

HLENKA *Dictyostelium discoideum*: MODELOVÝ SYSTÉM NEJEN PRO BIOLOGY ***JITKA ČEJKOVÁ**

Ústav chemického inženýrství, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
jitka.cejkova@vscht.cz

Klíčová slova: *Dictyostelium discoideum*, cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP), excitabilní médium, Bělousova-Žabotinského reakce

Obsah

1. Úvod
 - 1.1. Životní cyklus hlenky *Dictyostelium discoideum*
 - 1.2. *Dictyostelium discoideum* jako modelový systém
 - 1.3. Šíření excitačních vln
2. Experimentální studium hlenky *Dictyostelium discoideum*
 - 2.1. Pěstování buněk
 - 2.2. Příprava buněk
 - 2.3. Snímání a vyhodnocování experimentů
 - 2.4. Výsledky experimentálního pozorování vývoje hlenky *Dictyostelium discoideum*
 - 2.5. Vliv externích stimulů na agregaci hlenky *Dictyostelium discoideum*
3. Závěr

1. Úvod

Existuje řada chemických a biologických systémů, ve kterých jsou studovány nelineární dynamické jevy, jako jsou oscilace, excitabilita, chaos, tvorba disipativních struktur nebo šíření vln. Na Ústavu chemického inženýrství se během své vědecké kariéry této problematice věnovala Ing. Hana Ševčíková, CSc., které je tento článek věnován. Soustředila se především na výzkum excitability a šíření koncentračních vln ve dvou chemických a jednom

biologickém systému. Prvním z nich byla reakce Bělousova a Žabotinského, při níž dochází k oscilacím a vzniku koncentračních vln typu pulsu, které se mohou periodicky šířit systémem^{1–8}. Druhý studovaný systém poskytl oxidace kyseliny arsenité jodičnanovými ionty, která tvoří reakční prostředí umožňující šíření koncentračních vln typu fronta^{9–14}. Cílem zkoumání biologického systému představeného populací buněk hlenky *Dictyostelium discoideum*, u něhož dochází k šíření excitačních vln cyklického adenosin-3',5'-monofosfátu (cAMP), bylo posoudit, do jaké míry lze nebo nelze chování biologických systémů pochopit na základě znalostí o chemických systémech^{15–19}.

Předložená práce je zaměřena pouze na třetí z výše zmíněných systémů, čtenáři tedy budou seznámeni s hlenkou *Dictyostelium discoideum*, detailně bude popsán její zajímavý životní cyklus a princip šíření vln cAMP. Zmíněno bude také využití tohoto modelového systému při studiu některých biologických pochodů (např. chemotaxe, diferenciací buněk, signálních transdukčních drah). Budou ukázány výsledky experimentálního pozorování vývoje hlenky *Dictyostelium discoideum* za přirozených podmínek, podrobněji se zaměříme na agregační fázi vývoje a šíření vln cAMP. Dále budou shrnuty výsledky experimentů výzkumné skupiny Hany Ševčíkové a jejích studentů, které souvisely s ovlivňováním agregace buněk vnějšími stimuly (elektrické pole¹⁶, organické látky^{20–23}, cAMP¹⁹ a 2',3'-*O*-isopropylidenadenosin (IPA)¹⁸ v agaru).

1.1. Životní cyklus hlenky *Dictyostelium discoideum*

Hlenky jsou eukaryotické mikroorganismy všudypřítomné na vlhkých a stinných místech v půdách mírného pásu²⁴. Dosud bylo popsáno asi 60 druhů, z nichž nejvíce studovaným druhem jsou hlenky *Dictyostelium discoideum*. Buňky *Dictyostelium discoideum* mají vlastnosti buněk jak z rostlinné, tak i živočišné říše. Stejně jako rostlinné buňky produkují celulosu a tvoří spóry. S živočišnými buňkami je spojuje schopnost pohybu a kolektivního chování. *Dictyostelium* bylo poprvé pozorováno Oskarem Brefeldem roku 1869. Svůj název získalo podle zesíťovaných struktur během agregace (dicty – zesíťovaný) a vzpřímené plodnice (stelium – věž).

Hlenky jsou buňky měňavkovitého tvaru o velikosti asi 10 μm. Ve své vegetativní fázi života se volně pohybují

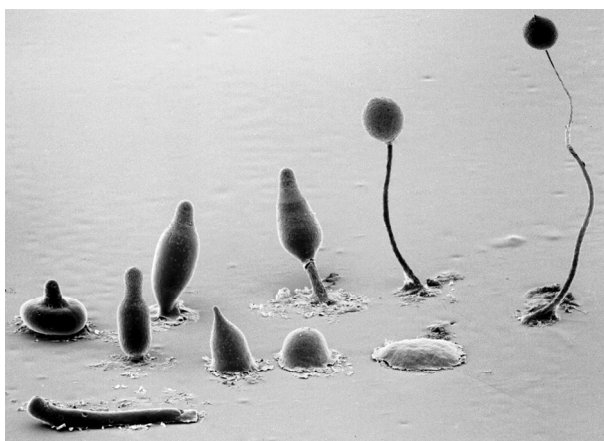
* Tento článek bych chtěla jménem svým a jménem zaměstnanců a studentů Ústavu chemického inženýrství VŠCHT v Praze věnovat Hance Ševčíkové, kolegyni, která dokázala vždy ochotně pomoci a měla spoustu elánu do práce, školitelce, která nikdy neztrácela víru v úspěch svých svěřenců, kamarádce, která vždy uměla povzbudit a zvednout náladu, organizátorce, která dokonale připravila každou oslavu či besídku, člověku, který dokázal se vším bojovat. Bohužel boj s těžkou nemocí Ing. Hana Ševčíková, CSc. prohrála dne 23.9.2006. 23.7.2013 by Hanka oslavila své šedesáté narozeniny.

jako samostatní jedinci, živí se bakteriemi a rozmnožují se dělením. V případě, že se veškerá potrava z jejich okolí vyčerpá, mají buňky *Dictyostelium discoideum* na rozdíl od ostatních druhů z rodiny hlenek pouze dvě možnosti, jak přežít. Buď pohlavním způsobem vytvořit mnohobuněčné makrocysty, nebo nepohlavně vytvořit plodnici nesoucí spóry. Ostatní druhy mohou ještě nepohlavním způsobem vytvářet jednobuněčné mikrocysty. Nejvíce studovaným způsobem je tvorba plodnice a spór, protože jsou na něm ukázány základy vývoje mnohobuněčných organismů a principy mezibuněčné komunikace, díky níž se statisíce buněk začnou chovat jako organizované společenství. V následujícím se zaměříme pouze na tento způsob přežívání hlenek (obr. 1).

Když je v okolí buněk nedostatek živin a buňky začnou hladovět, nastupuje morfogenetická fáze, během níž buňky nepotřebují potravu a čerpají ze zásob nahromaděných během vegetativního období. U hladovějících buněk dochází k inaktivaci genů potřebných pro růst a jsou aktivovány jiné geny – důležité pro morfogenezi. Buňky získávají schopnost syntetizovat a rozpoznávat cAMP, odpovídat na jeho signály a odbourávat ho.

Během rané agregační fáze, která nastává mezi čtvrtou a šestou hodinou od počátku hladovění, některé buňky začnou syntetizovat cAMP a periodicky ho každou pátou až sedmou minutu v pulzech vysílat do okolí. Vyloučený cAMP difunduje k nejbližším buňkám a ty reagují na přísun cAMP díky receptorům citlivým k cAMP dvojitým způsobem. Zprvu se buňky začnou pohybovat proti koncentračnímu spádu (tedy ke zdroji cAMP) pohybem označovaným jako pozitivní chemotaxe a zadruhé buňky začnou produkovat další cAMP, který pak difunduje k buňkám dále od zdroje. Periodickým opakováním těchto dějů se buňky postupně shromáždí v agregačním centru.

Ze 100 000 hladovějících buněk se vytvoří mnohobuněčný, relativně plochý agregát s neostrými hranicemi, který se přemění do tzv. „kupky“ hemisférického tvaru, jež



Obr. 1. Životní cyklus hlenky *Dictyostelium discoideum*. (Autorem snímků z elektronového mikroskopu je M. J. Grimson a R. L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University)

prodělá úchvatné změny. Nejprve se na ní objeví špička, která roste do výšky a připomíná prst (někdy se tato fáze také nazývá „stojící slimák“), poté se skácí na podklad a v podobě plazícího se slimáka (pseudoplasmodium) se stěhuje za světlem, než dosáhne oblasti, kde jsou vhodné podmínky k vytvoření plodnice (houbičky). Zhruba 20 % buněk je určeno k vytvoření stonku, tudíž předurčeno k zániku. Ze zbývajících buněk se ztrátou vody a vytvořením obalu stanou spóry, které ve vrcholu plodnice dokáží přežít nepříznivé podmínky. Za nějaký čas se spóry uvolní do okolí a v případě dostatku potravy nabobtnají, přemění se v buňky a opět nastává vegetativní fáze životního koloběhu hlenek. Buňky se množí, živí a volně pohybují, dokud se opět nevyčerpá potrava z jejich okolí. Pak jsou hladovějící buňky nuceny znovu agregovat a zopakovat výše popsany vývojový cyklus.

Z uvedeného vyplývá, že hlenku můžeme řadit jak mezi jednobuněčné, tak mezi mnohobuněčné organismy. K vývoji složitějšího, mnohobuněčného organismu (houbičky) je zapotřebí, aby se populace původně samostatných, identických vegetativních buněk chovala jako spolupracující kolektiv, kde jsou jasně definované úkoly pro všechny členy populace.

1.2. *Dictyostelium discoideum* jako modelový systém

Hlenka *Dictyostelium discoideum* je výborným modelovým systémem, který je zkoumán z různých pohledů v širokém spektru vědních oborů²⁵. Zabývají se jím především biologové, např. molekulární, buněční a vývojoví biologové, genetici nebo biochemici. Tento organismus je vhodný k popisu cytokineze, pohyblivosti buněk²⁶, fagocytózy²⁷, chemotaxe²⁸, buněčné diferenciaci²⁹, adheze³⁰, signálních transdukčních drah, mezibuněčné komunikace, vývoje mnohobuněčného organismu z jednotlivých buněk³¹ a dalších dějů. Při pochopení pochodů odehrávajících se u hlenky *Dictyostelium discoideum* můžeme lépe porozumět i pochodům objevujícím se u vyšších organismů. Výhodou studia hlenky *Dictyostelium discoideum* je např. její jednoduchá stavba, krátká reprodukční doba, a tedy možnost připravit velké množství buněk v krátkém čase, dále relativně jednoduchý genetický kód, a tudíž možnost snadno popsat genom a připravit různé mutanty.

Na hleně *Dictyostelium discoideum* se např. pozoruje vzájemná soudržnost buněk a jejich přilnavost k substrátu³². Mnoho buněk se dokáže plazivými pohyby přemísťovat na delší vzdálenosti nebo přes překážky. Stejně jako se hlenky dokážou rychle pohybovat během chemotaktické agregace, tak se leukocyty dostávají přes překážky k místům svého působení nebo se nádorové buňky odpojují ze svého primárního místa a přemísťují se do jiných částí těla.

Savčí buňky mají schopnost rozpoznat hustotu buněk ve svém okolí, což hraje důležitou roli při řízení růstu buněk a jejich diferenciaci³³. Bez této schopnosti by nebylo možné u vyvíjejícího se embrya správné roztřídění zárodečných buněk do různých typů budoucích tkání. Během vývoje si buňky v embryu vyměňují signály, aby si rozděl-

lily, kterou specializovanou funkcí bude každá z nich zastávat, jakou polohu zaujme a zda bude dál žít nebo umře či se rozdělí. Studium této diferenciace přímo u savčích buněk je obtížné kvůli jejich složitosti, a proto se tyto procesy zkoumají na jednoduchém organismu jako je hlenka *Dictyostelium discoideum*. Hladovějící buňky *Dictyostelium discoideum* se v určité fázi svého vývojového cyklu diferencují na stonkotvorné a sporotvorné a tím si rozdělují úlohy a umístění v budoucím mnohobuněčném útvaru – plodnici. Některé buňky zahynou a vytvoří stonek a hlavičku houbičky, jiné vytvoří spory a jsou naopak nositelkami života příštích generací hlenky.

Hlenka *Dictyostelium discoideum* je fascinujícím organismem nejen pro biologie, ale i pro fyziky a chemiky³⁴. Během agregační fáze se objevují obrazce podobné obrazcům vyskytujícím se u reakce Bělousova-Žabotinského. B. P. Bělousov objevil v 50. letech 20. století oscilace koncentrace katalyzátoru (ionty ceru) při oxidační reakci kyseliny citrónové bromičnanem. A. M. Žabotinský později pokračoval ve studiu tohoto typu neobvyklých chemických reakcí a od té doby se skupina takových reakcí označuje jako BZ reakce. BZ reakce jsou hojně zkoumány, jak experimentálně, tak teoreticky matematickým modelováním, protože ukazují řadu typů nelineárního dynamického chování. Biologický systém hlenky *Dictyostelium discoideum* má po formální stránce mnoho společného s chemickým BZ systémem a je tedy studován i z pohledu nelineární dynamiky.

1.3. Šíření excitačních vln

Excitabilní médium je nelineární dynamický systém, který má schopnost šířit vlny a nepodporovat vznik dalších vln, dokud se systém nezregeneruje do původního stavu. Jak bylo zmíněno výše, takovýmto systémem je i vrstva hladovějících buněk *Dictyostelium discoideum*. Než si popíšeme princip šíření vln cAMP u *Dictyostelia discoidea*, definujeme si základní pojmy týkající se excitabilních systémů a jako velice jednoduchý příklad si uvedeme požár v lese.

Prvky excitabilního média se mohou vyskytovat v jednom ze tří stavů: excitabilním, excitovaném a nebo refrakterním. Excitabilní prvky jsou v relativním klidu, ale mohou být vnějšími vlivy převedeny do stavu excitovaného. Na příkladu požáru v lese excitabilní stav odpovídá klidovému období, kdy nic nehoří. Excitací je myšlen impuls, v našem příkladu lesa jeho zapálení, který uvede systém do excitovaného stavu. Excitabilní prvky se dostávají do excitovaného stavu poté, co se staly excitovanými prvky v jejich sousedství. Stromy začnou hořet, až když se na ně přenese oheň z okolních stromů. V excitovaném stavu setrvává systém pouze určité období, potom nastává takzvaná refrakterní fáze. Na jejím počátku je systém vůči dalším impulsům zcela imunní (absolutní refrakterita). Pokud v lese všechno shořelo, nemůže se tam šířit další požár. Následující část refrakterní fáze spočívá v návratu systému do původního stavu, les se regeneruje, začínají růst nové stromy a systém se postupně znovu stává excita-

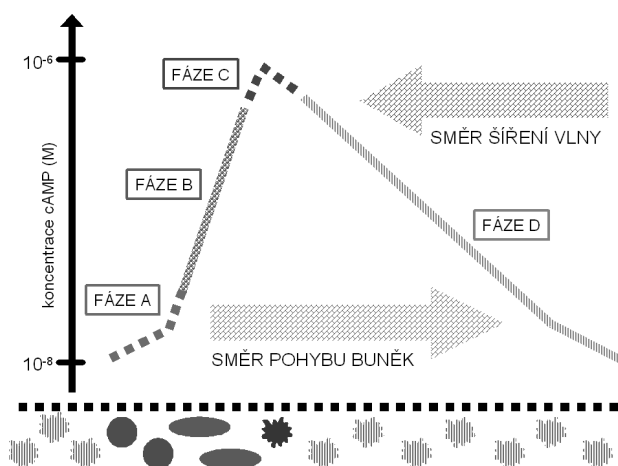
bilním, tedy schopným šířit další vlny.

Podle toho, zda se vlny šíří po křivce nebo po ploše, je rozdělujeme na jednorozměrné nebo dvourozměrné. Příkladem jednorozměrné vlny je tzv. mexická vlna, kterou je možno pozorovat na stadionech při různých sportovních utkáních. Dvourozměrné vlny mohou mít různé tvary, základními typy jsou vlny kruhové a spirálové. Kruhové vlny se šíří z jednoho bodu všemi směry, příkladem může být výše popsaný požár v lese. Např. nedopalek cigarety uvnitř lesa může způsobit vznik požáru a jeho následné šíření směrem k hranicím lesa. Spirálové vlny také vznikají v jednom bodě, ale šíří se ve formě spirál. Tímto způsobem se např. šíří patologické vzruchy po srdečním svalu.

Hojně studovaným chemickým excitabilním systémem jsou média Bělousova – Žabotinského. Oscilační barevné změny při těchto redoxních reakcích lze pozorovat buď v míchaném vsádkovém systému, např. v kádince, nebo v nemíchaném médiu, např. na Petriho misce.

Vrstva hladových buněk *Dictyostelium discoideum* nanesených na agar je příkladem biologického excitabilního média. Excitabilní buňky setrvávají v relativním klidu, dokud nejsou vnějšími silami z tohoto stavu vybudeny. Vnějšími silami je myšlena koncentrační perturbace, čili zvýšení koncentrace signální látky (cAMP). Buňka se stává excitovanou po navázání cAMP, který se k ní dostal difúzí od sousedních buněk, na povrchové receptory citlivé k cAMP. Buňky v excitovaném stavu mají aktivovaný aparát pro tvorbu dalšího cAMP, který je částečně uvnitř buňky odbouráván enzymem buněčnou fosfodiesterasou a částečně vylučován do okolí buňky. Po několika minutách dosahuje koncentrace extracelulárního cAMP hodnoty řádově 10^{-6} M, buňky jsou vystaveny trvalému stimulu cAMP a dostávají se do stavu absolutní refrakterity. Mají obsazeny všechny receptory, nejsou schopny přijímat signál a ani na něj reagovat. Extracelulární cAMP postupně difunduje k sousedním buňkám nebo je odbouráván extracelulární fosfodiesterasou a jeho koncentrace v okolí buněk klesá. Receptory se stávají znovu citlivými k vnějším podnětům a buňky se pozvolna dostávají opět do excitabilního stavu. Jsou znovu připraveny reagovat a vyčkávají na další signál cAMP. Po několika minutách se na receptory naváže další cAMP a cyklus se opakuje.

Výše popsaný mechanismus šíření vln je schematicky znázorněn na obr. 2, kde je postup vlny z hlediska tvaru buněk rozdělen do čtyř fází. Ve fázi A buňky detegují cAMP signál, omezuje se tvorba panožek, buňky se zakulacují a začínají svůj pohybový aparát polarizovat směrem ke zdroji chemoatraktantu. V místech rostoucího gradientu cAMP (fáze B) jsou buňky excitované, protahují se a vykonávají rychlý organizovaný pohyb přímo ke zdroji chemoatraktantu. Zároveň buňka sama produkuje cAMP. Fáze C nastává v místech s nejvyšší koncentrací cAMP (cca 10^{-6} M) a odpovídá počátku refrakterního období. Buňky se zastavují, přestávají vykonávat pohyb ke zdroji cAMP, depolarizují se a začínají opět vytvářet panožky. Ve fázi D gradient cAMP klesá, fosfodiesterasou se postupně odbourává cAMP, receptory se stávají opět aktivními, buňky jsou asymetrické, jakoby rozčuchané, panožky



Obr. 2. Schematické znázornění reakce buněk na přicházející vlnu cAMP

vyčnívají do všech stran a buňky se pohybují neorganizovaně.

Neorganizovaný migrační pohyb měňavkovitých buněk hlenky se děje náhodně všemi směry rychlostí přibližně $6 \mu\text{m min}^{-1}$. Pohyb buněk v přítomnosti gradientu cAMP je orientovaný a děje se ve směru rostoucí koncentrace cAMP. V jeho průběhu se buňka prodlužuje, vytváří dlouhé panožky a pohybuje se řádově rychleji než při pohybu neorganizovaném – rychlostí přibližně $30 \mu\text{m min}^{-1}$. Protože je tento pohyb vyvolán přítomností chemické látky v okolí buňky, nazývá se chemotaxí. Během agregace do kupky urazí buňky vzdálenost až 2 cm.

Vrstvou buněk na agaru se šíří kruhové nebo spirálové vlny a to v závislosti na plošné hustotě buněk. Při nižších hustotách se na miskách neobjevují žádné spirály a chemotaktické shlukování je řízeno vysíláním kruhových vln z agregačních center, zatímco při vyšších plošných hustotách dominují na miskách vlny spirálové, vycházející z agregačních center. Spirálové vlny se také mohou tvořit z porušených vln kruhových, a proto je možno během jednoho experimentu pozorovat oba typy vln, nejprve kruhové vlny, které později přecházejí ve vlny spirálové³⁵.

2. Experimentální studium hlenky *Dictyostelium discoideum*

2.1. Pěstování buněk

Všechny experimenty byly provedeny s axenickým kmenem hlenky *Dictyostelium discoideum* AX2. Buňky byly pěstovány z rozmrazených spor (uskladněných při -20°C) a kultivovány za sterilních podmínek v živném médiu HL5 v temné komoře při teplotě 21°C za neustálého promíchávání na automatické třepačce. Buňky byly sklizeny v exponenciální fázi růstu.

2.2. Příprava buněk

Suspenze buněk a živného média byla odseparována v centrifuze. K odstředěnému peletu buněk bylo přidáno cca 30 ml fosfátového pufru ($14,7 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, pH 6,14), směs byla jemně propláchnuta špičkou pipety a opět vložena do odstředivky. Po dalším promytí byla spočítána koncentrace buněčné suspenze a naředěna fosfátovým pufrům na koncentraci $5 \cdot 10^6$ b./ml. Na jednu Petriho misku (průměr 8,4 cm) s NN-agarem (0,5 % agaru ve fosfátovém pufru, 2 mM kofeinu) bylo naneseno 6,8 ml takto připravené buněčné suspenze. Misky byly ponechány asi 15 min v klidu, během této doby si buňky sedly, a pak byla rychlým otočením misky o 180° slita přebytečná kapalina. Petriho misky byly umístěny do temné komory, kde bylo pozorováno chování buněčné vrstvy.

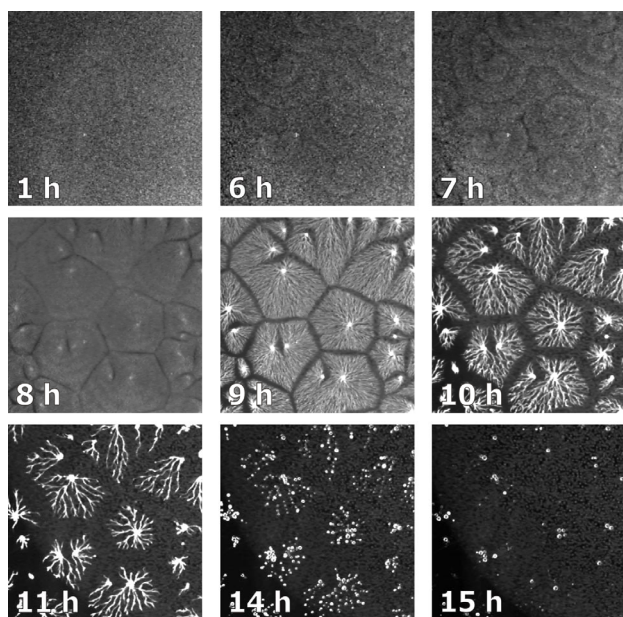
2.3. Snímání a vyhodnocování experimentů

Základem pro snímání experimentů byl optický přístroj (inverzní mikroskop s fázovým kontrastem nebo makrooptika pro snímání v temném poli), dále kamera a počítač vybavený programem pro obrazovou analýzu Lucia. Misky s buněčnou vrstvou na agaru se začínaly snímat zhruba jednu hodinu od počátku hladovění v časových intervalech 1 min. Celková doba snímání se pohybovala okolo 24 hodin.

Periodický vznik a šíření pulsů cAMP vrstvou buněk byl monitorován pouze nepřímo s využitím tzv. metody temného pole, založené na rozdílných optických vlastnostech buněk v místech s rozdílnými koncentracemi cAMP. cAMP se za přirozených podmínek vrstvou hladovějících agregujících buněk šíří ve formě koncentračních vln. Tyto vlny je možno dosud pozorovat pouze zprostředkovaně optickou metodou temného pole na základě faktu, že buňky vykonávající organizovaný pohyb ke zdroji cAMP mají protáhlý tvar a lámou světelné paprsky pod jiným úhlem než ostatní buňky. Rozdíly v optických hustotách se na snímcích pořízených touto metodou projevují tak, že pohybující se buňky se jeví jako světlé oblasti na tmavém podkladu. S využitím metody založené na izotopovém značení bylo dokázáno³⁶, že vlny pohybujících se buněk souhlasí s nejvyššími koncentracemi cAMP (10^{-6} M), tedy vlnami cAMP.

2.4. Výsledky experimentálního pozorování vývoje hlenky *Dictyostelium discoideum*

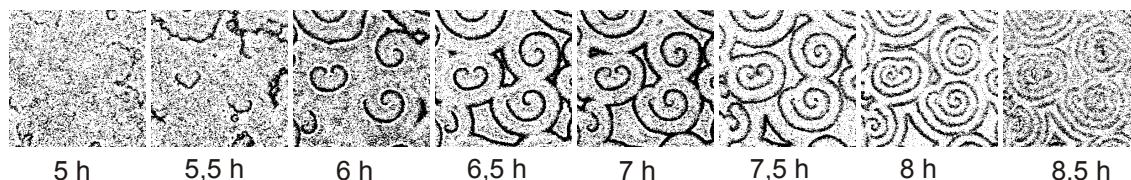
Průběh agregační fáze vývoje hlenky *Dictyostelium discoideum* sledovaný optickou metodou temného pole je zachycen na obr. 3. Několik hodin od počátku hladovění se na snímcích vyskytovala homogenní vrstva buněk. Kolem páté hodiny se na miskách objevovaly první vlny neurčitých tvarů, které se postupně přeměnily v pravidelné spirály. Okolo osmé hodiny se začaly vytvářet hranice teritorií a vrstva se rozpadla na agregační teritoria. V jednotlivých teritoriích se utvořily proudy shlukujících se buněk do



Obr. 3. **Agregační fáze vývojového cyklu hlenky *Dictyostelium discoideum* zaznamenaná technikou temného pole.** V čase 1 h homogenní vrstva hladovějících buněk na agaru, okolo 6 h první vlny cAMP, 7 h pravidelné spirálové vlny cAMP, 8 h rozpad na agregační teritoria, 9–11 h proudy shlukujících se buněk, 15 h kupky, stojící slimáci. Časy uváděny vzhledem k počátku hladovění buněk. Velikost obrázků $1,9 \times 1,9$ cm

agregačních center. Proudly byly zpočátku velice tenké a dlouhé, ale postupem buněk směrem do centra shlukování mohutněly a krátily se. Zhruba čtrnáct hodin od počátku hladovění byla miska pokryta kupkami, z nichž se většina do 24 h od počátku hladovění přeměnila v houbičky.

Programem Lucia byly obrázky z temného pole upraveny a byly zvýrazněny vlny cAMP (obr. 4). Dále byly vytvořeny časoprostorové grafy a z nich vyhodnoceny parametry šíření vln. Průměrná rychlost šíření vln v čase klesala z počáteční hodnoty $0,31 \text{ mm min}^{-1}$ na konečnou $0,17 \text{ mm min}^{-1}$. Perioda šíření vln měla také klesající tendenci, zpočátku se pohybovala kolem 7,3 min a při dozívání vlnění činila asi 4,3 min. Agregační fáze trvala zhruba 3–4 hodiny a ke shromáždění buněk z agregačního teritoria do kupky bylo zapotřebí asi 30 vln.



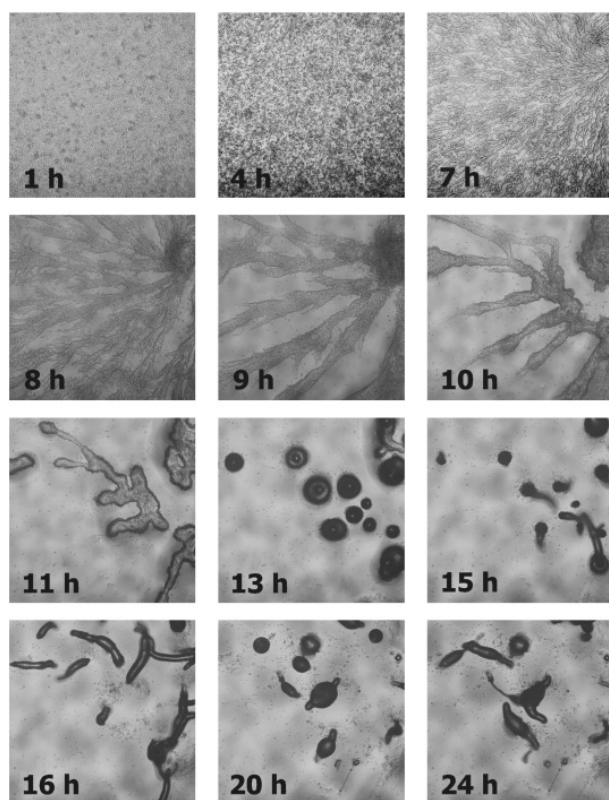
Obr. 4. **Vlny cAMP v průběhu agregační fáze vývoje hlenky.** Snímky pořízené technikou fotografie v temném poli (viz obr. 3) jsou počítačově zpracovány pro získání lepší viditelnosti vln. Časy uváděny vzhledem k počátku hladovění buněk. Velikost obrázků $1,5 \times 1,5$ cm

Na obr. 5 je zachycen vývoj buněk za přirozených podmínek na snímcích z mikroskopu. Po nanesení buněk na agar se vytvořila homogenní vrstva a jednotlivé buňky se pohybovaly náhodně, neorganizovaně, všemi směry. Kolem sedmé hodiny od počátku hladovění se buňky začínaly sdružovat do tenkých řetízků, jejichž spojováním vznikly proudy směřující do agregačního centra. Tento proces trval zhruba do jedenácté hodiny, kdy se vytvořily velké agregáty, které se během dvou hodin rozpadly na kupky. Kupky postupně rostly do výšky a kolem patnácté hodiny se dostaly do stádia stojícího slimáka. Stojící slimáci se skáceli na agar a kolem šestnácté hodiny se po misce pohybovali plazící se slimáci. Kolem dvacáté hodiny se někteří slimáci zastavili a postupně přeměňovali v houbičky. V době 24 hodin od počátku hladovění se vyskytovalo na misce pouze několik houbiček, kolem dvacáté šesté hodiny už byla celá miska pokryta houbičkami a vývojový cyklus byl ukončen.

2.5. Vliv externích stimulů na agregaci hlenky *Dictyostelium discoideum*

Výzkum excitabilního biologického systému hlenky *Dictyostelium discoideum* se v laboratorii Hanky Ševčíkové ubíral několika směry. Velká část výsledků experimentální práce souvisela s vlivem přiloženého elektrického pole na šíření koncentračních vln cAMP během agregační fáze vývoje hlenky¹⁶. Další oblastí výzkumu byla spolupráce s Ústavem organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, kde byly vyvíjeny barevné indikátory cAMP na bázi makrocyclických sloučenin a azopeptidů. Úkolem bylo testovat biokompatibilitu daných látek (organická rozpouštědla²⁰, pryskyřičné nosiče s navázaným azobarvivem²¹, bezfosfátové pufr^{22,23}) s buňkami hlenky *Dictyostelium discoideum*.

Dále se skupina Hany Ševčíkové zabývala experimentálním studiem atypické agregace hladovějících buněk *Dictyostelium discoideum* ovlivněných cAMP (cit.^{19,37}) a jeho derivátem IPA (cit.^{18,37}). Přídavek těchto substancí v různých koncentracích do agaru, nosného substrátu neobsahujícího žádné živiny, na který se nanášely hladové buňky, modifikuje průběh agregační fáze vývoje ve srovnání s průběhem za přirozených podmínek. Navázáním těchto látek na buněčné receptory jsou dosud neobjasněným způsobem vyvolány jiné mechanismy umožňující agregaci a dokončení vývojového cyklu. Dochází tím také



Obr. 5. Vývoj hlenky *Dictyostelium discoideum* zaznamenaný inverzním mikroskopem s fázovým kontrastem. V čase 1 h rovnoměrně rozmístěné hladovějící buňky na agaru, od 7 h proudy shlukujících se buněk, 11 h agregáty, 13 h kupky, 15 h stojící slimáci, 16 h plazící se slimáci, 24 h první houbičky. Časy uváděny vzhledem k počátku hladovění buněk. Velikost obrázků $1,75 \times 1,75$ mm

k ovlivnění excitability, vzniku a šíření koncentračních vln cAMP, chemotaxe, agregace a následného vývoje.

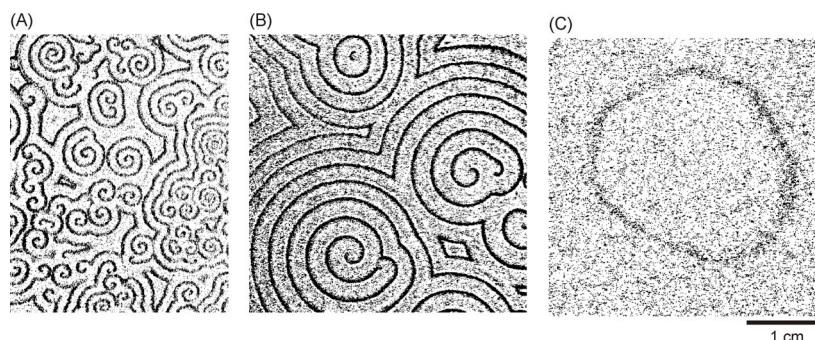
U experimentů s IPA v agaru byla jedním z rozdílů od přirozeného chování tvorba spirálových vln s většími vlno-

vými délkami. Zatímco za přirozených podmínek se spirálová vlna šíří na ploše několika milimetrů čtverečních (obr. 6A), vlny na agarech obsahujících IPA měly v průměru i několik centimetrů (obr. 6B). Dalším rozdílem bylo netypické druhé vlnění (periodické vysílání malých kruhových vln), které se objevovalo po odeznění spirál, vedoucí k rozpadu buněčné vrstvy na miniteritoria, v nichž se buňky na rozdíl od přirozeného chování shlukovaly atypicky bez tvorby proudů.

Hlavními znaky experimentů s buňkami ovlivněnými cAMP v agaru byly (i) vznik a šíření globální vlny (pro koncentrace cAMP v agaru 0,0625–4,5 mM), (ii) posunutý začátek tvorby excitačních vln (koncentrace menší nebo rovny 1 mM), (iii) vymizení typického cAMP vlnění a netypické shlukování buněk bez tvorby proudů (v koncentračním rozmezí 2–4,5 mM) a (iv) nedokončení vývoje do stádia houbičky (při koncentracích vyšších než 5 mM). Zajímavým poznatkem experimentů s cAMP v agaru byla globální vlna (obr. 6C), která se nikdy neobjevuje u experimentů s přirozenými buňkami. Tato atypická vlna vzniká na misce vždy pouze jedna přibližně ve středu misky a šíří se k okrajům misky přibližně stejnou rychlostí. Čas vzniku globální vlny a rychlost jejího šíření závisí na koncentraci cAMP v agaru. Při nízkých koncentracích cAMP v agaru se globální vlna objevuje dříve a šíří se větší rychlostí než při koncentracích vyšších. Její šíření souvisí s odbouráváním cAMP přidaného do agaru pomocí enzymu fosfodiesterasy.

3. Závěr

Zkoumání průběhu agregační fáze vývoje hlenky *Dictyostelium discoideum* se několik let věnovala Biolaborator Ústavu chemického inženýrství VŠCHT Praha založená Ing. Hanou Ševčíkovou, CSc. Na první pohled by se mohlo zdát, že popis dynamického chování hlenky *Dictyostelium discoideum* za přirozených podmínek, i za podmínek pro hlenku v přírodě neobvyklých, s chemickým inženýrstvím nesouvisí, ale ve skutečnosti právě chemicko-inženýrská metodika umožňuje pochopit analogie mezi



Obr. 6. Porovnání koncentračních cAMP vln za přirozených podmínek (A) a na agaru s přídavkem 2 mM IPA (B). Globální vlna na agaru s přídavkem 2 mM cAMP (C). Snímky pořízené technikou fotografie v temném poli počítačově zpracovány pro získání lepší viditelnosti vln

fungováním biologických a chemických systémů.

Studium uvedeného systému zahrnuje stejně jako jiné chemicko-inženýrské práce jak metody experimentální, tak metody matematického modelování. Pro konstrukci experimentálních zařízení se využívají technologie reaktorového inženýrství a pro matematický popis daného systému se aplikují rovnice materiálové bilance. Hojně se uplatňují i základní poznatky o chování autokatalytických reakcí v nemíchaných tenkých vrstvách reakčního média a výsledcích společného působení difuzního transportu složek a autokatalytické reakce.

Hlenka *Dictyostelium discoideum* je intenzivně studovaným mikroorganismem, který prodělává přechod od jednobuněčného organismu k mnohobuněčnému za relativně krátkou dobu. Pro svou jednoduchou stavbu, krátkou regenerační dobu a pro svůj jednoduchý genetický kód je hlenka vhodným modelovým systémem pro studium mnoha biologických pochodů (chemotaxe, cytokineze, signálních transdukčních drah, diferenciací buněk a dalších). Během agregační fáze dochází ke shlukování buněk zprostředkovanému pulzy cAMP, které se šíří vrstvou buněk ve formě koncentračních vln, a proto je agregace hlenky *Dictyostelium discoideum* zkoumána i chemickými inženýry z pohledu nelineární dynamiky.

Hlenka *Dictyostelium discoideum* může posloužit také jako vzor pro inženýry, kteří se snaží navrhnout a vyrobit tzv. chemické roboty³⁸. Chemického robota si lze představit jako umělou buňku se schopností autonomního pohybu, látkové výměny, zpracovat absorbované molekuly chemickými reakcemi a cíleně vylučovat produkty. Takovéto inteligentní částice o velikosti v řádu desítek mikrometrů by měly být schopny mezi sebou „komunikovat“ pomocí chemických signálů stejně jako se hlenky dorozumívají pomocí cAMP. Podobně jako hlenky se musí chovat kolektivně, aby přežily nepříznivé období, stejně tak je kolektivní chování vyžadováno i u chemických robotů, aby dokázaly vykonat cílovou misi. Mnoho vlastností hlenky *Dictyostelium discoideum* slouží jako zdroj inspirace pro přípravu chemických robotů a ovládat hejna chemických robotů („umělých hlenek“) by našlo uplatnění např. při cíleném doručování a vylučování léčiv.

LITERATURA

- Ševčíková H., Marek M.: J. Phys. Chem. 88, 2181 (1984).
- Ševčíková H., Marek M.: Physica D 39, 15 (1989).
- Ševčíková H., Marek M., Müller S. C.: Science 257, 951 (1992).
- Kosek J., Ševčíková H., Marek M.: J. Phys. Chem. 99, 6889 (1995).
- Ševčíková H., Schreiber I., Marek M.: J. Phys. Chem. 100, 19153 (1996).
- Ševčíková H., Kosek J., Marek M.: J. Phys. Chem. 100, 1666 (1996).
- Pornprompanya M., Müller S. C., Ševčíková H.: Phys. Chem. Chem. Phys. 4, 3370 (2002).
- Pornprompanya M., Müller S. C., Ševčíková H.: Chem. Phys. Lett. 375, 216 (2003).
- Ševčíková H., Marek M.: Physica D 13, 379 (1984).
- Ševčíková H., Marek M.: J. Phys. Chem. 88, 2181 (1984).
- Merkin J. H., Ševčíková H.: Phys. Chem. Chem. Phys. 1, 91 (1999).
- Forstová L., Ševčíková H., Marek M., Merkin J. H.: Chem. Eng. Sci. 55, 233 (2000).
- Forstová L., Ševčíková H., Marek M., Merkin J. H.: J. Phys. Chem. A 104, 9136 (2000).
- Forstová L., Ševčíková H., Merkin J. H.: Phys. Chem. Chem. Phys. 4, 2236 (2002).
- Lindner J., Ševčíková H., Marek M.: Phys. Rev. E 6304, 1904 (2001).
- Šebestíková L., Slámová E., Ševčíková H.: Biophys. Chem. 113, 269 (2005).
- Godula T., Ševčíková H., Merkin J. H.: J. Theor. Biol. 240, 136 (2006).
- Hilgardt C., Čejková J., Hauser M. J. B., Ševčíková H.: Biophys. Chem. 132, 9 (2008).
- Ševčíková H., Čejková J., Krausová L., Příbyl M., Štěpánek F., Marek M.: Physica D 239, 879 (2010).
- Čejková J.: Testování biokompatibilitě organických rozpouštědel s hlenkou *Dictyostelium discoideum*. SVK2004 VŠCHT Praha (2004).
- Čejková J.: Testování biokompatibilitě porfyrinů, azobarviv a pryskyřic s hlenkou *Dictyostelium discoideum*. SVK2005 VŠCHT Praha (2005).
- Pavlík J.: Vliv heterocyklických sulfonových kyselin na agregaci buněk hlenky *Dictyostelium discoideum*. SVK2006 VŠCHT Praha (2006).
- Šmidová K.: Pozorování buněk *Dictyostelium discoideum* za nestandardních podmínek. SVK2006 VŠCHT Praha (2006).
- Kessin R. H.: *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity*. Cambridge University Press, Cambridge 2001.
- Annesley S., Fisher P.: Mol. Cell. Biochem. 329, 73 (2009).
- Selmececi D., Li L., Pedersen L.I.I., Nrelykke S.F., Hagedorn P.H., Mosler S., Larsen N.B., Cox E.C., Flyvbjerg H.: Eur. Phys. J. 157, 1 (2008).
- Jin T., Xu X., Fang J., Isik N., Yan J., Brzostowski J.A., Hereld D.: Immunol. Res. 49, 118 (2009).
- Rappel W.J., Loomis W. F.: Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine 1, 141 (2009).
- Brown J. M., Firtel R. A.: Dev. Biol. 216, 426 (1999).
- Cornillon S., Froquet R., Cosson P.: Eukaryot. Cell 7, 1600 (2008).
- Weijer C. J., v: *Systems Biology*, str. 209. Springer, Japan 2009.
- Fey P., Stephens S., Titus M. A., Chisholm R. L.: J. Cell. Biol. 159, 1109 (2002).
- Brazill D. T., Lindsey D. F., Bishop J. D., Gomer R. H.: J. Biol. Chem. 273, 8161 (1998).
- Nagano S.: Dev Growth Differ. 42, 541 (2000).

35. Lee K. J., Cox E. C., Goldstein R. E.: Phys. Rev. Lett. 76, 1174 (1996).
36. Tomchik K. J., Devreotes P. N.: Science 212, 443 (1981).
37. Čejková J.: Studium atypické agregace buněk *Dictyostelium discoideum*. Diplomová práce, VŠCHT Praha (2006).
38. www.chobotix.cz, staženo 15.2.2013.

J. Čejková (*Department of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Slime Mold *Dictyostelium discoideum* – A Model System Not Only for Biologists**

The slime mould *Dictyostelium discoideum* is an excellent microorganism that allows, as a model system, to study many biological problems, such as chemotaxis, gene expression, adhesion, cell differentiation, cell sorting, multicellular development from single cells, intercellular communication, phagocytosis, motility, programmed cell death and signal transduction. However, the microorganism is also investigated by physicists because of its non-linear dynamic behaviour and pattern formation. These single-celled soil inhabitants are an ideal example for the researchers seeking models of artificial cells and chemical robots or researchers in the swarm robotics field.