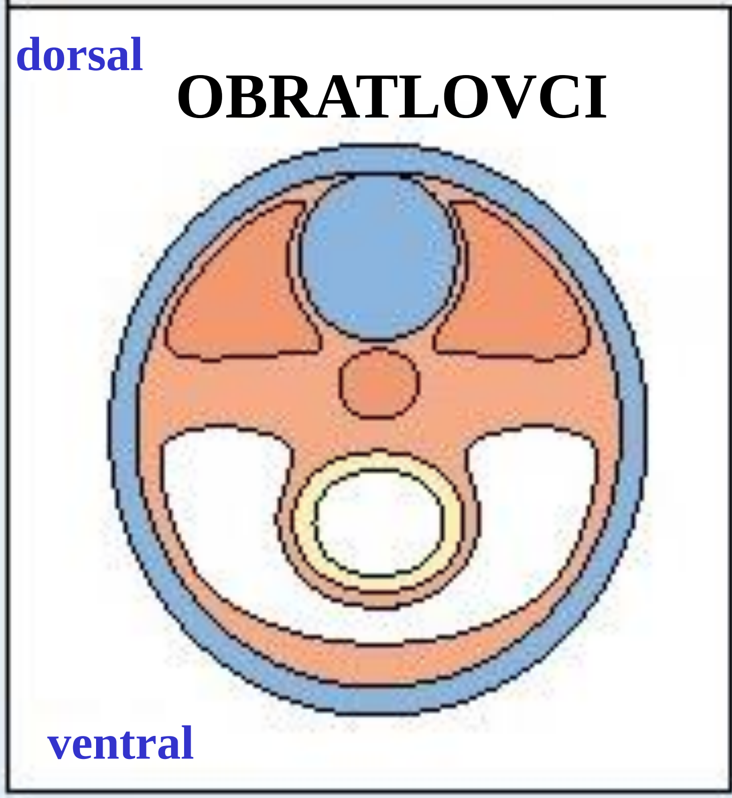
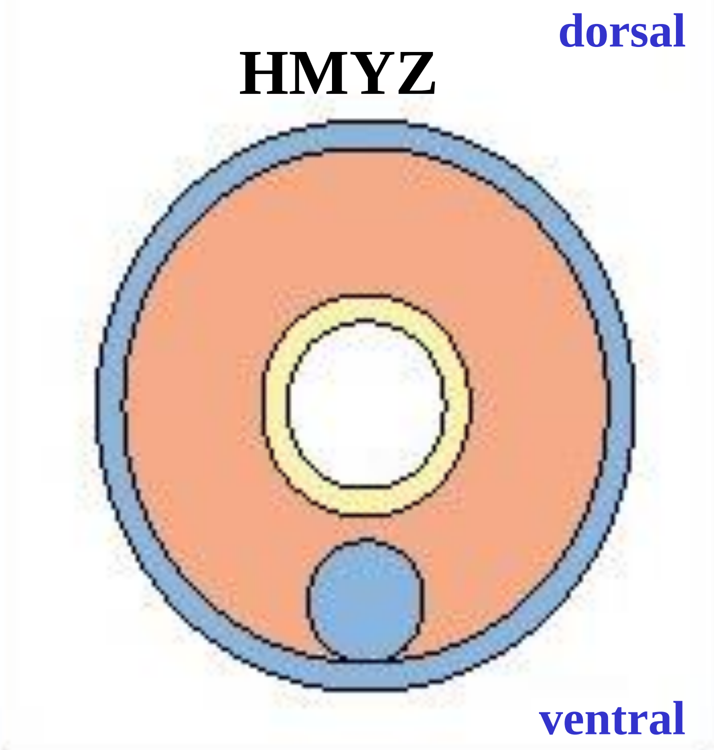
zárodečné listy

OBRATLOVCI

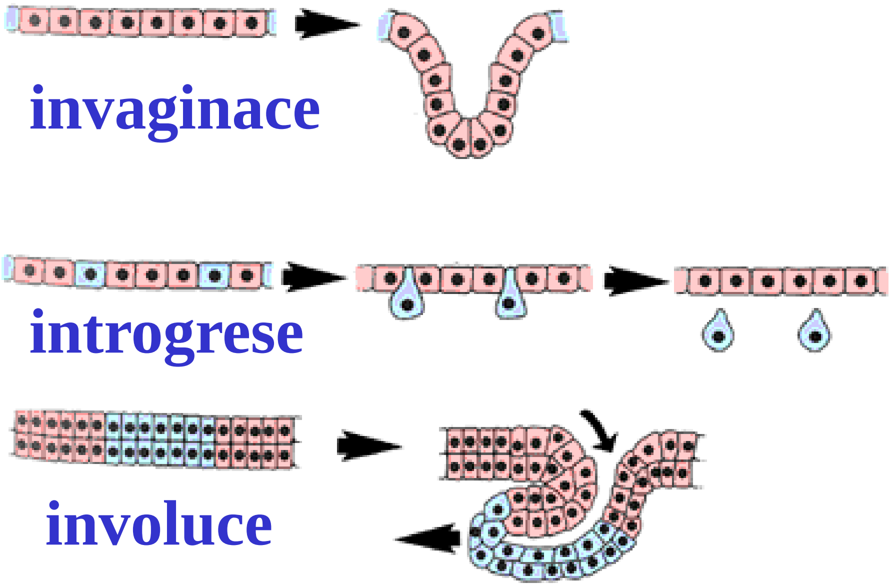


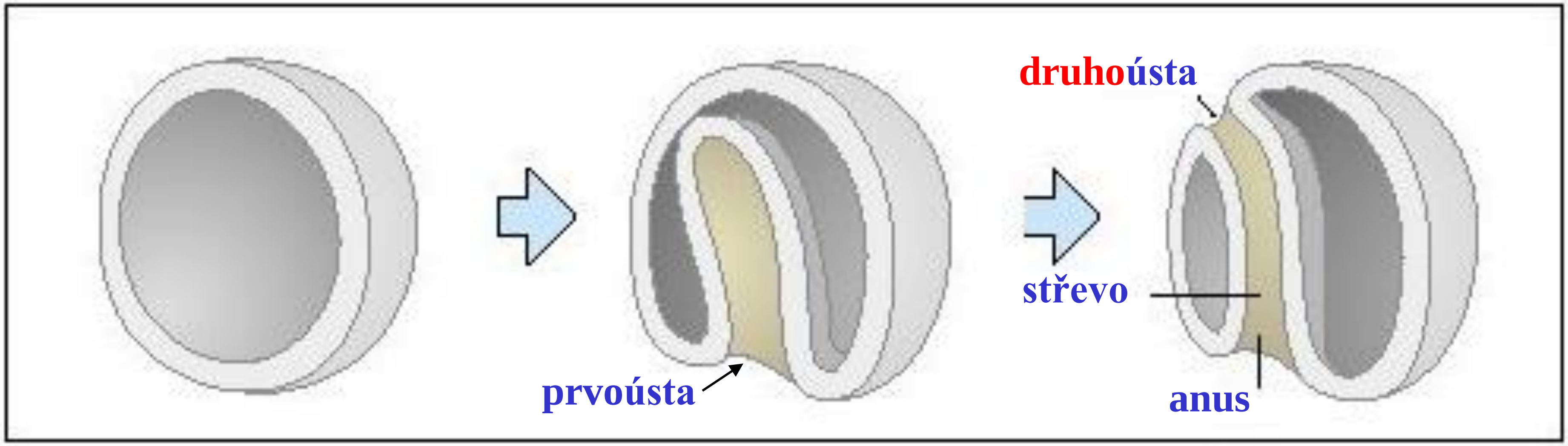
HMYZ



zárodečné listy	orgány :	
endoderm	střevo, játra, plíce	střevo
mesoderm	skelet, svaly, ledviny, srdce, krev	svaly, srdce, krev
ektoderm	pokožka, nervový systém	kutikula, nervový systém

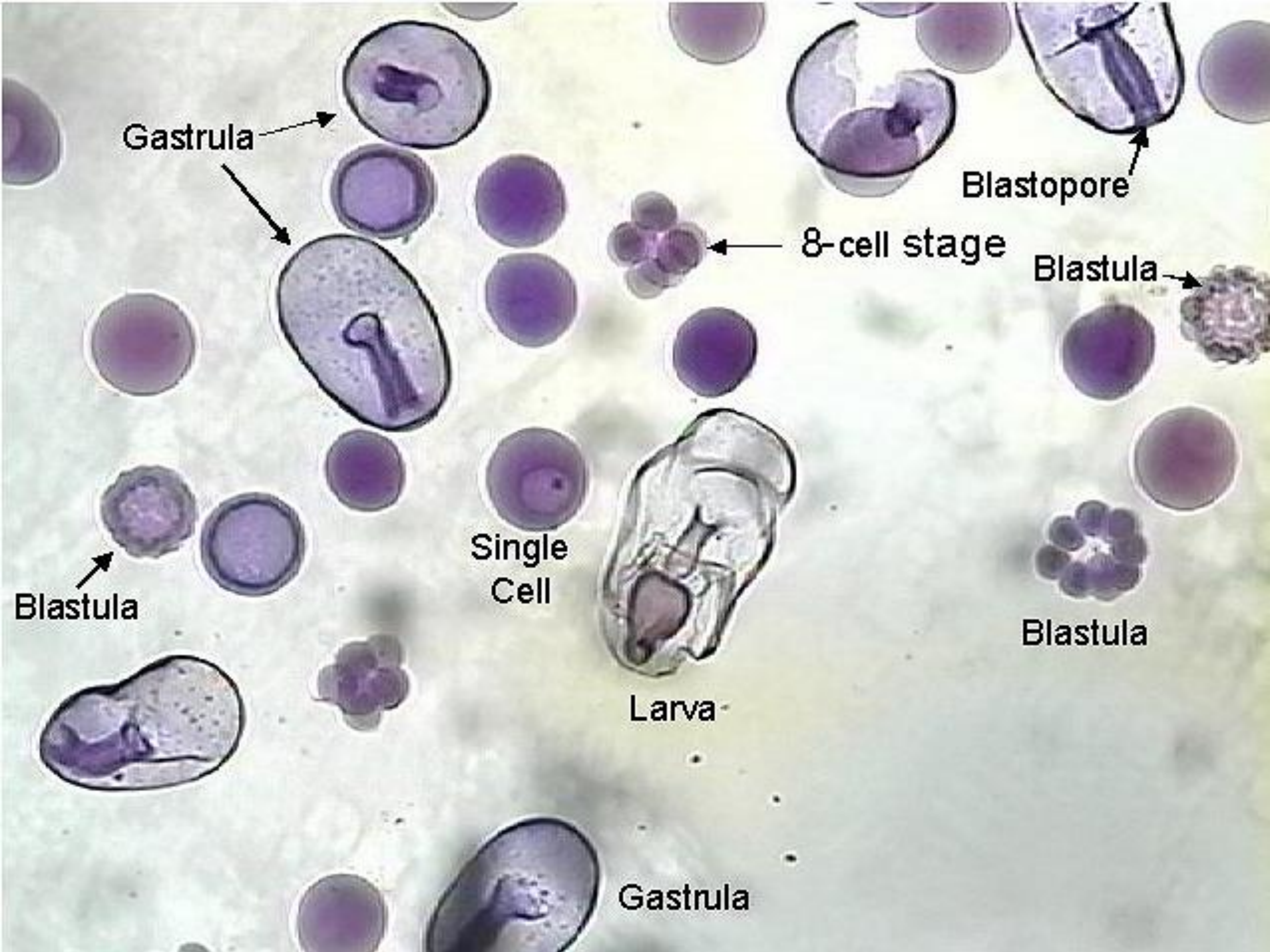
GASTRULACE - klíčové stádium diferenciace



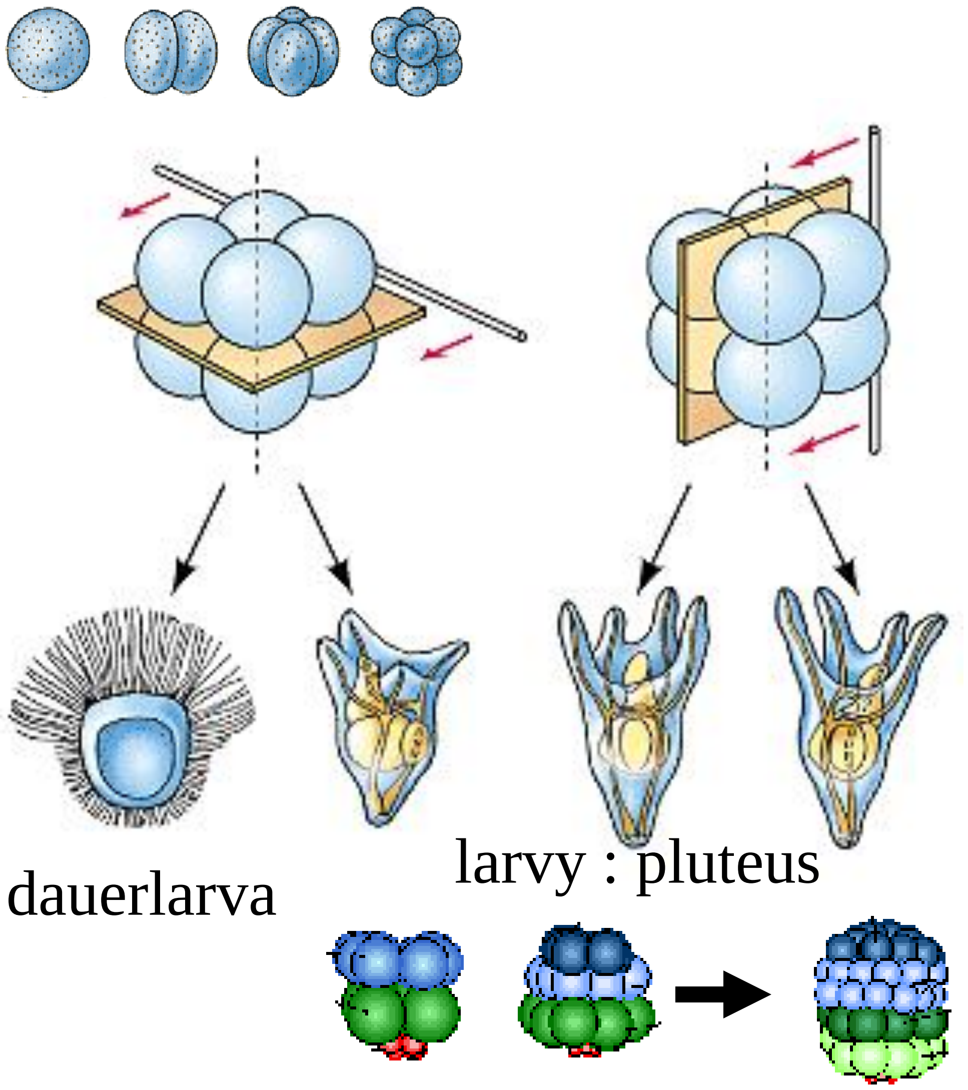


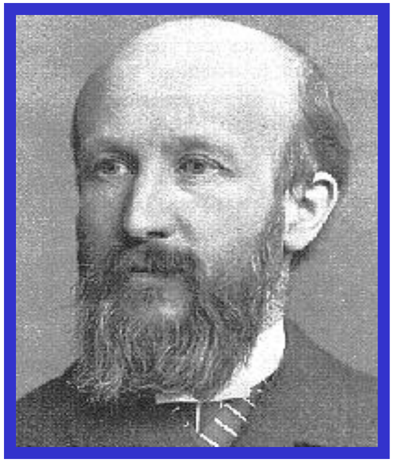
mořská ježovka: při gastrulaci vznikají invaginací prvoústa, která posléze prolomí otvor k „druhým“ ústům

ježovka

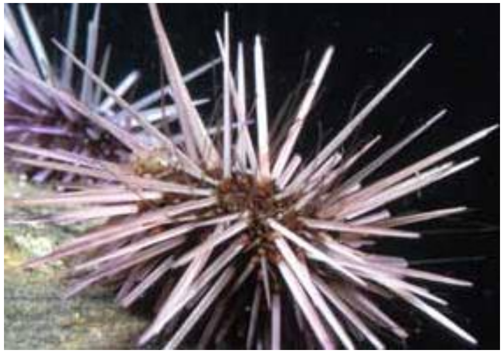

Gastrula
Blastopore
8-cell stage
Blastula
Blastula
Single Cell
Blastula
Larva
Gastrula

Mořská ježovka : historický model fertilizace, embryologie a buněčného klonování



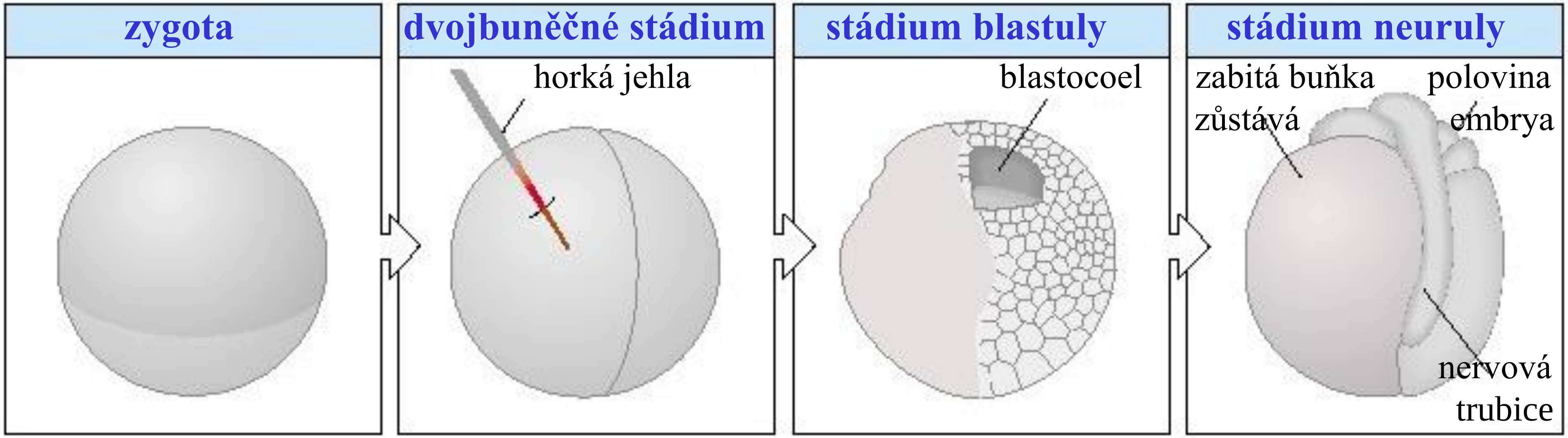


Oscar Hertwig
(1849-1922)



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 …

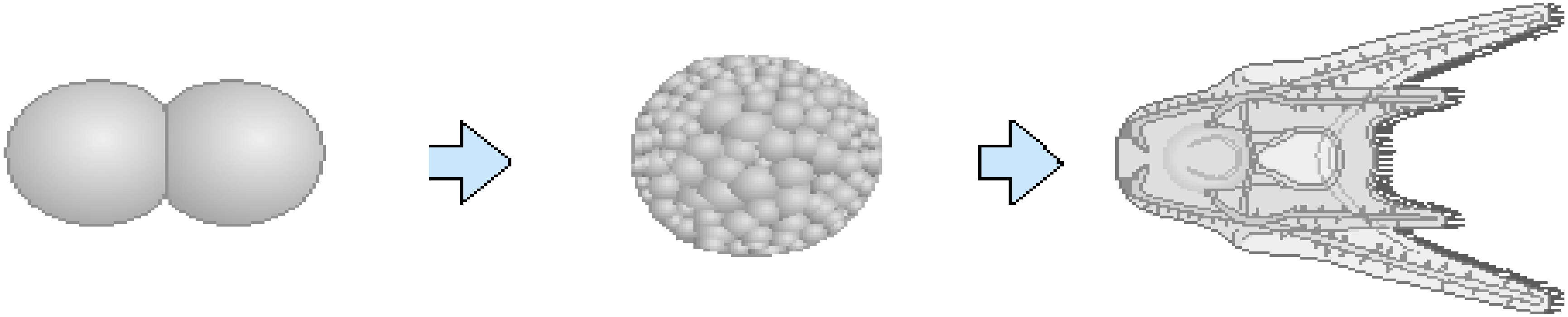
Popření teorie mozaikového vývoje i mechanicismu :

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

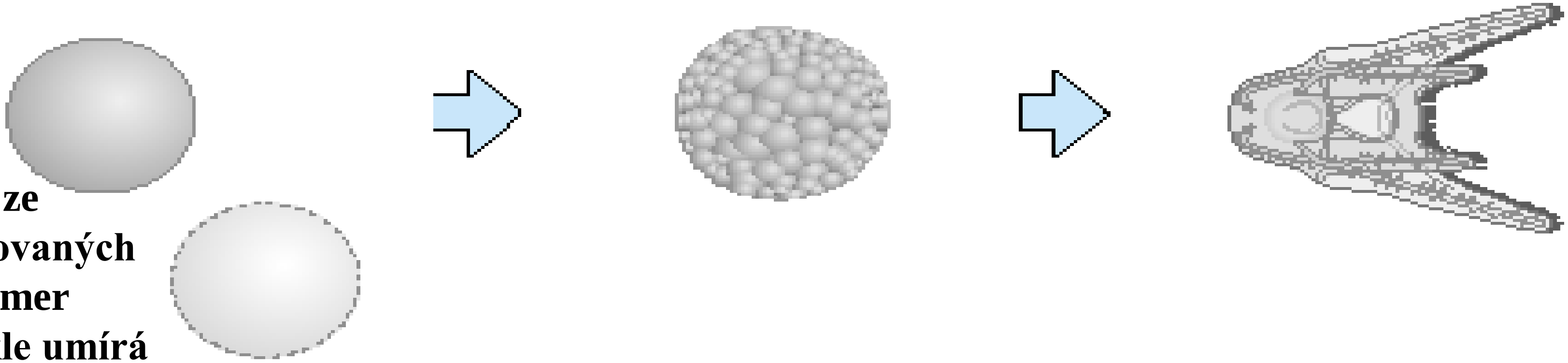
… organismy (embrya) mají schopnost regulace …

Hans Driesch (1876-1941)

normální vývoj larvy ježovky ze stádia dvou blastomer



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

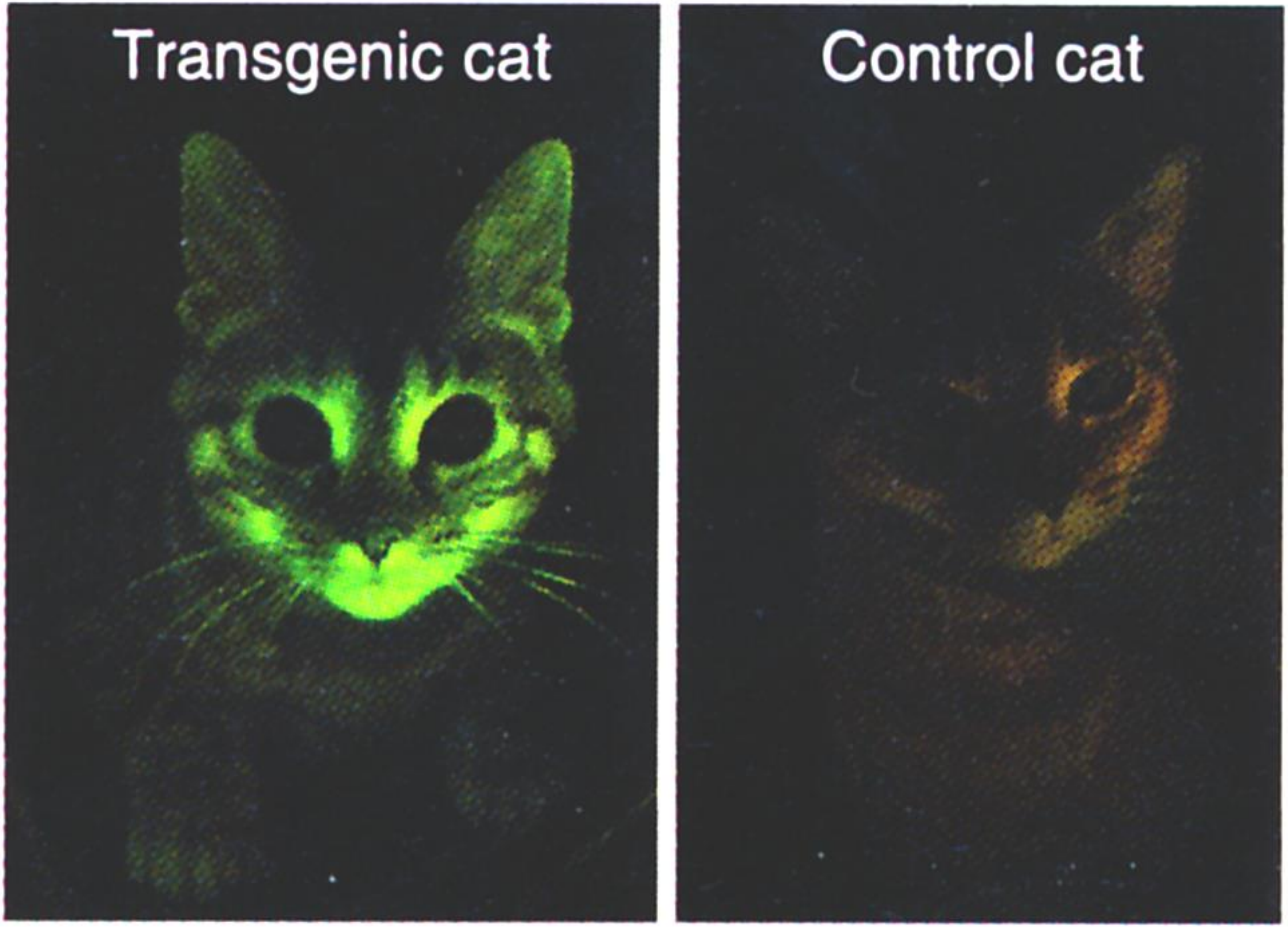


jedna ze separovaných blastomer obvykle umírá

… v hlavní roli :

obratlovci

5 months



… v hlavní roli :

zebřička

The Fish
(Danio rerio)

Small, tropical zebrafish, native to southeast Asia, have been recruited relatively recently from the pet shop and into the lab. They are easy to look after and breed prodigiously. External fertilization allows easy genetic manipulation and analysis, and the embryo is optically transparent. In addition, the availability of a vast storehouse of mutations means that this model will provide insights into developmental processes for years to come.

Stats

Size: 3 cm long

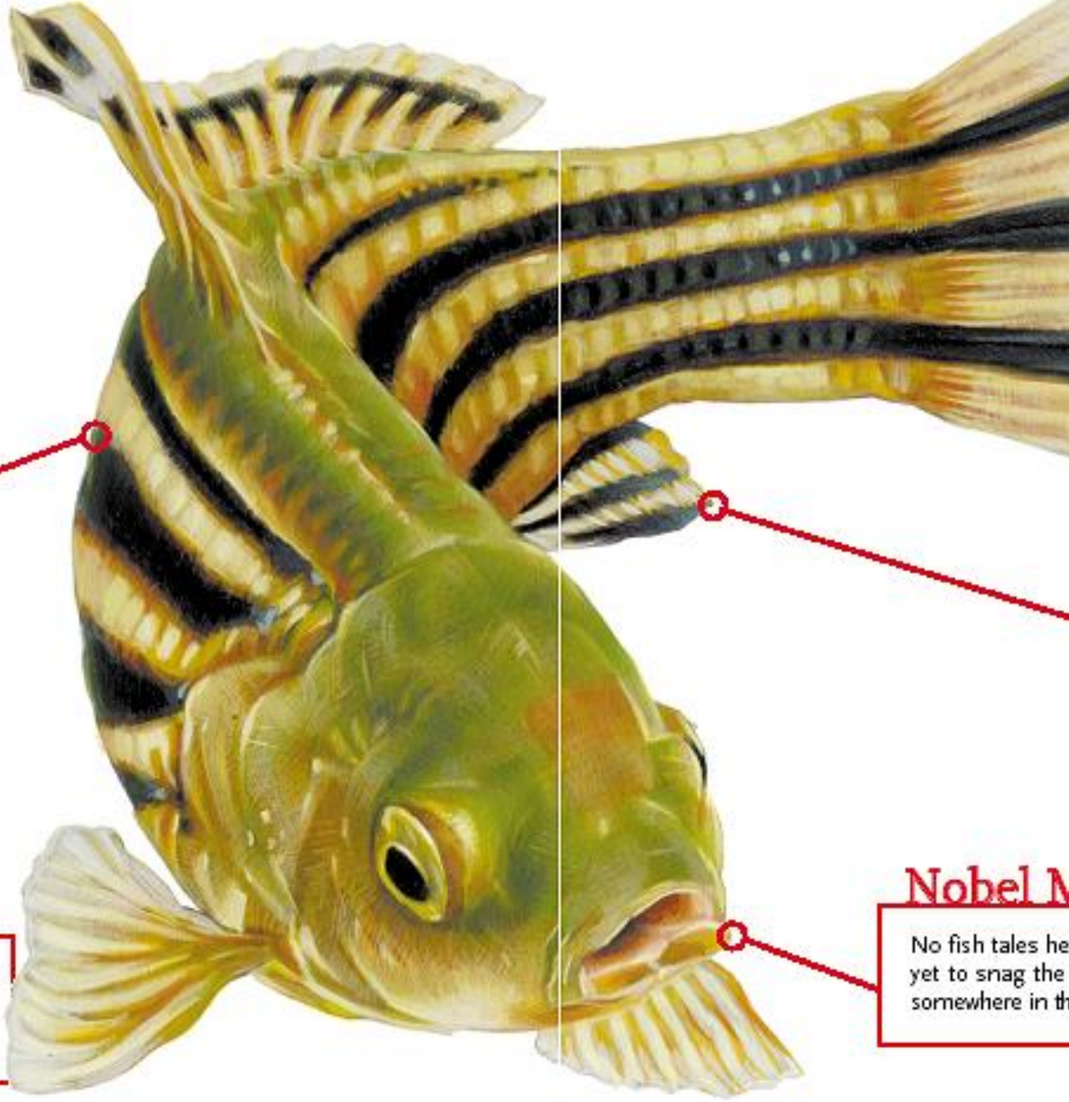
Diet: Brine shrimp and algae

Life span: ~5 years

Reproduction: Eggs fertilized externally

Development: Transparent embryos develop to adults in 3 months

Average clutch size: 200



Web Sites

Zebrafish Information Network: zfin.org

Danio rerio Sequencing Project: www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio

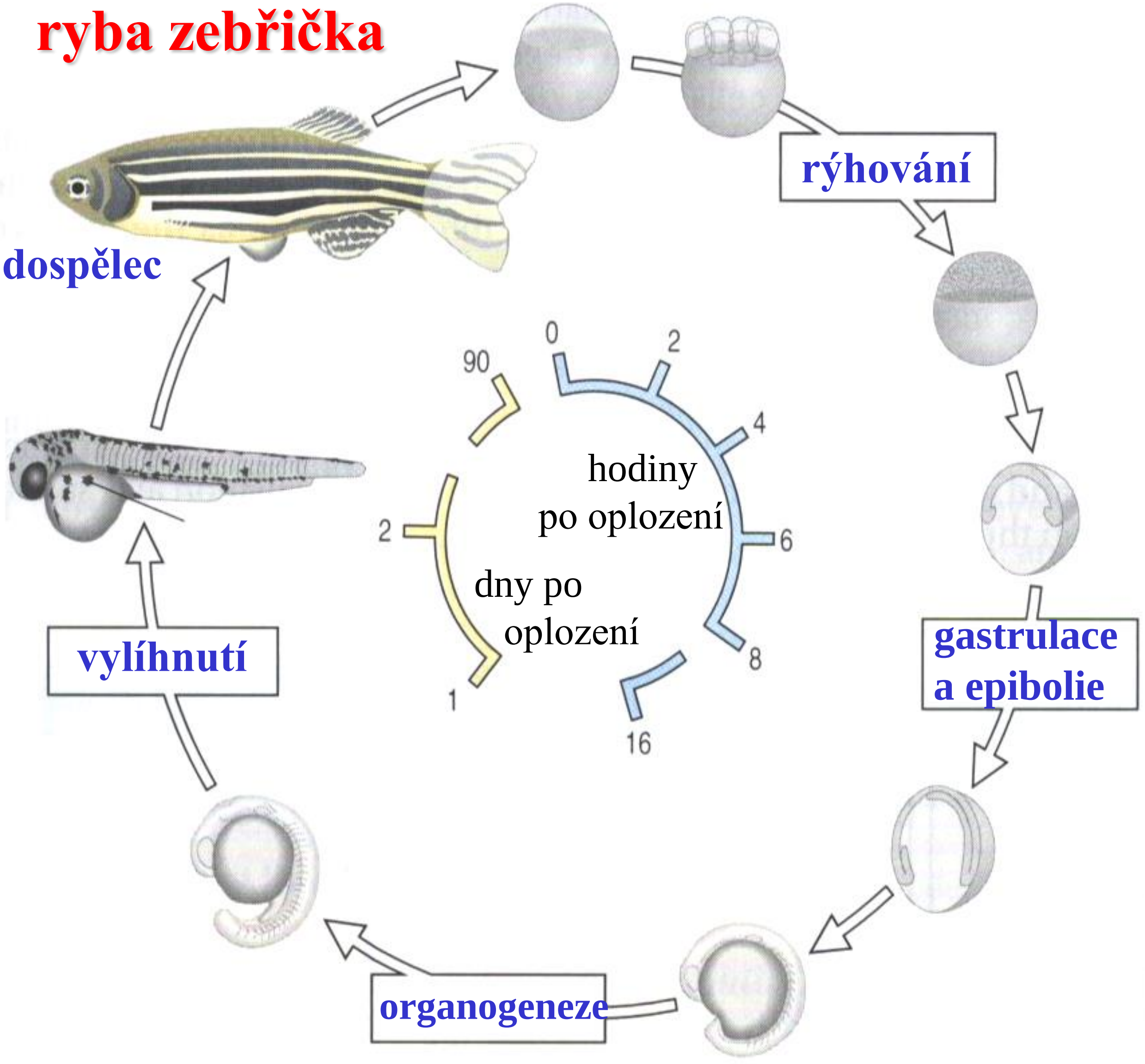
Trans-NIH Zebrafish Initiative: www.nih.gov/science/models/zebrafish

Nobel M

No fish tales he
yet to snag the
somewhere in th

Danio rerio
ryba zebřička

30 minut po (vnějším) oplození



rýhování

gastrulace a epibolie

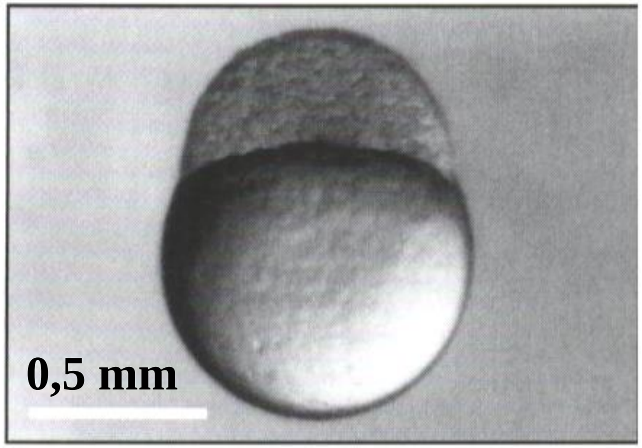
organogeneze

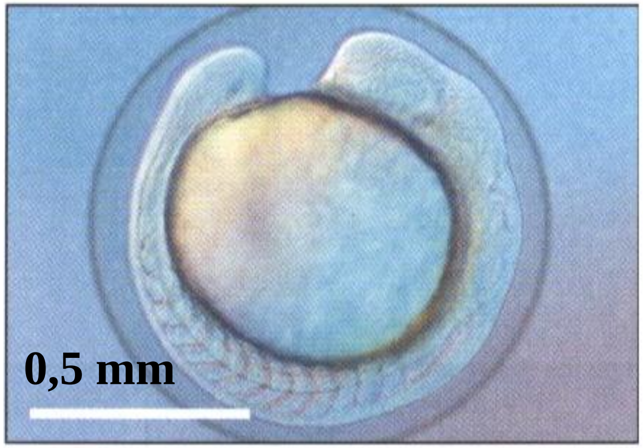
vylíhnutí

dospělec

hodiny po oplození

dny po oplození



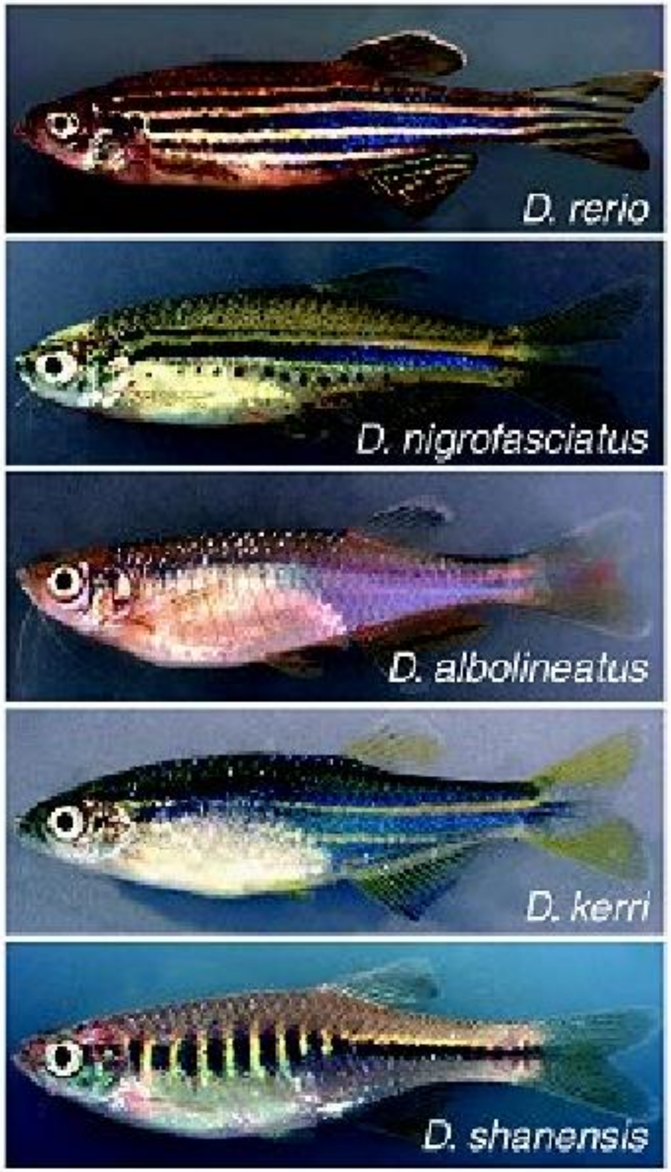


George Streisinger

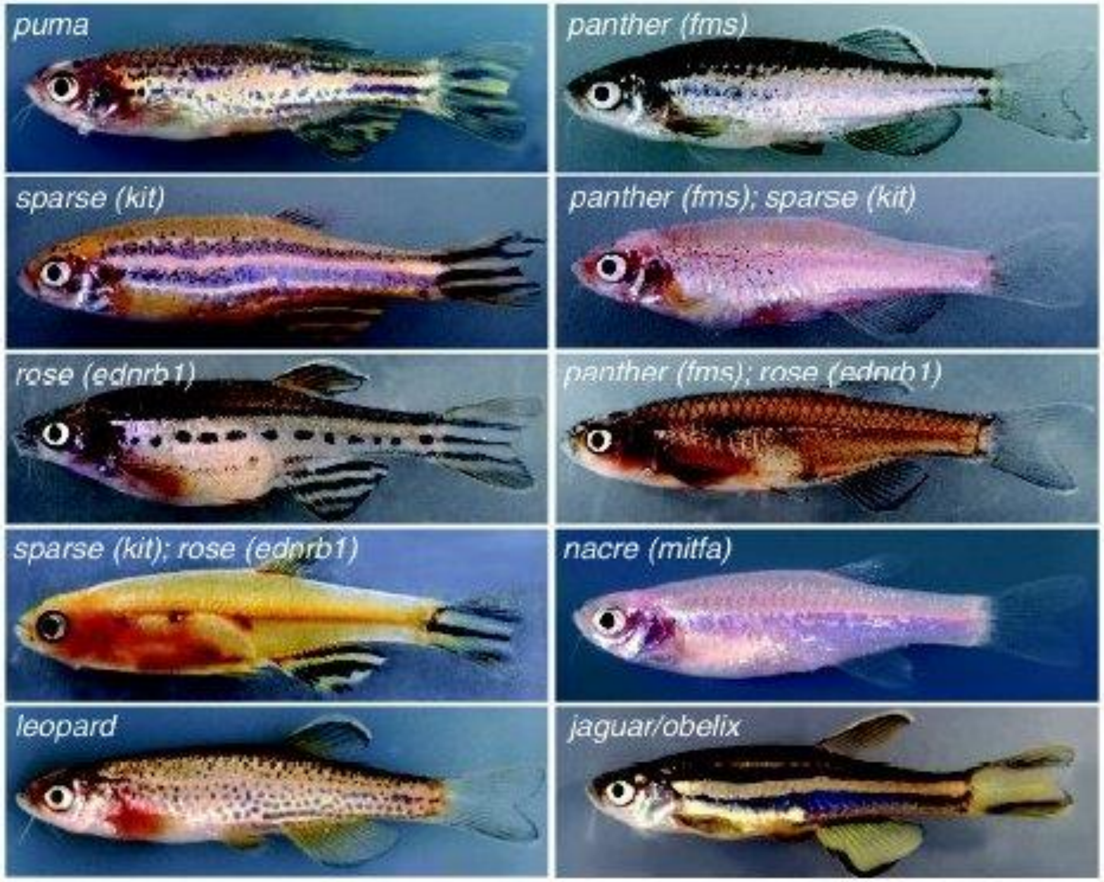
"Founding Father" of Zebrafish Developmental and Genetic Research

Born: December 27, 1927, in Budapest, Hungary

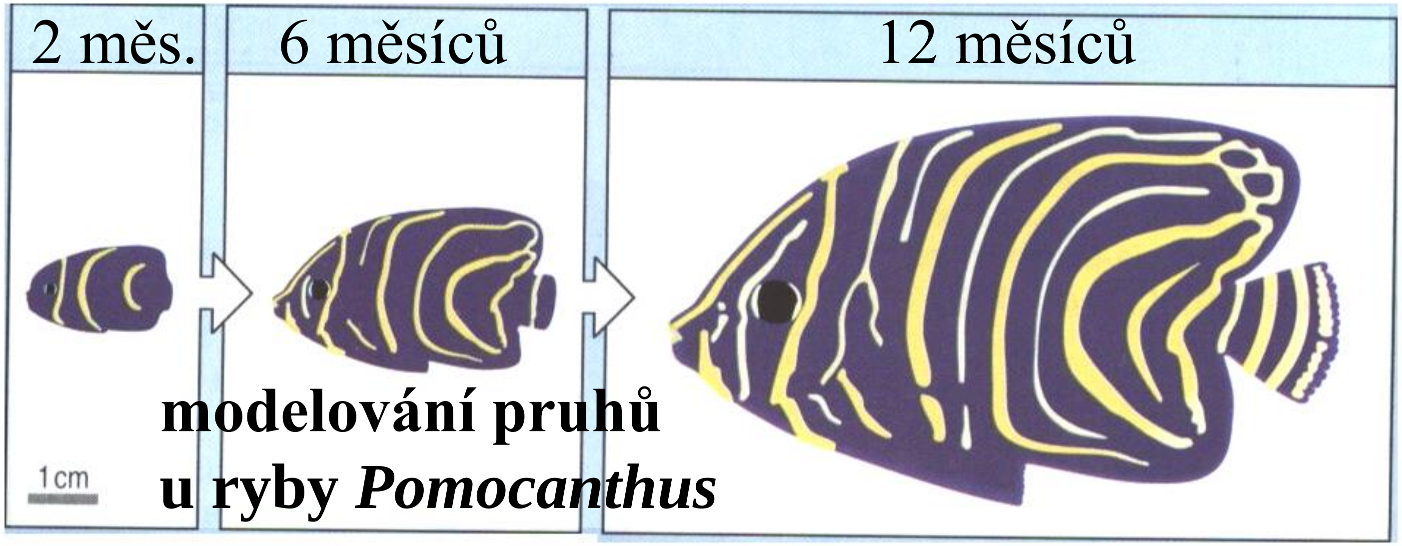
Died: August 11, 1984, while scuba-diving at the Oregon Coast near Florence



Diversity of *Danio* adult pigment patterns.

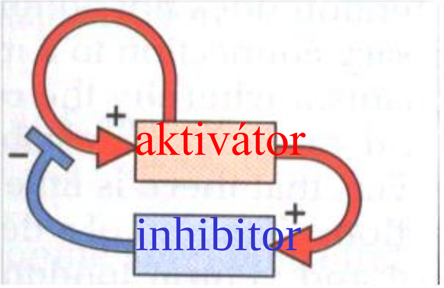


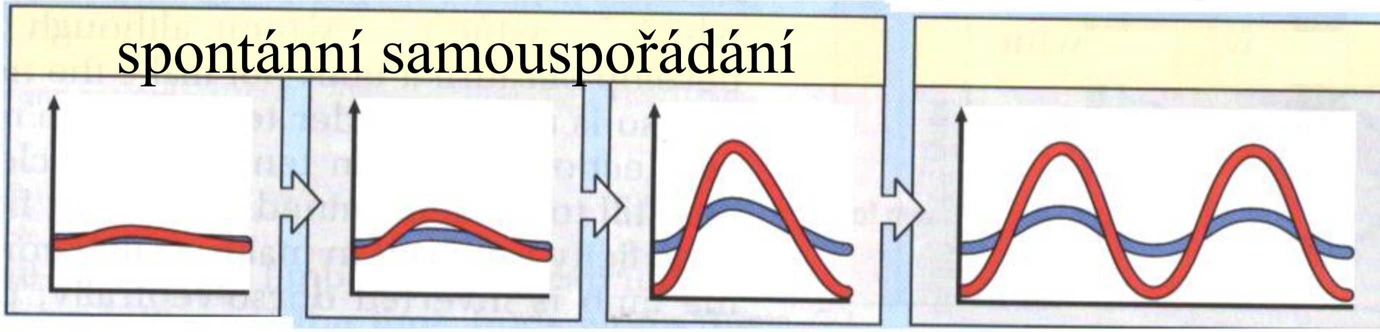
Zebrafish pigment pattern mutants.



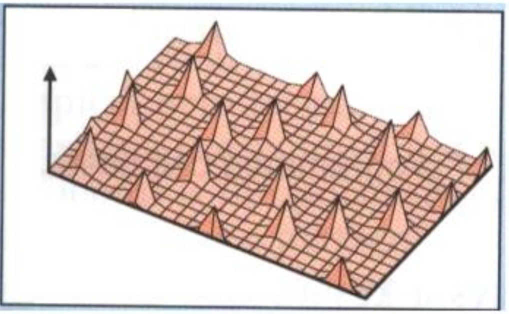
modelování pruhů u ryby *Pomocanthus*

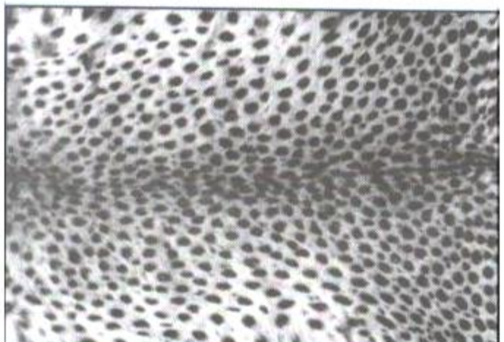
Reaktivně – difúzní mechanismy vývoje





spontánní samouspořádání





Uspořádání pigmentu v pruzích zebřičky

neurální hřeben (gastrulace, ektoderm, migrace)

→

3 typy pigmentových buněk = chromatoforů (savci mají jen melanocyty)

černé - MELANOFORY (melanin)

stříbrné - IRIDOFORY (guanin-bohaté reflexní destičky)

žluto-oranžové - XANTOFORY (pteridiny a karotenoidy)

černé pruhy

světlé pruhy

Tvorba uspořádání zbarvení zebřičky v ontogenezi

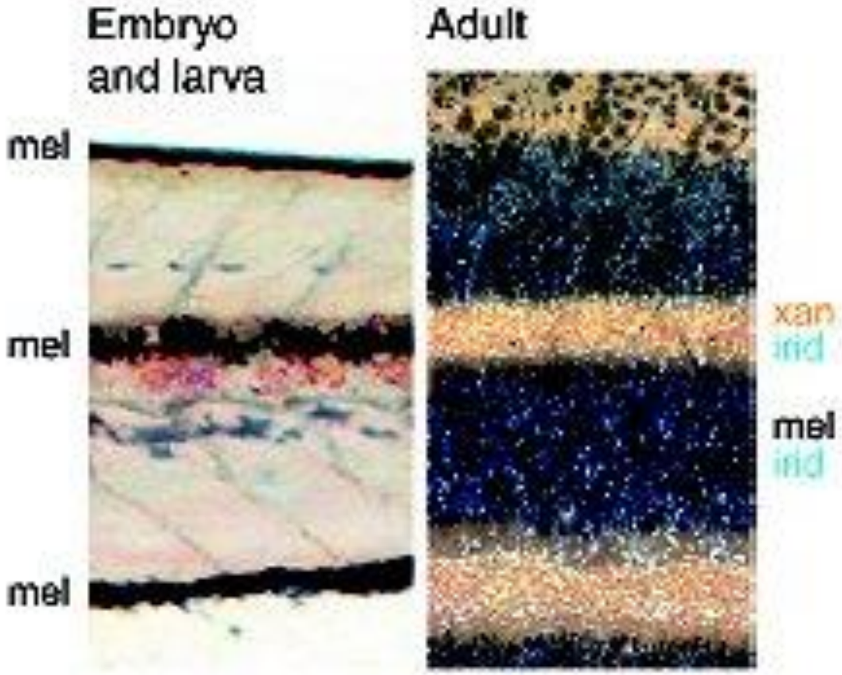
metamorfóza

LARVA → **DOSPĚLEC**

migrace i apoptóza chromatoforů, vznik nových z kmenových buněk

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

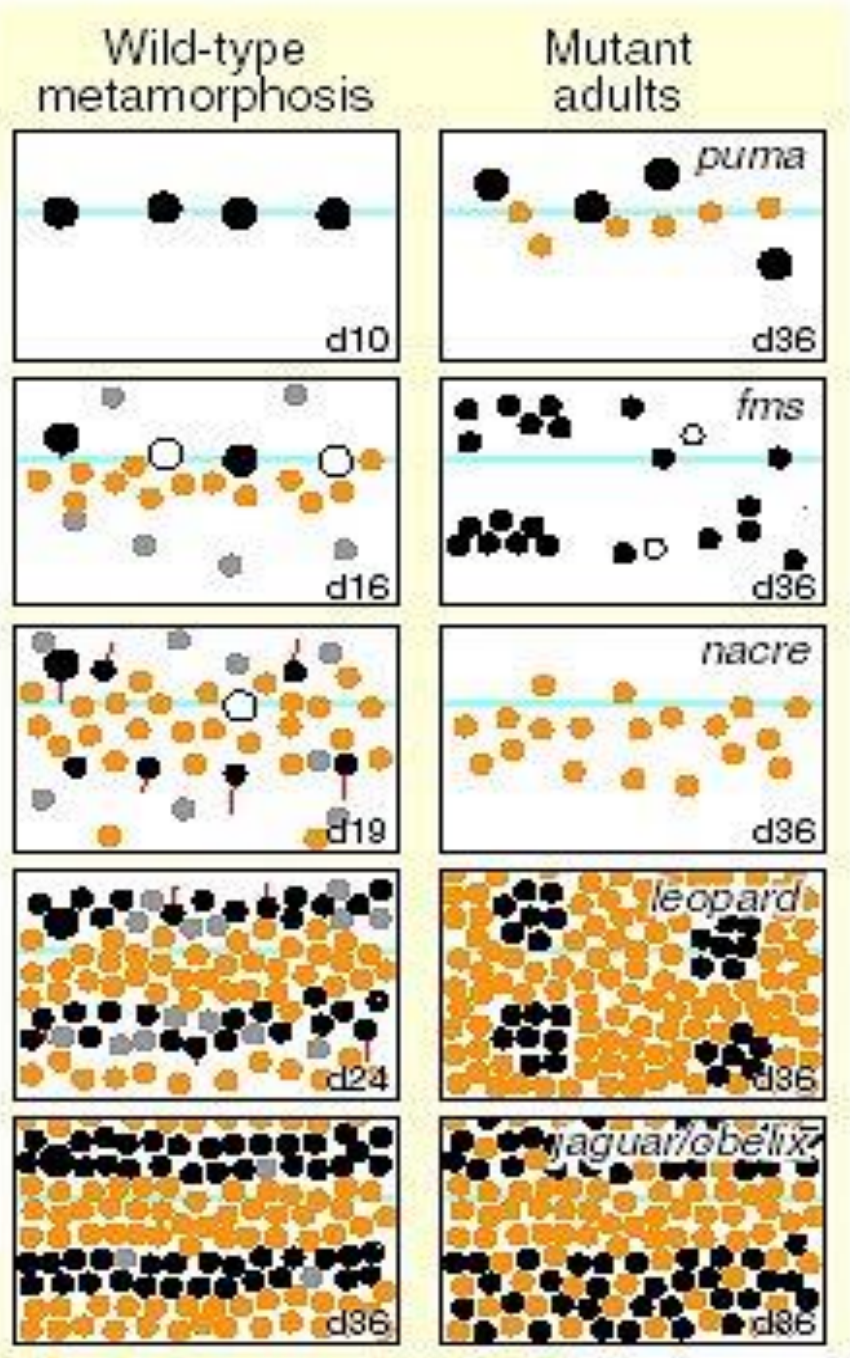
změny v pruzích, dva primární + 3-4 sekundární, + xantofory a iridofory



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)**
- **pobyh 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.

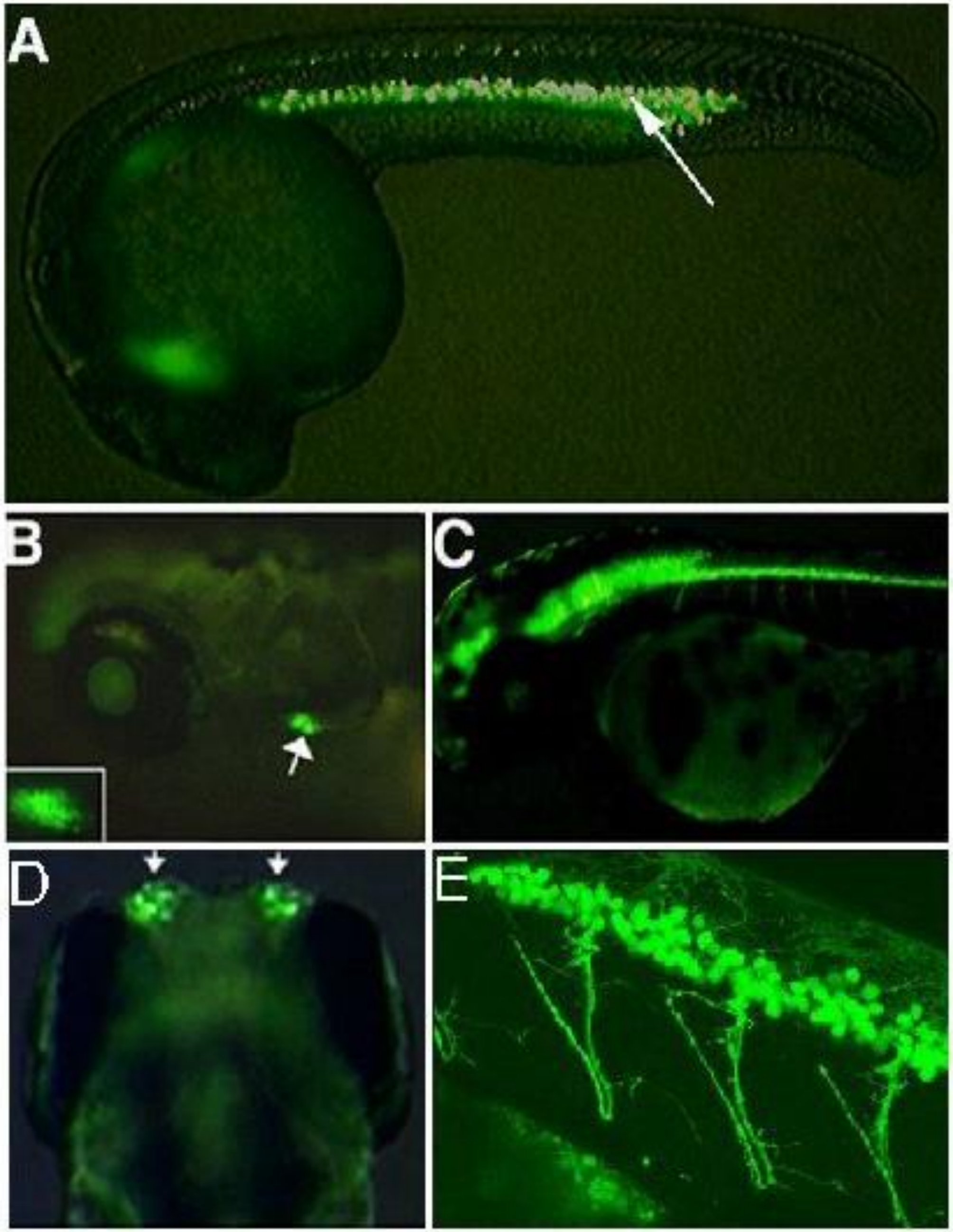
MELANOPHORES

XANTHOPHORES

transgenní ryba „green fluorescence protein“

Danio rerio

zebřička



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

NC 2008

Osamu Shimomura

Osamu Shimomura was the first person to isolate GFP and to find out which part of GFP was responsible for its fluorescence. His meticulous research laid the solid foundations on which the GFP revolution was built. In 1960, shortly after he arrived in Princeton from Japan, Shimomura started studying the bioluminescence of the crystal jellyfish, *Aequorea victoria*.

Osamu Shimomura in the lab in the basement of his home. He is holding a sample of real GFP isolated from *Aequorea victoria*, not produced by bacteria. (Photo courtesy of Osamu Shimomura)

This jellyfish produces green bioluminescence from small photoorgans located on its umbrella (see Figures below). When the rings of twenty to thirty jellyfish are squeezed through a rayon gauze, a faintly luminescent liquid called squeezate is obtained. Shimomura went to Friday Harbor, Washington, to collect this squeezate and to extract from it the substance responsible for its luminescence. In order to do his research Shimomura estimates that he collected over a million *Aequorea* specimens, cut off the rings, and produced squeezate.

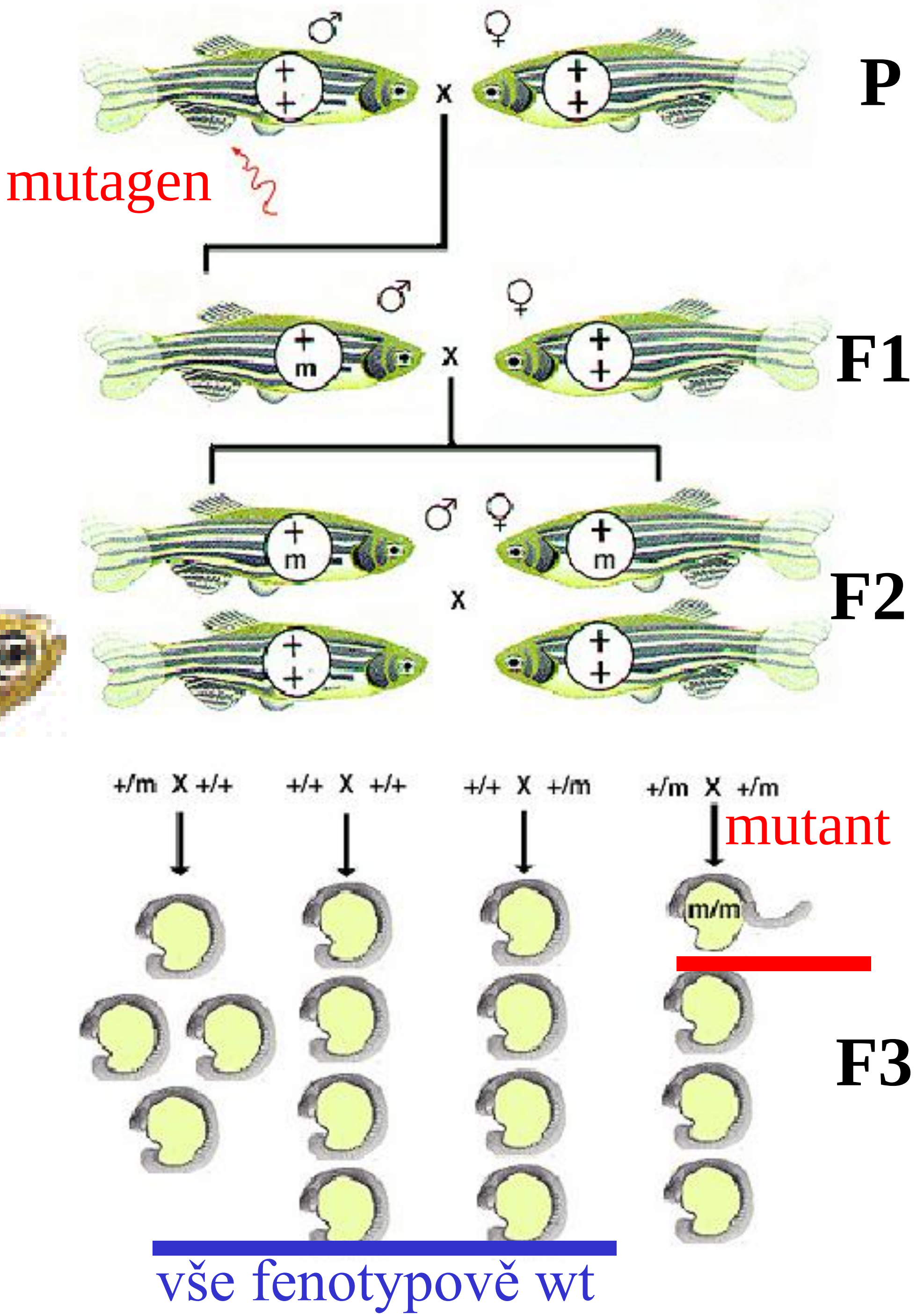
Right: Photoreceptors on umbrella of *Aequorea victoria* bioluminescing. (Photo courtesy of Osamu Shimomura)

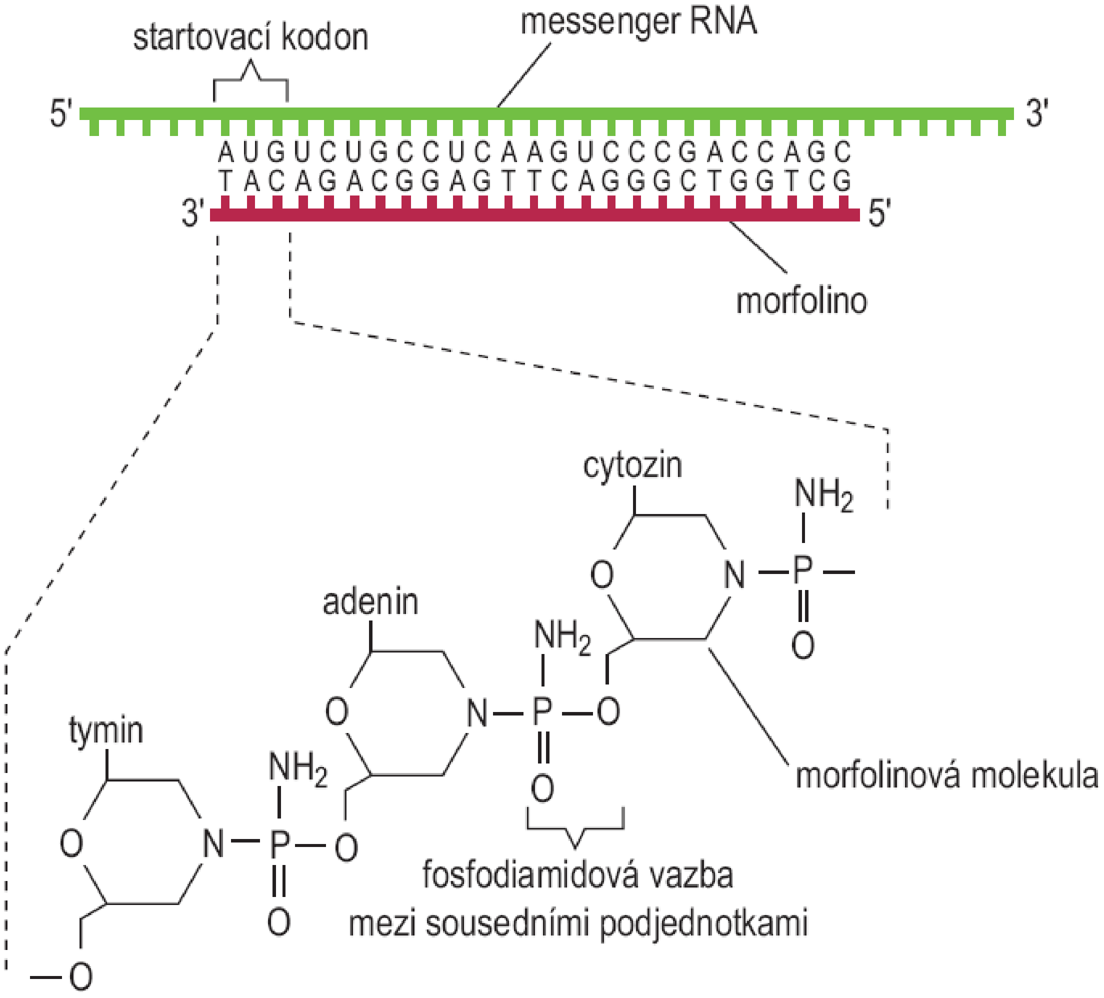
He found that in order to bioluminesce Aequorea releases calcium ions. These bind to a protein that he called aequorin, which release blue light upon calcium binding. The blue light is absorbed by green fluorescent protein, which in turn gives off the green light as shown below.

(Photo courtesy of Osamu Shimomura)

Osamu Shimomura's interest in *Aequorea* has always been based on its bioluminescence. He wanted to understand the chemistry and biochemistry involved in the production of its green glow and has never been interested in applications of GFP as a tracer molecule

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.

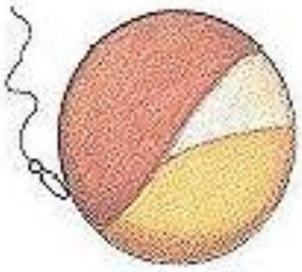
… v hlavní roli :

žáby

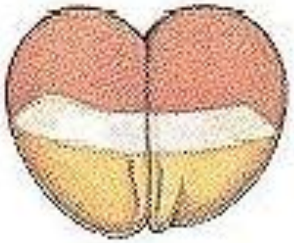
a ocasatí obojživelníci

Základní stádia ontogeneze obojživelníků

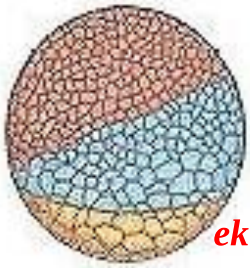
oplozené vajíčko



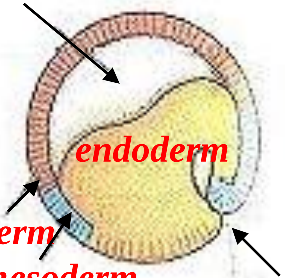
2-buněčné stádium
(90 min)



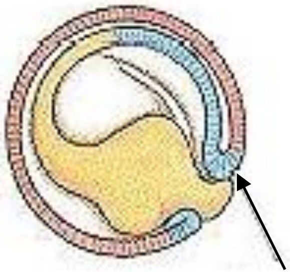
midblastula
(4tis. buněk, 7 h)

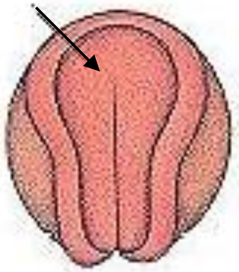


časná gastrula
(20tis. buněk, 9h)



pozdní gastrula
(12h)

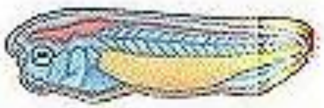




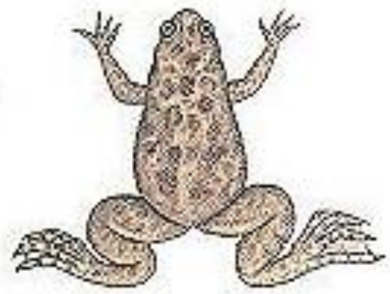
časná neurula

časná neurula

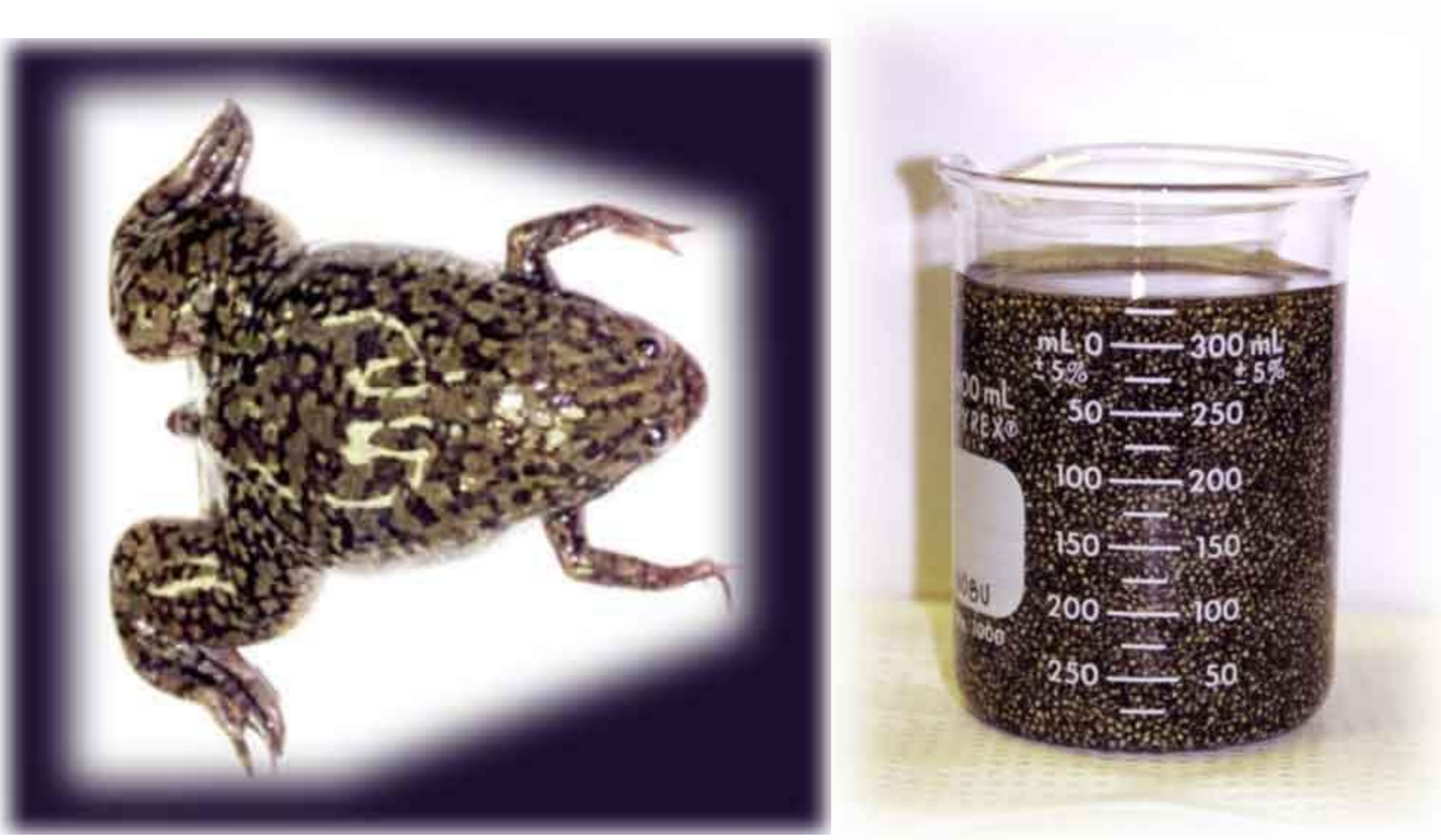
pozdní neurula
(150tis. buněk, 20h)



vylíhnutý pulec
(500tis. buněk, 3d)

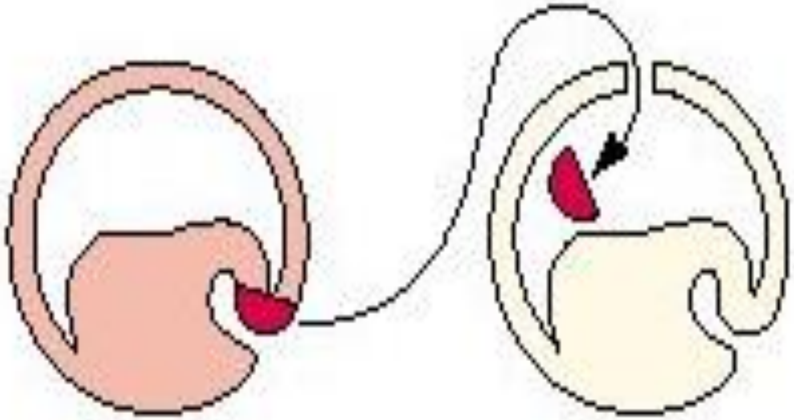


dospělá žába
(12 měsíců)

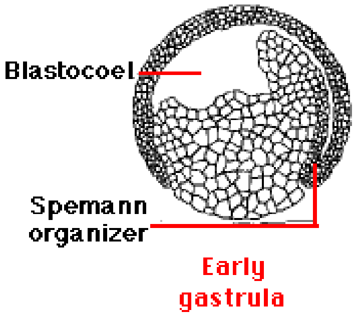


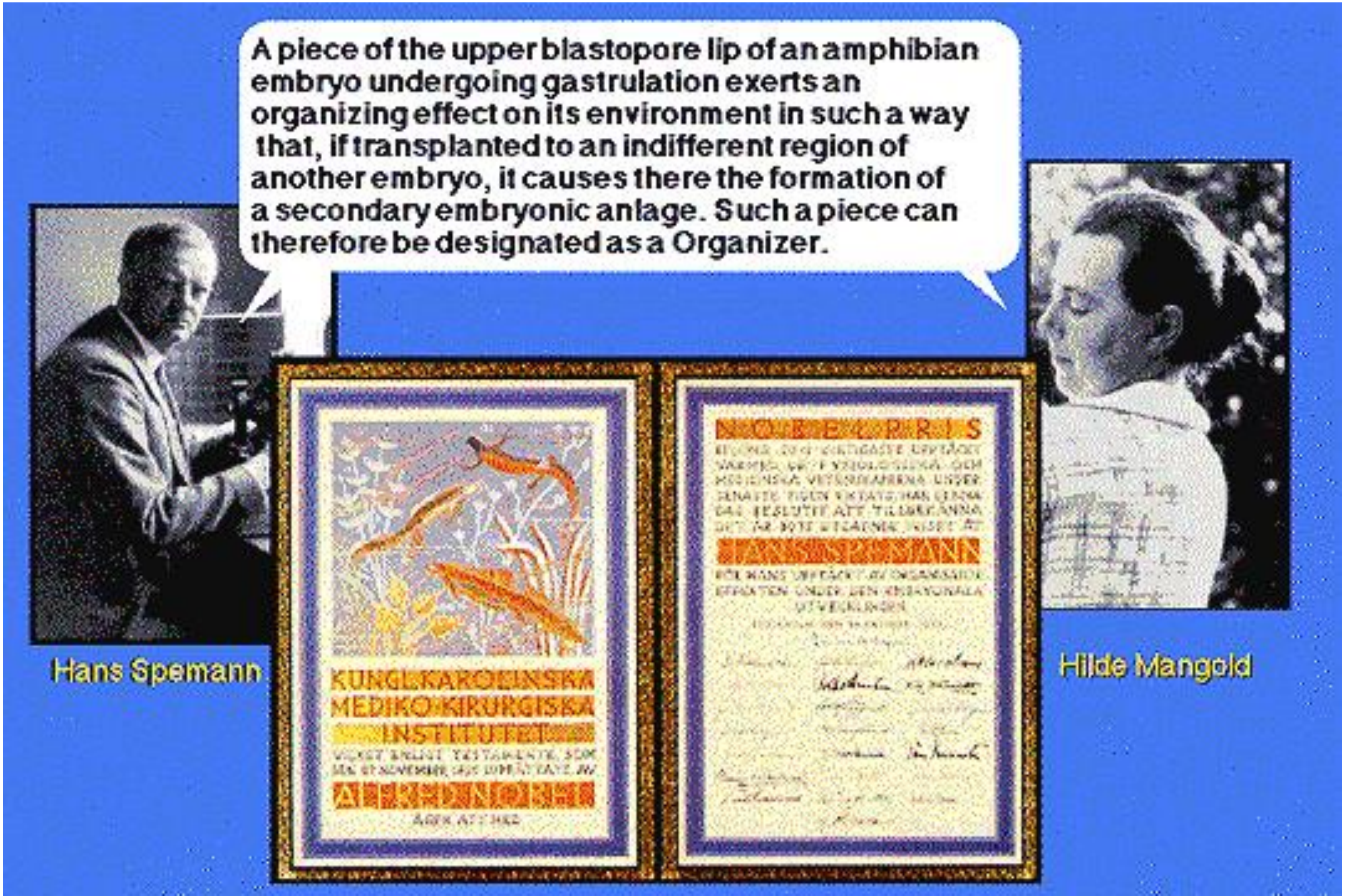
***Xenopus laevis* – africká drápatka – model molekulární embryologie**

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



OBJEV ORGANIZÁTORU (Freiburg 1923)
HANS SPEMANN (1869-1941)
HILDE MANGOLD (1898-1924)





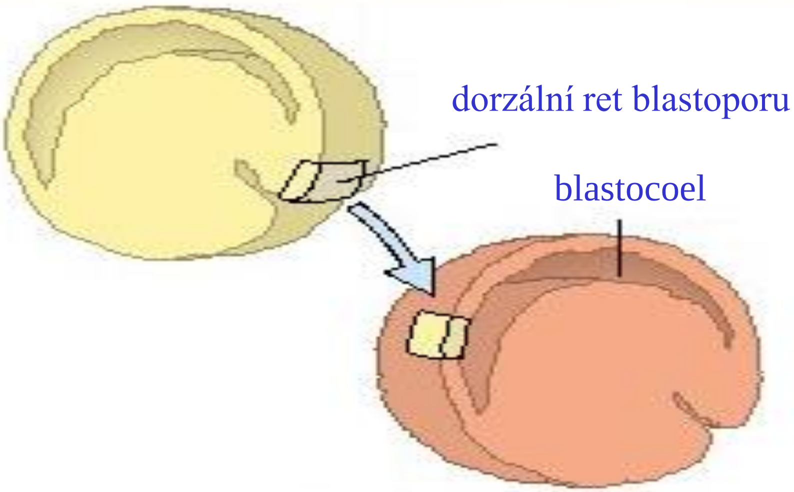
A piece of the upper blastopore lip of an amphibian embryo undergoing gastrulation exerts an organizing effect on its environment in such a way that, if transplanted to an indifferent region of another embryo, it causes there the formation of a secondary embryonic anlage. Such a piece can therefore be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

KUNGL KAROLINSKA
MEDIKO-KIRURGISKA
INSTITUTET

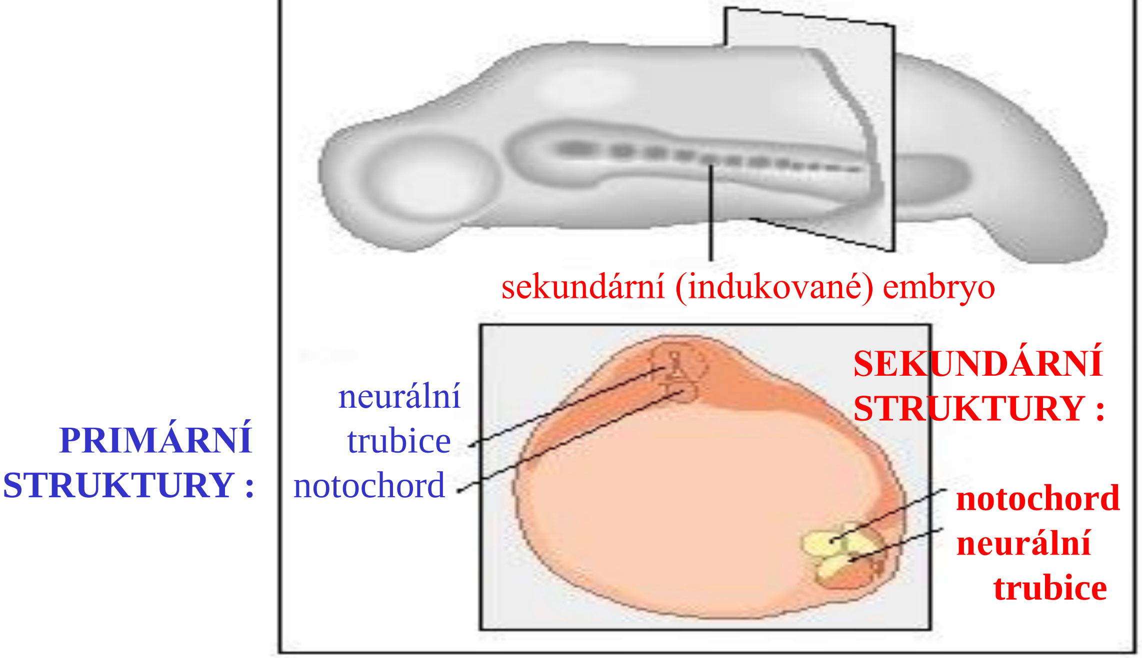
Indukce nové tělní osy přenosem oblasti organizátoru časné gastruly čolků

(Spemann a Mangoldová 1924)

dorzální ret blastoporu nepigmentovaného druhu
přenesen do obalu blastocoelu pigmentovaného druhu

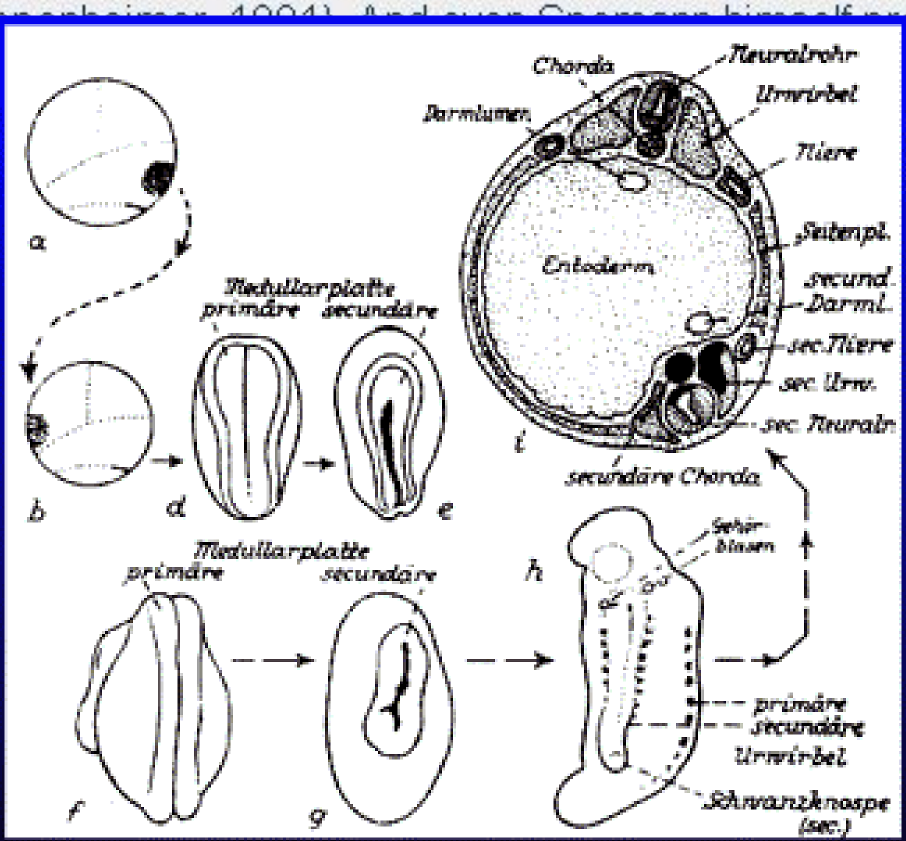


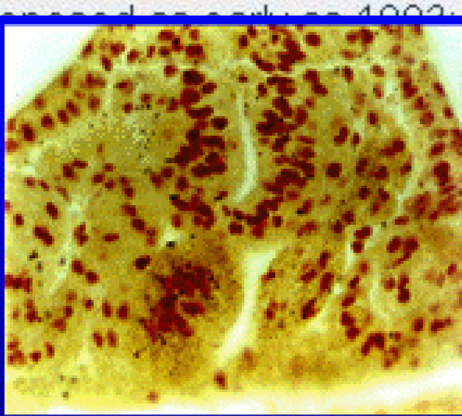
indukce sekundárního embrya



Herbst. However, even as early as 1828 von Baer suggested that the optic vesicle could elicit lens formatic
the adjacent ectoderm (see O
conceivable that the neural pla

The original authors





From actual microscope slide of Hilde Mangold, courtesy of P. Faßler and K. Sander

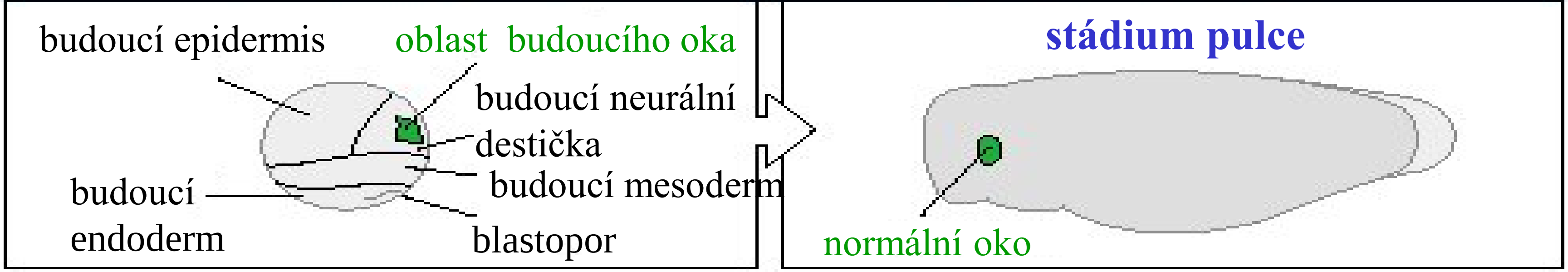
Experimental protocol for heteroplastic transplantations

SPEMANN, H. AND MANGOLD, H. 1924. Über Induktion von Embryonanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik* 100: 599 - 638.

Strongylus paradoxus (which
development of the middle ea
in the University). After comple
Würzburg. After contracting Lungenspitzenkatarh (probably tuberculosis), he retired for a Winter (1896-97)

Determinace oblasti oka v průběhu embryogeneze obojživelníků

„osudové mapování“ normální gastruly lokalizuje oblast budoucího oka



budoucí epidermis

oblast budoucího oka

budoucí neurální destička

budoucí mesoderm

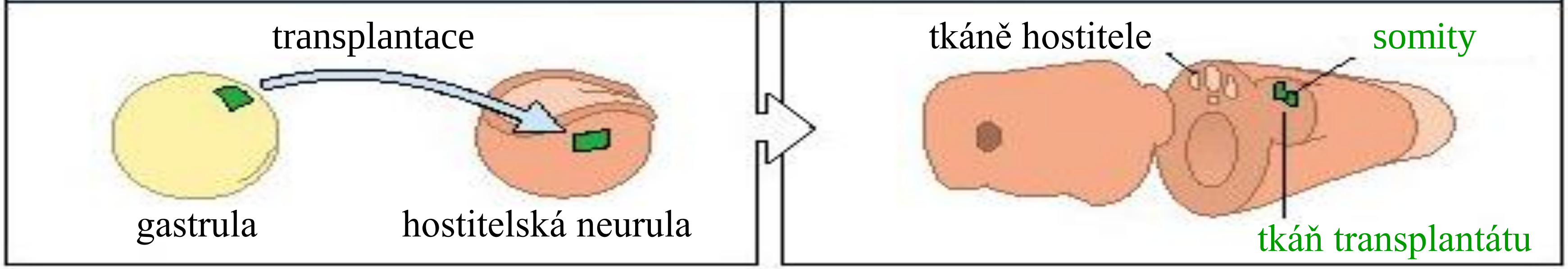
budoucí endoderm

blastopor

stádium pulce

normální oko

transplantát z časné gastruly se vyvine podle své nové polohy



transplantace

gastrula

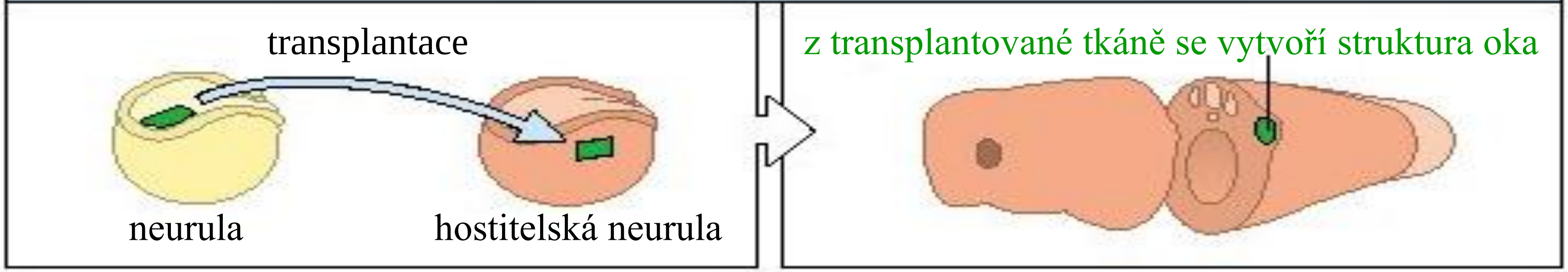
hostitelská neurula

tkáně hostitele

somity

tkáň transplantátu

transplantát z pozdějšího stádia embrya se vyvine jako oko

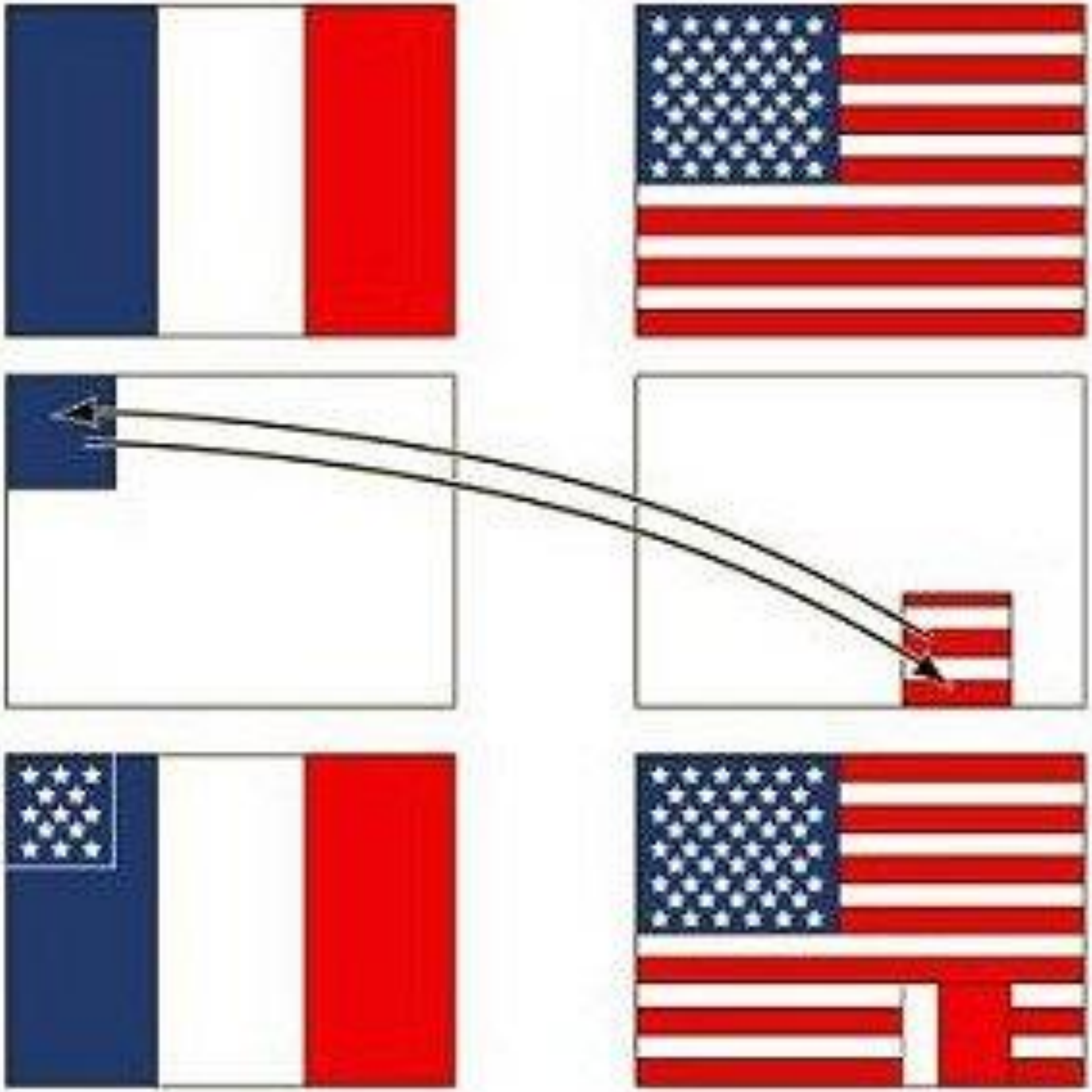


transplantace

neurula

hostitelská neurula

z transplantované tkáně se vytvoří struktura oka

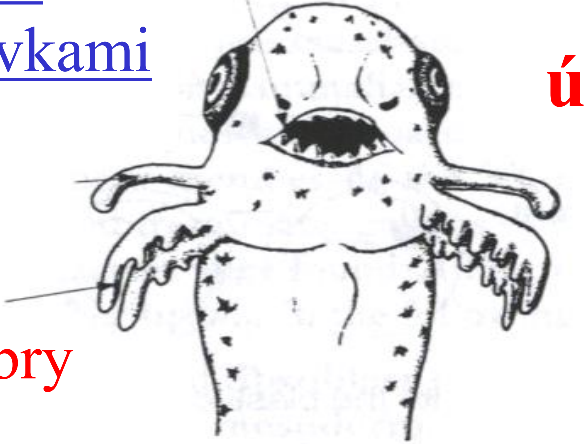


základní schéma :

ústa žáby

čelist s přísavkami

zuby



ústa čolka

žábry

---

transplantace :

blastula žáby
(donor)

„budoucí“ epidermis

oblast „budoucích“ úst

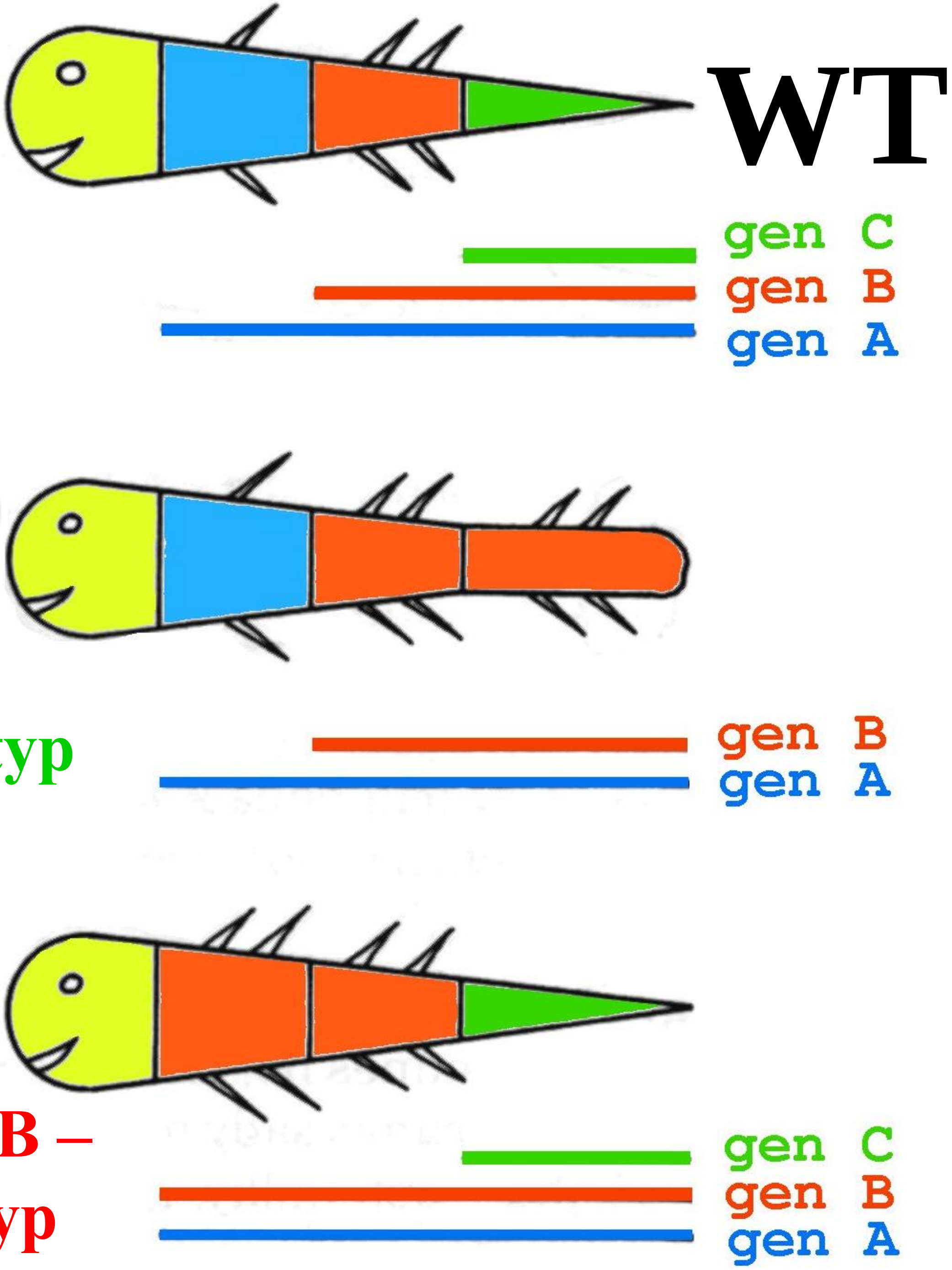
gastrula čolka
(recipient)

čelist s přísavkami

XENOTRANSPLANTACE

čolek s žabími ústy

Homeotické geny řídí anteriorně - posteriorní specifikaci těla (platí to i u žab !)



ztráta funkce genu C - „více anteriorní“ fenotyp

ektopická exprese genu B – „více posteriorní“ fenotyp

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 Pallette Stage
3-6 Weeks Post-Amputation

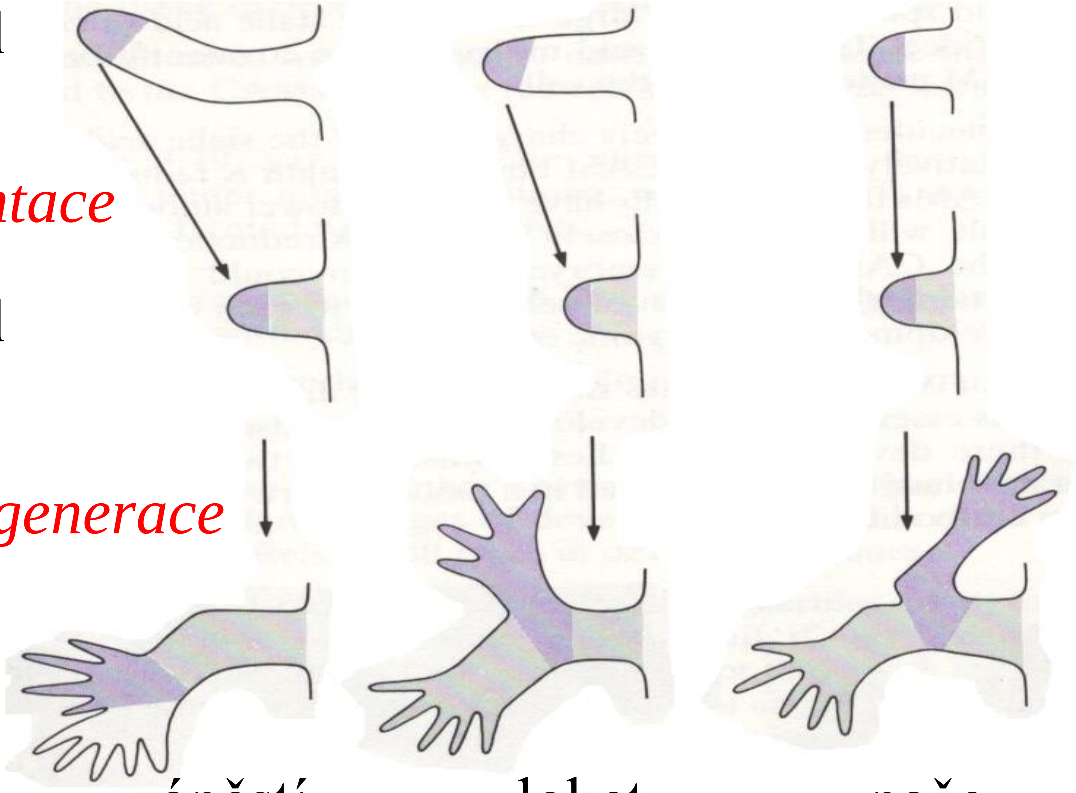
Early Differentiation Stage
4-7 Weeks Post-Amputation

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“



blastema zápěstí

blastema lokte

blastema paže

regenerující pahýl přední nohy

transplantace

regenerující pahýl zadní nohy

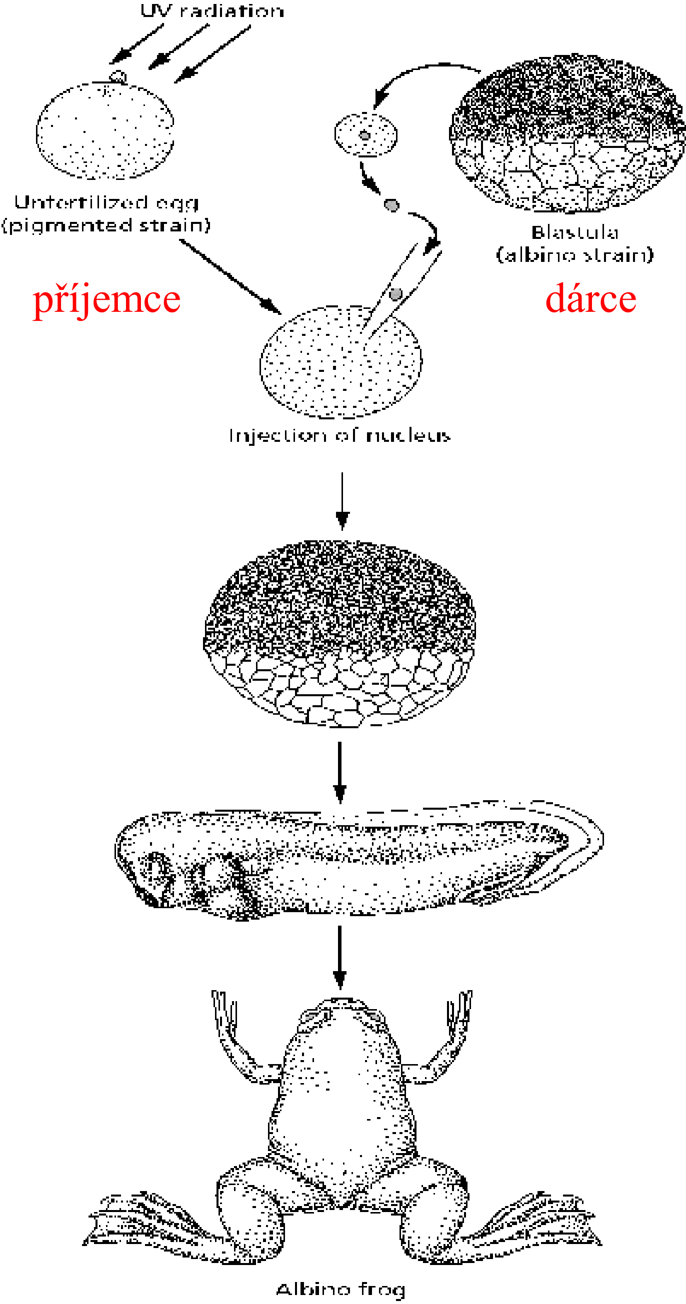
regenerace

zápěstí → kotník

loket → koleno

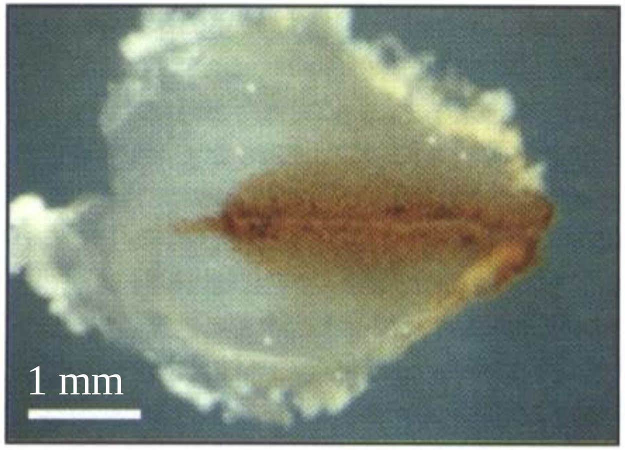
paže → stehno

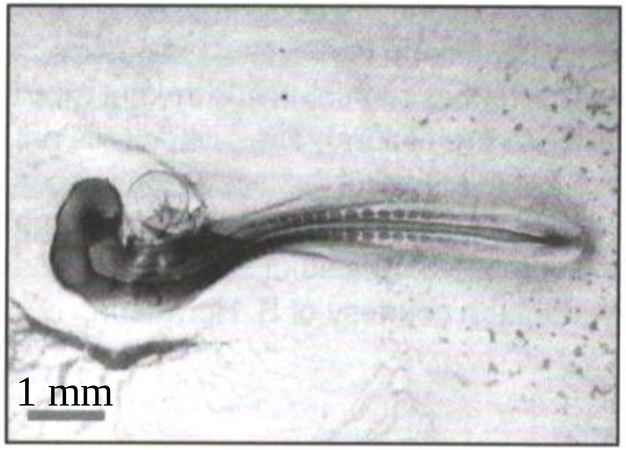
John Gurdon (Oxford, 1962)

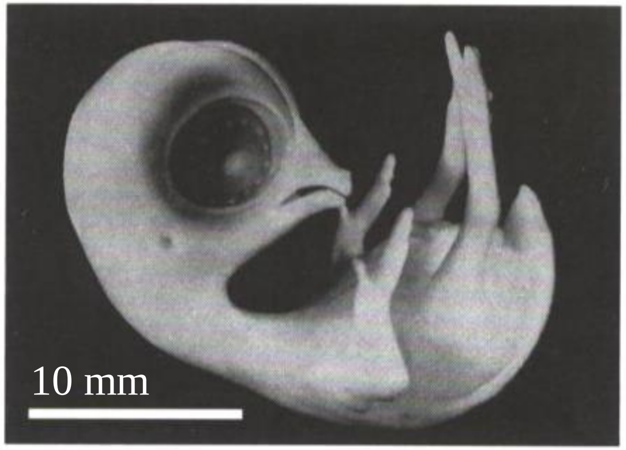


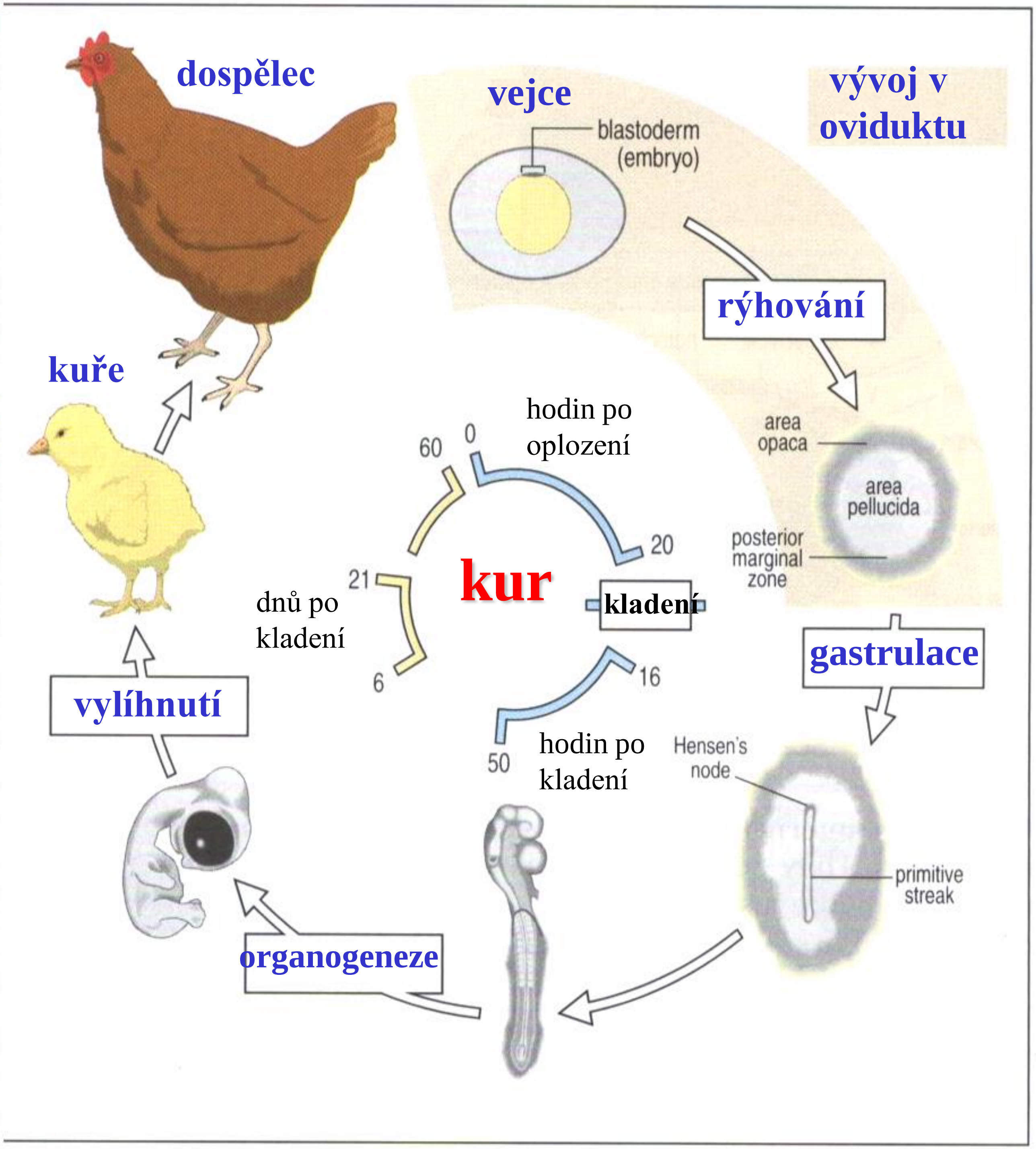
Poruchy vývoje končetin jako indikátor teratogenních faktorů (ekotoxikologie)

kuře či slepice









kur

dospělec

vejce

vývoj v oviduktu

rýhování

kuře

hodin po oplození

kladení

dnů po kladení

gastrulace

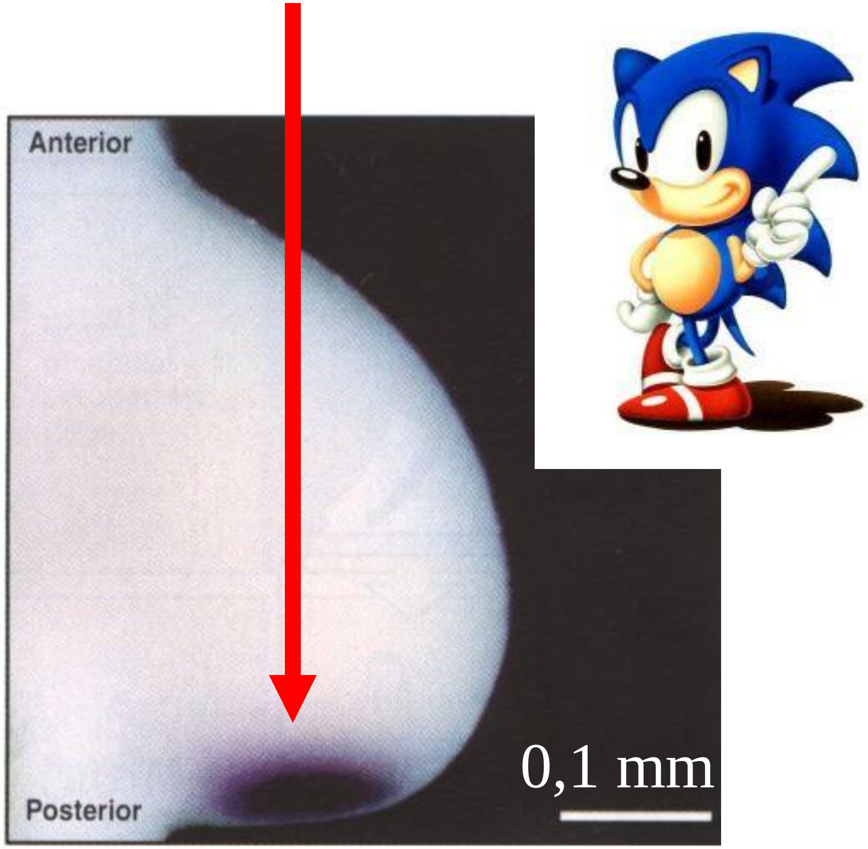
vylíhnutí

hodin po kladení

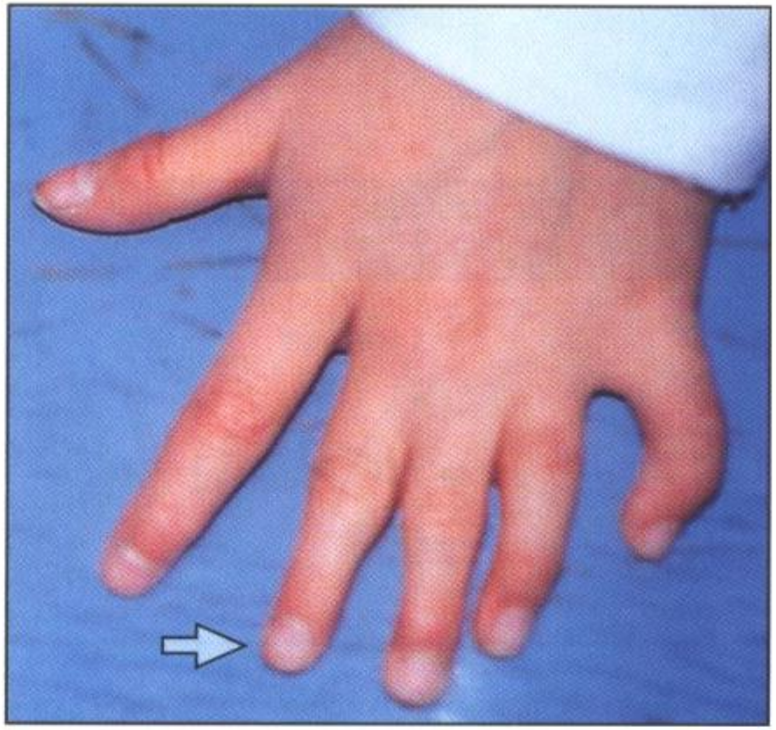
organogeneze

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

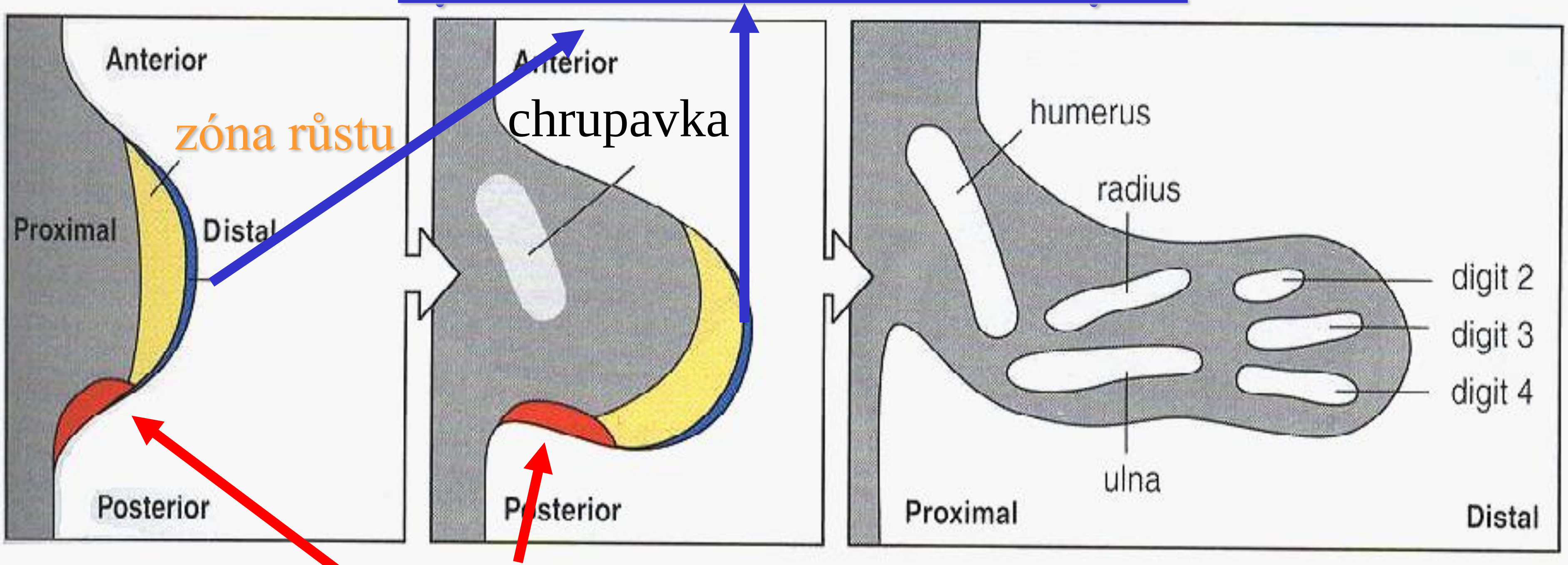


polydaktylie u člověka

Buňky v růstové zóně vyžadují poziční informaci

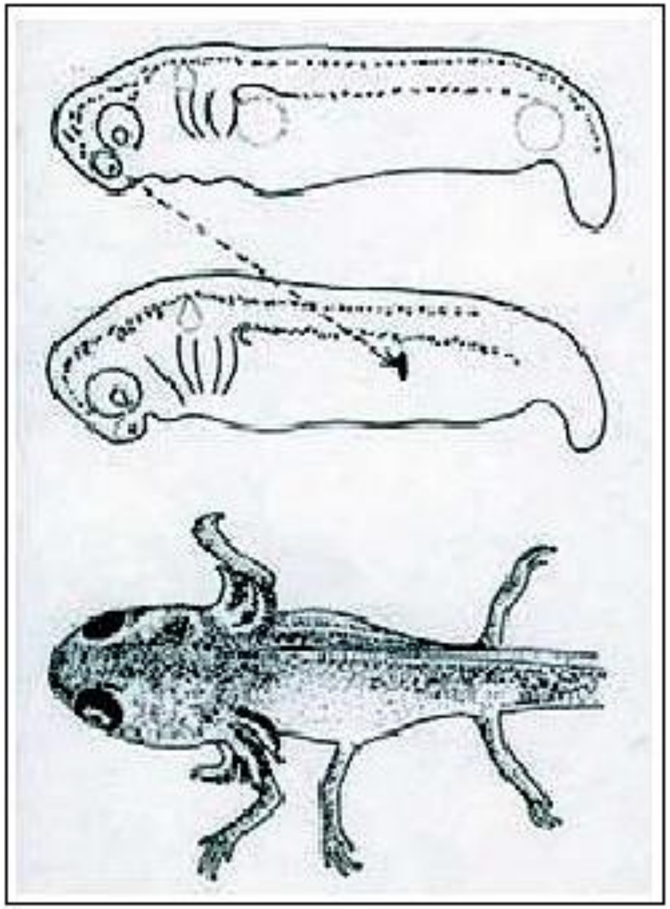
- růstová zóna je specifikována apikální ektodermální rýhou na distálním konci a polarizační oblastí na posterioru, buňky od nich posléze získávají poziční hodnotu

apikální ektodermální rýha

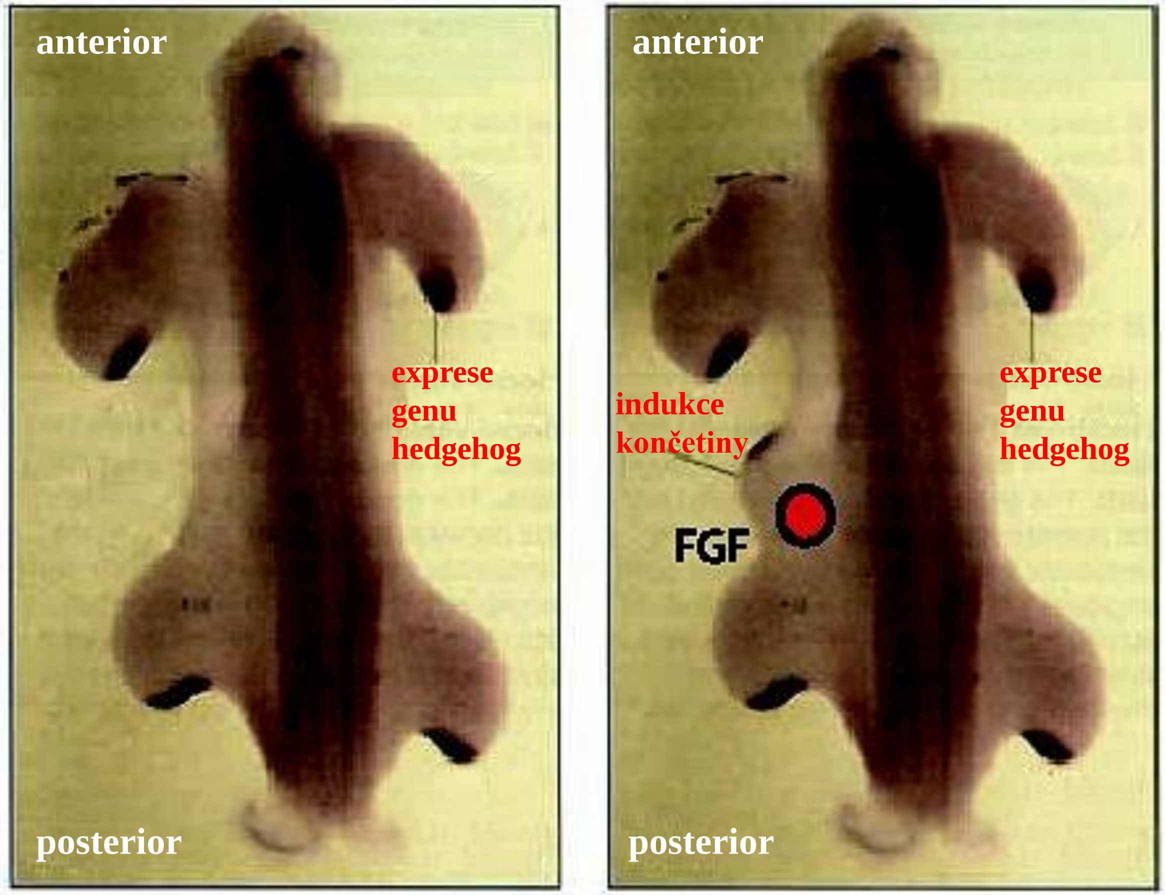


polarizační oblast (Sonic hedgehog)

Pleiotropní funkce jednotlivých signálů



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

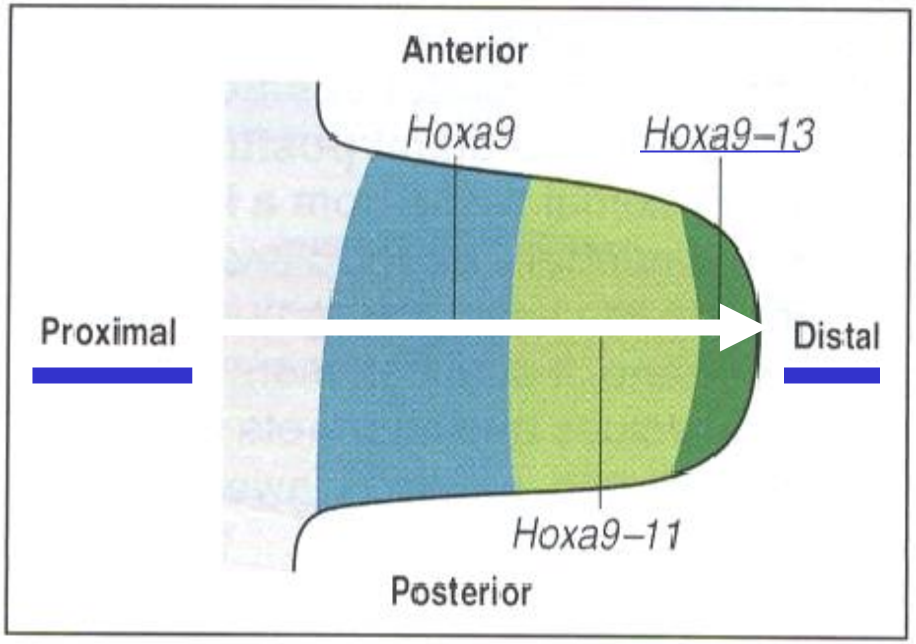


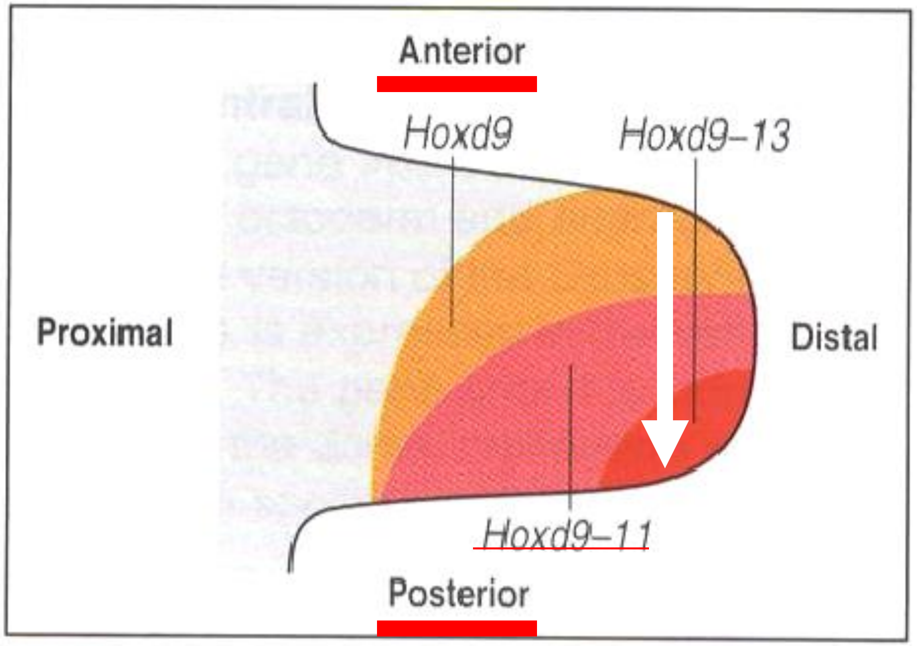
iniciace vývoje končetiny kuřete vyžaduje fibroblastový růstový faktor, který aktivuje expresi genu hedgehog, aplikace FGF do boku embrya vede ke tvorbě extra – končetiny (Arias 2003)

Exprese homeotických genů v pupenu křídla kuřete

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

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





RŮSTOVÉ FAKTORY (GF) ŽIVOČICHŮ

- PROTEINY produkované určitými buňkami do okolí

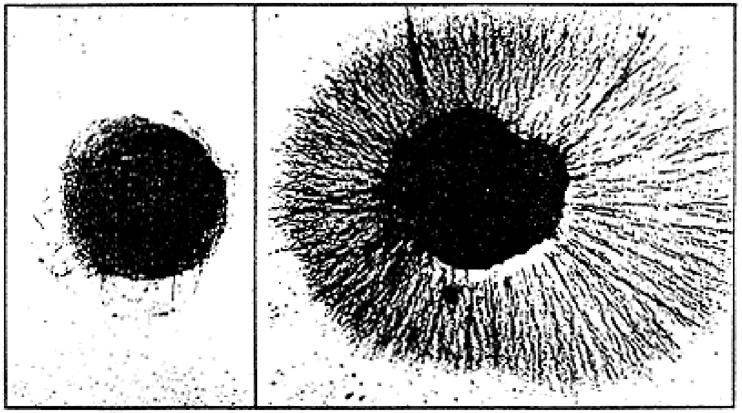
- řídí RŮST a DIFERENCIACI (morfogeny, onkogeny)

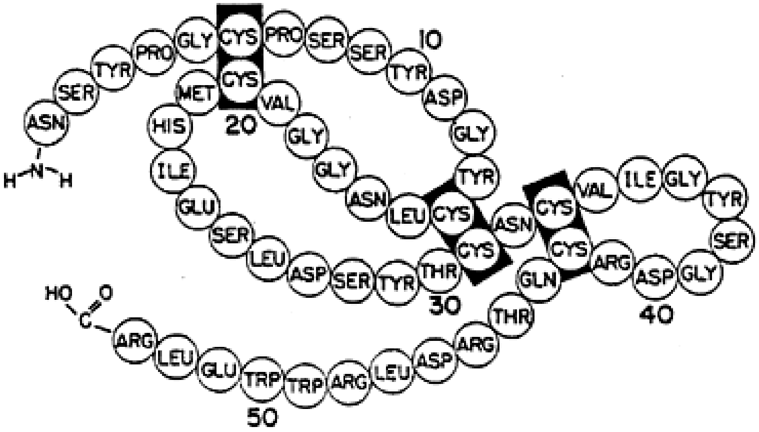
- vážou se na TRANSMEMBRÁNOVÉ RECEPTORY, což vyvolává biochemické změny (časté fosforylace, tj. kinázy) vedoucí k aktivaci či supresi specifických genů

- 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 tkání rozhodují proteinové morfogeny - RŮSTOVÉ FAKTORY

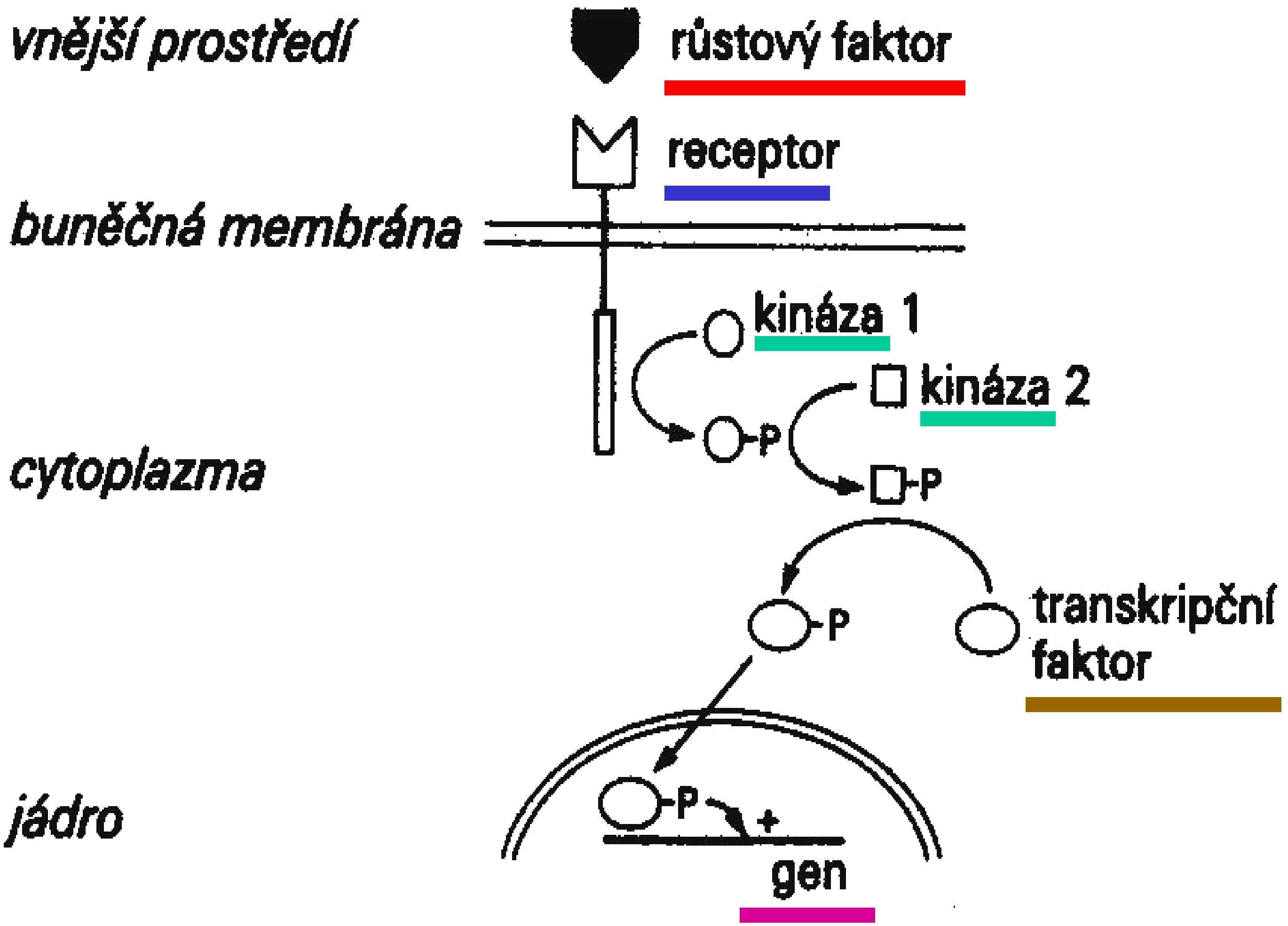




Rita Levi-Montalcini
(Itálie 1909) … nervový NGF

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

Stanley Cohen
(USA 1922) … epidermální EGF

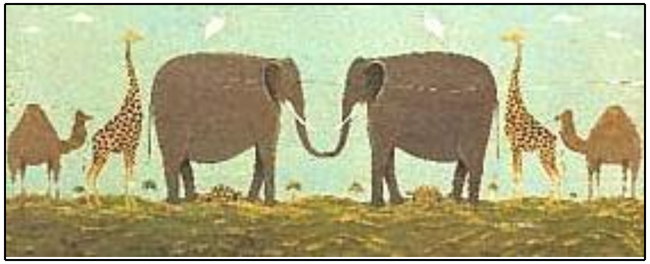


Mechanismus účinku typického růstového faktoru. Jen fosforylovaná forma každého enzymu může fosforylovat další článek řetězu (P-fosfátová skupina).

Savci:

kompenzace dávky X-vázaných genů

Úlohy pohlavnosti v životě eukaryot :



☹ meiosa a kombinace gamet zajišťují evolučně výhodnou heterozygotnost a variabilitu

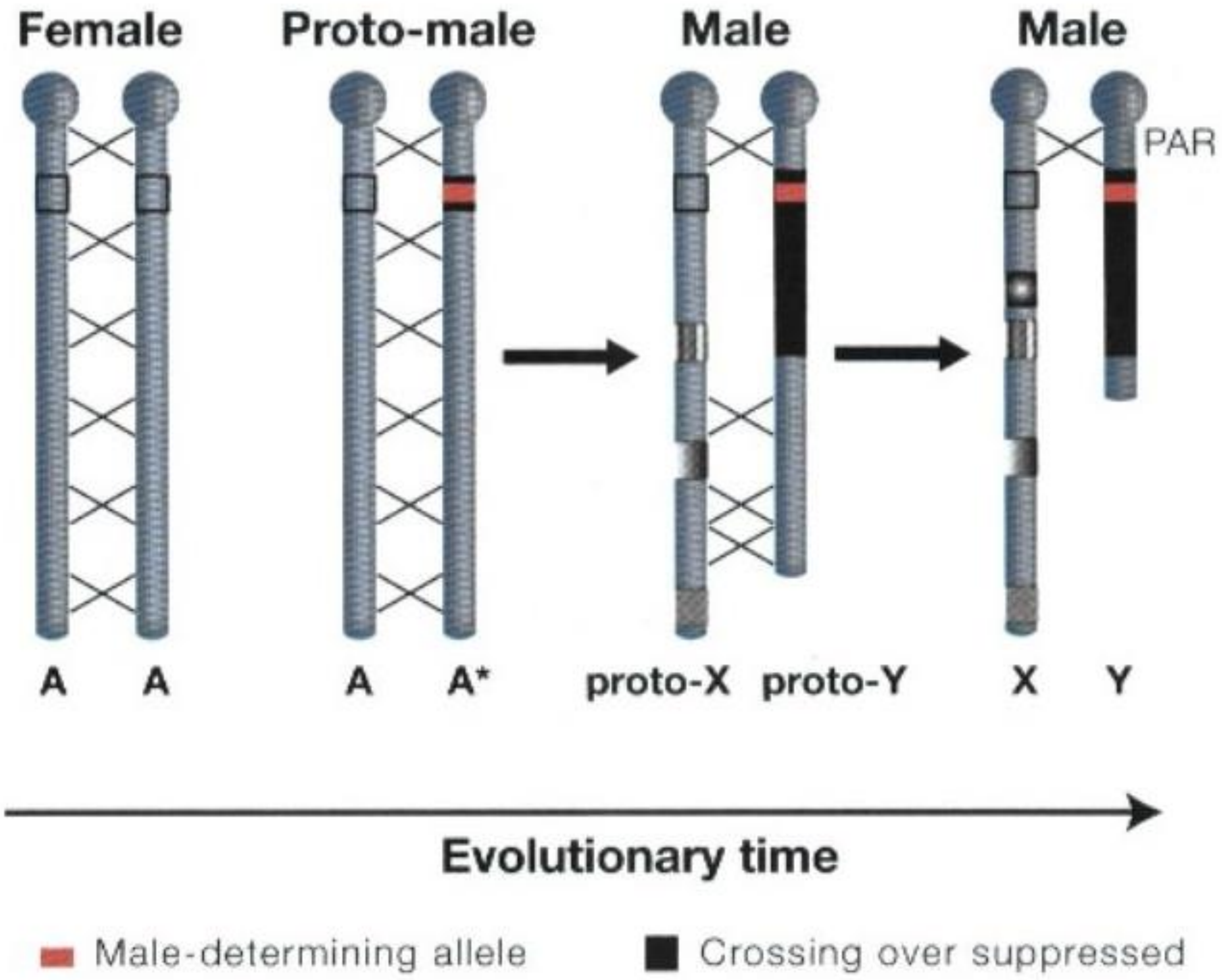
☹ diferenciace zárodečné dráhy a příslušných gamet (včetně tvorby pohlavních orgánů)

☹ 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

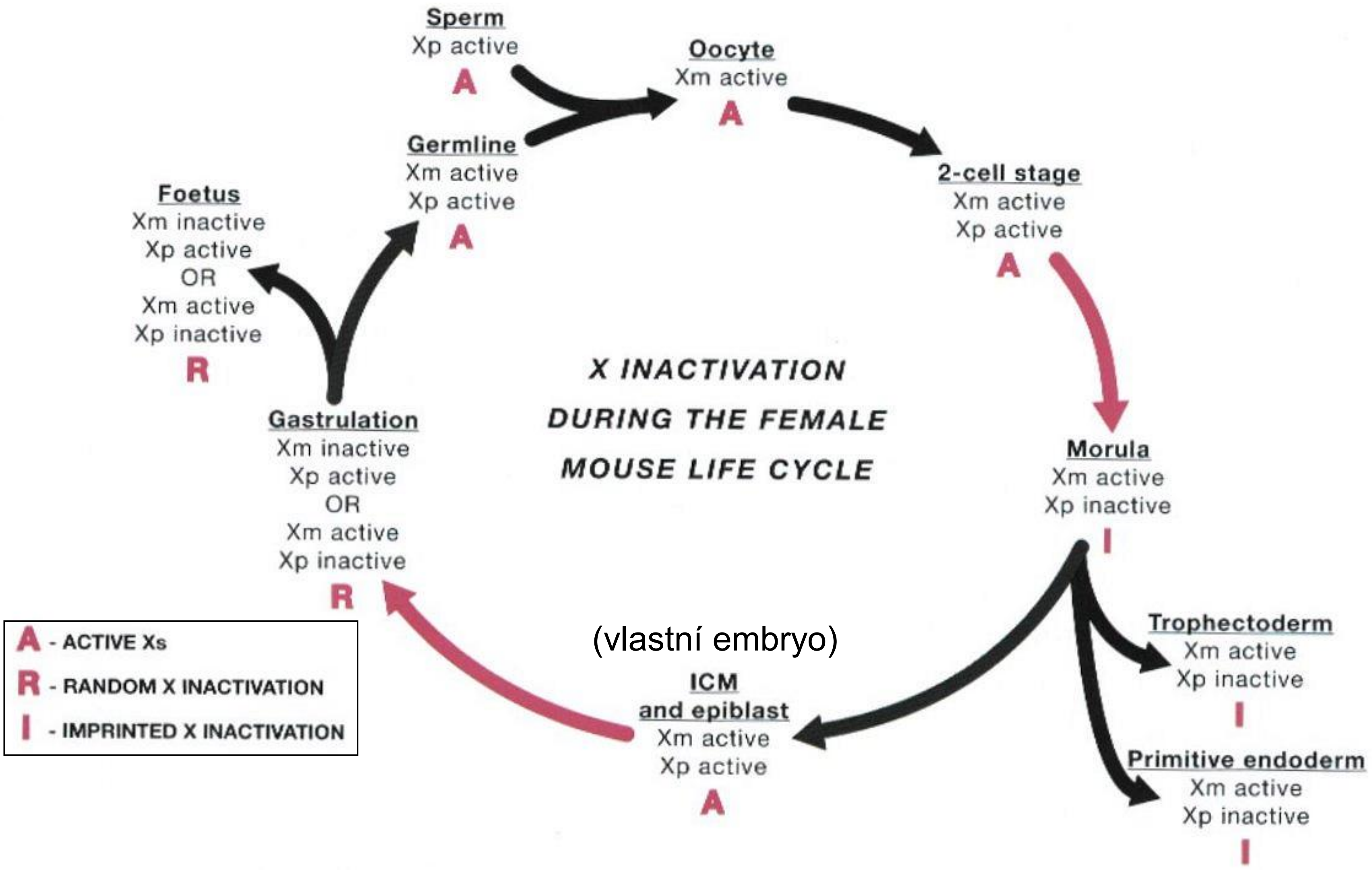
Evoluce pohlavního chromozomu Y



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

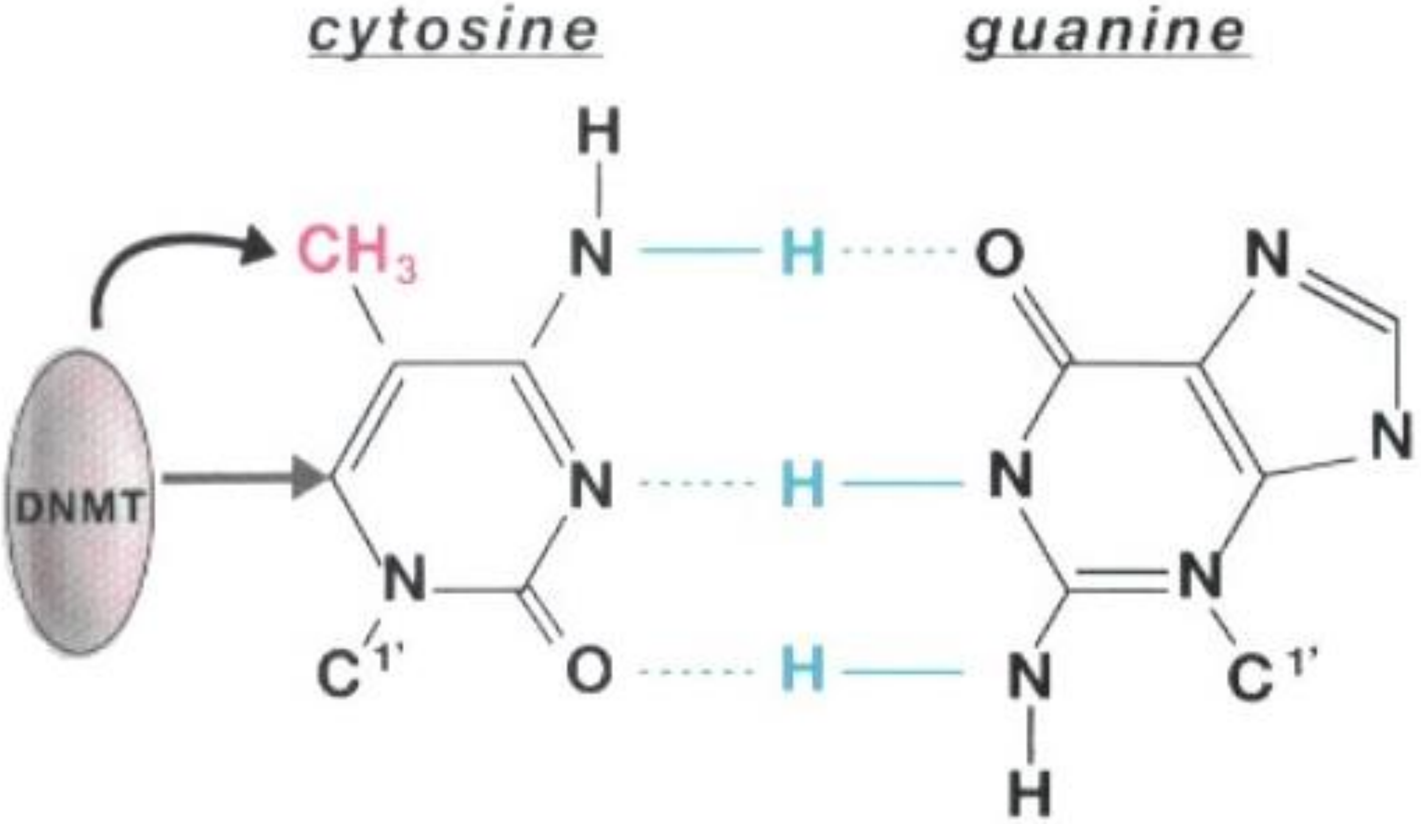
	♀	♂
Drosophila	XX	XY
savci	XX nebo XX	XY
C-elegans	XX (hermafrodit)	XO



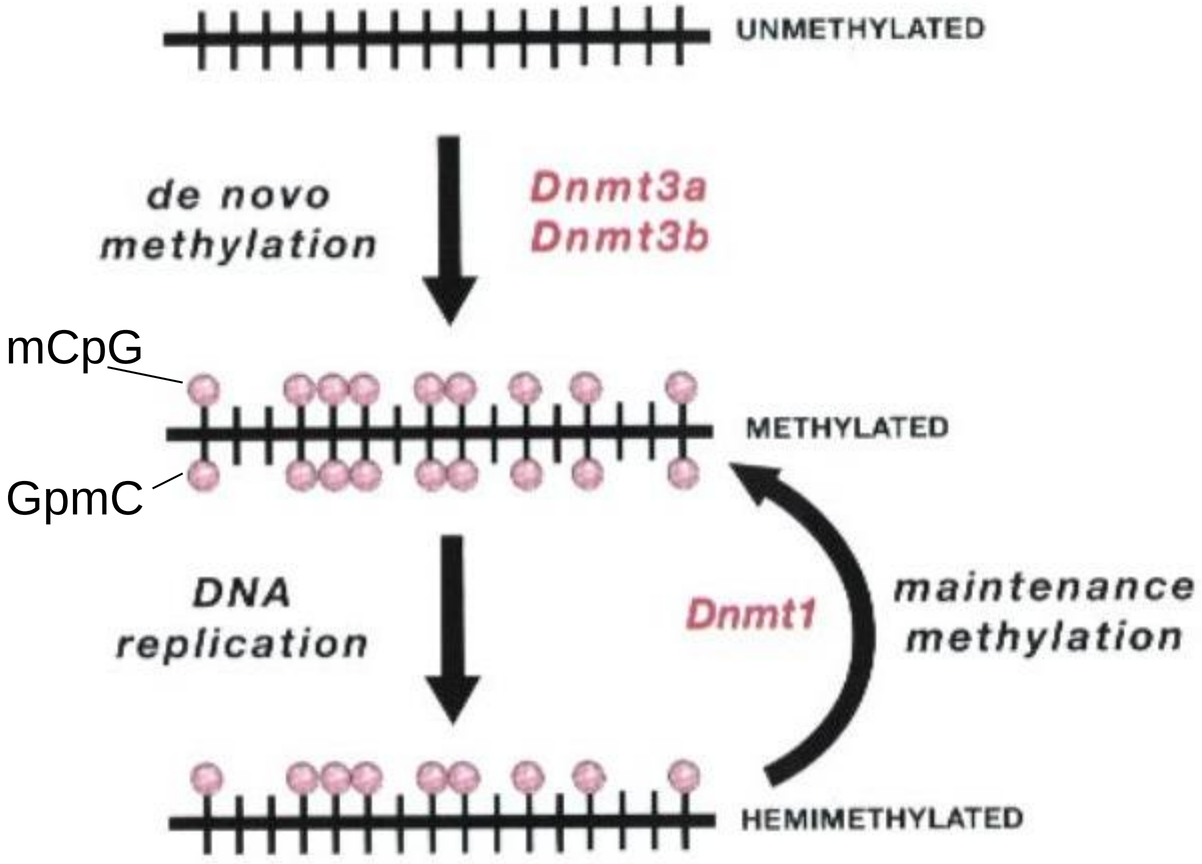
V průběhu samičího vývoje se chromozom X podrobuje inaktivaci (**R** nebo **I**) a reaktivaci (**A**). Inaktivace se nejdříve odehrává v časném preimplantovaném embryu (imprinting) a následně v buňkách epiblastu v době gastrulace (náhodná inaktivace). Inaktivní X je reaktivován především v zárodečné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

Savci:

metylace DNA

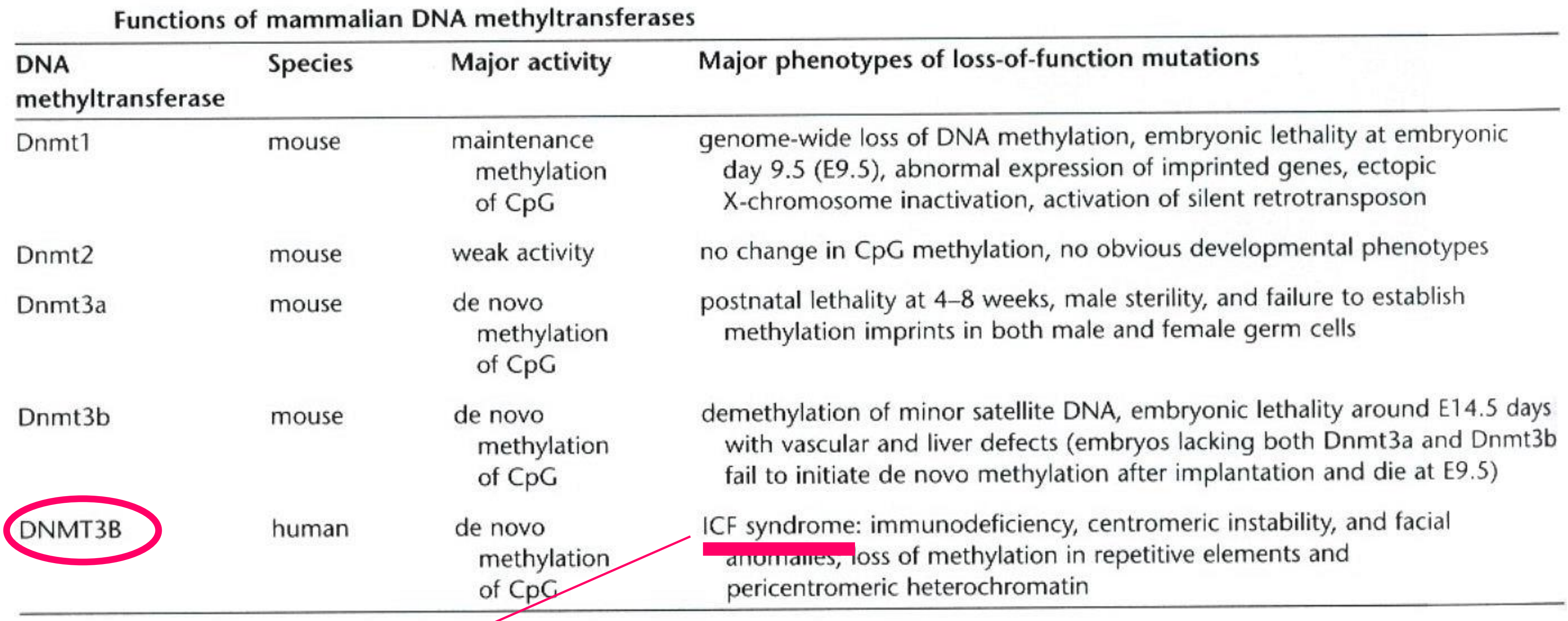


Adice metylové skupiny do 5-pozice pyrimidinového kruhu cytozinu prostorově nebrání párování bazí (GC). DNA metyltransferázy se v průběhu metylace kovalentně vážou na C-6-pyrimidinu.



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

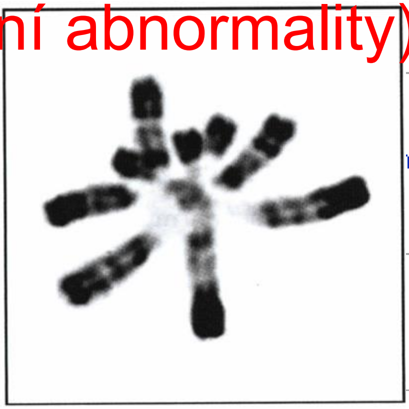
DNA methyltransferase	Species	Major activity	Major phenotypes of loss-of-function mutations
Dnmt1	mouse	maintenance methylation of CpG	genome-wide loss of DNA methylation, embryonic lethality at embryonic day 9.5 (E9.5), abnormal expression of imprinted genes, ectopic X-chromosome inactivation, activation 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)
DNMT3B	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**(munodeficience)-**C**(entromerická nestabilita)-**F**(aciální abnormality) syndromu

ICF syndrome

From Wikipedia, the free encyclopedia

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



nmune disorder.

Genetics

ICF syndrome can be caused by a mutation in the DNA-methyltransferase-3b (Dnmt3b) gene.[1]

Presentation

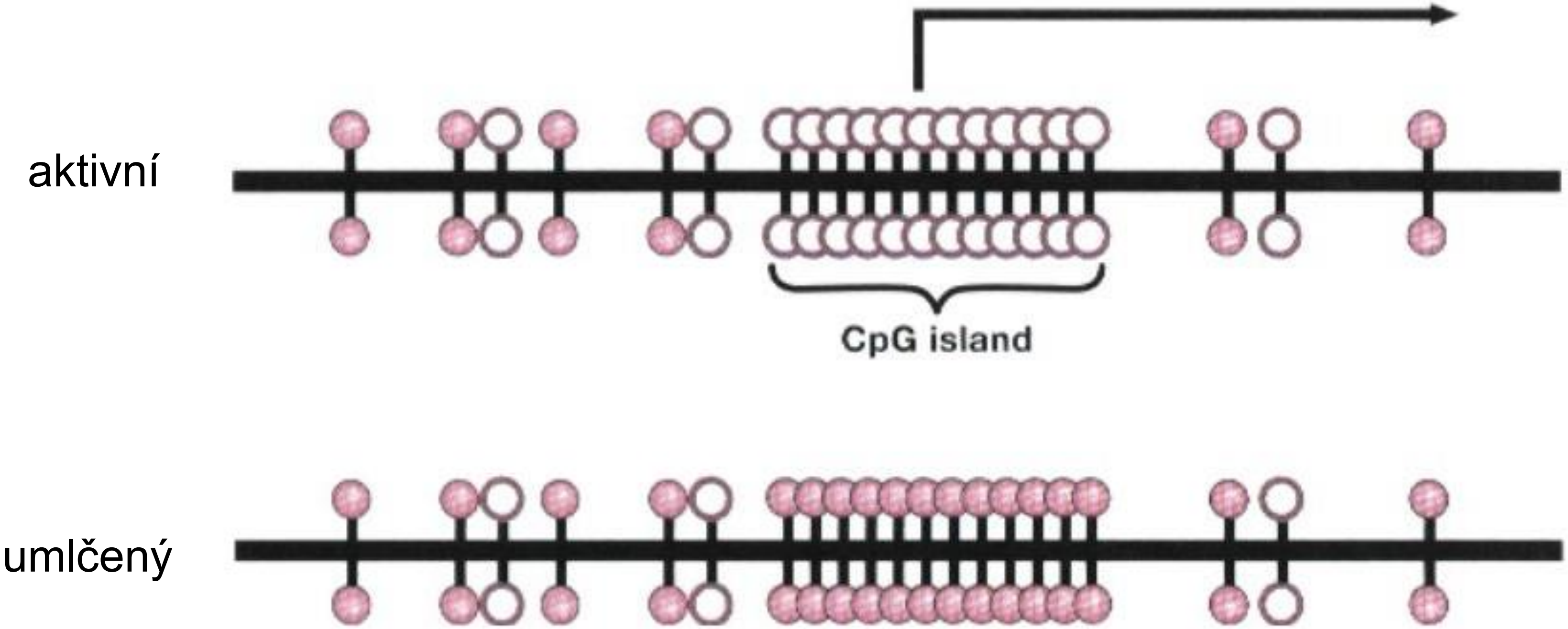
It is characterized by variable reductions in serum immunoglobulin levels which cause most ICF patients to succumb to infectious diseases before adulthood. ICF syndr

patients exhibit facial anomalies which include hypertelorism, low-set ears, epicanthal folds and macroglossia.

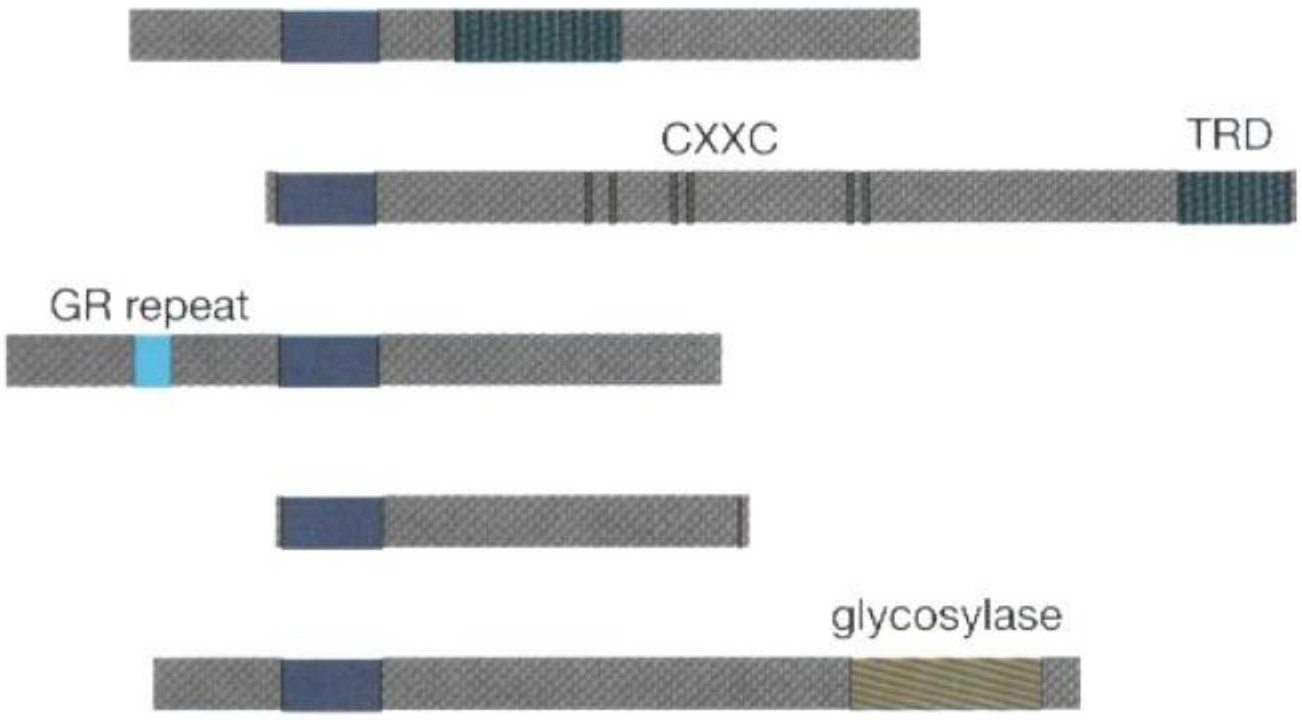
MAPPING DNA METHYLATION

To understand the functions of DNA methylation, it is first necessary to find out where it occurs in the genome. There are several methods of doing this, each with advantages and disadvantages.

- As methylation is mainly confined to CpG sequences, cleavage by restriction enzymes that recognize a CpG-containing DNA sequence has been extensively used for mapping (Bird and Southern 1978). This method has the advantage that large regions of the genome can be assayed, but it is limited to CpGs that are found within restriction enzyme sites.
- A reliable method for testing all cytosines within a region involves the **bisulfite modification** of single-stranded DNA (Frommer et al. 1992). This leads to deamination of unmodified cytosines, but 5-methylcytosine is protected. As a result, cytosines that survive bisulfite treatment are identified as methylated. Due to its high resolution and positive identification of methylated cytosine, this is the method of choice for analyzing DNA methylation patterns, although thorough analysis of large regions is time-consuming.
- Several **PCR-based methods** that depend on prior bisulfite treatment of DNA have been developed to accelerate the analysis of regions of interest (see, e.g., Herman et al. 1996). These methods are highly convenient, but by focusing on a few CpG sites within a region, they sacrifice the detailed information that would be revealed by bisulfite sequencing.
- Use of **microarrays** has recently been adapted for mapping DNA methylation. For example, DNA that is resistant to degradation by the 5-methylcytosine-specific nuclease McrBC can be probed against tiled arrays of genomic DNA sequences to give an overview of the methylation level across a specific region (Martienssen et al. 2005). Probes for tiled arrays can also be immunoprecipitated using 5-methylcytosine-specific antibodies, allowing a global survey of DNA methylation levels.



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 clasping, nonrhythmic breathing, and abnormal gait; postnatal survival ~10 weeks
MECP2	binds mCpG with adjacent AT run; transcriptional repressor	human	heterozygotes suffer from Rett syndrome, 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)