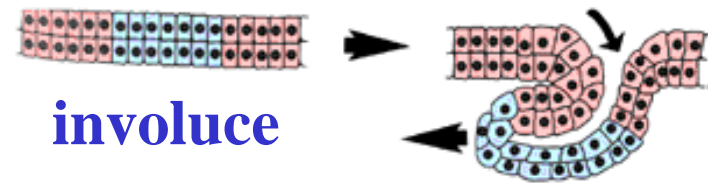
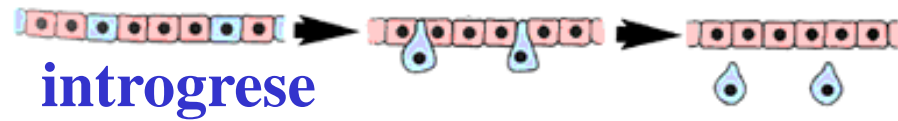


# GASTRULACE - klíčové stádium diferenciace

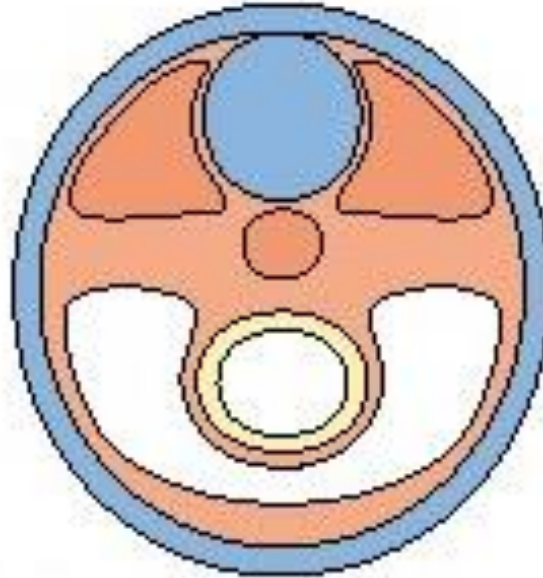


mořská ježovka: při gastrulaci vznikají invaginací prvoústa,  
která posléze prolomí otvor k „druhým“ ústům

## zárodečné listy

dorsal

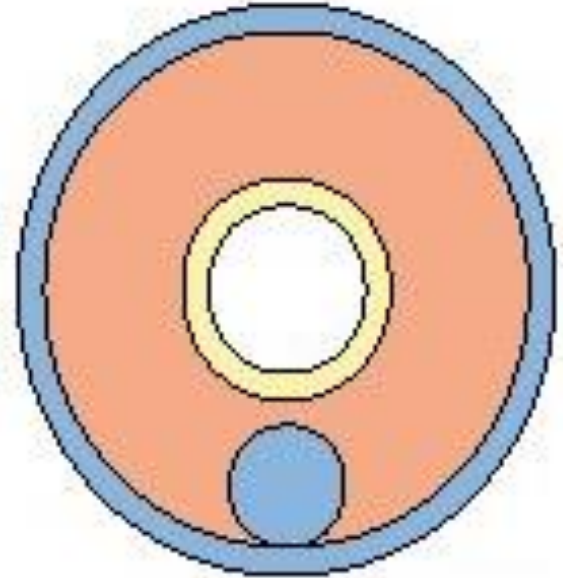
### OBRATLOVCI



ventral

dorsal

### HMYZ



ventral

**zárodečné listy**

**orgány :**

**endoderm**

**střevo, játra, plíce**

**střevo**

**mesoderm**

**skelet, svaly, ledviny, srdce, krev**

**svaly, srdce, krev**

**ektoderm**

**pokožka, nervový systém**

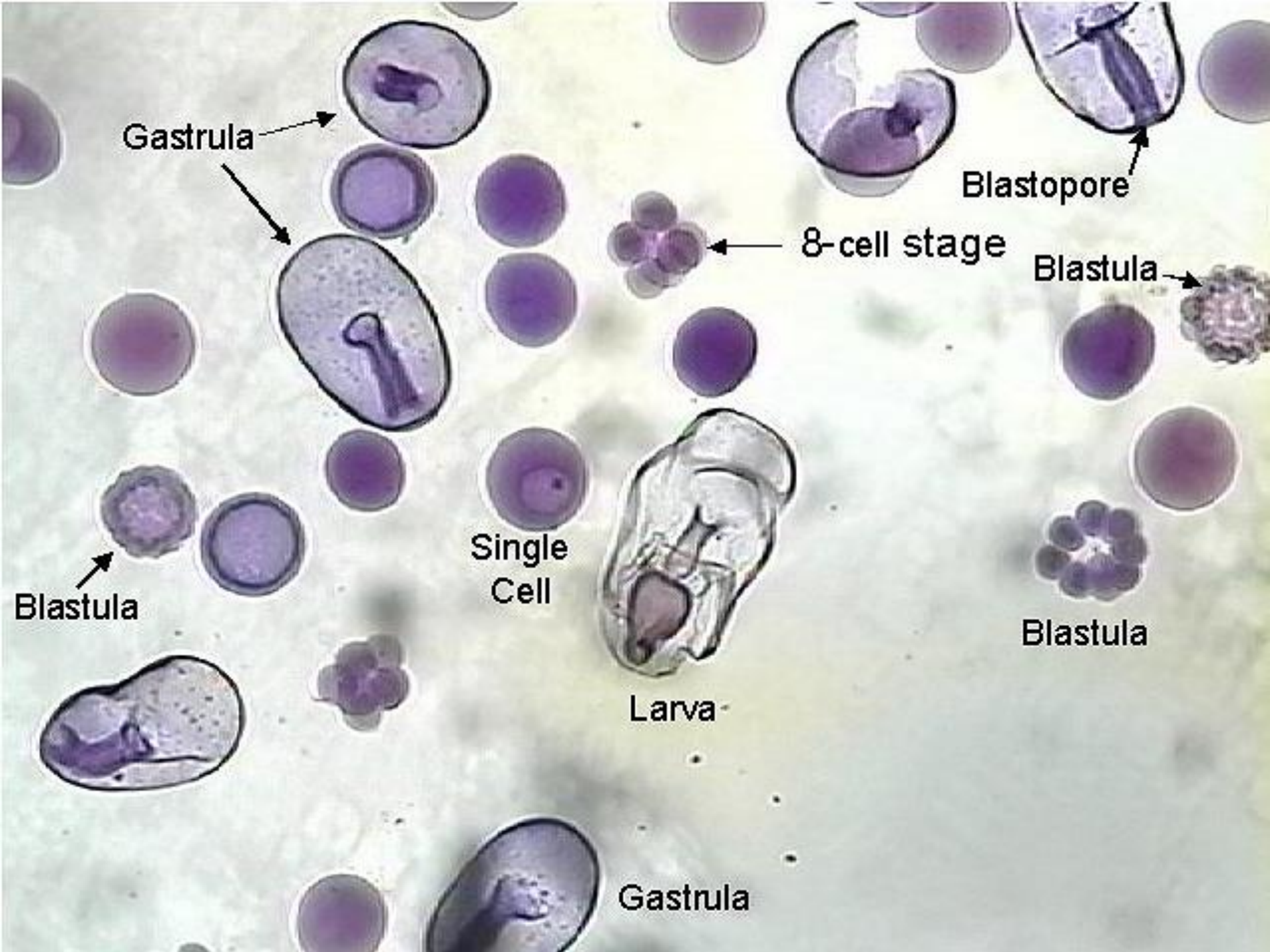
**kutikula, nervový systém**



A close-up photograph of several sea urchins resting on a dark, sandy seabed. The urchins are covered in numerous sharp, light-colored spines. The word "ježovka" is overlaid in blue, italicized text across the center of the image.

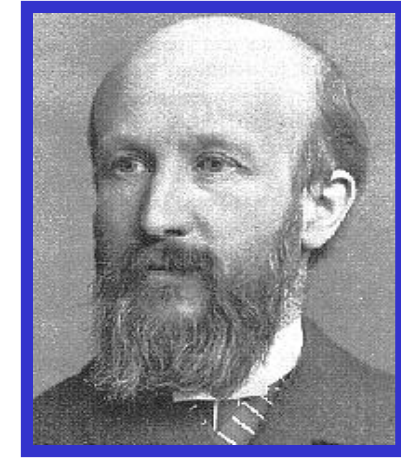
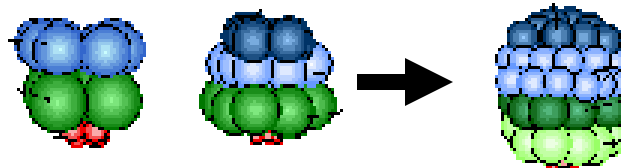
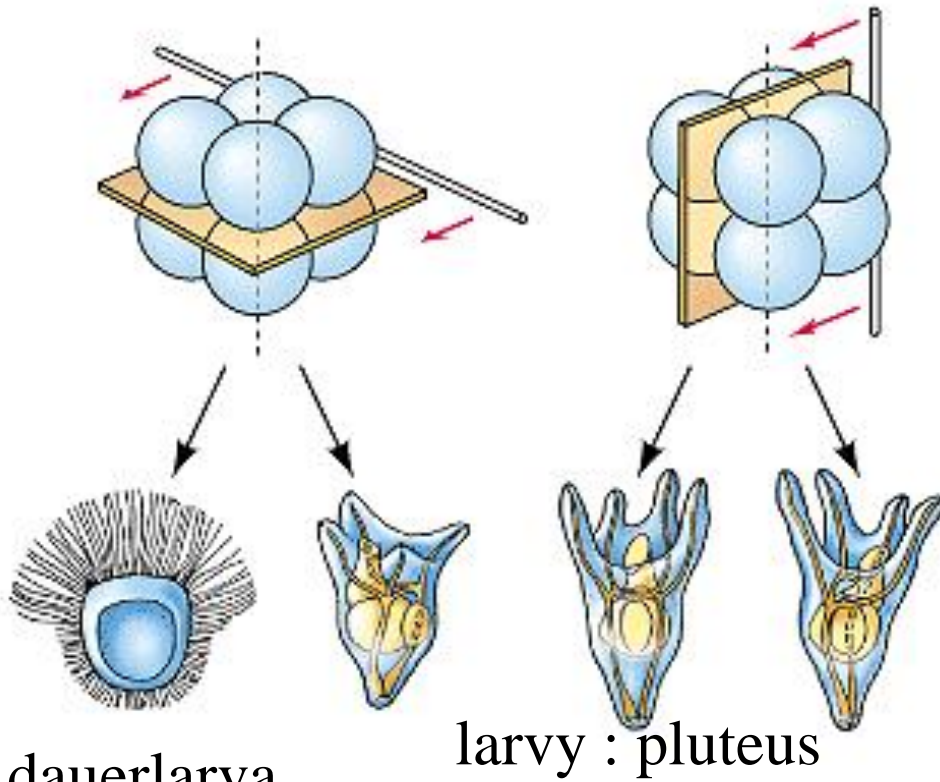
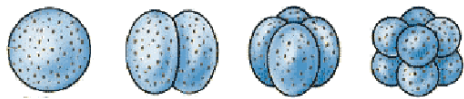
*ježovka*



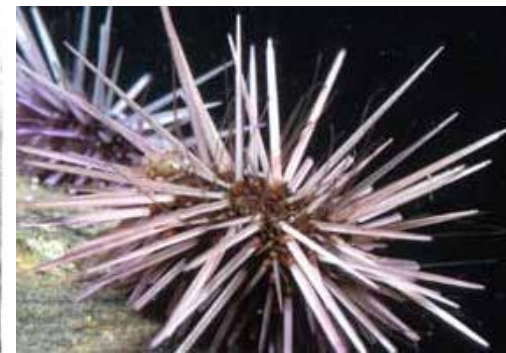




# Mořská ježovka : historický model fertilizace, embryologie a buněčného klonování



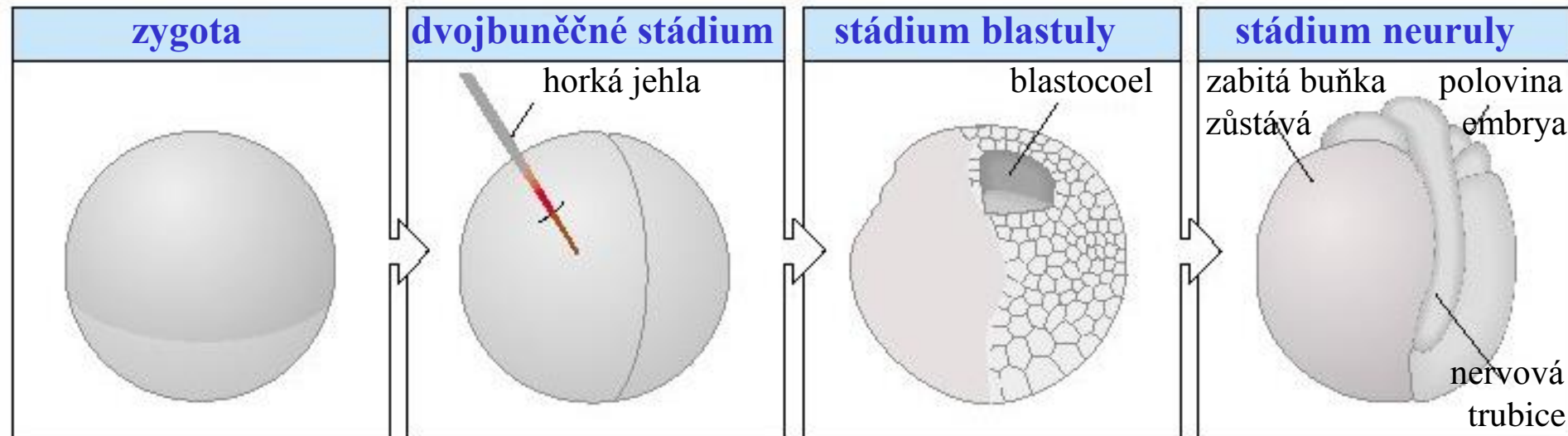
Oscar Hertwig  
(1849-1922)



# Rouxovy experimenty na žabích vajíčkách měly vést k ověření Weismannovy teorie mozaikového vývoje



Wilhelm Roux (1850-1924)



- vývoj žáby je založen na mozaikovém mechanismu: buňky mají svůj charakter a osud je derminován při každém rýhování ...
- ... ale Hans Driesch zatím dělá obdobné pokusy na ježovkách a dochází k jiným závěrům ...



# Popření teorie mozaikového vývoje i mechanicismu :

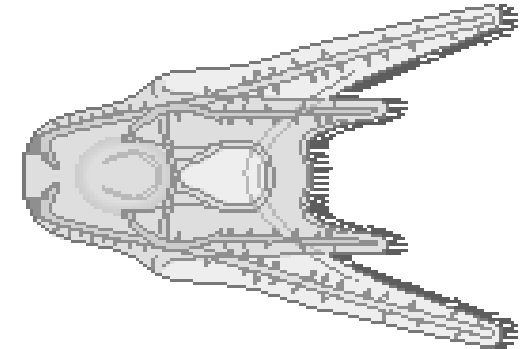
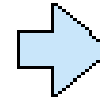
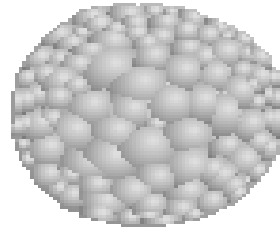
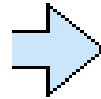
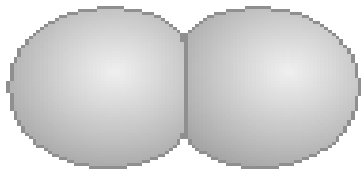
... organismy nejsou stroje, tyto nemohou samy doplňovat své chybějící části ...

... organismy (embrya) mají schopnost regulace ...

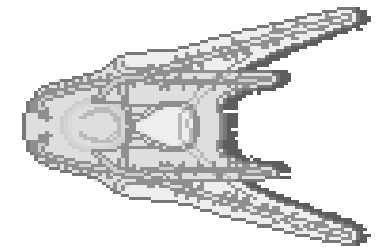
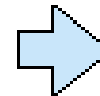
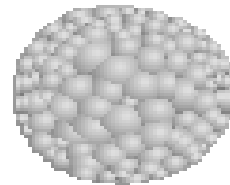
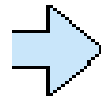
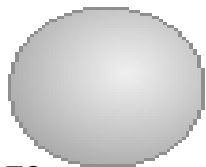
Hans Driesch (1876-1941)



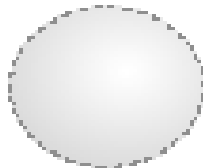
normální vývoj larvy ježovky ze stádia dvou blastomer



jedna ze dvou separovaných blastomer dává vznik normální (menší) larvě



jedna ze  
separovaných  
blastomer  
obvykle umírá



... v hlavní roli :

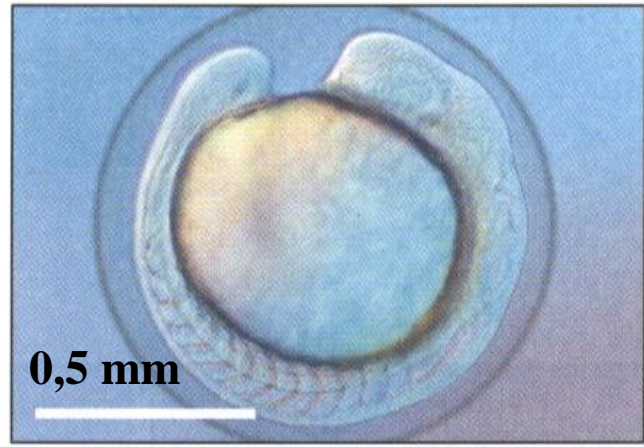
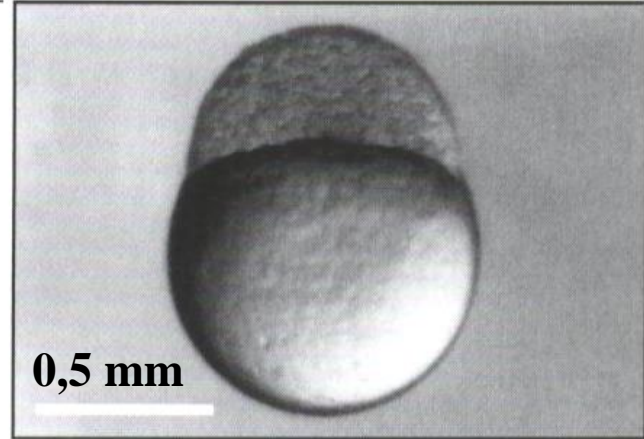
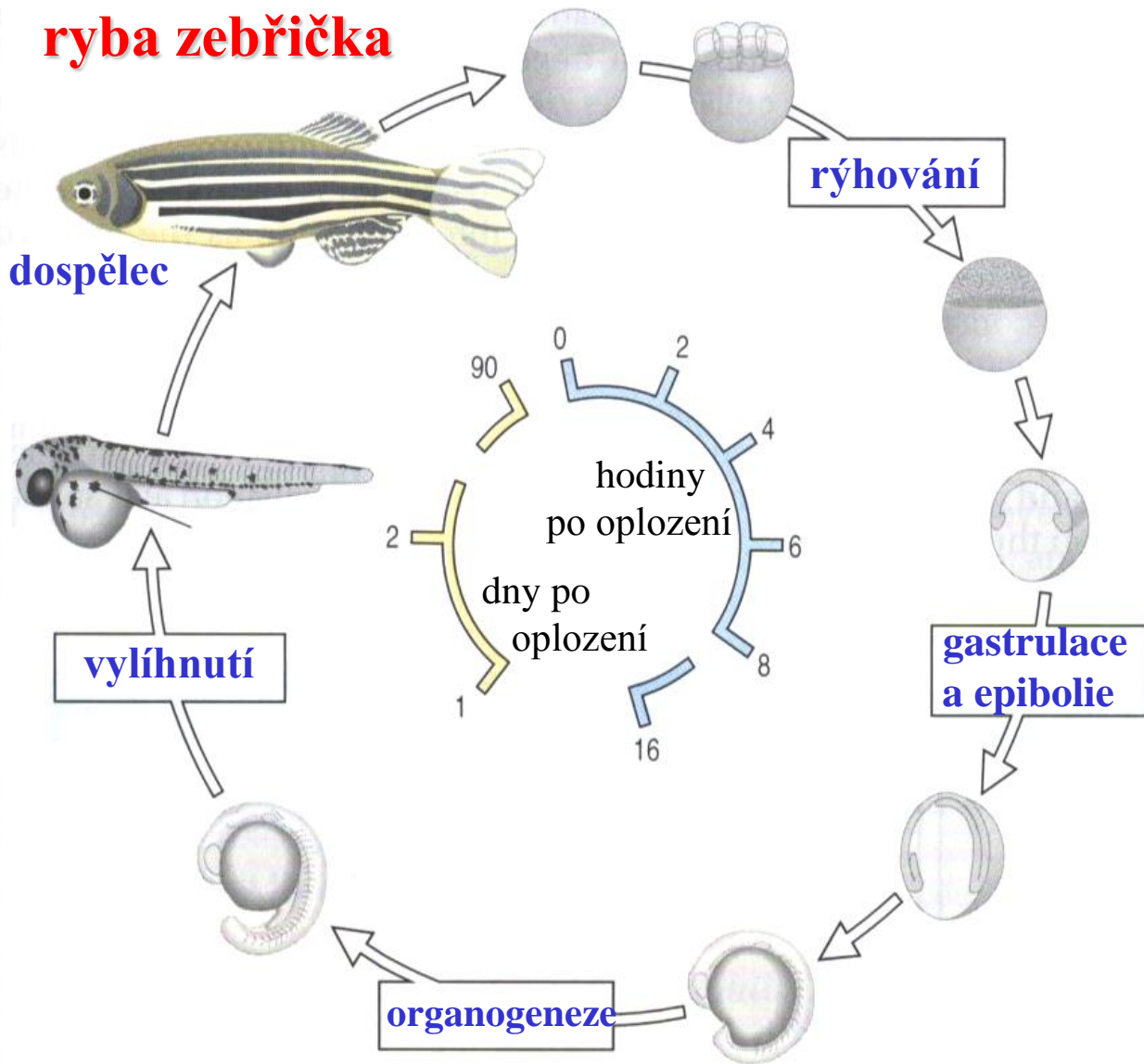
*zebrůvka*





***Danio rerio***  
**ryba zebříčka**

30 minut po (vnějším) oplození





*D. rerio*



*D. nigrofasciatus*



*D. albolineatus*



*D. kerri*



*D. shanensis*



*puma*



*panther (fms)*



*sparse (kit)*



*panther (fms); sparse (kit)*



*rose (ednrb1)*



*panther (fms); rose (ednrb1)*



*sparse (kit); rose (ednrb1)*



*nacre (mitfa)*



*leopard*

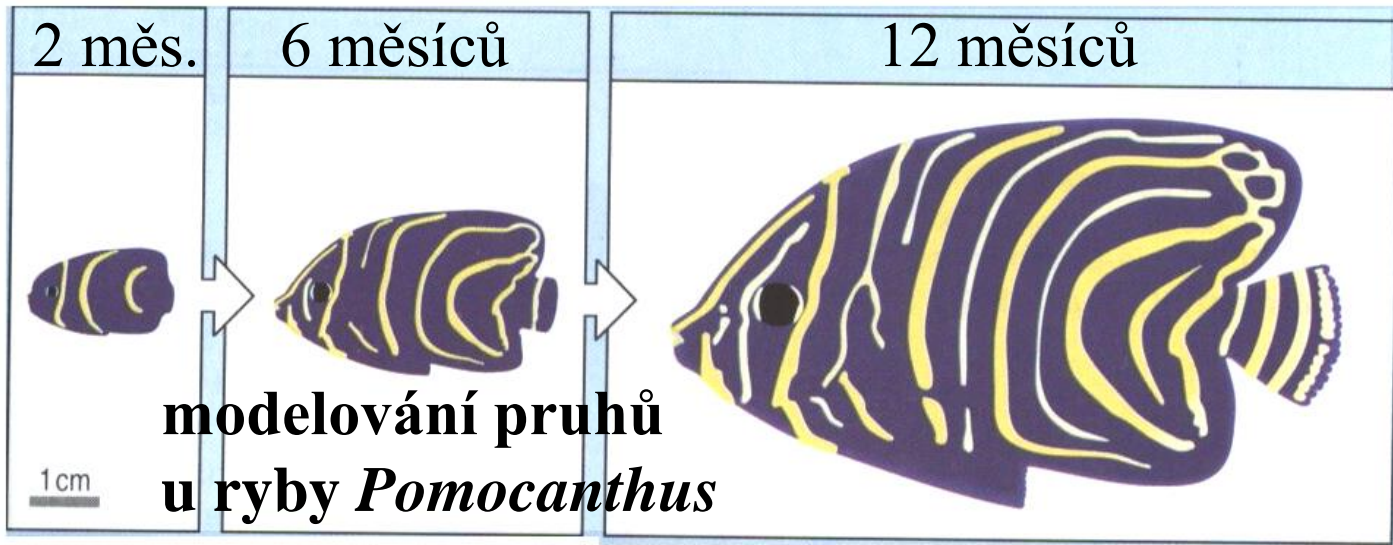


*jaguar/obelix*

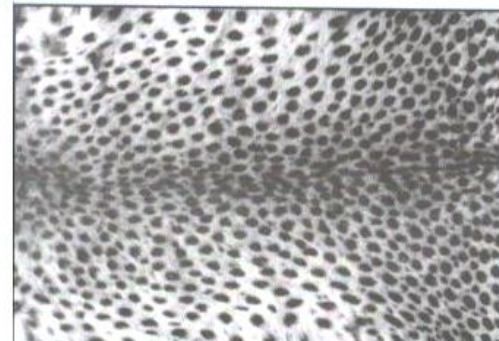
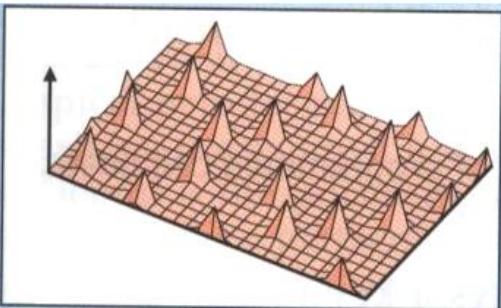
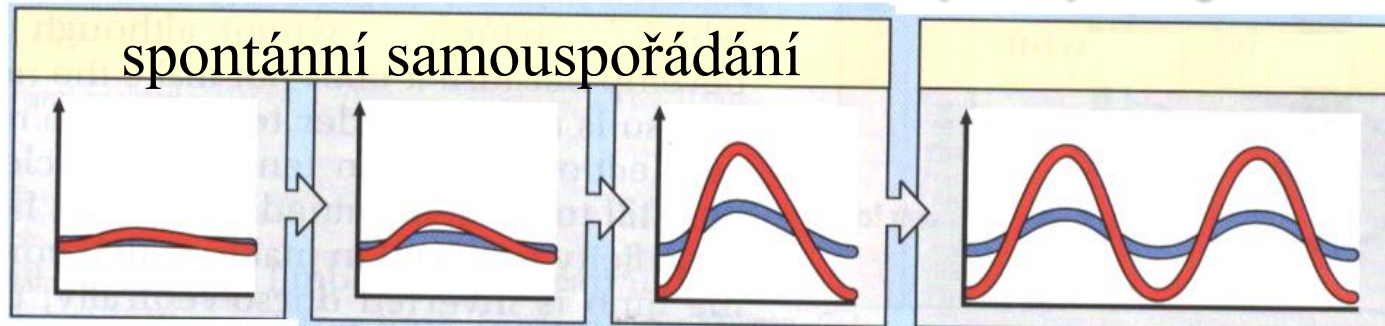
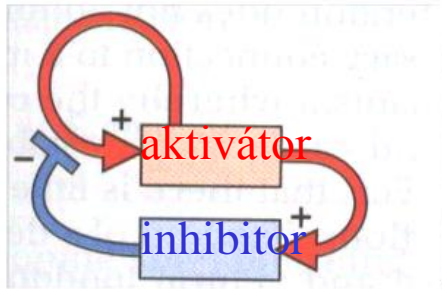
Zebrafish pigment pattern mutants.

Diversity of *Danio* adult pigment patterns.





# Reaktivně - difúzní mechanismy vývoje



# Uspořádání pigmentu v pruzích zebřičky





# Tvorba uspořádání zbarvení zebřičky v ontogenezi

*metamorfóza*

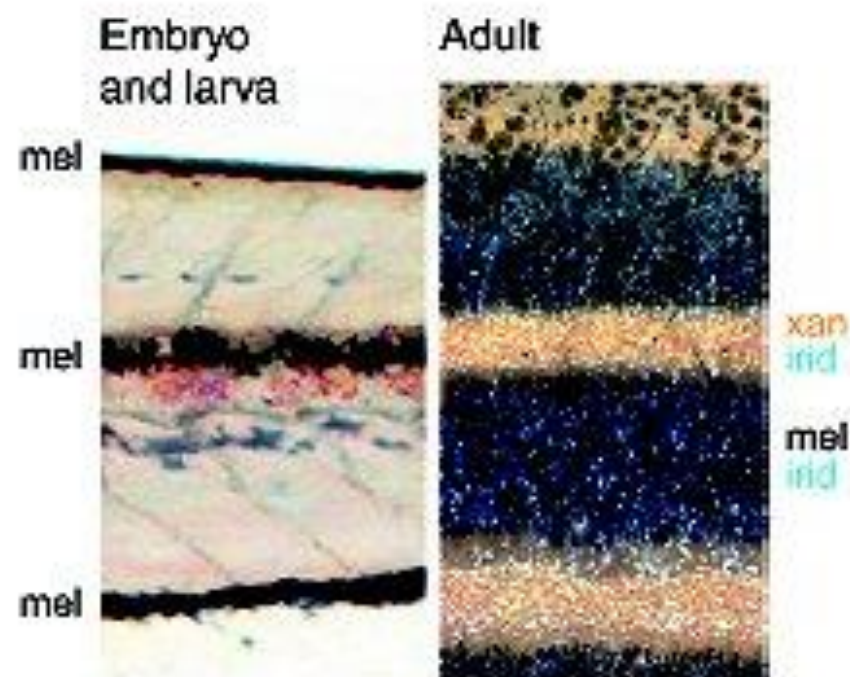
**LARVA**

→  
migrace i apoptóza  
chromatorů, vznik nových  
z kmenových buněk

**DOSPĚLEC**

jen nevýrazné 2 tmavé  
pruhy melanoforů  
vznikajících z neurulálních  
buněk gastruly, migrace

změny v pruzích, dva  
primární + 3-4 sekundární,  
+ xantofory a iridofory



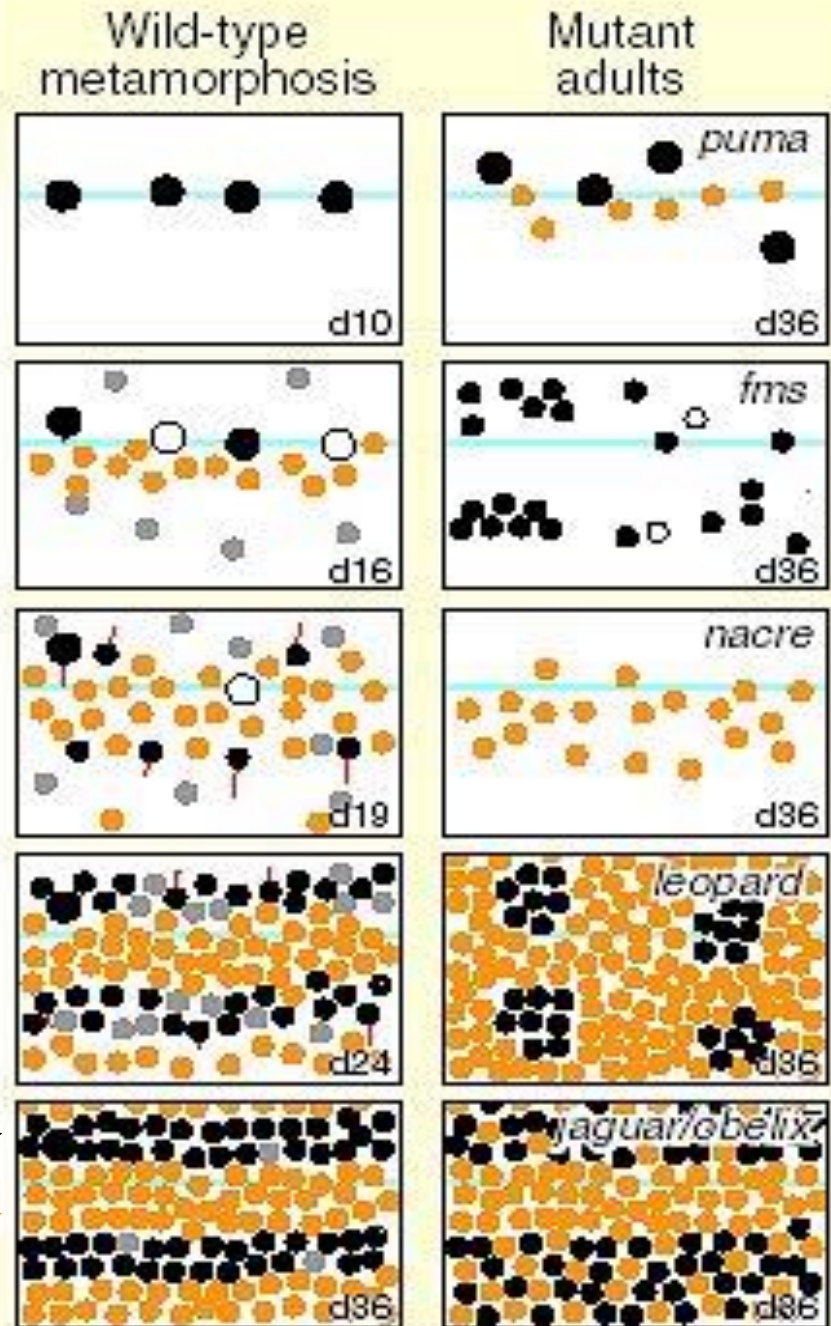
Pigment patterns at different stages.

The early larva at the start of metamorphosis (left) has melanophore stripes dorsally, ventrally, and in the middle of the flank and clusters of xanthophores and iridophores beneath the middle stripe. The adult (right) has alternating light and dark stripes containing xanthophores and melanophores, respectively.



- tři typy chromatoforů (buněk)
- pohyb buněk
- programovaná buněčná smrt

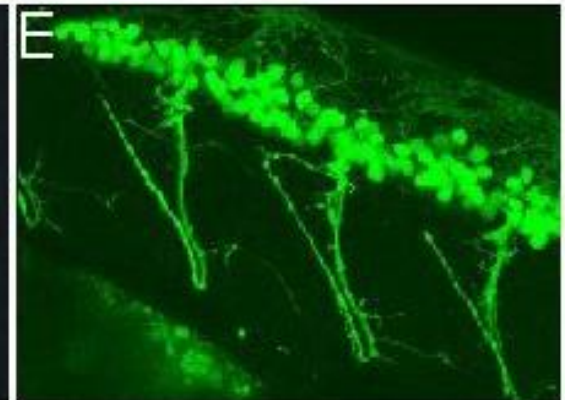
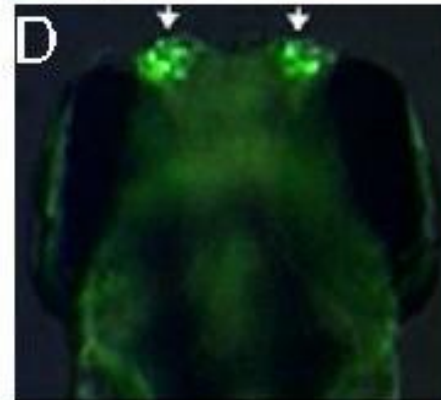
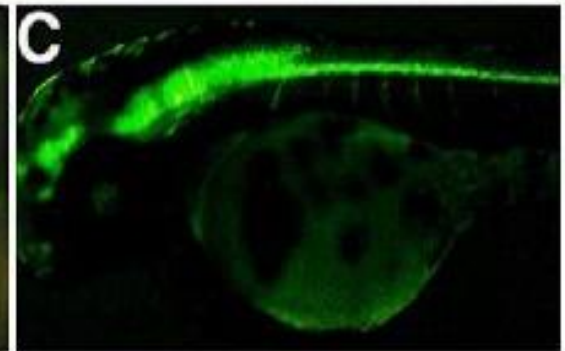
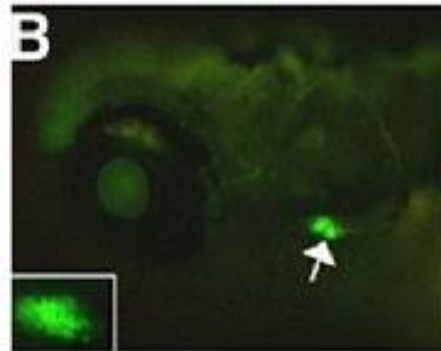
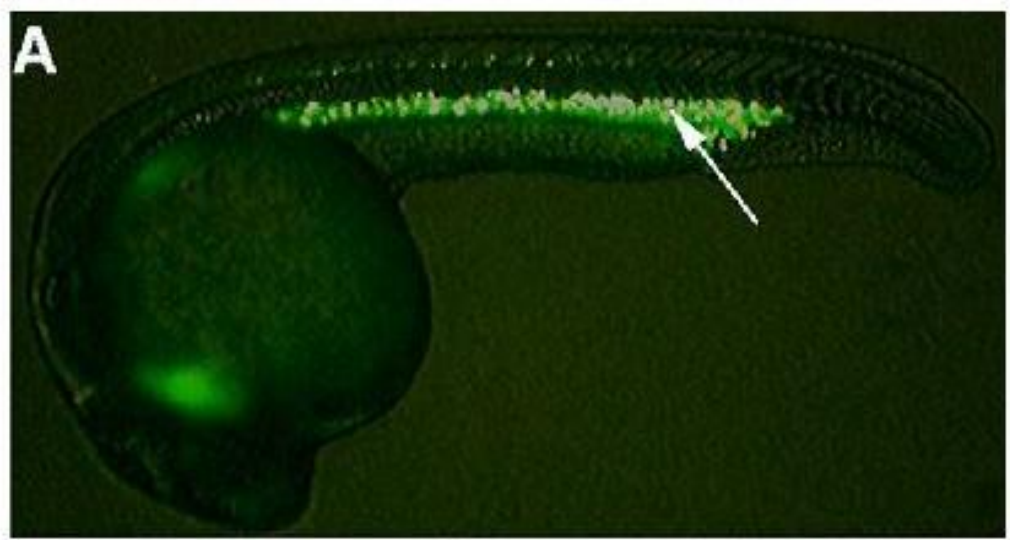
Chromatophore arrangements  
 In wild-type (left), larval melanophores (large black circles) are present along the horizontal myoseptum (blue line). Some of these cells die (open circles), others move into the developing adult stripe (red tracks). Simultaneously, xanthophores (orange) begin to appear in the middle of the flank and metamorphic melanophores (gray) appear over the flank. Some metamorphic melanophores migrate into the position of adult stripes; others differentiate already at the site of stripe formation. After metamorphosis, the pigment pattern has little resemblance to that of the embryo. In pigment pattern mutants (right), chromatophore numbers and arrangements differ dramatically from wild-type.



MELANOPHORES  
 XANTHOPHORES

transgenní  
ryba  
„green  
fluorescence  
protein“

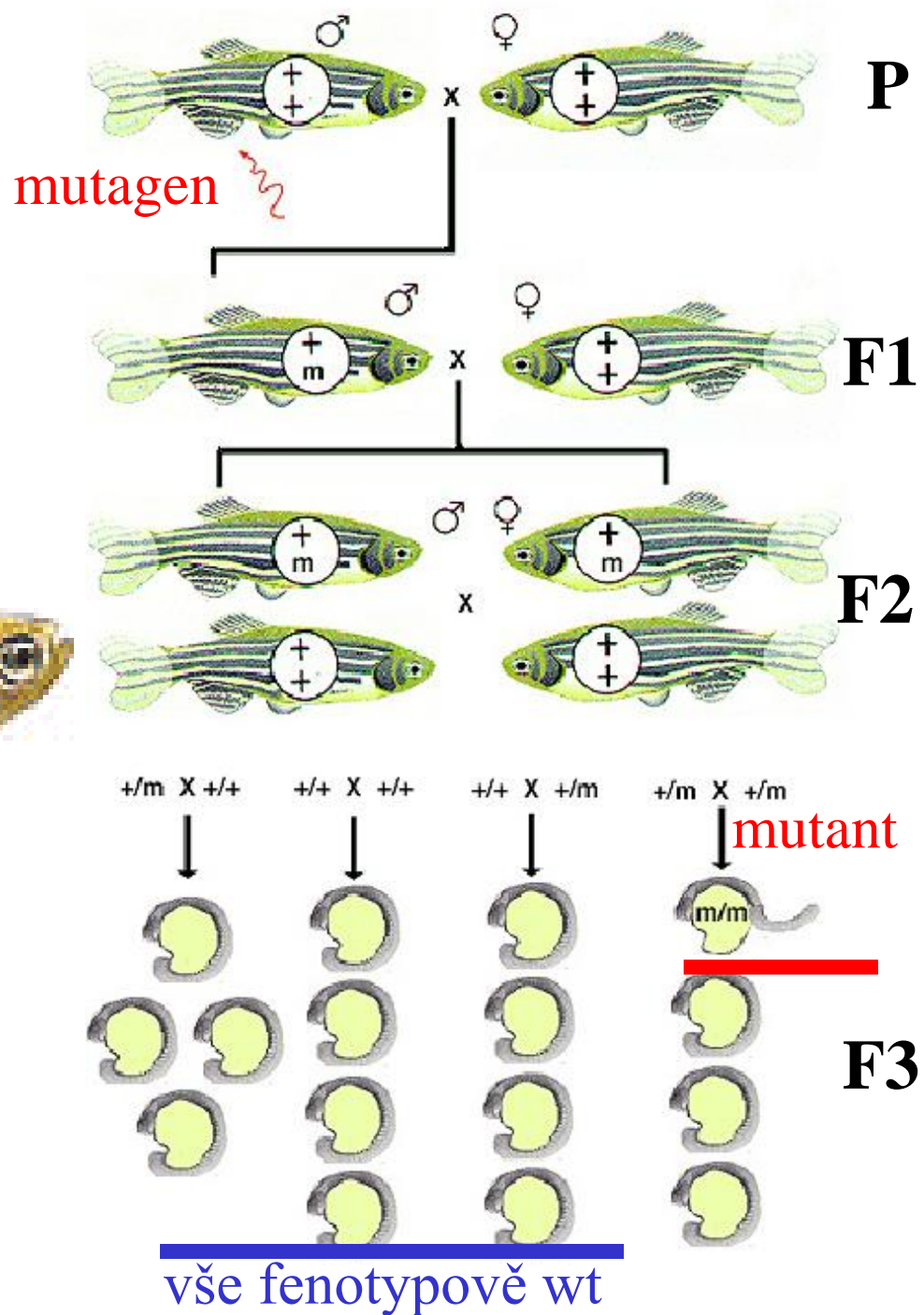
*Danio rerio*  
zebrička

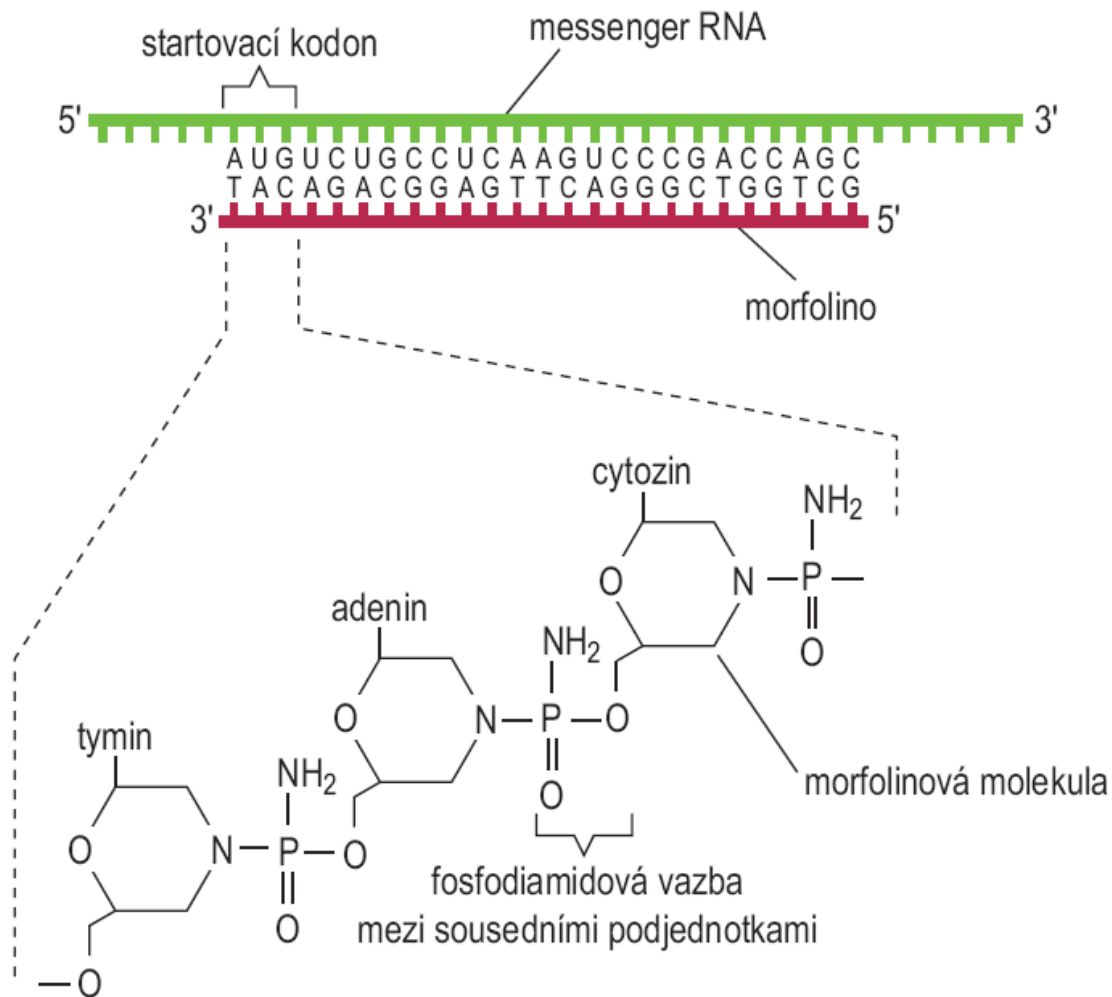


**A.** Blood **B.** Thymus **C.** Central Nervous System  
**D.** Olfactory Neurons **E.** Motor Neurons



# Zebřička - model vývojové genetiky a ekotoxikologie





Technika morfolino pro párování se sekvencí kolem startovacího kodonu mRNA genu *no tail* u ryby zebřičky. Morfolina mají obvykle 20 až 25 jednotek. Každá sestává z morfolinové molekuly vázané k dusíkaté bázi (A, T, U, G nebo C). Jednotky jsou vázány jedna k druhé fosfodiamidovou vazbou namísto fosfodiesterové vazby, jak je tomu v DNA a RNA.





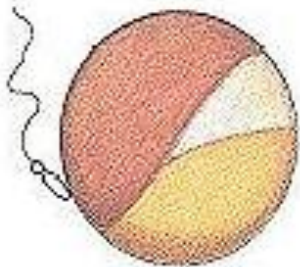
**... v hlavní roli :**

***žáby***  
***a ocasatí***  
***obojživelníci***

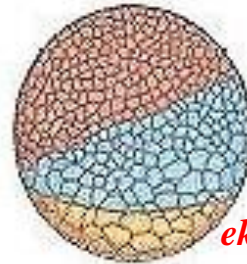
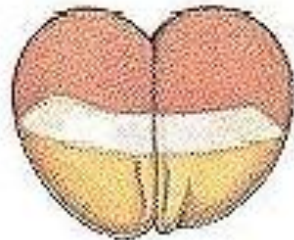
# Základní stádia ontogeneze obojživelníků

oplozené vajíčko    2-buněčné stádium (90 min)    midblastula (4tis. buněk, 7 h)    časná gastrula (20tis. buněk, 9h)    pozdní gastrula (12h)

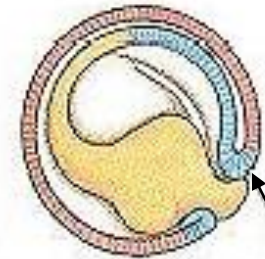
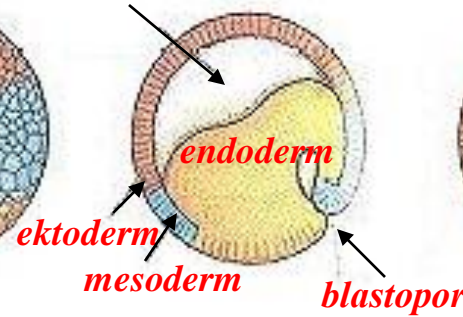
*animální pól*



*vegetální pól*

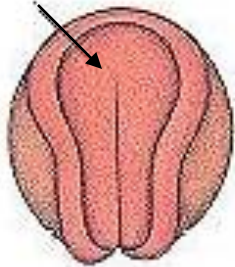


*blastocoel*



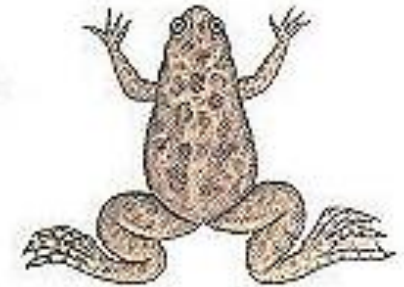
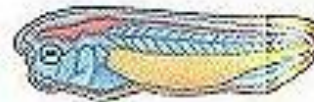
*blastopore*

*neurální destička*



*neurální destička*

*uzavírající se neurální destička*



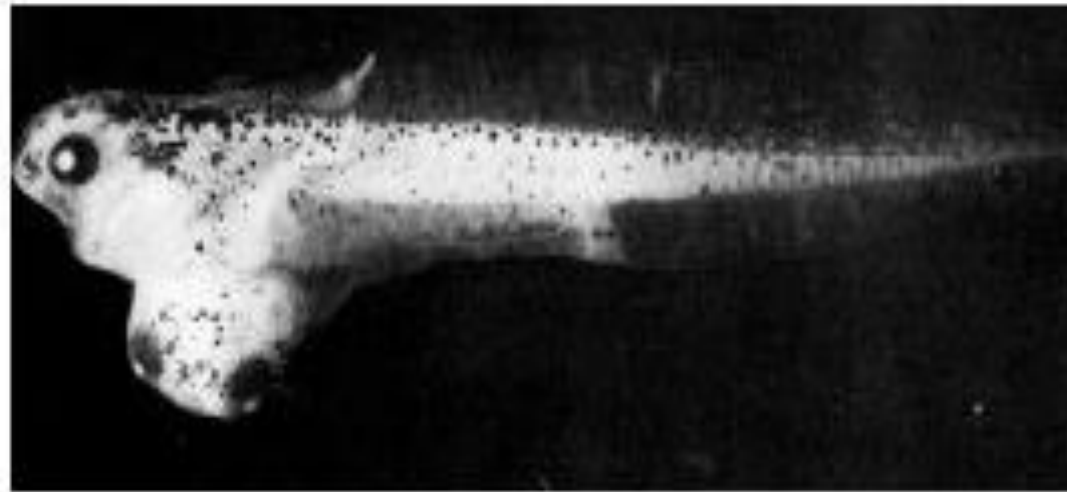
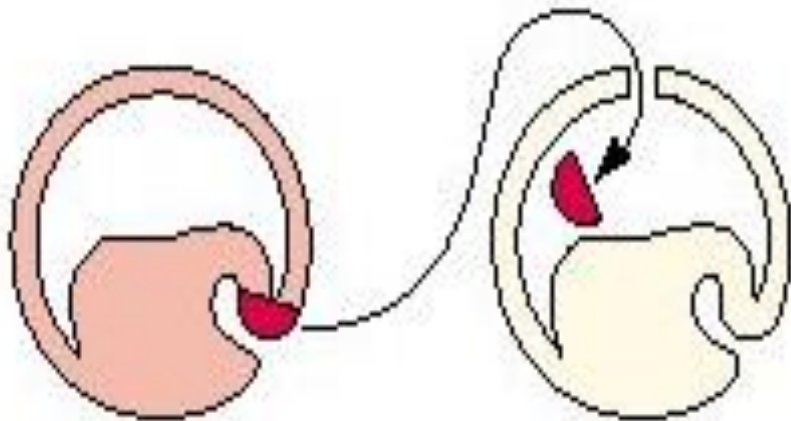
časná neurula    časná neurula    pozdní neurula    vylíhnutý pulec    dospělá žába  
(150tis. buněk, 20h)    (500tis. buněk, 3d)    (12 měsíců)



*Xenopus laevis* – africká drápatka – model molekulární embryologie



# HISTORICKÉ KOŘENY VÝVOJOVÉ BIOLOGIE : *slavné experimenty Hanse Spemanna s čolky*

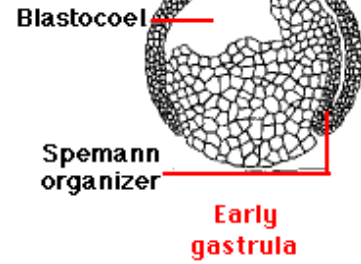




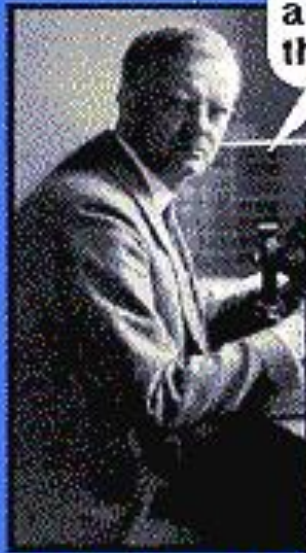
# OBJEV ORGANIZÁTORU (Freiburg 1923)

## HANS SPEMANN (1869-1941)

## HILDE MANGOLD (1898-1924)



A piece of the upper blastopore lip of an amphibian embryo undergoing gastrulation exerts an organizing effect on its environment in such a way that, if transplanted to an indifferent region of another embryo, it causes there the formation of a secondary embryonic anlage. Such a piece can therefore be designated as a Organizer.



Hans Spemann

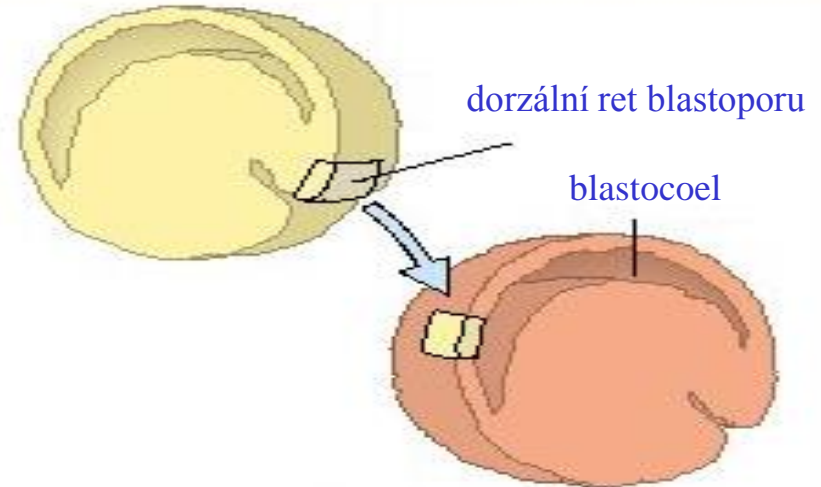


Hilde Mangold

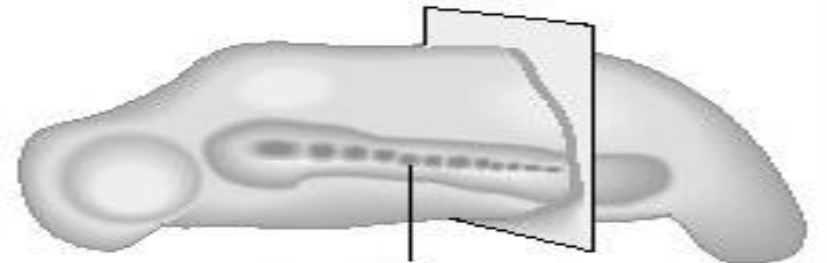
# Indukce nové tělní osy přenosem oblasti organizátoru časné gastruly čolků

(Spemann a Mangoldová 1924)

dorzální ret blastoporu nepigmentovaného druhu  
přenesen do obalu blastocoelu pigmentovaného druhu



**indukce sekundárního embrya**



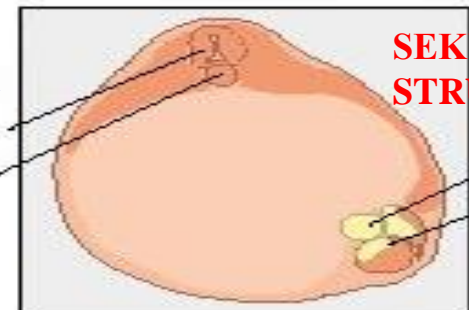
sekundární (indukované) embrya

**PRIMÁRNÍ  
STRUKTURY :**

neurální  
trubice  
notochord

**SEKUNDÁRNÍ  
STRUKTURY :**

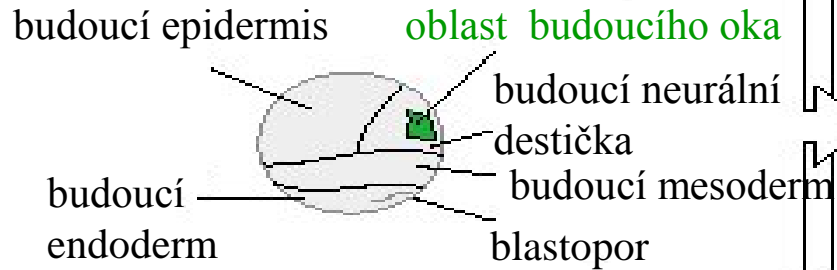
notochord  
neurální  
trubice



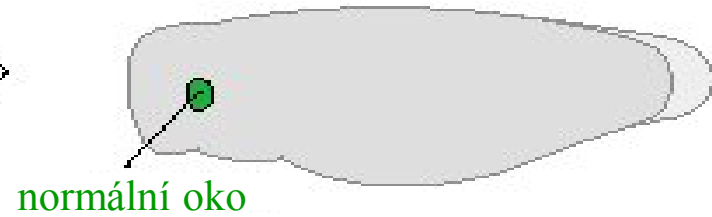


# Determinace oblasti oka v průběhu embryogeneze obojživelníků

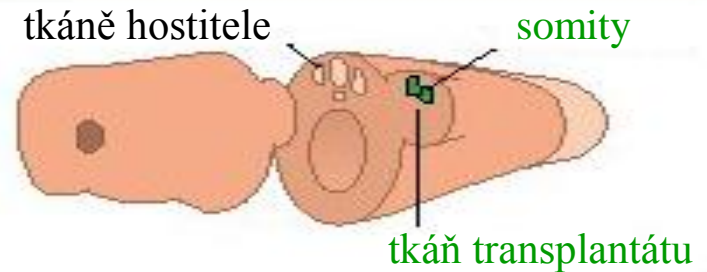
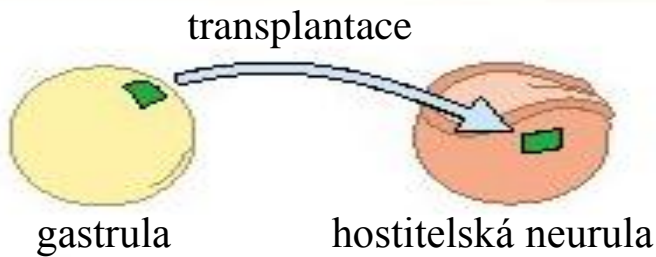
„osudové mapování“ normální gastruly lokalizuje oblast budoucího oka



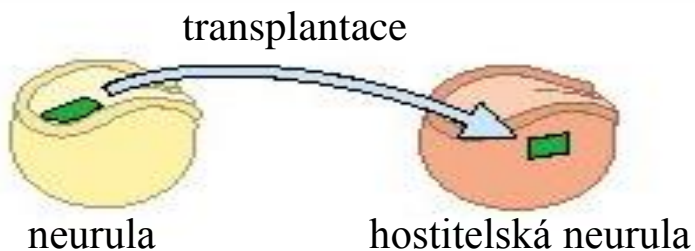
stádium pulce



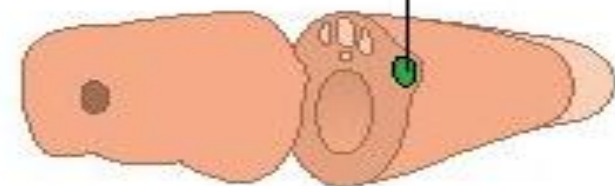
transplantát z časně gastruly se vyvine podle své nové polohy

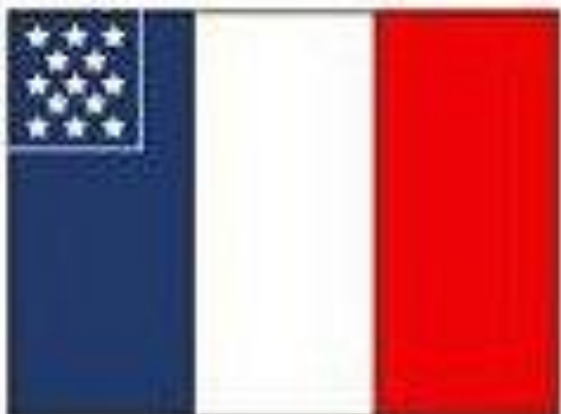
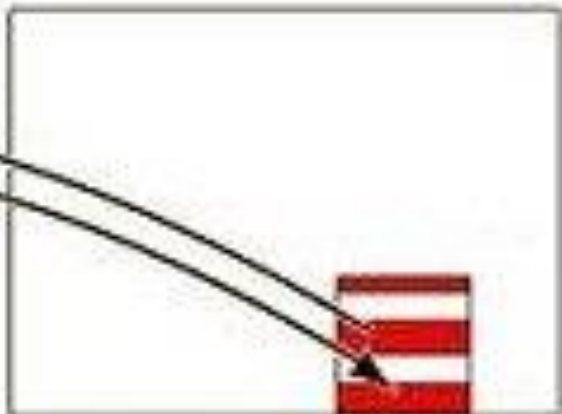
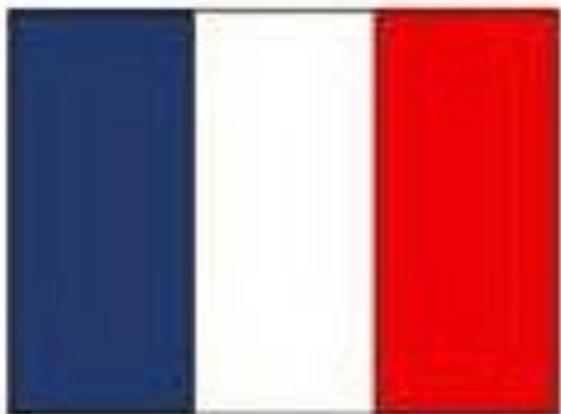


transplantát z pozdějšího stádia embrya se vyvine jako oko



z transplantované tkáň se vytvoří struktura oka





základní  
schéma :

ústa  
žáby

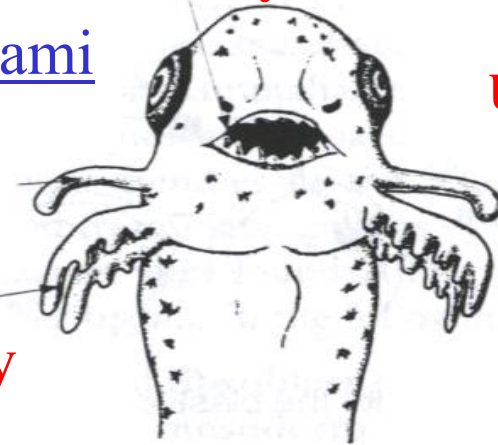


čelist s  
přisavkami

zuby

ústa  
čolka

žábry



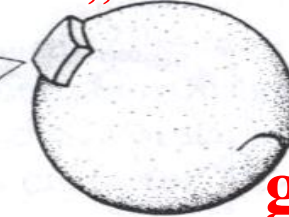
transplantace :

blastula  
žáby

(donor)  
„budoucí“  
epidermis



oblast „budoucích“ úst



gastrula  
čolka

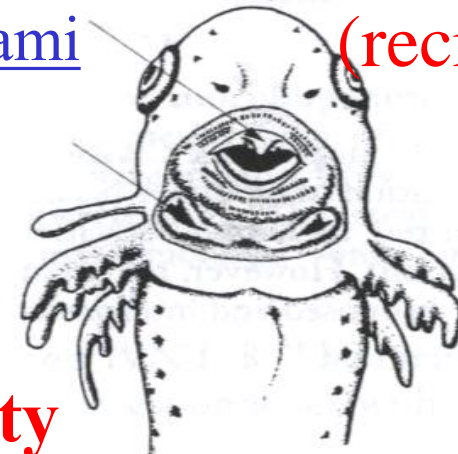
čelist s  
přisavkami

(recipient)



# XENOTRANSPLANTACE

čolek s žabími ústy





# ČOLEK - MODEL REGENERACE



Unamputated Limb



Wound Epithelium Formation  
1 Day Post-Amputation



Dedifferentiation Stage  
0-1 Week Post-Amputation



Early Bud Stage  
1-2 Weeks Post-Amputation



Mid Bud Stage  
2-4 Weeks Post-Amputation



Late Bud/Early Palette Stage  
3-6 Weeks Post-Amputation



Early Differentiation Stage  
4-7 Weeks Post-Amputation



Mid Differentiation Stage  
5-8 Weeks Post-Amputation



Late Differentiation Stage  
6-9 Weeks Post-Amputation



"Complete" Regeneration  
7-10 Weeks Post-Amputation

**Transplantace regenerujících končetin mloka demonstrují vývojovou hypotézu „roztřídění buněk na bázi jejich odlišné adhezivity“**

**regenerující pahýl  
přední nohy**

*transplantace*

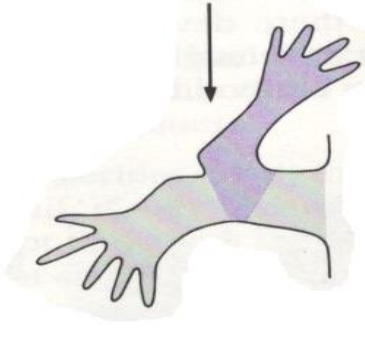
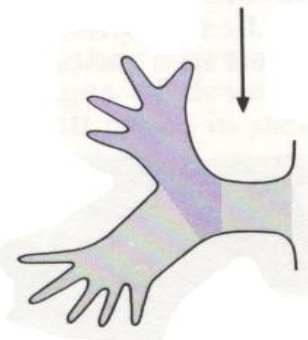
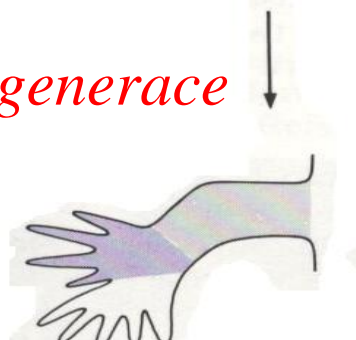
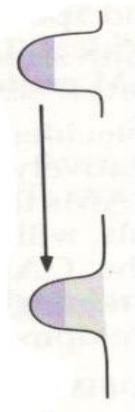
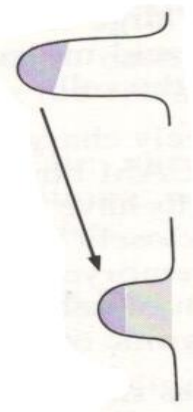
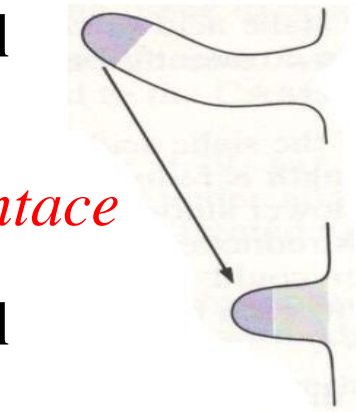
**regenerující pahýl  
zadní nohy**

*regenerace*

blastema  
zápěstí

blastema  
lokte

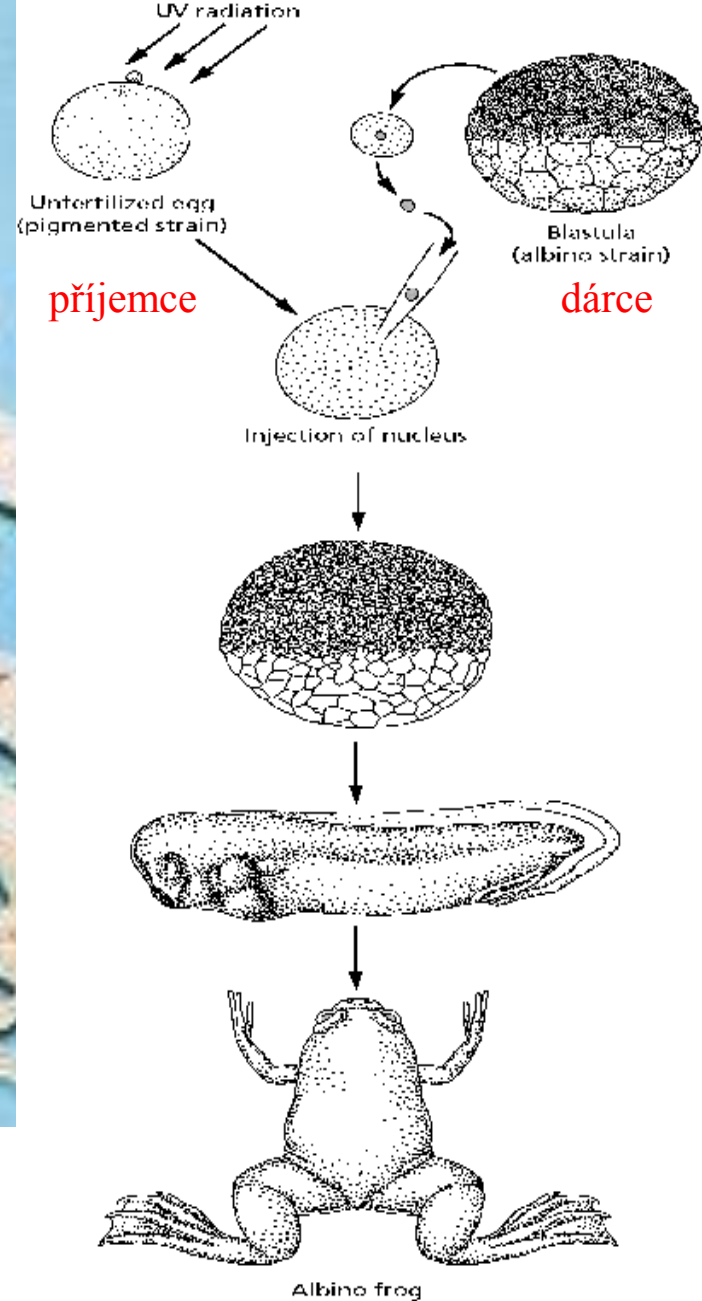
blastema  
paže



zápěstí  
↓  
kotník

loket  
↓  
koleno

paže  
↓  
stehno

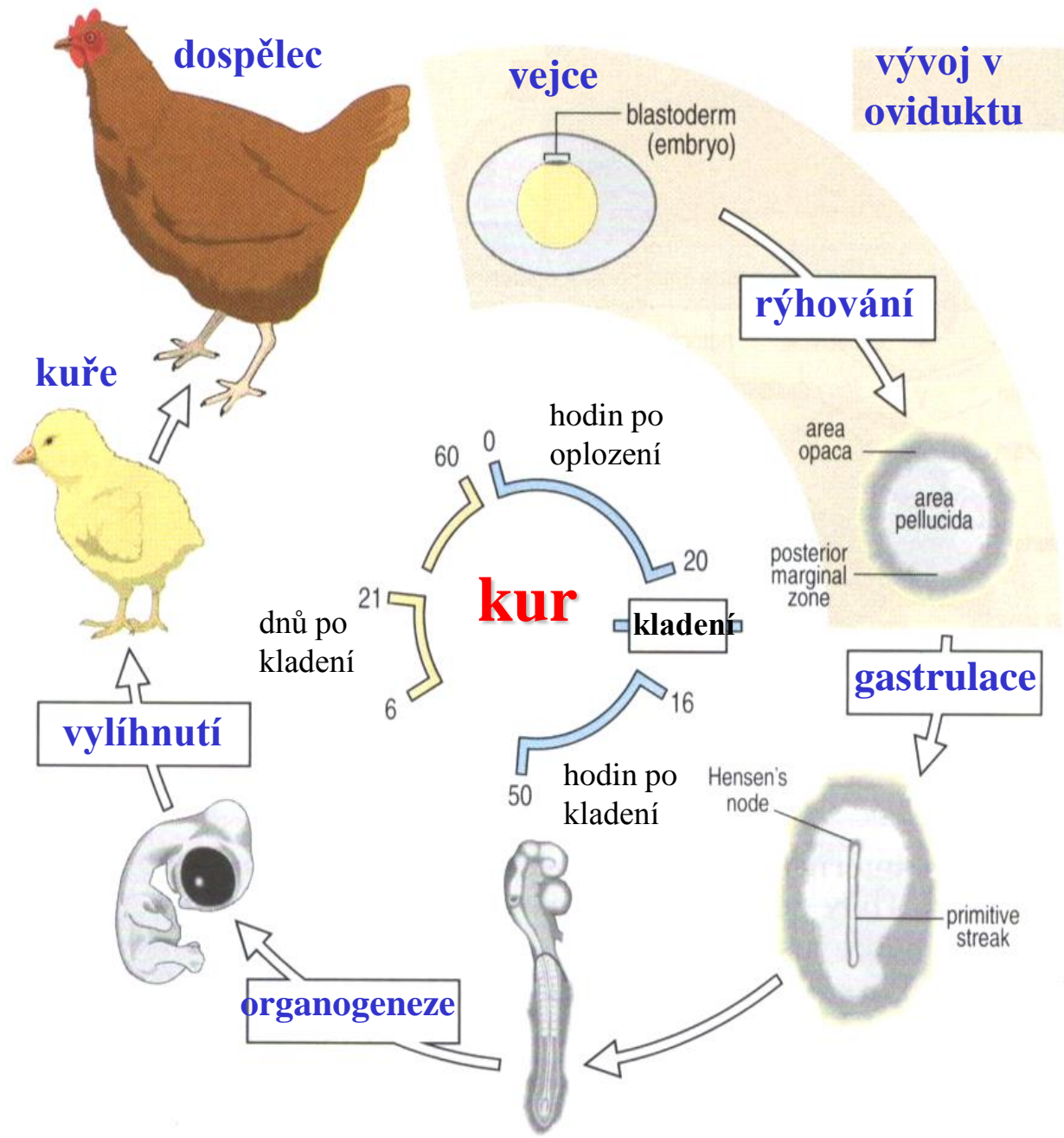
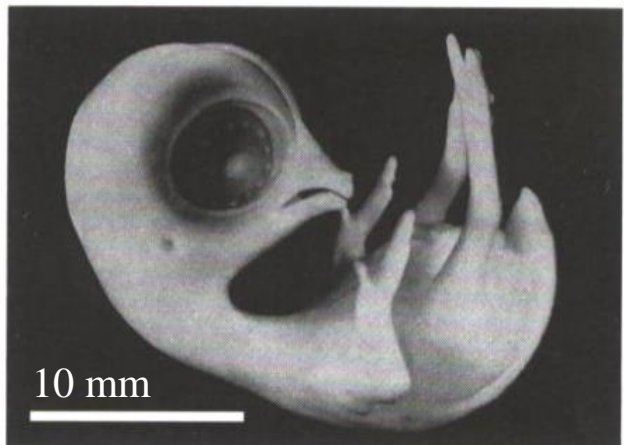
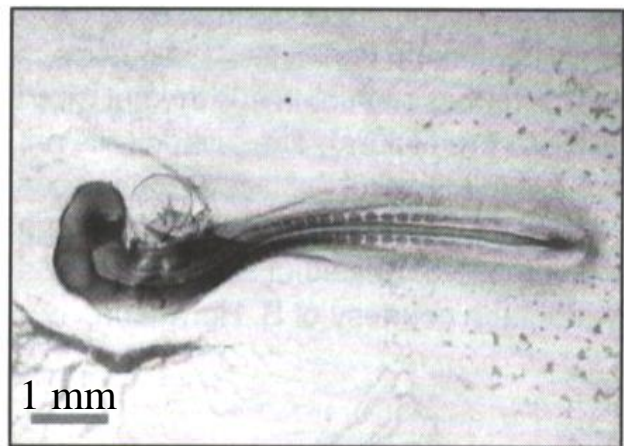
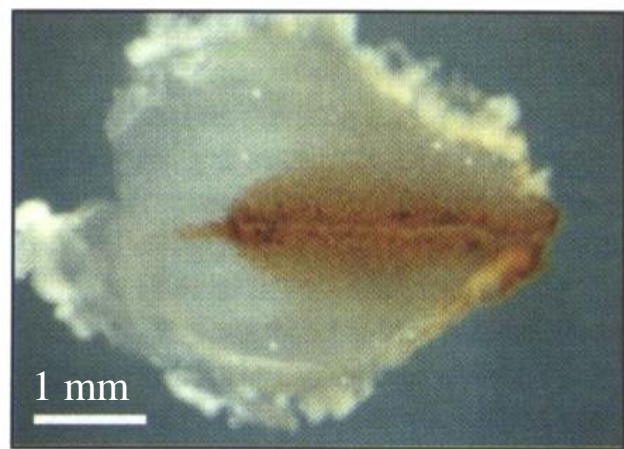


**John Gurdon (Oxford, 1962)**



Poruchy vývoje končetin  
jako indikátor  
teratogenních  
faktorů  
(ekotoxikologie)

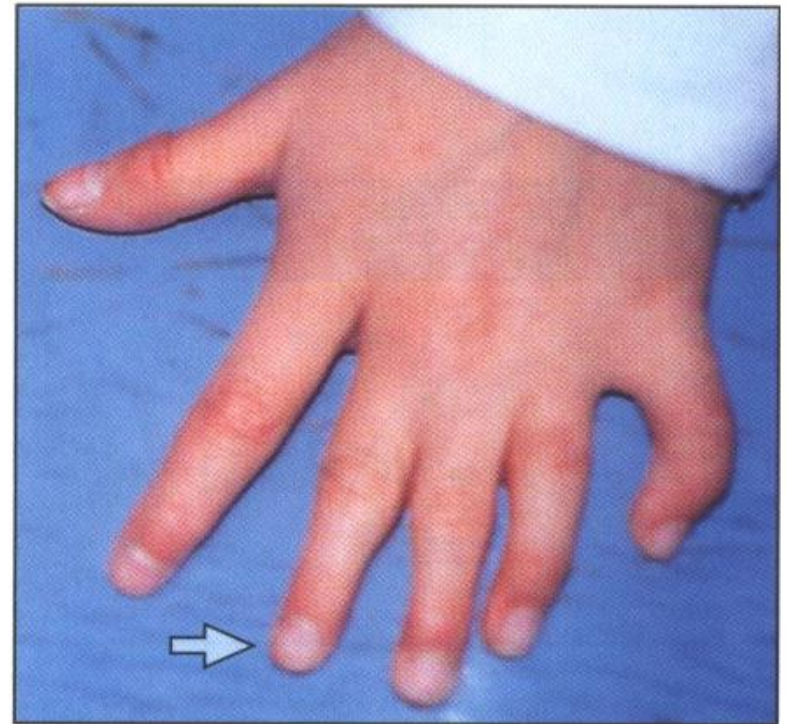
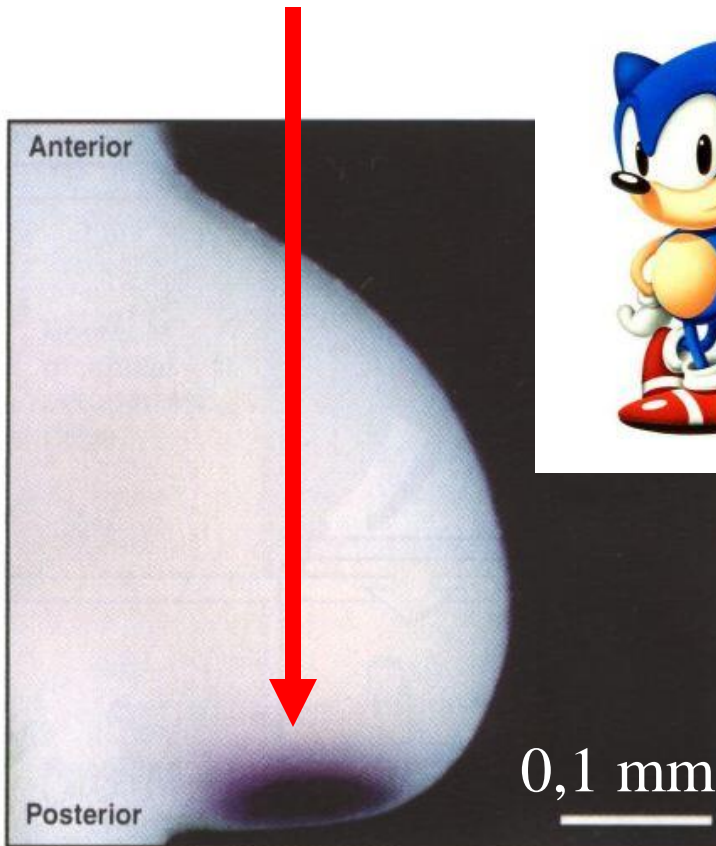






Polarizační oblast pupene specifikuje končetinu podél antero-posteriorní osy

exprese genu *Sonic hedgehog* na posteriorním konci pupene poskytuje poziční signál podél A-P osy



pupen kuřecí končetiny

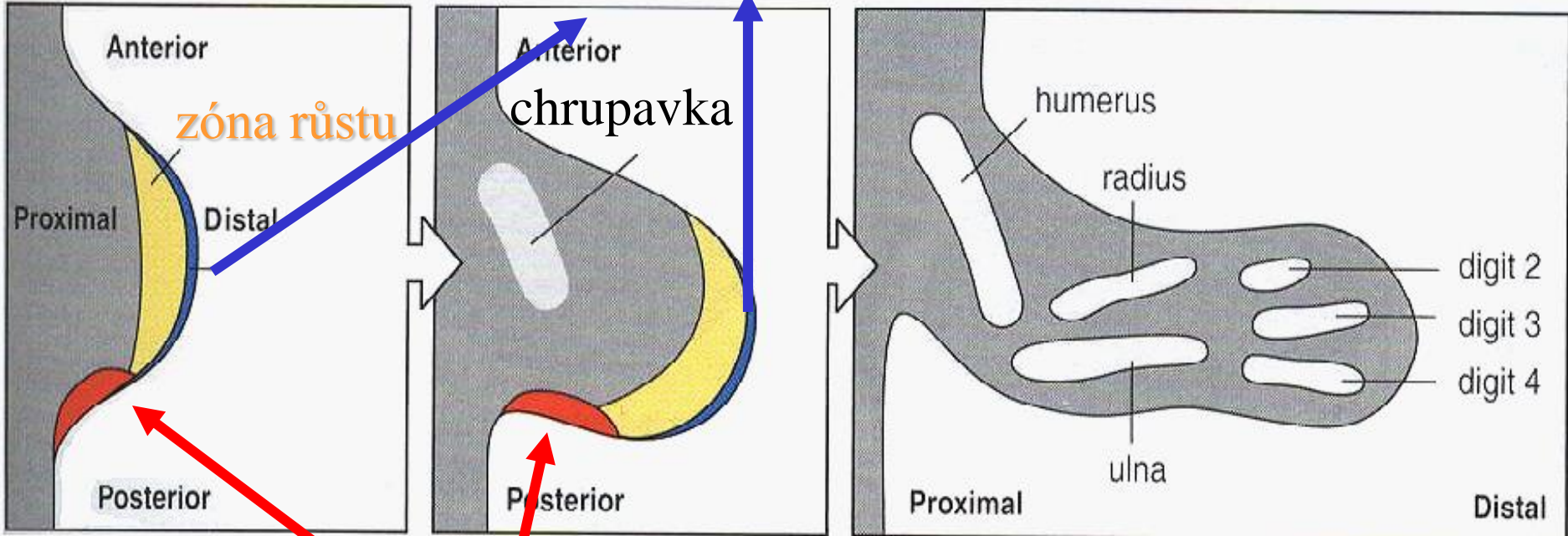
polydaktylie u člověka



# Buňky v růstové zóně vyžadují poziční informaci

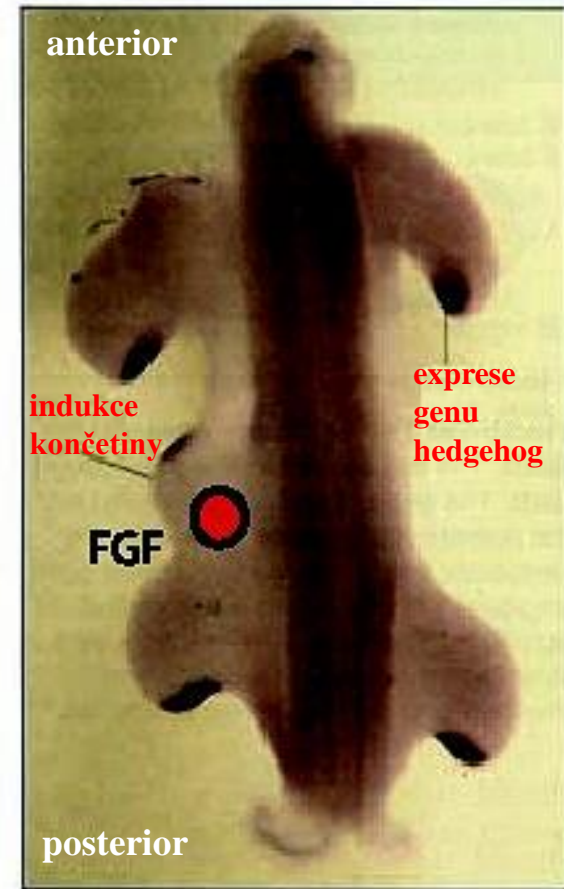
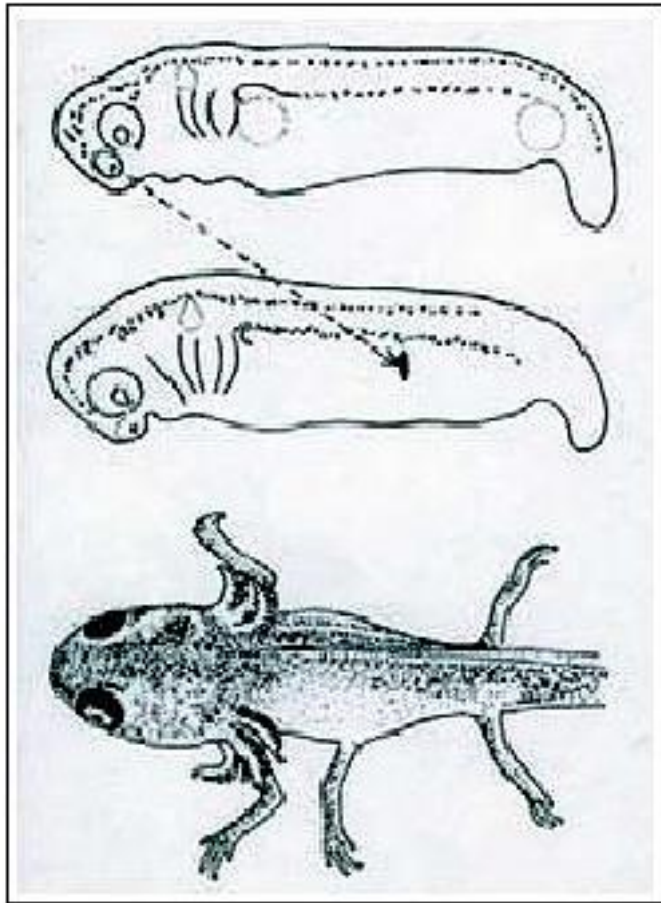
- růstová zóna je specifikována **apikální ektodermální rýhou** na **distálním konci** a **polarizační oblastí** na **posterioru**, buňky od nich posléze získávají poziční hodnotu

apikální ektodermální rýha



polarizační oblast (Sonic hedgehog)

# Pleiotropní funkce jednotlivých signálů

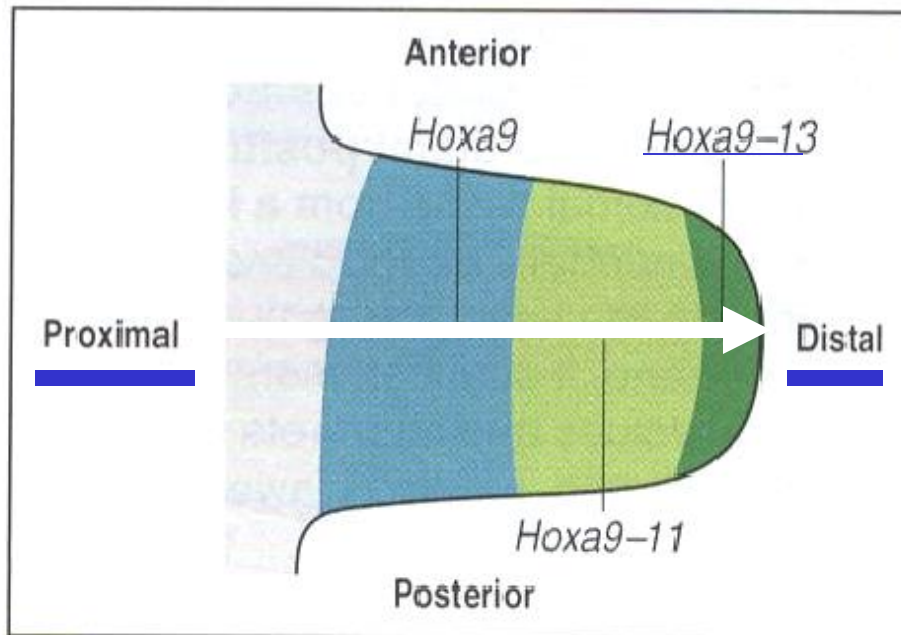


přenos tkáně z anteriorní oblasti hlavy mloka na bok vede ke tvorbě nové končetiny ( Balinsky 1933 )

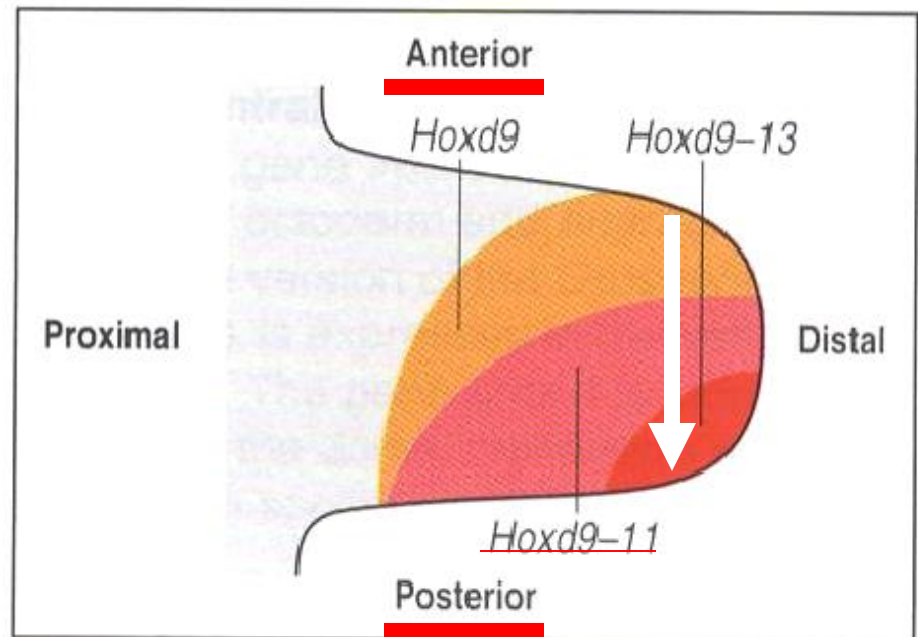
iniciace vývoje končetiny kuřete vyžaduje fibroblastový růstový faktor, který aktivuje expresi genu hedgehog, aplikace FGF do boku embrya vede ke tvorbě extra – končetiny ( Arias 2003 )

# Expresce homeotických genů v pupenu křídla kuřete

*Hox-a* geny jsou exprimovány podél proximo-distální osy :  
*Hox-a 13* je nejdistančnější



*Hox-d* geny jsou exprimovány podél antero-posteriorní osy :  
*Hox-d 13* je nezádnější

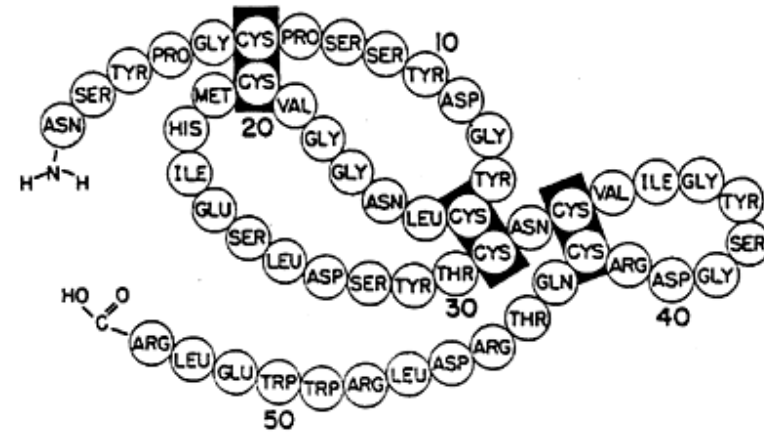
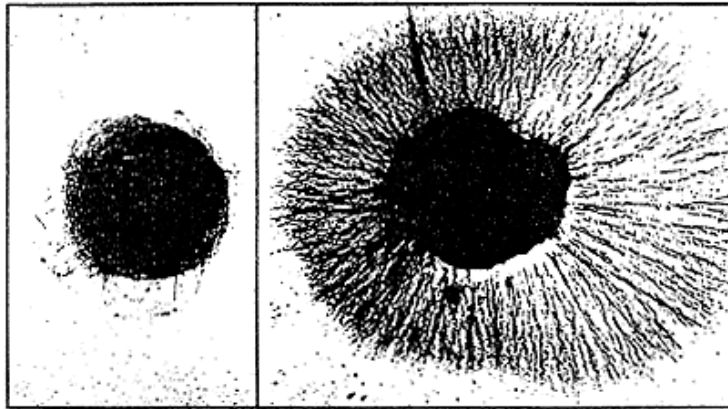




# RŮSTOVÉ FAKTORY (GF) ŽIVOČICHŮ

- PROTEINY produkované určitými buňkami do okolí
- řídí RŮST a DIFERENCIACI (morfogeny, onkogeny)
- vážou se na TRANSMEMBRÁNOVÉ RECEPTORY, což vyvolává biochemické změny (časté fosforylace, tj. kinázy) vedoucí k aktivaci či supresi specifických genů
- tyto metabolické kroky mezi receptorem a cílovými geny se označují jako SIGNÁLNÍ DRÁHA (kaskáda)
- známo asi 200 GF: cytokiny, hedgehog, interleukiny, interferony, nervový, epidermální, krevních destiček, hematopoetické, kostní morfogenetický protein (BMP), Wnt (wingless-integrin)

# O dělení a diferenciaci buněk i tkáně rozhodují proteinové morfogeny - **RŮSTOVÉ FAKTORY**

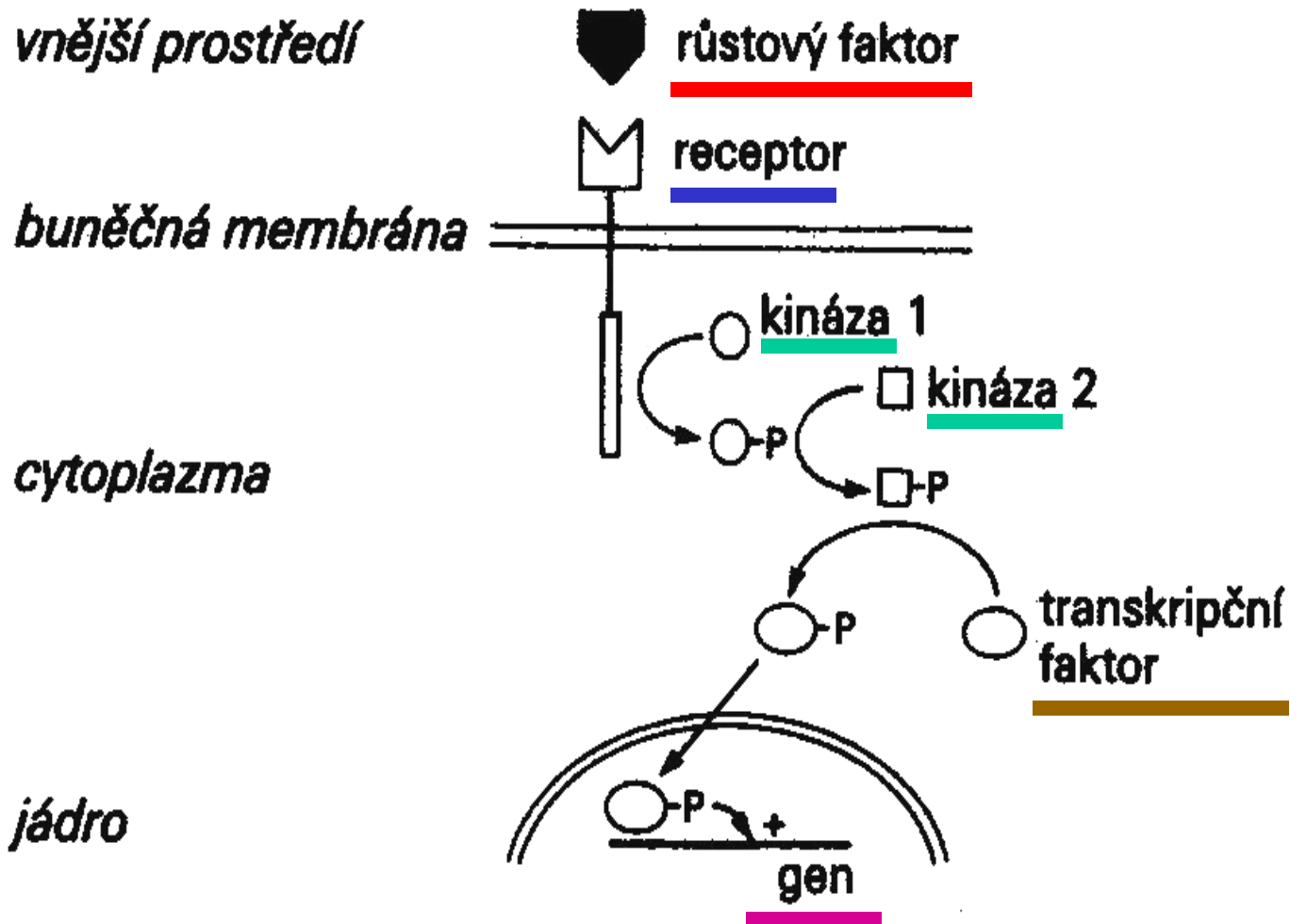


Rita Levi-Montalcini  
(Itálie 1909) ... nervový NGF

**Nobelova cena ve fyziologii (1986)  
... za objevy růstových faktorů**



Stanley Cohen  
(USA 1922) ... epidermální EGF



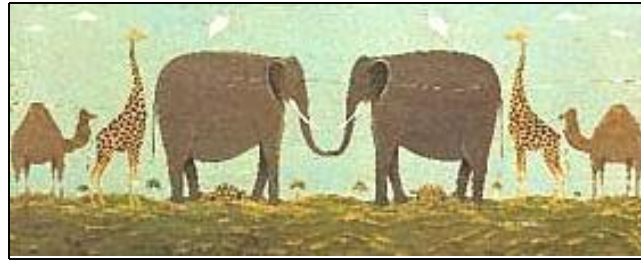
Mechanismus účinku typického růstového faktoru. Jen fosforylovaná forma každého enzymu může fosforylovat další článek řetězu (P-fosfátová skupina).



**Savci:**

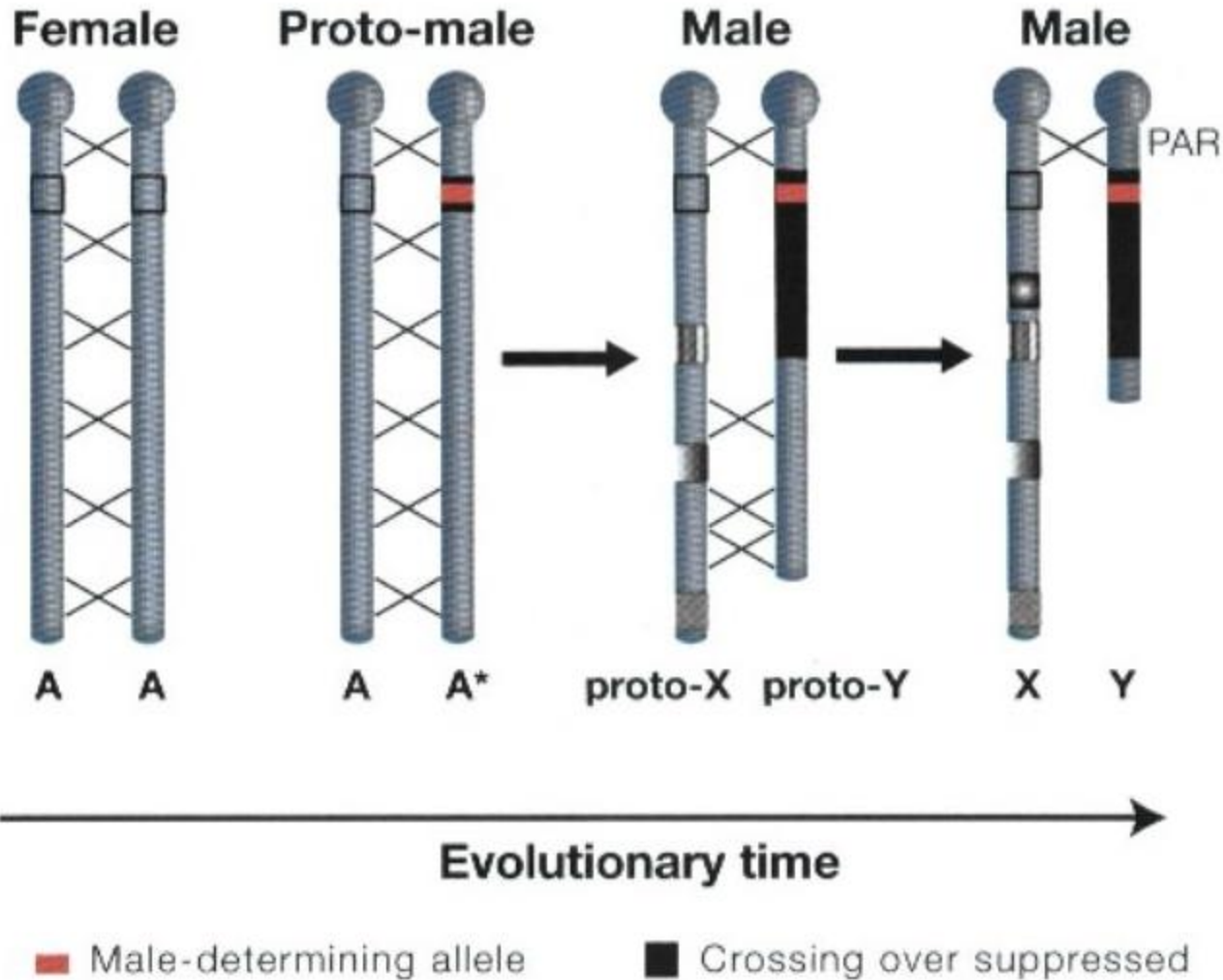
kompensace dávky X-vázaných genů

# Úlohy pohlavnosti v životě eukaryot :



- ⊖ meiosa a kombinace gamet zajišťují evolučně výhodnou heterozygotnost a variabilitu
- ⊖ diferenciace zárodečné dráhy a příslušných gamet (včetně tvorby pohlavních orgánů)
- ⊖ pohlavně specifický vývin somatických buněk (pohlavní dimorfismus)
- ⊖ řízení transkripčních hladin chromosomů X (umlčování či zesilování exprese vázaných genů)
- ⊖ metylační nastavení gametického imprintingu - záznamu o expresi genů v příští filiální generaci

# Evoluce pohlavního chromozomu Y



Časně v evoluci se pohlaví lišila pouze v jediném autozomálním lokusu – heterozygotní proto-male a homozygotní proto-female. K zabránění vzniku intersexů dochází k supresi cross-overu a akumulaci mutací kolem male-determinující alely. Nerekominující oblast degeneruje (ztrácí geny), pseudoautosomální oblast zůstává aktivní.



# KOMPENZACE DÁVKY GENŮ



*Drosophila*

XX

X<sub>Y</sub>

savci

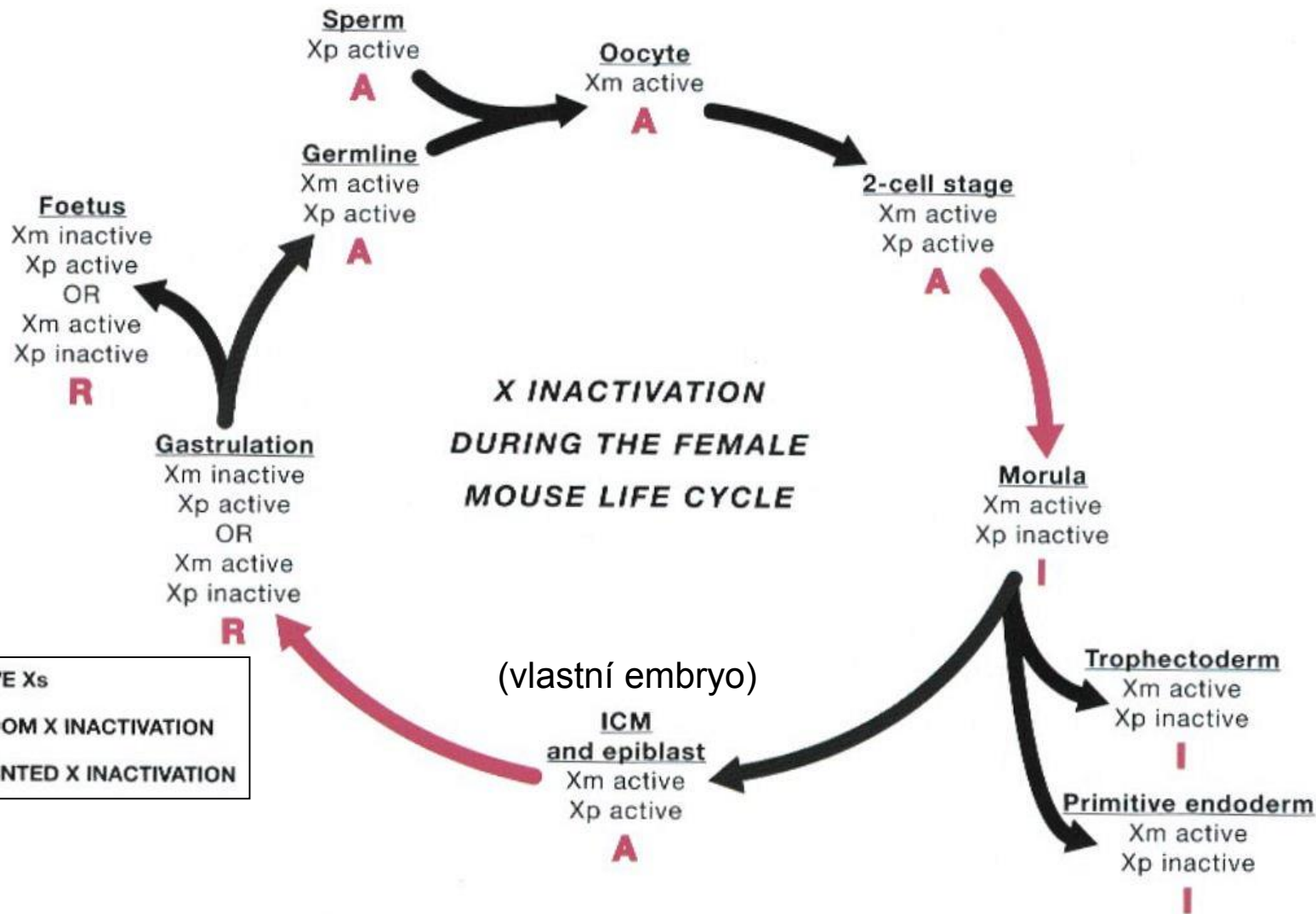
XX nebo XX

XY

*C-elegans*

XX (hermafrodit)

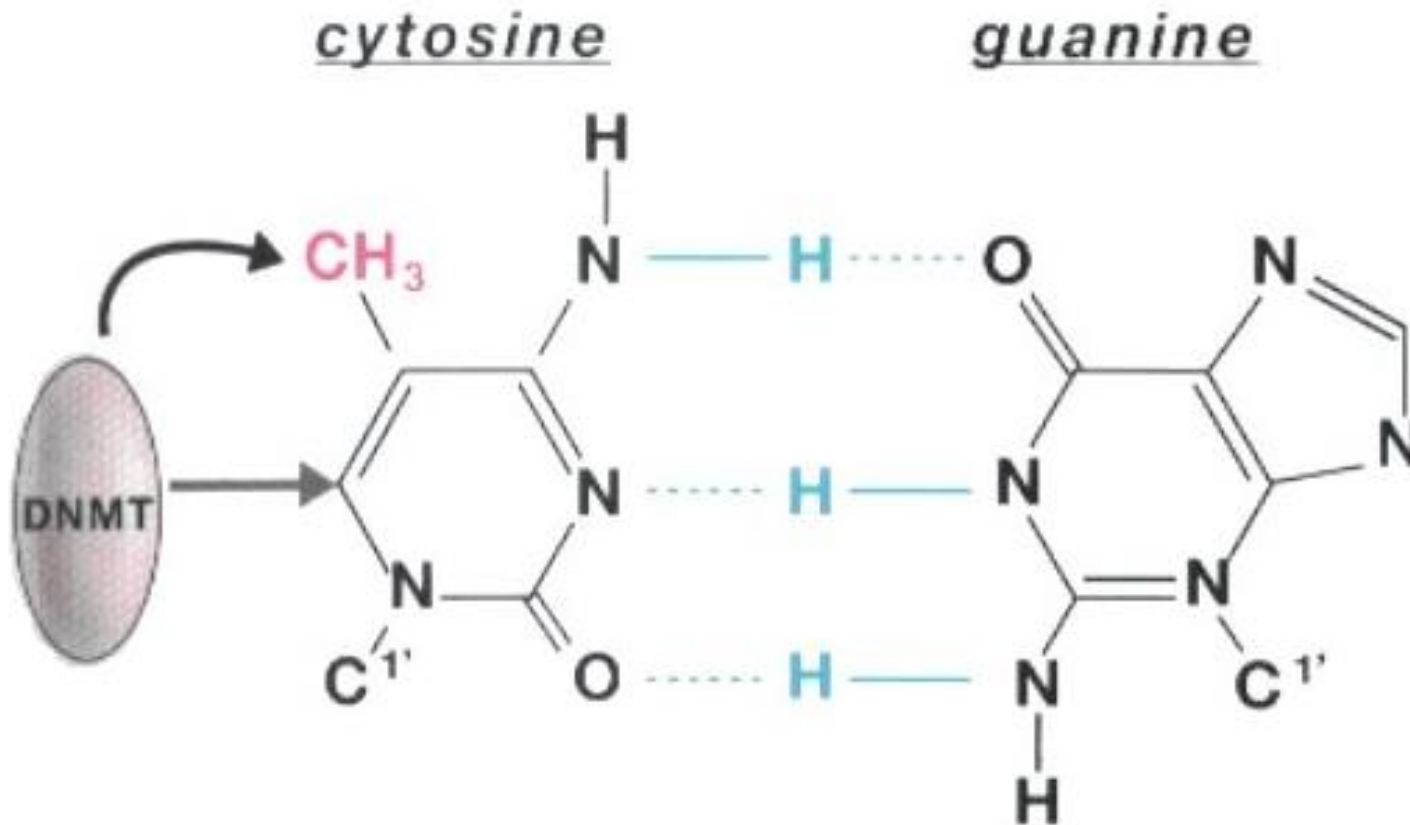
XO



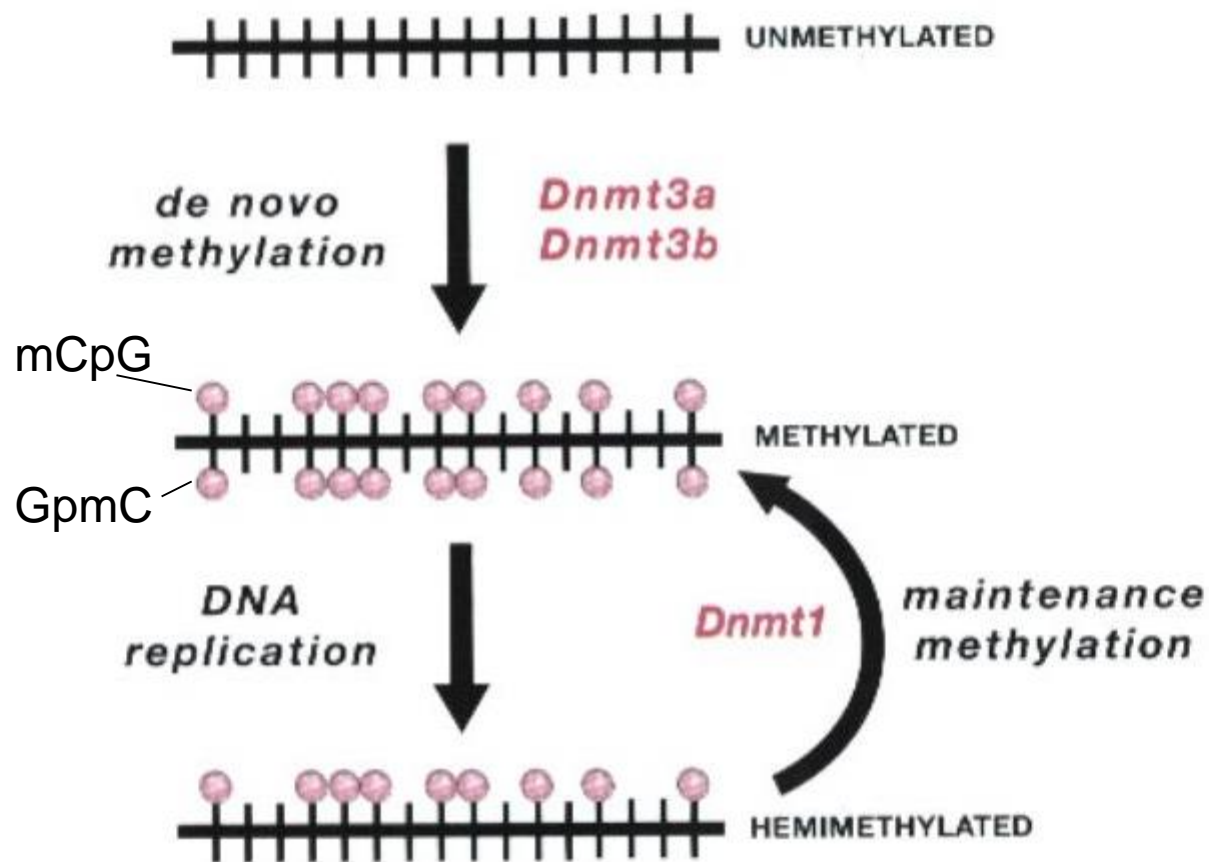
V průběhu samičího vývoje se chromozom X podrobuje inaktivaci (**R** nebo **I**) a reaktivaci (**A**). Inaktivace se nejdříve odehrává v časném preimplantovaném embryu (imprinting) a následně v buňkách epiblastu v době gastrulace (náhodná inaktivace). Inaktivní X je reaktivován především v zárodečné dráze.

Savci:  
metylace DNA





Adice metylové skupiny do 5-pozice pyrimidinového kruhu cytozinu prostorově nebrání párování bazí (GC). DNA metyltransferázy se v průběhu metylace kovalentně vážou na C-6-pyrimidinu.



## De novo a udržovací metylace DNA

Nemetylovaná DNA se stává **de novo metylovanou** aktivitou DNA metyltransferáz **Dnmt3a a Dnmt3b** za vzniku symetrické metylace CpG párů. Po semikonzervativní replikaci DNA je metylováno pouze parentální vlákno a symetrické metylace je dosaženo účinkem **udržovací DNA metyltransferázy (Dnmt1)**.

## Functions of mammalian DNA methyltransferases

DNA methyltransferase	Species	Major activity	Major phenotypes of loss-of-function mutations
Dnmt1	mouse	maintenance methylation of CpG	genome-wide loss of DNA methylation, embryonic lethality at embryonic day 9.5 (E9.5), abnormal expression of imprinted genes, ectopic X-chromosome inactivation, activation of silent retrotransposon
Dnmt2	mouse	weak activity	no change in CpG methylation, no obvious developmental phenotypes
Dnmt3a	mouse	de novo methylation of CpG	postnatal lethality at 4–8 weeks, male sterility, and failure to establish methylation imprints in both male and female germ cells
Dnmt3b	mouse	de novo methylation of CpG	demethylation of minor satellite DNA, embryonic lethality around E14.5 days with vascular and liver defects (embryos lacking both Dnmt3a and Dnmt3b fail to initiate de novo methylation after implantation and die at E9.5)
<b>DNMT3B</b>	human	de novo methylation of CpG	ICF syndrome: immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies, loss of methylation in repetitive elements and pericentromeric heterochromatin

Dysfunkce de novo DNA metyltransferázy vede k I(munodeficiency)-C(entromerická nestabilita)-F(aciální abnormality) syndromu

### ICF syndrome

From Wikipedia, the free encyclopedia

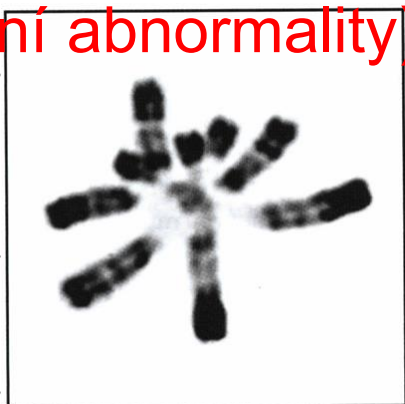
**ICF syndrome** (or **Immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome**)

#### Genetics

ICF syndrome can be caused by a [mutation](#) in the DNA-methyltransferase-3b (*Dnmt3b*) [gene](#).<sup>[1]</sup>

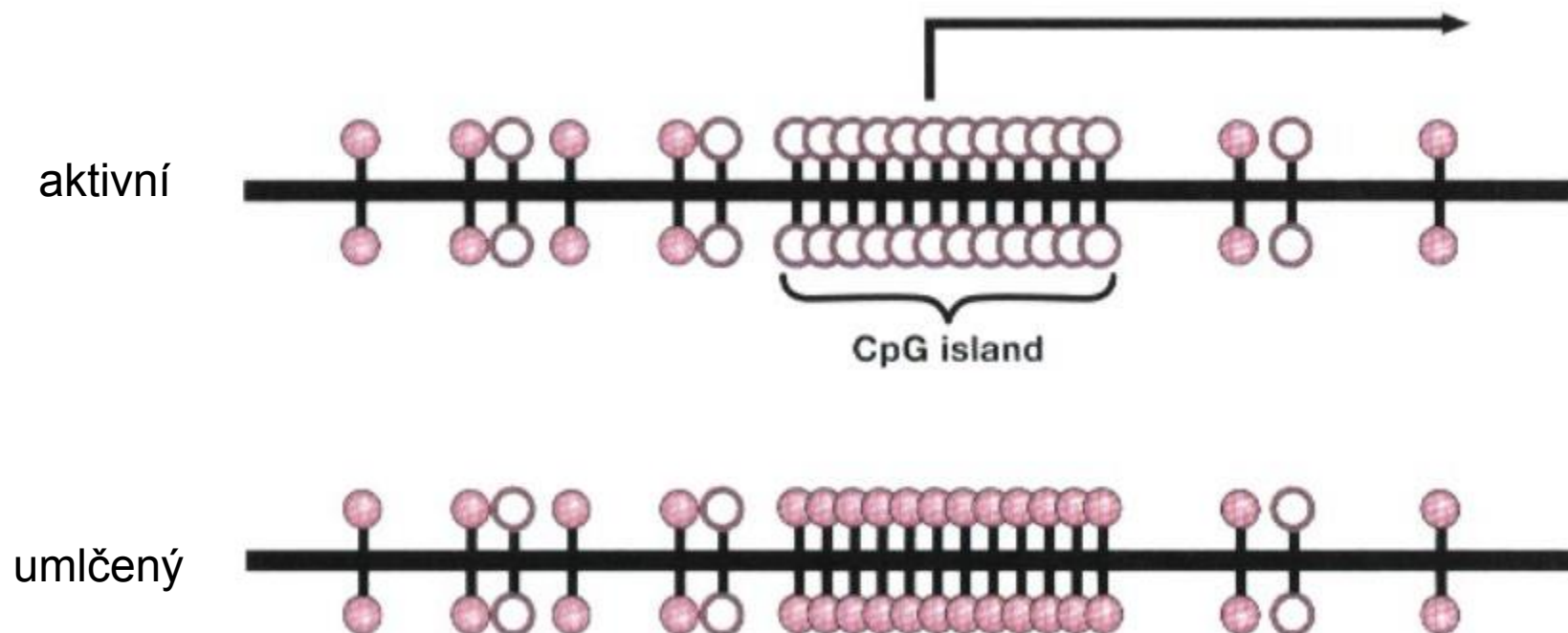
#### Presentation

It is characterized by variable reductions in [serum immunoglobulin](#) levels which cause most ICF patients to succumb to [infectious diseases](#) before [adulthood](#). ICF syndrome patients exhibit [facial anomalies](#) which include [hypertelorism](#), [low-set ears](#), [epicanthal folds](#) and [macroglossia](#).

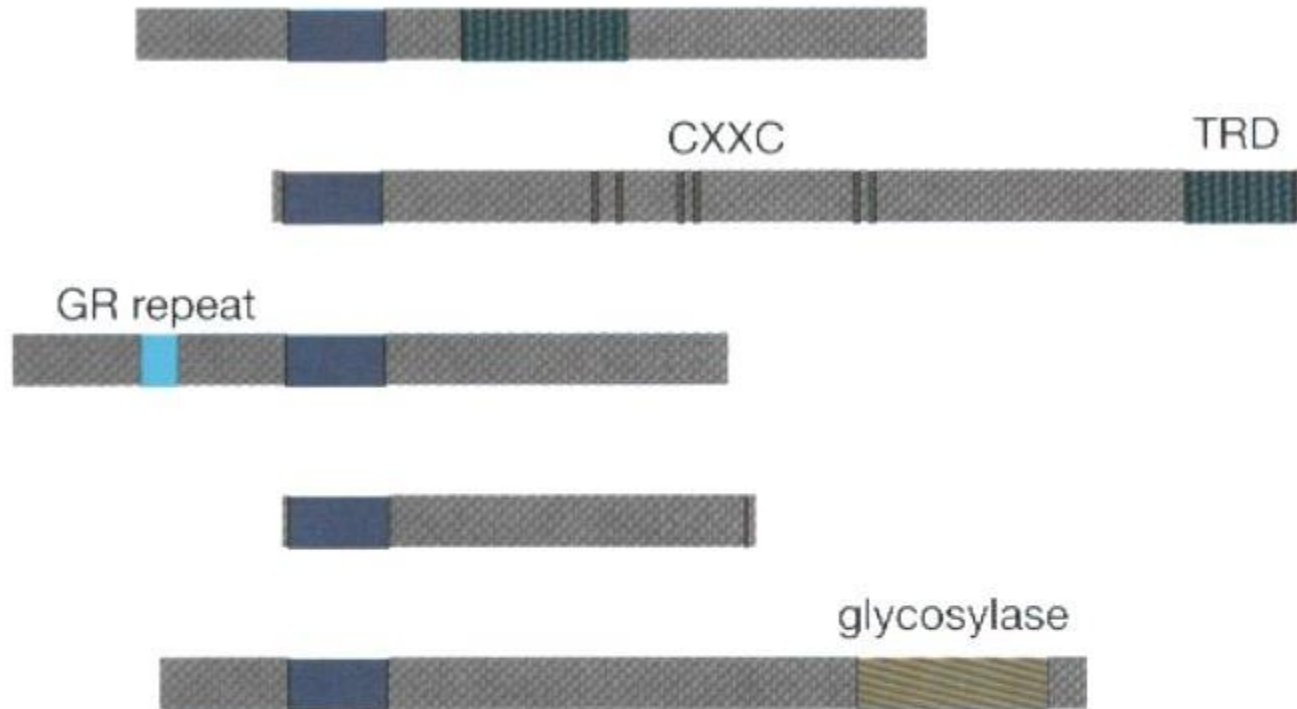


immune disorder.





**CpG ostrovy jsou oblasti s vysokou denzitou dinukleotidu CpG, které postrádají metylaci. Nacházejí se v promotorech většiny lidských genů. Dlouhodobé umlčení genu může být zajištěno metylací této oblasti: některé imprintované geny, geny na inaktivním chromozomu X, aberantní umlčování genů v nádorových buňkách.**



## Proteiny specificky se vážící na metylovanou DNA (CpG)

Pět členů rodiny MBD (methylbinding-domain DNA) proteinů jsou seřazeny podle své konzervativní **MBD domény**.

Jiné domény zahrnují například TRD (transkripční represní doménu) aj.

## Functions of methyl-CpG-binding proteins

MBP	Major activity	Species	Major phenotypes of loss-of-function mutations
MeCP2	binds mCpG with adjacent A/T run; transcriptional repressor	mouse	delayed onset neurological defects including inertia, hindlimb claspings, nonrhythmic breathing, and abnormal gait; postnatal survival ~10 weeks
MECP2	binds mCpG with adjacent AT run; transcriptional repressor	human	heterozygotes suffer from <b>Rett syndrome</b> , a profound neurological disorder characterized by apraxia, loss of purposeful hand use, breathing irregularities, and microcephaly
Mbd1	binds mCpG via MBD; a major splice form is also able to bind CpG via a CxxC domain	mouse	no overt phenotype, but subtle defects in neurogenesis detected
Mbd2	binds mCpG; transcriptional repressor	mouse	viable and fertile, but show reduced maternal nurturing behavior; defective gene regulation in T-helper-cell differentiation leading to altered response to infection; highly resistant to intestinal tumorigenesis
Mbd3	core component of NuRD co-repressor complex; does not show strong binding to mCpG	mouse	early embryonic lethal
Mbd4	DNA repair protein that binds mCpG and T:G mismatches at mCpG sites; thymine DNA glycosylase that excises T from T:G mismatches	mouse	viable and fertile; three- to fourfold increase in mutations at CpG sites; increased susceptibility to intestinal cancer correlates with C-to-T transitions within the Apc gene; Mbd4 functions to minimize the mutability of 5-methylcytosine



Rettův syndrom je způsoben mutací X-vázaného genu kódujícího 5-mC-vazebný protein (transkripční represor)