

Bulletin

Grantové agentury
České republiky



2/2008



15 let GAČR

- 2 Výsledky hodnocení dílčích a závěrečných zpráv za rok 2007
- 3 Kmenové buňky – fenomén dnešní doby
Významný příspěvek českých badatelů k poznání biologie lidských embryonálních kmenových buněk
Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.
- 5 Produkce embryí přenosem jader somatických buněk – ex ovo omnia?
Ing. Josef Fulka, DrSc.
- 9 Publikace ESF – program EUROCORES

Editorial

Číslo 2/2008 je mj věnováno dvěma publikovaným výstupům z projektů, či programů, podporovaných Grantovou agenturou ČR. Důkazem této významné podpory kvalitnímu výzkumu jsou právě prezentace v prestižních vědeckých časopisech.

Ing. J. Fulka, Jr. je takto zapojen do programu EUROCORES, tématický podprogram EuroSTELLS a výsledky projektu byly zveřejněny v časopise **Science**.

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc. participuje za podpory Grantové agentury ČR na činnosti mezinárodního fóra International Stem Cell Forum a také jeho podíl na výzkumu embryonálních kmenových buněk znamená mimořádný vědecký úspěch. Výsledky první fáze výzkumu byly publikovány v loňském červencovém čísle časopisu **Nature Biotech**.

Bulletin Grantové agentury České republiky

Ročník 16, číslo 2/2008

Odpovědná redaktorka: Mgr. Monika Muchová

Adresa redakce: Kancelář GA ČR, Národní 3, 110 00 Praha 1, tel./fax: 224 240 598

Foto na obálce: Vrcholné dílo Josefa Hlávky – rezidence metropolity v Černovicích, s katedrálou, klášterem a nádherným arménským chrámem. Za toto monumentální dílo obdržel cenu na Světové výstavě v Paříži. Archiv Nadání Hlávkových.

Tiskne, distribuuje, přihlášky k odběru přijímá a veškeré reklamace vyřizuje: BCS, s.r.o., provozovna Chrást 59, 289 14 Poříčany, tel./fax: 321 695 410, e-mail: bcs-brunclik@iol.cz

Grafická úprava a zlom: Eva Říhová, tel.: 774 534 818, e-mail: evariha@volny.cz

Evidenční číslo Ministerstva kultury MK ČR E 6517

Vychází šestkrát ročně, roční předplatné 150 Kč

Uzávěrka tohoto čísla: 30. dubna 2008

© Grantová agentura České republiky, 2008

ISSN 1210-6402



Výsledky hodnocení dílčích a závěrečných zpráv za rok 2007

Obdobně, jako v předchozích letech, předkládali řešitelé a příjemci grantů jednak dílčí zprávy o průběhu řešení v roce 2007 (k 15. lednu 2008), včetně upřesňujících finančních požadavků na rok 2008, tak i závěrečné zprávy za projekty s datem ukončení k 31. 12. 2007.

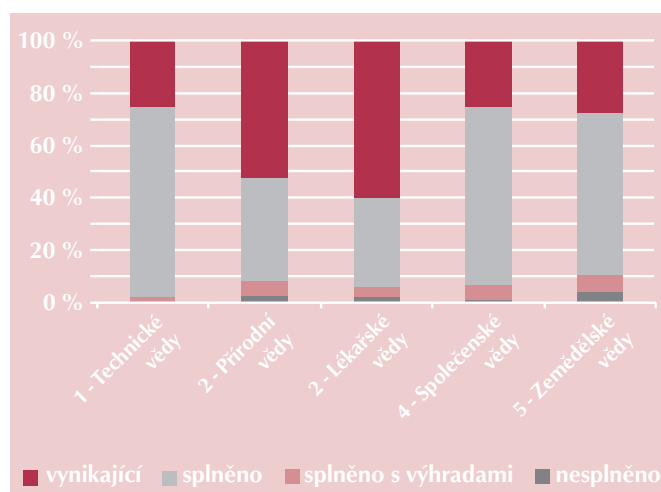
Zprávy byly posouzeny odbornými komisemi Grantové agentury ČR a zařazeny u pokračujících projektů do jednotlivých stupňů hodnocení – **částečně – úplně**, u dokončených projektů ve stupnici – **vynikající – splněno – splněno s výhradami – nesplněno**.

Hodnocení pokračujících projektů

U pokračujících projektů byla posouzena orgány GA ČR mj. také oprávněnost a přiměřenost požadovaných finančních prostředků na rok 2008. Na společném zasedání představenstva, předsedů oborových komisí a vedoucích odborných sekcí na základě doporučení oborových komisí představenstvo hlasováním jednomyslně **rozhodlo dne 28. února 2008 o přidělení finančních prostředků na rok 2008**. Po splnění všech administrativních procedur, budou finanční prostředky zaslány příjemcům grantů.

Hodnocení ukončených projektů

Výsledky hodnocení ukončených projektů shrnuje následující graf. Vyplývá z něho mj, poměrně vysoká úspěšnost v hodnocení projektů z oborů lékařských a přírodních věd.



OK	Obor	Počet pokračujících projektů			Hodnocení		Počet projektů	Přidělené prostředky na rok 2008 (v tis. Kč)	Průměrné náklady v r. 2008
		2005	2006	2007	částečné	úplné			
1	Technické vědy	10	190	176	4	372	376	300471	799
2	Přírodní vědy	10	231	219	9	451	460	306854	667
3	Lékařské vědy	1	53	54	3	105	108	115496	1069
4	Společenské vědy	5	166	188	29	330	359	162380	452
5	Zemědělské vědy	2	67	53	3	119	122	96598	792
	GA ČR Celkem	28	707	690	48	1377	1425	981799	689

OK	Obor	nesplněno	splněno s výhradami	splněno	vynikající
1	Technické vědy	0	5	131	45
2	Přírodní vědy	5	12	82	107
3	Lékařské vědy	0	2	16	31
4	Společenské vědy	2	10	119	45
5	Zemědělské vědy	2	3	29	13
	GA ČR Celkem	9	32	377	241

Kmenové buňky – fenomén dnešní doby

Významný příspěvek českých badatelů k poznání biologie lidských embryonálních kmenových buněk

Kmenové buňky – fenomén dnešní doby

Současný biologický a biomedicínský výzkum pokrývá nezměrné množství témat, objektů i jevů. Obdobně jako to platí v mnoha jiných oblastech lidské činnosti, také zkoumaná biologická témata se liší, i když často jen zdánlivě, svojí významností, či alespoň atraktivitou z pohledu jejich možného užití pro blaho člověka. Poslední dekáda vynesla na toto exkluzivní výsluní zájmu živé objekty mikroskopické velikosti – souborně zvané kmenové buňky.

Příčinou obrovského zájmu o kmenové buňky je jejich potenciální užití v mnoha výzkumných a aplikačních oblastech, odhalováním molekulární podstaty lidských onemocnění počínaje a buněčnou terapií konče (Tabulka 1). Tato očekávání jsou odvozena ze dvou unikátních biologických vlastností kmenových buněk, jimiž je schopnost kmenových buněk generovat dělením totožné kopie sama sebe – sebeobnova, doprovázená jejich kapacitou diferencovat se do široké plejády specializovaných buněčných typů dospělého organismu – pluripotence. Tyto, v jistém smyslu nezralé či primitivní buňky, mají nejen bezprecedentní význam během časného vývoje jedince, ale vyskytují se také v dospělém organismu po celý jeho život, kde hrají klíčovou roli v procesech obnovy tkání a orgánů. Na základě této skutečnosti lze tedy rozlišit dvě základní kategorie kmenových buněk, embryonální kmenové (Embryonic Stem; ES) buňky a kmenové buňky dospělých jedinců. Zatímco kmenové buňky druhé kategorie jsou přítomny ve všech tkáních a orgánech, ES buňky lze získat pouze z časného preimplantačního embrya ve stádiu blastocysty. Linie embryonálních kmenových buněk přitom vznikne „prostým“ převedením buněk embryoblastu, tedy části blastocysty z níž vzniká vlastní zárodek, do podmínek *in vitro*. Vhodné kultivační podmínky pak umožňují časově neomezenou *in vitro* propagaci ES buněk při zachování jejich pluripotence. Poprvé se podařilo připravit linie ES buněk v roce

1981 z myších blastocyst (Martin, Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78:7634-7638). Následující téměř dvě dekády experimentování s myšími ES buňkami pak opakovaně prokázaly jejich neomezenou diferenciací kapacitu. Není proto divu, že ustavení prvních linií ES buněk z blastocyst člověka v roce 1998 (Thomson et al., Science, 1998, 282: 1145-1147) vyvolalo revoluci v zájmu jednak o samotné ES buňky, ale také o kmenové buňky přítomné v různých tkáních a orgánech dospělého lidského těla. Přestože diferenciací kapacita kmenových buněk přítomných v dospělém lidském těle se zdá být také velmi rozsáhlá, absolutní diferenciací potenciál (totipotence) je, díky již zmíněným *in vivo* experimentům s myšími ES buňkami, dosud předpokládán pouze u lidských ES buněk.

„International Stem Cell Forum“ a „International Stem Cell Initiative“

Využití diferenciacího potenciálu lidských ESC je zcela pochopitelně podmíněno co možná nejhlubším porozuměním jejich biologickým vlastnostem a zejména odhalením molekulárních mechanismů, které tyto vlastnosti podmiňují. Docílit potřebného poznání v této oblasti vyžadovalo v první fázi ustavit alespoň určitý počet nezávislých linií lidských ES buněk vhodných k experimentování. V mnoha laboratořích vyspělých zemí celého světa proto začaly být brzo po prvním úspěchu Dr. Tomsona derivovány nové linie lidských ES buněk.

Česká Republika se již v roce 2003, díky našemu úsilí spojenému s více než vstřícným postojem pracovníků brněnské privátní ženské kliniky HELIOS a zejména pak díky pochopení dárcovských párů, zařadila do klubu zemí, kde se linie ES buněk z lidských blastocyst podařilo ustavit. Rostoucí počet linií lidských ES buněk však nejen umožnil rychle rozšířit studium lidských ES buněk do mnoha laboratoří, otevřel také významnou otázku, kolik linií lidských ESC vlastně potřebujeme k dosažení vědeckých a zejména pak klinickomedicínských cílů. Jedním ze způsobů, jak přispět k odpovědi na tuto otázku, v níž se střetává touha po co nejčasnějším terapeutickém užití lidských ES buněk se zřejmými etickými překážkami, je začít odhalovat rozdíly a shody mezi již existujícími liniemi těchto buněk. Tato skutečnost byla rozeznána Prof. Peterem Andrewsem (University of Sheffield, UK), který inicioval globální aktivitu, zaměřenou na analýzu co největšího počtu linií lidských ES buněk, nazvanou International Stem Cell Initiative (ISCI). Tato aktivita je realizována pod „deštníkem“ celosvětového sdružení nazvaného International Stem Cell Forum

Tabulka 1. Očekávané využití lidských embryonálních kmenových buněk

- modelový systém pro studium patogeneze lidských onemocnění
- modelový systém pro testování toxicity a teratogenicity látek
- modelový systém pro výzkum nových léků
- modelový systém pro studium lidského vývoje
- transplantace k náhradě buněčné populace zničené chorobou (buněčná terapie)

(ISCF; <http://www.stemcellforum.org>). ISCF bylo založeno v roce 2003 s cílem propojit výzkum financující národní agentury, aby bylo dosaženo efektivní spolupráce a výměny informací v oblasti výzkumu kmenových buněk.

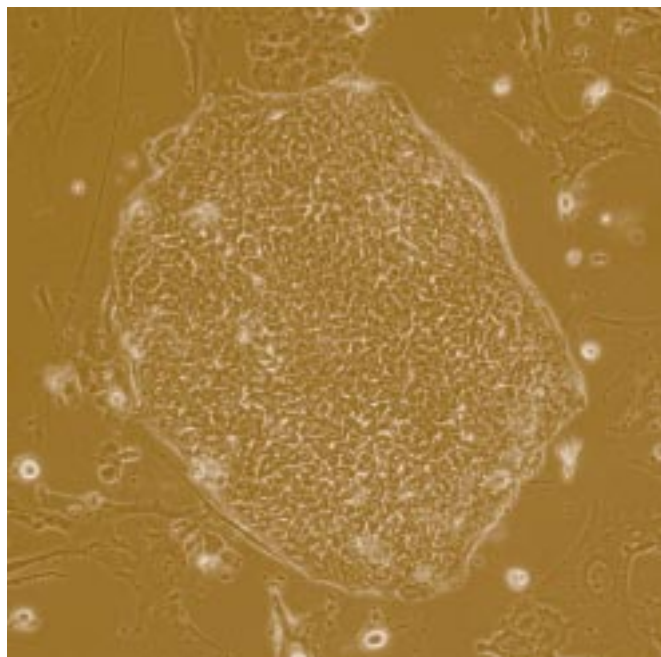
Od roku 2004 se díky participaci Grantové agentury ČR účastní této mezinárodní aktivity také Česká Republika. Prvním hmatatelným výstupem účasti GA ČR v ISCF jsou výsledky první, přibližně tři roky trvající, fáze ISCI (ISCI1), na jejichž získání se jako jediná v ČR podílela také naše laboratoř, a které byly loni publikovány v červencovém čísle časopisu *Nature Biotechnology* (Adewumi et al., *Nature Biotech*, 1997, 25:803-816).

Jak již bylo naznačeno výše, obecným cílem studie ISCI1 bylo *i)* posoudit podobnosti a rozdíly v přítomnosti běžně používaných molekulárních znaků lidských ES buněk u co největšího počtu nezávislých linií tohoto buněčného typu a *ii)* identifikovat a dobře validovat sadu molekulárních znaků použitelných jako standard k hodnocení identity lidských ES buněk. K dosažení tohoto cíle bylo v rámci ISCI1 analyzováno celkem 59 nezávisle derivovaných linií lidských ES buněk propagovaných v 17-ti laboratořích z 11-ti zemí (Tabulka 2). Naše laboratoř přispěla do ISCI1 analýzou tří linií lidských ES buněk – CCTL9, CCTL12 a CCTL14. Toto přispění bylo, vzhledem k nemožnosti jiné přímé podpory aktivit ISCF z prostředků GA ČR, finančně zajištěno z prostředků dvou projektů GA ČR řešených na našem pracovišti (301/05/0463, řešitel doc. Aleš Hampl; 305/05/0434, řešitel doc. Petr Dvořák). V rámci ISCI1 byly analyzovány zejména následující parametry lidských ES buněk: *i)* exprese 17-ti různých povrchových antigenů a 93 genů, které byly cíleně vybrány jako potenciální znaky nediferencovaných a diferencujících se lidských ES buněk, *ii)* alelicky specifická exprese 10-ti různých imprintovaných genů, *iii)* stav linií z hlediska jejich mikrobiální kontaminace a *iiii)* diferenciační kapacita linií určená schopností tvořit benigní nádory - teratomy po aplikaci buněk experimentálnímu zvířeti.

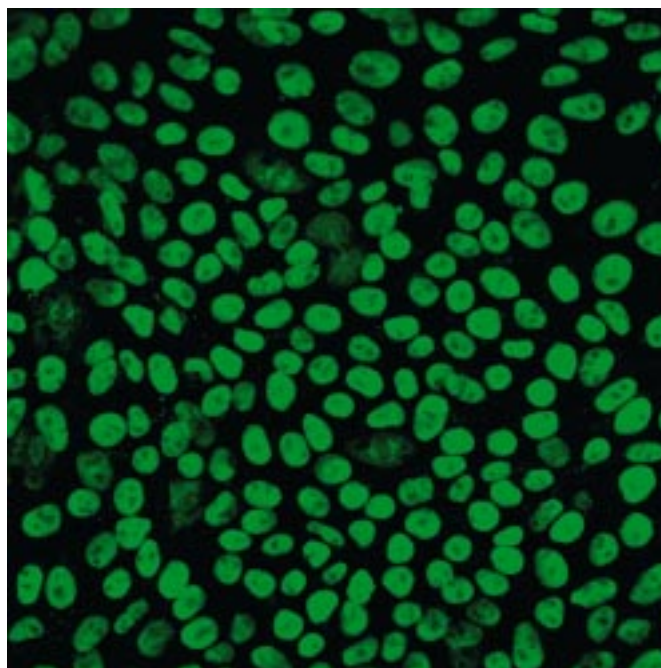
Z těchto analýz vyplynulo, že linie lidských ES buněk, přes svůj různý genetický základ a přes odlišné přístupy, které byly použity k jejich izolaci a kultivaci, vykazují výraznou podobnost v mnoha znacích nediferencovaných a diferencujících se lidských ES buněk. Nicméně, studova-

Tabulka 2. Země zúčastněné v projektu ISCI1

- Austrálie
- Česká Republika
- Finsko
- Izrael
- Japonsko
- Kanada
- Nizozemí
- Singapur
- Švédsko
- USA
- Velká Británie



Obrázek 1. Kolonie lidských embryonálních kmenových buněk (linie CCTL14) rostoucích na podkladové vrstvě myších embryonálních fibroblastů. Fotografováno na mikroskopu Olympus IX51 při optickém zvětšení 100x. Autor: Bc. Dáša Doležalová.



Obrázek 2. Přítomnost transkripčního faktoru Nanog (zeleně) v jádrech lidských embryonálních kmenových buněk. Nanog je typickým znakem nediferencovaného stavu buněk. Vizualizováno technikou nepřímé imunofluorescence následovanou konfokální laserovou mikroskopií na přístroji Olympus Fluoview 5000. Autor: Bc. Michaela Kunová.

né linie nebyly zcela identické. Byly nalezeny významné rozdíly v expresi molekulárních znaků typických pro různé diferenciační dráhy a také výrazná variabilita v expresi

alel imprintovaných genů. Z pohledu budoucích medicínských aplikací je také velmi významným poznatkem skutečnost, že ani u jedné z 59 linií lidských ES buněk nebyla nalezena kontaminace vybranými bakteriemi, mykoplasmaty či viry. Mimo svoje vědecké přínosy, je tato studie jedním z významných kroků směrem k ustavení obecných standardů a procedur, které umožní verifikaci výsledků experimentů na lidských ES buňkách mezi laboratoři po celém světě. Je také základem pro další mezinárodní kooperaci zaměřenou na vytvoření teoretických základů pro budoucí použití lidských ES buněk v regenerativní medicíně, vývoji léčiv a toxikologii.

Skutečnost, že vědecký význam ISCI1 byl rozpoznán ihned po publikování získaných výsledků dobře dokládá

schválení podpory pro druhou fázi studie (ISCI2). Experimenty v rámci ISCI2 již byly odstartovány a naše pracoviště se jich v plné míře dále účastní. Jsou tak spolu s naší účastí na projektu 6FP „ESTOOLS“ (<http://www.estools.eu>) a účastí na aktivitách „International Society for Stem Cell Research“ (<http://www.isscr.org/committees/standards.htm>) důkazem kapacity České Republiky a jejich vědců přispívat k pokroku v jedné z nejrychleji se rozvíjejících oblastí biomedicínského výzkumu.

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta ■

Produkce embryí přenosem jader somatických buněk – ex ovo omnia?

Produkce klonovaných jedinců (embryí) je svým způsobem velmi přímočarý metoda – z oocyty vyjmeme jeho vlastní jadernou DNA (chromosomy v metafázi II) a tím vytvoříme cytoplasmu. Do cytoplasmu pak následně přeneseme jádro somatické buňky a po určité době takto rekonstruované embryo aktivujeme, a tím nastartujeme jeho další vývoj. Celý postup by se tak mohl zdát jako relativně jednoduchý. Že tomu ale tak není svědčí to, že jeho úspěšnost je velmi nízká a v případě reprodukčního klonování jen asi 3 % rekonstruovaných embryí se vyvíjí až do ukončení březosti a narození nového jedince. V případě klonování terapeutického jsou výsledky výrazně lepší a až 30–40 % rekonstruovaných embryí dá vznik blastocystě, která je dále použitelná pro ustavení linií embryonálních buněk (ESc). Tyto výsledky platí však pouze pro myš a navíc odrážejí úsilí jen těch nejúspěšnějších laboratorů. To znamená, že další skupiny mají úspěšnost mnohem nižší, anebo nejsou úspěšné vůbec. Odlišná je i situace pro hospodářská zvířata, kde např. až dosud nebyly ustaveny linie ESc. Klonovaná vyvíjející se lidská embrya se podařilo vytvořit až v letošním roce. Obecně to znamená, že i po řadě let intenzivního výzkumu v této oblasti, představuje klonování „velkou neznámou“ s řadou nezodpovězených otázek.

Jednou z těchto otázek je i reprogramace přenášeného jádra a úloha cytoplasmu pro zabezpečení vývoje embrya. Somatické buňky, z nichž izolujeme jádra pro přenos, jsou vysoce specializované a zpravidla se nacházejí ve značném stupni diferenciaci. Reprogramací pak rozumíme takové procesy, které dokáží změnit tato jádra natolik, že svou funkcí a morfologií odpovídají prvotním jednobuněčným embryím. Pokud je reprogramace kompletní, má embryo šanci se vyvíjet až v nového jedince. Zpravidla se však podaří navodit jen reprogramaci částečnou, která může být dostačující pro tvorbu blastocyst, ne však pro tvorbu embrya s plným vývojovým potenciálem. Reprogramaci lze indukovat několika způsoby, v našem příspěvku se však zaměříme pouze na oocyt.

Obecně akceptované dogma klonování vychází z představy, že cytoplasmu indukují především reprogramaci přenášeného jádra a zabezpečí i požadované zvětšení objemu tak, aby rekonstruované embryo bylo přibližně stejně velké jako normální jednobuněčné embryo. Je logické usuzovat, že řada dalších faktorů musí pocházet z cytoplasmu – histony, transkripční faktory, atd. Co přináší klonování embryu somatická buňka? Představa je taková, že je to především jaderný materiál – DNA a jádérko; v nedávné

době bylo dokázáno, že jsou to i centrosomy (organely nezbytné pro buněčné dělení).

Naše výsledky však dokazují, že klonování není tak jednoduché, jak se původně předpokládalo, a že se jedná o proces mnohem komplexnější, který je jen velmi málo poznán. V předkládaném souhrnu se zaměříme výhradně na původ jadérka (nukleolus) v rekonstruovaných embryích. Původně byly naše pokusy zaměřeny na studium jeho úlohy pro průběh finálních stádií meiotického zrání oocyty, jejich postupným rozšířením se pak podařilo dokázat význam jadérka oocyty při produkci klonovaných embryích přenosem jader somatických buněk.

Nukleolus v oocytech s ukončeným růstem

V nezralých oocytech, které ukončily růst a jsou schopny projít finálními stádii zrání, se nachází v zárodečném váčku (GV – germinal vesicle) zpravidla jedno jadérko, které je těsně obklopeno chromatinem. Na rozdíl od somatických buněk, kde se jadérka skládají ze tří komponent (fibrilární, densně fibrilární a granulózní), obsahují jadérka těchto oocytů pouze jednu složku – densně fibrilární materiál. U somatických (případně ve vývoji pokročilejších embryonálních buněk) je funkce jadérka komplexní – produkce ribosomů, biosyntéza a processing komponentů RNA riboproteinového komplexu, regulace buněčného cyklu, imprinting, diferenciacce, atd. Úloha jadérka v oocytech není jasná a spíše se předpokládá, že jeho materiál je následně a postupně transformován na jadérka embryích.

Enukleolace oocytů a jejich zrání v podmínkách in vitro

Koncem 90. let jsem během svého pobytu v Cambridge zjistil, že jadérka lze vyjmout mikrochirurgicky z oocytů tak, aniž by došlo k jejich poškození. K pokusům byly použity oocyty prasat, které však obsahují tolik tukových částic, že to znemožňuje vizualizaci zárodečného váčku s jadérkem. Proto je bylo nezbytné před vlastní nukleolací centrifugovat. Centrifugace vedla k přemístění tukových částic do jedné hemisféry, druhá hemisféra byla pak transparentní a obsahovala zárodečný váček s jadérkem. Veškeré manipulace probíhaly nadále pod mikroskopem za použití různých typů mikromanipulátorů. Zcentrifugovaný oocyt byl stabilizován fixační pipetou, injekční pipeta o průměru velikosti jadérka následně penetrovala zonu pellucidu a její ústí jsme přiblížili těsně k jadérku. Je nezbytné podotknout, že injekční pipeta nepenetruje ani vitellinní a ani jadernou membránu, pipeta je vtlačena do oocyty co nejbližší k jadérku (neinvazivní nukleolace). Následný mírný podtlak v injekční pipetě vede k tomu, že se jadérko přednostně přesunuje do pipety, samo penetruje membránu jádra (zárodečného váčku – GV) a jako písek v přesýpacích hodinách se přelije ze zárodečného váčku do cytoplasmy. Cytoplasma s jadérkem je pak odstraněna z oocyty dalším

jemným sáním, kterým je následně přerušena i spoj mezi vlastním oocytem a cytoplasmou obsahující jadérko (nukleoloplast). Nukleoloplast je tak obklopen vitellinní membránou, obsahuje vlastní jadérko a minimální množství cytoplasmy. Jadérko může být následně použito k případné reinjekci. Enukleolované oocyty jsou schopny zahájit a dokončit zrání ve stejné frekvenci, jako je tomu u kontrol. To dokazuje, že jadérko u oocytů s ukončeným růstem není nezbytné pro normální průběh predovulačních fází zrání (Fulka, Jr. et al. 2003).

Následně jsme využití metody neinvazivní nukleolace testovali u oocytů myši, kde je ta výhodou, že jsou transparentní a nemusí se před manipulací centrifugovat. Stejně jako u prasat, pro manipulace byly vybírány jen ty oocyty, které byly obklopeny kompaktní vrstvou kumulárních buněk a nevykazovaly žádné známky degenerace. Enukleolace znázorňují snímky 1–3. Postup je úspěšný v průměru u více jak 75 % manipulovaných oocytů. Jak jsme již uvedli výše, nukleolus v oocytech s dokončeným růstem je těsně obklopen chromatinem. Nemohli jsme tak vyloučit, že určitá část chromatinu je vyjmuta při nukleolaci spolu s jadérkem. Značení protilátkami proti anti-triMe H4K20 a stejně tak i barvení Hoechstem dokázalo, že ve většině případů zůstává veškerý chromatin v zárodečném váčku a pouze výjimečně jsme ho detekovali kolem jadérka v nukleoloplastu. Stejně tak jako u prasat. I oocyty myši bez jadérka dokončí meiotické zrání a dosáhnou stádia metafáze II ve stejné frekvenci jako oocyty kontrolní. Meiotické vřetenko a uspořádání chromosomů v metafázi I a II není odlišné od kontrol. Hladiny H1 a MAP kinázy byly rovněž shodné s kontrolami. Karyotyp metafáze I a II vykazoval normální počet chromosomů. To je pak základním předpokladem pro následné manipulace – aktivace, oplodnění in vitro, přenosy jader.

Množství nukleolárního materiálu je v oocytech limitováno

Cílem následující části pokusů bylo zodpovědět otázku, zda budou přítomna jadérka v prvojádrech, která vzniknou po indukci dekondezace chromosomů v nukleolovaných oocytech – zda tedy oocyt případně neobsahuje materiál pro tvorbu jadérek v nadbytečném množství. Tato otázka se zdá být zdánlivě nelogická a teoreticky lze předpokládat, že tomu tak nebude. Například ale v případě nukleolace zralých oocytů, kdy je z nich vyjmuto dělicí vřetenko s chromosomy metafáze II a následně injekci jádra somatické buňky do těchto oocytů (cytoplástů), dojde ke kondenzaci chromosomů jádra somatické buňky, jejich uspořádání do metafáze a tvorbě pravidelného dělicího vřetenka. To znamená, že materiál pro tvorbu vřetenka je v oocytech v nadbytku a vyjmutí metafáze II nevede k jeho kompletnímu odstranění.

V našich pokusech jsme indukovali dekondezaci několika způsoby: i/ inkubací nukleolovaných oocytů v metafázi I v médiu s cycloheximidem, ii/ parthenogenetickou



Text k obrázkům

Obr. 1: Nezralý oocyt myši před enukleolací. Oocyt je obklopen zonou pellucidou (ZP) a obsahuje zárodečný váček (GV) s prominentním jadérkem (NCL). Stabilizaci oocytu zajišťuje fixační pipeta (H – holding), vlastní enukleolace se provádí injekční pipetou (I).

Obr. 2: Průběh enukleolace. Část zárodečného váčku je nasáta do injekční pipety, což vede k tomu, že jadérko penetruje jeho membránu a jako písek v přesýpacích hodinách se přemísťuje mimo zárodečný váček do cytoplasmy.

Obr. 3: Ukončená enukleolace. Malé množství cytoplasmy oocytu (nukleoloplast) obklopené membránou a obsahující jadérko je zcela odděleno od oocytu. Zárodečný váček (GV) bez jadérka je jasně patrný v cytoplasmě ©.



došlo k dekonenzaci chromosomů. To znamená, že množství nukleolárního materiálu je v oocytu jednou provždy dáno a pokud se jadérko odstraní, nemůže se znovu vytvořit.

Vývoj embryí vzniklých z enukleolovaných oocytů

Embrya vzniklá z neenukleolovaných oocytů se po parthenogenetické aktivaci či oplození vyvíjí až do stádia blastocyst a značení s pomocí B23 a C23 dokazuje jasně přítomnost jadérek v blastomerách. Vývoj embryí z enukleolovaných oocytů se zpravidla zastavil ve stádiu 2 až 4 buněk. U myši nebyla jadérka v blastomerách viditelná. Analýza úrovně transkripce (BrUTP) ukázala stejnou intenzitu fluorescence ve stádiu dvou buněk jak u kontrol, tak i experimentálních skupin. Ve stádiu čtyř buněk byly pozitivní jen jádra kontrolních embryí. Re-injekce izolovaných jadérek do enukleolovaných oocytů však vede k obnovení vývojového potenciálu embryí z nich vzniklých, což jsme potvrdili narozením několika mláďat u myši.

Jadérka somatické či embryonální kmenové buňky nenahradí původní nukleolární materiál z oocytu.

Pokud přeneseme jádro do cytoplasmu (enukleovaný oocyt metafáze II) dojde téměř bezprostředně k rozpuštění jaderné membrány, jadérek (FRGY 1,2) a kondenzaci chromosomů. Po následné indukci dekonenzace se vytvoří pseudo-prvojádra, která opět jadérka obsahují. Nebylo však jasné, zda tato jadérka pocházejí z transformovaného nukleolárního materiálu somatické buňky, nebo se jedná o původní nukleolární materiál zárodečného váčku. Obecně akceptovaná teorie přenosu jader by upřednostňovala první možnost. Pro objasnění, která možnost platí, jsme přenášeli jádra somatických buněk do cytoplasmů získaných z oocytů v metafázi II, a to buď od neenukleolovaných (kontroly) či enukleolovaných oocytů (experimentální skupina). U kontrol byla v pseudo-prvojádrech vždy pozorována jadérka. U experimentální skupiny pseudo-prvojádra nikdy jadérka neobsahovala. To jasně dokazuje, že jadérka v pseudo-prvojádrech pocházejí z původního nukleolárního



aktivací enukleolovaných oocytů v metafázi II, nebo iii/ jejich oplozením intracytoplasmatickou injekcí spermie (ICSI). Prvojádra u kontrol (neenukleolovaných oocytů) vždy obsahovala jedno či více jadérek. Jadérka však nikdy nebyla přítomna, pokud oocyty byly enukleolovány a následně

ho materiálu oocyty. Nemůžeme však ani zcela vyloučit možnost částečné participace nukleolárního materiálu somatické buňky. Stejná byla i situace, pokud jsme pro přenosy použili jádra embryonálních kmenových buněk, které jsou méně diferencované.

Absenci jadérek odpovídá i vývojový potenciál embryí vzniklých po přenosu jader – kontroly se vyvíjí až do stádia blastocyst, u experimentální skupiny se vývoj zastaví ve stádiu dvou až čtyřech buněk (Ogushi et al., 2008).

Závěr

I přes nové přístupy dediferenciace (iPS) představují přenosy jader postup, který je zajímavý jak z teoretického, tak i praktického hlediska. Využití se předpokládá v řadě oblastí – pokud jde o terapeutické klonování, jsou to především buněčné terapie v humánní medicíně a farmakoterapie. Využití reprodukčního klonování je uvažováno především v zemědělství a při záchraně ohrožených druhů zvířat (FAO). Aplikace těchto postupů však vyžaduje zvýšení efektivity těchto postupů. To je možné pouze tehdy, pokud pochopíme základní principy a procesy doprovázející přenosy jader. Naše pokusy jasně dokázaly, že tomu tak dosud není a že přinejmenším jedna poměrně velká organela oocyty hraje při přenosech jader zcela zásadní a unikátní úlohu. Tím se mění i původní dogma klonování a oocyty tak musíme přisoudit mnohem větší význam, než se původně předpokládalo.

Navíc mohou i naše výsledky pomoci i při léčení některých – patrně velmi vzácných – forem neplodnosti u lidí. Přenosy nukleolárního materiálu do embryí, kde je funkce jadérek nedostatečná, by mohly vést k obnovení jejich vý-

vojového potenciálu (Fulková et al., 2004). Je reálné předpokládat, že jadérko není jedinou organelou, kterou obdobný materiál somatické buňky nedokáže nahradit. Zda je tomu skutečně tak, ukáže však další výzkum.

Poděkování

Především děkuji svým spolupracovnícům, Sugako Ogushi a Heleně Fulkové, které rozvinuly původní metodu enucleolace k výsledkům, které byly následně publikovatelné v Science. Výše uvedené pokusy byly částečně podporovány GAČR (524/02/0032 a STE/05//E004). Můj dík patří i vedení VÚŽV (Doc. Ing. Věra Skřivanová, CSc.) a CBTTN 2LF UK (Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.) za kontinuální podporu.

Literatura

- Fulka, Jr., J., Moor, R.M., Loi, P. a Fulka, J. (2003) Enucleation of porcine oocytes. *Theriogenology* 59, 1879-1885.
- Fulková, H., Mrázek, M. a Fulka, Jr., J. (2004) Nucleolar dysfunction may be associated with infertility in humans. *Fert. Steril.* 82, 486-487.
- Ogushi, S., Palmieri, Ch., Fulková, H., Saitou, M., Miyano, T. a Fulka, Jr., J. (2008) The Maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals. *Science* 319, 613-616.

J. Fulka, Jr

*Výzkumný ústav živočišné výroby Praha
Centrum buněčných terapií
a tkáňových náhrad, 2LF UK Praha ■*

Publikace ESF – program EUROCORES



Fundamentals of Nanoelectronics (FoNE)

Publikace představuje činnost podprogramu FoNE probíhající v rámci programu EUROCORES. Vědeckým záměrem uvedeného programu je rozvíjet nové koncepce nezbytné pro zvládnutí obsluhy nanopřístrojů. Na aktivitách programu se podílí vědecké týmy z 10 evropských zemí. Českou republiku zastupují dva významní vědeckí pracovníci – dr. Tomáš Jungwirth a dr. Vít Novák z Fyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i.

Challenges of Biodiversity Science (EuroDIVERSITY)

Tato zpráva přináší základní informace o činnosti podprogramu EuroDIVERSITY programu EUROCORES, jenž vytváří příležitost pro spolupráci více než 100 evropských vědeckých týmů, které se zabývají problematikou změn biodiverzity a jejich vlivem na fungování ekosystémů. Na aktivitách programu se úspěšně podílejí dva čeští vědci – dr. Martin Černý z Přírodovědecké fakulty UK a prof. Pavel Kindlmann z Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR, v.v.i.



Dynamic Nuclear Architecture and Chromatin Function (EuroDYNA)

Brožura informuje o podprogramu EuroDYNA programu EUROCORES, který umožnil spolupráci 40 vědeckým týmům z 8 evropských zemí v oblasti výzkumu řízení genové exprese. Pomocí nejmodernějších technologií používaných v molekulární biologii a biochemii se jednotlivé vědecké týmy snažili získat hlubší pohled na to, jak pracuje buněčné jádro. Za Českou republiku se na aktivitách programu podílel prof. Pavel Hozák z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Development of a Stem Cell Tool Box (EuroSTELLS)

Publikace přináší základní informace o struktuře a cílech podprogramu EuroSTELLS programu EUROCORES. EuroSTELLS podporuje inovační a multidisciplinární spolupráci a současně také koordinaci národních a mezinárodních iniciativ v rámci výzkumu kmenových buněk. Do úspěšné práce programu je za ČR zapojen dr. Josef Fulka z Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i.

