

5. ročník (2020/2021)



1. SADA

Autorská řešení

MUNI | RECETOX
SCI

MUNI Ústav
SCI experimentální
biologie

Obsah

1. Zničehonic něco (Daniel Pluskal)	3
2. Barevná úloha (Vít Procházka)	14
3. Mustausaf Czechoslovak (Jan Macek)	20
4. Červená královna a pohlavní výběr (František Váňa, Oldřich Tomášek)	28
5. English bonus: OK, but coffee first! (Hana Seličová)	39

Daniel Pluskal (e-mail: pluskal.daniel@gmail.com)

1. Zničehonic něco

20 bodů

Proč těsto kyne? Jak se z moštu stane víno a proč může zoctovatět, když se nechá na vzduchu? Jak to, že když namočíme a zahřejeme ječná zrna, začnou sládnout? A jak je možné, že mléko stářím houstne, tuhne a stává se z něj jogurt? Od dávných věků si lidé všímali všemožných spontánních procesů, které si nedovedli racionálně vysvětlit. Od těchto dob již protéklo mnoho vody, nicméně chléb, víno, ocet, pivo i jogurt dodnes rádi a hojně používáme. Co se ale změnilo, je naše chápání procesů, které naši předkové brali jako dar shůry. Nyní již víme, že za vším stojí mikroorganismy společně se svými nejmocnějšími nástroji: enzymy. Výzkum enzymů, ale i proteinů obecně byl v minulosti ovšem velmi složitý. Chcete zkoumat nějaký enzym? Nezbude vám než získat dostatečný počet organismů, ve kterých se enzym vyskytuje, náročně zpracovat jejich části, ve kterých se produkuje nebo shromažďuje, obtížně protein vyizolovat za použití řady purifikačních technik a možná, jenom možná získáte enzym v dostatečném množství a kvalitě, aby jej bylo možné zkoumat. Takto fungovala enzymologie téměř dvě stovky let, od přelomu 18. a 19. století až do roku 1972, kdy byla připravena první rekombinantní DNA. A jen o deset let později byl pomocí rekombinantní technologie připraven první umělý protein nevyizolovaný z druhu svého přirozeného výskytu – lidský inzulin. Pomocí rekombinantní technologie bylo najednou možné produkovat v podstatě jakýkoliv protein v libovolném množství přímo v laboratoři, což byl pro vědu obrovský skok kupředu.

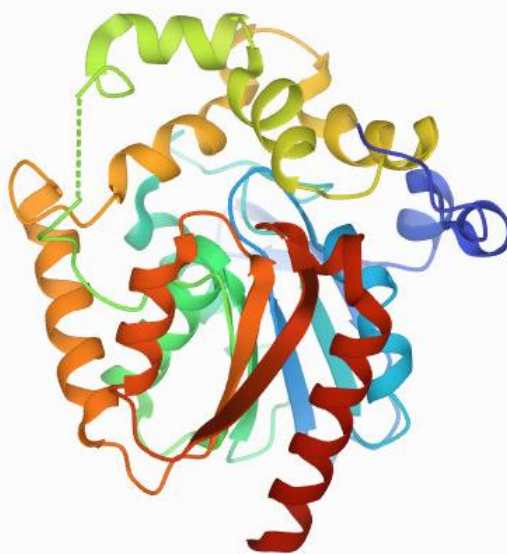
1. Co znamená v molekulárně biologickém smyslu pojem „rekombinace“? Jak se liší rekombinantní protein od běžných proteinů? [0,5 b]

Rekombinace je proces, při kterém dochází ke štěpení a spojení molekul DNA způsobem, jakým dříve spojeny nebyly. Tím dochází ke změnám genetické informace v ní uložené, což může mít za následek vnášení, modifikaci nebo eliminaci různých znaků a vlastností organismů.

Rekombinantní protein je takový protein, který vznikl dle informace z rekombinantní DNA.

Rekombinantní technologie spočívá v identifikaci genu z původního organismu, který kóduje protein našeho zájmu, a vložení tohoto genu do organismu jiného. Tento hostitelský organismus je zvolen tak, aby byla práce s ním co nejjednodušší. Hostitelský organismus kultivujeme, tedy necháme pomnožit, dokud jej není dostatečné množství, a potom v něm vhodným způsobem spustíme expresi, tedy výrobu našeho proteinu. Jakmile máme pocit, že naše malé továrničky už navyráběly našeho proteinu dostatek, narostlou biomasu sklídíme a zamrazíme při velmi nízkých teplotách. Výsledkem jsou jakési malé a snadno zpracovatelné konzervy, většinou s velmi vysokým obsahem rekombinantního proteinu našeho zájmu. Jak je z tohoto shrnutí jasné, produkce rekombinantních enzymů je vysoce komplexní soubor procesů s řadou variací, my si tedy představíme variantu úplně nejjednodušší, ale zato zdaleka nejčastěji využívanou.

Prvním krokem produkce rekombinantních proteinů je samozřejmě získání genu, ve kterém je zakódován náš protein. Už v této počáteční fázi se objevuje první obrovská síla rekombinantní technologie. Pokud totiž víme, jakou má náš protein nebo jeho gen sekvenci, nemusíme se vůbec zdržovat se sháněním původního organismu a izolací genu z něj. Naopak na začátku našeho procesu gen vůbec nemusíme fyzicky mít, což je zdaleka nejčastější případ, co může nastat. Gen je totiž možné na základě jeho sekvence připravit prostřednictvím metody syntézy umělých genů. Tato metoda je nicméně velice specializovaná a obtížná, a proto ji většinou neprovádějí přímo výzkumné laboratoře, ale specializované firmy. Takto můžeme připravit jakýkoliv protein, jehož sekvence je známá. O tom, že takových proteinů není vůbec málo, vás přesvědčí například krátká návštěva internetového archivu PDB a o tom, že získání jejich sekvence je velmi jednoduché, vás přesvědčí následující úkol. Pokud ale nevíme, jak náš protein nebo jeho gen vypadá, je rekombinantní technologie stále velmi mocným spojencem: ve spojení s vhodnou screeningovou technologií je schopná relativně snadno a rychle takový gen v genomu původního organismu identifikovat.



Enzym s kódovým označením 2PSH.

2. Navštivte webové stránky rcsb.org a v databázi PDB naleznete položku s kódem 2PSH. Jako odpověď na otázku uveďte, o jaký enzym se jedná (zkratka nebo celý název), z jakého organismu pochází a vložte jeho úplnou sekvenci (319 aminokyselin, tedy 319 písmen). [2 b]

Enzym, který se skrývá pod kódem 2PSH je enzym RLuc (Renilla-luciferin 2-monooxygenáza) a pochází z organismu *Renilla reniformis*. Pro zajímavost, enzym má ve svém organismu, mořském koloniálním žahavci, obrannou roli, kdy při jeho reakci vzniká jasné zelené světlo.

Sekvence RLuc:

```
MASKVYDPEQRKRMITGPQWWARCAQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIFLHG NATSS
YLWRHVVPPIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLTAWFELLNLPKKIIF
VGHDWGAALAFHYAYEHQDRIKAIVHMESVVDVIESWDEWPDIEEDIALIKSEEGERK
MVLNNFFVETVLP SKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKP
DVVQIVRNYNAYLRASDDL PKLFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTAFVKVKGLHFLQED
APDEMGKYIKSFVERVLKNEQVDH HHHHHH
```

Jakmile víme, jaký protein potřebujeme, přichází čas pro zvolení správného náhradního rodiče, tedy organismu, pomocí kterého protein vytvoříme. Správný hostitelský organismus musí být dostatečně komplexní, aby pokryl veškeré procesy nutné při přípravě kterého konkrétního enzymu, ale stále co nejjednodušší, aby byla práce s ním co nejpohodlnější.

Věda tedy nepoužívá leckteré organismy, ale takové, který jsou pečlivě vybrané, dobře prostudované a snadno geneticky modifikovatelné se zvážením všech jejich výhod a nedostatků.

3. Nejvyužívanější typy organismů využívané pro produkci rekombinantních proteinů jsou bakterie, kvasinky, hmyz infikovaný bakulovirem anebo savčí dělivé buňky. Který z těchto čtyř hostitelů byste zvolili, pokud byste chtěli vyprodukovat: [3 b]

a) větší protein (cca 70 kDa), který obsahuje disulfidické můstky a vyžaduje posttranslační modifikace a nevyžaduje glykosylaci, přičemž vám jde o co nejvyšší výtěžek, co nejrychlejší provedení a co nejnižší cenu?

Pro větší a strukturně náročnější enzymy (disulfidické můstky, posttranslační úpravy) je možné volit kvasinky, hmyz nebo savčí buňky. Produkce pomocí hmyzu i savčích buněk je ale pomalá, nákladná a zbytečně složitá. Správná odpověď je tedy využití kvasinek.

b) malý (cca 30 kDa), jednoduchý protein bez obsahu disulfidických můstků, přičemž vám jde o co nejvyšší výtěžek, co nejrychlejší provedení a co nejnižší cenu?

Pokud potřebujeme malý nenáročný protein bez strukturních složitostí co nejrychleji, v dobrém výtěžku a levně, není důvod volit složitějšího než bakteriálního hostitele.

c) větší (cca 100 kDa) a složitý protein vyžadující posttranslační úpravy a chaperony, přičemž nejste omezeni časem a jde o co nejvyšší výtěžek?

Tento protein by již byl z hlediska produkce oříšek. Vyžaduje chaperony, čímž se nabízí možnost využít savčí nebo hmyzí buňky. Oba tyto procesy jsou pomalé, nicméně za použití hmyzích buněk dosáhneme daleko vyššího výtěžku než za použití buněk savčích, produkce v hmyzích buňkách je také značně levnější.

Jakmile máme vybraného správného hostitele, je načase mu nějakým způsobem předat náš gen. To se provádí pomocí takzvaných vektorů. Vektor z biologického hlediska nemá „směr a velikost“, jak si můžete pamatovat z hodin matematiky; jedná se o jakýkoliv nosič našeho genu, který umožňuje gen vpravit do hostitelského organismu, a to takovým způsobem, že jej bude organismus schopen správně číst a používat. Správný vektor musí hostitel umět také autonomně replikovat a předávat dalším generacím, zároveň by však měl být nepřenositelný horizontálně, aby se nemohl nekontrolovatelně šířit do buněk, ve kterých ho nechceme. Takových možností je obrovské množství: jen pro bakterie můžeme volit jako vektor plasmidy, bakteriofágy, kosmidy nebo i celé umělé bakteriální chromozomy a řadu dalších nukleovou kyselinu nosných elementů. Ještě obsáhlejší knihovnu možností můžeme použít při modifikaci kvasinek, hmyzích nebo savčích buněk. My se ale nyní spokojíme s bakteriemi jako hostitelskými organismy a vektory pro ně zdaleka nejvíce využívanými – plasmidy.

Plasmidy jsou kruhové molekuly DNA, které se v bakteriích přirozeně vyskytují. Obsahují doplňkovou genetickou informaci – taková informace není nutná k přežití, nicméně může šance na přežití značně vylepšit například poskytnutím informace nutné pro resistenci k určitému antibiotiku. A právě tohoto je možné dobře využít. Vezmeme plasmid, který by bakterii obvykle poskytl resistenci k určitému antibiotiku, například ampicilinu, a přidáme do něj gen našeho proteinu. Takové modifikace DNA nám umožňují příslovečné „genetické nůžky“ – enzymy zvané restriční endonukleázy. Tyto enzymy jsou schopné v sekvenci nukleové kyseliny hledat určité konkrétní sekvence a na jejich základě řetězec definovaně přestříhnout. Protože víme, jakým způsobem byla plasmidová DNA přestřižena, můžeme náš gen navrhnout přesně tak, aby do přestřiženého místa pasoval jako dílek do puzzle. Pak nám zbývá už jenom přidat trochu DNA ligázy, enzymu, který přestřižené řetězce znovu spojí, a náš fúzní vektor je na světě.

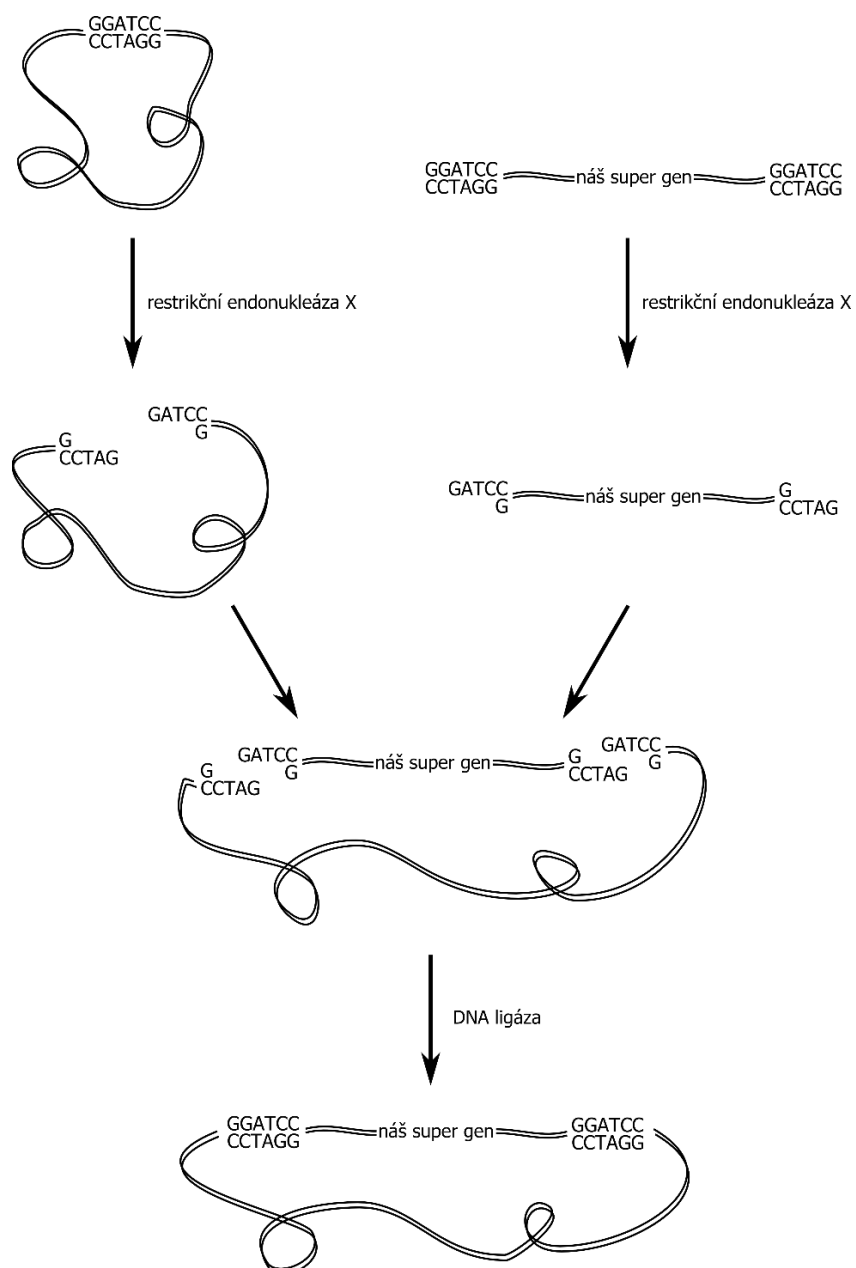


Schéma procesu vkládání genu do plasmidu.

4. Prostudujte schéma vkládání cílového genu do vektorového plasmidu a rozhodněte, která konkrétní restriční endonukleáza (např. NdeI) byla pro proces použita. [1 b]

V procesu byla využita restriční endonukleáza BamHI. Z nákresu víme, že enzym DNA štípe dle profilu G|GATCC, přičemž jiná běžně používaná restriční endonukleáza takový profil nemá. Uznána bude také modifikovaná varianta BamHI-HF a jakákoliv jiná restriční endonukleáza, která by případně měla stejný restriční profil.

5. Jaký je rozdíl mezi transkripčním a translačním fúzním vektorem? [1 b]

Translační fúzní vektory obsahují jak signály pro iniciaci transkripce, tak i translace – tedy transkripční promotor, místo pro vazbu ribozomu a iniciační kodon. Do vektoru tedy vkládáme pouze cílovou genetickou informaci, která však musí respektovat čtecí rámec vektoru.

Transkripční fúzní vektory obsahují pouze signály pro iniciaci transkripce; místo pro vazbu ribozomu a iniciační kodon musí být součástí vkládaného genu.

Jakmile je vektor připraven, musíme jej předat našim bakteriím. Tomuto procesu se říká transformace buněk a lze ho provádět hned několika způsoby, které využívají jevu, že bakterie v krizových situacích umožňují vstup cizorodým látkám do cytoplazmy: zkrátka tonoucí se stébla chytá, co kdyby jim některá z těch látek pomohla krizi přežít? Nejpoužívanější z takových metod je metoda teplotního šoku. K malému množství suspenze buněk, které chceme transformovat, přidáme trošku vektoru a směs necháme vychladit na teplotu pod 4 °C. Buněčnou suspenzi poté skokově krátce zahřejeme na teplotu 42 °C; tím ve stěnách buněk vytvoří mikroskopické trhlinky vlivem různých fyzikálních jevů, zejména teplotní roztažnosti vody v buňce. Mikrotrhlinkami může náš vektor vniknout do cytoplazmy, nicméně takto poškozené buňky jsou nyní velmi citlivé a snadno umírají. Buňky proto opět zchladíme a přidáme regenerační medium – roztok různých pro bakterie výživných látek – aby se buňky mohly vzpamatovat. Transformovanou a regenerovanou buněčnou suspenzi rozetřeme na pevném, například agarovém živném mediu na Petriho miskách. Agarové medium obsahuje za účelem selekce buněk antibiotikum, vůči kterému jsou nyní transformované buňky odolné – jakákoliv bakterie, která by vektor nepřijala, v prostředí antibiotika zkrátka nepřežije, a tak máme prakticky jistotu, že všechny kolonie, které na agaru narostou, vektor obsahují.

6. Aby bylo bakterie možné transformovat metodou teplotního šoku, musí být tzv. chemokompetentní, čehož je dosahováno přidávkem vysokých koncentrací chloridu vápenatého. Jakým způsobem chlorid vápenatý pomáhá při transformaci bakteriálních buněk? [1 b]

DNA je molekula přirozeně záporně nabitá díky fosfátovým skupinám ve své páteři. Záporně nabitá je také cytoplazmatická membrána bakterií, tentokrát díky fosfátovým skupinám ve fosfolipidech ji tvořících. Záporné náboje se odpuzují, proto kdyby byla provedena transformace teplotním šokem u nekompetentních

bakterií, průchod DNA mikrotrhlinkami by byl z důvodu přítomnosti odpudivých sil značně nepravděpodobný. Chlorid vápenatý v roztoku disociuje na anionty chloridové (ty nás příliš nezajímají, protože jsou od buněk odpuzovány) a kationty vápenaté. Vápenaté kationty jsou elektrostatickými silami přitahovány jak k cytoplazmatické membráně, tak k volné DNA, našemu plasmidu. Při počáteční inkubaci buněk s vektorem na ledu se tedy vektor „přilepí“ na stěny buněk. Když poté ve stěnách vlivem teplotního šoku vzniknou mikrotrhlinky, průnik plasmidu do cytoplazmy je daleko pravděpodobnější, což činí proces transformace výrazně efektivnějším.

7. Jaký je rozdíl mezi pojmy transformace, transfekce a transdukce? [0,5 b]

V principu se jedná o to stejné – přijetí cizorodé DNA z prostředí buňkou. O transformaci hovoříme v případě, že DNA přijímá prokaryotní organismus, třeba bakterie, o transfekci zase v případě eukaryotního organismu, například kvasinky. Transdukce se používá jak pro eukaryotní, tak prokaryotní buňky, pokud je genetická informace do buňky vpravena prostřednictvím viru jako vektoru.

8. Pro vkládání vektoru do obtížnějších, například rostlinných buněk se někdy využívá metoda tzv. genové pistole. V čem tato metoda spočívá? Jedná se o metodu transformace, transfekce nebo transdukce? [1 b]



Metoda genové pistole je jedna z kurióznějších metod transfekce zejména rostlinných buněk, je však využitelná pro buňky prakticky jakékoliv. DNA, RNA nebo i proteiny jsou naneseny na mikročástice těžkého kovu do buněčné kultury doslova nastřeleny pomocí speciální pistole. První prototypy těchto přístrojů byly přímo modifikované plynové pistole nebo nastřelovačky hřebíků s náložemi založenými na střelném prachu vystřelující polymerní projektily poprášené wolframovými projektily s genetickou informací na povrchu a takový projektil byl napřímo vystřelen do vzorku buněk nebo tkáně. Projektil proletěl skrze vzorek, přičemž okolo sebe vysokou rychlostí rozprašoval prach s genetickou informací. Střed vzorku, kudy projektil proletěl, byl sice zcela zničen, nicméně do některých buněk se odletující mikroprojektily dostaly tou správnou rychlostí

a okolo průstřelu vznikl jakýsi donut efektivně transformovaných buněk. Nutno dodat, že od těchto prototypů věda značně pokročila. Wolfram byl z důvodu své cytotoxicity nahrazen zlatem, namísto jednoho velkého projektilu je nyní vystřelováno více drobných projektilů akcelerovaných tlakem helia, ty po cestě na první síťce nabírají zlaté mikročástice s genetickým materiálem a zastaví se o druhou, jemnější síťku; zlaté mikročástice však projdou druhou síťkou a jsou nastřeleny do buněk. Proces se tímto zefektivnil a byla značně omezena destrukce vzorku. Kam však zmizela všechna legrace?

Transformace buněk není příliš efektivní proces. Ne každá buňka plasmid přijme, nicméně ty, které jej nepřijmou anebo by se do média dostaly náhodnou kontaminací, vyselektujeme zmíněným použitím antibiotika v reakčním médiu. Samotná příprava vektoru ale také není příliš efektivní proces. Část molekul plasmidu je sice upravená vložením našeho genu tak, jak chceme, část z nich ale náš gen nepřijme a po aplikaci DNA ligázy se molekuly spojí přesně tak, jak vypadaly na začátku před štěpením. Obě tyto varianty plasmidu (plasmid bez našeho genu a plasmid s naším genem) jsou ale bakterie schopny přijmout a obě tyto varianty zároveň bakteriím poskytnou odolnost vůči použitému antibiotiku.

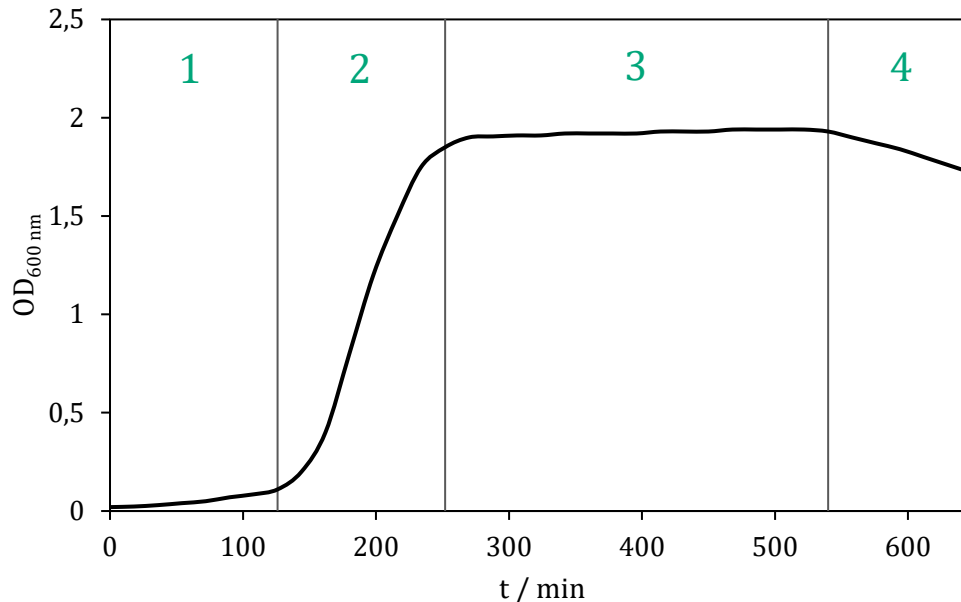
9. Pro řešení tohoto problému se často využívá metoda tzv. modrobílého screeningu. V čem tato metoda spočívá? Jak na agaru vypadají kolonie bakterií, které přijaly vektor bez vloženého genu a jak vypadají kolonie, které přijaly námi modifikovaný vektor? [3 b]

β -galaktosidáza je enzym schopný rozkládat určité sacharidy, β -galaktosidy, na monosacharidy. Aby však správně fungoval, musí dojít ke spojení čtyř těchto enzymů do komplexu, který je teprve potom schopen nějaké katalýzy. Pro modrobílý screening se využívají geneticky upravené bakterie, které umějí z β -galaktosidázy syntetizovat jenom část, takzvaný ω -peptid, který sám o sobě není schopen β -galaktosidy rozkládat, protože mu chybí druhá část – takzvaný α -peptid, který je nutný ke spojení jednotlivých enzymů do zmiňovaného aktivního komplexu. Ke transformaci těchto bakterií se využije speciální typ plasmidu, který nese gen právě pro buňce chybějící α -peptid. Tento gen je ale strategicky modifikován restričním místem. Pokud tedy do vektoru vložíme náš gen, dojde k přerušení a tím deaktivaci genu pro α -peptid. K samotnému provedení screeningu je ale potřeba ještě jedna biochemická klička – přídavek chromogenního substrátu X-gal do živného média. X-gal je analogem laktózy, jehož štěpením β -galaktosidázou vzniká mimo jiné vždy jedna molekula 5,5-dibrom-4,4-dichlorindiga. Tyto molekuly spontánně dimerizují a získávají intenzivní modrou barvu. Sečteno podtrženo: bakterie které plasmid vůbec nepřijaly, v prostředí antibiotika nepřežijí. Bakterie, které přijaly plasmid bez námi vloženého genu produkují α -peptidy, které se spojují s ω -peptidy produkovanými buňkou, tvoří funkční β -galaktosidázu, dochází k rozkladu X-gal a kolonie na agaru se tedy jeví výrazně modré. A nakonec bakterie, které přijaly náš gen, sice v prostředí antibiotika přežijí, nicméně nemohou produkovat α -peptid. Přeměna X-gal se v nich tedy nekoná a kolonie na agaru zůstávají bílé.

Bakterie máme připravené. Všechny spolehlivě obsahují vektor, který je upraven vložením našeho genu. Bakterie ale náš protein stále neprodukují. Ptáte se proč? Chyba nikde nenastala, naopak, vše funguje tak, jak má. Správná kombinace hostitele a vektoru totiž umožňuje kontrolu nad tím, kdy se protein zájmu v buňkách začne vyrábět, a bakterie proto zatím čekají na náš signál. Jejich čas ale ještě nenadešel – zatím máme buněk pro produkci moc málo. Na agarové plotničky si tedy vybereme nějakou pěknou kolonii a hezky sterilně touto kolonií zaočkujeme namísto pevného média medium tekuté, zpravidla jenom trošku, třeba 10 mililitrů. Takové médium potom udržujeme provzdušňované, například třepáním na laboratorních třepačkách, a teplé, kultivace probíhají často při 37 °C. A najednou se bakterie mají. Spoustu živin, spoustu prostoru, spoustu kyslíku, krásně teplíčko, to se jim líbí, a tak se množí a množí. Když máme buněčnou kulturu dostatečně narostlou, naším tekutým médiem můžeme zaočkovat více média, třeba už i litr. A buňky rostou a rostou a dělí se a dělí se. Nyní už ale musíme být na pozoru a pečlivě monitorujeme optickou hustotu naší kultury. Jakmile totiž nastane správný čas, zchladíme kulturu na 20 °C, to abychom co nejvíce zpomalili buněčné dělení a zabránili přemnožení, a buňkám dáme signál – můžeš exprimovat náš protein. Buňky, které jsou nyní v rozpuku, se nemohou množit, živin na přežití mají více než dost, a tak exprimují náš protein v daleko, daleko vyšší míře, než by jej exprimovaly v přirozených podmínkách, přestože jej nepotřebují. Prostě protože můžou. Naše mikrotovárničky pracují a pracují. V tomto stavu kulturu udržujeme zpravidla kolem 20 hodin. Opět si ale musíme dát pozor, tentokrát aby bakterie nevyprodukovaly proteinu příliš. Pokud taková situace nastane, buňky začnou protein ukládat jako odpad nebo zásoby do inkluzních tělísek, ze kterých se protein získává zpět jen se značnými ztrátami.

10. Níže na obrázku vidíte růstovou křivku bakteriální kultury jako závislost optické hustoty kultury na čase kultivace, pokud by růst NEBYL zpomalen ochlazením kultury na 20 °C. Pojmenujte fáze růstu buněčné kultury označené čísly 1-4 a stručně vysvětlete, co se během jednotlivých fází děje. Kdy během růstu kultury by bylo vhodně růst zastavit a indukovat expresi rekombinantního proteinu? Stručně zdůvodněte svoji odpověď. [3 b]

Růstová křivka bakteriální kultury



Fáze 1 = lag fáze. Nedochozí k velkému množení buněk, bakterie se teprve „rozkoukávají“ a zvykají si v novém prostředí, na dělení se připravují.

Fáze 2 = log fáze, fáze exponenciálního růstu, fáze logaritmického růstu, fáze exponenciální nebo fáze logaritmická. Bakterie se intenzivně množí nejčastěji dle logistické křivky; ke konci fáze růst zpomaluje z důvodu postupného vyčerpávání prostoru, kyslíku, živin, dochází zkrátka k nějaké limitaci.

Fáze 3 = stacionární fáze. Buňky se buďto nedělí, nebo se dělí přibližně stejně rychle, jak odumírají. Bakterie přežívají, postupně vyčerpávají živiny z prostředí.

Fáze 4 = fáze vymírání, fáze poklesu, lytická fáze. Buňkám dochází živiny a postupně vymírají.

Nejvhodnější fází pro zastavení růstu a indukci exprese je něco před polovinou log fáze, v grafu výše tedy kolem 180. minuty. Růst je zastaven, dokud buňky mají ještě dostatek prostoru i živin jak pro přežití, tak pro produkci proteinu našeho zájmu, nedochází k přílišnému soutěžení o zdroje a protein může vznikat ve vysoké kvalitě. Pokud bychom růst zastavili a expresi indukovali příliš brzo, buňky by sice nemusely o zdroje soutěžit, bylo by jich však příliš málo a výtěžek proteinu by byl špatný. Pokud bychom tak učinili příliš pozdě, třeba až ve stacionární fázi, buňky už musí soutěžit o zdroje, kterých mohou mít nedostatek, namísto syntézy našeho proteinu se musí soustředit i na své vlastní přežití. Cílový protein jim zavazí a vyčerpává, proto jej mohou poškozovat a opětovně rozkládat za účelem zisku zdrojů nebo ukládat do inkluzních tělísek, ze kterých se protein získat sice dá, nicméně se značnými ztrátami a v nevelké kvalitě.

11. Bakterií zdaleka nejčastěji využívanou pro produkci rekombinantních proteinů je velice známá *Escherichia coli*, přesněji její geneticky modifikovaný kmen DE3 v kombinaci s plazmidem typu pET jako vektorem. Při této kombinaci hostitele a vektoru je možné indukovat expresi rekombinantního proteinu z vektoru pouhým přidáním látky označované zkratkou IPTG. Jaká látka se pod touto zkratkou ukrývá? Na jakém principu funguje spouštění exprese pomocí IPTG? Proč se pro spouštění exprese nevyužívá laktóza, přestože to řídicí mechanismus teoreticky umožňuje? [4 b]

Pod zkratkou IPTG se skrývá isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid. Spíše než název látky je ale důležité, že se jedná o látku imitující laktózu – může tedy vstupovat do aktivních míst enzymů laktózu zpracovávajících, nicméně z důvodu svých odlišností nemůže být jako laktóza přeměněn a aktivní místa zmíněných enzymů blokuje.

Mechanismus řízené indukce exprese proteinů pomocí IPTG opět spoléhá na genetickou modifikaci jak buněk hostitele (*E. coli* s modifikací DE3), tak plasmidu (typ pET, ale i jiné typy) použitého jako vektoru. Modifikovaný plasmid s námi vloženým genem obsahuje promotor (místo, odkud začíná transkripce), který nerozpoznávají běžné RNA polymerázy vyskytující se v *E. coli*, ale pouze speciální T7-RNA polymeráza. Tento gen je ale

„zamčen“ pomocí vazného místa pro protein LacI a stejným zámekem je opatřen také náš gen vložený ve vektoru. Protein LacI se v buňce *E. coli* vyskytuje přirozeně a jeho úkol je vázat se na speciální místo v DNA, čímž blokuje syntézu enzymů nutných pro využití laktózy jako zdroje energie. Zkrátka pokud buňka nemá laktózu, nemusí plýtvat energií pro vytváření nástrojů pro její zpracování, my jsme si ale stejný zámek strategicky umístili tam, kde se nám to hodí. Tímto s genetickými úpravami končíme a můžeme přejít k samotnému procesu.

Pokud *E. coli* DE3 nemá přístup k laktóze, funguje naprosto obyčejně, syntetizuje si vlastní RNA polymerázu a dělá věci, co buňky normálně dělají. Nic zvláštního. LacI pevně sedí na DNA a zamyká lac operon (ten nás ale v procesu nezajímá), gen pro T7-RNA polymerázu v DNA bakterie a gen pro náš rekombinantní protein v plasmidu. Přichází čas pro indukci exprese našeho proteinu. Do kultury přidáme IPTG, látku, která imituje laktózu a rychle se váže na protein LacI. LacI si



říká „Hele, laktóza, je čas přestat blokovat laktózu zpracovávající enzymy“ a uvolňuje geny pro T7-RNA polymerázu i gen našeho proteinu. Buňka syntetizuje T7-RNA polymerázu, ta může nasedat na svůj speciální promotor v plasmidu a překládat náš protein do mRNA, která již může být konečně vzorem pro vznik našeho proteinu.

Laktózu jako induktor nepoužíváme proto, že může vstupovat do přirozeného metabolismu *E. coli*, v průběhu času se tedy bude spotřebovávat a produkce proteinu tak bude klesat. IPTG se nespotebovává, a tak běží produkce proteinu stále stejnou rychlostí.

Nakonec už nezbyvá než výtobytky našeho zemědělského družstva sklídit. Kulturu odstředíme, aby se bakterie usadily na dně v podobě béžové pasty. Medium odlijeme, dezinfikujeme a zlikvidujeme. Bakterie opět resuspendujeme v malém množství vhodného pufru a hluboce zamrazíme, zpravidla na -70 až -80 °C. A výsledek naší práce? Malé, úhledné konzervičky plné bakterií obsahující velké množství našeho vysněného proteinu, v zamraženém stavu skladovatelné po velmi dlouhou dobu, klidně v řádu let.

Produkce enzymu tímto končí, práce s ním ale teprve začíná. Rekombinantní protein je možné zkoumat přímo v buňkách, většinou je ale nutné jej z buněk vyizolovat a důkladně přechistit – purifikovat. Tento krok se stává nezbytným, pokud by měl být protein přímo aplikován v průmyslu nebo lékařství. Pro tyto účely se využívá řada metod zejména chromatografických nebo elektroforetických, nicméně jejich soubor je tak obsáhlý, že by vydal (a v průběhu letošního ročníku IBISu ještě vydá) na celou další úlohu. Proto prosím neodcházejte od přijímače a nepromeškejte naše další toulky biotechnologickou divočinou.

Vít Procházka (e-mail: wydeg@email.cz)

2. Barevná úloha

20 bodů

Nenechte se zmást názvem – tato úloha je ve skutečnosti čistě „bílá“ (tj. laboratorně zaměřená). Budeme se v ní věnovat možnostem pozorování různých biologických preparátů (především bakteriálních a živočišných) za využití mikroskopu a různých barviček.

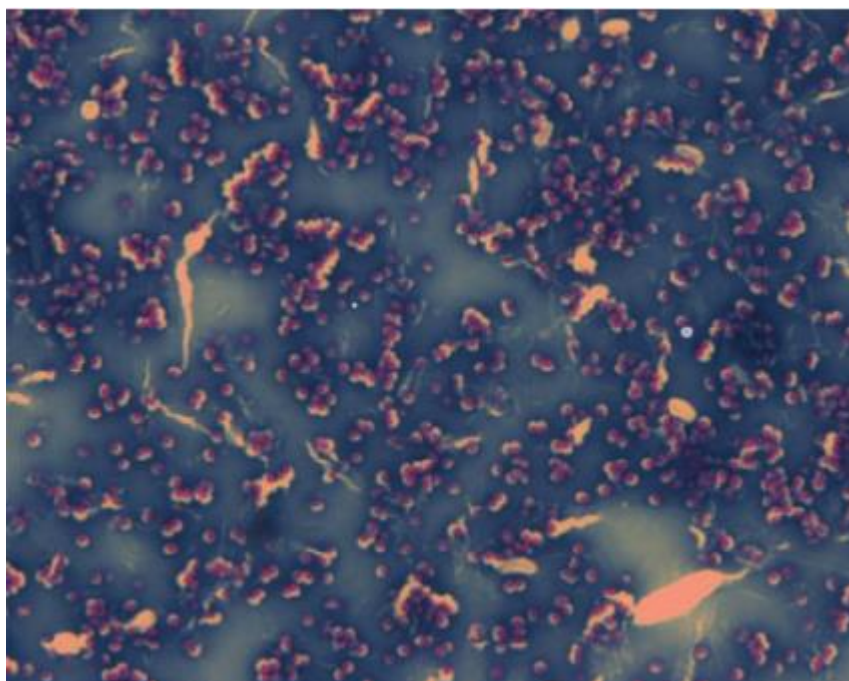
Bakterie a další mikroorganismy

Preparát na podložním sklíčku se před obarvením zpravidla nechá uschnout a fixuje buď trojím protažením plamenem kahanu, nebo chemicky. Lze pozorovat i tzv. nativní preparát bez těchto kroků, pouze kapku vody s kulturou mezi podložním a krycím sklíčkem. Nativní preparát umožňuje pozorovat pohyb buněk či obtížně barvitelné struktury. Jelikož není příliš zřetelný, pozoruje se často s využitím fázového nebo Nomarského kontrastu, nastaveného na mikroskopu.

Negativní barvení spočívá v obarvení pozadí, buňky vidíme jako bezbarvé, takže můžeme snáze pozorovat jejich obrysy. Lze je použít i v kombinaci s barvením buněk.

1. Napiště alespoň dvě využití negativního barvení. [2 b]

měření buněk, pozorování kapsul, pouzder, slizu, kontrastní pozadí při barvení buněk např. dle Ziehla a Neelsena



2. Tento preparát byl obarven podle Manevala, pozadí je obarveno Kongo červení. Proč má tedy modrou barvu? [1 b]

Kongo červeň je pH indikátor, při $\text{pH} < 3$ je modrá, při $\text{pH} > 5,2$ je červená. Manevalova metoda používá k barvení buněk barvivo (např. fuchsin) v kyselém prostředí.

K pozorování bakteriálních bičíků lze použít preparát, ke kterému se přidá nejen barvivo (např. krystalová violet), ale i mořidlo tanin. Bičíky jsou křehké – preparát není vhodné fixovat a neměly by se používat skleněné pomůcky kromě krycího a podložního skla.

3. Co bychom ve světelném mikroskopu pozorovali, kdybychom nepoužili mořidlo? Vysvětlete proč. [2 b]

Pozorovali bychom pouze buňky, ne jejich bičíky. Bičík bakterie má průměr přibližně 20 nm, což je o řád nižší než rozlišovací schopnost světelného mikroskopu.

Nejspíše nejznámější bakteriologickou barvicí technikou je Gramovo barvení, které rozděluje bakterie na _____ a _____ podle struktury jejich buněčné stěny. Fixovaný preparát je nabarven krystalovou violetí, mořen Lugolovým roztokem, promyt acetonem či ethanolem a nabarven safraninem. _____ bakterie mají nad fosfolipidovou membránou silnou vrstvu buněčné stěny, která se obarví krystalovou violetí a ve výsledném preparátu je fialová. _____ bakterie mají peptidoglykanovou vrstvu jen tenkou, nad ní se nachází další membrána obsahující lipopolysacharidy. Při promývání organickým rozpouštědlem se tato vnější membrána odplaví a z tenké buněčné stěny se snáze vyplaví barvivo. Pro snazší rozpoznání jsou všechny buňky obarveny znovu, například safraninem; jelikož je světlejší (ružový), je toto zbarvení vidět pouze u _____ bakterií.

4. Doplňte pojmy. [2 b]

grampozitivní, gramnegativní, grampozitivní, gramnegativní, gramnegativních

Některé bakterie mají buněčnou stěnu silně impregnovanou hydrofobními glykolipidy, např. s obsahem mykolových kyselin. Tato vlastnost zkresluje výsledky Gramova barvení, a tak je třeba použít odlišné techniky, např. barvení podle Ziehla a Neelsena. Při něm jsou fixované buňky barveny karbolfuchsinem, poté promyty. Pozadí a odbarvené buňky jsou dobarveny methylenovou modří nebo malachitovou zelení.

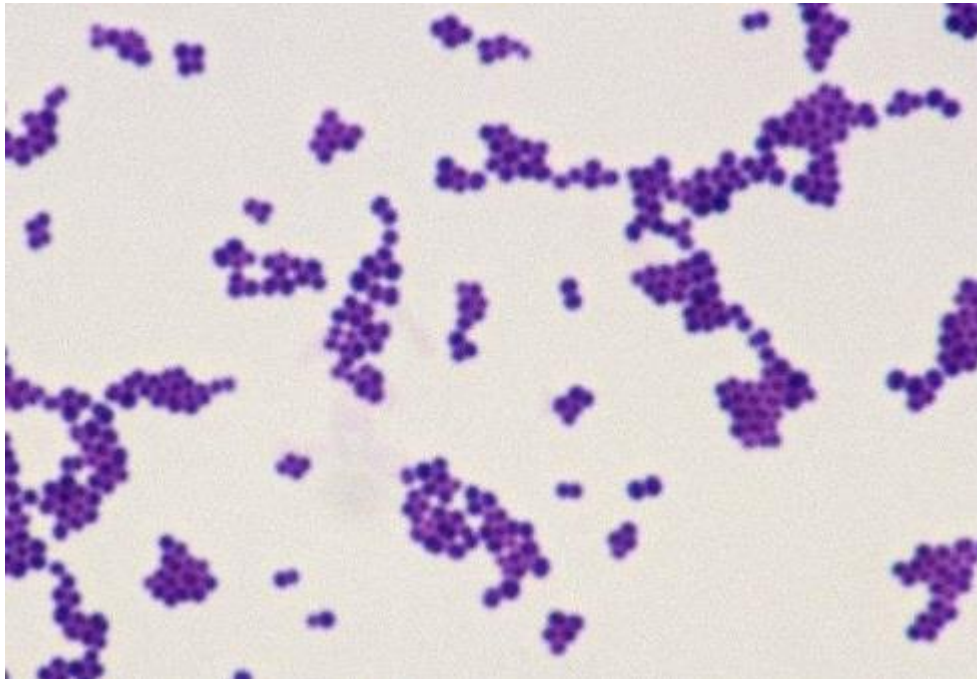
5. Jak se souhrnně označují bakterie, které Ziehlovým-Neelsenovým barvením zčervenají? Proč se jim říká zrovna takto? [1 b]

acidorezistentní; impregnace buněčné stěny brání odplavení barviva kyselým ethanolem

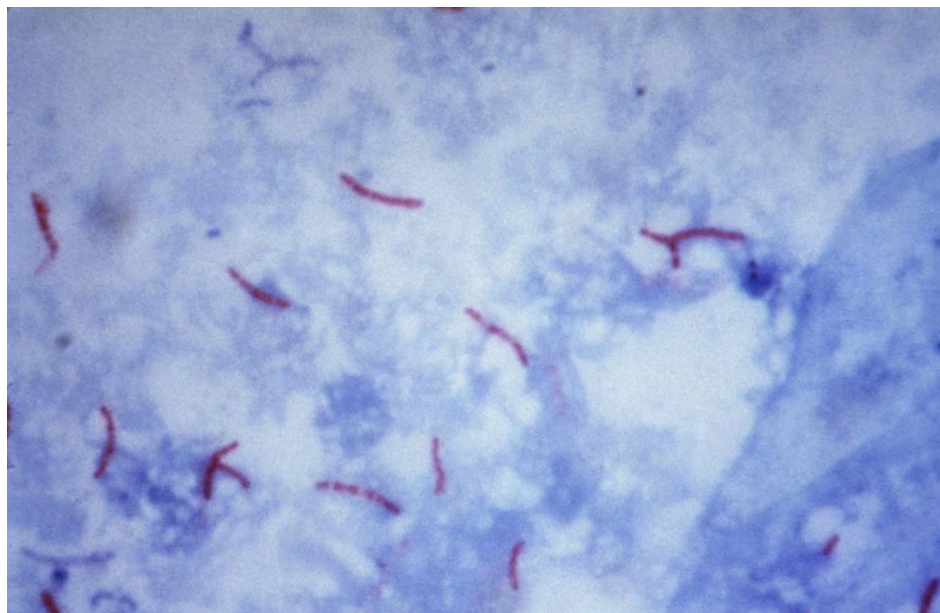
6. Tento způsob barvení se provádí s koncentrovaným barvivem a za horka. K čemu by došlo, kdybychom barvili za laboratorní teploty? A co kdybychom zahřívali preparát až k varu? [2 b]

V prvním případě by se preparát neobarvil vůbec nebo jen nezřetelně: impregnace brání nejen úniku, ale i vstupu barviva. Ve druhém případě by došlo k poškození buněk až ke znehodnocení preparátu.

Nyní se pokusíme určit dvě bakterie na základě barvených preparátů a dalších indicií.



Preparát 1



Preparát 2

Preparát 1 byl obarven dle Grama. Na Petriho miskách s masopeptonovým agarem tvoří bakterie hladké okrouhlé kolonie světle žluté barvy. Bakterie je kataláza pozitivní, výsledek bacitracinového testu (0,04 U) negativní. Bakterie způsobila pooperační infekci.

Preparát 2 byl obarven dle Ziehla a Neelsena (karbolfuchsin, methylenová modř). Gramovo barvení neposkytlo jednoznačný výsledek. Pacient, z jehož hlenu byla bakterie získána, trpí horečkou a vykašlává krev.

7. Které bakterie jsou podle vás v preparátech? [4 b]

Preparát 1: *Staphylococcus aureus*

Preparát 2: *Mycobacterium tuberculosis*

Živočišné tkáně

Histologické preparáty se připravují následujícím postupem:

- odběr tkáně – bloček max. 1 cm³
 - fixace vhodným činidlem (např. formaldehyd, ethanol, ledová kys. octová, kys. trichloroctová) nebo směsí činidel
 - vypírání fixačního činidla (vodou nebo ethanolem)
 - odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou, projasnění xylenem
 - zalití do parafinu
 - krájení na mikrotomu (tloušťka zpravidla 6-8 μm)
 - umístění na podložní sklíčko
 - deparafinace xylenem, zavodnění sestupnou alkoholovou řadou
 - barvení
 - znovu odvodnění a projasnění
 - uzavírání pod krycí sklíčko, upevnění kanadským balzámem
8. V postupu jsou zmíněny celkem tři změny rozpouštědla (zavodnění či odvodnění). Zdůvodněte každou z nich – proč nelze preparát připravit třeba s jedinou změnou rozpouštědla? [2 b]

první odvodnění: parafin, který je hydrofobní, musí prostoupit celým preparátem, aby se dobře krájel

zavodnění: barviva jsou hydrofilní

druhé odvodnění: kanadský balzám je hydrofobní

Ke krájení je kvůli mechanickým vlastnostem nutné mít vzorek v parafinu, k barvení se hodí již nakrájené, tenké, ale ještě nezamontované vzorky. Proto se změna rozpouštědla provádí třikrát.

Nejčastější barvení v histologii je pomocí hematoxylinu a eosinu. Různé buněčné struktury se přednostně barví jedním, druhým nebo žádným barvivem. Fialový hematoxylin barví především jádro, červenorůžový eosin pak cytoplasmu a její proteiny. Lipofilní struktury, např. tuk v adipocytech, se nebarví.

9. Jak se nazývají struktury s vyšší afinitou k hematoxylinu, resp. eosinu? (Odpovědi jsou dvě adjektiva.) [1 b]

bazofilní, eosinofilní (uznávám i acidofilní)

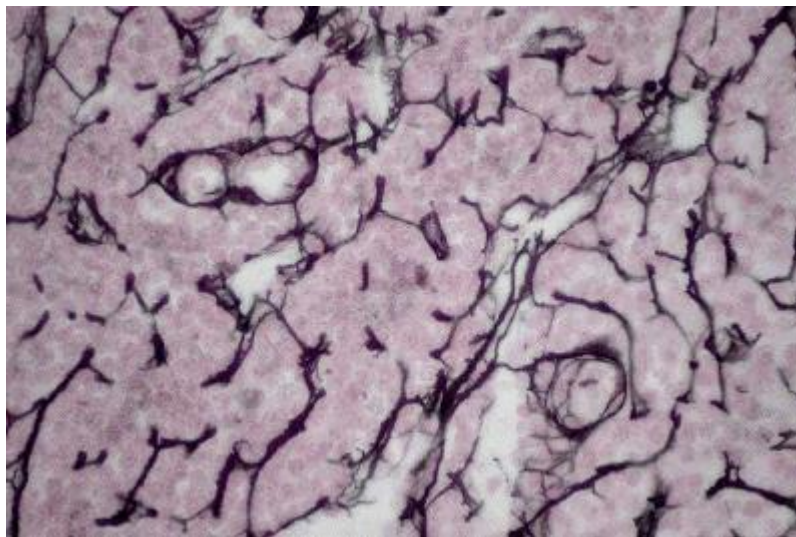
10. Jistá skupina buněk se dělí na tři podskupiny pojmenované podle vlastností z předchozí otázky. Jak se tato konkrétní skupina souhrnně nazývá? [1 b]

granulocyty

11. Hematoxylin samotný je žlutá krystalická látka. Které dva kroky je třeba provést, aby se stal fialovým barvivem? [1 b]

oxidace na hematein, např. jodičnanem sodným; přidání mořidla – kamence, např. $KAl(SO_4)_2$

Některé buněčné struktury či formy mezibuněčné hmoty vyžadují speciální barvení, například impregnaci stříbrnou solí. Tímto barvením lze mj. zviditelnit retikulární vlákna tvořící oporu lymfatických orgánů, viz obrázek (preparát lymfatické uzliny):



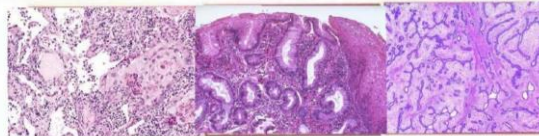
12. Proč jsou na obrázku vidět pouze retikulární vlákna a ne retikulocyty? Odpověď si pečlivě rozmyslete. [1 b]

Buňky produkující retikulární vlákna se nazývají retikulární buňky pro odlišení od retikulocytů, což jsou prekurzory červených krvinek. Ty se vyskytují v kostní dřeni, nikoli v lymfatických uzlinách.

Pokud vás někdy čeká poznávačka z tkání, ať už ve středoškolských soutěžích nebo na vysoké škole, přeji vám, abyste nedopadli takto. :)

Histopathology in a nutshell

What doctors see

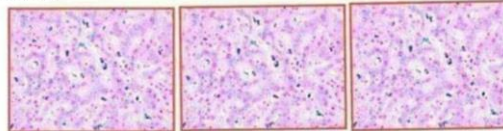


Squamous cell carcinoma lung

Barrett's oesophagus

Fibroadenoma breast

What I see



Jan Macek (e-mail: janmacek249@gmail.com)

3. Mustausaf Czechoslovak

20 bodů



Alberta Schweizera, francouzského lékaře z nemocnice v Lambaréné, zná kdekdo. Málokdo však zná doktorku Vlastu Kálalovou Di-Lotti, „českého Schweizera“. Kálalová byla jednou z prvních žen, které vystudovaly medicínu na Univerzitě Karlově. Po absolvování praxe v Brně, řídíc se svým heslem „*v samostatném státě nutno budovat*“, se Kálalová rozhodla vybudovat československý ústav v Bagdádu, v Iráku.

To se jí po mnohých nesnázích skutečně podařilo a v roce 1925 založila v Bagdádě vlastní ordinaci, kterou (po příjezdu české zdravotní sestry) proměnila na Mustausaf (=malou nemocnici), kde léčila místní obyvatele (zejména místní ženy, u kterých nepřipadalo v úvahu navštívit lékaře). V Bagdádu se setkala se širokou škálou nemocí, úrazů, předsudků a pověr. Ve volném čase prováděla vědecký výzkum a starala se o dobrou pověst naší zemičky v zahraničí.

Památce doktorky Kálalové je věnována tato úloha.



(Obr. 1: Vlasta Kálalová)

1. Představte si Bagdád v roce 1925. S jakými nemocemi byste se asi jako tamní lékaři nejčastěji setkávali? Zamyslete se i nad tím, proč a jak se tyto nemoci tak moc šířily. Zkuste také vymyslet, proč byla v Bagdádu enormně vysoká kojenecká úmrtnost. [2 b]

Blízký východ je celkem tradičně semeništěm nejrůznějších chorob. Zmiňme kupříkladu mor a cholera (ačkoliv v tomto ohledu se situace díky Brity zavedenému vodovodu, kanalizaci a karanténnímu systému lepšila). Dalším podobným onemocněním byl tyfus.

Velkým faktorem přenosu byla řeka Tigris, hlavní zdroj vody ve městě. Šířila se jí různá parazitická onemocnění (schistosomosa, tasemnice, různé motolice).

Zapomenout nesmíme ani na dále vzpomínanou “bagdádskou bouli”

Co se kojenecké úmrtnosti týče – bagdádské teploty (zvláště v létě) dosahují extrémních hodnot, taková „viróza“ jako banální dětské průjemy může ve spojení s nimi vést k velmi rychlé dehydrataci a smrti. Zvláště u pologramotného obyvatelstva...

Uznány budou všechny rozumné nápady 😊

Nyní se spolu podíváme na trošku sociologie. Irák je samozřejmě muslimská země, což se pojí s celou řadou kulturních specifik, která evropskému lékaři notně ztěžují život. Jako příklad bych uvedl vykladače „chíre“ – byli to muži, kteří otevřeli Korán na náhodné stránce a z obsahu této stránky vyvozovali budoucnost, ku příkladu k jakému lékaři jít nebo zda podstoupit doporučenou operaci.

2. Jaké další zvyky či kulturní odlišnosti mohli lékaři v Bagdádu komplikovat život (uvažujte i to, že do Bagdádu přijížděli za léčením i obyvatelé okolní pouště)? Jaké výhody měla Kálalová oproti svým ostatním kolegům? Jak se musela lišit její ordinace oproti těm, které ošetřovali výhradně křesťanské pacienty? [2 b]

Kromě již zmíněné Chíre, hrála velikou roli povinnost muslimských žen se zahalovat. Ženy nemohly jít k mužskému lékaři, protože by to pro ně znamenalo zneuctění a vyloučení z komunity. Taktéž si lékař musel zvyknout na nejrůznější rituální praktiky (vykuřování operačního sálu atp.) a na to, že pacienti vyžadují garanci úspěchu operace, odmítají z náboženských důvodů zůstat v nemocnici na hospitalizaci nebo že považují evropskou doktorku za “nečistou” (šíté).

Příslušníci pouštních kmenů zase nebyli vůbec zvyklí na uzavřené prostory, neznali vodovod ani elektřinu a svým objevováním způsobovali nemocničnímu personálu těžkou hlavu – také přenášeli různé parazity a potenciálně i jiná onemocnění.

Kálalová měla hned několik výhod – jednak byla sama žena (a navíc chirurgyně), takže se mohla starat o širokou škálu pacientů (a hlavně pacientek). Zároveň uměla výborně arabsky (turecky, persky, německy, francouzsky, italsky...) a měla mezi arabským obyvatelstvem mnoho přátel (dostalo se jí třeba i audience u iráckého krále Faisala).

Nejdůležitějším faktorem v ordinaci byla diskretnost – zastřené okna, oddělené čekárny pro muže a ženy, diskretní vchod a ochota vyjždět za nemocnými (pro bohaté muslimky bylo nepřístojné opouštět harém).



(Obr. 2: vyšetřovna bagdádské nemocnice)

S konzervativností tehdejší bagdádské společnosti souvisí i následující příběh:

Seděly v čekárně, teď odpoledne už tam byly samy, a přesto zůstaly zahaleny. Na dvoře se opíral o zeď podmračený mladý muž, bratr pacientky. „Co se jí stalo?“ zeptala se Vlasta. Starší žena pod závojem cosi zmateně mumlá, mladá se třese.

„Má horečku?“

Ba ne, spíš to bude šok, tak ať už se odhodlá a sundá ten hábit, abych jí mohla vyšetřit.

„Upadla, upadla na schodech do serdábu (podzemního „obýváku“, kde je v bagdádském létě relativní chlad),“ vysvětluje matka. „Spadla na konev.“ Konečně je závoj dole a mladá Arabka na vyšetřovacím lehátku.

„Kam se uhodila?“

Nic, jenom se třese a pláče. Žádnou ránu nemá, zlomeninu zřejmě také ne, nekrvácí, nikde ani oděrka. „Upadla na kropící konev,“ opakuje s úzkostným důrazem matka. Tak pochopí to nebo ne? „Nic na ní nevidím. Možná upadla, ale nic si neudělala, ani modřinu nemá, zbytečně jste se polekaly.“

Děvče brečí čím dál tím víc...

3. Co se asi tak dívce mohlo stát? Jako pomůcku můžete vzít, že jí bylo zhruba 17 let. Jaký chirurgický výkon chtěla rodina po doktorce Kálalové? [3 b]

Dívka byla znásilněna (pravděpodobně někým z rodiny). Provdat však mohla rodina dívku pouze tehdy, byla-li pannou. Operaci, kterou rodina chtěla, byla plastika panenské blány (hymenoplastika), kterou Kálalová zdařile provedla. Pasáž byla převzata z knihy *Doktorka z domu trubačů* od Ilony Borské.

Jedním z „cechů“ Bagdádu je tzv. bagdádská boule (kožní leishmanióza/cutaneous leishmaniasis). Touto nemocí se aktivně zabývala i Kálalová a sama ji i prodělala. O této nemoci napsala svůj jediný bagdádský lékařský článek (KÁLALOVÁ – DI-LOTTI, Vlasta: „Imunizační metoda proti orientální bouli“, *Časopis Lékařů českých číslo 38*, 1932, s. 1-8). Nejedná se o smrtelné (kožní forma) onemocnění, ale vzniklé papuly vedou ke znetvoření obličeje, zvláště pokud jedinec prodělá leishmaniózu v raném věku.

4. Co za organismus způsobuje leishmaniózu? Jaký (v Bagdádu) je primární vektor této nemoci? Z jaké geografické oblasti pochází většina případů? Z jakého důvodu je lézí většinou více (obvykle v řadě za sebou) na jednom místě? [2 b]

Nemoc způsobují prvoci rodu *Leishmania*. Primárním vektorem jsou droboučké mušky rodu *Flebotomus* (problém je, že jsou tak malé, že prolezou skrz většinu sítí proti moskýtům). Většina nemocných pochází z Blízkého východu (Irák, Afghánistán, Saudská Arábie, Írán, Sýrie). Řádky lézí jsou způsobeny tím, že flebotomy většinou nenajdou vlasečnice (ze kterých sají krev) napoprvé a dělají “řádku” vpichů – každý z nich je ale infikovaný leishmaniemi a typicky vede ke vzniku léze.

5. Dohleďte referovaný článek Dr. Kálalová (je k dispozici online a zadarmo), popište, jak a na základě kterého fenoménu předcházela Kálalová kožní leishmanióze. Je v současné době proti leishmanióze dostupná nějaká vakcína? Pokud ne, jak tuto nemoc (kožní formu) léčíme? Jak jí v roce 1925 léčila Kálalová? [4 b]

Kálalová prováděla imunizaci pomocí transplantátu kůže – pouhý kontakt s virem nefunguje, expozice musí trvat delší dobu (na druhou stranu jakmile jedinec kožní leishmaniózu prodělá, zůstává ve většině případů imunní až do konce života). S tímto poznatkem Kálalová vsadila na to, že protilátky vytvořené v kůži budou fungovat, i pokud bude tato kůže transplantována, což vyzkoušela na několika pacientech, zdravotní sestře z nemocnice a svých dětech, a to relativně úspěšně (byť to samozřejmě nebylo klinické testování v dnešním slova smyslu).

Očkování proti leishmanióze stále neexistuje, v dnešní době léčíme leishmaniózu (v případě izolované kožní léze) pomocí elektrokauterizace nebo kryoterapie (vypálení tekutým dusíkem). Případně subkutánně podávaný lipofilní amfotericin B. Orální systemickou terapií potom představuje miltefosin.

Kálalová léčila léze primárně pomocí elektrokauterizace – amfotericin nebyl v té době k dispozici a alternativu představovala cca 3 měsíce trvající léčba sloučeninami antimonu (+V).

6. Jaké jsou další formy leishmaniózy? Co to je kala azar? Co znamená zkratka DNDi a jak je spojena s leishmaniózou? Vyjmenujte alespoň 3 „zapomenuté nemoci“ a rozepište z jakého důvodu jsou „zapomenuté“. [4 b]

Mukokutánní forma: paraziti se v infikovaných makrofázích dostanou z kůže do dýchacích cest (sliznice nosu, úst a hrtanu), kde působí stejné léze jako u kožní formy, často kombinované se sekundárními bakteriálními záněty (= příčina smrti).

Poslední formou je forma viscerální, též známá (pokud je způsobena určitým druhem leishmanie) jako kala azar – černá horečka. Zde dojde k úniku infikovaných makrofágů do všech tělních orgánů (na orgánech pak také vznikají léze). To vede ke kachexii („únava organismu“) a smrti. U vyléčených pacientů obvykle nastává sekundární kožní leishmanióza (část makrofágů unikne z postižených orgánů zpět do kůže). Toto onemocnění je bez léčení velmi často smrtelné.

DNDi – drugs for neglected diseases – iniciativa, která zkoumá léčiva pro „zapomenuté nemoci“ (kala azar, chagasova choroba, tuberkulóza, spavá nemoc, malárie). Tyto nemoci se hlavně vyskytují v chudých oblastech světa a farmaceutickým koncernům se ekonomicky nevyplatí vyvíjet proti nim léky. Nemoci jsou tudíž léčeny zastaralými léky, případně léky, vůči nimž je nemoc rezistentní (typicky tuberkulóza na Ukrajině nebo malárie). Iniciativa se také zabývá vyvíjením sér proti hadím uštknutím.



(Obr. 3 Kala azar – chcete-li se dozvědět něco více o „zapomenutých nemocech“, doporučuji zejména: <https://nvsimejtesinas.cz/>)

Kromě léčení pacientů, vědeckého výzkumu a dalších povinností byla Kálalová i výkonnou amatérskou entomoložkou. Do Čech posílala krabice vzácného hmyzu (i přes to, že její první dodávku zdemolovali turečtí celníci v domněnii, že se snaží pašovat opium), které významně obohatily sbírky Národního muzea.

6. Zjistěte, který brouk z čeledi krascovití (*Buprestidae*) je pojmenován po Vlastě Kálalové. Který z velikánů české entomologie jej popsal a pojmenoval? [1 b]

Cyphosoma lawsoniae kalalae, popsán entomologem Janem Obenbergem z Národního muzea.



(Obr. 4 Kálalová na lovu hmyzu, Mezopotámie)

A jak to s doktorkou Kálalovou dopadlo? V Bagdádu přerušovaně žila a pracovala až do roku 1932. Také se tam oženila s Italem Giorgiem Di-Lottim. Spolu odjeli z Bagdádu do Čech poté, co Kálalová onemocněla horečkou dengue. Kálalová si zařídila ordinaci v rodných Bernarticích, kde i se svými dvěma dětmi žila spokojeně skoro až do konce druhé světové války. Několik dní před vyhlášením míru protáhla Bernarticemi ustupující divize SS a zmasakrovala tamní obyvatelstvo, včetně Vlastiny rodiny (Kálalová vyvázla s těžkým zraněním). Dožila se 74 let, zemřela v Písku v roce 1971. Do Bagdádu jí komunistický režim již nikdy nepustil a nenašel se nikdo, kdo by byl ochoten její kliniku převzít (a klinika tak zanikla).



(Obr. 5 památeční deska v Bernarticích)

Do Bagdádu se z Československa vydal až v roce 1962 MUDr. Jaroslav Slípka a obdržel od Kálalové mnohé rady a doporučení, v zemi však nezůstal.

7. Představte si, že chcete pokračovat ve šlépějích Kálalové a založit v Bagdádu vlastní nemocnici. Na jaký lékařský problém byste se zaměřili (léčbu jaké nemoci atp.) a proč? Čím byste vybavili svou nemocnici? (ve smyslu jakými zařízeními („facilities“), netřeba vypisovat: hromada hraček, bazének s balónky a tobogán, stačí prostě napsat dětský koutek :) [3 b]

Velmi otevřená otázka, na kterou je možné odpovědět myriádou způsobů. Z možných problémů k řešení (nikoliv finální výčet!): v zemi se stále aktivně bojuje (traumacentrum, centra následné péče pro rekonstrukční chirurgii), jsou zde časté různé infekční choroby (tyfus, průjmová onemocnění (problém hlavně u dětí), spalničky – očkovací centra, centrum pro léčbu tyfu), problém představují i mentální onemocnění (PTSD!) a je zde tedy zapotřebí i psychiatrických nemocnic. Dále je rozhodně možné mluvit o rakovině, diabetu, kardiovaskulárních onemocněních, HIV, hepatitidě, malnutrici a plejádě dalších problémů...

Příklad řešení:

Za neurgentnější považuji pomoc úrazovým pacientům (válečná zranění, dopravní nehody, popáleniny od domácího vaření v uprchlických táborech, oběti závalů atp.) a pokusil bych se tedy vybavit malou chirurgickou nemocnici.

Jako první bych zařídil přísun pitné vody a kanalizaci (watsan – viz <https://www.youtube.com/watch?v=4pfGGJItZlk> – enormně důležité zařízení, jeho absence znamená -1 bod), dále bezpečné ubikace pro zdravotníky a zázemí pro ně.

Nemocnice by se skládala z příjmací místnosti (triáž), několika vyšetřoven, dvou operačních sálů, zázemí pro sterilizaci nástrojů, místnosti pro roentgen, malé JIP (samozřejmě vybavené adekvátně podmínkám – problém s většinou medicínských přístrojů v zemích 3. světa je ten, že není dostupný žádný servis – jakmile se rozbijí, nemáte šanci je opravit) cca 5ti lůžkové a vybavené 2 ventilátory a lůžkového oddělení pro cca 30 ležících pacientů. Nesmíme zapomenout ani na porodnický sál. Dalšími odděleními by byl i sklad zásob/lékárna a úsek pro rehabilitace a fyzioterapii.

Nesmíme zapomenout ani na další technické zázemí – prádelnu, náhradní elektrický generátor, rozvody kyslíku... a personál – lékaře, sestry, techniky, logistiky, ošetřovatele, fyzioterapeuty, pomocný personál, farmaceuty atd. atp.

Pokud by vás zajímalo, jak toto udělat mobilně a efektivně:

https://www.youtube.com/watch?v=yI2_rRrCDxM

A to už je úplně všechno! 😊 Pokud jste došli až sem, můžete se poplácat po zádech a pográtulovat si. A pokud vás příběh doktorky Vlasty Kálalové zaujal, nemohu než doporučit k přečtení knihu *Doktorka z domu trubačů* z pera Ilony Borské.

*František Váňa (e-mail: vana.frantik@seznam.cz)
ve spolupráci s MVDr. Oldřichem Tomáškem Ph.D.*

Oldřich Tomášek vystudoval veterinární lékařství na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně a doktorské studium zoologie na Univerzitě Karlově. V současné době pracuje na Ústavu biologie obratlovců Akademie věd ČR, kde se zabývá fyziologií stárnutí a pohlavního výběru a evolučními a fyziologickými mechanismy souvisejícími s evolucí životních strategií a s životem v různých typech prostředí. Tyto mechanismy studuje především u ptáků.



20 bodů

4. Červená královna a pohlavní výběr

Červená královna

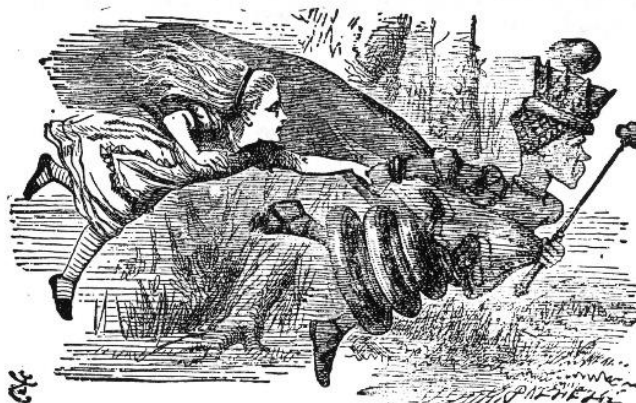
Připravte se na pořádnou jízdu! Poženeme se nyní společně závratnou rychlostí po poli evoluční biologie, a přece pas potřebovat nebudeme, jelikož se nepohneme z místa.

Nejprve začneme jednou tematickou písni, jež kromě textu o touze po druhém pohlaví s naším tématem souvisí i méně zjevně. Je totiž svého druhu komplexním namlouvacím chováním vyprodukovaným lidskou inteligencí, která je dost možná sama do určité míry důsledkem pohlavního výběru.

<https://www.youtube.com/watch?v=6t7EPbnZUz8>

„No, v našem kraji,“ řekla Alenka, dosud ještě trochu udýchaná, „se obvyčejně dostanete někam jinam – když takhle rychle dlouho běžíte, jako jsme my běžely.“ „Nějaký pomalý kraj!“ řekla Královna. „Nu, zde, jak vidíte, potřebujete běžet, kolik dovedete, abyste zůstaly na místě. Chcete-li se dostat někam jinam, musíte utíkat aspoň dvakrát tak rychle!“

(Carroll, 1871; překlad J. Císař)



Muž z Chicagské university s plnovousem

1. **Doplňte do následujícího textu slova na vynechaná místa.** [0,5 b]

Leigh Van Valen byl význačný badatel v oblasti evoluční biologie. Roku 1973, to ještě neměl vous tak protkaný šedinami, dospěl k jednomu významnému objevu při studiu mořských fosílií. Tím objevem byla skutečnost, že pravděpodobnost vyhynutí druhu nezávisí na tom, jak dlouho tento druh existuje, ale je dána schopností se adaptovat. Tato myšlenka je dnes známa jako zákon konstantního vymírání a dala vznik v dnešní době asi nejuznávanější teorii o evoluci sexuality, teorii Červené královny (z anglického Red Queen Hypothesis) pojmenované podle Červené královny z knihy Lewise Carrolla Za zrcadlem a co tam Alenka našla.

Červená královna zasahuje

Běh Červené královny může probíhat v mnoha podobách. Je totiž poháněn jak změnami v abiotických faktorech prostředí, tak zejména interakcemi mezi jedinci stejného druhu či interakcemi mezidruhovými.

2. **Uveďte dvě hlavní mezidruhové interakce, které jsou nejtypičtějšími příklady běhu Červené královny. Vysvětlete, jak podle teorie červené královny tyto příklady koevoluce probíhají. Proč jde o závod, který nemá vítěze?** [1 b]

Predátor/kořist

Jde o dynamickou mezidruhovou interakci, kterou můžeme popsat pomocí teorie Červené královny.

Vezměme si jako příklad vztah lišky a zajíce. Úspěšnější (tzn. ty, které budou mít více potomků) budou ty lišky, které budou nositeli genů předurčujících je jako úspěšné predátory. Ty získaly od svých rodičů a předají je dále svým potomkům. Mohou mít různou podobu. Například krycí zbarvení umožňující připlížení se ke kořisti, lepší čich zvyšující šance na její vystopování nebo lepší fyzická kondice, která hraje mnohdy rozhodující roli ve finální fázi lovu.

Zajíci v tomto příkladu však vyvíjí protistrategie. Podobně jako u lišek ti neúspěšnější předají geny poskytující výhodu v této mezidruhové interakci svým potomkům. Může jít například o mohutnější svalovinu nejen zadní končetiny, umožňující jim lišce zmizet před očima, citlivější sluchové ústrojí (tímto způsobem se nejspíše vyvinuly velké slechy, které zvyšují množství zachyceného akustického zvukového vlnění) nebo, podobně jako u lišek, čich umožňující detekci jejich přítomnosti.

Tyto znaky kořisti a predátora jsou však v dynamické rovnováze červené královny. Vyvíjejí se totiž, jak bylo výše zmíněno, mechanismem přirozeného výběru (nejlépe přizpůsobený přežije). Vyvinutá adaptace u jednoho účastníka interakce vede k tomu, že se zvýší selekční tlak kladený na druhého účastníka, který se tuto adaptaci snaží (samozřejmě prostřednictvím přirozeného výběru – není to vůlí ovládaný proces) překonat nebo obejít pomocí svých protiadaptací. Podle teorie Červené královny je tedy výhoda získaná vyvinutím jakékoliv výhodné adaptace dočasná a je postupem času překonána vyvinutím protiadaptace u protivníka.

Liška se tedy adaptuje, aby byla dostatečně rychlá a kořist ulovila, zatímco zajíc se adaptuje proto, aby unikl s holým životem. Oba musí proto podléhat neustálému vývoji, jinak by vyhynuli. Boj o přežití tedy nemá trvalého vítěze.

Parazit/hostitel

Paraziti se adaptují na to, aby mohli přežívat na úkor hostitele, ten se tomu brání, aby nebyl oslaben a jeho geny nebyly evolučně zapomenuty. Být dobrým parazitem je však vskutku věc náročná. Parazit nesmí působit příliš negativně, protože jinak zabije hostitele, a tudíž i sebe dříve, než se sám stihne rozmnožit. Zároveň je též neustále předmětem zájmu imunitního systému, který je naučen rozeznávat cizí antigeny. Parazit tak musí měnit (mutovat) či maskovat své povrchové struktury (antigeny) tak, aby měl imunitní systém hostitele s jejich odhalením co největší potíže. Krom toho si hostitel může vyvinout i další možné strategie, jako je například stranění se nezdravě vypadajících jedinců (tzv. imunitní chování či behaviorální imunita) nebo snad největší triumf hostitele v tomto závodě Červené královny, kterým je sexuální rozmnožování. Jednou ze strategií hostitele, ve které může hrát svou roli sexuální rozmnožování, může být změna zámků (receptorů), pomocí kterých se intracelulární parazité dostávají do jeho buněk. Z pohledu parazita jako druhu však nevěšte hlavy. Vystavuje vás to totiž selekčnímu tlaku a vybere z vás ty jedince, kteří budou disponovat paklíči (ligandy pro dané receptory) nebo jinými strategiemi vyvažující hostitelovy adaptace. Podobně jako u interakce predátor/kořist nikdo nemá dlouho navrch a tento závod nemá konce. Slovy červené královny: musíte běžet (na poli evoluční biologie to znamená se vyvíjet a adaptovat), abyste zůstali tam, kde jste – tzn. abyste jako druh nevyhynuli. O výhodách sexuálního rozmnožování se dozvíte dále.

K čemu jsou pohlaví

Červená královna je považována za hlavní příčinu evoluce pohlavního rozmnožování neboli sexuality. V tomto kontextu ji nejvíce proslavila stejnojmenná kniha Matta Ridleyho. Pohlavní rozmnožování nemá podle teorie Červené královny nic společného s adaptacemi na neživé prostředí. Je důsledek boje s mnohem vážnějším protivníkem, který nikdy nespí.

4. Kolik lidí v Česku průměrně onemocní každý rok chřipkou? Uveďte, které dva genetické mechanismy umožňují viru chřipky měnit své vlastnosti a neustále tak překonávat náš imunitní systém. Jak často je třeba vyvíjet novou vakcínu? [2 b]

Zhruba 1 milion lidí; antigenní posun (neboli shift) a antigenní zlom (neboli drift); každý rok (případně 2x za rok, uvažujeme-li o obou zemských hemisférách).

Dalším velmi aktuálním příkladem Červené královny je evoluce rezistence vůči antibiotikům u bakterií. Tato rezistence se většinou vyvine do několika let od vývoje nového typu antibiotika. Vzhledem k tomu, že vývoj antibiotik je zdoluhavý a finančně velmi náročný proces, získávají pomalu odolné kmeny bakterií navrch a hrozí, že během několika málo desetiletí téměř úplně ztratíme výhodu získanou díky vědě před necelými 100 lety.

5. V tajence následující křížovky se dozvíte zkratku jednoho z nejobávanějších mikrobů rezistentních na četná antibiotika. [1 b]

a) Jak se jmenoval objevitel prvního širokospektrálního antibiotika a následný nositel Nobelovy ceny?

b) Rezistence se mezi bakteriemi často předává přenosem genů, který probíhá mezi dvěma jedinci, kteří nejsou ve vztahu rodič-potomek. Jakým přídatným jménem se tento typ přenosu genetické informace nazývá?

c) Jedním z opatření zpomalujících šíření rezistentních kmenů je snížení počtu předepisovaných antibiotik. Ve které ze zemí OECD se antibiotika předepisují v přepočtu na obyvatele nejméně?

d) Rezistenci na léčiva si vyvíjejí nejen bakterie, ale také například prvoci. Uveďte nejvýznamnější protozoární onemocnění, rozšířené především v tropech a přenášené komáry.

a)	F	L	E	M	I	N	G												
b)	H	O	R	I	Z	O	N	T	Á	L	N	Í							
c)	N	I	Z	O	Z	E	M	S	K	O									
d)	M	A	L	Á	R	I	E												

Za splněné řešení je považována pouze kompletně vyplněná křížovka, ne pouze tajenka.

6. Aby mohlo dojít k evoluci sexuality, je nutné, aby její výhody převážily výhody nepohlavního rozmnožování (asexuality). Uveďte výhody a nevýhody obou rozmnožovacích strategií. [1 b]

	Pohlavní rozmnožování	Nepohlavní rozmnožování
Výhody	větší variabilita potomstva variabilita nevzniká jen díky náhodně získaným mutacím a je zprostředkována různorodou kombinací rodičovských genů	nepotřeba partnera vysoká schopnost reprodukce – každý jedinec produkuje potomky
Nevýhody	snížené množství potomků – tzv. daň za samce (produkují pouze spermie) nutnost hledání partnera – časová a energetická nákladnost, vyšší pravděpodobnost predace	nízká variabilita potomstva variabilita vzniká pouze pomocí mutací

Vnitrogenomový konflikt

Pro lepší pochopení doporučuji se předem obeznámit s teorií sobeckého genu, kterou zpopularizoval Richard Dawkins. Teorie sobeckého genu navrhuje, že hlavní jednotkou přirozeného výběru je gen, nikoliv jedinec. Těla jedinců jsou podle této hypotézy pouze stroje vytvořené geny za účelem jejich vlastního přežití a replikace. Tato hypotéza umožnila vysvětlit mnohé do té doby neřešitelné problémy, jako jsou třeba konflikty genů uvnitř genomu jednoho jedince.

„Oněch 75 tisíc genů, které vytvářejí průměrné lidské tělo a vládnu mu, můžeme přirovnat k 75 tisícům obyvatel středně velkého města. Lidské tělo – tak jako existence lidské společnosti – závisí na nelehké rovnováze svobodného podnikání a sociální kooperace. Bez kooperace a solidarity by obyvatelé města netvořili komunitu. Všichni by lhali a podváděli a snažili se o nezákonné zbohatnutí na úkor všech ostatních; veškeré sociální aktivity – obchod, vláda, vzdělání, sport – by se zhroutily. Bez spolupráce mezi geny by tělo, v nichž geny sídlí, nemohla být použita k přenosu do další generace. Nebyla by totiž nikdy vybudována.“ (Ridley, 1993)

V následující sekci se podíváme na jeden z nejzajímavějších dopadů Červené královny podle teorie Haiga a Grafena z roku 1991.

Chromozomální bratrovražda

7. Co to jsou geny meiotického tahu a jakým způsobem zvyšují svou fitness (tzn. úspěšnost svého přenosu do další generace)? Tyto geny jsou však velmi vzácné. Jak se nazývá a funguje mechanismus, který podle teorie Haiga a Grafena meiotickému tahu brání? Který pár chromozomů by byl podle této teorie k meiotickému tahu nejnáchylnější? [2 b]

Geny meiotického tahu jsou skupinou sobeckých genů. Při pohlavním rozmnožování získává potomek po jedné alele každého genu od každého z rodičů. Každý rodič však má také dvě alely od každého genu, jež získal od svých rodičů (a tudíž prarodičů potomka, o kterém je řeč). Geny meiotického tahu (jejich alely) získané od jednoho z prarodičů se při tvorbě gamet v pohlavních orgánech rodičů našeho potomka snaží zvýšit šanci svého přenesení do další generace na úkor alel od druhého prarodiče. Toho docílí buď tak, že brání alelám od druhého prarodiče vstoupit do vytvářených vajíček a vecpou se tam samy, nebo zabíjejí pohlavní buňky (většinou spermie) vzniklé meiózou, které nesou alely druhého prarodiče. Typickým příkladem druhého způsobu může být gen Segregation distorter u octomilky *Drosophila melanogaster*. U samců pro svůj vlastní prospěch sníží počet vzniklých spermií při jedné meióze na 2 ze 4. V případě zabíjení gamet jde však vždy o spolupráci minimálně dvou genů. Zmíněný zabijácký gen zabíjí spermie určitým enzymem. Aby však nezabil i svou buňku a tedy i sebe, potřebuje obranu v podobě dalšího genu produkujícího protein, který proti účinku enzymu buňku chrání.

Proces nazvaný crossing-over zamíchává genetickou informaci na jednotlivých chromozomech a znemožňuje tak spolupráci těchto genů (zabiják a ochránce) a jejich uchycení, krom vzácných případů.

Nejnáchylnější jsou heterochromozomy X a Y.

Tahle teorie je však navzdory své elegantnosti těžce testovatelná. Sám Haig se k tomu vyjádřil těmito slovy: „(Námi navržený mechanismus) je jako sprej proti slonům. Věříte, že funguje, protože okolo sebe nevidíte žádné slony.“

Pohlavní výběr

Pohlavní výběr vedl u mnoha druhů k evoluci nápadných až extravagantních znaků, tzv. ornamentů. Mezi nejznámější případy patří například prodloužená a avantgardně zdobená či tvarovaná ocasní pera samců páva či rajek nebo parohy u jelenovitých sudokopytníků. Ornamentální znaky však nemusí být pouze vizuální, ale lze mezi ně zařadit i komplexní vokální projevy (např. zpěv pěvců), či prvky chování. Jak komplexní a mnohdy až bizarní namlouvací chování pohlavním výběrem vzniká, lze vidět na následujících videích:

<https://www.youtube.com/watch?v=wTcfDCiBqV0>

<https://www.youtube.com/watch?v=rX40mBb8bkU>

Ornamentální znaky jsou často považovány za indikátory, kterými jedinci signalizují druhému pohlaví své genetické kvality a tělesnou kondici. Aby takové indikátory fungovaly, musí však být nějak zajištěno, že jedinci ve špatné kondici nebudou moci podvádět – tedy že jejich ornamenty budou méně intenzivní než u jejich kvalitnějších konkurentů. Jedním z mechanismů, který by tuto čestnost signalizace kvality a kondice mohl zajišťovat je tzv. alokační trade-off.

8. Vysvětlete pojem alokační trade-off. Uved'te příklad alokačního trade-off ve vašem životě. Vysvětlete, jak je možné, že alokační trade-off mezi dvěma znaky může vyústit v jejich pozitivní korelaci. [1 b]

Trade-off znamená kompromis ve smyslu „něco za něco“. Alokační trade-off znamená, že pokud investuji (alokuji) více zdrojů do jedné věci (např. do exprese ornamentů), zbyde mi méně na investici do jiné věci (např. do kvalitních spermií). Možný příklad ze života: pokud např. rodinné úspory investuji ho do nákupu velkého drahého domu, zbyde mi málo na auto.

Vysvětlete, jak je možné, že alokační trade-off mezi dvěma znaky může vyústit v jejich pozitivní korelaci.

V případě, že existuje variabilita v dostupnosti zdrojů či schopnosti jedince si zdroje zajistit. Lidé se například liší ve výši svého příjmu, a proto lidé s drahými domy většinou nejezdí žigulíkem, ale zbyde jim stále dost peněz na nákup drahého auta.

9. Jedním z velmi zajímavých sekundárních pohlavních znaků, vyskytujících se u některých lidských populací, je tzv. steatopygie. Vysvětlete, co tento pojem znamená a jak je steatopygie podle moderních medicínských standardů definována. Má ji Věstonická venuše? Vysvětlete, proč ano či ne. Uved'te alespoň dvě v současnosti žijící etnické skupiny, kde se vyskytuje. [1 b]

Steatopygie je ukládání tuku v oblasti hýždí, přičemž úhel mezi linií zad a horní částí hýždě svírá úhel kolem 90°.

Věstonická venuše ji nemá, protože úhel mezi linií zad a horní stranou hýždí svírá cca 120°. Khoisanové, Pygmejové, Andamanci.

10. Vysvětlete následující pojmy související s pohlavním rozmnožováním: monogamie, polygamie, polygynie a polyandrie. Je u savců a ptáků častější polygynie či polyandrie a proč? Jedinci jakého pohlaví si mohou polygamií zajistit více potomků? A jaké jsou potenciální přínosy polygamie pro to druhé pohlaví? [2 b]

Monogamie – párovací systém, ve kterém samci a samice tvoří páry pečující o potomky

Polygamie – obecný název pro párovací systémy, ve kterých se jedinci jednoho pohlaví rozmnožují s více než jedním jedincem opačného pohlaví

Polygynie – systémy, ve kterých se jeden samec rozmnožuje s více samicemi

Polyandrie – systémy, ve kterých se jedna samice rozmnožuje s více samci

Je u savců a ptáků častější polygynie či polyandrie a proč?

Polygynie, protože samice ve srovnání se samci do mlád'at investují více času i energie (gravidita, laktace, produkce vajec). U samců navíc roste počet zplozených mlád'at úměrně s počtem samic, se kterými kopuluje.

Jedinci jakého pohlaví si mohou polygamií zajistit více potomků?

Více potomků si polygamií mohou zajistit samci. Pro samice je přínosem vyšší genetická různorodost potomků a tudíž vyšší šance, že alespoň část potomků zdědí kvalitní geny, dále pojistka proti případné neplodnosti partnera, lepší zajištění potravy a rodičovské péče o mlád'ata.

A jaké jsou přínosy polygamie pro to druhé pohlaví?

Vyšší genetická různorodost potomků a tudíž vyšší šance, že alespoň část jich zdědí kvalitní geny; pojistka proti případné neplodnosti partnera; lepší zajištění potravy a rodičovské péče pro mlád'ata.

11. Vysvětlete následující termíny: předkopulační a pokopulační fáze pohlavního výběru, vnitropohlavní a mezipohlavní forma pohlavního výběru.

Zařad'te následující znaky a procesy do relevantních kolonek v tabulce: vaginální zátka, infanticida, loubí lemčků, záměrný potrat (vyvolaný samicí), parohy, ejekce spermií samicí. Který z těchto znaků lze označit jako rozšířený fenotyp? [3 b]

Předkopulační fáze – fáze pohlavního výběru odehrávající se před kopulací, tzn. kompetice mezi jedinci stejného pohlaví o jedince druhého pohlaví, výběr sexuálního partnera

Pokopulační fáze – odehrává se po kopulaci v případě, že samice kopuluje s více než jedním samcem. Patří sem soupeření spermií dvou a více samců o oplození vajíček (tzv. kompetice spermií) a skrytá samičí volba, tzn. mechanismy, kterými samice může zvýhodnit spermie konkrétního samce

Vnitropohlavní výběr – soupeření mezi jedinci stejného pohlaví (např. souboje)

Mezipohlavní výběr – výběr sexuálního partnera ve smyslu preference pro konkrétní(ho) jedince opačného pohlaví

	vnitropohlavní výběr	mezipohlavní výběr
předkopulační fáze	parohy	loubí lemčků
pokopulační fáze (před oplozením)	vaginální zátka	ejekce spermií samicemi
pokopulační fáze (po oplození)	infaticida	záměrný potrat

Mezipohlavní konflikt aneb Červená královna opět zasahuje

U kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) dochází v rámci pohlavního výběru ke konfliktu mezi pohlavími. Samice jsou v podstatě znásilňovány samci, přičemž samců často na tomto aktu spolupracuje i několik. Na rozdíl od většiny druhů ptáků, kteří mají pro přenos spermatu do reprodukčního traktu samice jen drobný výběžek na kloace, se u kačerů za tímto účelem vyvinul až absurdně dlouhý a vývrtkovitě zatočený kopulační orgán, který jim slouží jako obdoba savčího penisu. (Na obrázku je vývrтка inspirovaná oním extravagantním kopulačním orgánem kačerů.)



12. U samic však došlo mechanismem Červené královny k evoluci protiadaptace, která jim umožňuje rozhodnout, zda ji kopulující samec oplodní či ne. Co je podstatou této protiadaptace u samic kachny divoké a jak to vysvětluje evoluci extrémně prodlouženého a tvarovaného kopulačního orgánu kačerů? [1 b]

U samic kachny divoké se vyvinuly slepé záhyby vaginální části reprodukčního traktu. Pokud kachna nechce, aby samec oplodnil její vajíčka, nasměruje ho do slepého záhybu. Evoluce dlouhého a šroubovitě stočeného kopulačního orgánu kačerů je pak důsledek principu Červené královny, kterým se samci snaží překonat uvedenou protiadaptaci samic.

Pokopulační pohlavní výběr aneb i spermie plavou podle Červené královny

Pohlavní výběr může pokračovat i po kopulaci. Pokud samice kopuluje s více než jedním samcem, dochází soutěži jejich spermií o oplození samičích vajíček, tzn. kompetici spermií. Tento mechanismus vedl k evoluci některých zajímavých až bizarních forem spermií.

13. Který současný živočišný druh má nejdelší známé spermie? Kolik jeho spermie měří a jak zhruba dlouhé by byly u 180 cm vysokého muže, pokud by měly mít stejný poměr k velikosti těla? Jak dlouhé jsou ve skutečnosti mužské spermie? [1 b]

Který současný živočišný druh má nejdelší známé spermie?

Octomilka *Drosophila bifurca*.

Kolik jeho spermie měří a jak zhruba dlouhé by byly u 180 cm vysokého muže, pokud by měly mít stejný poměr k velikosti těla?

Spermie *D. bifurca* měří kolem 5,8 cm a jsou zhruba 20x delší než tělo octomilky. U 180 cm vysokého muže by tedy musely spermie měřit cca 36 metrů.

Jak dlouhé jsou ve skutečnosti mužské spermie?

Mužské spermie ve skutečnosti měří 40–55 μm .

14. Samci běžného druhu motýla běláška řepkového (*Pieris napi*) produkují neplodné bezjaderné spermie, které tvoří až 90 % jejich ejakulátu. Jaký je jejich význam? [1 b]

Neplodné spermie zaplní orgán, ve kterém samice skladují spermie, a brání tím jejímu oplození jiným samcem.

15. A ještě jedna zajímavost z našich luhů a hájů. Samci nenápadného druhu hlodavce myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) mají na hlavičce spermií háčky. K čemu jim tato zajímavá struktura slouží? [1 b]

Spermie se díky nim spojují do tzv. vláček, které jsou rychlejší než jednotlivé spermie.

Hana Seličová (e-mail: h.selicova@seznam.cz)

OK, but coffee first!

20 points

You wake up in the morning, you're not even ready to get out of bed yet, and your first thought is heading to the kitchen for a coffee machine. Do you recognize yourself in this description of the morning routine? A lot of people don't have it different in today's busy world, so I decided to introduce you to the issue of stimulants and serve you, as well as freshly brewed coffee, interesting facts about some of them.

Stimulants in general are psychoactive substances, which can temporarily improve your mental and physical performance. These magicians can be natural or synthetic, the effects of each type of stimulant differ in the type of effect and in its mechanism of operation in human body. Stimulants include caffeine, thein, nicotine, cocaine, phenylethylamine stimulants or methyldioxymethamphetamine (popularly known as ecstasy). So let's get boosted by some information about these substances!

1. One of the well-known stimulants is undoubtedly caffeine. It is found in a large number of drinks - whether it is coffee, tea, hot chocolate or energy drinks. We can also find it in products made from cocoa beans. Caffeine has many benefits for human health. List at least two of caffeine effects that you think are most important and can help to the health of user. (for example – caffeine can reduce fatigue and improve concentration. [2 p]

reduction of fatigue, support of fat metabolism - faster weight loss, or treatment of obesity, improvement of concentration (in ADHD, a frequent solution of lack of concentration), antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-diabetes, and antihypertensive properties

2. We will stick with caffeine for a while. Like any other substance affecting human health, this stimulant is monitored, in Europe particularly by the European Food and Safety Authority (EFSA). This institute has set a safe amount for caffeine that does not adversely affect health. This value was set for healthy adult at ___ of caffeine in a single dose, the total daily dose of caffeine should not exceed ___. Fill in the missing values with their unit. [1 p]

200 single dose intake; 400 mg daily intake

3. Find out how many mg of caffeine has: a regular espresso, flat white, green tea, energy drink (e.g. Redbull) and NOCCO BCAA drink, which is often used by athletes as a pre-workout kick. [3 p]

Espresso = ___ mg of caffeine (aprox. 70 mg)

Flat white = ___ mg of caffeine (aprox. 140 mg – double shot of coffee)

Green tea = ___ mg of caffeine (aprox. 30 mg)

Energy drink = ___ mg of caffeine (Redbull aprox. 80 mg)

NOCCO BCAA drink = ___ mg of caffeine (180 mg)

4. As soon as we get caffeine in circulation, its metabolism begins. About 99% is absorbed within the first 45 minutes after ingestion. The half-life of this stimulant is on average 4 hours. In the assignment you always have clues to the word we are looking for. All terms refer to caffeine metabolism. [3 p]

-----: one of the metabolites of caffeine, accounts for about 12% of the total volume of caffeine; dilates blood vessels and increases urine volume (THEOBROMINE)

-----: location of caffeine metabolism (LIVER)

-----: skeleton structure of caffeine (XANTHINE)

-----: any biological process in an organism that recurs with a regularity of approximately 24 hours (CIRCADIAN RHYTHM)

-----: pyragallol, resorcinol, hydrochinon, cinnamic acid belongs to the group of chemicals named (POLYPHENOLS)

5. Recently, the trend of so-called boosted coffee has grown a lot. It consists of "improving" morning coffee by adding a few drops of oil - usually MCT oil (medium-chained-triglycerides) or coconut oil. What benefits does boosted coffee provide to this busy society - especially to people who can't keep up with breakfast? [1 p]

Fats in the diet can provide enough energy for the brain and the body to function. In this case, it is an advantage for people who do not manage to have breakfast or do not want to have breakfast. Fat in coffee starts metabolism - specifically beta oxidation of fatty acids, which takes place in the liver. It can thus increase the value of human metabolism. The fats in these oils provide enough energy to start the day without another meal. (Both MCT and coconut oil also provide anti-oxidant and anti-inflammatory properties and can also offer anti-microbial support, to help rid the gut of harmful pathogenic bacteria, parasites, fungus, etc.)

6. In 1827, the caffeine contained in tea was first discovered and began to be called thein. Unlike caffeine in coffee, thein is less aggressive in terms of agitation and has a longer effect - it does not have such a rapid onset and also the effects fade longer. What causes this difference in the absorption of the same substance? [1 p]

It does not occur freely in tea but in bound form.

7. Another stimulant that can activate the centers of the brain focused on concentration and learning is nicotine. We hear about the negative effects of smoking from all sides. What diseases it causes and how many smokers a year die from the causes of smoking. But nicotine alone can theoretically be a useful helper and therapeutic retarder for a certain disease. Which disease is it? Write a possible principle of slowing down symptoms of this disease with nicotine. [3 p]

Examination of the brains of patients with Alzheimer disease (AN) showed a reduction in nicotine binding sites of up to 70% compared to the brains of healthy people of the same age. It is the administration of nicotine or other specific nAChR agonists that is one of the promising possibilities. AN is associated with cerebral acetylcholine deficiency due to degeneration and impairment of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Therefore, the administration of nicotine to patients with AN could be a possible therapeutic retardation of the disease.

An interesting finding came from a series of about twenty epidemiological studies that looked at the relationship between smoking and the incidence of AN. Sixteen of these studies found a lower incidence of AN in smokers than in non-smokers. Only four did not show significant differences in the incidence of AN between smokers and non-smokers. These findings suggested that nicotine acts as a substance with a marked neuroprotective effect - preventing degeneration and death of neurons and reducing the formation of neurotoxic beta-amyloid. Nicotine administration improved cognitive abilities in patients with AN but did not affect their long-term memory.

8. Amphetamines - stimulants, substances used to treat narcolepsy or loss of attention in ADHD. At the same time, however, they are also used as a recreational drug. What is the slang name of this drug starting with the letter S? [0,5 p]

SPEED

9. In what chemical form are these substances most often used? [0,5 p]

They occur the most often as salts, most often sulphates.

additional information about MDMA:

This drug – SPEED = MDMA is a synthetic drug that acts as a stimulant and hallucinogen. It produces an energizing effect, distortions in time and perception, and enhanced enjoyment from sensory experiences. It has also been described as an entactogen—a drug that can increase self-awareness and empathy.

MDMA affects the brain by increasing the activity of at least three neurotransmitters (the chemical messengers of brain cells): serotonin, dopamine, and norepinephrine. Like other amphetamines, MDMA enhances release of these neurotransmitters and/or blocks their reuptake, resulting in increased neurotransmitter levels within the synaptic cleft (the space between the neurons at a synapse).

10. The stimulatory effect of this drug (MDMA) is primarily the inhibition of catecholamine depletion in the brain as well as their release from cells. List at least two known catecholamines and the place where these hormones are produced in the human body. [2 p]

adrenaline / epinephrine, noradrenaline / norepinephrine, dopamine; those hormones are produced in the adrenal medulla

11. Other stimulants of the new age are substances called AMPAkinases, such as CX717 or ampalex. Both substances are still in the clinical testing phase. What are the advantages of using these memory-promoting substances? [2 p]

They have no effect on the mechanism of sleep, do not affect the periphery, have no potential for addiction.

12. AMPAkinases are a class of pharmacological agents that act as positive modulators of AMPA receptors. The AMPA receptor is an ionotropic transmembrane receptor for the sodium salt of one of the essential amino acids. What substance are we talking about? [1 p]

glutamate