Ernstem Meyrem a Johnem Meynardem Smithem přesvědčena, že jednotící princip v tomto případě již odhalili Charles Darwin a Alfred Russel Wallace a popsali jej svou teorií evoluce. Vyšli z nesporného faktu evoluce a objevili její přirozený mechanismus.

Darwin, Wallace, a po nich darwinisté, vysvětlují různost živých forem jako důsledek přírodního výběru z dědičné variability. Všechny živé formy podle toho divergují z jediného zdroje a jsou tedy v generickém vztahu; pro darwinistu evoluce není pokrokem a nesměřuje

k předem danému cíli. Od roku 1859, kdy Darwin publikoval svůj „*Původ druhů*“, došlo ve vědách o živé přírodě k mnohým významným událostem a darwinismus za sto padesát let prodělal svůj vlastní vývoj v souladu s hromadícími se poznatky paleontologie, srovnávací anatomie, embryologie a genetiky. V první polovině 20. století byla znovuobjevená mendelovská genetika obohacena genetikou populační. Zatímco ta první se soustřeďovala na vztahy mezi jednotlivými geny, druhá přispěla zkoumáním frekvenčních a kombinačních změn v množinách genů (alel).

Původní Darwinova teorie, darwinismus, integrující klasickou mendelovskou genetiku a genetiku populací byla nazvána „novou syntézou“ - „neodarwinismem“; neodarwinismus interpretuje evoluci jako graduální změnu relativních frekvencí alel (na této vývojové etapě ustrnula převážná většina dnešních laických kritiků darwinismu; za všechny uveďme alespoň dílo P.J. Johnsona, „*Darwin on Trial*“, 1993). Neodarwinismus se ve druhé polovině 20. století dostal do problémů s fakty, hromadícími se z různých oborů biologie - zejména s revolučním objevem mobility genů. Analýzu této situace a vědeckou kritiku „nové syntézy“, předložil americký genetik R. C. Lewontin („*The Genetic Basis of Evolutionary Change*“, 1974). Ukázal, že gradualistický model evoluce a klasická i populační genetika nemohou hodnověrně vysvětlit vzrůst biologické complexity a vznik nových druhů, aniž by byly principiálně doplněny dalšími poznatky.

Od 19. století se formovala embryologie jako experimentální věda. Výjimečnou osobností tohoto období byl K. von Baer, který na základě srovnávací anatomie embryí obratlovců objevil základní vývojové archetypy a usoudil, že jsou z nich v každé evoluční linii, ale v různých vývojových fázích, odvozovány druhově specifické struktury (1828). Tento geniální závěr již předznamenal dnešní představy o vztahu mezi ontogenezí a fylogenezí. Evoluční a vývojová biologie však dlouho existovaly jako dvě oddělené vědní disciplíny. Ani idea statického genu - základní princip klasické mendelovské genetiky, ani modely populačních genetiků, nebyly totiž použitelné pro vysvětlení embryonálního vývoje a molekulární podstaty evolučních změn. Napřed bylo nutno vstříbat řadu „heretických“ poznatků a vyčkat jejich nových interpretací.

V 50. letech byl novými cytologickými metodami objeven paradoxní nesoulad mezi obsahem DNA v buněčném jádře a biologickou komplexitou. Evolučně pokročilé organismy totiž často obsahují méně jaderné DNA, než organismy složené z několika málo typů buněk. Dokonce i v rámci téže taxonomické skupiny může existovat velký rozptyl v obsahu jaderné DNA. Vysvětlení tohoto paradoxu přinesl objev nového typu DNA, která v genomech mnohonásobně převažuje nad obsahem tradičních genů a přitom nese informaci o složení proteinů. Je však příčinou *inherentní nestability genomů*, jevu vymykajícího se paradigmatu klasické genetiky. Vznik principiálních evolučních inovací („makroevoluci“) nyní spojujeme nikoli s graduální akumulací drobných mutací, ale právě s genomovou nestabilitou: spontánním zmnožováním sekvencí a přeskupování genomových modulů. V souvislosti s tím evoluci biologické complexity vysvětlujeme *kumulativní selekcí*, nezacíleným mechanismem, který v každém evolučním kroku využívá „součástky“ (moduly), úspěšné v předchozích etapách. Kumulativní selekce evoluci potencuje, ale současně vymezuje její možnosti a trajektorie. Poznamenejme, že v mnohých diskusích vznikají komunikační problémy směřováním pojmu „postupná“ evoluce s evolucí kumulativní selekcí.

V 60. letech byly objeveny genetické regulační mechanismy (F. Jacob, J. Monod) a C.H. Waddingtonem postulován „epigenetický“ (míněno „vývojový“) význam regulačních sítí. Tvoří se nové paradigma, paradigma vývojové molekulární genetiky. Původní model statického genomu, jen vzácně pozměňovaného náhodnými mutacemi, nahradily nové principy, *pilíře dnešní, „post-neodarwinistické“ evoluční teorie*:

- Genomy nejsou pasivními akumulátory genetických změn, ale samy participují na své evoluci skrze ovlivnitelnou dynamiku sekvencí.

- Organickou evoluci dnes chápeme jako důsledek výběru z dědičných modifikací (variability) ontogenetických programů.

Rozlišujeme *fakt evolve* a *mechanismy evolve*. Oba tyto aspekty jsou oblíbeným terčem laické kritiky. Podrobnější rozbor těchto kritik by zaujal větší prostor, než máme k dispozici. Lze však obecně zmínit některé základní kritické platformy:

- kritika neuznávající fakt evoluce
- kritika uznávající fakt evoluce, neuznávající existenci jejího přirozeného mechanismu
- vědecká kritika uznávající fakt i přirozený mechanismus evoluce
- pseudovědecká kritika, uznávající fakt i přirozený mechanismus evoluce, založená na nepochopení základních principů.

Z biblických axiomat (Genesis) vycházejí „kreacionisté“, popírající samotný fakt evoluce. Dlouhodobým vlivem v tomto směru působil Darwinův charismatický předchůdce C. Linné. Jedním ze základních axiomů kreacionismu je údaj o stáří Země; obecně přijatou konstantou je  $6 \times 10^3$  let. Kreacionismus je, formálně vzato, hypotézou, jejíž platnost může být ověřena metodami vědy. Stojí za zmínku, že dnešní, méně charismatičtí, zato bojovnější následovníci Linného, nacházejí ohlas ve vlivných politických kruzích; jejich konečným cílem je podřízení vědeckého výzkumu náboženským autoritám (k svéráznému „obohacení“ debat o evoluci nedávno přispěla i konference s účastí představitelů naší politické scény). Pro řadu myslitelů, přijímajících samotný fakt evoluce, je problémem představa o přirozené emergenci genetické informace. Tak francouzský filosof Tresmontant soudí, že „v žádném okamžiku svých dějin vesmír nedokáže vysvětlit vznik nové informace, jež v něm vyvolává k životu nové bytosti...“ (C. Tresmontant, *„Dějiny vesmíru a smysl stvoření“*, 1993). Jiní, kteří nepochopili podstatu mechanismu kumulované selekce, používají kvasivědeckou argumentaci, založenou na nesprávném použití pravděpodobnostních kalkulací a dokazují nemožnost vzniku komplexních systémů postupným hromaděním chyb.

Mezinárodním folklorem se stala hypotéza, nahrazující evoluční mechanismy odvíjením hypotetického inteligentního designu (ID). Původ této myšlenky můžeme vystopovat u Augustina a Tomáše Akvinského. Podrobného rozpracování se jí dostalo v 18. století Bonnetem, Treviranem a především anglickým teologem W. Paleyem (*Argument from Design, Natural Theology*, 1802). Současným populárním představitelem koncepce ID se stal americký biochemik M. Behe s argumentem „neredukovatelné komplexity“ (NK). Existence NK je podle něj důkazem inteligentního stvořitelského záměru (Behe do svých úvah, kromě podpůrných argumentů, opomenul zahrnout i příklady neinteligentních omylů, které vznik NK doprovázejí - na což před více než dvěma stoletími narazil Linnéův současník Ch. Buffon). Argumentace M. Behe (viz *„Darwin's Black Box“* 1996) se zakládá na důkazu kruhem: [ID je příčinou NK  $\Leftrightarrow$  NK dokazuje ID]. Hypotézy založené na koncepci ID nemohou být ověřeny a tudíž nepřinášejí žádný objektivní poznatek. Koncepce ID je nelogickou formou kreacionismu. Díky své pseudovědecké formě však umožňuje zneužití ve výukových programech nenáboženských disciplin. Je neúčelná: implikuje deistické pojetí vztahu Boha ke světu (v praxi se mnohý trpící neobrací k hypotetickému designeru, ale hledá Prozřetelnost, se kterou chce mít osobní vztah).

Pro církevní věřící by měly být alespoň podnětné, když ne závazné, závěry komise papežské akademie věd z roku 1982, že „fakt organické evoluce, včetně evoluce primátů a člověka, lze považovat za dokázaný“. Filosof a paleontolog, jezuita P. Teilhard de Chardin, vysvětluje i existenci nedokonalostí a zla jako nutný důsledek lokálních neuspořádaností evolvujícího vesmíru. Řešení „záhad“ přírody s pomocí nadpřirozena odmítá nejen většina vědců (v čele s R. Dawkinsem), ale i mnozí moderní teologové (P. Tillich, R. Bultmann, D.

Bonhoeffer). Spatřují v něm jen nepoctivou snahu hledat Boha v mezerách vědeckého poznání.

*Jestliže z úvah vyloučíme představu o účelnosti a zacílenosti evoluce, rozplyne se i problém „neredukovatelné complexity“. Řeší jej princip modularity a zmíněný mechanismus kumulované selekce. Málokdo pochybuje o tom, že proteosyntetický aparát, včetně genetického kódu, představuje unikátní, vysoce komplexní systém, přinejmenším stejně komplexní, jako enzymová kaskáda v mechanismu srážlivosti krve, citovaná M. Behe. Přesto jeho vznik a evoluci můžeme na základě současných poznatků „redukovat“ na posloupnost kumulativních kroků (pojedenali jsme o tom jinde: M.B., „O vzniku života II. Vznik a evoluce proteosyntézy“, Živa 2003/2; analogicky bychom mohli rozebírat i jiné oblíbené argumenty zastánců ID, například nemožnost postupné evoluce lokomočního aparátu bakterií nebo oka živočichů).*

Problémem pro pochopení dnešní moderní evoluční teorie, na rozdíl od neodarwinismu, je její nenázornost (podobně jako v případě současných fyzikálních teorií). Zahrnuje složité molekulární principy a mechanismy, implementuje poznatky z řady nebiologických disciplin (teorie informace, teorie nelineárních procesů a chaosu, termodynamiky otevřených systémů. Kooperativita molekul a samoorganizace molekulárních komplexů jsou považovány za hnací sílu pro vznik života v prebiotických podmínkách. Symbiogenezi a mezidruhový přenos genetické informace jsou vysvětlitelné diskontinuity ve vzrůstu biologické complexity - například formování jádra, cytoplasmy a organel eukaryotické buňky z prokaryotických předchůdců. Pro současného darwinistu je i emergence genetické informace srozumitelná jako důsledek molekulární selekce, bez dodatečných předpokladů, viz M. Eigen, „Selforganization of Matter and the Evolution of Biological Molecules“, 1971).

*Kde jsou příčiny odporu k racionálnímu vysvětlení našeho původu? Především je to iluze o naší výlučnosti spolu se subjektivní představou o smyslu a cíli našeho bytí. Další příčinou je samotná lidská přirozenost. Díky ní se pídíme po podstatě věcí a jevů, ale současně dospíváme k úzkosti z důsledků toho poznání; za poznání jsme bolestně trestáni ztrátou životních jistot (tento lidský úděl popisuje příběh o vyhnání z ráje). Evoluční teorie (ruku v ruce s moderní fyzikou) nemilosrdně odstraňuje srozumitelný model světa Dantovy Božské komedie. Nutí nás k duchovní dospělosti v reálném světě, což není snadné sousto.*

Mimořádné osobnosti intuitivně, prozřením, dospěly k etice, založené na úctě k životu. Hledáme-li smysl existence v „odlidštěném“ světě vědy, hledejme jej, paradoxně, právě na půdě Darwinovy evoluční teorie; ta sice není světskou náhražkou náboženství, zato může být přirozeným zdrojem a zdůvodněním etiky úcty k životu (konečně, nabízí i kosmickou perspektivu: v ní jsme spojeni se vznikem a dějinami celého vesmíru).



**Doc. RNDr. Milan Bezděk, CSc.** byl dlouholetým výzkumným pracovníkem Biofyzikálního ústavu AV ČR, nyní působí jako pedagog Ústavu fyziky kondenzovaných látek na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně.

# Genetika na Přírodovědecké fakultě Ostravské univerzity v Ostravě

## Kateřina Malachová

Moravskoslezský kraj je tradičně vnímám jako místo, kde převládal těžký průmysl a v důsledku toho je zde příroda zcela zdevastovaná. Současnost však není již tak černobílá, neboť struktura průmyslu se mění, staré závody se zavírají, výroba v hutích se utlumuje a šachty až na několik, jsou dnes již zavřeny.

Přes historicky upřednostňovaný rozvoj technického vysokoškolského vzdělávání se podařilo v tomto hustě osídleném kraji vybudovat v roce 1991 vysokou školu s klasickým všeobecným univerzitním zaměřením - Ostravskou univerzitu v Ostravě, která má dnes šest fakult. K progresivně se rozvíjejícím fakultám patří Přírodovědecká fakulta, na které má sídlo také Katedra biologie a ekologie. Při svém vzniku využila tato katedra odborného i materiálového potenciálu Katedry biologie založené již v roce 1953 na tehdy samostatné Pedagogické fakultě a částečně také Ekologického ústavu ČSAV, zrušeného po roce 1989. Přes určitou nepřízeň okolí si katedra pomalu a jistě vybuďovala na univerzitě své postavení. Patří dnes k jednomu z největších, personálně nejmladších, ale usilovně se rozvíjejících pracovišť. Katedra má všeobecné biologické zaměření, které garantují tři oddělení – experimentální biologie, botaniky a zoologie. Vedle tradičních systematických a ekologických oborů, věnuje velkou pozornost také rozvoji obecně biologických oborů, zejména pak molekulární biologii a genetice.

Výuka genetiky a molekulární biologie je na odpovídající obsahové úrovni zařazena do všech studijních oborů garantovaných katedrou, tj. Systematické biologie, Aplikované ekologie i Experimentální biologie i do dvouoborových studií v kombinaci s biologii a to jak ve stupni bakalářském, tak magisterském. Vedle kmenových pracovníků katedry – Doc. RNDr. Kateřiny Malachové, CSc., RNDr. Petra Pečinky, CSc., Mgr. Hany Sezimové, Ph.D. a Mgr. Zuzany Pavlíčkové se na výuce genetických disciplín podílejí také externí pracovníci. V rámci předmětu Aplikovaná genetika to jsou – prim. MUDr. E. Šilhánová, CSc. (Oddělení lékařské genetiky FNŠP Ostrava), RNDr. K. Janko, Ph.D. (Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR Liběchov), RNDr. P. Smýkal, Ph.D., (Agritec, s.r.o., Šumperk), Mgr. T. Adamus, Ph.D., Mgr. I. Mikulenkova a Mgr. M. Eliáš, Ph.D. (Katedra fyziologie rostlin UK Praha) a v předmětu Vývojová genetika – prof. RNDr. B. Vyskot, DrSc. (Biofyzikální ústav AV ČR, Brno).

Výzkumné aktivity pracoviště jsou dlouhodobě zaměřeny na studium genotoxicity látek kontaminujících životní prostředí. Tento výzkumný směr systematicky navazuje na ostatní aktivity katedry zaměřené zejména na studium změn v biodiverzitě organismů v průmyslem poškozené krajině. V posledním období jsou cíleně rozvíjeny vybrané molekulárně genetické metody umožňující hodnocení některých typů změn v molekule DNA souvisejících s působením mutagenů a látek s antioxidantními účinky a metody molekulární fylogeneze. V rámci uvedených výzkumných směrů jsou také zadávány bakalářské a diplomové práce studentů.

Ve dvouletých intervalech pořádá Katedra biologie a ekologie vědeckou konferenci Změny životního prostředí a jejich bioindikace zahrnující kromě jiného sekci Toxikologie a genotoxicity. Několik následujících příspěvků částečně demonstuje výsledky dosažené ve výše uvedených výzkumných oblastech.



**Doc. RNDr. Kateřina Malachová, CSc.**, je vedoucí Katedry biologie a ekologie Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity v Ostravě.

# Evoluce asexuality – nový pohled na „stárnutí klonů“

Pavel Drozd<sup>1</sup>, Karel Janko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity v Ostravě

<sup>2</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR Liběchov; e-mail: pavel.drozd@osu.cz

## Otázka existence pohlavního rozmnožování

Jedním ze zásadních problémů, které řeší evoluční biologie na přelomu tisíciletí je objasnění evoluce pohlavního rozmnožování. Připustíme-li přirozený výběr jako jeden z několika hlavních mechanismů evoluce, pak je nutné vysvětlit, proč organismy „preferují“ sexuální rozmnožování, resp. jaké výhody přináší sexualita oproti asexualitě. Významnými mezníky v této problematice se staly dvě hypotézy objasňující „výhody sexu a nevýhody klonů“: hypotéza Červené královny (van Valen 1973) a hypotéza Müllerovy rohatky. Dvě výše zmíněné hypotézy jsou nejčastěji citovány jako vysvětlení pro dominantní postavení sexuálního rozmnožování v přírodě, ačkoliv celkem se dá napočítat přes dvacet alternativních hypotéz.

První hypotéza vychází ze zjištění, že pravděpodobnost vyhynutí druhu se s časem nemění, tzn. dlouhodobá selekce nijak nezvýhodňuje „staré druhy“, protože působení selekce je vzájemné. Tato interakce by potom vysvětlila evoluci pohlavního rozmnožování jako „snahu“ o neustálou změnu genomu (a genofondu), která jako jediná zajistí obranu proti neustále se vyvíjejícím parazitům a konkurentům.

Hypotéza Müllerovy rohatky elegantně doplňuje předchozí, protože vysvětluje dlouhodobou nevýhodu asexuálního rozmnožování. Zatímco u pohlavního rozmnožování se díky rekombinaci a segregaci do potomka dostává pouze 50 % genetického materiálu rodiče, při předávání kompletního genetického materiálu u klonálních linií musí docházet ke kumulaci škodlivých mutací (pravděpodobnost přenosu škodlivé mutace je tedy dvojnásobná). A právě toto stárnutí klonálních linií (snižování jejich zdatnosti, tzv. "clonal decay") je obecně považovaný za příčinu zeštíhlení a poměrně rychlého zániku vývojových větví nepohlavně se rozmnožujících druhů. Ačkoliv proti této hypotéze hovoří několik populárních příkladů „starých asexuálů“ i modely prokazující krátkodobé výhody ("two-folded cost of reproduction" neboli model „jeskyně panen“, rychlost mitózy oproti meióze), je efekt Müllerovy rohatky zcela zásadním argumentem při objasňování mnoha biogeografických a ekologických fenoménů. Jako příklad můžeme uvést například dlouhodobé přežívání asexuálních linií díky izolaci od jejich sexuálních předků a mladších klonálních linií, které zjistili u pakobylek Law & Crespi (2002) nebo u měkkýšů Neiman & Lively (2004).

Jak se tedy obě hlavní hypotézy testují? Červená Královna předpokládá obecně vyšší prevalenci parazitů u klonálních organismů, než u příbuzných sexuálních linií díky tomu, že kmeny parazitů se snadněji adaptují na geneticky identické jedince. Tato hypotéza založená na negativní "frequency-dependent" selekci navíc předpokládá tím vyšší míru napadení, čím frekventovanější je daný klon. Takže srovnání parazitace mezi příbuznými sexuálními a asexuálními organismy a mezi jednotlivými klony slouží jako robustní test této hypotézy. Müllerova rohatka zase předpokládá méně účinnou purifikující selekci u asexuálů, a tudíž vyšší míru akumulace nesynonymních mutací u klonálních linií.

Zde je třeba říci, že důkazy nejsou jednoznačné. Ačkoliv existují práce, kde se vyšší parazitace klonů a rychlejší akumulace nesynonymních mutací jasně prokázala (např. Dybdahl and Lively 1998, Paland and Lynch 2006), je i dost prací, které tyto trendy neprokázaly (např. Cutter and Payseur 2003, Mee and Rowe 2006). Co však platí téměř univerzálně je, že asexuální organismy tvoří ve fylogenetickém stromu mnohobuněčnými spíše jen terminální lístky. Navíc se ukazuje, že pokud existují v rámci klonálních druhů,

kteře ještě mají blízké sexuální příbuzné, nějaké staré klonální linie, pak žijí pouze tam, kde chybí sexuální kompetitor (např. Neiman et al. 2005). Tato pozorování pak tvoří téměř páteř argumentace, že asexuální rozmnořování nemá z dlouhodobého hlediska perspektivu a obecně slouží jako podpora Müllerovy rohatky.

Jakkoliv však zní Müllerova rohatka jednoduše a logicky, musíme si položit několik otázek, které s ní souvisí. Jak dlouho musí docházet ke kumulaci mutací, než se nižší fitness projeví? V případě, že by byl její účinek zřetelný až po mnoha generacích, jaká je potom krátkodobá nevýhoda, kvůli které působí negativní selekce? Jak lze vůbec tento efekt měřit? Existuje alternativní vysvětlení pro výše zmíněná pozorování distribuce klonů a jejich mladých věků?

### **Neutrální modely vs. selekce**

Náš aktuální výzkum je zaměřen zejména na hledání alternativního modelu, který by jednoduše vysvětlil takové fenomény jako je například distribuce věku klonů a které jsou dosud považované za důkaz Müllerovy rohatky (Janko et al. 2008). Jako možnou alternativu bez vlivu selekce (neutrální model) jsme zvolili model tzv. klonální obměny ("clonal turnover"), který byl dosud uznáván jako možné vysvětlení udržení asexuálních druhů, tedy jako faktor působící proti efektu Müllerovy rohatky (Butlin et al. 1999, Paland et al. 2005). Základní hypotézou tedy je, že výsledkem tohoto neutrálního modelu je distribuce věku klonů shodná s distribucí přepokládanou pro linie ovlivněné efektem rohatky. Tato distribuce by tedy mohla vznikat nejen pod tlakem selekce, ale také vlivem driftu.

Pro simulaci obou efektů byl vytvořen „individual-based model“ přežívání klonálních linií v prostoru a v čase. Pomocí programu R ("R core development team 2008") byla generována matice  $N$  jedinců  $\times$   $D$  dém  $\times$   $T$  generací. Klonální linie přitom mohly vznikat pouze v první démě (na styku s rodičovským druhem) a to s průměrným počtem  $c$  nových linií na generaci a dále se šířily do dalších dém migrační rychlostí  $m$  (pravděpodobnost, že jedinec migruje). U každého jedince byla nastavena možnost vzniku mutací s průměrným počtem  $U$  mutací na jedince/generaci. Počty nových klonů i počty mutací byly generovány jako pseudonáhodná čísla s Poissonovou distribucí (při daném průměru  $c$  pro nové klonální linie a  $U$  pro počty mutací na jedince za generaci). Pro model byla použita tzv. měkká selekce, tzn. jedinci, kteří nedosáhli určitého fitness vymírali, aniž by produkovali potomky další generace. Selekcce byla definována tzv. selekčním koeficientem  $s$ . Pravděpodobnost negativní selekce pak byla nastavena pro každého jedince jako  $(1-s)^k$ , kde  $k$  je počet mutací u daného jedince. Počet potomků každého jedince byl náhodný a byl generován tak, že každý potomek byl zpětně přiřazen (náhodně) k určitému klonu z dané démy. Vývoj byl sledován vždy minimálně po dobu 15 000 generací.

Tento model nepředpokládal kompetici mezi sexuálním druhem a jeho asexuálními deriváty, poněvadž tato nebyla cílem naší studie a dodnes vlastně ani neexistuje konsensus o tom, které ekologické, genetické a etologické parametry hrají významnou roli v kompetici sex-klon.

### **Máme důkazy Müllerovy rohatky?**

Popsaný model je vlastně ekvivalentem populačně genetických modelů přežívání alel v populacích (Kimura and Crow 1964). My jsme v tomto případě pouze uvažovali analogii mezi mutací, která vytváří novou alelu a vznikem nového klonu. Tak, jako se každá mutace může a nemusí předat do další generace v jedné či více kopiích, či se eventuelně z populace ztratit, tak se daný klonální jedinec může či nemusí rozmnožit a eventuálně může dojít ke zmizení celého klonu. Důležitou premisou Müllerovy rohatky je, že čím starší daný klon je, tím pravděpodobněji bude nahrazen nově vzniklým klonem nezátíženým škodlivými



mutacemi, zatímco v neutrálním modelu je pravděpodobnost rozmnožení klonálního jedince nezávislá na věku jeho klonu.

Náš model ukázal, že simulace s jak neutrálními tak selekčními podmínkami má za výsledek to, že se ustaví rovnováha mezi vznikem a zánikem klonů a že tudíž existuje maximální věk, kterého se klony mohou dožít. Toto není nic překvapivého a vyplývá to z teorie genetického driftu. To, jakého věku se mohou klony dožít přitom závisí jednak na rychlosti vzniku nových klonů, jednak na struktuře populace a také na tom, jak inkorporované škodlivé mutace poškozují svého nositele (či spíše nositelku, protože klonální organismy jsou především samičího pohlaví). Je také možno dokázat, že existují podobné výstupy pro klonální diverzitu, tzn. z kolika klonů se bude daná asexuální populace skládat. Platí tedy:

- Čím více nových klonů vzniká, tím mladší klony budou.
- Zároveň bude více klonů s větší strukturovaností populace.
- Současně méně klonů se bude nacházet v populacích vzdálených od sexuálního předka (ty však budou mnohem starší).
- Čím efektivněji budou mutace znevýhodňovat existující klony, tím více se budou v populacích nacházet mladší klony a bude se zvyšovat klonální diverzita.

Oba naše modely – neutrální a selekční – by se tedy měly výrazně kvantitativně lišit v tom, jakého stáří se klony mohou dožít a jaká bude klonální bohatost asexuálních populací. A právě tyto predikované charakteristiky by bylo možné testovat na skutečných příkladech.

Bohužel, v přírodě zpravidla nikdy nevíme, jak často vznikají nové klony, jaká je konektivita populací a jaký je efekt škodlivých mutací. Jinými slovy, z pozorovaných dat není možné rozlišit mezi oběma modely na základě předpokládaných kvantitativních rozdílů. Problémem je, že oba modely (neutrální a selekční) kvalitativně poskytují shodné predikce: čím dále od sexuálního druhu vzorkujeme, tím starší klony budeme nacházet a tím jich bude méně. Paradoxně právě tento jev je pozorován v reálných populacích a byl dosud vykládán jako jasná podpora pro mechanismy zmíněného „clonal decay“, tedy evolučního zastarávání klonů. Naše práce ukazuje, že stejná pozorování se dají vysvětlit mnohem jednodušeji pomocí obyčejného genetického driftu!

Přichází otázka, co dál? Zatím je těžké si představit jak bychom mohli přesně odhadnout míru s jakou vznikají nové klony tak, aby bylo možno spočítat, zda pozorované hodnoty se dají vysvětlit neutrálním, či selekčním modelem. Možné však je zjistit z tvaru příbuzenských stromů spojujících klonální jedince, zda odpovídají neutralitě, či zda se u nich projevil nějaký selekční, či demografický tlak (Gordo et al. 2002). A jestliže už máme jasné predikce, jak selekce ovlivňuje možné dosažitelné stáří klonů, dalším krokem našeho výzkumu musí nutně být právě porovnání obou predikcí.

## Literatura

- Butlin, R.K., Schön, I. & Martens, K. (1999). Origin, age and diversity of clones—Commentary. *J. Evol. Biol.* 12: 1020–1022.
- Cutter, A.D., Payseur, B.A. (2003). Rates of deleterious mutation and the evolution of sex in *Caenorhabditis*. *J. Evol. Biol.* 16: 812–822.
- Dybdahl, M.F. & Lively, C.M. (1998). Host-parasite coevolution: Evidence for rare advantage and time-lagged selection in a natural population. *Evolution* 52: 1057–1066.
- Gordo, I., Navarro, A. & Charlesworth, B. (2002). Muller's ratchet and the pattern of variation at a neutral locus. *Genetics* 161: 835–847.
- Janko, K., Drozd, P., Flegr, J. & Pannell, J.R. (2008). Clonal turnover versus clonal decay: a null model for observed patterns of asexual longevity, diversity and distribution. *Evolution* 62: 1264–1270.

- Kimura, M. & Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Law, J.H. & Crespi, B.J. (2002). Recent and ancient asexuality in *Timema* walkingsticks. *Evolution* 56: 1711–1717.
- Mee, M.A. & Rowe, L. (2006). A comparison of parasite load in sexual and asexual *Phoxinus* (Pisces: Cyprinidae). *Can. J. Zool.* 84: 808-816.
- Müller, H.J. (1932). Some Genetic Aspects of Sex. *American Naturalist* 66 (703): 118–138.
- Neiman, A, Jokela, J & Lively, C.M. (2005). Variation in asexual lineage age in *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Evolution* 59: 1945-1952.
- Neiman, M. & Lively, C.M. (2004). Pleistocene glaciation is implicated in the phylogeographical structure of *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand snail. *Molecular Ecology* 13: 3085–3098.
- Paland, S., Colbourne, J. K. & Lynch, M. (2005). Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Evolution* 59: 800–813.
- Paland, S. & Lynch, M. (2006). Transitions to asexuality result in excess amino-acid substitutions. *Science* 311: 990-992.
- van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1: 1-30.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

## **Molekulární taxonomie korýšů na oddělení zoologie**

**Ivona Horká, Zdeněk Ďuriš**

Katedra biologie a ekologie (KBE), Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, 710 00 Ostrava, e-mail: ivona.horka@osu.cz

Katedra biologie a ekologie (KBE) PŘF Ostravské univerzity v Ostravě je pracovištěm, které již dlouhodobě rozvíjí mj. i takové zoologické obory, jako astakologii (nauka o račích) a karcinologii (věda, zabývající se vyššími korýši řádu *Decapoda*). Astakologické studie jsou zaměřeny na problematiku rozšíření, ekologie a ochrany raků (*Astacidae*) v ČR a Střední Evropě (Kozák a kol., 2002, 2003; Bláha a kol., 2006; Horká, 2006; Ďuriš a kol., 2006, 2007; Ďuriš, Horká, 2007). Z tohoto pracoviště vzešel podnět mj. i ke spolupráci ve využití molekulárních metod pro diagnostiku račího moru a genetiku populací invazních raků v ČR, jež jsou nyní rozvíjeny na PŘF UK v Praze (Kozubíková a kol., 2006, 2007, 2008, 2009). Vybrané metody budou postupně zaváděny i na pracovišti KBE v Ostravě. Karcinologické výzkumy na KBE vycházejí z dřívějších standardních studií zaměřených na ekologii arktických korýšů řádu *Decapoda* (např.: Ďuriš, 1992a, 1993; Ďuriš, Weslawski, 1996), a aktuálních systematických prací, jejichž objektem jsou zejména tropické symbiotické krevety podčeledi *Pontiinae* (čel. *Palaemonidae*) (např.: Ďuriš, 1990a,b; 1992b; Ďuriš, Bruce, 1995; Ďuriš, Horká, 2008; Ďuriš, Horká, Hoc, 2009; Ďuriš, Horká, Marin, 2008; Chadwick et al., 2008; Ďuriš, Horká, Sandford, 2009)

Výsledky kvalitních systematických prací jsou základem pro navazující studie ekologie, fylogeneze, fylogeografie, etologie vybraných skupin organismů. Srovnávací morfologie, bezesporu nesporně záslužná pro zformování a propracování výchozích klasifikací organismů, zde poskytuje pouze omezené možnosti, protože nedisponuje dostatečně exaktními nástroji pro odhalení kryptické diverzity, paralelismů a konvergenčí ve sledovaných skupinách organismů. Takový nástroj v současné době nabízejí molekulární metody. S jejich rozvojem a prohlubujícím se automatizací a dostupností se

v posledních letech stává téměř nezbytností uvádět nové i stávající taxony organismů s konkrétní nukleotidovou sekvencí příslušného genu, obvykle odkazem na její položku v internetové databázi GenBank.

Modelovou skupinou organismů zvláště vhodných pro dílčí evoluční studie jsou námi studované krevety. Podčeleď mořských krevet *Pontoniinae* patří k systematicky a ekologicky nejrozmanitějším taxonům řádu *Decapoda*. Vedle minoritního zastoupení volně žijících forem, většina druhů této podčeledi žije v symbiotickém vztahu s různými mořskými bezobratlými, především s mořskými houbami, sasankami, korály nebo ostnokožci. U takto asociovaných krevet se často vyskytují specifické adaptace, které se projevují v jemných detailech morfologie, specifického zbarvení, či neobvyklých prvků chování, jež nezřídka úzce souvisí se specifickým typem vzájemné vazby mezi klientem a hostitelem. Právě neobvykle široká škála těchto vazeb (typ hostitele, hostitelská specifita, typ symbiózy, demografie klientů, aj.) poskytuje nepřeberné možnosti evolučních studií.

Ve spolupráci s katedrou ekologie PřF UK v Praze jsme se v minulém roce zaměřili na fylogenetickou revizi dvou hlavních skupin krevet podčeledi *Pontoniinae* (rod *Periclimenes*, sk. „*aesopus*“ a „*brevicarpalis*“) asociovaných s mořskými sasankami, a to na základě morfologických, ale i molekulárních studií. Analyzovat budeme mitochondriální geny pro ribozomální podjednotky (12S, 16S rRNA) a/nebo kódující gen pro podjednotku I cytochrom c oxidázy (COI) u krevet ze tří geografických oblastí: Indo-Pacifiku (Rudé a Jihočínské moře), východního Atlantiku (Středomoří) a západního Atlantiku (Karibské moře). Aktuálně řešíme problém selekce optimální molekulární metody vhodné pro vybranou skupinu korýšů.

Tvarově a barevně velmi atraktivní indo-tichomořské krevety skupiny „*aesopus*, čističi ryb korálových útesů, představují zvláště zajímavou modelovou skupinu. Jednotlivé druhy se vyznačují velmi odlišným rozsahem a umístěním svého areálu, šířkou spektra hostitelských sasanek, čisticí aktivitou, hloubkou výskytu, početností skupin, asociací s jinými krevetami a rybami klauny. V rámci této skupiny, která se evidentně vyvinula z forem volně-žijících přes nespecifické symbionty žahavců, a dále vyhraněné sasankové komenzály a mutualisty, až po čističe ryb existují formy, které sasanku zřejmě druhotně opustily a žijí benticky, nebo změnilly typ hostitele.

Podobné, byť méně početné skupiny sasankových krevet vykazující podobný tvar těla, zbarvení i některé prvky chování známe rovněž ze Středomoří a tropického západního Atlantiku. Jsou to příbuzné nebo zcela odlišné evoluční linie? Jak se v průběhu evoluce formovaly tyto biogeograficky izolované skupiny sasankových krevet? Nezávisle, prostřednictvím příbuzných linií bentických krevet, jako nespecifičtí symbionti, či již jako sasankové krevety formou „host-switchingu“, tj. adaptací na lokální hostitele?

Metody molekulární taxonomie v současné době zaváděné a rozvíjené na KBE, detailní klasifikace a analýzy charakteristik sledovaných modelových skupin organismů přispějí k poodhalení některých dílčích cest, kterými se evoluce ubírala při formování obdivuhodné biologické diverzity naší planety. Zároveň nabídnou i hodnotné údaje a argumenty pro studium fungování systémů, jejich využití a ochrany.

## Literatura

- Bláha L., Hilscherová K., Mazurová E., Hecker M., Jones P. D., Newsted J. L., Bradley P. W., Gracia T., Ďuriš Z., Horká I., Holoubek I., Giesy J. P. (2006). Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects. *Environment International* 32: 749–757.
- Ďuriš Z. (1990a). Two new species of the commensal shrimp genus *Periclimenaeus* Borradaile, 1915 (Decapoda, Palaemonidae) from the Maldivian Islands. - *Journal of Natural History* 24: 615-625.

- Ďuriš Z. (1990b). Two new species of the palaemonid shrimp genus *Periclimenes* from the Maldive waters (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). - *Acta Soc. zool. bohemoslov.* 54: 1-8, pls. 1-4.
- Ďuriš Z. (1992a). On a small collection of Crustacea Decapoda from the Bellsund Region, Spitsbergen. - In: J. Repelewska-Pekalowa, K. Pekala (Eds.), *Wyprawy Geograficzne na Spitsbergen. UMCS, Lublin*: 121-149.
- Ďuriš Z. (1992b). Revision of *Vercoia* Baker (Crustacea: Decapoda: Crangonidae). - *Invertebrate Taxonomy* 6: 1437-1457.
- Ďuriš Z. (1993). On a collection of Crustacea Decapoda from the southeastern Svalbard. - In: J. Repelewska-Pekalowa, K. Pekala (Eds.), *Man Impact on Polar Environment, XX Polar Symposium, Lublin, Poland. UMCS, Lublin*: 141-157.
- Ďuriš Z., Bruce A. J. (1995). A revision of the 'petitthouarsii'-group of species of the genus *Periclimenes* Costa (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). - *Journal of Natural History* 29: 619-671.
- Ďuriš Z., Drozd P., Horká I., Kozák P., Policar, T. (2006). Biometry and demography of the invasive crayfish *Orconectes limosus* in the Czech Republic. - *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 1215-1228.
- Ďuriš Z., Horká I. (2007). První nález invazního raka pruhovaného *Orconectes limosus* na území Moravy a Slezska. *Časopis Slezského Muzea, Opava* (A) 56: 49-52.
- Ďuriš Z., Horká I. (2008). A new shrimp species of the genus *Leptomenaeus* Bruce, 2007 from Vietnam (Crustacea: Decapoda: Pontoniinae). *Zootaxa* 1872: 45-58.
- Ďuriš Z., Horká I., Dao tan Hoc (2009). *Periclimenaeus nufu*, a new species of shrimp (Crustacea: Decapoda: Pontoniinae) from Vietnam. *Raffles Bulletin of Zoology* 57: 453-464.
- Ďuriš Z., Horká I., Kristian J., Kozák P. (2006). Some cases of macro-epibiosis on the invasive crayfish *Orconectes limosus* in the Czech Republic. - *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 380-381: 1325-1337.
- Ďuriš Z., Horká I., Marin I. (2008). *Periclimenes sulcatus* sp. nov., a new pontoniine shrimp (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from Vietnam. *Zootaxa* 1860: 35-50.
- Ďuriš Z., Horká I., Petrusek A. (2007). Invasive zebra mussel colonisation of invasive crayfish: a case study. *Hydrobiologia* 590: 43-46 (on line electronic version with supplementary material: doi: 10.1007/s10750-007-755-x).
- Ďuriš Z., Horká I., Sandford F. (2009). *Periclimenaeus pectinidactylus* n. sp. (Crustacea: Decapoda: Pontoniinae) from the Belizean Barrier Reef, Caribbean Sea. *Zootaxa* 2130: 31-40.
- Ďuriš, Z., Weslawski J.M.(1996). Range extensions of some decapod crustaceans of the northeastern Greenland. - *Acta facultatis scientiarum naturalis Universitatis Ostraviensis (biol.-ecol.)* 3 (148): 81-91.
- Horká I. (2006). *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 - rak bahenní. In: Mlíkovský, J., Stýblo, P. (eds): *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky. Praha: ČSOP*: 229-231.
- Chadwick N.E., Ďuriš Z., Horká I. (2008). Biodiversity and behavior of shrimps and fishes symbiotic with sea anemones in the Gulf of Aqaba, northern Red Sea. In: Por D.V., Ben-Eliahu N. (eds), *Aqaba-Eilat, the Improbable Gulf. Environment, Biodiversity and Preservation*. Magnes Press, Jerusalem: 209-223 a 238-239.
- Kozák P., Ďuriš Z., Policar T. (2002). The stone crayfish *Austropotamobium torrentium* (Schrank) in the Czech Republic. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 367: 1-7.
- Kozák P., Policar T., Ďuriš Z. (2003). Migratory ability of *Orconectes limosus* through a fishpass and notes on its occurrence in the Czech Republic. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 372-373: 367-373.

- Kozubíková E., Petrusek A., Ďuriš Z., Kozák P., Geiger S., Hoffmann N R., Oidtmann N B. (2006). The crayfish plague in the Czech Republic – review of recent suspect cases and a pilot detection study. - *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381: 1313-1323.
- Kozubíková E., Filipová L., Kozák P., Ďuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B., Petrusek, A. (2009). Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology* 23: 1204–1213.
- Kozubíková E., Petrusek, A., Ďuriš Z., Martín M.P., Diéguez-Uribeondo J., Oidtmann B. (2008). The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture* 274: 208-217.
- Kozubíková E., Petrusek, A , Ďuriš Z., Oidtmann B. (2007). *Aphanomyces astaci*, the crayfish plague pathogen, may be a common cause of crayfish mass mortalities in the Czech Republic. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 27: 79-82.

## **Laboratoř molekulární biologie na KBE a její současné výzkumné zaměření**

**Petr Pečinka, Jiří Červeně**

Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, 710 00 Ostrava, e-mail:petr.pecinka@osu.cz

Laboratoř pro molekulární biologii se na Katedře biologie a ekologie podařilo zásadně inovovat v roce 2006 díky projektu FRVŠ. Vybavení novými přístroji mělo význam nejen pro rozvoj výuky molekulární biologie, ale umožnilo také studentům ve větší míře si vybrat bakalářské a diplomové práce s molekulárně-biologickou tematikou. V současné době v laboratoři pracuje více než deset studentů, kteří se ve svých pracích zabývají detekcí poškození DNA vyvolané látkami dostávajícími se do životního prostředí antropogenní činností, vazbou nádorového supresoru p53 a jeho homologu p63 na superhelikální DNA a detekcí lokálních otevřených struktur. Svou činností studenti důležitými výsledky přispívají k výzkumu, který je součástí výzkumného směru katedry.

Pro naprostou většinu experimentů využíváme plasmidovou DNA. Použití plasmidu poskytuje mnoho výhod: jednoduchou izolaci ve velkém množství, relativně malé množství restričních míst i dalších sekvencí pro specifické interakce a zároveň poměrně jednoduchou přípravu plasmidů obsahujících sekvence určené ke zkoumání. Studium vazby proteinu p53 i jeho strukturních homologů je založeno především na retardaci DNA s navázanou molekulou proteinu při elektroforéze v agarozovém gelu. V těchto experimentech je zkoumána pevnost interakce proteinu při vazbě na jeho konsensní sekvenci, stejně tak vazby sekvencně nespecifické na nadšroubovicové struktury přítomné v plasmidové DNA. Konsensní sekvence proteinu p53 je zajímavá tím, že je často tvořena palindromatickou sekvencí schopnou přecházet do křížové struktury. Jedním z nejdůležitějších výsledků výzkumu bylo zjištění, že vazba p53 na konsensní sekvenci je výrazným způsobem ovlivňována topologickým stavem molekuly DNA. Výsledky kompetičních experimentů potvrdily, že vazba p53 na konsensní sekvenci vytvářející křížovou strukturu je podstatně pevnější než vazba na tutéž sekvenci nacházející se v pravotočivé B-DNA. Protože je známo, že struktura křížové formy je ovlivněna přítomností některých dvoumocných iontů, je současný výzkum zaměřen na vliv hořčnatých iontů na interakci p53 na konsensní sekvence v křížové formě.

Rozpracována je také studie, která se zabývá sekvenčně nespecifickou vazbou proteinu p53 na trojřetězcové struktury – triplexy, v počátcích jsou studie vazby na tetraplexovou DNA tvořenou kontrolní sekvencí v promotoru *c-myc* genu. V poslední době narůstá úsilí vědců pochopit úlohu nadšroubovicových struktur v regulaci buněčného cyklu i v regulaci transkripce. V lidském genomu byla pomocí imunoprecipitace chromatinu nalezena místa, na něž se p53 váže se zvýšenou afinitou i přesto, že neobsahují konsensní sekvence pro jeho vazbu. Tato místa vložená do plasmidů zkoumáme v naší laboratoři s ohledem na možný výskyt lokálních otevřených struktur, jejichž přítomností by mohla být zvýšená vazebná aktivita proteinu p53 vysvětlena.

Výzkum tak rozličných vazebných interakcí proteinu p53 bychom nemohli provádět pouze vlastními silami. Podílíme se na něm díky spolupráci s Biofyzikálním ústavem AV ČR v Brně, kde jsou interakce p53 s DNA předmětem dlouhodobého zájmu a kde úspěšně v této oblasti pracuje skupina pod vedením doc. Fojty. Výzkum je podporován Grantovou agenturou AV ČR.

V souladu s dlouhodobým výzkumným zaměřením katedry na hodnocení mutagenity látek zavádíme a rozvíjíme také molekulárně genetické metody hodnocení genotoxicity látek. Základní technikou, kterou pro testování genotoxických účinků látek z prostředí využíváme, je gelová elektroforéza. Princip detekce je založen na rozdílné elektroforetické mobilitě různých topologických forem plasmidové DNA. Nejčastější formou poškození DNA jsou zlomy, vzniklé na jednom nebo na obou řetězcích. Takovéto zlomy se u plasmidové DNA projeví přechodem z kompaktní superhelikální do relaxované formy s nižší elektroforetickou mobilitou. Další častou formou poškození, kterou je kovalentní modifikace bází, je možné na řetězcové zlomy převést pomocí vhodných enzymů, které buňky využívají ve svém reparačním aparátu, případně pomocí vhodných chemikálií, například horkého piperidinu. Obě metody jsou hojně využívány jak v bakalářských tak diplomových pracích a první výsledky byly publikovány na několika konferencích. Využití této metody nachází uplatnění i při testování látek, které mají na DNA ochranný vliv, například antioxidantů. V oxidativním metabolismu často dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují mimo jiné řetězcové zlomy. Přítomnost ochranných látek v reakční směsi umožňuje usoudit na jejich antioxidantivní účinek z míry nepoškozené DNA oproti kontrole. Takovéto testování je vhodné pro posouzení účinku například nových potravinových doplňků přicházejících na trh.

V počátcích jsou práce využívající polymerázové řetězcové reakce pro detekci vnitřetězcových, případně meziřetězcových spojů způsobených látkami s více funkčními skupinami. Vzhledem k vysoké citlivosti PCR bychom tuto techniku rádi využili v blízké budoucnosti i pro detekci bodových mutací nastávajících v důsledku působení mutagenních látek. Významným milníkem v rozvoji laboratoře a v rozšíření metodické základny se v roce 2008 stalo zakoupení polarografu. Plánujeme jej využít pro zvýšení citlivosti detekce poškození DNA, neboť některé práce uvádějí, že touto metodou je za určitých podmínek možno rozpoznat jednu poškozenou bázi mezi 100 000 nepoškozenými (1,2). Pomocí elektrochemických technik je mimo jiné možné snadno detekovat jednořetězcové úseky, správnost hybridizace nebo vazbu DNA s proteiny. Přestože první poznatky o elektrochemickém chování nukleových kyselin byly publikovány již před půl stoletím, snahy využít elektrochemických vlastností nukleových kyselin pro diagnostické účely jsou poměrně nedávného data. Důvodem je, že až v polovině 90. let 20. století byly elektrochemické metody analýzy DNA na takové úrovni, že se mohlo pomýšlet na jejich praktické využití. Od této doby probíhá v oblasti elektrochemie nukleových kyselin velmi bouřlivý výzkum, který je umocňován zájmem a podporou ze strany soukromého sektoru. I v této oblasti využívá naše pracoviště vazeb na BFÚ, kde dlouhodobě probíhá úspěšný výzkum pod vedením prof. Palečka a doc. Fojty. Naší snahou je rozšířit využití polarografu pro detekci mutagenních



látek znečišťujících životní prostředí. Základy elektrochemické analýzy nukleových kyselin jsou postupně zahrnovány také do výuky, zejména oboru experimentální biologie.

## Literatura

1. Fojta M., Paleček E. (1997). *Anal. Chim. Acta* 342: 1-12.
2. Havran L., Vacek J., Cahová K., Fojta M. (2008). *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 1751-1758.

## Využití klasických a molekulárně genetických metod při studiu taxonomie epifytických mechorostů

Vítězslav Plášek<sup>1</sup>, Jakub Sawicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, e-mail: [vitezslav.plasek@osu.cz](mailto:vitezslav.plasek@osu.cz)

<sup>2</sup> Department of Botany and Nature Protection, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Plac Łódzki 1, 10-727 Olsztyn, Poland, e-mail: [jakub.sawicki@uwm.edu.pl](mailto:jakub.sawicki@uwm.edu.pl)

Od roku 2000 autoři společně řeší problematiku taxonomie a ekologie zástupců čeledi *Orthotrichaceae* kombinací klasických i molekulárně genetických metod. Jedná se o studium tří rodů: *Orthotrichum*, *Ulota* a *Zygodon*, které patří k celosvětově rozšířeným taxonům epifytických mechorostů. K realizaci výzkumu jsou využívány následující markery: ITS, *LEAFY/FLO*, chloroplastový *matK*, *trnH-psbA*, *ycf5* a mitochondriální spacer *nad4-nad5*. Projekt kombinuje metody výzkumu kladistické systematiky s rekonstrukcí fylogenetických vztahů uvnitř čeledi *Orthotrichaceae* na základě sekvencí tří genomů. K vyhodnocení dat využíváme tyto následující metody: Maximum Parsimony, Minimum Evolution, Maximum Likelihood, Bayesian Inference s použitím programu Mega4, Modeltest 3.4, RAxML 7.0.3, MrBayes 3.1 a další.

Mezi první dílčí výsledky lze zařadit:

- (i) Znovu-potvrzení výskytu druhů *Orthotrichum scanicum* & *O. alpestre* v České republice. Tyto druhy byly u nás dlouhodobě považovány za vymizelé (Plášek & Mudrová 2006; Plášek 2007).
- (ii) Nalezení nového zástupce naší bryoflóry, kterým je *Orthotrichum pulchellum*; taxon do té doby znám zejména ze západní Evropy (Plášek & Marková 2007, 2008).
- (iii) Specifikace ekologických nároků jednotlivých druhů studované čeledi (Plášek et al. 2007).
- (iv) Systematické uspořádání rodu *Orthotrichum* s pomocí studia sekvencí jaderné (ITS a dvou intronů ve *LEAFY/FLO* genu), chloroplastové (*trnH-psbA* spacer a *matK*) a mitochondriální DNA (*nad5-nad4* spacer) (Sawicki et al. 2009a,b).
- (v) Objevení kryptické speciace uvnitř rodu *Orthotrichum* (u *O. striatum* a *O. stramineum*) a nalezení molekulárních markerů, které snadněji umožní tento typ speciace odkrýt.
- (vi) Podpora nově vymezeného rodu *Nyholmiella* (dříve součást r. *Orthotrichum*) srovnáním rozdílů DNA (Sawicki et al. 2009).
- (vii) Popis nového druhu *Orthotrichum moravicum* Plášek & Sawicki sp. nova z území Moravskoslezských Beskyd (Plášek et al. 2009). Tento epifytický mech se zároveň jeví jako endemický druh toho horského masívu. Vzhledem k jeho nápadným morfologickým znakům (dlouhé boční přívěsky brv endostomu) by byl, v případě

jeho výrazně většího areálu, již jistě nalezen v jiných částech Evropy nebo zaznamenám autory při revizích evropských herbářových sbírek.

V současné době autoři připravují popis dalšího nového druhu a monografii rodu *Orthotrichum* v Evropě doplněnou určovacími klíči, který pro detailní popis determinačních znaků kombinuje textové i grafické přílohy (pérovky, mikrofotografie, SEM fotografie).

## Literatura

- Plášek V. (2007). Potvrzení výskytu mechu *Orthotrichum alpestre* Hornsch. Ex Bruch & Schimp. v České republice a na Slovensku a nově zjištěná historická lokalita tohoto druhu na Slovensku. *Bryonora* 40: 27-30.
- Plášek V., Drozd P. & Wierzcholska S. (2007). The chorology, ecology & population biology of the genus *Orthotrichum*, *Ulota* & *Zygodon* in the central Europe. Part I. Methods & first results. *Nowellia Bryologica* 33: 39-47.
- Plášek V. & Marková I. (2007). *Orthotrichum pulchellum* (Orthotrichaceae, Musci), new to the Czech Republic. *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* 92: 223–228.
- Plášek V., Marková I. (2008): *Orthotrichum pulchellum* Brunt.- In. New national a regional bryophyte records, 18.- *Journal of Bryology* 30:163-164.
- Plášek V. & Mudrová R. (2006) *Orthotrichum scanicum* Grönvall (Orthotrichaceae, Musci), rediscovered in the Czech Republic.- *Čas. Slez. Muz. Opava (A)* 55: 229-234.
- Plášek V., Sawicki J., Trávníčková V. & Pasečná M. (2009). *Orthotrichum moravicum* (Orthotrichaceae), a new moss species from the Czech Republic. *Bryologist* 112: 329–336.
- Sawicki J., Plášek V. & Szczecińska M. (2008). Testing candidate trnH-psbA noncoding plant barcode region in the *Orthotrichum* genus.- In Environmental changes and biological assessment IV. *Scripta Fac. Rerum Natur. Univ. Ostraviensis* 185: 170-177.
- Sawicki J., Plášek V. & Szczecińska M. (2009). Molecular evidence does not support the current division of *Orthotrichum* subgenus *Gymnopus*. *Plant Systematics and Evolution*, 278: 125-137.

## Využití plasmidové DNA pro detekci antioxidačního efektu látek rostlinného původu

**Zuzana Rybková, Kateřina Malachová**

Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, 30. dubna 22, Ostrava, e-mail: zuzana.rybkova@osu.cz

### Úvod

Některé látky vyskytující se v rostlinách se vyznačují antioxidačními a také antimutagenními, antibakteriálními, protinádorovými a protizánětlivými účinky. K příznivě působícím látkám rostlinného původu patří např. polyfenolické látky nacházející se zejména v ovoci a zelenině<sup>1</sup>. Ochranný efekt těchto látek je představován celou řadou vzájemně se doplňujících účinků přispívajících k vytvoření homeostázy. Narušení této rovnováhy, např. působením volných radikálů, může vést ke vzniku a rozvoji četných onemocnění a chorobných stavů, např. aterosklerózy, diabetu, zánětlivých stavů, neurologických onemocnění, očních chorob, onemocnění trávicího traktu a dalších. Polyfenolické antioxidanty se vyznačují schopností vázat nejen volné radikály, ale i přechodné kovy za vzniku pevných chelátů, a inhibovat enzymy katalyzující vznik volných radikálů<sup>2,3</sup>.



Cílem práce bylo zjistit, zda DMSO, který je používán jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků, inhibuje oxidační poškození v plasmidu DNA a detekovat antioxidační účinek vzorků rostlinných extraktů z kůry *Magnolia officinalis* a hroznového extraktu *VinOserae*. Bylo zjištěno, že mezi významné biologicky aktivní složky kůry magnolie patří látky magnolol a honokiol<sup>4,5</sup>. Extrakt *VinOserae* obsahuje řadu látek s antioxidačními vlastnostmi, včetně fenolických kyselin, *t*-resveratrolu, antokyanů a proantokyanidinů. Antioxidační efekt testovaných vzorků byl zjišťován molekulárně genetickou metodou založenou na sledování konformačních změn plasmidové DNA.

## **Materiál a metodika**

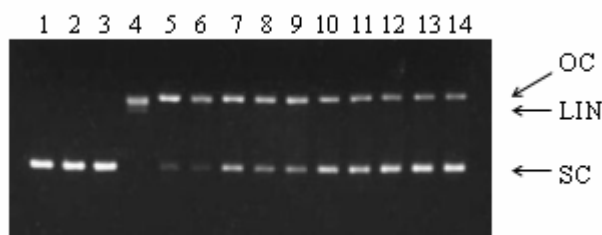
Pro detekci antioxidačního efektu extraktů z rostlin byly vybrány dva vzorky poskytnuté firmou FAVEA, spol. s r.o. (Kopřivnice, Česká republika) - extrakt z *Magnolia officinalis* (MO) a extrakt *VinOserae* (VO). Oba vzorky (v práškovém stavu) byly rozpuštěny v destilované vodě. Pro indukci oxidačního poškození plasmidové DNA bylo použito H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (nebo CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) (PENTA, Česká republika). V rámci studia schopností látek inhibovat oxidační poškození DNA byl také otestován dimethylsulfoxid (DMSO). Efekt působení dimethylsulfoxidu na plasmidovou DNA byl sledován z důvodu jeho používání jako rozpouštědla pro přípravu vzorků. Všechny chemikálie byly užity v čistotě p.a. Plasmid DNA pBluescript II SK (-) byl získán z BFÚ AV ČR, v.v.i. (Brno, Česká republika).

Studium interakcí testovaných látek s DNA spočívalo v detekci konformačních změn plasmidu pBluescript II SK (-) pomocí gelové elektroforézy. Metoda je založena na rozdílné elektroforetické mobilitě jednotlivých topologických forem DNA. Důsledkem oxidačního poškození DNA na úrovni cukr-fosfátového řetězce je vznik zlomů v superhelikální kruhové (SC) formě DNA. Vzniká buď otevřená kruhová (OC) forma v případě jednořetězcových zlomů, nebo forma lineární (LIN), jsou-li zlomy dvouřetězcové. Indukce oxidačního poškození DNA byla hodnocena jako konverze superhelikální kruhové formy DNA na formu otevřenou kruhovou, případně formu lineární. Protektivní účinek testovaných látek byl zjišťován na základě jejich schopností inhibovat oxidační poškození DNA indukované peroxidem vodíku za přítomnosti iontů přechodných kovů.

Analýza změn v konformaci DNA byla provedena agarózovou gelovou elektroforézou (1% agaróza, 1 x TAE pufr, 7 V/cm, 80 minut, pokojová teplota). Po skončení elektroforézy byly gely ponechány po dobu 30 minut v roztoku ethidium bromidu (1 µg/ml) a následně 30 minut odbarvovány v destilované vodě. Gely byly vyfotografovány pod UV světlem pomocí transiluminátoru GeneGenius (SynGene, Velká Británie).

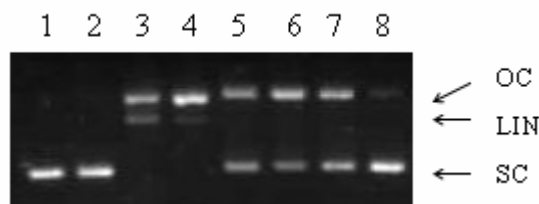
## **Výsledky**

Poškození DNA bylo vyvoláno působením peroxidu vodíku na plasmidovou DNA v přítomnosti iontů mědi (dráha č. 4, obr.1). Schopnost dimethylsulfoxidu ovlivňovat změnu topologického stavu plasmidové DNA byla zjišťována u 2,5 - 50% roztoku DMSO. Znatelná inhibice tvorby zlomů v plasmidové DNA byla pozorována již při použití 10% roztoku DMSO (dráha č. 7, obr.1). Velmi slabý protektivní efekt dimethylsulfoxidu byl zjištěn i u nižších koncentrací DMSO – 2,5% a 5% roztok (dráhy č. 5 a 6). Efekt dimethylsulfoxidu s účinkem částečné inhibice poškození plasmidové DNA hydroxylovými radikály byl prokázán i při působení peroxidu vodíku na plasmidovou DNA v přítomnosti iontů železa (obrázek gelu není prezentován). Při sledování antioxidačního účinku DMSO s využitím plasmidu pBluescript byla jako pozitivní kontrola provedena také detekce vlastního účinku dimethylsulfoxidu na strukturu plasmidové DNA. Bylo ověřeno, že DMSO neindukuje žádné signifikantní změny topologického stavu plasmidové DNA.

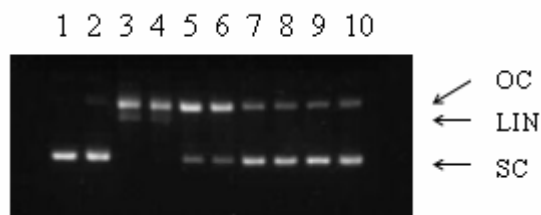


Obr. 1. Efekt DMSO,  $H_2O_2$  (0,003%) a  $100 \mu M Cu^{2+}$  na plasmid pBluescript po inkubaci 30 min. při  $37^\circ C$ . Dráha 1 představuje kontrolu DNA. Dráha 1 – DNA; Dráha 2 – DNA +  $H_2O_2$ ; Dráha 3 – DNA +  $Cu^{2+}$ ; Dráha 4 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$ ; Dráha 5 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 2,5% DMSO; Dráha 6 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 5% DMSO; Dráha 7 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 10% DMSO; Dráha 8 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 15% DMSO; Dráha 9 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 20% DMSO; Dráha 10 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 25% DMSO; Dráha 11 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 30% DMSO; Dráha 12 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 35% DMSO; Dráha 13 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 40% DMSO; Dráha 14 – DNA +  $H_2O_2$  +  $Cu^{2+}$  + 50% DMSO.

Obr. 2 zaznamenává výsledky detekce působení extraktu Magnolie vzhledem k inhibici oxidačního poškození plasmidové DNA. Vzorek byl otestován v koncentračním rozmezí 0,6 – 3  $\mu g$ , v objemu 10  $\mu l$  reakční směsi. U nejnižší dávky 0,6  $\mu g$  vzorku (dráha č. 4) nebyl zjištěn žádný protektivní účinek testované látky, při aplikaci 1-3  $\mu g$  vzorku (dráhy č. 5 až 8) byla detekována částečná inhibice tvorby zlomů v DNA, nejvýraznější inhibice indukce zlomů v DNA byla zjištěna při aplikaci 3  $\mu g$  vzorku (dráha č. 8).



Obr. 2. Efekt vzorku Magnolie (MO),  $H_2O_2$  a  $100 \mu M Fe^{2+}$  na plasmid pBS po inkubaci 30 min. při  $37^\circ C$ . Dráha 1 představuje kontrolu DNA. Dráha 1 – DNA; Dráha 2 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$ ; Dráha 3 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$  +  $Fe^{2+}$ ; Dráha 4 až 8 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$  +  $Fe^{2+}$  + MO (4: 0,6  $\mu g$ ; 5: 1  $\mu g$ ; 6: 1,5  $\mu g$ ; 7: 2  $\mu g$ ; 8: 3  $\mu g$ )



Obr. 3. Efekt vzorku VinOserae (VO),  $H_2O_2$  a  $100 \mu M Fe^{2+}$  na plasmid pBS po inkubaci 30 min. při  $37^\circ C$ . Dráha 1 představuje kontrolu DNA. Dráha 1 – DNA; Dráha 2 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$ ; Dráha 3 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$  +  $Fe^{2+}$ ; Dráha 4 až 10 – DNA + 0,3%  $H_2O_2$  +  $Fe^{2+}$  + VO (4: 0,2  $\mu g$ ; 5: 0,5  $\mu g$ ; 6: 1  $\mu g$ ; 7: 1,5  $\mu g$ ; 8: 2  $\mu g$ ; 9: 3  $\mu g$ ; 10: 4  $\mu g$ ) .

Obr. 3 ukazuje výsledky testování vzorku extraktu VinOserae. Extrakt VinOserae byl otestován v koncentračním rozmezí 0,2 – 4  $\mu g$ , v objemu 10  $\mu l$  reakční směsi. Při aplikaci nejnižší dávky 0,2  $\mu g$  nebyla zaznamenána žádná inhibice tvorby zlomů v plasmidové DNA (dráha č. 4). Protektivní účinek testované látky byl zjištěn po aplikaci dávky 0,5  $\mu g$  vzorku (dráha č. 5). Nejvýraznější efekt inhibice oxidačního poškození plasmidové DNA byl detekován v drahách č. 7 až 10 při aplikaci 1,5 - 4  $\mu g$  vzorku.

## Závěr

S využitím plasmidu pBluescript byl detekován protektivní efekt dimethylsulfoxidu. Bylo zjištěno, že DMSO částečně inhibuje poškození plasmidové DNA indukované hydroxylovými radikály. U rostlinných extraktů (extrakt z *Magnolia officinalis* a extrakt *VinOserae*) byly elektroforeticky detekovány změny topologického stavu plasmidové DNA a zjištěn značný protektivní efekt inhibice oxidačního poškození DNA indukovaného peroxidem vodíku za přítomnosti iontů železa. Antioxidační účinek těchto extraktů byl v rámci další studie prokázán také Amesovým testem, na kmeni *Salmonella typhimurium* His<sup>-</sup> TA102<sup>6</sup>. Zjištěné výsledky ukazují, že metoda sledování změn topologického stavu plasmidové DNA pomocí gelové elektroforézy je velmi dobře využitelná pro detekci antioxidačního účinku látek různého původu. K výhodám DNA topologické zkoušky patří zejména její časová nenáročnost, úspora materiálu a také skutečnost, že zkouška není negativně ovlivňována vlastnostmi vzorku, jako např. toxicitou a nevyžaduje jeho sterilitu.

## Literatura

1. Cai Y., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. (2006). *Life Sci.* 78: 2872.
2. Racek J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. (2003). Galén, Praha.
3. Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. (2000). Grada Publ., Praha.
4. Wang X., Wang Y., Geng Y., Li F., Zheng Ch. (2004). *J. Chromatogr. A* 1036: 171.
5. Bang K. H., Kim Y. K., Min B. S., Na M. K., Rhee Y. H., Lee J. P., Bae K. H. (2000). *Arch. Pharmacol. Res.* 23: 46.
6. Pavlíčková, Z., Malachová, K., Červeň, J. (2009). Antimutagenic and DNA damage protective activities of plant extracts. *Genetic Toxicology and Cancer Prevention – Autumn Meeting*, Bratislava, 59.

## Využití Amesova miniaturizovaného flukтуаčního testu pro detekci mutagenů

Hana Sezimová

Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, 30. dubna 22, Ostrava, e-mail: hana.sezimova@osu.cz

## Úvod

Na světě existuje asi 10 milionů známých chemických látek a sloučenin, lidskou činností ročně přibývá až 3000 nových látek. Mnohé z nich mají praktický význam, u některých se uvažuje o jejich využití, velmi často však nejsou známy škodlivé účinky těchto látek (Tichý, 2004). Nebezpečí cizorodých chemických látek spočívá v toxicitě, schopnosti perzistence, kumulace v ekosystémech, transformaci v nebezpečné metabolity a zejména ve schopnosti interagovat s DNA živých organismů. V souvislosti s nutností testování xenobiotik byla vyvinuta celá řada postupů jejich sledování. K hlavním přístupům hodnocení kontaminace prostředí patří chemické analytické metody např. atomová absorpční spektrofotometrie (AAS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Metodami lze velice přesně získávat informace o současném stavu prostředí a je možné zjišťovat přesná

množství a typy kontaminantů. Výsledkem chemických analýz a hodnocení bývá obvykle výběr nejvýznamnějších, primárních polutantů. Tento přístup má však omezenou schopnost charakterizovat chemické složení komplexní směsi látek, objasnit možné chemické interakce nebo vznik rozkladných produktů z různých degradačních procesů chemických i biologických. K provedení komplexního a rozhodujícího hodnocení možného rizika na živé organismy jsou využívány biologické testy, jejichž důležitou součástí jsou také testy toxicity a genotoxicity vzorků jednotlivých složek prostředí na vybraných senzitivních organismech. Jsou založeny na sledování celkového účinku všech biodostupných kontaminantů ve vzorku a přinášejí informace o toxikologickém a genotoxikologickém riziku vzorku jako celku. Mezi screeningové biotesty genotoxicity řadíme také Amesův test, který se provádí za využití agarových ploten („plate incorporation assay“) (Ames et al., 1975, Mortelmans, Zeiger, 2000). Jednou z alternativ tohoto testu je tzv. fluktuační test (Hubbard et al., 1984), který na rozdíl od klasického Amesova testu na agarových plotnách, probíhá výhradně v tekutém médiu. Cílem předkládané práce bylo zjistit vhodnost využití Amesova miniaturizovaného fluktuačního testu pro detekci mutagenních účinků standardních látek i reálných vzorků povrchových a odpadních vod.

## **Materiál a metody**

Princip Amesova fluktuačního miniaturizovaného testu je stejný jako u klasického Amesova testu a je založen na indukci zpětné mutace detekčního systému *Salmonella typhimurium* His<sup>-</sup> působením genotoxické látky. V případě působení mutagenní látky na indikátorový kmen dojde u něj ke zpětné mutaci v histidinovém operonu a tento kmen dokáže růst v prostředí s absencí histidinu, což se projeví změnou zbarvení média z fialové na žlutou barvu. Výhodou fluktuačního testu je jeho jednoduchost, rychlost a rovněž díky lepšímu kontaktu všech komponent ve vzorku s bakteriálním kmenem také vyšší citlivost (Rao, Lifshitz, 1995). Na principu fluktuačního Amesova testu je komerčně vyráběna Muta-ChromoPlate sada, která obsahuje všechny roztoky potřebné k provedení testu, disky lyofilizovaného bakteriálního kmene, mikrotitrační destičky, zařízení na filtraci vzorku a misky potřebné k pipetování vzorku do jamek mikrotitračních destiček (The Muta-ChromoPlate kit, 1997).

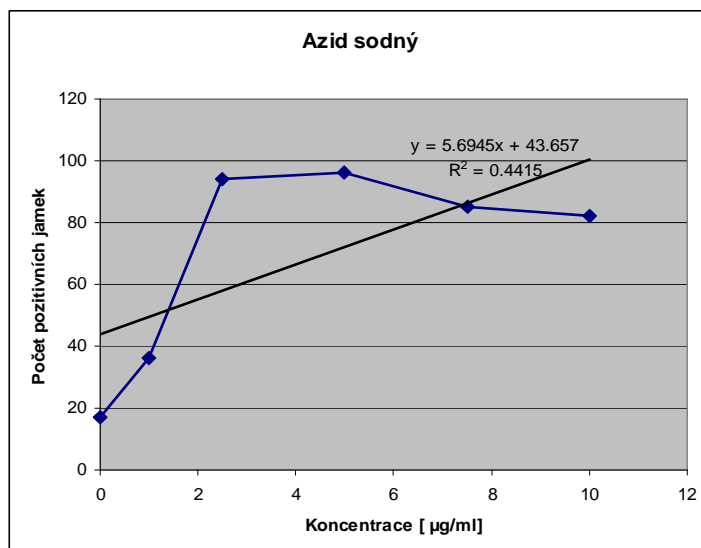
Postup provedení Amesova fluktuačního miniaturizovaného testu zahrnuje přípravu suspenze bakterií, reakční směsi a v případě modelování metabolické aktivity i S9 směsi. Následuje aplikace příslušného množství reakční směsi, vzorku, popř. standardních látek, ředící vody, bakteriální kultury a pro test s metabolickou aktivací také S9 směsi do jednotlivých zkumavek. Obsah každé zkumavky se přenesení do 96-ti jamek mikrotitrační destičky, tzn. že je v testu aplikován do všech jamek mikrotitrační destičky stejný vzorek. Test je vyhodnocován po uplynutí doby inkubace (5 dní) vizuálně následujícím způsobem. Všechny jamky žluté, částečně žluté nebo zakalené jsou vyhodnoceny jako pozitivní, jamky fialové jsou vyhodnoceny jako negativní. Konečný výsledek je zjištěn porovnáním počtu pozitivních jamek na mikrotitračních destičkách s testovaným materiálem nebo standardními mutageny (pozitivní kontrola) s úrovní spontánních mutací v negativní kontrole.

Amesův fluktuační miniaturizovaný test může být proveden pomocí zakoupené komerčně dodávané sady Muta-ChromoPlate nebo individuálně připraveným postupem (Sezimová, 2006), který sice snižuje uživatelský komfort, ale rovněž velmi výrazně snižuje náklady na provedení testu.

## Výsledky a diskuze

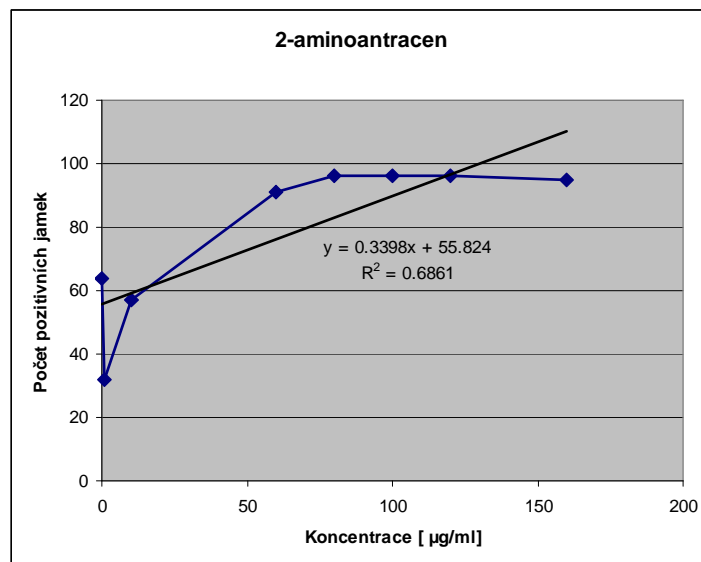
Využití Amesova miniaturizovaného fluktuačního testu na námi připravených mikrotitračních destičkách bylo ověřeno na standardních látkách: azidu sodném (obr. 1), 2-nitro-1,4-fenyldiaminu, 4-nitro-1,4-fenyldiaminu, 2-aminoantracenu (obr. 2) a benzo(a)pyrenu. Na základě získaných výsledků byly vybrány optimální koncentrace pro používání těchto látek jako pozitivních kontrol.

Koncentrace [μg/ml]	Počet pozitivních jamek
0	17
1	36
2,5	94
5	96
7,5	85
10	82



Obr. 1: Azid sodný (*Salmonella typhimurium* TA 100, -S9)

Koncentrace [μg/ml]	Počet pozitivních jamek
0	64
1	32
10	57
60	91
80	96
100	96
120	96
160	95



Obr. 2: 2-aminoantracen (*Salmonella typhimurium* TA 100, +S9)

Námi modifikovaná metoda pro monitorování reálných vzorků byla ověřena na vzorcích povrchových a odpadních vod. Celkově bylo testováno 9 vzorků odpadních vod průmyslových podniků, které zahrnovaly různé druhy výroby a 25 profilů 14 řek v povodí řeky Odry. Vzorky byly testovány v surovém a rovněž v zkoncentrovaném stavu (TNV 75 7231). Výsledkem bylo zjištění, že všechny testované vzorky odpadních vod byly pozitivní

v surovém stavu na jednom nebo obou detekčních bakteriálních kmenech (*Salmonella typhimurium* TA 98, TA100). Chemický rozbor odpadních vod, který byl prováděn současně s genotoxikologickým hodnocením, ne vždy dokázal identifikovat složku, která zodpovídá za mutagenní účinky. Mutagenní působení bylo rovněž detekováno u vybraných vzorků povrchových vod (např. Bohumínská stružka-ústí, Černý potok-ústí). Nejčastěji byla zaznamenána pozitivní odezva v testu s využitím detekčního kmene *Salmonella typhimurium* TA 98 ve variantě využívající S9 frakci. To ukazuje na přítomnost nepřímo působících látek, jejichž účinek se projeví až po metabolické změně v organismu, které vyvolávají posunové mutace.

### **Závěr**

Ověření využitelnosti Amesova flukтуаčního miniaturizovaného testu s vlastní přípravou mikrotitračních destiček v praxi bylo provedeno na standardních látkách a vzorcích povrchových a odpadních vod. U standardních látek byla zaznamenána závislost mezi koncentrací testované látky a počtem pozitivních jamek v testu. U všech vzorků odpadních vod bylo detekováno genotoxické působení na jednom nebo obou bakteriálních kmenech *Salmonella typhimurium* His<sup>-</sup>. Také ve vzorcích povrchových vod protékající průmyslovou aglomerací byly zjištěny genotoxické látky. Chemickým rozbohem, který byl prováděn u zkoumaných vzorků, se v řadě případů nepodařilo rizikovou mutagenní látku identifikovat. Tato skutečnost potvrdila, že biologické testy mutagenity mají, vedle chemických analýz, v hodnocení genotoxických rizik své nezastupitelné místo .

### **Literatura**

- Ames, B.N., McCann J., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
- Holoubek, I. et al. (2004). *Využití testů genotoxicity pro kontrolu kontaminace zemědělských produktů, potravin a vzorků životního prostředí*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D., Bridges, J.W. (1984). *Handbook of mutagenicity test procedures*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 141-160.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455: 29-60.
- Rao, S.S., Lifshitz, R. (1995). The Muta-ChromoPlate Method for measuring mutagenicity of environmental symplex and pure chemicals. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal* 10: 307-313.
- Sezimová, H. (2006). *Hodnocení genotoxických účinků kontaminant životního prostředí*. VŠB-TU Ostrava.
- Tichý, M. (2004). *Toxikologie pro chemiky – Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. Karlova univerzita v Praze, Praha.

## O buňkách, nádorech a lidech

**Jana Šmardová**

*Biologie nádorů zajímá mnoho lidí. Nejenom studenty, biology či další přírodovědce, ale i laiky. Mohlo by to souviset s tím, že v Evropě a ve Spojených státech patří rakovina k nejčastějším příčinám úmrtí, a tak se nás každého hodně dotýká. To je jistě jedna z příčin zájmu, ale zřejmě ne jediná. Vždyť například zabiják ještě „úspěšnější“ než rakovina – onemocnění srdce a cév – zdaleka tolik pozornosti nepřitahuje.*

*Přednáším molekulární a buněčnou biologii nádorů a v průběhu let jsem si začala velmi intenzivně uvědomovat paralely a podobnosti mezi chováním buněk (zdravých i nádorových) a chováním lidí nebo i celých skupin lidí. Někdy tyto nápady nabízím studentům, pro uvolnění atmosféry během dlouhých přednášek, pro udržení jejich pozornosti a pobavení, pro usnadnění vzhledu do nějakého problému. Ale vždy s nadějí, že je to i příležitost pro naše společné zamyšlení. Říkám těmto myšlenkám a nápadům „přesahy“. Postupně jsem došla k poznání, že nádor není jen nemoc a záležitost buněk, ale že je to princip. A že nádory bují nejenom v našich tělech, ale v našich životech mnohem obecněji i v životě celé společnosti. Domnívám se, že právě tato skutečnost je příčinou všeobecného zájmu o rakovinu. Protože ta nás ohrožuje mnohem více a mnohem univerzálněji, než si obvykle uvědomujeme.*

*V jednom stručném přehledu pro akademickou obec jsme před časem s manželem popsali pohled biologů na to, jak vznikají nádory. Tímto textem chci na náš předchozí text navázat a hlavně se pokusit ho rozšířit právě o ty pohledy, které přicházejí nově, tj. o přesahy.*



**Obr. 1:** Přesahy. Osteoklast, tj. buňku, která se podílí na odbourávání kostní hmoty, nafotil a její cytoskelet obarvil Pierre Jurdic (Francie), jako východisko pro svou kresbu použil Pierre Favre (Švýcarsko).

### **Zdravý mnohobuněčný organizmus**

Zdravý mnohobuněčný organizmus představuje harmonické společenství velkého počtu buněk, z nichž každá má svou funkci, kterou vykonává ve vymezeném čase a vymezeném prostoru dané tkáně pro maximální užitek celé buněčné populace. Jednotlivé buňky daného organismu spolu nesoutěží, ale vzájemně se podporují a spolupracují, aby jejich existence byla pro jejich nositele užitečná a neznamerala zátěž. Uvádí se, že tělo dospělého člověka je tvořeno asi  $10^{13}$  buňkami. To je ohromující číslo. (Jen pro srovnání, na naší planetě žije necelých  $10^{10}$  lidí.) Stejně ohromující je, kolik nejrůznějších buněčných typů v našem těle je. Máme tak rozdílné buňky jako nejrůznější typy krvinek, neurony, svalové buňky, buňky, které tvoří povrch kůže a výstelku střev a dalších orgánů, jaterní buňky, a mnoho dalších. Nejenom, že všechny tyto rozmanité buňky v našem těle potřebujeme a žádný

typ nesmí chybět, ale navíc každý buněčný typ musí být zastoupen ve velmi přesném množství. Harmonii celku – mnohobuněčného organismu, výrazně narušuje jak nedostatek některých buněk, tak jejich nadbytek. Pro všechny buněčné typy navíc platí, že každá buňka se musí v těle nacházet na svém správném místě. Uspořádanost buněk v těle je vysoká a tolerance k odchylkám malá.

Na počátku vývoje takto vysoce uspořádaného společenství buněk stojí vždy buňka jediná: oplozené vajíčko. Tato jediná buňka obsahuje ve svém jádře genetickou informaci, která je kompletní a dostatečná pro následující vytvoření celého organismu, a která do značné míry předurčuje jeho podobu, fungování, vlastnosti a chování. Ačkoliv se jednotlivé buňky v těle tolik odlišují od sebe navzájem a také od původního oplozeného vajíčka, až na malé výjimky všechny nesou úplně stejnou genetickou informaci. A tak se před námi otevírají nesmírně zajímavé otázky. Jak vznikají jednotlivé buněčné typy? Jak se rozrůžňují, diferencují? Jak se mnohobuněčný organismus postupně tvoří a jak je dosaženo uspořádanosti? Jak jednotlivé buňky vědí, jak se mají vyvíjet a proměňovat? Kam patří, kde mají své místo? Co přesně mají vykonávat? Kdy se mají dělit? A na molekulární úrovni je to pak otázka: jak ví každá jednotlivá buňka, jak má svou genetickou informaci využívat? Jak se naučí, kterou její část má využívat a kdy? Kdo řídí, kontroluje a zajišťuje, aby správné buňky byly na správném místě, aby se diferencovaly ve správné buněčné typy a potom vykonávaly své správné funkce ve prospěch celého organismu? V zásadě existují jen dvě možnosti. (1) Buď v mnohobuněčném organismu existuje nějaké řídicí centrum, které řídí a koordinuje jednotlivé buňky, tkáně a orgány a zajišťuje mezi nimi soulad a dobrou spolupráci, a to vše ve prospěch celého organismu. (2) Nebo žádné takové řídicí centrum neexistuje a naopak každá jednotlivá buňka nese plnou odpovědnost za svůj vlastní osud a tedy asi  $10^{13}$  díl odpovědnosti za společný úspěch celého organismu. Správná je možnost druhá! Nebyla prokázána existence řídicího centra, z něhož by jednotlivé buňky v těle dostávaly pokyny, rady či rozkazy k tomu, co mají dělat. Poznatky mnoha oblastí biologie, včetně embryologie a vývojové biologie, naopak postupně skládají obraz toho, jak jednotlivé buňky fungují, neustále mezi sebou komunikují, navzájem se ovlivňují a ovlivňovat se nechávají a společně tak vytvářejí dokonalé soukolí mnohobuněčného organismu.

Mnohobuněčný organismus tedy představuje vyspělé společenství buněk, které v sobě spojuje jedinečné potřeby relativně autonomních buněk s potřebami a zájmy celku. Vidíme sami na sobě, na své vlastním těle, že toto uspořádání je vrcholně funkční, téměř dokonalé. Jako všechno má ale i ono svou odvrácenou tvář, svá rizika. Autonomie a individuální odpovědnost každé jedné buňky přináší mnohobuněčnému organismu vedle nesporných výhod i jistou zranitelnost. Ta spočívá v tom, že se může stát, že se některá buňka vydá svou vlastní cestou a rozhodne se sledovat svůj vlastní zájem bez ohledu na to, zda je tím naplňován i zájem celku. Dokonalou představitelkou takové nespolupracující buňky je buňka nádorová. O nádorových buňkách se někdy říká, že porušují základní pravidla sociálního chování, jindy se označují jako sobecké buňky. Pro organismus nepředstavuje vážné riziko, pokud se jednotlivá buňka nahodile zachová nesprávně. Ale potenciálně nebezpečná situace nastává tehdy, dojde-li v jedné buňce ke genetické změně, která buňce dovolí přežít, rozdělit se a tak produkovat dceřiné buňky s podobně asociálním chováním. Organizace tkáně nebo i celého organismu tak může být rozvrácena postupně expandujícím klonem abnormálních buněk.

### **Co je rakovina, nádor, kancerogeneze?**

Rakovina je onemocnění způsobené zhoubným nádorem. Nádor (tumor, neoplazma, novotvar) je patologický útvar vytvořený v tkáni mnohobuněčného organismu, jehož růst se vymkl kontrole. Proces vzniku a vývoje nádorů se označuje jako kancerogeneze.



Kancerogeneze má dva základní rysy, které jsou klíčem k pochopení její molekulární podstaty. (1) O nádorech mluvíme jako o onemocněních genomu, protože základem jejich vzniku jsou především mutace. (2) K přeměně normální zdravé buňky v buňku plně maligní nestačí mutace jediná. Kancerogeneze je vícestupňový proces postupného hromadění několika mutací. Mutace, které vedou k vývoji nádorů, postiženým buňkám neškodí, ale naopak je zvýhodňují oproti buňkám sousedním. A právě tato výhoda, kterou individuální buňka s danou mutací získává, ohrožuje život celého mnohobuněčného organismu. Během vývoje nádoru se uplatňuje přírodní selekce, která umožňuje přežívání aktivně se množících mutantních buněk bez ohledu na buňky sousední. Jak původní populace mutovaných buněk roste, postupně se dále vyvíjí: v některých buňkách této populace se nahodile objevují další mutace a některé z nich jsou přírodní selekcí opět preferovány. Celý proces vrcholí vznikem agresivních nádorových buněk žijících uvnitř populace zdravých „disciplinovaných“ tělních buněk. Řádné struktury těla jsou utlačovány nádorovými buňkami, které se postupně prosazují na jejich úkor.

Konkrétních genů, které mohou být u nádorů mutovány a přispívat tak k procesu kancerogeneze, bylo nalezeno mnoho (řádově desítky až stovky). Dokonce i nádory stejného nebo velmi podobného histologického typu mohou vzniknout mutacemi různých genů. Proces kancerogeneze tedy může být velmi individuální. Přesto lze pro mutace související s kancerogenezí najít společného jmenovatele. Obecně je přijímána představa, že v buňce musí proběhnout alespoň sedm základních změn, které se společně podílejí na vytvoření maligního fenotypu. Jsou to změny vedoucí k (1) získání soběstačnosti v produkci růstových signálů, (2) necitlivosti k signálům zastavujícím buněčný cyklus, (3) poškození apoptózy, (4) získání neomezeného replikačního potenciálu, (5) indukci angiogeneze, (6) získání metastatického potenciálu a (7) navýšení genetické nestability (obr. 2).

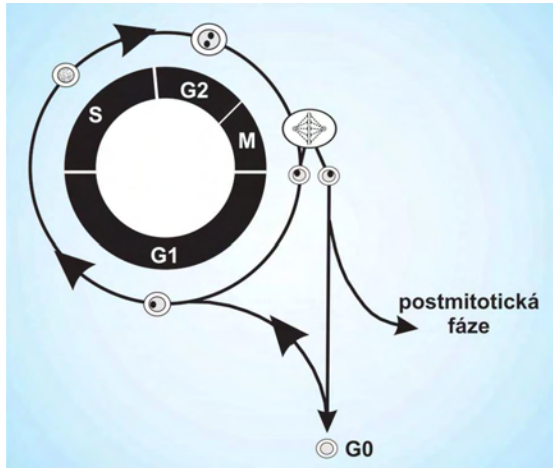


**Obr. 2.** Sedm znaků nádorových buněk.

### Poškození regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus představuje sled procesů, kterými buňka postupně duplikuje své složky, aby se následně rozdělila do dvou buněk dceřiných. Buněčný cyklus představuje postupné střídání čtyř fází (obr. 3). V S-fázi musí buňka duplikovat veškerý svůj genetický materiál, aby jej mohla později v úplnosti spolehlivě předat dceřiným buňkám. Kdyby dceřiné buňce scházela (nebo přebývala) i jen malá část genetické informace, mohlo by to vážně ohrozit její životaschopnost nebo funkčnost. K vlastnímu rozdělení duplikovaného genetického materiálu a následně rozdělení celé buňky dochází během mitózy, tj. M-fáze. Mezi fázemi S a M je fáze G2 a období od zakončení fáze M a zahájením fáze S se označuje

jako fáze G1. Buněčný cyklus je tedy cyklem čtyř fází, které vždy probíhají ve stejném pořadí: S-G2-M-G1. Ačkoliv se obě fáze G označují jako „gap“ (přestávka, mezera) neznamená to, že se v nich nic důležitého neděje. Buňka v těchto fázích vykonává své běžné činnosti, je plně metabolicky aktivní a může svůj postup buněčným cyklem podle potřeby zastavit nebo pozastavit. Body, ve kterých se buněčný cyklus zastavuje nebo pozastavuje, označujeme jako kontrolní body buněčného cyklu.



**Obr. 3.** Buněčný cyklus. Buněčný cyklus je tvořen sledem čtyř fází, které vždy probíhají ve stejném pořadí: S-G2-M-G1. V bodě restrikce na konci fáze G1 buňka buď vstoupí do buněčného cyklu nebo se navrátí do reverzibilní klidové fáze G0 nebo vstoupí do ireverzibilního, postmitotického, terminálně diferencovaného stavu.

Na molekulární úrovni je celý buněčný cyklus rozfázován do mnoha menších postupných kroků. Ty následují jeden za druhým, opět v přesném, nezaměnitelném sledu. Návaznost fází je zajištěna tím, že pro vstup do každého dalšího kroku je nezbytné završení kroku předchozího. Výsledkem každého dílčího kroku je celý soubor změn a jednou z těchto změn je také syntéza pomyslného klíče, který odemkne bránu k dalšímu kroku. Někdy se tento sled kroků přirovnává ke kostkám domina, které jsou rozestavěny za sebou tak, že když spadne jedna kostka, srazí tu následující, ta opět tu, která následuje za ní, a postupně tak v přesném sledu padají i všechny kostky další.

Je ale otázka, která kostka domina je tou první, a co rozhodne o tom, že spadne. Tato kostka je totiž klíčem k regulaci celého cyklu. Molekulární podstata této první dominové kostky již byla do značné míry objasněna, a tak víme, že tento klíčový rozhodovací bod buněčného cyklu se nachází na konci fáze G1 a nazývá se někdy bodem START nebo bodem restrikce nebo krátce bodem R. Jakmile je buněčný cyklus zahájen a projde bodem R, je už nevyhnutelně také plně (nebo do takové míry, do jaké je toho buňka schopna) dokončen. Klíčem k regulaci buněčného cyklu je tak regulace průchodu bodem R. K bodu R proto směřují všechny důležité informace - signály, které musí být brány v úvahu, když se rozhoduje o buněčném rozdělení a vlastně o dalším buněčném osudu. V bodě restrikce se buňka rozhoduje o tom, zda započne - a neodvratně také dokončí - buněčný cyklus. Pokud signály, které buňka obdržela, nevedou k zahájení buněčného cyklu, může se buňka navrátit či vstoupit do reverzibilní klidové fáze G0 anebo může vstoupit do postmitotického, diferencovaného stavu (obr. 3). Tento stav je ireverzibilní, z něho se již buňka do buněčného cyklu navrátit nemůže.

Rozvrácení normální buněčné diferenciaci je významnou součástí procesu kancerogeneze. Mechanismů, které se podílejí na řízení diferenciaci jednotlivých buněčných linií a typů, je mnoho a nejsou ještě plně prostudovány a pochopeny. Ale je zřejmé, že existuje spojení mezi regulací buněčné proliferace (tedy buněčného cyklu) a buněčné diferenciaci a obecně platí, že je mezi nimi nepřímá úměra. Terminální diferenciaci je obvykle spojena s definitivním opuštěním buněčného cyklu.

O významnosti rozhodování o vstupu do buněčného cyklu v bodě restrikce svědčí to, že probíhá na dvou úrovních. Aby došlo k zahájení buněčného cyklu, musí být přítomny

signály stimulující buněčný cyklus (tzv. mitogenní signály) a zároveň nesmí být přítomny signály zastavující buněčný cyklus (tzv. antimitogenní signály). Buňka, která se má proměnit v buňku nádorovou, potřebuje být zcela nezávislá na regulátorech buněčného cyklu (stát se zcela neregulovatelnou) a k tomu musí obejít obě tyto úrovně regulace zahájení buněčného cyklu. Musí se stát soběstačnou v produkci růstových signálů a zároveň necitlivou k signálům, které zastavují buněčný cyklus.

### **Soběstačnost v produkci růstových signálů**

Rozdělení buňky na dvě dceřiné je významný okamžik nejenom v životě mateřské buňky, ale také v životě všech okolních buněk dané tkáně. To, že se z jedné buňky stanou dvě, ovlivní život všech buněk v okolí. Zatímco jednobuněčné organizmy (např. bakterie) jsou zcela autonomní, dělí se velmi ochotně a jsou ve svém dělení omezovány prakticky jen dostupností živin, buňka ve společenství mnohobuněčného organismu musí při rozhodování o svém rozdělení citlivě vnímat potřeby sousedních buněk a své dělení jejich potřebám podřídít. Zdravá buňka v mnohobuněčném organismu tedy ke svému rozdělení nevyhnutelně potřebuje mitogenní signály z vnějšího prostředí. Takové stimulující signály mohou pocházet z bezprostředního okolí, od sousedních buněk, a pak je označujeme jako parakrinní. Nebo mohou být výsledkem nějaké potřeby pocházející nebo řízené ze struktur fyzicky vzdálenějších a pak mluvíme o endokrinní stimulaci.

Na molekulární úrovni je takovým stimulujícím signálem nějaká molekula: růstový faktor, hormon, cytokin a podobně. Podstatné je to, že na daný signál, danou molekulu, reagují pouze buňky, které pro příslušný signál mají na svém povrchu odpovídající receptor. Receptor je molekula, která se obvykle nachází v buněčné membráně. Svou extracelulární částí směřuje ven z buňky, zatímco svou intracelulární částí směřuje dovnitř buňky. Jen buňky vybavené příslušným receptorem mohou signální molekuly zachytit. V důsledku této vazby se pozmění struktura intracelulární části receptoru a tak je signál přenesen dovnitř buňky, kde přes řadu dalších přenašečů může signál dorazit až ke konečnému efektoru, který vyvolá adekvátní buněčnou odpověď. Takovým efektozem jsou pro mitogenní signály molekuly ovlivňující bod R. V bodě R je tento signál přijat a vyhodnocován spolu s dalšími signály.

Buňka může mít na svém povrchu celou řadu nejrůznějších receptorů, které potom rozhodují o tom, na které signály z vnějšího prostředí reaguje a na které neodpovídá. Ve skladbě receptorů vystavených na svém povrchu (stejně jako ve skladbě vnitrobuněčných přenašečů a vůbec všech dalších molekul) se buňky mezi sebou liší. Buď jen nevýznamně, například u vývojově příbuzných, podobných buněčných typů (například zralá a nezralá bílá krvinka) nebo výrazně, například u buněk velmi vzdálených (například krvinka a neuron). Na druhou stranu i velmi vzdálené buňky mohou mít na svém povrchu stejný nebo podobný receptor a reagovat tak na stejný (například endokrinní) signál. V této souvislosti připomeňme, že všechny buňky v těle mají ve svém jádře téměř totožnou genetickou informaci, tedy totožný soubor genů. Rozrůznění (diferenciace) buněk souvisí s jejich vývojem, s jejich individuální historií (zkušeností), která vedla k tomu, že každá buňka (buněčný typ) využívá jinou část genů (má je zapnuté), zatímco jinou část genů nevyužívá (má je vypnuté). A v souvislosti s přijímáním a přenosem signálů je třeba si uvědomit, že jedním z možných vyústění přenosu signálů do buňky je právě vypnutí nebo zapnutí nějakého genu nebo skupiny genů. Dalo by se říci, že je to získání nové zkušenosti, které buňku od této chvíle mění a mění tak více nebo méně i způsob, jakým od této chvíle bude reagovat na všechny podněty, tj. signály.

Zdravá buňka, která je součástí mnohobuněčného organismu, nikdy nevstoupí do buněčného cyklu, aniž by k tomu dostala jasný signál z vnějšího prostředí. Naopak pro nádorovou buňku je typické, že se dělí bez ohledu na okolní buňky, zcela nezávisle na jejich potřebách. Nádorová buňka si mitogenní signály stimulující ji k buněčnému dělení vytvoří

sama. Existuje mnoho způsobů, jak to může udělat. Například určitá mutace může vyvolat neadekvátní tvorbu růstového faktoru, na který pak již buňka „adekvátně“ reaguje prostřednictvím svého funkčního receptoru a další části funkční signální dráhy a rozdělí se. Tento stav, kdy buňka produkuje růstový faktor, na který pak sama reaguje, se označuje jako autokrinní stimulace. Jiná mutace může pozměnit strukturu a funkci receptoru nebo některého z proteinů tvořících další část mitogenní signální dráhy, který se podílí na přenosu signálů v buňce. Tyto pozměněné molekuly jsou pak trvale v zapnutém stavu a trvale přenášejí signál, který nikdy neobdržely. Výsledkem každé takové změny může být nadměrná buněčná proliferace, buněčné dělení, které neodpovídá skutečným potřebám společenství buněk v mnohobuněčném organizmu.

### **Necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus**

Mohlo by se zdát, že buňka soběstačná v produkci růstových signálů je již dostatečně „odbrzděná“ a vydává se na cestu nádorové přeměny. Toto odbrzdění je skutečně nezbytným krokem kancerogeneze, ale naštěstí není krokem dostatečným. A dokonce není ani krokem dostatečným k úplné deregulaci samotného buněčného cyklu. Zdravá buňka kontroluje buněčný cyklus na dvou úrovních. Kromě toho, že ji v klidovém, nedělicím se stavu udržuje nepřítomnost růstových signálů, udržuje ji v klidu také přítomnost signálů, které buněčný cyklus aktivně zastavují.

Kde se signály zastavující buněčný cyklus (tzv. antimitogenní signály) berou? Mohou podobně jako mitogenní signály přicházet z vnějšího prostředí, od okolních buněk. Pak jsou prostřednictvím příslušných receptorů a přenašečů přenášeny až k bodu R, kde buněčný cyklus účinně zastaví. Projevem jednoho typu takového signálu je tzv. kontaktní inhibice, kdy si buňky po dosažení kritické blízkosti navzájem signalizují, že jsou již v těsném kontaktu a po dalším buněčném dělení by jim již mohlo být příliš těsno.

Velkým zdrojem antimitogenních signálů je také samotná buňka. V každé buňce jsou přítomny mechanismy, které neustále monitorují její stav. Především je monitorován stav DNA, která zodpovídá za archivaci genetické informace. Každé poškození, které by mohlo způsobit, že by se při případném buněčném dělení mohla do dceřiných buněk přenášet nepřesná, poškozená genetická informace, je důvodem k vytvoření signálu, který buněčný cyklus spolehlivě zastaví. Podobně nedostatek některých živin, zdrojů energie nebo stavebních kamenů nutných pro vytvoření dvou plnohodnotných dceřiných buněk je zdrojem signálu, který buněčný cyklus zastaví.

Přítomnost signálů zastavujících buněčný cyklus je sama o sobě dostatečná k udržení kontroly nad buněčným dělením. Aby se vznikající nádorová buňka stala nezávislou a neovladatelnou, musí zcela znečitlivět k signálům, které její rozdělení zastavují. Způsobů, jak toho dosáhnout, existuje rovněž mnoho. Mutace mohou způsobit tvorbu receptorů nebo přenašečů signálů, které brzdící signál nepřijímají. Nebo ho přijímají, ale nepřenesou dál. Nebo je poškození již na úrovni molekul, které mají za úkol monitorovat stav buňky a ve změně podobě tento úkol neplní a příslušný signál netvoří.

Pro úplnost ještě zopakujeme, že necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus je nutnou podmínkou deregulace cyklu, ale není sama o sobě podmínkou dostatečnou. K získání úplné nezávislosti je nutná současná produkce vlastních růstových signálů.

*Typickým rysem nádorových buněk je špatná komunikace: dělají si vše po svém, neberou ohled na to, co signalizují okolní buňky a tím ani nemohou ve svém životě a svou existencí nijak zohlednit zájmy a potřeby ostatních. Nádorové buňky se v důsledku vymknuté regulace buněčného cyklu ženou vpřed, tedy svým vlastní směrem a vlastní rychlostí. Zdánilivě, krátkodobě, jako by v závodě s okolními, regulovanými, vnímavými, komunikujícími buňkami vítězily. Kdybychom jim přisoudili lidské vlastnosti, určitě by si jako vítězové připadaly. Vždyť*

*nesouhlas, pochybnosti, nespokojenost okolních buněk (ale i svou vlastní!) nevnímají, jsou k jejich signálům již necitlivé. Dokonce i optikou buněk okolních mohou vypadat jako průkopníci, jako takové šikovné buňky, co umějí něco navíc. Ale dlouhodobě, v konečném důsledku ničí tyto nádorové buňky společné dílo tj. mnohobuněčný organizmus a tím zabíjejí nejenom buňky poražené, ale taky samy sebe, domnělé vítěze této fatální soutěže. Není nádor jasnou ukázkou toho, že spolupráce a vzájemná komunikace vedou k lepším a udržitelnějším výsledkům než soutěž „kdo z koho“?*

*Jiným typickým znakem nádorových buněk je poškození diferenciací, tedy **ztráta specializace**, která někdy vede až k zestejnění buněk v nádoru. Ukázkovým biologickým příkladem jsou lymfomy. Lymfocyty zdravého imunitního systému dbají o svou diferenciaci, rozrůzněnost, ba individualizaci až jedinečnost. Existují stovky milionů různých virů, bakterií, živočišných buněk a dalších cizích molekul, které musí podnítit imunitní systém k adekvátní reakci. A tak imunitní systém potřebuje široké spektrum lymfocytů s odlišnými schopnostmi rozpoznávat specifické cíle. Potřebuje tedy k dobré funkci mnoho velmi úzce specializovaných odborníků. To v nádoru, v lymfomu, v nevypsané soutěži „o nejlepšího“ zvítězil jeden, rádoby nejúspěšnější, nejšikovnější lymfocyt. Že se nic pořádného ještě nestihl naučit? Nedokončil vzdělání, nedokončil specializaci? To nevádí! Copak neumí nejlépe prorazit? Rychle uspět a prosadit se? Tak co je vlastně v nepořádku? Analogicky, nebiologicky: neznáme každý ze svého okolí podobné „rychloukašené“ pseudoodborníky, kteří jsou plni odhodlání, nepochybují o sobě a nevnímají zpětnovazebné signály? Anemusí to být jen jednotlivci, mohou to být i dobře sešikované týmy, oddělení, firmy. A v mnohem jemnější podobě: nemáme každý z nás občas pochybnosti o sobě plynoucí z toho, že nerozumíme všemu? Že jsme třeba jen příliš úzce specializovaní a přitom by se nám líbilo umět se vyjádřit ke kdečemu? Nepomáháme tím někdy vytvářet prostředí, které adoruje všeměly a necení si pokory a vlastně odvahy „držet se svého kopyta“ a svou nenápadnou „malou“ prací obdobnou dílu jediného lymfocytu přispívat ke zdaru celku?*

### **Poškození apoptózy**

Expanze populace nádorových buněk vyplývá nejen ze zvýšení rychlosti jejich proliferace, tedy rychlosti, s jakou se buňky množí, ale také ze snížení rychlosti, s jakou buňky uvnitř nádorové populace umírají. Obvyklým způsobem, kterým buňky podléhají programované buněčné smrti, je apoptóza. Tento sebedestrukční proces, který je zanikající buňkou aktivně řízen, vede k fragmentaci buněčného jádra a v něm obsažené DNA a k postupnému rozkladu buněčných proteinů, aniž by došlo k porušení plazmatické membrány. Apoptotický program je přítomen ve všech buněčných typech v těle. Je nejenom součástí genetické informace každé buňky, ale celý apoptotický mechanismus je neustále latentně přítomen v každé buňce a připraven k rychlé indukci a okamžitému použití. To výmluvně svědčí o významu tohoto procesu a dokazuje neustálou připravenost každé buňky v těle odumřít apoptózou, je-li to v zájmu celého organismu. Během vývoje mnohobuněčného organismu se stává docela často, že buňka nebo buňky, které v nějakou fázi byly v určitém místě, v určitém čase a v určité podobě potřebné a užitečné, by se v dané podobě, na daném místě, v daném čase staly překážkou dalšího zdárného vývoje a musí být odstraněny. Podobně buňky, které jsou závažně poškozené, ve výrazné nerovnováze nebo infikované virem či bakterií, by představovaly pro organizmus riziko, a musí být odstraněny. Spouštěcím signálem apoptózy tak může být poškození DNA, deregulace některých onkogenů, nedostatek kyslíku, nepřítomnost signálů pro přežití nebo naopak přítomnost signálů smrti, které buňka dostává formou mimobuněčných faktorů. Jakmile je proces apoptózy zahájen, proběhne podle přesně stanoveného scénáře až do konce. Jednotlivými kroky tohoto procesu jsou zmenšení a kondenzace buňky, zaškrcování cytozolu, fragmentace jádra, rozklad buněčných membrán,

degradace cytoplazmy a cytoskeletu, degradace chromozomů a nakonec degradace a úplné vymizení buňky.

Ani nefyziologicky rychle expandující (proliferující) klon buněk by nemusel v těle představovat vážné riziko, pokud by buňky tohoto klonu adekvátně odpovídaly na signály vyvolávající apoptózu. Apoptóza tak představuje účinnou ochrannou bariéru organismu proti možnému vývoji nádoru, která musí být nevyhnutelně poškozena, aby vyvíjející se nádorová buňka mohla navzdory zájmům organismu přežít a dále expandovat. Současné poznatky o nádorech potvrzují, že rezistence k indukci programované buněčné smrti je skutečně znakem většiny a možná všech typů nádorů.

*Také úloha apoptózy ve vývoji a v životě mnohobuněčného organismu nám nabízí řadu příležitostí k zamyšlení nad paralelami s životem lidí v lidské společnosti. Dopad poškození apoptózy na proces kancerogeneze pak tyto úvahy výrazně umocňuje a přidává na jejich závažnosti. I jen z letmého náčrtu – a tím spíš pak při podrobnějším výkladu – vývoje mnohobuněčného organismu a diferenciacního procesu, který doprovází vznik různých buněčných typů, zřetelně vyplývá, že vývoj je vždy tvořen kombinací toho, co vzniká a nově se rozvíjí, a toho, co musí ustoupit a zaniknout. Opět můžeme využít už zmíněný příklad zrání lymfocytů. I terminálně diferencovanému, zralému lymfocytu zůstává schopnost proliferace, která je nezbytná ve chvíli, kdy lymfocyt zasahuje proti infekčnímu činidlu, k němuž má specifitu. Po odeznění infekce ale přežívají pouze paměťové buňky a počet lymfocytů je nadále redukován právě prostřednictvím apoptózy. Navíc zdravý imunitní systém musí nejenom zajistit účinnou reakci na cizorodé látky, ale zároveň se nesmí splést a nesmí zaútočit na své vlastní složky. Regulovaná apoptóza tak je nezbytnou součástí i odstraňování lymfocytů, které by mohly být pro organismus nebezpečné.*

*A jaké známe paralely z lidského života? Určitě je jich mnoho. Často zapomínáme, že pro správný osobní vývoj, osobní diferenciaci musíme nejenom nacházet a podnikat správné kroky nové, ale nezbytně nutně musíme také uzavírat a ukončovat kroky a fáze předchozí. Pro pobavení studentů někdy připomínám, že děti nikdy nechodí zároveň do mateřské školky i do základní školy. Nelze studovat vysokou školu, aniž bychom ukončili a uzavřeli studium na škole střední. To se zdá ještě docela samozřejmé. Ale co poslanci, kteří i nadále zůstávají na plný úvazek zaměstnání ve svých jiných zaměstnáních. Neznáte uchazeče o nové pozice, kteří si zároveň udržují všechny pozice stávající a kumulují je? Není možné, že **nedostatečné** využívání programovaného **ukončování** rozvrací životy jednotlivých lidí i život celých společností? Neukazují nám nádory názorně, k čemu až to vede?*

### **Získání neomezeného replikačního potenciálu**

Další bariérou, kterou musí nádor při svém vývoji překonat, je omezenost replikačního potenciálu, která je vlastní většině somatických buněk v těle. Existence vnitřního limitu omezujícího celkový počet buněčných cyklů, kterými může savčí buňka projít, byla pozorována při kultivaci buněk v tkáňových kulturách. Opakovaně se ukazovalo, že všechny buněčné kultury pravidelně zestárnou a odumírají po dosažení určitého počtu (50 až 60) buněčných rozdělení. A bylo zřejmé, že toto omezení další proliferace je určováno vnitřními faktory samotných buněk. Pochopení podstaty tohoto jevu souviselo s odhalením telomer a pochopením jejich funkce. Telomery jsou repetitivní sekvence DNA na koncích eukaryotických chromozomů. Na ně se váží složité proteinové komplexy, jejichž hlavní funkcí je ochrana konců chromozomů tak, aby nebyly vnímány buněčnými mechanizmy jako zlomy DNA, nebyly degradovány, případně aby se vzájemně nespojovaly fúzí. Dvoušroubovicová DNA je během buněčného dělení replikována takovým mechanismem, který nedovoluje úplnou syntézu konců DNA, a tak při každém buněčném dělení jsou dceřiné řetězce DNA na svém konci zkracovány. Při přílišném zkrácení ztrácejí telomery schopnost



chránit konce chromozomů a jsou signálem k navození klidového stavu doprovázejícího stárnutí buněk, tzv. senescence, spojeného s úplným zastavením buněčného cyklu. Zkracování telomer tedy funguje jako mitotické počítadlo a určuje proliferační kapacitu buněk.

Omezená proliferační kapacita může být velmi výraznou ochrannou bariérou při vývoji nádoru. Kancerogeneze je víceúrovňový proces. Ke svému završení/naplnění potřebuje postupně nahromadit několik různých mutací. Na počátku procesu stojí jedna (první odrodilá) buňka, v níž dojde k první mutaci. Tato mutace buňku zvýhodní oproti buňkám okolním a proto taková buňka expanduje a vytvoří celý klon buněk nesoucí stejnou mutaci. V jedné buňce tohoto klonu dojde s určitou pravděpodobností (asi  $10^{-6}$  – viz kapitola 9) k další mutaci, která dále svou nositelku zvýhodní a ta projde další vlnou expanzivního růstu. V jedné buňce tohoto expandujícího klonu dojde k další mutaci a celý proces kancerogeneze se tak krok za krokem posunuje vpřed až k dosažení plně maligního fenotypu. Respektive, posunoval by se, pokud by ho nezastavila omezená replikační kapacita. Během opakujících se vln klonální expanze totiž buňky opakovaně procházejí buněčným cyklem a s každým cyklem postupně zkracují své telomery. A v jednu chvíli zkrátí své telomery natolik, že ty vyšlou signál o svém kritickém zkrácení a navodí v buňce stav senescence a do dalšího buněčného cyklu již nevstoupí. Tím se i proces kancerogeneze zastaví před svým završením.

K tomu, aby ke zkracování telomer nedocházelo, musí být v buňkách aktivní enzym nazývaný telomeráza. Tento enzym zajišťuje, aby replikace konců chromozomů proběhla úplně. Telomeráza je aktivní například v zárodečných nebo kmenových buňkách. U většiny lidských somatických buněk telomeráza není aktivní. Schopnost udržovat délku telomer je vlastní téměř všem maligním nádorovým buňkám. U velké většiny nádorů (85 až 90%) souvisí tato schopnost právě s aktivací telomerázy, zbývajících 10 až 15% nádorových buněk s neaktivní telomerázou používá alternativní mechanismus k udržování délky telomer, který je založen na rekombinaci DNA.

Odvrácenou stranou této ochranné bariéry je to, že přispívá k celkovému stárnutí organismu. Díky tomu, že téměř všechny tělní buňky mají omezený replikační potenciál a při tom se mnohé během života organismu vytrvale, neúnavně a podle potřeb organismu dělí, dochází se zvyšujícím se věkem postupně k úbytku počtu buněk, které mají ještě dostatečně dlouhé telomery, jsou plně zdatné a umožňují normální funkci. Tělo stárne. Někdy se říká, že stárnutí je cena, kterou platíme za jinak účinnou ochranu proti nádorům.

*Zdá se, že vztah mezi rakovinou a stářím je příkladem pečlivě vybalancované rovnováhy. V mládí, reprodukčním věku se telomery účinně uplatňují jako součást protinádorové bariéry, se zvyšujícím se věkem přispívají ke stárnutí. Je-li stárnutí cena za ochranu před nádory, je to cena pro nás přijatelná? Zatím snad nikdo neuvažuje o vytvoření novodobého elixíru mládí založeného na aktivaci telomerázy (s výjimkou cíleného využití takové strategie jako protinádorové terapie), ale není poznání souvislosti mezi funkcí telomer a vývojem nádorů na jedné straně a stárnutím na druhé straně příležitostí k zamyšlení nad naším vztahem ke stárnutí? Nejsme civilizace adorující, vyznávající, upřednostňující mládí? Nejsme civilizace, která nezná dobře **hodnotu stárnutí a stáří**? Je to velké zjednodušení, ale propojme si na chvíli proces dospívání, dospělosti a stárnutí s buněčným procesem diferenciací, zrání a dosažení terminální diferenciací. Jak by se vám líbilo trávit život v těle, kde by byly jen mladé buňky? Možná by to moc dobrý život nebyl.*

## **Indukce angiogeneze**

Schopnost nádorů přesáhnout svou velikostí masu o průměru větším než  $1 \text{ mm}^3$  závisí na jejich schopnosti zajistit si přístup ke krevnímu systému. Tato schopnost umožňuje nádorovým buňkám v dostatečné míře získávat základní živiny a kyslík a zbavovat se odpadů svého metabolismu. Vzdálenost, která může být pro tento účel překlenuta prostou difúzí,

nepřesahuje 0,5 mm. Během organogeneze je dostatečný přístup všech buněk ke krevnímu systému zabezpečen koordinovaným růstem a vývojem cév a orgánové tkáně. Proto je proces růstu nových krevních cév, tj. proces angiogeneze, po dokončení vývoje tkáně jen přechodný a přísně regulovaný.

Přesvědčivé důkazy o závislosti vývoje nádorů na schopnosti indukce angiogeneze byly podány již v roce 1971. Buňky proliferující uvnitř tkáně zdánlivě disponují inherentní schopností vyvolat růst krevních cév, ale ve skutečnosti tomu tak není. Proliferující premaligní léze jsou zpočátku neangiogenní, což limituje jejich schopnost expanze. Angiogenní charakter získávají až během dalšího vývoje. Je zajímavé, že přechod z neangiogenního do angiogenního stavu, který se typicky odehrává v raných až středních fázích kancerogeneze, se neděje postupným vývojem, ale odehraje se „skokem“. Zapnutí angiogeneze je regulováno rovnováhou mezi aktivátory a inhibitory angiogeneze. Nejvýznamnějším stimulem nádorové angiogeneze je patrně nedostatek kyslíku, tzv. hypoxie. Nedostatek kyslíku se během vývoje nádoru navíc významně uplatňuje při selekci angiogenních buněčných klonů uvnitř neangiogenní premaligní masy buněk.

*Indukce angiogeneze je při vývoji nádoru zásadní krok. Neangiogenní nádory rostou pomalu (lineárně) a dosahují velikosti pouze několika málo milimetrů. Angiogenní nádory rostou rychle (exponenciálně) a mohou dosáhnout značné velikosti. Znaky nádorových buněk jako deregulovaný buněčný cyklus, poškozená apoptóza a neomezený replikační potenciál, se dají vysvětlit na úrovni nádorových buněk. Naproti tomu nádorovou angiogenezi nelze vysvětlit aniž bychom vedle nádorových buněk nevzali v úvahu také přímou účast a úlohu buněk nenádorových, například endoteliálních. Jinými slovy to znamená, že zásadní podmínkou úspěšného vývoje nádoru je **ochota nenádorových buněk spolupracovat s nádorem!** Dokud nenádorové buňky s nádorem nespolupracují, je organizmus více méně v bezpečí, i když jsou v něm klony nádorových buněk přítomné. Přistoupit na spolupráci s nádorovými buňkami je pro organizmus ovšem fatální. A paralel takové fatální, maligní spolupráce s nebezpečnými buňkami je v lidské historii nepřeborně...*

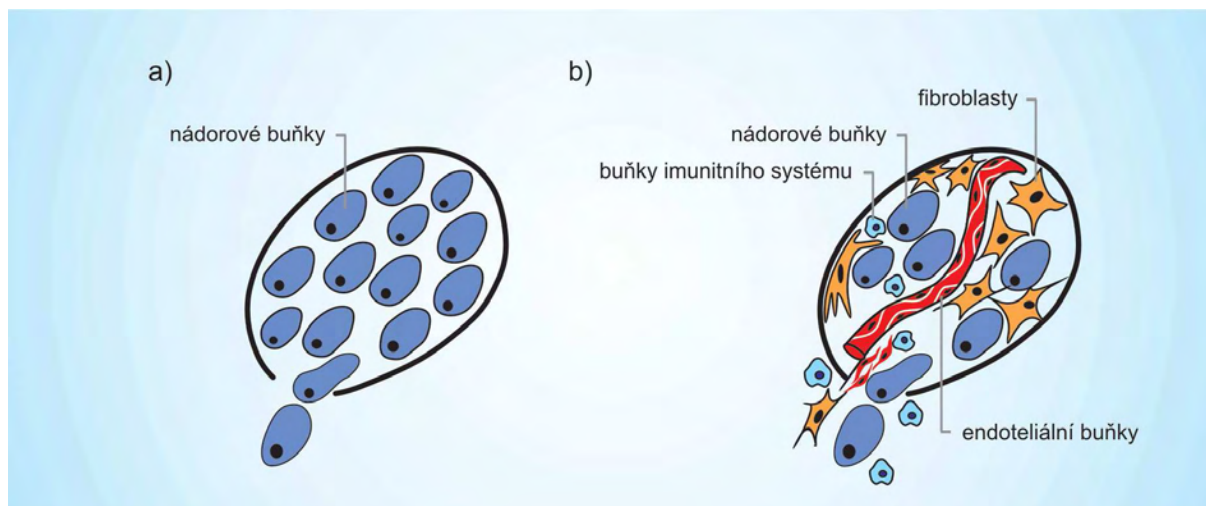
*Co nenádorové buňky k této spolupráci přiměje? Významným způsobem se o to zaslouhují samotné nádorové buňky. To ony se naučí vystupovat, komunikovat tak, aby nenádorové buňky ke spolupráci přiměly, aby je zvábila. V důsledku mutačních změn se naučí vysílat ty „správné“ signály do svého okolí. Takové signály, na které cílové, například endoteliální, buňky nemohou nereagovat. Je to tedy ochota nádorových buněk ke změně, k hledání takového vystupování, takového výrazu, až nenádorové buňky neodolají a začnou pracovat pro nádor. Nejsou nakonec nádorové buňky populistické?*

*Na druhé straně určité okolnosti nádorovým buňkám velmi nahrávají. Cožpak není hlavním úkolem vaskulární sítě, aby zajistila rozvod a dodávku kyslíku a živin celému organizmu, každé buňce? Jistě je nezbytnou podmínkou úspěšného plnění takového úkolu neustálé monitorování „stavu spokojenosti všech zákazníků“, vyhledávání těch nespokojených a rychlá obnova dodávky každému potřebnému. A cožpak uvnitř masy rychle expandujících nádorových buněk zcela zákonitě nevzniká mnoho nespokojených, tedy dusících se a podvyživených buněk? A není tedy logické, že je jen otázkou času, kdy se vaskulárnímu systému podaří dobudovat síť i do tohoto nehostinného místa? Že je to zneužití jinak dobře nastaveného systému založeného na vzájemné solidaritě všech součástí organizmu? Že tento sobecký, nesolidární buněčný útvar nakonec spotřebovává tolik zdrojů, že ohrožuje přežití celého organizmu... a v důsledku i sebe sama?*

Tvorba nových krevních vlásečnic je nutně doprovázena lokálními degradacemi bazálních membrán obklopujících kapiláry, invazí okolních podpůrných struktur – tzv. stromatu prorůstajícími endoteliálními buňkami ve směru působení angiogenních faktorů



nebo remodelace extracelulární matrix. Molekulární podstata těchto procesů bude stručně popsána v následující kapitole. Ukazuje na propojení procesů nádorové angiogeneze a metastazování, které není jen mechanistické, souvislostí je více. Za všechny jmenujme skutečnost, že obou těchto procesů se významně účastní i nenádorové buňky přítomné v nádoru (obr. 4).

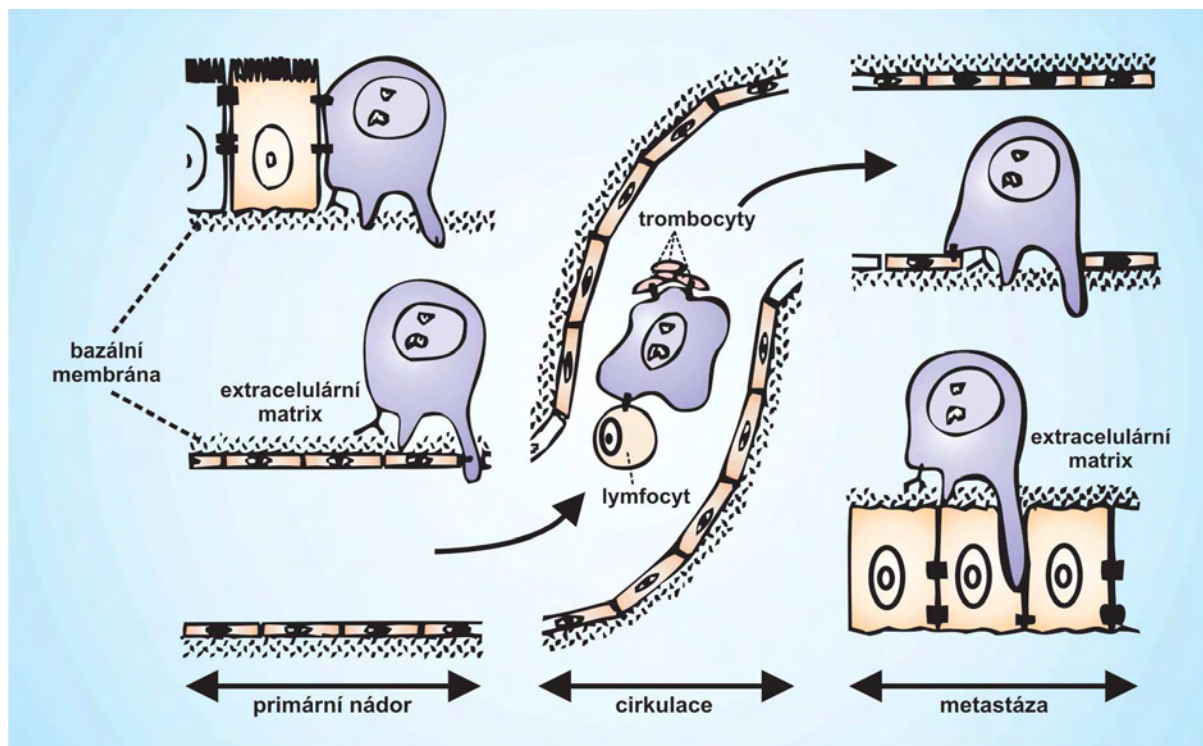


**Obr. 4.** Nádor je komplexní tkáň. Podle zjednodušené představy (a) byl nádor chápán jako soubor nádorových buněk. Nádor (b) je však komplexní tkáň, která je vedle nádorových buněk tvořena buňkami podpůrnými, endoteliálními, buňkami imunitního systému a dalšími. Na vývoj nádoru mají vliv všechny tyto buňky a jejich vzájemné interakce.

### Tvorba metastáz

Pokud nádorové buňky zůstávají pohromadě a tvoří jednolitou masu, vzniká nádor, který se označuje jako benigní. Ten může být často úplně odstraněn chirurgicky. Nádor, jehož buňky však mají schopnost invadovat okolní tkáň, je maligní. Maligní buňky se mohou uvolňovat z primárního nádoru, vstoupit do krevního nebo lymfatického systému a vytvořit v jiných částech těla sekundární nádory, metastázy. Čím více se nádor šíří, tím složitější je jeho úplné odstranění. Metastázy jsou nejzhoršivějším projevem nádorového onemocnění a jsou příčinou asi 90% úmrtí pacientů s rakovinou. Během svého vývoje většina nádorů dříve nebo později metastázy vytvoří.

Úspěšná invaze a vývoj metastázy jsou podobně jako vznik primárního nádoru závislé na všech do této chvíle zmíněných vlastnostech, které nádorové buňky získávají během kancerogeneze. Schopnost vytvořit metastázu je však podmíněna ještě dalšími změnami. Metastatická kaskáda zahrnuje několik kroků. (1) V první fázi se nádorová buňka musí uvolnit z primárního nádoru. (2) Dále prostupuje extracelulární matrix (ECM) a bazální membránou a dostává se do krevního systému. (3) Migruje tímto systémem a (4) opět prostupuje bazální membránou a ECM a (5) zakládá ohnisko sekundárního nádoru (obr. 5). Přesný průběh metastatické kaskády, především z hlediska mechanismů, které se na ní podílejí, a z hlediska jejich regulace není zcela objasněn. Je však zřejmé, že proces invaze provází postupná proměna schopnosti mezibuněčné adheze a remodelace extracelulární matrix. Obecně platí, že nádorové buňky jsou méně adhezivní než buňky normální a také vytvářejí méně extracelulární matrix. Ta musí být při průchodu nádorových buněk nemodelována, degradována. Klíčovou roli při fyziologické remodelaci extracelulární matrix a také během invaze nádorových buněk hrají proteázy, především metaloproteinázy. Tvorbu metastáz obecně provází zvýšená aktivita těchto enzymů.



**Obr. 5.** Metastatická kaskáda. Nádorová buňka se uvolňuje z primárního nádoru, prostupuje extracelulární matrix a bazální membránou a dostává se do krevního systému. Migruje tímto systémem, opět prostupuje bazální membránou a extracelulární matrix a tvoří metastázu.

Na interakcích buňky s okolním prostředím se podílí mnoho typů povrchových adhezivních proteinových komplexů. Ty zprostředkovávají vazby mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a jejich okolním prostředím, extracelulární matrix. Tyto adhezivní komplexy se kromě zajištění vlastních fyzických interakcí často podílejí na přenosu signálů. Pro většinu buněk v těle je přichycení, vytvoření vazeb prostřednictvím adhezivních komplexů, nezbytnou podmínkou jejich přežití. Porušení těchto vazeb za normálních okolností vede k indukci apoptózy a odstranění nepřichycených buněk (procesem, který se nazývá anoikis). Tento mechanismus pomáhá udržovat vysokou uspořádanost organismu. Hlídá, zda jsou správné buňky na svých správných místech. Buňka, která není schopná vytvořit vazby se svým okolím, do tohoto okolí možná vůbec nepatří a také nebude dobře spolupracovat. Naopak by mohla svou přítomností narušit funkci dané tkáně. Jinými slovy, vytváření vazeb pomáhá buňkám zjistit, kam patří, kde jsou doma.

Prostředí, kterým invadující a metastazující buňka během své cesty putuje, je proměnlivé a buňka je nucena se mu přizpůsobovat. Tato adaptace spočívá mimo jiné právě ve změně spektra adhezivních komplexů, které nádorová buňka na svém povrchu vystavuje. V průběhu metastatické kaskády tak nádorové buňky nejdříve oslabují, ztrácejí vazbu s ostatními buňkami v primárním nádoru (1), později vytvářejí adhezivní molekuly, které jim umožní průchod extracelulární matrix a bazální membránou (2, 4), krevním nebo lymfatickým systémem (3) a nakonec vytvářejí vazby s ostatními nádorovými buňkami v místě sekundárního nádoru, metastázy (5). Každý krok metastatické kaskády tedy předpokládá do nějaké míry zrušení stávajících vazeb a vytvoření vazeb nových.

*Vytváření vazeb je to, co buňkám pomáhá nalézt to správné místo k jejich životu a z hlediska celku zajišťuje udržování uspořádanosti. Nejenom jednotlivým buňkám by se špatně dařilo v místech, kam nepatří, ale také pro celek by narůstání entropie a chaosu znamenalo snižování funkčnosti a celkově zhoršování stavu. Platí něco z těchto pravidel i pro člověka a uspořádání společnosti? Některé analogie určitě nalézt můžeme. Nenacházíme i my*

*svoje místo v životě prostřednictvím vazeb, vztahů? Dítě hned po svém narození je udržováno při životě okamžitým vytvářením vztahů ke „svým“ lidem. A nejsou to právě tyto vztahy, které mu pak po mnoho let pomáhají nalézat jeho místo v životě? A podobně jako adhezivní komplexy neplní pouze funkci vzájemného fyzického propojení buněk, ale zajišťují také přenosy signálů (např. signálů přežití, bez kterých by jinak buňka zahájila apoptózu), ani pro člověka „nalezení místa pro život“ neznámá pouze fyzickou lokalizaci a přežití, ale znamená nalezení takového místa, kde žítí má smysl a dává příležitost k růstu a vývoji, tedy k naplňování životních potřeb. A jistě to nejsou jen vztahy rodinné – k partnerovi, dětem, rodičům, dalším příbuzným, ale také třeba pocit sounáležitosti s pracovním týmem, firmou, národem a dalšími společenstvími. Opravdu si uvědomujeme hodnotu vztahů? Není metastatická kaskáda a ukázka toho, jak se vztahy (adhezí) nakládají nádorové buňky, varovným mementem?*

### **Genetická nestabilita**

K vývoji plně maligního nádoru je nezbytných mnoho změn, které vznikají postupně, obvykle v průběhu mnoha let. I proto jsou nádory typickou nemocí vysokého věku: pro nahromadění dostatečně velkého počtu mutací je zapotřebí relativně dlouhé doby. Pravděpodobnost „úspěšného“ vývoje nádoru zvyšuje kromě časového faktoru ještě další okolnost, kterou je genetická nestabilita nádorových buněk. V jedné z předchozích kapitol jsme uvedli, že rychlost, s jakou dochází ke vzniku mutací v jednom genu během jednoho buněčného dělení, je asi  $10^{-6}$ . To znamená, že i u zdravých, geneticky stabilních buněk, není mutační rychlost nulová. Míra genetické stability/nestability byla ustavena během fylogeneze právě na této hodnotě a má charakter pečlivě vyvážené rovnováhy. Příliš vysoká míra stability by znemožňovala vývoj a adaptaci, příliš vysoká míry nestability by vedla k příliš častým chybám a nepřesnostem. Má-li mnohobuněčný organizmus být funkce schopným, jednotně reagujícím, koordinovaným celkem, musí každá jeho buňka být v kontaktu s dostatečně přesným plánem na společně vytvářené dílo.

I když nebylo prokázáno, že by genetická nestabilita byla nezbytnou podmínkou kancerogeneze, je prokázanou vlastností většiny nádorů a nepřímo a významně se na jejich vzniku podílí. Způsobuje významné zvýšení mutační rychlosti, která potom zvyšuje pravděpodobnost akumulace všech mutací souvisejících s kancerogenezí. Genetická nestabilita je výsledkem mutací, které (1) snižují přesnost replikace genomu, a tak zvyšují frekvenci vzniku mutací, (2) snižují účinnost mechanismů opravujících DNA nebo (3) zvyšují výskyt chromozomových zlomů a přestaveb, což navozuje nestabilitu karyotypu. Jiným zdrojem navýšení genetické nestability může být (4) kritické zkrácení telomer. Obecně má omezenost replikačního potenciálu vyjádřená kritickým zkrácením telomer charakter ochranného opatření proti nádorovému zvratu, protože omezuje životnost buněk, a tím i jejich potenciál úspěšně završit kompletní proces kancerogeneze (viz kapitola 6). Kriticky zkrácená telomera vyvolává signály, které vedou k zastavení buněčného cyklu, případně k indukci apoptózy (viz kapitola 5). Pokud ale v buňce již došlo k poškození těchto signálních drah, může kritické zkrácení telomer zůstat bez adekvátní odpovědi. Místo toho buňka pokračuje v dělení a chromozomy zbavené dostatečné ochrany svých koncových struktur fúzí a zvyšuje se pravděpodobnost translokací a rekombinací. Tyto procesy přispívají k navýšení genetické nestability. A tak zatímco u relativně nepoškozených buněk představuje neaktivní telomeráza a zkracující se telomery účinnou ochrannou bariéru proti vývoji nádorů, v průběhu kancerogeneze - po vyřazení odpovídajících signálních drah - naopak k vývoji nádorů přispívají.

Genetická nestabilita vedle již zmíněného urychlení procesu kancerogeneze může navíc způsobit značnou heterogenitu buněčných klonů v rámci jediného nádoru. Nejzávažnějším důsledkem této heterogenity jsou komplikace pro terapii, protože heterogenní

buněčná populace nádoru neodpovídá na danou terapii uniformně. To znamená, že zvolená terapie může být účinná na některé nebo i na většinu buněčných populací v nádoru, ale ponechává bez účinku i třeba minoritní klon nádorových buněk, který je v důsledku terapie selektován, zvýhodněn a může se stát počátkem nové nádorové masy, která je agresivnější a odolnější vůči působení terapeutik.

Genetická nestabilita má ještě jeden závažný důsledek. Metastazující populace nádorových buněk se ve srovnání s buňkami primárního nádoru nejenom dále vyvíjí podle nároků prostředí, kterým se pohybuje, ale zároveň se již na počátku tohoto procesu výrazně uplatňuje selekce, která z heterogenní populace buněk vybírá tu, která v novém prostředí nejlépe uspěje. Důsledkem je opět komplikace při výběru účinné terapie, protože sekundární nádory se mohou svými vlastnostmi od primárních nádorů výrazně lišit.

*V těle máme velké množství typů buněk, které se liší svými tvary, velikostí, metabolismem a samozřejmě typem práce, který vykonávají. Je fascinující si uvědomit, že všechny tyto rozmanité buňky (nebo alespoň jejich většina) nesou v sobě stejnou genetickou informaci. Všechny buňky tak v sobě nesou stejný, jen minimálně pozměněný (jak to odpovídá evolucí ustavené míře genetické nestability) společný plán k vytvoření společného díla, funkce schopného zdravého mnohobuněčného organismu. Vzhledem k tomu, že v těle neexistuje centrální řídicí centrum, které by dohlíželo na správnou činnost a spolupráci každé buňky, a naopak se při společném budování a provozování společného díla spoléhá na odpovědnost individuálních buněk, je existence takového společného plánu a jeho dosažitelnost pro každou jednotlivou buňku naprosto nezbytnou podmínkou úspěchu. Je to doslova tak, že se při oplození vajíčka a vzniku zygoty (mechanismem miózy) rozhodne, jaké dílo se bude budovat, a vytvoří se jeho závazný plán. Každá nově vznikající buňka pak během mitózy obdrží jeho přesnou kopii, aby v jakékoliv vzdálenosti, prostorové i časové, od původní první buňky – zygoty mohla spolehlivě a kompatibilně přispět svým  $10^{-13}$  podílem k úspěchu celku. Bez existence společného plánu, při jeho příliš velké proměnlivosti nebo při jeho nedodržování, by narůstal chaos a nekompatibilita jednotlivých složek systému.*

*Na lidské úrovni má genetická stabilita možná svou analogii ve vytvoření **pravidel a ochotě jejich dodržování**. Nejsou třeba pravidla silničního provozu vlastně takovým společným plánem? Plánem, který nám umožňuje se bezpečně pohybovat v nebezpečném a složitém prostředí našich cest? Pravidla jsou jasně daná, nemění se často, jsou tedy dostatečně stabilní. Mají svou přiměřenou míru nestability, kdy je třeba do souboru stávajících pravidel včleněno některé nové, které zohledňuje nový vývoj. Mírnou nestabilitu mohou navozovat i mimořádné situace, kdy třeba v krajní nouzi upřednostníme spáchání drobného přestupku než abychom vážně ohrozili některého účastníka provozu nebo sebe. Ale aby společný plán opravdu fungoval, musí být dostatečně stabilní, tj. nesmí se proměňovat překotně a musí být dostatečně dodržován. Jenže každý potkáváme nedisciplinované řidiče, kteří pravidla nedodržují. Jsou zdánlivě šikovnější – odvážnější a rychlejší - než pomalí, rozvášní, disciplinovaní řidiči. Tato rádoby šikovnost vydrží ale jen tak dlouho, dokud celý systém udrží v chodu právě ti disciplinovaní. Jakmile chaos naroste přes určitou míru, celý systém se zhroutlí a bude zničen jak pro disciplinované (nenádorové?), tak pro nedisciplinované (nádorové?) řidiče. Příkladem dokonání zhroutení společného plánu by mohlo být třeba Somálsko. Zmizel společný plán na spravování země, život společného a funkce schopného organismu. Organizmus se rozpadl na jednotlivé frakce, rody, skupiny lidí. Pro ně už neexistuje společný plán a nefunguje jeho společné dodržování. To je už existence divergentních heterogenních klonů, z nichž každý bojuje o vlastní přežití, bez ohledu na nějaký vyšší společný zájem. A nestabilita je tak vysoká, že se zatím zdá, že každý pokus o terapii jen selektuje agresivnější a za daných podmínek životaschopnější klon.*

## Závěr

Pravidla vztahů mezi buňkami nelze mechanicky aplikovat na lidské vztahy a chování jedinců ve společnosti, ale lze je využít jako inspiraci či jako východisko pro naše úvahy o našem chování a jeho možných následcích. Váhu těmto úvahám dodává jednak skutečnost, že pravidla vzájemných vztahů mezi buňkami v mnohobuněčném organismu se v evoluci ustavovala po mnoho miliónů let a jsou tedy již dobře prověřená, a pak také to, že všeobecně známe, k jakým výsledkům porušení pravidel mezibuněčných vztahů vede. Naopak dohlédnout následky lidského chování a především jeho dopad na celá společenství, bývá často komplikované až nemožné.

## Literatura

- Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J (2003). *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Grada.
- Blasco M.A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nat.Chem.Biol.* 3: 640-649, 2007.
- Compagni A., Christofori G. (2000). Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br.J.Cancer* 83: 1-5.
- Corn P.G., El-Deiry W.S. (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *BioEssays* 24: 83-90.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hahn W.C., Weinberg R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews* 2: 331-341.
- McKinnell R.G., Parchment R.E., Perantoni A.O., Damjanov I., Pierce G.B. (2006). *The biological basis of cancer*. Cambridge University Press.
- Šmardová J., Šmarda J. (2005). Jak vznikají nádory? *Universitas* 38 (4): 29-37.
- Weinberg R.A. (2003). Jediná odrodilá buňka. *Jak vzniká rakovina*. Academia.
- Weinberg R.A. (2007). *The Biology of Cancer*. GS Garland Science.

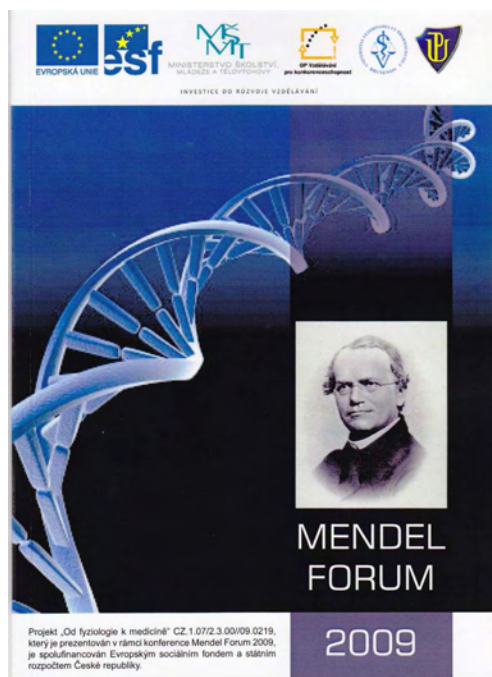


**Doc. RNDr. Jana Šmardová, CSc.** je vedoucí Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie Fakultní nemocnice v Brně a členkou Laboratoře buněčné diferenciaci Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU v Brně.



## Mendel Forum 2009

### Eva Matalová



Konference Mendel Forum jsou každoročně pořádány Mendelianem Moravského zemského muzea od roku 1992 a vytvářejí prostor pro setkání vědců, učitelů, studentů i široké veřejnosti. Hlavním cílem je seznámení účastníků s aktuálním vědeckým a kulturním odkazem J. G. Mendela, na který navazuje současný výzkum v genetice a molekulární biologii a následné aplikace v řadě oblastí od šlechtění přes diagnostiku až k biomedicíně. Letošní dvoudenní konference byla organizována Mendelianem MZM ve spolupráci s Ústavem fyziologie FVL VFU a Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i. V prvním dnu byla konference zaměřena na aktuální poznatky z oblasti genetiky a fyziologie. V dopolední sekci hostovali přednášející z Univerzity Palackého Olomouc, prof. RNDr. Stanislav Bureš, CSc. (Genetika v ptačí říši aneb o čem všem rozhodují samičky lejsků) a RNDr. Martin Fellner, Ph.D. (Z kukuřičného pole k molekulární fyziologii a genetice).

V této sekci byl dán prostor také popularizaci vědy s možností zapojení do vědomostních soutěží na téma: Fyziologie a medicína, Srdce, Mendel-Darwin. Otázky byly zveřejněny ve sborníku konference a vylosování výherci získali věcné ceny. Sekce zaměřená na aktuální poznatky byla uzavřena příspěvky na téma Patofyziologie nádorového růstu (prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.) a Chiméry v biomedicíně (RNDr. Lenka Dubská, Ph.D.). Konferenční odpoledne prvního dne bylo vyhrazeno exkurzi na Oddělení laboratorní medicíny Masarykova onkologického ústavu, kde měli účastníci možnost nahlédnout do zákulisí moderní diagnostiky, především v oblasti hematoonkologie.

Druhý konferenční den byl zahájen sekcí prezentující atraktivní projekty připravené pro studenty a pedagogy, a to s nabídkou přímého aktivního zapojení do jejich průběhu. První projekt „Srdce srdcí“ představený RNDr. Ivanou Fellnerovou, Ph.D. se řadí ke Guinnessovým rekordům jako „největší hodina biologie“ ([www.srdcesrdci.upol.cz](http://www.srdcesrdci.upol.cz)). Projekt od „Fyziologie k medicíně“ zaměřený na integraci vědy, výzkumu, vzdělávání a praxe je za podpory Evropských strukturálních fondů a státního rozpočtu ČR v letech 2009-2012 bezplatně otevřen pro cílovou skupinu z řad VŠ i SŠ studentů a pedagogů (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>). Představeny byly také další pedagogické a studentské projekty a konference v ČR i v zahraničí (AMAVET; SOČ; NSTA, USA). Druhá část dopolední sekce byla věnována J. G. Mendelovi a Ch. Darwinovi, jehož výročí (200 let od narození a 150 let od publikace jeho nejznámějšího díla) si v tomto roce připomínáme. Dopolední příspěvky byly doplněny odpolední diskuzí v rámci návštěvy výstavy Darwin v Anthroposu MZM, která letošní Mendel Forum uzavřela.

Konferenci Mendel Forum 2009 navštívilo více než 150 účastníků z řad VŠ i SŠ studentů, VŠ a SŠ pedagogů a odborné veřejnosti. Součástí bezplatné registrace byl konferenční sborník vydaný Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně za finanční podpory Evropských strukturálních fondů a státního rozpočtu ČR (projekt CZ.1.07/2.3.00/09.0219) pod ISBN 978-80-7305-080-1.

Konference Mendel Forum 2009 se konala v Dietrichsteinském paláci MZM v Brně (Zelný trh 8) ve dnech 20. a 21. října 2009. Program konference a sborník ve formátu pdf jsou k dispozici na stránkách <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>.



**Doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.** je vědeckou pracovnící Laboratoře embryologie živočichů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., docentkou fyziologie a farmakologie (Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno) a podílí se na činnosti Mendeliana Moravského zemského muzea v Brně.

## Oznámení



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### **Společný vzdělávací projekt BFÚ, OU a MU**

**Petr Pečinka<sup>1</sup>, Miroslav Fojta<sup>2</sup>, Ctirad Hofr<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Ostrava, <sup>2</sup> Oddělení biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno, <sup>3</sup> Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Mohutný rozvoj experimentálně-biologických disciplín v posledních letech vede k detailnějšímu porozumění procesů odehrávajících se na buněčné nebo molekulární úrovni. Nové poznatky jsou následně využívány v praxi, např. ve vývoji lepších a efektivnějších léků a diagnostických přístupů pro závažné infekční a civilizační choroby, intenzivnější využívání zemědělské půdy pro produkci potravin, využití upravených mikroorganismů v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu apod.

Na druhé straně vede bouřlivý rozvoj disciplín experimentální biologie k vytváření stále hlubšího příkopu mezi minoritní skupinou odborníků na jedné straně a majoritní laickou veřejností na straně druhé. Ne vždy je široké veřejnosti dostatečně srozumitelně sdělováno, na čem jednotlivé výzkumné týmy pracují, jaké je případné využití výsledků jejich výzkumu apod. Toto je velký dluh, který odborné kruhy vůči široké veřejnosti mají. Bohužel ani média tuto mezeru často nejsou schopna dostatečně kvalitně a srozumitelně vyplnit. Spíše se setkáváme s tím, že nový objev je ve sdělovacích prostředcích prezentován způsobem, který veřejnost mate, případně vyvolá neadekvátní očekávání. U odborníka naopak vyvolá v lepším případě smích a nevěřící kroucení hlavou, v horším pak nechť se sdělovacími prostředky napříště komunikovat.

Odstranění této mezery vyžaduje dlouhodobou systematickou a cílevědomou osvětovou aktivitu ze strany vysokých škol a dalších odborných pracovišť, především ústavů



Akademie věd ČR. Nutnost této osvěty a adekvátního předávání informací široké veřejnosti je dlouhodobě přehlížena, odborní pracovníci, až na výjimky, se těmito aktivitám příliš nevěnují, těžiště jejich práce kromě vysoce odborného výzkumu spočívá ve výuce a výchově svých nástupců. Na popularizaci vědy a jejich výsledků nezbývá čas a energie, nehledě k tomu, že systém financování vědy v ČR primárně zohledňuje publikaci výsledků v odborných časopisech, případně jejich aplikaci. Popularizace vědy se v tomto systému stává sice hlasitě vzývanou, nicméně z podstaty věci podružnou a čas ubírající záležitostí.

V současné době se rýsuje naděje, že tento dluh bude aspoň částečně splácen. Se vstupem České republiky do Evropské unie se naskytla příležitost čerpat finanční prostředky z Evropských strukturálních fondů na rozvoj vědy a také na zvyšování vzdělanosti široké veřejnosti. Biofyzikální ústav z Brna se ve spolupráci s Masarykovou univerzitou a s Ostravskou univerzitou v Ostravě rozhodl využít této příležitosti a společně navrhly projekt<sup>1</sup>, který úspěšně prošel oponentním řízením a od začátku roku 2010 umožní zájemcům získat základní přehled o moderních metodách používaných v experimentální biologii, biofyzice a dalších biologických disciplínách.

Součástí projektu jsou popularizační přednášky, které si kladou za cíl veřejnost srozumitelným způsobem seznámit s problémy a výzvami současné biofyziky, mikrobiologie nebo molekulární biologie a využitím výsledků v aplikovaném výzkumu, např. při šlechtění nových odrůd kulturních rostlin. Kromě teoretických přednášek budou na každém z partnerských pracovišť organizovány dvakrát ročně týdenní praktické kurzy, jejichž cílem je ukázat zájemcům základní metody a postupy používané v laboratořích při výzkumu nukleových kyselin, proteinů a dalších biologicky významných molekul, včetně jejich funkcí v živých buňkách. Součástí praktických kurzů jsou modelové úlohy, u kterých budou účastníci kurzu pod vedením lektorů navrhopvat řešení na základě znalostí, které získají v teoretické části kurzu. Snahou pracovišť je, aby absolventi kurzu získali všeobecný přehled nejen o metodách využívaných v experimentálně-biologických laboratořích včetně pochopení principu dané metody, ale také o vědeckých problémech, při jejichž řešení jsou tyto metody využívány. Z toho důvodu jsme při sestavování projektu neomezili kurzy pouze na ukázání moderních přístrojů, ve kterých daný proces probíhá automaticky, ale naopak počítáme s aktivním vyzkoušením metod postupně od jednodušších základních metod, jejichž zvládnutí výrazně usnadní pochopení současných nejmodernějších metod používaných v biologickém výzkumu. Náplní kurzů bude např. Amesův test genotoxicity a mutagenity, izolace DNA a proteinů, štěpení DNA restrikčními endonukleázami, základní provedení polymerázové řetězové reakce, přesné stanovení koncentrace DNA a proteinů pomocí různých analytických metod, fluorescenční značení molekul, lokalizace biomolekul za použití fluorescenční mikroskopie, kvantitativní analýza vazby proteinů na DNA apod. Účastníci kurzů budou mít příležitost si metody opravdu „osahat“ a pochopit, na jakém principu fungují. K zajištění praktického pojetí kurzu budou využívány stávající laboratorní a výukové prostory, které budou v rámci projektu dovybaveny pro pokrytí materiálních a instrumentálních potřeb praktických kurzů, tak aby mohli účastníci pracovat co nejvíc samostatně. Věříme, že takto pojatý kurz bude pro absolventy větším přínosem, než je pouze postavit před „černou skříňku“ představovanou posledním modelem přístroje z prospektů rozesílaných výrobcem a obchodními zástupci, do které se něco vloží a následně z ní automaticky vypadne výsledek. Velkým přínosem teoretických přednášek a praktických kurzů bude, jak aspoň doufáme, jejich přístupnost pro relativně širokou veřejnost. Kurzy nejsou určeny jen úzkým odborným kruhům, ale právě naopak, přihlásit se do nich může každý, koho daná problematika zajímá a chce se v ní lépe orientovat. Vhodnou cílovou skupinu spatřujeme např. ve středoškolsky

---

<sup>1</sup> projekt ESF OPVK reg.č. CZ.1.07/2.3.00/09.0046 s názvem Moderní biofyzikální metody: pokročilé praktické vzdělávání v experimentální biologii

vzdělaných pracovních provozních laboratořích, kteří rutinně provádějí některé vysoce specializované techniky a mají zájem se o nich dozvědět více. Nové poznatky a náměty k zamyšlení najdou i jinak odborně zaměřeni biologové, např. systematici nebo ekologové. Důležitou cílovou skupinu tvoří pedagogové vyučující biologii či chemii na středních školách, kteří prostřednictvím aktivit projektu mohou získat přístup k nejnovějším poznatkům současného vědeckého výzkumu, což se příznivě odrazí v jejich kvalitaci a v kvalitě výuky. Přínos kurzů s podobnou tematikou spatřujeme i v tom, že zvyšuje propustnost studentů mezi jednotlivými stupni studia. Jestliže student v bakalářském programu studoval např. chemii nebo fyziku a má zájem v navazujícím magisterském programu o některou z disciplín experimentální biologie, pak absolvování podobného kurzu pomůže překlenout mezery, které se v takovém případě nutně musí vyskytnout. Proto je naším záměrem pojmout výuku takovým způsobem, aby probírané metody a jejich souvislost s řešenými problémy pochopil a zvládl i „poučený laik“, např. středoškolský student se zájmem o biologii.

Projekt se rozeběhne od počátku roku 2010. Doufáme, že bude úspěšný nejen v hlavních cílech, které spočívají ve vzdělávání široké veřejnosti, ale že bude také stimulovat k hlubší a rozsáhlejší spolupráci mezi partnerskými pracovišti. Neformální spolupráce mezi institucemi samozřejmě díky osobním kontaktům probíhá, ale společný projekt poskytne příležitost dát této spolupráci oficiální ráz. Protože každé pracoviště zpracovává poněkud odlišnou tematiku, pracovníci zapojení v projektu budou mít možnost vzájemně se vzdělávat a sdělovat si nejnovější poznatky v těch oblastech experimentální biologie, které ostatní pracovníci nemají možnost podrobně sledovat. Toto přirozené a cílené zvyšování kvalifikace realizačního týmu se, jak doufáme, posléze pozitivně odrazí nejen ve zvýšené kvalitě kurzů, ale výuky obecně.



## **Projekt pro zkvalitnění výuky biologie na Přírodovědecké fakultě MU v Brně: MOSSEB**

**Renata Veselská, Jan Šmarda**

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Historie výuky experimentální biologie se na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity datuje již od vzniku fakulty v akademickém roce 1921/1922 a tradice této výuky pokračuje až do současnosti, kdy jsou studentům nabízeny tři obory bakalářského programu, dva obory magisterského a šest oborů doktorského studijního programu. Tuto výuku od roku 2006 zajišťuje Ústav experimentální biologie, který vznikl spojením šesti experimentálních pracovišť původní Sekce biologie.

Základ výuky v uvedených oborech tvoří povinné předměty, které jsou doplněny širokou nabídkou doporučeně volitelných a volitelných kurzů. Nabídka těchto kurzů však dosud nebyla dále strukturována a jednotlivé obory často nezávisle na sobě nabízely předměty, které spolu tematicky souvisely a mohly se vzájemně doplňovat, případně na sebe navazovat.

Pro studenty a studentky jednotlivých oborů je z hlediska jejich budoucího uplatnění velmi žádoucí, aby se cíleně profilovali jako specialisté pro určitou část experimentální

biologie, neboť ani v rámci studia zvoleného oboru nelze detailně obsáhnout celou jeho šíři. Naopak pro zvolenou profilaci jsou obvykle nezbytné interdisciplinární přesahy nejen obsahového, ale i metodického charakteru. Ústav experimentální biologie PřF MU v letošním roce získal finanční podporu z Evropského sociálního fondu (ESF) v rámci Operačního programu Vzdělávání pro konkurenceschopnost (OP VK) pro realizaci projektu s názvem „Modulární struktura studia experimentální biologie“ (projekt je prezentován pod akronymem MOSSEB). Hlavním cílem tohoto projektu je právě zavedení tematických modulů, které budou sdružovat kurzy podobného obsahového nebo metodického zaměření, čímž se studentům výrazně usnadní osobní odborná profilace v rámci zvoleného studijního oboru.

Kromě vytvoření a zavedení modulární struktury studia bude v rámci projektu MOSSEB finančně podpořena rozsáhlá modernizace výuky experimentální biologie, která bude zahrnovat inovaci 34 již existujících kurzů a dále zavedení 37 zcela nových kurzů, které doplní již existující nabídku vyučovaných předmětů tak, aby studenti a studentky mohli získat kvalitní specializované vzdělání ve zvolené profilaci nad rámec vlastního studijního oboru.

Dalším důležitým výstupem projektu MOSSEB bude nově vytvořený internetový výukový portál, jehož prostřednictvím budou studenti a studentky i široká veřejnost seznámeni s nabídkou kurzů v rámci modulární struktury výuky, s obsahovou náplní jednotlivých kurzů i jejich vzájemnými návaznostmi, s aktuálními informacemi k výuce, s odkazy na elektronické učební texty apod.

Vzhledem k mezioborovým přesahům výuky moderní experimentální biologie nelze projekt v podobném rozsahu uskutečnit bez účasti odborníků z dalších výzkumných a vzdělávacích institucí, s nimiž Ústav experimentální biologie PřF MU dlouhodobě a úspěšně spolupracuje. Partnery pro realizaci projektu MOSSEB proto jsou Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Masarykův onkologický ústav a Fakultní nemocnice Brno.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

## **Projekt integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe – od fyziologie k medicíně**

**Jaroslav Doubek<sup>1</sup>, Eva Matalová<sup>1</sup>, Ivana Fellnerová<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup> Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc

Fyziologie představuje prestižní vědecký obor, ve kterém jsou spolu s medicínou udělovány Nobelovy ceny. Jedná se o obor nesmírně dynamický, proto je rychlá orientace v aktuálních poznatcích, jejich efektivní využití a propojení se současnou praxí základem úspěchu při vědecko-výzkumné činnosti.

Projekt si tedy klade za cíl integraci vědy, vzdělávání a praxe a dále zkvalitnění soft-skills studentů, pedagogů a začínajících pracovníků vědy a výzkumu cestou zvyšování odbornosti a zpřístupnění vědecko-výzkumné činnosti a praktických aplikací. Projekt je realizován aktivním zapojením cílových skupin, a to především cestou specializovaných seminářů, exkurzí a formou odborných publikací. Projekt je určen pro začínající pracovníky vědy a výzkumu, VŠ studenty a SŠ učitele a studenty zapojené ve středoškolských odborných činnostech.

Partnerský tým tvoří vysokoškolští pedagogové, aktivně působící také na poli výzkumném a klinickém, s bohatými zkušenostmi z mezinárodních vědeckých pobytů.

### **CYKLUS 1: věda – výzkum – vzdělávání – mezinárodní uplatnění**

- 1) Aktuální vědecké poznatky na úrovni Nobelových cen (VĚDA)
- 2) Aktuální výzkum v oblasti fyziologie (VÝZKUM)
- 3) Prezentace vlastního výzkumu (VZDĚLÁVÁNÍ)
- 4) Mezinárodní možnosti (MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ)

### **CYKLUS 2: věda – výzkum – praxe**

- 1) Fyziologie – patofyziologie – medicína (DIAGNOSTIKA)
- 2) Fyziologie – patofyziologie – medicína (HUMÁNNÍ MEDICÍNA)
- 3) Fyziologie – patofyziologie – medicína (VETERINÁRNÍ MEDICÍNA)
- 4) Od fyziologie k medicíně (FINÁLNÍ KONFERENCE)



Více informací a aktuality na: <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

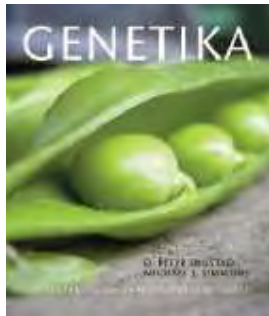
# Genetika česky

**Jiřina Relichová**

Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

## Nová vysokoškolská učebnice po 30 letech

Nakladatelství Masarykovy univerzity vydalo překlad osvědčené a moderně zpracované učebnice *Principles of Genetics* (5. aktualizované vydání, Wiley & Sons, 2009). Kolektiv překladatelů tvoří profesori brněnských univerzit a pracovišť Akademie věd ČR: Jiří Doškař, Jiří Fajkus, Petr Hořín, Aleš Knoll, Petr Kuglík, Jiřina Relichová (editorka českého vydání), Jan Šmarda, Jana Šmardová, Renata Veselská a Boris Vyskot.



**Autoři:** D. Peter Snustad a Michael J. Simmons

Rozsah 864 stran, pevná vazba, formát 24 x 28 cm

ISBN 978-80-210-4852-2

Bohatý obrazový doprovod

**Běžná cena 1 850 Kč**

**Výrazné slevy pro studenty a knihovny**

**Objednávky přijímá:**

**Nakladatelství Masarykovy univerzity**

Rybkova 19, 602 00 Brno-Kráv í hora, e-mail [namu@rect.muni.cz](mailto:namu@rect.muni.cz)

## Stručný obsah

**Kapitola 1** Vědní obor genetika

**Kapitola 2** Rozmnožování buněk a modelové organizmy v genetice

**Kapitola 3** Základní principy mendelovské dědičnosti

**Kapitola 4** Rozšíření mendelovské dědičnosti

**Kapitola 5** Chromozomové základy mendelovské dědičnosti

**Kapitola 6** Změny v počtu a ve struktuře chromozomů

**Kapitola 7** Vazba, crossing-over a chromozomové mapování u eukaryot

**Kapitola 8** Genetika bakterií a jejich virů

**Kapitola 9** DNA a molekulární struktura chromozomů

**Kapitola 10** Replikace DNA a chromozomů

**Kapitola 11** Transkripce a úpravy RNA

**Kapitola 12** Translace a genetický kód

**Kapitola 13** Mutace, reparace DNA a rekombinace

**Kapitola 14** Definice genu

**Kapitola 15** Metody molekulární genetiky

**Kapitola 16** Genomika

**Kapitola 17** Aplikace molekulární genetiky

**Kapitola 18** Transponovatelné genetické elementy

**Kapitola 19** Regulace genové exprese u prokaryot a jejich virů

**Kapitola 20** Regulace genové exprese u eukaryot

**Kapitola 21** Genetické řízení vývoje živočichů

**Kapitola 22** Genetická podstata rakoviny

**Kapitola 23** Dědičnost komplexních znaků

**Kapitola 24** Genetika populací

**Kapitola 25** Evoluční genetika

## Příloha

Gregor Johann Mendel: Pokusy s hybridy rostlin

Nový překlad Mendelovy objevené práce vydané v roce 1866.

## Mendel lectures

**Přednášky plánované na podzim 2009 a jaro 2010**  
**Místo konání: Augustiniánský klášetr Brno, Mendlovo náměstí**  
**<http://www.mendelmuseum.muni.cz/>**

23. listopadu 2009, 17.00 hod

**Prof. Jim E. Haber** (*Brandeis University, Waltham, USA*): Multiple mechanisms to repair a broken chromosome

15. dubna 2010, 17.00 hod

**Dr. Roland Kanaar** (*Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands*): How DNA recombination maintains genome integrity?

29. dubna 2010, 17.00 hod

**Prof. Azim Surani** (*Gurdon Institute, Cambridge, UK*): Germ cell specification in mice

13. května 2010, 17.00 hod

**Dr. Kai Simons** (*Max-Planck-Institute of Molecular and Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany*): Cell membrane organisation and lipid rafts

27. května 2010, 17.00 hod

**Prof. Ueli Schibler** (*University of Geneva, Switzerland*): Circadian gene expression in mammals: Hod does the brain talk to the body?

## Členské příspěvky 2009

Žádáme všechny členy GSGM, kteří dosud neuhradili členský příspěvek za rok 2009, aby tak učinili co nejdříve!

Členský příspěvek slouží především k uhrazení nákladů za tisk a rozeslání Informačních listů společnosti. Zůstává již několik let nezměněn a činí tedy i v roce 2009 základní částku 150 Kč na člena, pro studenty a důchodce je příspěvek snížen na 50 Kč.

Prosíme o úhradu příspěvku převodem na účet GSGM u Komerční banky:

č.19-9096530217/0100 s doplněním variabilního symbolu, tj. členského čísla (uveden na <http://www.gsgm.cz/clenove.html>)

Děkujeme.

*Členové výboru GSGM*

Toto číslo Informačních listů GSGM neprošlo jazykovou úpravou.



## *Real-time ready*

### *Ověřené sety primerů a sond pro studium genové exprese*

#### **RealTime ready Focus Panels pro Light Cycler 480**

**Nejčastěji studované kaskády v předplněných destičkách:** Referenční geny; buněčný cyklus; apoptosa; GPCR; jaderné receptory; ABC transportery.

#### **RealTime ready Custom Panels pro Light Cycler 480**

**Otestujeme různé kombinace primerů a sond** pro vámi vybrané geny a poté je dodáme v destičce pro LC480 uspořádané podle vašeho vlastního návrhu. Pomocí námi vytvořeného „makra“ pak velmi snadno spustíte běh a automaticky provedete analýzu.

#### **RealTime ready Custom Assays**

Otestované sety primerů a sond dodávané v jednotlivých vialkách – vhodné pro všechny real-time PCR přístroje.

**[www.realtimeready.roche.com](http://www.realtimeready.roche.com)**



Roche s.r.o.,  
Diagnostická divize,  
Karlovo náměstí 17,  
120 00 Praha 2,  
tel.: +420 220 382  
565 (564), fax: +420  
220 382 595, email:  
czech.appliedscien  
ce@roche.com



● Ultra lehká se snadným ovládáním

● 1 kanálové, 8mi kanálové a 12ti kanálové pipety

● Dokonalá ergonomie: Eppendorf PhysioCare Concept\*

reddot design award winner 2009

Novinka!

eppendorf® je registrovaná ochranná známka. Všechna práva vyhrazena, včetně grafiky a obrazů.

## Bylo těžké ji zdokonalit, ale zvládli jsme to!

### Eppendorf Research® plus

Eppendorf nastavuje nové standardy v pipetování. Ultra lehká pipeta Eppendorf Research plus splňuje nejvyšší požadavky spojené s přesností, správností, vynikající ergonomií a flexibilitou.

● **Ergonomie**

Pocitíte rozdíl v hmotnosti, vynaložené síle při pipetování, pohodlnosti a přesnosti nasazování špiček.

● **Flexibilita**

Pro Vaše potřeby si sami jednoduše nakalibrujte pipetu Research plus podle hustoty používané kapaliny, auto-kalibrujte celou pipetu nebo jen její část. Vyberte si mezi jednorávkovou a vícekanálovou pipetou či pipetou s fixním objemem z rozšířené nabídky různých velikostí.

● **Odolnost**

Pipeta byla důkladně testována a splňuje nejvyšší požadavky na odolnost vůči chemickému, tepelnému a mechanickému namáhání.

Více informací získáte na [www.eppendorf.co.uk/research-plus](http://www.eppendorf.co.uk/research-plus)

**eppendorf**  
— Czech & Slovakia —

Navštivte nás na: [www.eppendorf.cz](http://www.eppendorf.cz) · Napište nám na: [eppendorf@eppendorf.cz](mailto:eppendorf@eppendorf.cz)  
Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o. · Kolovratská 1476 · 251 01 Říčany u Prahy · Tel/Fax: +420 323 605 454