



Od fyziologie k medicíně

Věda na úrovni Nobelových cen

Eva Matalová, Marcela Buchtová, Jaroslav Doubek

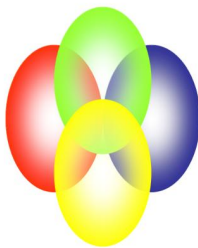
Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Od fyziologie k medicíně

Věda na úrovni Nobelových cen



Doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.

(matalova@iach.cz)

RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

(buchtova@iach.cz)

Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.

(doubekj@vfu.cz)

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-093-1



**OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ - INTEGRACE
VĚDY, VÝZKUMU, ODBORNÉHO VZDĚLÁVÁNÍ
A PRAXE**

CZ.1.07/2.3.00/09.0219

Projekt je určen pro:

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni bakalářské, magisterské a doktorské)
- 2) **Studenty VŠ** (zpracovávající odbornou práci na úrovni bakalářské, magisterské nebo doktorské)
- 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s aktivním zapojením v SOČ)

Projekt nabízí:

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů** se zaměřením na témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, aktivní **zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace**

<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Projekt je financován Evropským strukturálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



PANEL 1: VĚDA - VÝZKUM - VZDĚLÁVÁNÍ - MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ

Aktuální vědecké poznatky na úrovni Nobelových cen (věda)

Prezentace vlastního výzkumu (vzdělávání)

Aktuální výzkum v oblasti fyziologie (výzkum)

Mezinárodní možnosti (mezinárodní uplatnění)

PANEL 2: VĚDA - VÝZKUM - PRAXE

Fyziologie-patofyziologie-medicína (humánní medicína)

Fyziologie-patofyziologie-medicína (diagnostika)

Fyziologie-patofyziologie-medicína (veterinární medicína)

Studentská odborná konference

PANEL 1: VĚDA-VÝZKUM-VZDĚLÁVÁNÍ-MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ

TÉMA 1: VĚDA NA ÚROVNI NOBELOVÝCH CEN

REGION: BRNO

TERMÍNY: 3. února 2010

12. února 2010

15. února 2010

20. února 2010

Místo konání: Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Udělování Nobelových cen bylo zahájeno v roce 1901, pět let po smrti Alfreda Nobela. Ten v roce 1895 založil nadaci, která byla určena pro odměňování osobností, jimž se podařilo dosáhnout významných objevů v oblasti fyziologie nebo medicíny, chemie, fyziky, literatury a míru. Nobel ve své poslední vůli určil, že nositele ceny budou volit členové institucí: Karolinska Institutet (fyziologie/medicína), The Royal Swedish Academy of Sciences (chemie a fyzika), The Swedish Academy (literatura) a pětičlenná komise zvolená norským parlamentem (Storting) pro Nobelovu cenu míru. Později byla včleněna ještě cena za ekonomii, kterou na památku Alfreda Nobela uděluje od roku 1969 the Sveriges Riksbank.

Nobelovy ceny za fyziologii/medicínu jsou v posledních letech jednoznačně směřovány do oblasti molekulární biologie. Éra molekulární fyziologie a odpovídajících biomedicínských aplikací zaznamenala prudký rozvoj s objevem struktury DNA v roce 1953 (Nobelova cena udělena v roce 1962: F. Crick, J. Watson, M. Wilkins). Následovalo rozluštění genetického kódu (NC 1968: R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg), možnost čtení genetického kódu a celých genomů (NC 1978: W. Arber, D. Nathans, H. O. Smith) a objasnění, že genetický kód není pouze jednoduchý zápis, ale může být různě modifikován (1993: R. J. Roberts, P. A. Sharp), vysvětlení, co vlastně genetický kód představuje v programu života a objev homeoboxových genů (1995: E. B. Lewis, Ch. Nüsslein-Volhard, E. F. Wieschaus).

Také Nobelovy ceny za fyziologii/medicínu v novém tisíciletí jsou směřovány především k objevům na molekulární úrovni. Byly oceněny objevy objasňující komunikaci buněk ve složité síti nervového systému, vytváření paměťových stop (2000), mechanismy řídící životní rytmus buněk – klíčové regulátory buněčného cyklu (2001), genetická podstata řízení embryonálního vývoje a uplatnění programované smrti buněk (2002), dále objevy týkající se receptorů pro odoranty umožňující čichové vjemy (2004). Klinicky směřované Nobelovy ceny se týkaly zejména využití magnetické rezonance pro účely medicíny (2003), objasnění bakteriálního původu vředových onemocnění žaludku a otevření nových možností léčby

(2005), a virů vyvolávajících závažná onemocnění jako AIDS a rakovinu (2008). Modifikace genomu a genové exprese od RNA interferencí (2006) až po uplatnění kmenových buněk a transgenní organismy (2007) ukazují současný směr výzkumu na poli fyziologie a aplikací v medicíně (biomedicína). Také Nobelova cena za fyziologii/medicínu v loňském roce udělená za objevy týkající se telomeráz potvrdila tento trend integrace vědy a výzkumu na poli molekulární biologie a fyziologie s medicínskými aplikacemi.

Tato publikace je vydávána pro vzdělávací cyklus s tématem Věda na úrovni Nobelových cen, který je realizován v rámci projektu Od fyziologie k medicíně (CZ.1.07/2.3.00/09.0219), jehož cílem je integrace vědy, výzkumu, odborného vzdělávání a praxe. Tato publikace proto slouží jako úvod do dané problematiky, která bude diskutována v rámci seminářů, a současně obsahuje praktické návody pro vlastní experimentální práci účastníků projektu. Téma Věda na úrovni Nobelových cen je v teoretické oblasti zaměřen zejména na problematiku související s Nobelovými cenami udělenými v 21. století. Prakticky je směřován především na tři vybrané Nobelovy ceny za fyziologii-medicínu: objevy týkající se genetické kontroly časného embryonálního vývoje (1995), objevy klíčových regulátorů buněčného cyklu (2001), objevy týkající se genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti (2002).

Vzdělávací cyklus s tématem Věda na úrovni Nobelových cen je realizován Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Více informací o projektu: <http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Nobelova cena za fyziologii/medicínu v roce 1995
ZA OBJEVY TÝKAJÍCÍ SE GENETICKÉ REGULACE ČASNÉHO
EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE

Edward B. Lewis, Ch. Nüsslein-Volhard a Erich F. Wieschaus objevili klíčové geny určující „stavební plán“ organismu v časném embryonálním vývoji.

Jako modelový organismus byla použita drozofila, zejména vzhledem ke krátké generační době, snadné manipulaci a znalosti jejího genomu. Oplozené vajíčko (zygota) drozofily je sférické, do stadia 16 buněk zcela symetrické a buňky jsou rovnocenné. Poté však dochází ke specializaci buněk, embryo se stává asymetrickým, odlišuje se předozadní, dorzoventrální a laterální osa. Embryo se segmentuje a jednotlivé segmenty dávají vznik odlišným orgánům podle jejich umístění v embryu. Vědci ocenění Nobelovou cenou, se zaměřili na otázky, jak buňky „poznají“, kde se nacházejí a co mají vytvořit. Dále je zajímavé, zda jednotlivé buňky kooperují nebo se chovají zcela nezávisle. Také sledovali, kolik genů je určujících pro správný průběh časného embryonálního vývoje a jak spolu dané genové produkty interagují.

Na základě studia asi čtyřiceti tisíc mutací bylo identifikováno patnáct genů, které řídí časný embryonální vývoj drozofily a byly rozděleny do tří skupin: „gap“ geny řídící hrubý stavební plán embrya, „pair rule“ geny, které řídí utváření každého druhého tělního segmentu a „segment-polarity“ geny, které zodpovídají za jemné struktury individuálních segmentů.

Obdobné principy potvrzené u drozofily platí také u savčích embryí. Většina genů studovaných těmito laureáty má velký význam při embryonálním vývoji také u člověka. Chybné regulace v těchto klíčových genových sítích mají často fatální následky a jsou příčinou časných spontánních potratů.

GENETICKÁ KONTROLA ČASNÉHO EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE

Mnohobuněčný organismus je společenstvím miliard buněk v rozličných tkáních a orgánech integrovaných do jednoho celku. Fyziologické funkce tohoto složitého systému jsou založeny na neustálém dialogu jednotlivých buněk, který je zprostředkován celou řadou molekulárních signálů. Mezbuněčné komunikace probíhají mezi buňkami v přilehlých tkáních (lokální faktory), ale i na značnou vzdálenost (humorální a nervové regulace). Vysílané signální molekuly rozhodují o dělení buněk, jejich diferenciaci, specializaci, přežívání i smrti, řídí tedy buněčný cyklus i homeostázu (dynamickou stálost vnitřního prostředí) na všech úrovních.

Již na samém počátku ontogeneze mnohobuněčného organismu se uplatňují rozsáhlé buněčné rozhovory, které řídí následný osud zygoty a vývoj embrya. Nejznámější jsou signální produkty tzv. homeoboxových genů, které zajišťují polaritu embrya, např. vytvoření předozadní osy, identitu čelistí apod., a jsou základem řady fylogenetických studií a pochopení vývojových abnormalit. Také diferenciaci buněk ve tkáních a utváření jednotlivých orgánů je řízeno vzájemným dialogem buněk během morfogeneze. Porozumění buněčným rozhovorům a jejich zákonitostem otevírá cestu k cíleným terapeutickým modulacím vedoucím až k regeneraci a reparaci orgánů s využitím kmenových buněk.

Orgány a tkáně v organismu se nevyvíjejí nezávisle, ale v souladu s dalšími strukturami. Tento soulad obecně je umožněn právě morfogenetickými procesy řízenými mezbuněčnými rozhovory. Komunikační souhra na úrovni molekulárních posílů zajistí vytvoření odpovídajících tkání a orgánů na správném místě a zajistí koordinaci jejich funkcí. Tyto mechanismy lze sledovat celou řadou moderních metod, které umožňují studium osudu jednotlivých buněk v rámci orgánů např. jejich kultivací a modulací v explantátových systémech bez nutnosti zásahů na živých zvířatech.

Explantátové kultury pro studium fyziologických interakcí během časného embryonálního vývoje

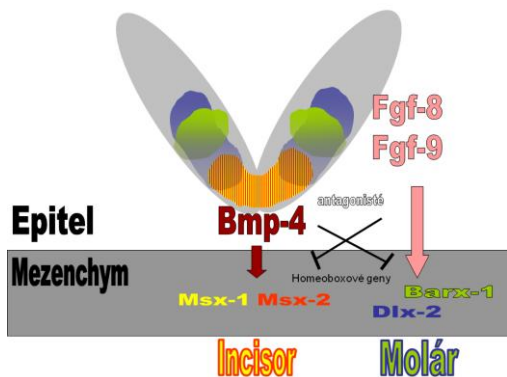
Jedním ze snadno viditelných orgánů, který se utváří na základě interakcí buněk epitelu a mezenchymu, je zub. Zuby slouží ke zpracování potravy, jsou však také prostředkem komunikace a v neposlední řadě umožňují identifikaci jedinců. Nejenom zubní vzorec bývá rozhodujícím klíčem ve forenzní medicíně, DNA v zubní pulpě je často nejlépe zachovaným zdrojem genetického kódu daného jedince. Než se ale zuby jako nejdolnější orgány těla prořežou do ústní dutiny, musejí se nejdříve vytvořit jejich zárodky. Molekulární signály a mezibuněčné dialogy tento vývoj provázejí od samého počátku. Nedorozumění v některých částech rozhovorů vedou až k chybění zubů, případně celé dentice.

Molekulární biologie v posledních letech proniká stále výrazněji do mnoha odvětví medicíny, a to jak v oblasti diagnostiky, tak terapie. Také v odontologii se otevírá nová oblast, tzv. molekulární stomatologie směřující k reparaci a regeneraci zubních tkání s využitím kmenových buněk pacientů. Propojení molekulární biologie s biomedicínskými aplikacemi je založeno na funkčních experimentech, které vycházejí ze zvířecích, především myších modelů. Vzhledem k etické stránce pokusů na zvířatech jsou preferovány metody, které respektují přístupy 3R (reduction, refinement, replacement).

Orgánové kultury umožňují zachování buněčných interakcí, sledování molekulárních komunikací a jejich cílenou modulaci mimo organismus. Explantáty mohou být manipulovány řadou způsobů na úrovni genomu, transkriptomu i proteomu. Používanými technikami jsou zejména elektroporace (působení elektrického pole umožní vstup DNA do cílové buňky) DNA konstruktů, RNA interference (Nobelova cena za fyziologii/medicínu 2006), implantace proteinových nosičů, ale také různé (např. heterotypické, heterochronické) rekombinace epiteliálních a mezenchymálních částí zubních základů. Explantáty lze kultivovat ve

standardní CO₂ atmosféře po dobu několika dnů, vývoj plně mineralizovaného zubu lze docílit v ledvinné kapsule hostitele.

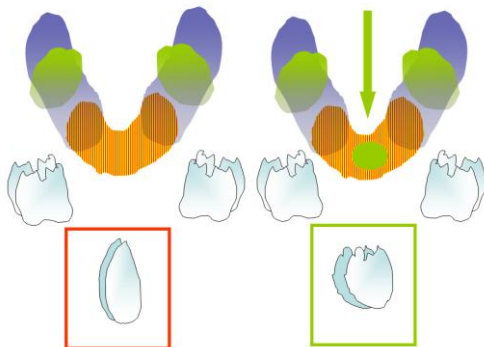
Explantáty zubních základů, případně celých mandibul jsou často používaným experimentálním přístupem pro výzkum odontogeneze. Umožnily také objasnění homeoboxového kódu, který řídí správné rozložení zubních základů v čelisti.



Podle této teorie je rozložení zubních základů v antero-posteriorní (předozadní) ose čelisti určeno expresí molekul kostního morfogenetického proteinu (bone morphogenetic protein, BMP) a fibroblastového růstového faktoru (fibroblast growth factor, FGF) v epitelové části budoucích zubních základů.

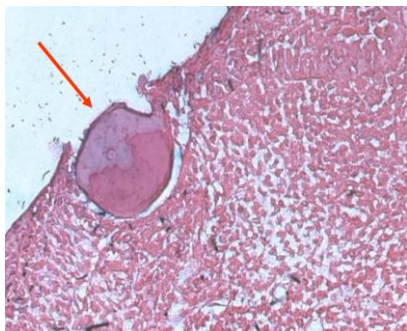
Tyto molekuly instruuji přilehlý mezenchym, ve kterém způsobují expresi homeoboxových genů. Epiteliální FGF8 řídí mezenchymální expresi genů Dlx1/2 a Barx1, čímž vymezuje oblast stoliček (molárovou oblast), epitelový BMP4 vyvolává expresi Msx1/2 v mezenchymu a určuje oblast řezáků. Tato teorie byla ověřena právě s pomocí explantátových kultur, a to transformací s využitím ektopického (experimentálně dodaného) Barx1 (resp. inhibice BMP4) v řezákové oblasti, což způsobilo tvorbu moláru podobného zubu v oblasti řezáků.

Pokud je tedy v regionu budoucí čelisti, kde se má vyvíjet řezák (zelená šipka)



aplikován produkt genu Barx-1 (typický pro molárovou oblast), dojde k tzv. transformaci a místo řezáků vzniká molárový typ zubu. Obdobně při inhibici genových produktů BMP-4 (takový antagonist je např. noggin), dojde ke stejnému transformačnímu efektu.

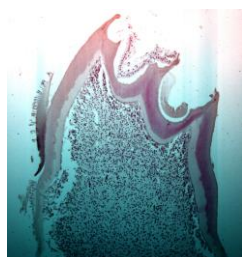
Zásah do mezibuněčných komunikací je možný několika způsoby, jedním



z nich je vložení proteinových nosičů ve tvaru kuliček (beads), které se nasáknou aktivní látkou (proteinovým produktem určitého genu) a cíleně pak dané mezibuněčné rozhovory směrují. Takové využití je možné jednak v základním výzkumu, ale také při medicínských aplikacích. Vložené proteinové nosiče lze po histo-

logickém zpracování tkáně snadno detekovat (šipka).

Ledvinná kapsule je jedna z možností, jak sledovat vývoj explantátu po delší dobu, než dovolují podmínky *ex vivo*. V takovém případě je explantát implantován do ledvinného vazivového pouzdra hostitele (v případě myších explantátů dospělé myši stejného kmene), kde díky krevnímu zásobení může dále růst. Tak lze z uvedených mandibulárních kultur získat plně mineralizované zuby. Ty jsou pak v ledvinném pouzdře

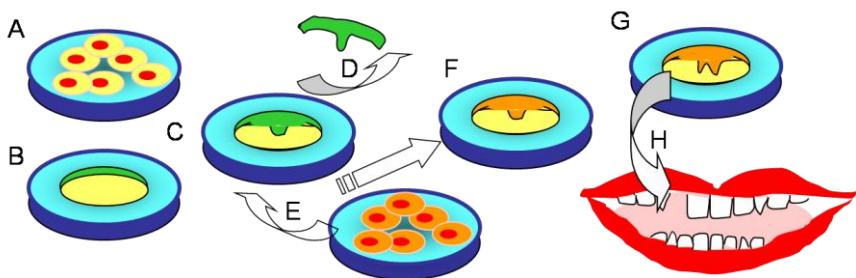


lokalizovány v podobě jakýchsi výrůstků (šipky), ze kterých jsou jednotlivé zuby izolovány.

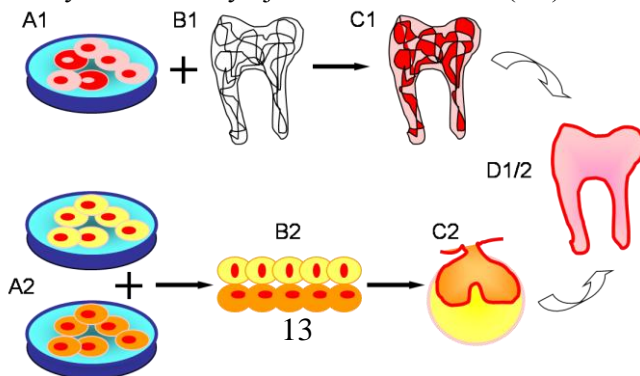
Po histologickém zpracování je zřejmé, že se jedná o zcela vyvinutý zub, včetně zubní pulpy, dentinu a skloviny.

Explantátové kultury jsou hojně využívány ve výzkumu možné náhrady zubů (a dalších orgánů) přímo z kmenových buněk pacientů.

Budoucnost molekulární medicíny na příkladu stomatologie by tedy mohla vypadat nějak takto: Kmenové buňky (žlutě) budou izolovány z tkání pacienta a kultivovány *ex vivo* v laboratoři (A). Populace kmenových buněk bude pokryta instruktivní vrstvou odpovídající embryonálnímu epitelu (zeleně, B) a zárodek bude kultivován až po stadium pupene, kdy bude epitelová část odstraněna (D) a nahrazena další populací kmenových buněk pacienta (E). Výsledný zubní základ nadále poroste v kultuře (G) a nakonec bude implantován na odpovídající místo v čelisti pacienta (H).



Jeden z přístupů k regeneraci zubů pomocí kmenových buněk využívá rozvolnění buněk (A1) zubních základů a jejich agregaci (C1) na podpůrném lešení (B1) pro tvorbu nového zubu (D1). Vývojový přístup je založen na opakování embryonálního vývoje. Kmenové buňky (A2) jsou izolovány, kultivovány a překryty embryonálním epitelem (B2). Po vytvoření mezenchymové části zubního základu může být kmenovými buňkami nahrazena také epiteliální část. Celý zubní základ (C2) pak pochází z kmenových buněk a vyvíjí se v normální zub (D2).



Kuře jako model pro studium genových interakcí během časného embryonálního vývoje

Jako modelový organismus, který je dobře definovaný a používá se ke studiu určitých mechanismů, např. vývojových či fyziologických.

Kuře slouží jako modelový organismus z celé řady důvodů. Embryo je snadno dostupné manipulacím ve skořápce, přičemž není nezbytné usmrtit matku jako je tomu u laboratorních savců (myš, potkan). Po manipulaci s embryem je možné jej ponechat ve skořápce po několik dnů a vývoj průběžně kontrolovat. Následně pak lze stanovit správnou dobu na ukončení experimentu a vzorky odebírat v přesně stanoveném vývojovém stádiu. Díky moderním metodám je již možné sledování exprese velkého souboru genů pomocí microarray čipů (30 000 genů současně) a provádět genové manipulace, jelikož sekvenování kuřecího genomu bylo již dokončeno. V současné době se kuřecích embryí využívá i v praxi pro testování toxických látek a potenciálních morfogenů (faktory ovlivňující morfolonii) či teratogenů (faktory narušující vývoj orgánů).

Vzhledem ke skutečnosti, že kuřecí embryo je snadno dostupné, přitahovalo pozornost badatelů již od nepaměti. Aristoteles jako první otevřel vajíčka v různých vývojových stádiích, aby zkoumal progresi jejich vývoje. Harvey (1628) je pak využil ke studiu struktury krevních ostrůvků a dále ke sledování funkčních rozdílů mezi arteriemi a vénami. Na základě svých pozorování předpověděl hypotézu o jejich vzájemném propojení prostřednictvím kapilárních cév. Následně Malpighi (1672) objevil skutečnost, že tlukot srdce začíná ještě před vlastní tvorbou krve a rovněž popsal existenci neurální rýhy (neurální trubice) a somitů. Zlepšení kvality mikroskopu a počáteční snahy o přípravu histologických řezů vedly k objevu zárodečných vrstev a prvním indikacím o existenci jejich vzájemných interakcí. Roux navrhl a provedl první experimentální manipulace, které vedly k narušení embryonálního vývoje a tím poskytovaly informace o vývojovém potenciálu buněk v embryu. Následně došlo ke zlepšení metod kultivace orgánových a buněčných kultur,

mikrochirurgických metod a metod sledování osudu buněk (Rawles, Fell, Rudnick, Graper, Pannett). Příprava videofilmů získaných časovou smyčkou („time-lapse“) zachycovala pohyb značených buněk v živých intaktních embryích a umožnila detailní sledování vývoje od počátku gastrulace až po vytvoření základů primordií pro jednotlivé orgány. Tato metoda rovněž umožnila pozorování chování izolovaných částí embryí. Následně Waddington odhalil mechanismus vzniku oboustranné asymetrie a interakce mezi buněčnými vrstvami, které vedou ke kontrole směru buněčného pohybu. Na základě těchto pozorování Abercrombie (1967, 1977) stanovil pravidla chování izolovaných buněk, což vedlo k objevu kontaktní inhibice a jiných principů, které jsou dnes základem moderní buněčné biologie. Díky snadnému přístupu k embryu byla pomocí transplantačních experimentů popsána zóna polarizační aktivity (zone of polarizing activity - ZPA) a apikální ektodermální hřeben (apical ectodermal ridge - AER), které slouží jako signální centra během formování končetin. Ve stejné době byla představena technika tvorby chimér pomocí kombinace tkání z kuřecích a křepelčích embryí, která slouží ke studiu migrace a diferenciaci buněčných populací v embryu. Díky této metodice bylo získáno velké množství informací o původu a osudu buněk neurální lišty, jakož i vývoji jednotlivých částí nervového systému.

V současné době se výzkum zaměřuje na detailní studium funkce jednotlivých genů a jejich produktů a studium molekulárního mechanismu vývoje. Kombinace metod experimentální embryologie s využitím molekulárních markerů vedla k zjištění, že rozdělení somitů podél jejich rostrokaudální osy určuje směr růstu motorických nervů či buněk neurální lišty a rovněž generuje segmentaci periferního nervového systému. Dále vedl k průkazu existence segmentální organizace zadního mozku a objev notochordu (základu nervové trubice) jako induktoru identity ventrální části nervové trubice a tím potažmo ventrální identity vyvíjející se míchy. Kuřecí model byl rovněž využit ke studiu oscilujících cyklů genové exprese, která se podílí na iniciaci tvorby somitů během postupujícího růstu těla.

Změny genové exprese jsou dodnes prováděny pomocí aplikace morfogenu či jiných vybraných regulátorů vývoje nasáklých do inertních kuliček, které se následně implantují do sledované tkáně. Ovlivnění vývoje může být zprostředkováno rovněž retrovirálními vektory (např. RCAS) či elektroporací plazmidů. Takto byly identifikovány klíčové molekuly, které iniciují růst končetin či dorzoventrální modelování těla.

V posledních letech byly klasické metody obohaceny novými metodami sloužícími ke sledování funkčních změn jednotlivých genů, jejich promotorů či využití kmenových buněk pro tvorbu transgenních organismů, které by však nebyly možné bez znalosti detailních informací o kuřecím genomu.

Rok	Popis objevu	Objevitel
1628	Funkce arterií a vén, předpověď existence kapilár	Harvey
1672-75	Neurální trubice, somity	Malpighi
1817-28	Zárodečné vrstvy (ektoderm, mezoderm, entoderm)	Pander, von Baer
1868	Neurální lišta	His
1929	Pohyby buněk během gastrulace	Graper, Wetzel
1960-68	T- a B-lymfocyty	Miller, Good, Glick, Claman
1967	Kontaktní inhibice	Abercrombie
1976	První buněčný onkogen (c-src)	Bishop, Varmus
1985-87	Kyselina retinová jako morfofen končetin	Tickle, Eichele
1989	Embryologický význam rhombomer	Lumsde, Keynes
1995	Genetická kaskáda regulující levo- a pravostrannou asymetrii	Tabin
1997	Oscilující genové exprese během somitogeneze	Pourquié

Sekvenování kuřecího genomu

První pokrok směrem k získání informace o kuřecím genomu byl učiněn v březnu 2003, kdy byly publikovány sekvence z 64 cDNA knihoven vytvořené z 21 různých tkání embryí i dospělců (Roslin Institute v Edinburghu, UMIST v Manchesteru a Univerzita v Dundee). Tím vědci získali informace z 339 314 EST sekvencí reprezentující přibližně 10 000 genů. První anotovaná verze kompletního kuřecího genomu byla publikována v květnu 2004 (International Chicken Genome Sequencing Consortium).

Kuřecí genom v haploidní formě obsahuje $1,2 \times 10^9$ párů bazí rozdělených do 40 chromozomů, které zahrnují i pohlavní chromozomy W a Z, přičemž samice je heterogamní a vlastní oba chromozomy WZ.

Kuřecí model v biomedicíně kraniofaciálních struktur

Vývoj obličeje podstupuje od časných embryonálních stadií po dosažení tvaru dospělců značné změny. Dochází k růstu jednotlivých obličejových prominencí, který je zakončen jejich srůstem a tvorbou uzavřeného patra. Vývojové odchylky v období tvorby čelistí a patra vedou k vážným anomáliím (rozštěpu rtu, rozštěpu patra), které jsou často neslučitelné se životem nebo vyžadují dlouhodobé náročné léčení. Z výše zmíněných důvodů představuje výzkum morfologie a vývoje kraniofaciálních struktur významnou součást studií klinických i preklinických disciplín v humánní i veterinární medicíně. Rozštěpy vznikají kombinací genetických a zevních faktorů a kuřecí embryo lze využít jako jeden z vhodných modelových druhů. Snadná přístupnost okénkem ve skořápce usnadňuje studium funkce jednotlivých genů při vývoji čelistí. Mapování genové exprese stanovující identitu jednotlivých prominencí pomocí metody microarray u normálních embryí umožňuje využití polygenetického přístupu, který je zcela nezbytný pro odhalení komplexních molekulárních základů vývoje kraniofaciálních struktur a vzniku jejich malformací. Použití microarray analýzy představuje novou možnost zkoumání genomu dovolující simultánní studium několika

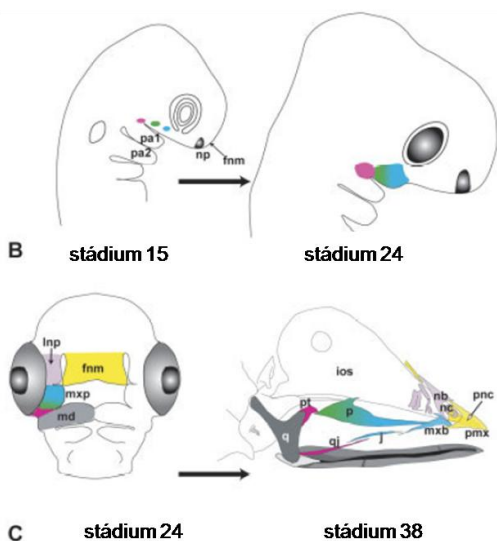
tisíců genů, snadnou identifikaci kandidátních molekul a signálních drah a v neposlední řadě sestavení profilu genové exprese u celého systému - embryologického či patologického. Tyto experimenty odhalují nové kandidátní geny podílející se na vývoji jednotlivých obličejových výčnělků.

Obličejové výběžky jsou tvořeny povrchoвым ektodermem a neuroektodermálním mezenchymem formovaným buňkami neurální lišty. Buňky podílející se na vzniku prvního faryngeálního (žaberního) oblouku a ostatních kraniálnějších struktur hlavy pocházejí z oblasti kaudálního metencefalonu (střední mozek). Při použití chimér křepelek a kuřat bylo zjištěno, že většina kostí mandibuly, dále maxila, patrová a jugální (jařmová) kost pocházejí z oblasti mezencefala. Tato data však neumožňují přesně determinovat původ a osud jednotlivých oblastí maxilárních a mandibulárních prominencí. Je nezbytné mapovat migrující buňky již v době, kdy se začínají tvořit faryngeální oblouky. To odpovídá období, kdy končí migrace buněk neurální lišty do jednotlivých obličejových prominencí.

Na příkladu vývoje jednotlivých obličejových prominencí bylo ukázáno mapování osudu buněčných populací osídlujících obličejové prominence. S využitím fluorescenčního značení migrujících buněk byla sledována otázka původu buněčných populací podílejících se na formování jednotlivých dermálních kostí obličeje, přičemž bylo zjištěno, že párové maxilární výběžky se vytvářejí v oblasti budoucích ústních koutků a přispívají k vývoji maxily a patrové kosti.

V současné době panuje názor, že všechny kosti horní čelisti vznikající z maxilární prominence pocházejí z prvního faryngeálního oblouku, přestože pro tuto skutečnost nebyl podán žádný experimentální důkaz. Otázkou proto bylo, zda buňky maxilární prominence jsou odděleny od kraniální maxilární a kaudální mandibulární kondenzace od nejranějších stádií tvorby faryngeálního oblouku, či zda buňky z prvního faryngeálního oblouku přispívají k tvorbě maxilární prominence. Mapování bylo zahájeno během časně tvorby faryngeálního oblouku (stadium 13, H&H) a pokračovalo až do pozdějších stádií, kdy je maxilární prominence již

vytvořena (stádium 24, H&H). S využitím fluorescenčního značení migrujících buněk byla studována otázka původu buněčných populací podílejících se na jednotlivých dermálních kostech obličeje. Bylo zjištěno, že párové maxilární výběžky se vytvářejí v oblasti ústních koutků a přispívají k vývoji maxily a patrové kosti. Toto mapování jasně ukázalo, že mezenchym prvního faryngeálního oblouku nepřispívá k tvorbě maxilární prominence a že tato oblast má samostatný původ. Podobné výsledky byly zjištěny při studiu axolotla, kde navíc dvě zřetelné kondenzace - maxilární a mandibulární, jsou rozeznatelné i morfologicky.



Hlavní vliv na migraci a další vývoj buněk neurální lišty mají signály z proencefala (předního mozku), entodermu a povrchového ektodermu jako např. retinoidy, FGF, WNT (Wingless family) a SHH (Sonic hedgehog). Během migrace dochází k epitelio-mezenchymální interakci buněk neurální lišty s okolními strukturami. Tyto interakce následně iniciují jejich

diferenciaci ve specifické kraniofaciální struktury.

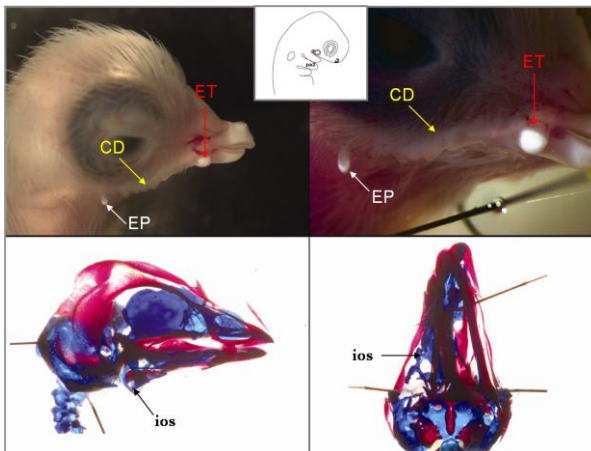
Existuje několik genů, které specifikují identitu jednotlivých obličejových prominencí. Tyto geny zahrnují transkripční faktory exprimované v mezenchymu vznikajícím z buněk neurální lišty před jejich konečnou diferenciací. V experimentech, které ovlivňují funkci těchto genů, byl jako výsledek popsán specifický kraniofaciální fenotyp. V případě, že dojde k přeměně jedné struktury, např. obličejové prominence (výběžky) v jinou, označuje se tento jev jako homeotická transformace.

Genové interakce

Buňky kraniální neurální lišty jsou odvozeny ze dvou odlišných oblastí: rostrální Hox-negativní a kaudální Hox-positivní. Správná morfogeneze Hox-negativního regionu závisí na signalizačních faktorech z entodermu. Tato oblast přispívá ke vzniku frontonazální masy a prvního faryngeálního oblouku. Pro modelování kaudálněji Hox-positivní oblasti je nezbytná exprese Hox genů pro správný vývoj kaudálnějších faryngeálních oblouků.

Hoxa2 je u embryí exprimován až do oblasti druhé rhombomery. V případě, že je Hoxa2 inaktivován, se buňky druhého faryngeálního oblouku chovají jako jejich sousedící buňky z Hox-negativního prvního faryngeálního oblouku a diferencují se zde části skeletu příslušející této oblasti. Naproti tomu ektopická exprese Hoxa2 v prvním faryngeálním oblouku vede k jeho transformaci v druhý faryngeální oblouk včetně tvorby příslušných skeletálních derivátů.

BMP a kyselina retinová se podílejí na určení identity frontonazální masy. Implantace nogginu a kyseliny retinové do prvního faryngeálního oblouku stádia 15 kuřecích embryí indukovala duplikaci elementů frontonazální masy na místě maxilárního výčnělku, stejně jako duplikaci vaječného zubu. Jelikož je noggin antagonistou BMP naznačuje tento výsledek, že snížení hladiny BMP a naopak zvýšení retinoidů se společně podílejí na specifikaci identity frontonazální masy.



Vzhledem ke skutečnosti, že při implantaci kuliček do prvního faryngeálního oblouku byla nejvíce ovlivněna oblast maxily, jsme se rozhodli umístit kyselinu retinovou a noggin rovněž do této postoptické oblasti. Tentokrát nastala duplikace frontonazálních elementů se současnou ztrátou derivátů maxilární prominence bez narušení tvorby skeletu mandibuly. Rovněž byly indukovány další ektodermální deriváty charakteristické pro frontonazální masu jako ektopický hřeben nebo duplikace vaječného zubu v oblasti maxily.

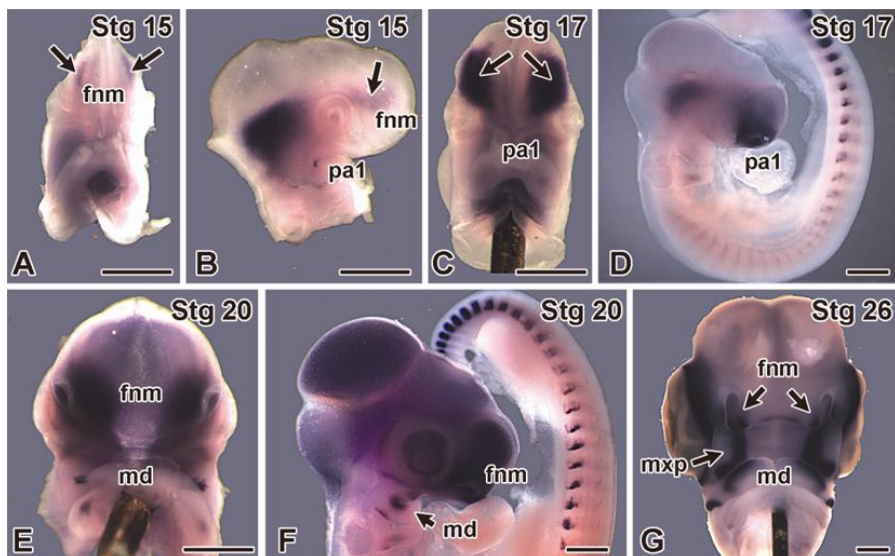
Komplexnost molekulárních regulací podílejících se na vývoji kraniofaciálních struktur a vzniku jejich vad vyžaduje dokonalou znalost genů a signalizačních drah zodpovídajících za jejich normogenezi.

V posledním desetiletí badatelé získali možnost využít polygenetického přístupu při studiu tisíců genů během jednoho experimentu. Microarray technologie bylo použito pro osvětlení komplexních molekulárních regulací v různých kraniofaciálních strukturách: klenby lebeční, kranialních sutur, čelistí a patra či zubů. Ve většině případů však jde pouze o povrchní průzkum výstupů z microarray. Jen v několika případech byla testována rovněž funkce kandidátních genů.

Microarray technologie rovněž umožnila odhalit regulátor růstu délky zobáku distálním směrem u pěnkav z dříve zmíněného experimentu. S využitím cDNA microarray analýzy byla u pěti druhů pěnkav zjištěna odlišná exprese kalmodulinu, který dříve nebyl spojován s kraniofaciálním vývojem. Prostorová a časová exprese kalmodulinu ve vyvíjejících se zobácích korelovala s celkovou délkou zobáku. Bylo rovněž potvrzeno, že efektor kalmodulinu CaM kináza (CaMKII) byla schopna ovlivňovat délku zobáku, když byla použita změna exprese pomocí virů. Kalmodulin by nebylo možné odhalit bez využití microarray technologie.

Jedním z cílů výzkumu v této oblasti je studium vývoje jednotlivých obličejových prominencí se zaměřením na mapování genové exprese stanovující identitu jednotlivých prominencí. Jeden z experimentů se týkal stadia 18 kuřecích embryí, tedy prvního období, kdy jsou jednotlivé obličejové výčnělky snadno rozeznatelné. Srovnání exprese frontonazální

masy, maxilární prominence a prvního faryngeálního oblouku ukázalo, že nejodlišnější byl profil u frontonazální masy, což odpovídá zcela jinému původu buněk podílejících se na jejím vývoji. Jako charakteristické geny pro frontonazální masu ve sledovaném stádiu se ukázaly geny *Tbx22* (obrázek), *Sox8*, *Eya2*, *Lmx1b*, *Tgln3*, *Ascl1*, *Sp8* a *Zic1*.



Microarray analýzy využívají miniaturních čipů umístěných na pevném podkladu (např. mikroskopické sklo). Barevnou reakcí vzorku s nukleotidovými sekvencemi v jednotlivých bodech čipu je pak možné odhalit, zda daný gen ve vzorku je či není aktivní (dochází k přepisu do RNA).

U kontrolních embryí poskytuje tato metoda rozsáhlé množství informací o genové expresi během raných stádií kraniofaciálního vývoje, což otevírá nové možnosti studia do budoucna. Navíc je velmi pravděpodobné, že některé z těchto nově objevených genů budou hrát roli při vzniku lidských kraniofaciálních poruch. Expresní profil homologických oblastí u člověka byl publikován pouze pro první faryngeální oblouk. Bylo by rovněž zajímavé porovnat seznamy genů pro nalezení konzervativních expresních vzorů u jednotlivých obličejových prominencí, popřípadě jejich rozdílů podílejících se na druhově specifické morfologii obličejových oblastí.

Nobelova cena za fyziologii/medicínu v roce 2001

ZA OBJEVY TÝKAJÍCÍ SE KLÍČOVÝCH REGULÁTORŮ BUNĚČNÉHO CYKLU

Buňky jsou základní stavební a funkční jednotkou organismů a procházejí mnohonásobným dělením (proliferací). Během buněčného dělení dochází k replikaci DNA (zdvojení počtu chromozomů) a její distribuci do dceřiných buněk. Časování proliferace a její přesné řízení je zajištěno mechanismy buněčného cyklu. V první fázi (G1) buňka zvětšuje svůj objem, pak podstupuje syntézu DNA (S), připravuje se na dělení (G2) a projde mitózou (M).

Leland Hartwell použil buňku kvasinky jako model pro genetické studie buněčného cyklu a objevil geny zodpovědné za jeho řízení (CDC-genes – cell division cycle genes). Tyto geny se uplatňují v tzv. kontrolních bodech buněčného cyklu a umožňují jeho správný průběh v jednotlivých fázích.

Paul Nurse identifikoval klíčový regulátor buněčného cyklu u kvasinek – gen *cdc2* a izoloval odpovídající gen také u lidských buněk (CDK1). Gen *cdk1* kóduje protein, který je členem rodiny cyklin- dependentních kináz (CDK). Tyto enzymy jsou schopny fosforylovat proteiny a řídit tak jejich funkčnost (inhibice, aktivace). Množství CDK molekul je během cyklu stejné, jejich aktivita je však výrazně měněna působením cyklinů. Proto jsou často CDK přirovnávány k silnému motoru auta a cykliny k řadící páce. Funkci brzdy pak plní inhibiční proteiny buněčného cyklu.

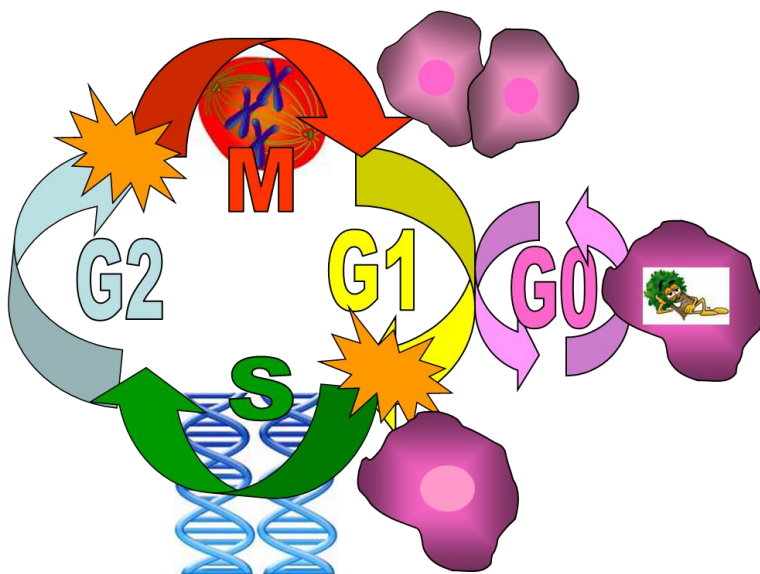
Cykliny objevil Tim Hunt a pojmenoval je podle jejich charakteristické změny množství v různých fázích buněčného cyklu (koncentrace jednotlivých cyklinů vlastně „informují“ buňku, ve které fázi se nachází). Periodická syntéza a degradace cyklinů během buněčného cyklu je tedy opravdu klíčovým regulačním mechanismem.

Klíčové regulátory buněčného cyklu jsou vysoce evolučně konzervované. Znalost těchto mechanismů umožňuje lepší pochopení, diagnostiku a terapii procesů souvisejících s deregulacemi buněčného cyklu jako je např. kancerogeneze.

KLÍČOVÉ REGULÁTORY BUNĚČNÉHO CYCKLU

Vznik nových buněk dělením mateřských je znám už přes 150 let, vždyť buněčná teorie je datována do roku 1838. Avšak až během posledních desetiletí byly identifikovány molekulární mechanismy řídící buněčný cyklus a tím také buněčné dělení, které jsou evolučně vysoce konzervované.

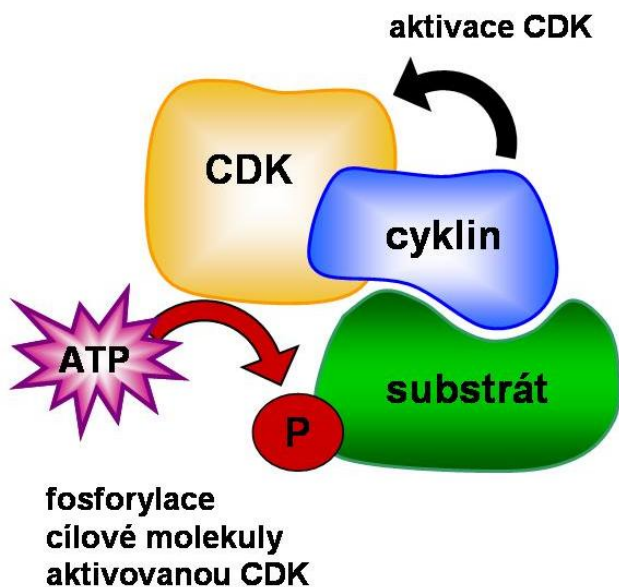
Buněčný cyklus sestává z několika fází. V první fázi, označované jako G1 se buňka výrazně zvětšuje a připravuje se na syntézu DNA, tedy zajištění kopie genetického materiálu pro obě dceřiné buňky. Před vlastní syntézou však dochází k důležité kontrole, kdy se buňka „zastaví“ v kontrolní fázi G1/S. Tento okamžik je nezbytný zejména ke kontrole dostatku živin, energie a materiálu, vždyť buňka musí nakopírovat miliardy chemických písmen (nukleotidů v DNA). Pokud je vše v pořádku, buňka vstupuje do syntetické, S fáze a proběhne replikace DNA. Po replikaci musí ještě dojít k vlastnímu rozdělení buňky, což zajišťuje mitotická neboli M fáze. Předtím, než buňka do této fáze cyklu vstoupí, musí projít dalším důležitým kontrolním bodem, a to G2/M.



G2/M kontrolní bod je kritický pro ověření správného přepisu genetické informace, tedy kontrole replikace. Každá nenapravená chyba totiž může být osudná a buňky s chybně syntetizovanou DNA musejí být eliminovány (podstoupit buněčnou smrt). „Přehlédnuté“ chyby jsou totiž často počátkem např. nádorových transformací.

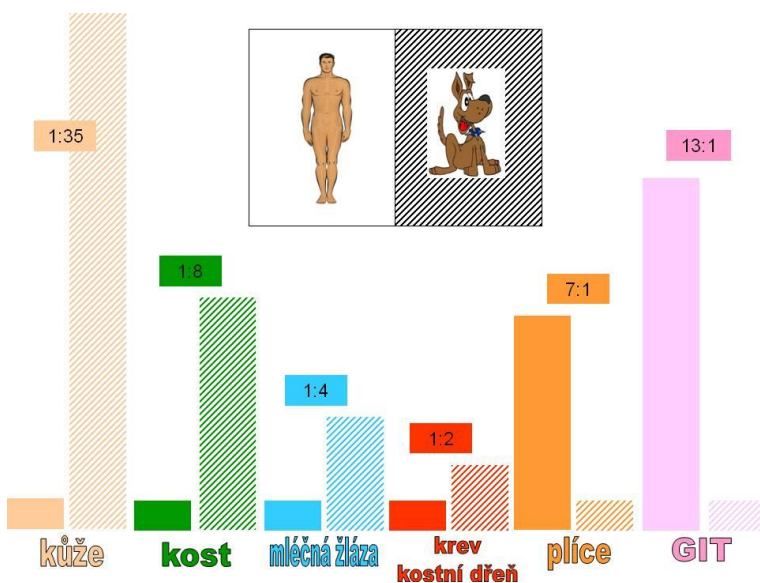
Doba buněčného cyklu se liší podle typu buněk, většinou zabírá několik hodin. Buňky také mohou z cyklu vystoupit a setrvávají v tzv. G0 fázi, kdy se nedělí. Přesto, že tato fáze je nazývána „odpočinková“ (resting), buňky během ní pilně plní svoje funkce.

Časovou souslednost buněčného cyklu zajišťují cykliny, cyklin-dependentní kinázy a inhibitory těchto kináz. Cykliny působí jako časovač a aktivují cyklin-dependentní kinázy (CDK). Aktivované CDK jsou schopny fosforylace cílových molekul (substrát). Fosforylace je základním mechanismem aktivace a deaktivace cílových molekul, což vede např. ke změnám jejich enzymové aktivity apod.



Kontrola buněčného cyklu a možné následky selhání

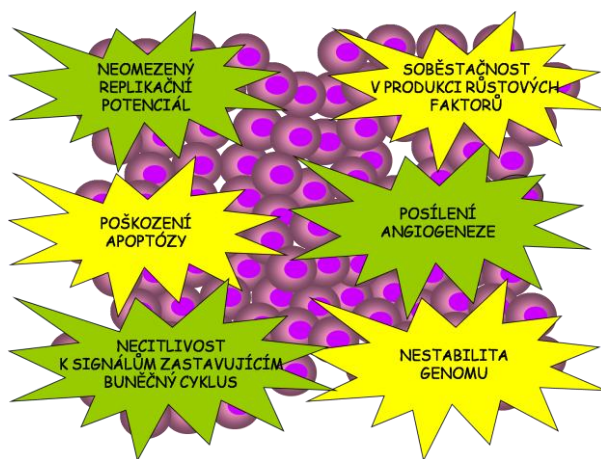
O nádorech (novotvarech), jejich vzniku, šíření, projevech, rozpoznávání a léčbě se sice dnes hodně ví, žel mnoho nepoznaného je podstatou faktu, že nádorová onemocnění jsou ve vyspělém světě druhou nejčastější příčinou úmrtí člověka. Zajímavým zjištěním je skutečnost, že výskyt nádorových onemocnění u zvířat na 100 tisíc vyšetřených je srovnatelný s člověkem. Liší se ale zastoupení nádorů podle orgánů či tkání. Srovnávací studie o výskytu nádorů (člověk vs. pes), přes uplatnění rozdílných diagnostických postupů, poskytly tyto výsledky: kůže 1:35, kost 1:8, mléčná žláza 1:4, krev, kostní dřeň 1:2, plíce 7:1, trávicí ústrojí 13:1. K dispozici jsou dnes solidní znalosti, týkající se plemenné dispozice zvířat k nádorům. Tak např. u boxera je vyšší výskyt nádorů mízního systému, u německého ovčáka trávicího ústrojí, u teriérů nádorů kůže, mízních tkání, žaludku, u španělů a ohařů dutiny ústní, u siamských koček je pozorován zvýšený výskyt nádorů tenkého střeva a lze uvést řadu dalších příkladů.



Za normálních (fyziologických) podmínek představuje růst (proliferace) buněk řízený, většinou se opakující proces, který je zakončen rozdělením rodičovské buňky na dvě dceřiné. Tím je zajištěn růst a zachování tkání. Po určitém počtu dělení nastává smrt buňky formou apoptózy (tj. programované fyziologické buněčné smrti). Proliferace je regulována mechanismy nitrobuněčnými a mimobuněčnými. Za fyziologickou regulaci růstu (dělení) buněk jsou odpovědné geny, označované protoonkogeny. V mechanismech mimobuněčných se uplatňují faktory stimulující či inhibující buněčný růst. Stimulační efekt vykonávají např. růstové faktory (GF) - vaziva (FGF), cévní výstelky (VEGF), faktory stimulující kolonie krevních buněk a další. Inhibičním účinkem se vyznačují např. faktory smrtící nádory (TNF), interferony (IFN) aj. Uvedené faktory (tzv. první poslové) působí na cílovou buňku prostřednictvím specifických molekul - receptorů, lokalizovaných na buněčné membráně. Výsledný efekt se potom realizuje za aktivace nitrobuněčných mechanismů (s účastí různých molekul jakožto druhých poslů).

Nádorový růst (bujení) je proces abnormální proliferace buněk, doprovázený změnou diferenciací buněk. To znamená, že vzniká tkáň se změněnou strukturou a funkcí – tkáň transformovaná. Předpokladem nádorového růstu je vlastně transformace (přeměna) buňky s limitovaným počtem dělení zakončených apoptózou v buňku s nekontrolovaným počtem dělení (v buňku „nesmrtelnou“). V důsledku změn genetické informace dochází totiž k poruše regulace buněčného růstu. Děje se tak cestou (1) aktivace protoonkogenů na onkogeny, jejichž produkty (onkoproteiny) stimulují proliferaci buněk, nebo (2) inaktivace supresorových genů (antionkogenů), jejichž produkty inhibují proliferaci buněk. Antionkogeny jsou také označovány jako „strážci zhoubných nádorů“. U člověka jsou takovými antionkogeny p53, p73. Produkty onkogenů a antionkogenů mohou být GF, enzymy aj. V obou případech získává buňka tzv. maligní fenotyp, který se vyznačuje nekontrolovaným růstem, poruchou diferenciací a změnami migračních vlastností (ty jsou předpokladem jednoho ze způsobů šíření - metastáz).

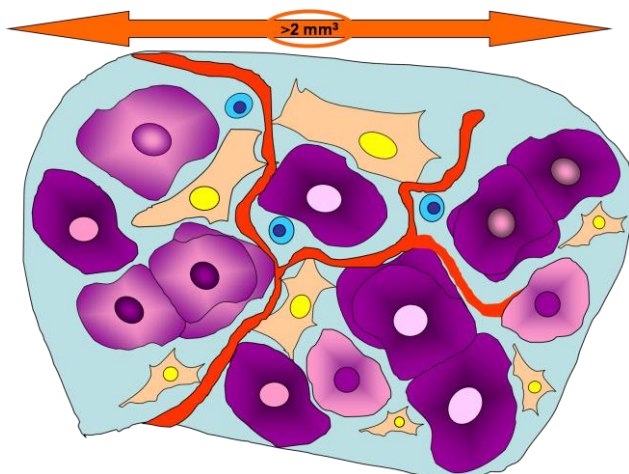
Nádorová transformace postihuje buňky jak s abnormálního genotypem, tak i s genotypem normálním. Jedinci s abnormálním genotypem (s vlohou pro nádor) onemocní, i když není intenzita působení vnějších škodlivých faktorů pro ostatní jedince patogenní. U normálního genotypu může jít o náhodnou, spontánní přeměnu nebo o transformaci vyvolanou faktory (kancerogeny) fyzikálními, chemickými nebo biologickými. Mezi fyzikálními faktory mají své místo různé druhy záření (např. rtg). Mezi chemické faktory patří různé alkylační látky včetně alkylačních cytostatik. Biologické faktory jsou představovány viry (herpes-, papovaviry aj.) a bakteriemi (např. helikobaktery). Některé látky (různé aromatické uhlovodíky, produkty bakterií a rostlin - aflatoxiny, griseofulvin) nevyvolávají nádor přímo, ale vyžadují metabolickou aktivaci. Označují se prokancerogeny. Významná je skutečnost, že nádorový růst přetrvává, i když jsou jeho příčiny eliminovány.



Způsob šíření nádoru se liší podle druhu nádoru. Nádory nezahobné (benigní) vykazují oproti zdravé tkáni malé rozdíly v enzymové výbavě buněk a vlastnostech buněčných povrchů. Důsledkem je růst nádoru expanzivní, tzn. pomalý a ohraničený růst s malým poškozením okolních struktur. Nádory zhoubné (maligní) mají oproti zdravé tkáni velké rozdíly v enzymové výbavě a vlastnostech buněčných povrchů. U nich to může být

šíření (1) infiltrativní, tj. tkáňovými štěrbinami, (2) invazivní, tj. spojené s destrukcí okolní tkáně, (3) šíření metastázami, tj. tvorbou dceřiných nádorů. Ty vznikají tak, že z původního ložiska uvolněná nádorová buňka se po transportu např. krví nebo mízou uhnízdí na novém místě.

Se zřetelem na šíření nádoru metastazováním a další růst nádoru je důležitá angiogeneze, což je vícestupňový proces tvorby nové cévy. Rostoucí nádorové ložisko totiž může bez krevního zásobení dosáhnout velikosti maximálně 1-2 mm³.



Při této velikosti se růst nádoru zpomaluje, až se zastaví, neboť přívod kyslíku a živin nestačuje. Angiogeneze je nastartována a řízena aktivátory, např. FGF, VEGF, a je výsledkem nerovnováhy mezi těmito aktivujícími faktory a inhibitory angiogeneze, např. angiostatinem, některými interferony aj. Stupeň angiogeneze je v těsném vztahu k prognóze onemocnění.

Organismus reaguje na nádor obvykle nevýraznou (zpočátku) a většinou déletrvající odpovědí. Tento zásah do organismu má často komplexní charakter a nese označení nádorová choroba.

Poznávání vzniku a šíření nádorů je robustní vědecké téma. Získané poznatky představují klíč pro diagnostiku a terapii nádorů.

Nobelova cena za fyziologii/medicínu v roce 2002

ZA OBJEVY TÝKAJÍCÍ SE GENETICKÉ REGULACE VÝVOJE ORGÁNŮ A PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI

Z jediného oplozeného vajíčka (zygoty) vznikají miliardy buněk dospělého organismu. Ty se kromě dělení dále diferencují (rozdělují) a tvoří stovky různých buněčných typů se specifickou funkcí v jednotlivých tkáních. K masivnímu buněčnému dělení však dochází nejen během embryonálního vývoje, ale i u dospělého organismu během každodenní obnovy tkání. Pro udržování tkáňové homeostáze je nutné balancovat tento vysoký nárůst buněk jejich kontinuální eliminací.

Sydney Brenner použil hlístici *Caenorhabditis elegans* jako ideální model pro studium buněčné diferenciaci a vývoje orgánů. Tělo tohoto asi 1 mm velkého živočicha sestává z přesně daného počtu buněk (959), jehož je docíleno přesně řízeným buněčným dělením a likvidací určitých buněk cestou programované buněčné smrti. Robert Horvitz využil tento model pro výzkum genetického programu řídicího buněčnou smrt. Dále identifikoval první „geny buněčné smrti“, označené jako *ced-3* a *ced-4* a ukázal, že jsou nezbytné pro její průběh. Později objevil také gen zabraňující buněčné smrti – *ced-9*. Obdobné geny byly později nalezeny také u člověka (např. *ced-9* odpovídá *Bcl-2*) a ukazují vysokou evoluční konzervovanost genetických mechanismů programované buněčné smrti.

John Sulston vyvinul techniku studia buněčných linií u *C. elegans* a potvrdil přesné řízení buněčné smrti. Každá buňka mnohobuněčného organismu je naprogramována k sebeustrukci, což umožňuje řízené spouštění tohoto programu na správném místě a ve správný čas. Následkem chybných regulací tohoto programu jsou vývojové poruchy jako např. syndaktylie; rezistence k programované buněčné smrti je spojena s výskytem nádorových a autoimunitních onemocnění, zvýšená senzitivita pak s neurodegenerativními chorobami. Poznání mechanismů buněčné smrti ale také otevírá možnosti terapií těchto závažných onemocnění.

GENETICKÁ REGULACE VÝVOJE ORGÁNŮ A PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI

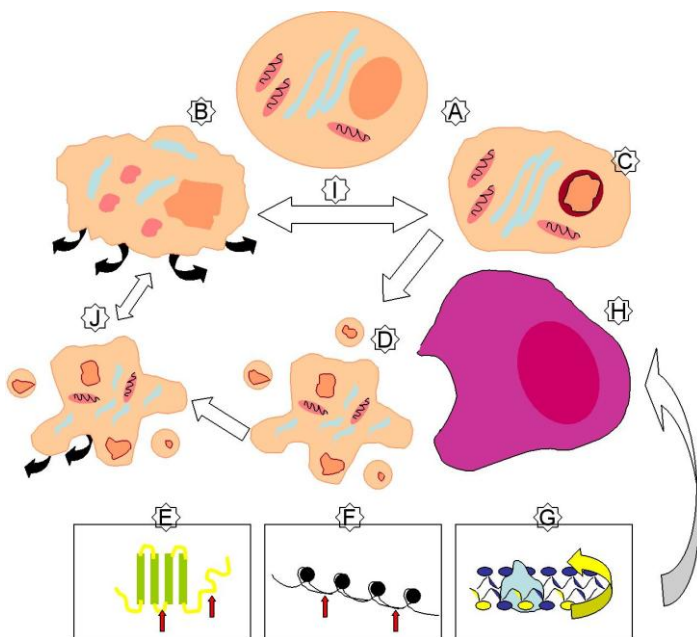
Stále podrobnější zkoumání života na buněčné a molekulární úrovni je dáno jednak technickými možnostmi, ale především neustálým doplňováním mozaiky informací. Vynález mikroskopu v 17. století učinil buňky poprvé viditelnými, elektronový mikroskop umožnil rozlišení detailů buněk. V první polovině devatenáctého století se zrodil obor buněčné biologie a o sto let později otevřel objev struktury DNA cestu prudkému rozvoji tohoto oboru na molekulární úrovni. Fenomén programované buněčné smrti však zůstával dlouho nedoceněn. Možná to bylo dáno skutečností, že život sám přináší tolik tajemství, že smrt byla brána pouze jako nezbytný pasivní konec zázraku života.

Zásadní zvrat v opomíjení důležitosti buněčné smrti jako aktivního procesu v kontinuitě života mnohobuněčného organismu znamenal rok 1972, kdy byla popsána nejvýznamnější cesta programované buněčné smrti, tzv. apoptóza. Aktuální prudký rozvoj výzkumu a aplikací v této oblasti je dán především skutečností, že smrt buňky cestou apoptózy je způsobena aktivací specifických geneticky kódovaných biochemických drah vedoucích k zániku buňky.

Každá buňka mnohobuněčného organismu je naprogramována k sebedestrukci, což je důležitý faktor pro regulace homeostázy na úrovni organismu. Tyto dráhy buněčné smrti musejí být během života buňky spolehlivě potlačeny a naopak bezchybně spuštěny při nezbytné eliminaci této buňky. Dráhy programované buněčné smrti zahrnují nejenom proteiny (enzymy), které se účastní vlastní exekuce, ale také přesné regulace tohoto programu a dále faktory podílející se na likvidaci a recyklaci buněčného těla. Znalost těchto drah a mezibuněčných komunikačních mechanismů pak umožňuje cílené zásahy v procesech, kde hraje programovaná buněčná smrt klíčovou roli.

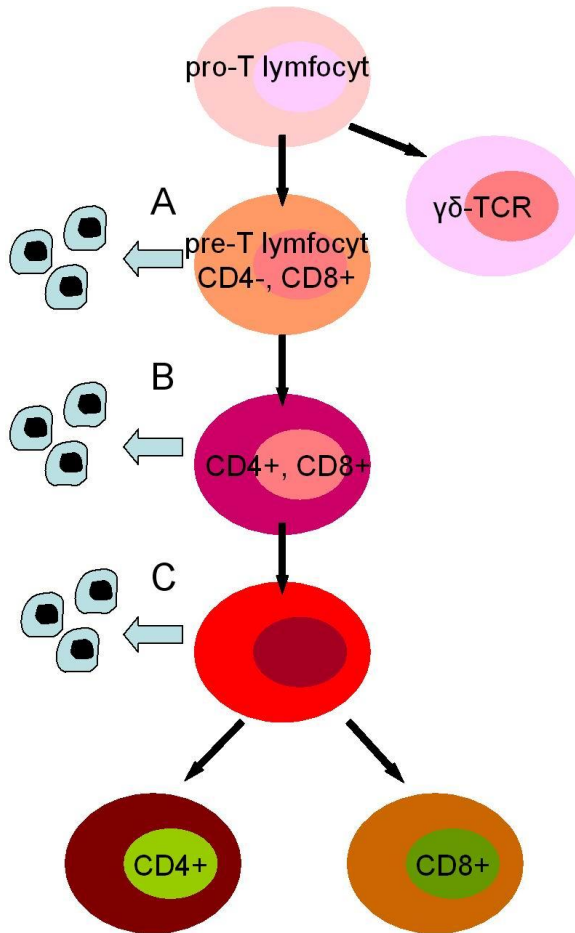
Význam smrti buněk v životě mnohobuněčného organismu

Programovaná buněčná smrt probíhá nejčastěji formou apoptózy (A). Buňka vstupující do apoptózy postupně zmenšuje svůj objem a její jádro kondenzuje (C). Cytoplazmatická membrána vykazuje zvrásnění, ale zůstává intaktní, stejně jako některé organely (mitochondrie) a to až do rozpadu buňky na apoptotická tělíska (D). Dochází ke specifickému štěpení intracelulárních proteinů (E), fragmentaci DNA (F) a translokaci některých složek cytoplazmatické membrány (G). Změny cytoplazmatické membrány aktivují fagocyty (H) a tak jsou apoptotická zbytky buněčného těla úspěšně odstraněny a recyklovány. Membrána nekrotické buňky (B) si nezachovává integritu, složky cytoplazmy se uvolňují do okolí a vyvolávají v místě poškození zánět. Apoptotickou a nekrotickou formu buněčné smrti nelze striktně oddělovat (I), byla ukázána řada intermitentních forem (aponekróza, nekroptóza), navíc nefagocytovaná apoptotická tělíska podstupují sekundární nekrózu (J).



Určení počtu a lokalizace buněk při vývoji orgánů a struktur mnohobuněčného organismu těsně souvisí s buněčným dělením/proliferací vyvažovaným buněčnou smrtí. V embryonálním vývoji savců se uplatňuje apoptóza již ve stádiu blastocysty. Dalším klasickým příkladem embryonální apoptózy u savců je vývoj končetin, zejména proces separace prstů - digitalizace. Porucha v apoptotickém programu při formování končetin je spojena především se syndaktyliemi (neoddělené prsty). Také vývoj nervového systému vyžaduje přísnou koordinaci buněčné proliferace a buněčné smrti, kdy apoptóze podléhá asi polovina neuronů. Dalšími z mnoha příkladů embryonální apoptózy u savců jsou angiogeneze (novotvorba krevních cév) a vývoj jiných větvených orgánů jako plic, ledvin, mléčných a slinných žláz. Vytvoření těchto soustav závisí na souhře proliferačních a apoptotických procesů. Také formování struktur pohlavní soustavy a srdce probíhá za účasti přesně řízených apoptotických událostí. Apoptóza je proto někdy označována jako sochař embryonálního vývoje.

Velmi výrazně se uplatňuje apoptóza při utváření a funkci imunitního systému. Imunitní systém je unikátní svojí specifičností, tedy škálou B- a T-lymfocytů, které reagují na široké spektrum antigenů, na druhou stranu je však nutné potlačení autoreaktivity (imunitní reakce proti vlastním buňkám). Obecně jsou tyto homeostatické mechanismy imunity zprostředkovány jemně vyladěnou rovnováhou mezi masivním buněčným dělením/expanzí a buněčnou smrtí/apoptózou. Programovaná buněčná smrt cestou apoptózy se navíc uplatňuje při maturaci (dozrávání) T lymfocytů v brzlíku, kde jí podléhá více než 95 % těchto buněk. Přísná kontrola je nezbytná pro eliminaci zakázaných klonů a prevenci nadměrné reaktivity a autoimunity. Dozrávání T-lymfocytů je založeno na vícestupňové selekci buněk apoptózou. V kůře brzlíku podstupují apoptózu pre-T-lymfocyty (A). Na pozitivní selekci (vazba MHC /hlavní histokompatibilní komplex, major histocompatibility complex) je založena kontrola přeskupení α řetězců (B). Ve dřeni brzlíku nastává finální negativní selekce a apoptóza autoreaktivních klonů (C). Maturované buňky jsou uvolňovány do krevního řečiště.



V neposlední řadě je apoptóza cestou cytotoxického (likvidujícího cílové buňky) účinku T lymfocytů, tedy výkonu buněčné imunitní odpovědi. Přítomnost receptorů buněčné smrti na většině buněk mnohobuněčného organismu je navíc nástrojem umožňujícím kontrolu a regulaci potenciálně nebezpečných buněk vlastního organismu.

Apoptotické signální dráhy

Znalost molekulárních mechanismů programované buněčné smrti cestou apoptózy je stále komplexnější, mnohé však dosud zůstává neobjasněno. Na základě molekulárních signálních drah lze rozlišit dvě základní cesty aktivace apoptózy – vnější a vnitřní.

Vnější (receptory zprostředkovaná) signální dráha je aktivována extracelulárními (mimobuněčnými) podněty působícími jako ligandy (vazebné signální molekuly) pro tzv. smrtící receptory na povrchu buněk. Vazbou ligandu na receptor je pak zahájena změna (oligomerizace) receptoru a spuštěna intracelulární (vnitrobuněčná) apoptotické mašinerie vedoucí k destrukci a likvidaci buňky.

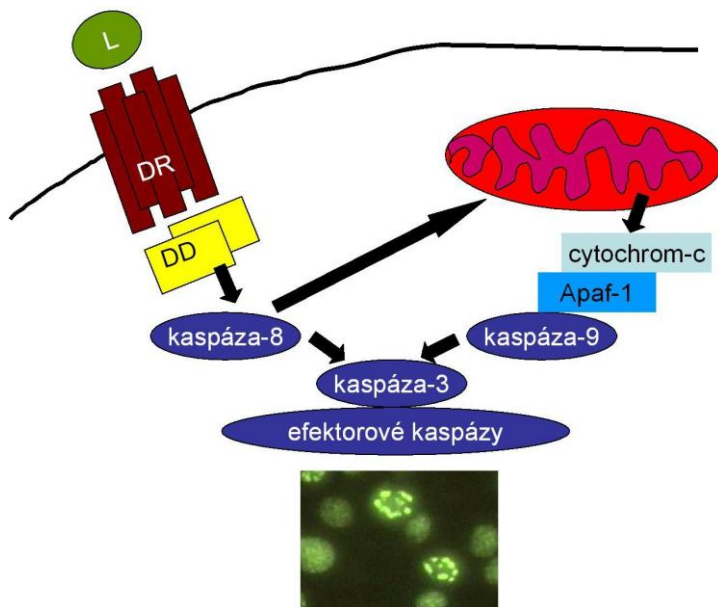
Vnitřní (na membránových receptorech nezávislá) apoptotická dráha je zprostředkována přes mitochondrie, případně endoplazmatické retikulum. Apoptotickým stimulem může být cytotoxický nebo oxidační stres, tepelný šok a poškození DNA. Pro osud buňky je rozhodující rovnováha mezi pro- a anti-apoptotickými členy proteinové rodiny Bcl-2 asociovanými právě s mitochondriemi, případně s endoplazmatickým retikulem. Mitochondrie navíc reagují nejenom na prvotní apoptotické signály, ale přijímají stimuly také z dalších organel a buněčných struktur.

Vnější a vnitřní cesty tak mohou být na určitých úrovních propojeny, což ukazuje složitou síť molekulárních signalizací během apoptózy. Mimo přímých vnitřních a vnějších stimulů je apoptóza regulována růstovými faktory a dalšími cytokiny, proteiny extracelulární matrix, některými neurotransmitery (látkami působícími na synapsích neuronů), kortikoidy a dalšími signálními molekulami na bázi steroidů, oxidem dusnatým apod. Vstup buňky do apoptózy je otázka života či smrti, proto kromě spouštěcích kroků zahrnuje apoptóza také celou řadu regulačních a inhibičních drah.

Proces apoptózy je doprovázen translokací (přesunem) některých membránově vázaných molekul (typicky fosfatidylserinu) na povrch buňky/apoptotických tělísek. Tyto membránové značky pak aktivují

fagocytující buňky a vedou k efektivní likvidaci zbytků apoptotické buňky bez dalších následků. Smrt buňky a fagocytóza jsou relativně rychlé procesy; k úplnému vymizení buňky z tkáně může dojít již během několika hodin.

Intracelulární dráhy apoptotické smrti jsou ve většině případů provázeny aktivací kaspáz, což jsou enzymy (cysteinproteázy) přítomné v cytoplazmě buněk neustále v inaktivní formě. Díky tomu je možná jejich rychlá aktivace a celý průběh buněčné smrti. Iniciační kaspázy se uplatňují jak při vnější cestě (např. kaspáza-8), a to interakcí s intracelulární částí receptorů smrti, tak při vnitřní cestě (např. kaspáza-9) vytvořením tzv. apoptozómu, tedy komplexu kaspázy s molekulami Apaf-1 a cytochromu c uvolněnými z mitochondrií. Exekuční kaspázy (např. kaspáza-3) se pak podílejí na aktivaci finálních kroků apoptotické smrti vedoucích k fragmentaci jádra a DNA.



Deregulace apoptózy – zvýšená rezistence

Obecně lze říci, že apoptotická buněčná smrt je výsledkem převahy pro-apoptotických signálů (induktory apoptózy) nad anti-apoptotickými (např. růstové faktory). Patofyziologické stavy spojené s poruchou apoptotického programu mohou být navozeny rezistencí buněk k apoptotickým signálům, ale také naopak zvýšenou senzitivitou k apoptóze.

V případě nadměrné rezistence k apoptóze jsou klasickým příkladem nádorové transformace. Kromě zvýšené proliferace a dediferenciace je deregulace apoptózy základní fenomén rakovinných buněk. U různých typů nádorových buněk byla zaznamenána např. zvýšená hladina anti-apoptotického proteinu Bcl-2 (některé lymfomy); inaktivující mutace v proteinu p53, který je klíčovým regulátorem nejen buněčného cyklu ale i apoptózy; nepřímo se do negativní regulace apoptotického programu zapojují také faktory a proteiny důležité pro přežití buňky, např. receptory růstových faktorů u nádorů plic, nebo estrogenový receptor u nádoru mléčné žlázy. Patologie ve známých složkách apoptotické mašinerie pak může sloužit jako cíl protinádorové terapie. Na experimentálních modelech i klinických studiích již byly hlášeny úspěchy s aplikací nemutované formy genu p53 prostřednictvím virových vektorů (viry modifikované pro přenos genetické informace) jako jednou z možných cest cílených nádorových terapií. Byla potvrzena také možnost aktivace apoptotického programu nádorových buněk prostřednictvím snížené exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 technologií Bcl-2 antisense oligonukleotidů (komplementárních – potlačujících expresi cílového proteinu). Téměř polovina pacientů vykazovala jasnou léčebnou odpověď spojenou s hladinou Bcl-2, terapie se ukazuje nadějnou zejména u některých typů lymfomů (nádorová onemocnění lymfatického systému). Nadějnou alternativou se zdá také terapie založená na cílení přirozených inhibičních proteinů apoptotických drah. Inhibice c-FLIP výrazně zvyšuje senzitivitu karcinomů k apoptóze zprostředkované CD95, která je hlavní drahou přirozené likvidace buněk imunitním systémem. Další cílovou skupinou jsou proteiny z rodiny IAP (inhibitor-of-apoptosis), např. survivin.

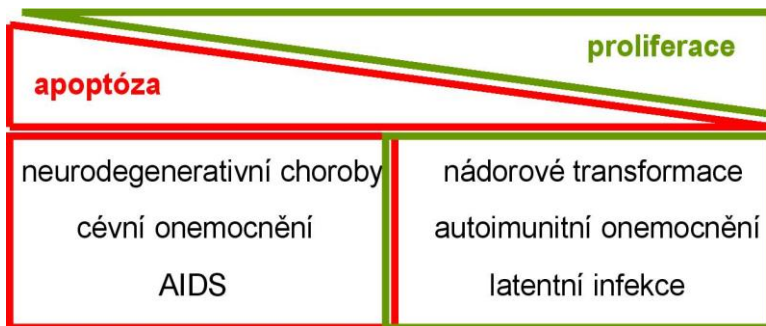
Antisense oligonukleotidy proti této molekule vyvolávají spontánní apoptózu především u nádorů plic a melanomů (nádorová onemocnění kůže). Protein CD95, receptory pro TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) a TNF patří do již zmíněné skupiny receptorů smrti hrajících úlohu v tzv. vnější cestě indukce apoptózy. Z hlediska vývoje léčebných postupů jsou stimulace TNFR a CD95 nevhodné kvůli výrazné hepatotoxicitě (vyvolávají nadměrnou apoptózu hepatocytů). V centru zájmu je tedy receptor pro TRAIL. Normální buňky jsou totiž téměř nesenzitivní k TRAIL signalizaci, zatímco rakovinné buňky vykazují různou citlivost. Ve fázi II klinického testování u lidských onkologických pacientů jsou například preparáty mapatumumab a lexatumumab stimulující TRAIL-R1, respektive TRAIL-R2.

Dalším příkladem chybné regulace apoptózy ve smyslu zvýšené rezistence jsou autoimunitní onemocnění v širším slova smyslu. Jedná se především o monoklonální gamapatie, revmatoidní artritidu, autoimunitní tyreoiditidu a systémový lupus erytematos. K akumulaci lymfocytů dochází vlivem inhibice apoptózy, která nekompensuje proliferaci těchto buněk. Lymfocyty vykazují sníženou senzitivitu na apoptotickou stimulaci přes CD95 membránové receptory. Také na rozvoji hepatitidy C a autoimunitní hepatitidy má apoptóza zřejmě zásadní podíl. Úroveň apoptózy a především hladina TNF- α (tumour necrosis factor alpha) odráží progresi zánětu a fibrózy u pacientů s hepatitidou C. U chronických hepatitid dochází k indukci apoptózy hepatocytů autoreaktivními T lymfocyty v důsledku jejich snížené senzitivity k apoptóze, která za normálního stavu eliminuje tyto reaktivní buňky.

Deregulace apoptózy – zvýšená senzitivita

Jak již bylo řečeno, existuje celá řada patologických stavů spojených se zvýšenou vnímavostí buněk k apoptotické destrukci. Předčasná apoptóza u buněk s dlouhým životním cyklem jako jsou neurony, je příčinou mnoha závažných neurodegenerativních onemocnění. V centru výzkumného zájmu humánní medicíny jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba, které přes značné odlišnosti vykazují společné znaky jako dlouhodobý průběh,

vysoký invazivní potenciál a dosud špatnou prognózu. Dalším společným rysem těchto onemocnění je ztráta specifických skupin neuronů, které vstupují do apoptózy, a tím narušení neuronální sítě. Přesto, že přesný molekulární mechanismus dosud není znám, zdá se, že apoptóza u těchto neuronů může být vyvolána různými podněty (β -amyloid, oxidační poškození, redukce metabolismu glukózy apod.), které se hromadí jednak ve stárnoucí mozkové tkáni a dále u pacientů s Alzheimerovou demencí. Proti-apoptoticky by v těchto případech mohly působit proteiny Bcl-2, které regulují přežívání neuronů. Genetický základ se odvozuje od exprese tzv. presenilinových genů, které činí neurony senzitivnější k apoptóze. Z tohoto hlediska se uvažuje také o možnostech náhrady apoptotických neuronů z kmenových buněk nervové tkáně, které se mohou získat jak z řad prekurzorů gliových buněk, tak zřejmě z určitých kmenových buněk specifických oblastí nervové soustavy, např. hippocampu a čichového epitelu. Dalším z příkladů předčasné apoptózy u dlouhověkých buněk je degenerativní onemocnění oční sítnice, které je vyvoláno chybnými regulacemi buněčného cyklu.



Možnosti modulace apoptózy

Z hlediska prevence a epidemiologie některých patologických stavů je významná úloha některých přírodních látek při regulaci apoptózy. Například kurkumin, žlutá látka z kořene rostliny *Curcuma longa*, který je základní složkou kari koření, je spojen s pozitivní regulací apoptózy a prevencí rozvoje karcinomu střeva a konečníku. Pro-apoptoticky působí také resveratrol, antioxidant v červeném víně. Jeho účinek byl popsán

v mnoha *in vitro* studiích a jeho protinádorový efekt byl zjištěn epidemiologickými rozbory.

Samostatnou kapitolou regulací apoptózy jsou interakce hostitel – patogen. Klasický příklad zahrnuje invaze intracelulárních bakterií a virové infekce, především retrovirové. Apoptóza v těchto případech může být předčasně aktivována nebo naopak oddálena, a to z hlediska jak výhody pro patogena, tak obranného mechanismu hostitele. AIDS je hlavním výzkumným tématem již několik desetiletí. Apoptóza se při tomto onemocnění uplatňuje na několika úrovních. Infikované CD4+ T lymfocyty jsou před apoptózou chráněny až do uvolnění virových částic, pak je naopak apoptóza iniciována. Současné terapeutické přístupy založené na aplikaci specifických antivirotik, modulaci vazeb mezi lymfocyty a virovou částicí a mezi smrtícími molekulami imunitního systému (CD95-CD95L) a dalších imunologických přístupech, které by mohly být v budoucnu doplněny o případné odstranění virů přežívajících uvnitř buněk cílenou apoptózou těchto hostitelských buněk.

V této souvislosti lze jmenovat příklady z veterinární medicíny jako cytotoxický efekt způsobený virem psinky. Infekce navozuje imunosupresi kvůli apoptóze lymfocytů a degeneraci mozečku (multifokální demyelinizace) asociované také s procesem apoptózy. Deregulovaná apoptóza lymfocytů a monocytů je navozena i virem reprodukčního a respiračního syndromu prasat. Jiným příkladem je regulace signálních drah infikované buňky bakteriemi *Anaplasma phagocytophilum* a *Ehrlichia chaffeensis*, která zahrnuje kromě efektů na potlačení oxidačního vzplanutí fagocytů také inhibici apoptózy napadené fagocytující buňky. Pro terapeutickou indukci apoptózy se ve veterinární praxi často využívá účinek glukokortikoidů, které jsou zvířatům podávány při zánětlivých a autoimunitních onemocněních i při nádorech typu lymfomů.

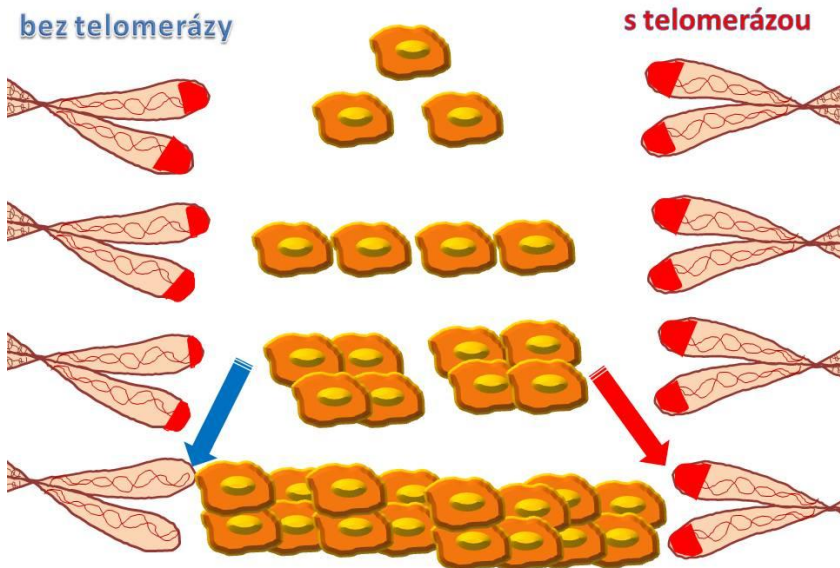
Další poznatky ukazují možnou spojitost apoptózy s řadou patologických procesů či onemocnění jako kardiovaskulární dysfunkce, především ischemie (nedokrvení), hypertrofie (zvětšení buněk tkání a orgánů), kardiomyopatie (degenerativní onemocnění srdce) nebo ateroskleróza.

Telomery, telomeráza

Nesmrtelnost buněk a organismu bývá často lákavou představou, ale může být velmi závažnou nevýhodou. Aktuální výzkum dokazuje stále rozsáhlejší význam buněčné smrti v životě mnohobuněčných organismů. Pochopení mechanismů apoptózy otevírá také lákavé možnosti cílených modulací tohoto procesu a slibných terapií. Příčiny chybného apoptotického programu však nejsou vždy jednoznačné. Například je jasné, že rakovina není jedna a nebude tedy existovat univerzální lék. Navíc komplikovanost samotné apoptózy a její provázanost s dalšími buněčnými procesy ztěžuje přímé medicínské aplikace i přes optimistické dílčí výsledky. Terapeutické modulace apoptotické mašinerie na úrovni genomu i aplikace kmenových buněk s nízkým apoptotickým potenciálem jsou velmi atraktivní, ale mohou v mnoha systémech vyvolávat nežádoucí nádorové transformace. Naopak při experimentálních terapeutických inhibicích apoptózy se navíc mnohdy aktivují kompenzační intracelulární mechanismy, případně alternativní formy buněčné smrti (nekróza, autofagie). Diskutována je také životaschopnost buněk se zastaveným programem smrti. I přes uvedené obtíže, nedostatky a nejasnosti, které se dosud vyskytují v řadě navrhovaných terapií, jsou možné přínosy v léčbě řady onemocnění natolik nadějně a atraktivní, že modulace apoptotického programu představují horké téma současného výzkumu.

Programovaná buněčná smrt úzce souvisí s tzv. telomerovým stárnutím buněk. Buněčné dělení poskytuje na jednu stranu buňkám nesmrtelnost (vznikají buňky dceřiné, ale mateřská vlastně nijak „neumírá“), na druhou stranu je však nezbytné omezit počet možných dělení dané buňky. To je zajištěno zkracováním koncových úseků chromozomů, tzv. telomer. Telomery nejsou při replikaci nikdy přepsány do konce (replikační aparát nemá prostor pro dosyntetizování úplného konce). Proto tyto úseky plní funkci jakési čepičky, která je tvořena nekódujícími oblastmi. Pokud se však tyto telomery zkrátí opakovaným dělením tak, že další replikační přepis by vedl ke ztrátě kódujících sekvencí DNA, buňka prochází programovanou smrtí.

Výjimku z tohoto pravidla představují buňky embryonální, kde je nezbytné obrovské množství opakovaných dělení při vývoji celého organismu ze zygoty. V těchto buňkách je aktivní enzym telomeráza, který je schopen zkracující se úseky telomer dosyntetizovat. Obdobnou výjimku mají bohužel i buňky nádorové.



Nobelova cena za fyziologii–medicínu v roce 2009 byla udělena právě za objevy, jak jsou chromozomy chráněny telomerami a enzym telomerázou.

Elizabeth Blackburn a Jack Szostak objevili, že unikátní sekvence DNA v telomerách ochraňuje chromozomy před degradací. Carol Greider a Elizabeth Blackburn identifikovali telomerázu.

STUDIUM GENOVÝCH REGULACÍ ČASNÉHO EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE S VYUŽITÍM KUŘECÍHO MODELU

Praktický příklad: práce s kuřecími embryi a aplikace morfogenu

1) Inkubace vajec

Vajíčka se vloží do líhně, která umožňuje rotaci vajec během inkubace a tím zabraňuje srůstu embryí se skořápkou. Teplota inkubátoru je udržována přibližně na 38 °C a nádobka s destilovanou vodou zajišťuje vlhkost prostředí. Proudění vzduchu a rovnoměrnou teplotu v celém objemu líhně zajišťuje ventilátor, který je aktivní i po vypnutí vytápění termostatem.

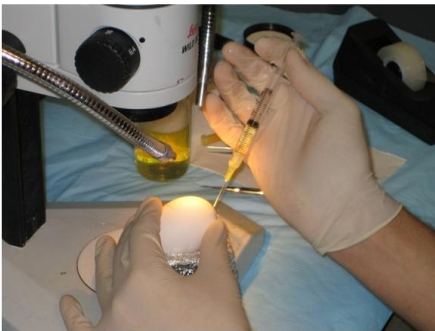
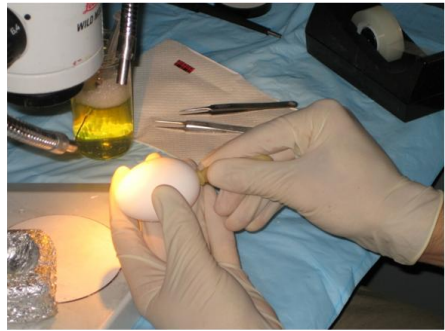
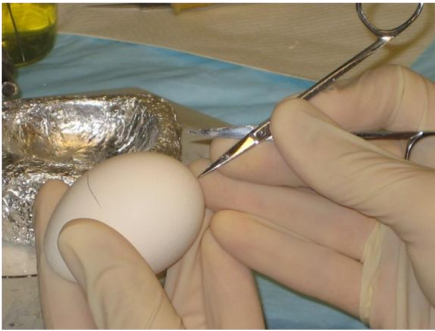


2) Otevření kuřecích vajec

Pomůcky: nůžky, izolepa, jehla, gumový balónek

Sterilní technika!!!

- Pracovat po celou dobu v rukavicích
- Po vyjmutí vajec z inkubátoru je postříkat 70% alkoholem
- Používat sterilní nástroje z autoklávu
- Před každým použitím nástrojů sterilizace 70% alkoholem



3) Barvení embryí

Pro zviditelnění tkání raných vývojových stádií se využívají vitální barviva, která jsou pokud možno co nejméně toxická. Na barvení živých kuřecích embryí se využívá např. roztok neutrální červeně (stačí 1 kapka).

4) Stadiování kuřecích embryí –viz obrázek na další straně

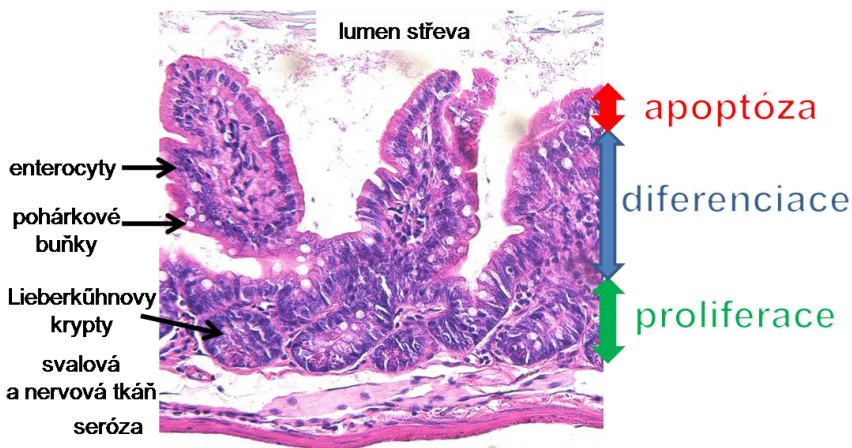
Embrya se zařazují do vývojových stádií na základě morfologických kritérií (*Hamburger and Hamilton (1951): A Series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol, 88: 49-92*)

5) Aplikace morfogenu do končetinových pupenů

- Embrya zařadit do vývojového stadia podle tvaru končetin a maxilární prominence
- Roztrhnout embryonální membránu (chorion, amnion) v okolí přední končetiny, aniž by došlo k poškození cév a krvácení
- Jemně narušit epitel na laterální straně končetiny
- Uchopit kuličku (bead) nasáklou morfogenem do pinzety
- Implantovat kuličku do končetinového základu

DETEKCE MOLEKUL SOUVISEJÍCÍCH S BUNĚČNÝM CYKLEM

Vhodným příkladem pro demonstraci buněčného cyklu jsou tkáně s rychlou obnovou, jako například tkáň tenkého střeva. Funkční enterocyty se u savců obnovují v několikadenních intervalech diferenciací z kmenových buněk.



Pro získání takového histologického obrázku je třeba tkáň nejprve zpracovat. Jedním ze způsobů fixace je 4% paraformaldehydem, která umožňuje i dlouhodobé uchovávání odebrané tkáně. Dalším krokem je pak promytí a odvodnění tkáně, které zahrnuje vzestupnou etanolovou řadu od 30% etanolu až po 100%. Doba promývání v jednotlivých koncentracích závisí na velikosti vzorku a pohybuje se od minut do hodin. Jakmile je vzorek odvodněn, zpracovává se v xylenu nebo jiných chemikáliích kompatibilních s parafinem. Do parafinu se totiž tkáň zalévá a po zatuhnutí je umožněno její krájení na mikrotomu na řezy žádané tloušťky (většinou mezi 4–10 μm , což umožňuje náhled do každé vrstvy buněk v dané tkáni nebo orgánu). Po nakrájení se řezy napínají na teplé vodní hladině, umístí se na podložní sklo a usuší se. Tak jsou vzorky připraveny pro histologická barvení, cytologická a molekulární značení a další speciální analýzy, před kterými se provádí jejich odparafinování a opětovné zavodnění.

Odběr vzorků, fixace, odvodnění

(a)

Zalévání do parafinu (b)

Krájení tkáňových řezů (c)

Umístění řezů na podložní sklo (d)

Barvení tkáňových řezů (e)

Montování řezů (f)

Fotodokumentace tkáňových řezů

(g)



a



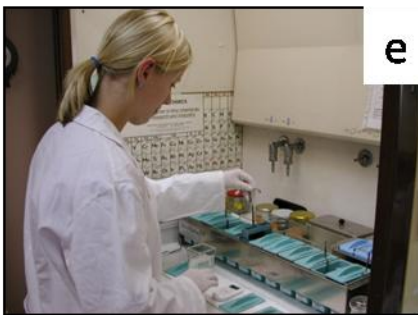
b



c



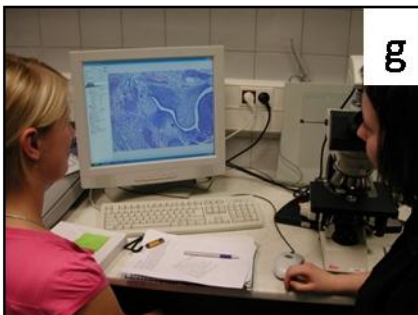
d



e



f



g

Imunohistochemická detekce antigenu proliferujících buněk (PCNA)

Imunohistochemická reakce je založena na kompatibilitě antigenu a protilátky. Antigen (**antibody generating**) je každá cizorodá látka, která dokáže vyvolat specifickou imunitní odpověď, na jejímž konci je tvorba protilátek. Těto skutečnosti, že proti každému tkáňovému antigenu lze vyrobit protilátku, se využívá ve výzkumu. Možných způsobů je několik od injekce antigenu do těla králíka, myši, kozy nebo dalšího živočišného druhu a odběru protilátek z krevního séra, až po přípravu protilátek v kulturách tzv. hybridomů a jejich odběr z kultivačního média.

Antigen proliferujících buněk (**proliferating cell nuclear antigen, PCNA**) se účastní topologického propojení mezi DNA a DNA polymerázou při replikaci (DNA clump). Z toho je zřejmé, že tento protein je lokalizován v jádře (nuclear), kde dochází k replikaci a dosahuje nejvyšší hladiny během S fáze buněčného cyklu. Kromě syntézy DNA je PCNA protein důležitý i při opravách DNA (DNA repair).

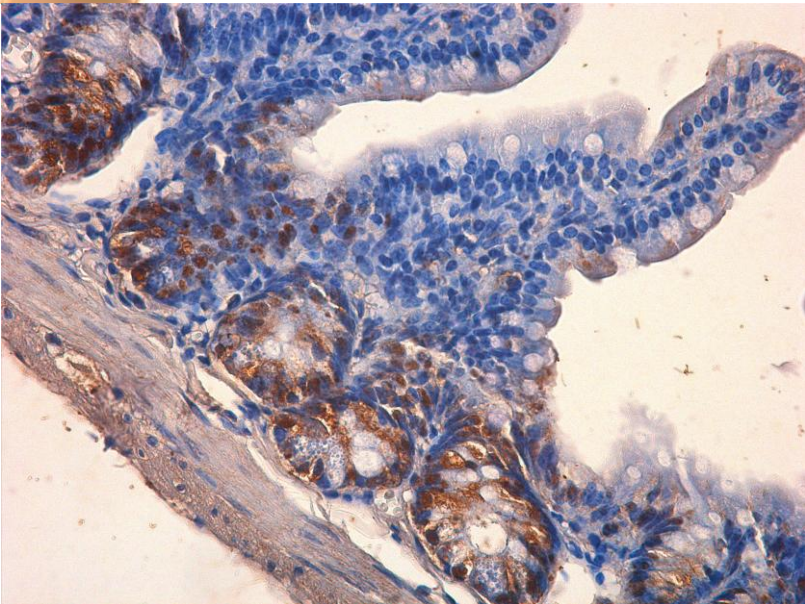
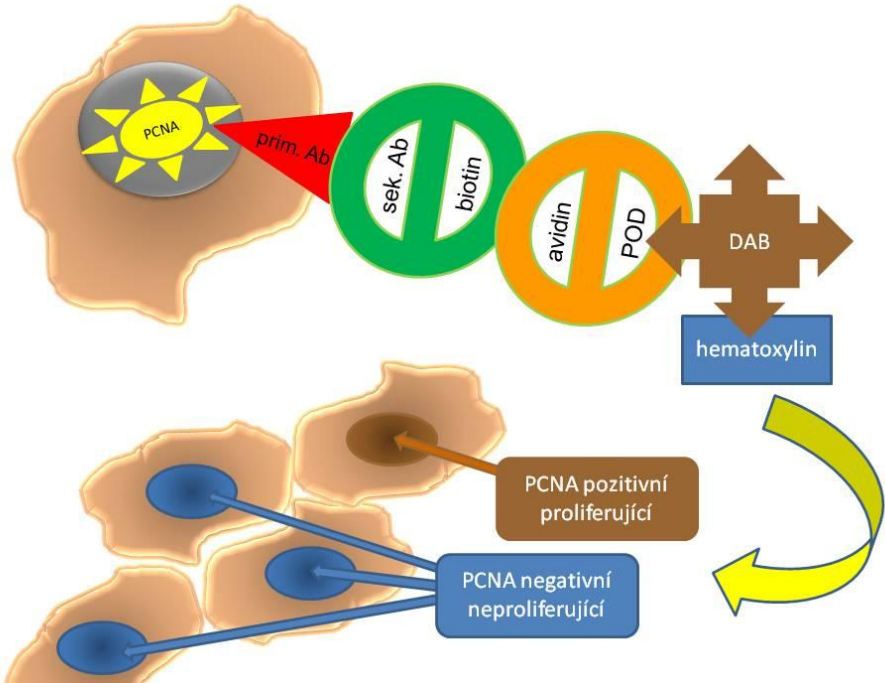
Vizualizací PCNA proteinu v jádrech buněk lze detekovat, které buňky v rámci tkáně právě podstupují proliferaci. Tato detekce zahrnuje dva klíčové kroky: vazbu protilátky na antigen a vizualizaci protilátky. Tento postup platí zejména pro fluorescenčně značené primární protilátky, pro trvalejší preparáty a hodnocení konvenčním světelným mikroskopem se používá vícekrokový systém: vazba primární protilátky na antigen, vazba biotinem značené sekundární protilátky na primární, vazba enzymu přes biotin a chromogenní substrátová reakce. Pro lepší barevný kontrast pozitivních buněk se aplikuje tzv. protibarvení, buď fluorescenční, nebo klasické histologické.

Procento proliferujících buněk v dané tkáni charakterizuje její proliferační aktivitu, jejíž hodnocení je důležitou součástí analýzy tkání z hlediska obnovy (a buněčného cyklu) a je součástí vyšetření karcinomů. Vysoká celularita (buněčnost), vysoký proliferační index, infiltrativní růst a nekrózy jsou obecně považovány za markery agresivního chování nádorů.

Praktický příklad: lokalizace proliferujících buněk v tenkém střevě myši

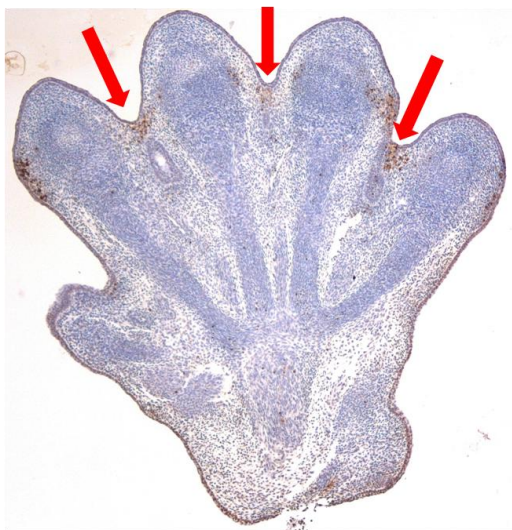
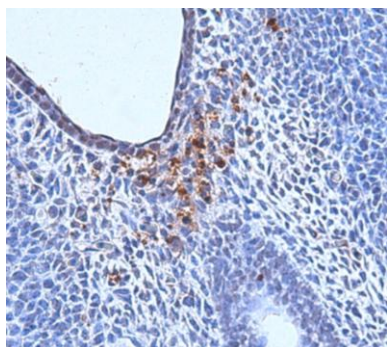
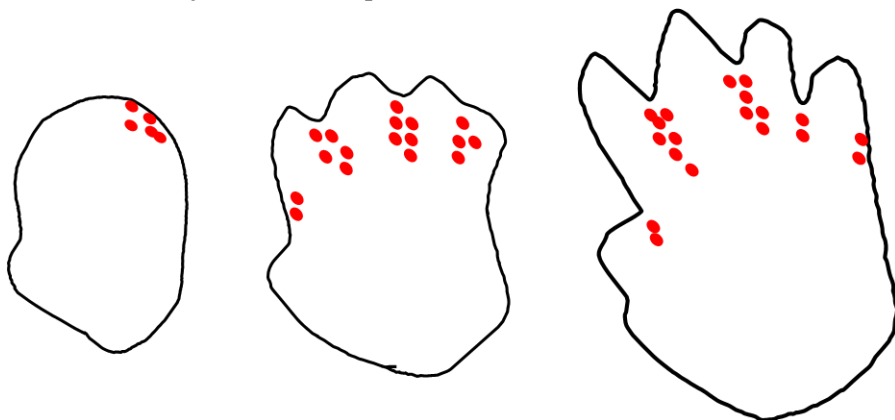
Pomůcky: parafinové histologické řezy, primární králičí protilátka anti-PCNA, sekundární protilátka anti-rabbit, vizualizační systém biotin-křenová peroxidáza (POD), chromogenní substrát DAB (diaminobenzidin), fosfoborátový pufr (PBS)

- 1) Histologické řezy odparafinovat v xylenu a zavodnit sestupnou etanolovou řadou
- 2) Aplikovat předpůsobení (revitalizace antigenů) – je-li nutné
- 3) Promýt 3xPBS
- 4) Inhibovat endogenní peroxidázu peroxidem vodíku v PBS
- 5) Promýt 3xPBS
- 6) Aplikovat primární protilátku ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30 – 60 min
- 7) Promýt 3xPBS
- 8) Aplikovat sekundární protilátku ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30 min
- 9) Promýt 3xPBS
- 10) Aplikovat komplex biotin-POD ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě, 30 min
- 11) Promýt 3xPBS
- 12) Aplikovat chromogenní substrát (hlídat intenzitu hnědého zbarvení pozitivních jader pod mikroskopem!)
- 13) Promýt destilovanou vodou
- 14) Provést protibarvení hematoxylinem
 - 5 min hematoxylin
 - 10 min tekoucí voda
- 15) Odvodnit, zamontovat, vyhodnotit



DETEKCE A MODULACE BUNĚČNÉ SMRTI - APOPTÓZY

Klasickým příkladem programované buněčné smrti cestou apoptózy je digitalizace končetin. Z původně kompaktního končetinového základu pádlovitého tvaru dochází cestou apoptózy k eliminaci meziprstních (interdigitálních) segmentů a individualizaci jednotlivých prstů končetiny. U myši přední končetiny probíhá proces digitalizace v embryonálních dnech 12,5–15, 5, nejmarkantnější apoptóza je patrna v embryonálním dnu 13,5–14,5 a lze ji detekovat např. metodou TUNEL.

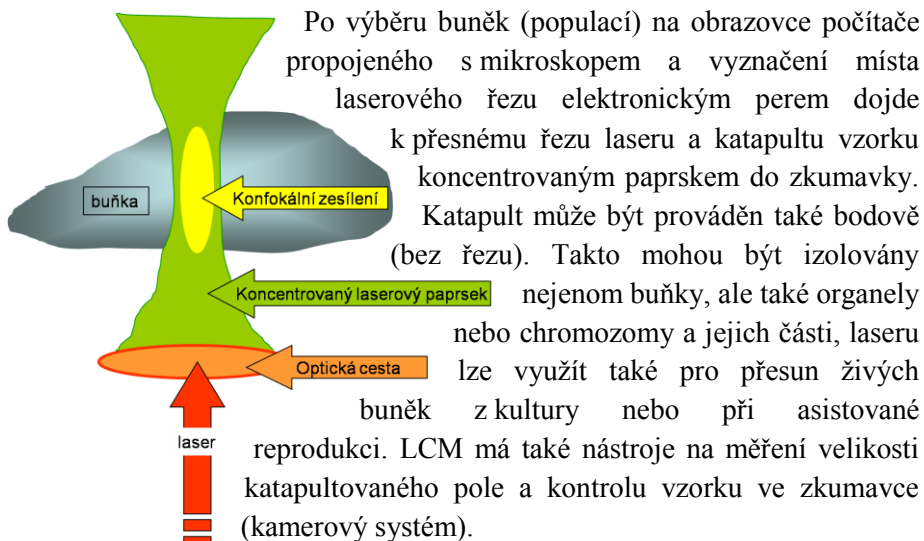


Metoda TUNEL (terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated nick end labelling) je založena na enzymovém (enzym deoxynucleotidyl-transferáza) značení zlomů DNA, které vznikají účinkem nukleáz na konci apoptotického procesu. Tím vlastně buňka před smrtí „skartuje“ svoji genetickou informaci. Fragmenty apoptotické DNA lze detekovat také agarózovou gelovou elektroforézou, kde vzniká typický žebříček fragmentů o délce 180 párů bazí a násobku (odpovídající délce DNA mezi nukleozomy). Imunohistochemicky, obdobně jako u PCNA, se detekují proteiny apoptotické mašinerie a průběh jejich aktivace (např. štěpené kaspázy), pozdní stadia apoptózy lze prokázat i morfologicky – rozpad buňky na membránou krytá apoptotická tělíška. Při sledování apoptózy a jejích mechanismů u jednotlivých buněk je výběr metod ještě rozmanitější než u histologických řezů. Jedná se především o metody průtokové cytometrie (např. průkaz translokace fosfatidylserinu), ELISA (aktivita kaspáz), imunoprecipitace (interakce jednotlivých molekul) a další. Využití buněčných kultur a tkáňových lyzátů však neumožňuje přesnou prostorovou lokalizaci sledovaných buněk (apoptotických, proliferujících) v rámci tkáně a orgánu. V posledním desetiletí byl výzkum na úrovni jednotlivých buněk v rámci tkání (tedy i apoptózy) zkvalitněn metodou laserové mikrodisekce (LCM, laser capture microdissection).



Výzkum na úrovni jednotlivých buněk - laserová mikrodisekce

U řezů tkání umožňuje tato metoda unikátní výběr specifických, přesně lokalizovaných buněčných populací a jejich bezkontaktní katapult do připravené zkumavky. Tato moderní technika zajišťuje homogenní vzorek buněk získaných přímo z jejich přirozeného prostředí, bez *in vitro* kultivací. Především v biomedicinském výzkumu je takový přístup nezbytný pro dosažení spolehlivých údajů, které nelze získat jednoduchým zpracováním náhodného vzorku z daného orgánu. Tato technika tak v posledních letech otevřela cestu k detailnímu studiu fyziologie jednotlivých buněk na úrovních, které byly dostupné pouze pro buněčné linie.

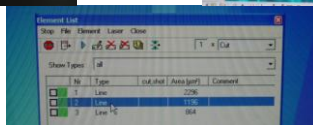
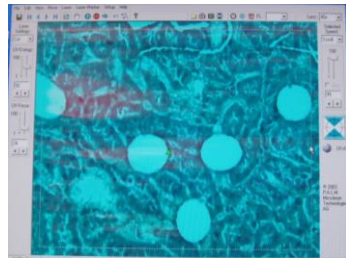
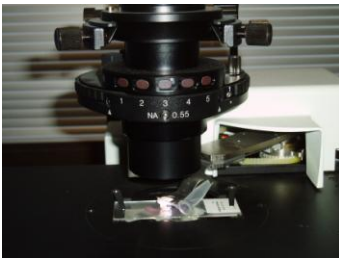


Řada významných výsledků s využitím LCM byla dosažena především na úrovni DNA a RNA. Rychlý rozvoj analýz vzorků v oblasti nukleových kyselin je dán snadnou manipulací se vzorky a dostupností amplifikačních metod, které zajistí dostatečné množství sledovaných molekul pro následné analýzy. Rozsáhlé využití je v přístupech založených na microarrays. Na úrovni proteomu však amplifikační přístup není možný a hodnocení spoléhá na proteomické techniky, s ohledem na množství získaného vzorku se jedná především o hmotnostní spektroskopii.

Praktický příklad: laserová mikrodisekce apoptotických buněk v interdigitálních segmentech myších končetin

Pomůcky: membránou potažená podložní skla pro mikrodisekci, parafinové řezy myších končetin, výběr apoptotických buněk na základě morfologických kritérií (apoptotická tělíska) nebo značení metodou TUNEL

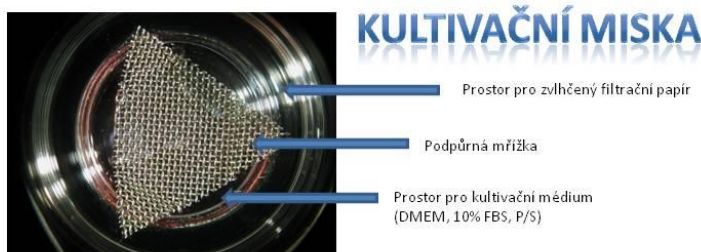
- 1) Umístění skla do LCM mikroskopu, nastavení cílového místa, zaostření
- 2) Příprava mikrozkuhavky
 - napipetovat 25 μ l puftru do víčka
 - umístit víčko zkuhavky do držáku LPC zařízení
 - nastavit nad podložní sklo se vzorkem
- 3) Navolit parametry zvětšení a nastavit sílu a ohnisko laseru (testovací čára mimo cílovou oblast vzorku) na obrazovce počítače
- 4) Vymezit cílové oblasti (interdigitální segmenty, případně jednotlivé buňky) na monitoru počítače pohybem myši, nastavit typ disekce (roboLPC, autoLPC atd.)
- 5) Zadat daný úkol (seznam úkolů včetně údajů týkajících se plochy vymezené oblasti)
- 6) Spustit laser
- 7) Zkontrolovat „prázdné“ místo na obrazovce, případně kamerová kontrola vzorku ve zkuhavce



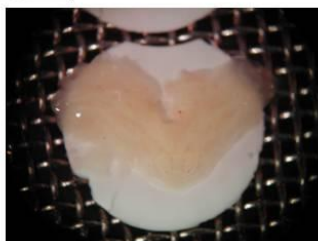
Praktický příklad: modulace apoptózy v explantátových kulturách

Pro studium mechanismů buněčné smrti se úspěšně využívá také různé modifikovaných knock-out modelů (floxed, cre, atd.). V případě modulace apoptózy, která by *in vivo* vedla k časné letalitě (např. knock-out pro kaspázu-8 je letální v embryonálním dnu 11,5), případně vícenásobných inhibic (např. kombinace různých kaspáz) jsou vítaným přístupem explantátové kultury.

- 1) Příprava myších explantátových kultur
- 2) Příprava kultivačních misek a kultivačního média
- 3) Podmínky kultivace explantátů
- 4) Možnosti modulace (kaspázové inhibitory – beads, přidání do média)
- 5) Sledování penetrace a účinku modulačních látek

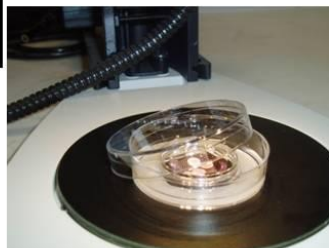


**UMÍSTĚNÍ
EXPLANTÁTU**



**KULTIVACE
EXPLANTÁTU**

Příprava pod stereoskopickým
mikroskopem – co nejvyšší sterilita
Kultivace v 5% CO₂ atmosféře při 37 °C



Možnost osobního setkání s nositeli Nobelových cen

Od roku 1951 jsou organizována každoroční setkání laureátů Nobelových cen v Lindau, německém městě ležícím na břehu Bodamského jezera. Jedním z cílů tohoto unikátního fóra je předávání znalostí mladé generaci, proto mají na tato setkání přístup také studenti a mladí vědci. Přihlášení probíhá zasláním motivačního dopisu a životopisu, při vysoké kvalitě je možno získat stipendium hradící náklady spojené s cestou a pobytem. Veškeré informace o již konaných Nobelovských setkání v Lindau, aktuální informace a celá řada zajímavostí jsou dostupné na stránkách: www.nobel-lindau.de

ite Meetings - Windows Internet Explorer
www.lindau-nobel.de/webframe.Ax026

Obíbené položky Nástroje Nápověda

hstings

Welcome to the Lindau Laureate Meetings!

Educate. Inspire. Connect. The Lindau Nobel Laureate Meetings.

The annual Lindau Nobel Laureate Meetings provide a globally recognised forum for the transfer of knowledge between generations of scientists. They inspire and motivate Nobel Laureates and international Best Talents. Lectures of Nobel Laureates reflect current scientific topics and present relevant fields of research of the future. In panel discussions, seminars and during the various events of the social programme young researchers nominated by a worldwide network of Academic Partners interact with Nobel Laureates.

The Meetings of Nobel Laureates in Chemistry, Physiology or Medicine and in Physics have been held since 1951. Since 2004, the holders of the Bank of Sweden Prize in Economic Sciences in Memory of Alfred Nobel, have also held biannual meetings on Lake Constance. The Lindau Dialogue has been given extra impulse with the interdisciplinary conferences. These are being organised by the Council and the Foundation every five years starting with the jubilee year of 2000.

Watch lectures of Nobel Laureates online. Click on thumbnails to open media player:

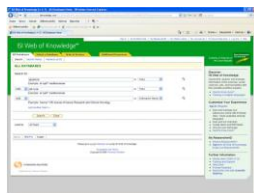
- MEETINGS
Read the programs, participants' lists, abstracts, reports of Lindau Meetings and learn about their history.
- WATCH LECTURES ONLINE HERE
Join the Lindau Meetings by watching Nobel Laureates lectures online.
- NOBEL LAUREATES
Get information about Nobel Laureates and their contributions to the Lindau Meetings.
- ACADEMIC PARTNERS
Learn more about our worldwide network of nominating institutions.
- YOUNG RESEARCHERS
Find out where participating top talents come from, how to Lindau and log in to your profile.
- COMMUNICATIONS
Get the latest press releases and press pictures or browse international media coverage of previous meetings.
- BENEFACTORS
Meet the scientific, commercial and political institutions whose patronage makes the Lindau Dialogue possible.
- ABOUT US
Learn more about the people behind and the work of the Foundation and Executive Secretariat.

Lindau 2005

Vybrané literární prameny:

- Blankenberg, F.G. In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med* 2008; 49:81S-95S.
- Cobourne MT, Sharpe PT (2003). Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol* 48(1):1-14.
- Couly GF, Coltey PM, Le Douarin NM (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* 117(2):409-29.
- Doseff, A. I. Apoptosis: The sculptor of development. *Stem Cells Dev* 2004;13:473-483.
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A (1998). Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75(1-2):3-28.
- Handrigan GR, Buchtova M, Richman JM (2007). Gene discovery in craniofacial development and disease - cashing in your chips. *Clinical Genetics* 71(2):109-119.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115:2665-2672.
- Lee SH, Fu KK, Hui JN, Richman JM (2001). Noggin and retinoic acid transform the identity of avian facial prominences. *Nature* 414(6866):909-12.
- Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL 2005: When cells die. Wiley Interscience. ISBN 9780471219477 (online ISBN 9780471476504).
- Lodish H et al. 2000: Molecular cell biology. W. H. Freeman and company. ISBN 0-7167-3136-3
- Logan C, Francis-West P (2008). Gene transfer in avian embryos using replication-competent retroviruses. *Methods Mol Biol* 461:363-76.
- Lumsden A (1991). Cell lineage restrictions in the chick embryo hindbrain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 331(1261):281-6.
- Matalová E, Fleischmannová J, Sharpe PT, Tucker AS 2008: Tooth agenesis: From molecular genetics to molecular dentistry. *J Dent Res* 87: 617-623
- Sharpe PT, Mason I 1999: Molecular Embryology: methods and Protocols. Humana Press, ISBN 0-89603-387-2
- Tucker AS, Sharpe PT 2004: The cutting edge of mammalian development: how embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 5: 499-508
- Yen AHH, Sharpe PT 2008: Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 331: 359-372

Více aktuálních informací k dané tématice:



Web of Knowledge

<http://apps.isiknowledge.com>



PubMed

www.pubmed.com



Nobel Prize homepage

<http://nobelprize.org>



GEISHA

gene expression database for ESTs

<http://geisha.arizona.edu/geisha/>



ENSEMBL

<http://www.ensembl.org>



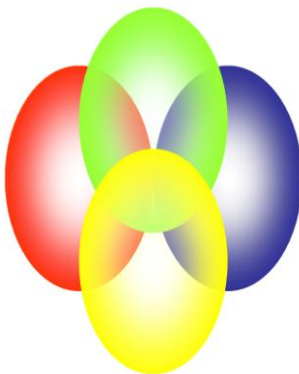
ESF projekt Od fyziologie k medicíně

<http://cit.vfu.cz/fyziomed>

**PŘEHLED NOBELOVÝCH CEN ZA
FYZIOLOGII/MEDICÍNU
1995-2009**

<p>1995 – genetické řízení časného embryonálního vývoje Edward B. Lewis (USA), Christiane Nüsslein-Volhard (Německo), Eric F. Wieschaus (USA)</p>
<p>1996 – specifická buňkami zprostředkovaná imunitní reakce Peter C. Doherty (Austrálie), Rolf M. Zinkernagel (Švýcarsko)</p>
<p>1997 – priony – nový biologický princip infekce Stanley B. Prusiner (USA)</p>
<p>1998 – oxid dusnatý jako signální molekula v kardiovaskulárním systému Robert F. Furchgott (USA), Louis J. Ignarro (USA), Ferid Murad (USA)</p>
<p>1999 – vnitřní signály proteinů řídící jejich transport a lokalizaci v buňce Günter Blobel (USA)</p>
<p>2000 – transdukce signálu v nervovém systému Arvid Carlsson (Švédsko), Paul Greengard (USA), Eric Kandel (USA)</p>
<p>2001 - klíčové regulátory buněčného cyklu Leland Hartwell (USA), Tim Hunt (UK), Paul Nurse (UK)</p>
<p>2002 - genetická regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti Sydney Brenner (USA), Robert Horvitz (USA), John Sulston (UK)</p>
<p>2003 - zobrazování s využitím magnetické rezonance Paul Lauterbur (USA), Peter Mansfield (UK)</p>
<p>2004 - receptory pro odoranty a organizace čichového systému Richard Axel (USA), Linda Buck (USA)</p>

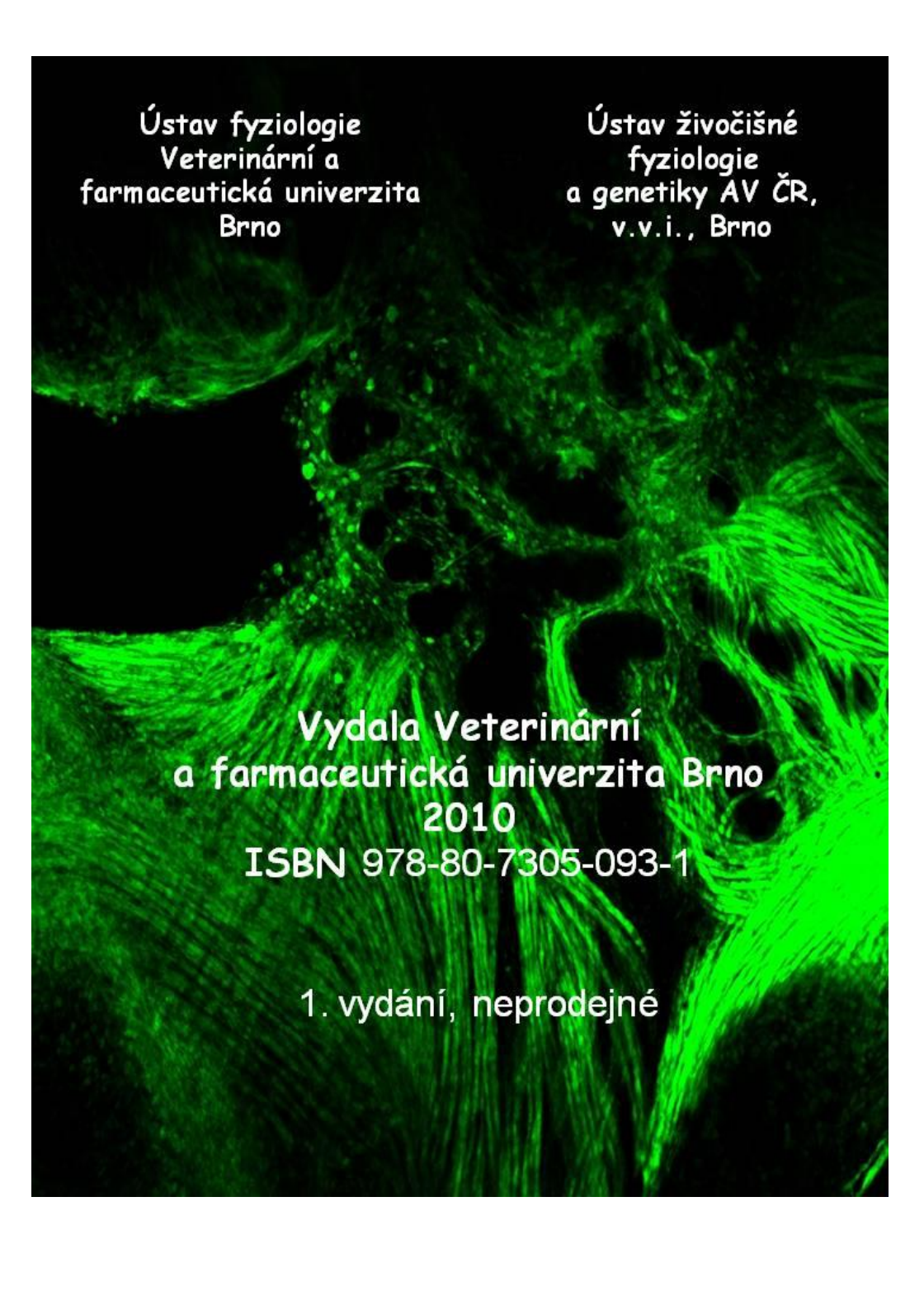
<p>2005 - <i>Helicobacter pylori</i> - záněty a vředová onemocnění žaludku</p> <p>Barry J. Marshall (Austrálie), J. Robin Warren (Austrálie)</p>
<p>2006 - RNA interference, umlčování genů dvouřetězcovou RNA</p> <p>Andrew Fire (USA), Craig Mello (USA)</p>
<p>2007 - specifické genové modifikace u myši s využitím embryonálních kmenových buněk</p> <p>Mario Capecchi (USA), Martin J. Evans (UK), Oliver Smithies (USA)</p>
<p>2008 – objev viru HIV a papilomaviru způsobujícího cervikální nádory</p> <p>Harald zur Hausen (Německo), Françoise Barré-Sinoussi (Francie), Luc Montagnier (Francie)</p>
<p>2009 – ochrana chromozomů telomerami, funkce enzymu telomerázy</p> <p>Elizabeth H. Blackburn (USA), Carol W. Greider (USA), Jack W. Szostak (USA)</p>



Obsah

ESF projekt „Od fyziologie k medicíně“	2
VĚDA NA ÚROVNI NOBELOVÝCH CEN	4
Nobelova cena za fyziologii-medicínu 1995	7
GENETICKÁ KONTROLA ČASNÉHO EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE	8
Explantátové kultury pro studium fyziologických interakcí během časného embryonálního vývoje	9
Kuře jako model pro studium genových interakcí během časného embryonálního vývoje	13
Nobelova cena za fyziologii-medicínu 2001	22
KLÍČOVÉ REGULÁTORY BUNĚČNÉHO CYKLU	23
Kontrola buněčného cyklu a možné následky selhání	25
Nobelova cena za fyziologii-medicínu 2002	29
GENETICKÁ REGULACE VÝVOJE ORGÁNŮ A PROGRAMOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI	30
Význam smrti buněk v životě mnohobuněčného organismu	31
Telomery, telomeráza	40
STUDIUM GENOVÝCH REGULACÍ ČASNÉHO EMBRYONÁLNÍHO VÝVOJE	42
Praktický příklad: práce s kuřecími embryi a aplikace morfogenu	42
DETEKCE MOLEKUL SOUVISEJÍCÍCH S BUNĚČNÝM CYKLEM	45
Imunohistochemická detekce antigenu proliferujících buněk (PCNA)	47
Praktický příklad: lokalizace proliferujících buněk v tenkém střevě myši	48

DETEKCE A MODULACE BUNĚČNÉ SMRTI - APOPTÓZY	50
Výzkum na úrovni jednotlivých buněk - laserová mikrodisekce	52
Praktický příklad: laserová mikrodisekce apoptotických buněk v interdigitálních segmentech myších končetin	53
Praktický příklad: Modulace apoptózy v explantátových kulturách	54
Možnost osobního setkání s nositeli Nobelových cen	55
Literární a internetové odkazy	56
Přehled Nobelových cen za fyziologii-medicínu 1995-2009	58



Ústav fyziologie
Veterinární a
farmaceutická univerzita
Brno

Ústav živočišné
fyziologie
a genetiky AV ČR,
v.v.i., Brno

Vydala Veterinární
a farmaceutická univerzita Brno
2010

ISBN 978-80-7305-093-1

1. vydání, neprodejné