

JACEK Z. KUBIAK¹, MAREK MALESZEWSKI²

¹CNRS/University Rennes 1, UMR 6290, Cell Cycle Team, Rennes, France

²Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Zoologii, Zakład Embriologii, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Polska

E-mail: Jacek.Kubiak@univ-rennes1.fr
maleszewski@biol.uw.edu.pl

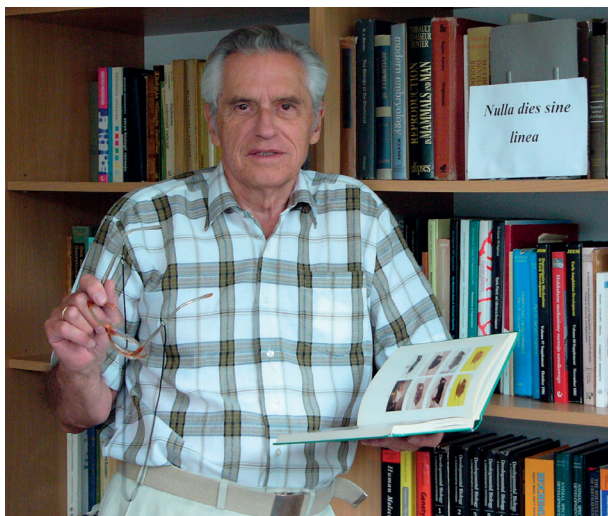
PROF. ANDRZEJ K. TARKOWSKI – PIONIER EMBRIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ SSAKÓW

Eksperyment to podstawowa metoda poznawcza stosowana od dawna w embriologii. Sama obserwacja tego, jak przebiega rozwój zarodka, nie może bowiem dostarczyć informacji o szczegółach mechanizmów kierujących tym procesem. Dla ich poznania najlepiej obserwować reakcje zarodka na ingerencje eksperymentatora, powodujące zaburzenia rozwoju. Dopiero ich analiza pozwala wysnuć wnioski co do mechanizmów rządzących badanym procesem. W embriologii eksperymentalnej często uszkadza się lub izoluje część zarodka, wymienia się jego części pochodzące z różnych obszarów lub przeszczepia fragmenty z jednego zarodka do drugiego, by następnie śledzić rozwój tak manipulowanych zarodków.

Systematyczne eksperymenty nad rozwojem zwierząt mają swoje początki w badaniach wybitnych uczonych niemieckich aktywnych naukowo na przełomie XIX i XX w. Wyniki doświadczeń Augusta Weismanna (1934–1914), Wilhelma Roux (1850–1924), Hansa Driescha (1867–1941) i Hansa Spemann (1869–1941) stworzyły podstawy współczesnej biologii rozwoju zwierząt. Pierwsi embriolodzy wybierali za obiekty badań bezkręgowce morskie (szkarłupnie i żachwy) oraz płazy (traszki, salamandry i żaby). Są to bowiem organizmy łatwo dostępne, rozmnażające się przez zapłodnienie zewnętrzne, których zarodki również rozwijają się poza organizmem matki. Zatem łatwo stworzyć im w laboratorium warunki zbliżone do naturalnych. Zwierzęta te produkują wiele komórek rozrodczych, co bar-

dzo ułatwia pracę. W dodatku niebagatelną zaletą oocytów i zarodków tych zwierząt są także ich względnie duże rozmiary. Najważniejszą konkluzją wynikającą z badań pierwszych embriologów było stwierdzenie, że w świecie zwierząt zachodzą dwa typy regulacji wczesnego rozwoju zarodkowego. W modelu nazwanym „mozaikowym” poszczególne części zarodka (blastomery, czyli komórki powstające w wyniku podziałów zygoty) różnicują się w jego tkanki niezależnie od siebie. Zarodek wykształca się właśnie jako mozaika autonomicznie rozwijających się elementów, które są zdeterminowane do różnicowania w określonym kierunku, niezależnie od ich położenia w zarodku – także po ich wyizolowaniu lub przeniesieniu w inny obszar zarodka. Przykładowo, tak rozwija się larwa żachwy. Na początku rozwoju innych organizmów, losy blastomerów nie są jeszcze ściśle zdeterminowane i mogą ulegać zmianie, gdy pojedyncza komórka lub ich grupa zostanie przeniesiona w inne miejsce zarodka. Jest to stopniowa determinacja losów komórek zarodka. Tak dzieje się u płazów, a taki typ rozwoju nazywany został regulacyjnym.

Całkowitą zagadką pozostawało jednak, jak regulowany jest odbywający się w macicy matki, a więc w trudnodostępnym dla eksperymentatora miejscu, rozwój ssaków. Z oczywistych względów – gdyż dotyczy to również nas, ludzi – odpowiedź na to pytanie była wyjątkowo intrygująca. Poznanie mechanizmów regulujących rozwój zarodkowy ssaków jest także bardzo istotne dla celów medycznych.



Ryc. 1. Profesor Andrzej K. Tarkowski (fot. K. Szczepańska).

Wyzwanie to podjął ponad pół wieku temu Andrzej K. Tarkowski (Ryc. 1), który zatrudniony był już wówczas w Uniwersytecie Warszawskim, ale doświadczenia do swego doktoratu wykonywał w stacji badawczej Polskiej Akademii Nauk w Białowieży. Przedstawiona przez niego rozprawa doktorska opisywała badania nad potencjałem rozwojowym pojedynczych blastomerów uzyskiwanych z dwukomórkowych zarodków myszy, w których jeden blastomer był niszczonej mikrochirurgicznie. Okazało się, że zredukowane do połowy zarodki mysie mogą rozwijać się zupełnie normalnie i utworzyć w pełni wykształcone i normalne osobniki, w dodatku tej samej wielkości, co uzyskane z całych zarodków.

Znaczenie tego odkrycia stanowiącego podstawę publikacji w *Nature* (TARKOWSKI 1959), czasopiśmie o niewątpliwie najwyższym prestiżu w świecie nauki, było ogromne. Sugerowało ono bowiem, że rozwój ssaków charakteryzują wielkie zdolności regulacyjne. W dodatku doświadczenia Tarkowskiego zapoczątkowały systematyczny rozwój nowej dyscypliny badań biologicznych - embriologii eksperymentalnej ssaków. Dały także podwaliny pod tak burzliwie rozwijającą się dziś dziedzinę biologii poświęconą totipotentnym lub pluripotentnym komórkom macierzystym, czyli komórkom posiadającym zdolności do różnicowania się we wszystkie lub w większość tkanek budujących organizm. Fakt, że u ssaków nie tylko cały zarodek, ale i wyizolowane z niego blastomery zachowują pełny potencjał rozwojowy pokazuje, że są one totipotentne. U podstaw

badania nad zarodkowymi komórkami macierzystymi leżą więc niewątpliwie doświadczenia Tarkowskiego opisane w jego rozprawie doktorskiej i w pracach będących jej kontynuacją.

Zwierzęce komórki macierzyste są obecnie nie tylko obiektem, ale i niezmiernie ważnym narzędziem badań współczesnej biologii. Testem na zachowanie przez te komórki zdolności do różnicowania się we wszystkie tkanki organizmu jest uzyskiwanie zwierząt chimerowych, tworzonych przez wprowadzanie komórek macierzystych do zarodków biorców. A pierwsze chimerowe zarodki ssaków rozwijające się w dorosłe organizmy także po raz pierwszy uzyskał Tarkowski. W 1961 r. opublikował, również w *Nature*, artykuł, w którym przedstawił wyniki eksperymentów polegających na łączeniu ze sobą wczesnych zarodków myszy (TARKOWSKI 1961). Taki zabieg prowadził w ostateczności właśnie do uzyskania chimerowych dorosłych myszy. W doświadczeniach tych, oraz we wspomnianych powyżej i kontynuowanych w późniejszych latach, poświęconych badaniom potencjału rozwojowego izolowanych blastomerów (TARKOWSKI i WRÓBLEWSKA 1967), wykazał Tarkowski wielką plastyczność wczesnych zarodków ssaków, zwaną inaczej zdolnościami do regulacji. Dowodzą jej wyniki doświadczeń prowadzonych wspólnie z licznymi współpracownikami także w czasie najnowszym. Wykryto bowiem, że determinacja losów komórek w przedimplantacyjnym zarodku ssaka zachodzi w zaskakująco późnym okresie rozwoju, zapewne w stadium około 32-komórkowym. Stosując tzw. komplementację tetraploidalną udowodniono, że blastomery zarodka 16-komórkowego zachowują nieograniczony potencjał rozwojowy. Zabieg ten polega na otoczeniu wyizolowanego blastomeru z tego stadium tetraploidalnymi blastomerami pomocniczymi. Po przeszczepieniu takiego zarodka do dróg rodnych samicy uzyskano zdrowe młode pochodzące wyłącznie z potomnych komórek pojedynczego blastomeru (Ryc. 2). Zaobserwowano też, że z przynajmniej niektórych pojedynczych komórek pochodzących z zarodków 32-komórkowych, otoczonych tetraploidalnymi blastomerami pomocniczymi, również można, choć udaje się to niezmiernie rzadko, otrzymać normalne płody (TARKOWSKI i współaut. 2010).

Zwierzęta chimerowe, uzyskiwane na różne sposoby, stały się w czasach najnowszych ważnym narzędziem w badaniach nad



Ryc. 2. Identyczne genetycznie czworaczki myszy pochodzące z siostrzanych blastomerów jednego zarodka 16-komórkowego (TARKOWSKI i współaut. 2010).

rozwojem i różnicowaniem komórkowym u ssaków. W doświadczeniach tych często tworzy się chimery zbudowane z bardzo różnych genetycznie komórek. Przykładowo, z diploidalnych i tetraploidalnych, czyli takich, w których typowy zestaw diploidalny chromosomów został podwojony. O tych ostatnich wiadomo, że tworzyć mogą tkanki pozazarodkowe, ale są eliminowane z ciała płodu. Zastosowanie zarodków tetraploidalnych zwiększa więc szanse rozwojowe badanych komórek, gdyż wspomaga ono m. in. rozwój łożyska. I tu należy podkreślić, że bardzo wydajna metoda uzyskiwania zarodków tetraploidalnych na drodze elektrofuzji blastomerów zarodków 2-komórkowych opracowana została także pod kierunkiem Tarkowskiego w latach 80. XX w. w kierowanym przez niego Zakładzie Embriologii UW (KUBIAK i TARKOWSKI 1985).

Klonowanie ssaków poprzez przeszczepianie jąder komórek somatycznych do żeńskich komórek rozrodczych było w ostatnich latach, obok uzyskiwania zarodkowych komórek macierzystych, zagadnieniem biologicznym przykuwającym uwagę opinii publicznej. Wiele metod manipulowania zarodkami, które stosowane są w eksperymentach prowadzonych w tej dziedzinie opracowane zostały przez Tarkowskiego lub przez jego uczniów w Zakładzie Embriologii UW (MODLIŃSKI 1978). Ale wkład Tarkowskiego w rozwój biologii rozwoju ssaków, który przyczynił się do sklonowania owcy Dolly i innych ssaków, nie ogranicza się wyłącznie do opracowania technik manipulacji zarodkami. Wyniki prac nad oddziaływaniami jądrowo-cytoplazmatycznymi w komórkach rozrodczych i zarodkach ssaków we wczesnym rozwoju, które Tarkowski i jego współpracow-

nicy prowadzili z zastosowaniem tych metod, a zwłaszcza opisanie przekształceń jąder komórek somatycznych wprowadzanych do oocytów, stworzyły teoretyczne podstawy dla klonowania ssaków (CZOŁOWSKA i współaut. 1984). Wykazały bowiem jakim przekształceniom muszą podlegać owe jądra komórkowe, aby mogły poprowadzić pełny rozwój zarodkowy.

Istotnym elementem procedury klonowania, a także niektórych metod zapłodnienia *in vitro* jest sztuczne pobudzenie oocytu do rozwoju, czyli doświadczalna partenogeneza. Tarkowski wniósł znaczny wkład również w poznanie tego zagadnienia. W artykule opublikowanym także w *Nature* w 1970 r. zdemontował jak przebiega rozwój partenogenetycznych zarodków myszy uzyskanych w wyniku sztucznego pobudzenia oocytów do rozwoju przy pomocy impulsów prądu elektrycznego (TARKOWSKI i współaut. 1970). Badania prowadzone nad rozwojem takich zarodków miały ogromne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów genetycznych regulujących wzrost i morfogenezę zarodka, jak również tkanek pozazarodkowych. Badania te miały też niebagatelny wpływ na poznanie mechanizmów komórkowych i molekularnych samego zapłodnienia z udziałem plemnika. Zastąpienie wnikania plemnika do oocytu jego partenogenetycznym pobudzeniem do rozwoju pozwoliło bowiem wykazać, które z wczesnych procesów rozwojowych wymagają udziału plemnika, a które zależne są wyłącznie od oocytu. W kilkanaście lat po opublikowaniu wyników tych badań okazało się, że prawidłowy przebieg rozwoju ssaków wymaga obecności w zarodku genomów pochodzących od rodziców obu płci i niosących geny w zróżnicowany sposób naznaczone epigenetycznie w procesie metylacji DNA (McGRATH i SOLTER 1984).

Powyższe, skrótowe omówienie najważniejszych pionierskich prac Tarkowskiego nie opisuje w pełni całego spektrum jego zainteresowań badawczych, które w różnych etapach jego kariery i przy współudziale wielu współpracowników obejmowały także inne zagadnienia związane z wczesnym rozwojem zwierząt. W ich zakres wchodziły badania nad: pierwotnymi komórkami płciowymi u ssaków i u ptaków, wpływem poliploidii i haploidii zarodka myszy na jego rozwój, oddziaływaniami jądrowo-cytoplazmatycznymi podczas oogenezy, mechanizmami zapłodnienia. Wyczerpujące omówienie wyników tych prac znaleźć można w opublikowanym



Ryc. 3. W 2002 r. w Tokio odbyła się ceremonia wręczenia prof. Tarkowskiemu prestiżowej nagrody naukowej Japan Prize (fot. z archiwum Zakładu Embriologii UW).

kilka lat temu artykule, który przedstawia ponad 100-letnią historię badań embriologicznych prowadzonych w Uniwersytecie Warszawskim (TARKOWSKI i współaut. 2008).

W 2012 r., w 50 lat po obronie doktoratu przez prof. Tarkowskiego odbyło się na UW uroczyste odnowienie jego doktoratu. Fundamentalne znaczenie prac Profesora Tarkowskiego dla biologii rozwoju i rozrodu podkreślili recenzenci jego dorobku. Profesor Bartel z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi swoją opinię rozpoczyna od następujących słów „Pan Profesor Andrzej Tarkowski jest światowej sławy embriologiem, twórcą polskiej szkoły embriologii doświadczalnej ssaków. Jego oryginalne i pionierskie osiągnięcia okazały się fundamentalne dla dalszego rozwoju embriologii zwierząt i człowieka”. Zdaniem prof. Bartla „...dokonania naukowe Pana Profesora Andrzeja Krzysztofa Tarkowskiego stworzyły teoretyczne i praktyczne podstawy pod epokowe osiągnięcia biologii i medycyny XX wieku – zapłodnienie pozaustrojowe,

we, klonowanie, komórki macierzyste”. Z tą opinią współbrzmi zdanie wyrażone przez drugiego recenzenta, prof. Bilińskiego z Uniwersytetu Jagiellońskiego, który stwierdza, że „Profesor Andrzej K. Tarkowski jest uczonym światowej sławy, wybitnym specjalistą w dziedzinie biologii rozwoju i rozrodu ssaków” oraz wyraża opinię, że „...Jego badania i osiągnięcia wyjaśniające mechanizmy leżące u podstaw różnicowania zarodków ssaków zapoczątkowały szybki rozwój tej dziedziny biologii i przyniosły nauce polskiej szeroki międzynarodowy rozgłos”. Uznanie zasług prof. Tarkowskiego dla światowej nauki są wyrażane nagrodami i honorami przyznawanymi przez różne gremia i organizacje. Spośród nich na szczególne podkreślenie zasługuje wyróżnienie Go w 2002 r. przez Japońską Fundację Nauki i Technologii prestiżową Japan Prize (Ryc. 3).

Z okazji 80. rocznicy urodzin prof. Tarkowskiego, w październiku 2013 r. odbyła się na UW międzynarodowa konferencja

naukowa pt. „Mammalian Embryology Conference. Celebrating Pioneering Work of Professor Andrzej K. Tarkowski”. Pozwoliła ona nie tylko uczcić jubileusz Profesora, ale również dokonać bilansu badań w dziedzinie regulacji rozwoju ssaków, gdyż skupiła wielu z najlepszych, współczesnych embriologów ssaków. W dwa tygodnie później FNP przyznała prof. Tarkowskiemu swoją roczną nagrodę, która ze względu na jej prestiż nazywana bywa Polskim Noblem. Nagroda ta została przyznana Tarkowskiemu za całokształt jego pionierskich badań nad rozwojem myszy.

Pomimo wieku, profesor Tarkowski jest ciągle czynny zawodowo. Twierdzi, że do-

piero teraz, na emeryturze, gdy wolny jest od obowiązków administracyjnych na uczelni i w Polskiej Akademii Nauk, ma warunki do poświęcenia całego swego czasu na badania naukowe. W 2012 r. uzyskał prestiżowy grant Maestro Narodowego Centrum Nauki na badania rozwoju chimer międzygatunkowych. Eksperymenty, które prowadzi wraz ze współpracownikami z Zakładu Embriologii UW mogą odpowiedzieć na pytanie, na czym polegają bariery rozwojowe nawet blisko ze sobą spokrewnionych gatunków ssaków. Tym razem mysz jest tylko jednym z badanych przez Profesora gatunkiem ssaka.

PROF. ANDRZEJ K. TARKOWSKI – PIONIER EMBRIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ SSAKÓW

Streszczenie

Przedstawiamy poniżej główne odkrycia Prof. Andrzeja K. Tarkowskiego jak również jego i zasługi dla rozwoju polskiej szkoły eksperymentalnej embriologii ssaków. Okazją do napisania tego artykułu

były 80. urodziny Profesora i nadanie mu przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej dorocznej nagrody naukowej zwanej Polskim Noblem.

PROFESSOR ANDRZEJ K. TARKOWSKI – PIONEER OF MAMMALIAN EXPERIMENTAL EMBRYOLOGY

Summary

Below we present the main discoveries of Prof. Andrzej K. Tarkowski and his contributions for the development of the Polish school of experimental embryology of mammals. The jubilee of 80 years of

Prof. Tarkowski and the recognition of his work by the Foundation for Polish Science through the annual scientific award called the Polish Nobel Prize were special opportunities to write this article.

LITERATURA

- CZOŁOWSKA R., MODLIŃSKI J. A., TARKOWSKI A. K., 1984. *Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes*. J. Cell Sci. 69, 19–34.
- KUBIAK J. Z., TARKOWSKI A. K., 1985. *Electrofusion of mouse blastomeres*. Exp. Cell Res. 157, 561–566.
- MCGRATH J., SOLTER D., 1984. *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes*. Cell 37, 179–183.
- MODLIŃSKI J. A., 1978. *Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts*. Nature 273, 466–467.
- TARKOWSKI A. K., 1959. *Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs*. Nature 184, 1286–1287.
- TARKOWSKI A. K., 1961. *Mouse chimaeras developed from fused eggs*. Nature 190, 857–860.
- TARKOWSKI A. K., WRÓBLEWSKA J., 1967. *Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage*. J. Embryol. exp. Morph. 18, 155–180.
- TARKOWSKI A. K., WITKOWSKA A., NOWICKA J., 1970. *Experimental parthenogenesis in the mouse*. Nature 226, 162–165.
- TARKOWSKI A. K., MALESZEWSKI M., ROGULSKA T., CIEMERYCH M. A., BORSUK E., 2008. *Vertebrate embryology at Warsaw University: from XIX century to the present time*. Int. J. Dev. Biol. 52, 121–134.
- TARKOWSKI A. K., SUWIŃSKA A., CZOŁOWSKA R., OŹDŻEŃSKI W., 2010. *Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice*. Dev. Biol. 348, 190–198.