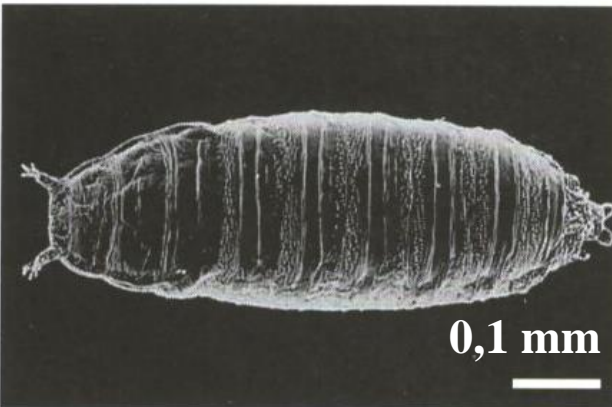
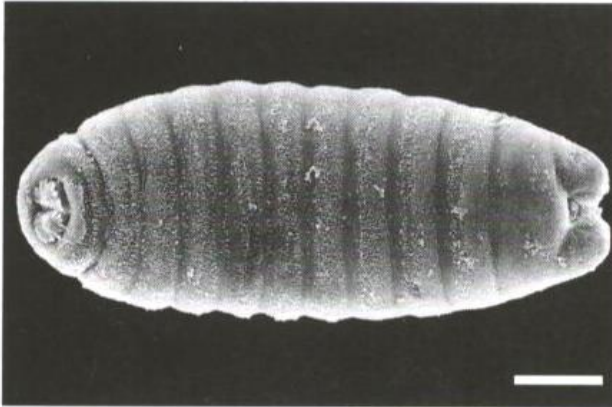
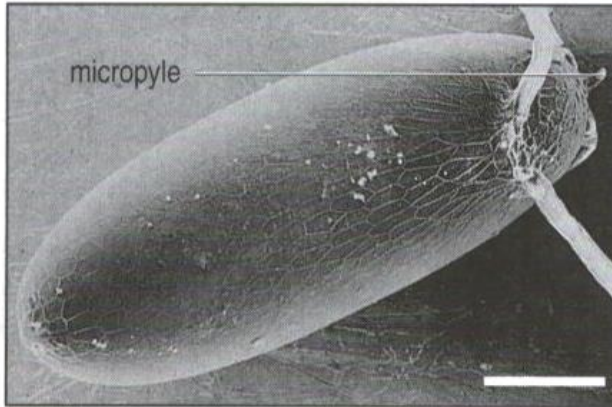


*Její Veličenstvo
královna
Octomilka*

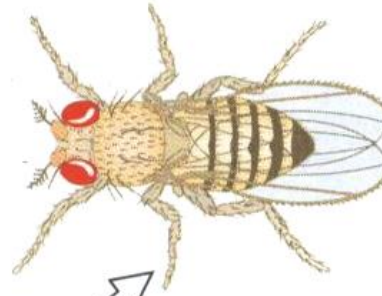


**Thomas Hunt
Morgan
(1866-1945)**

Drosophila melanogaster : životní cyklus

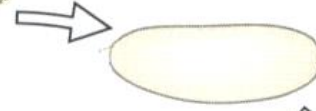


dospělec



metamorfóza

oplozené vajíčko



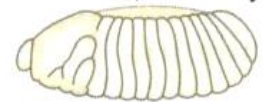
rýhování

Syncitial blastoderm



gastrulace

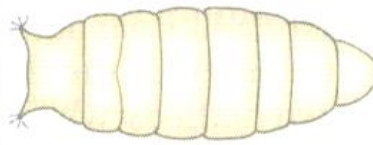
Embryo



vylíhnutí



kukla



3.

2.

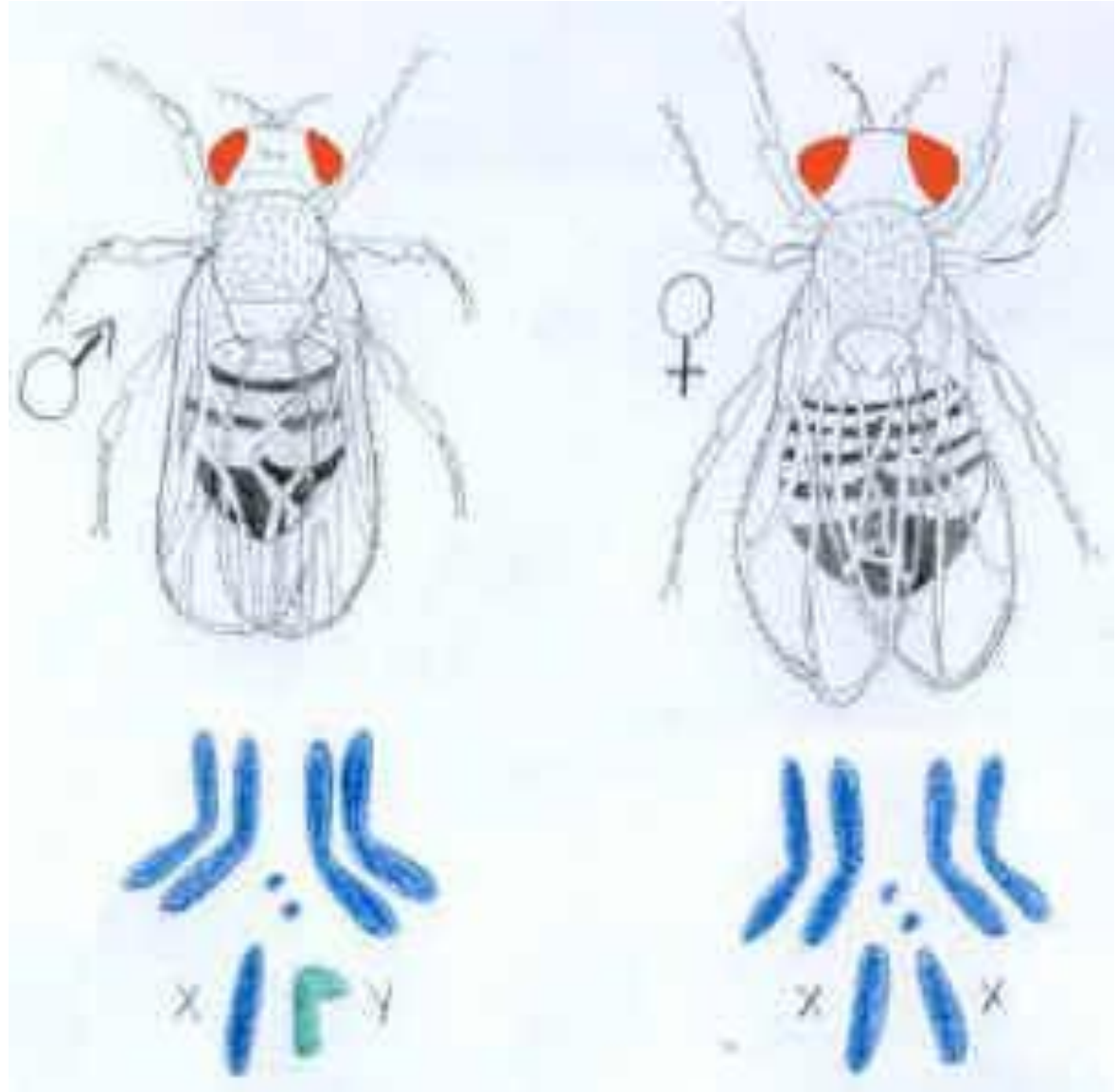
1.

larvy 1.- 3. instaru

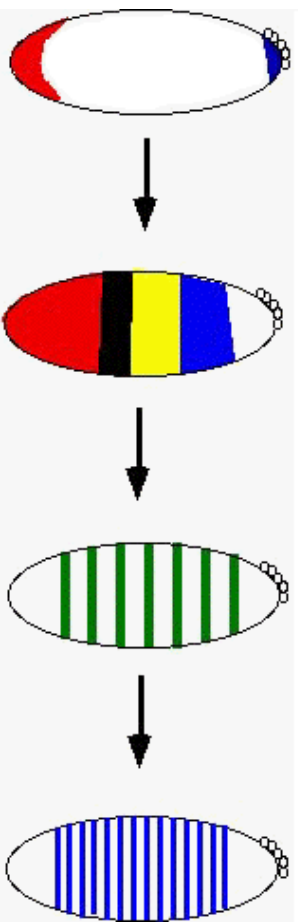


Chromosomy *Drosophila*

- 3 páry autosomů
- samečci a samičky se liší v pohlavních chromosomech
 - samečci XY
 - samičky XX



Individuální vývin octomilky je kaskádou řízenou maternálními a zygotickými geny

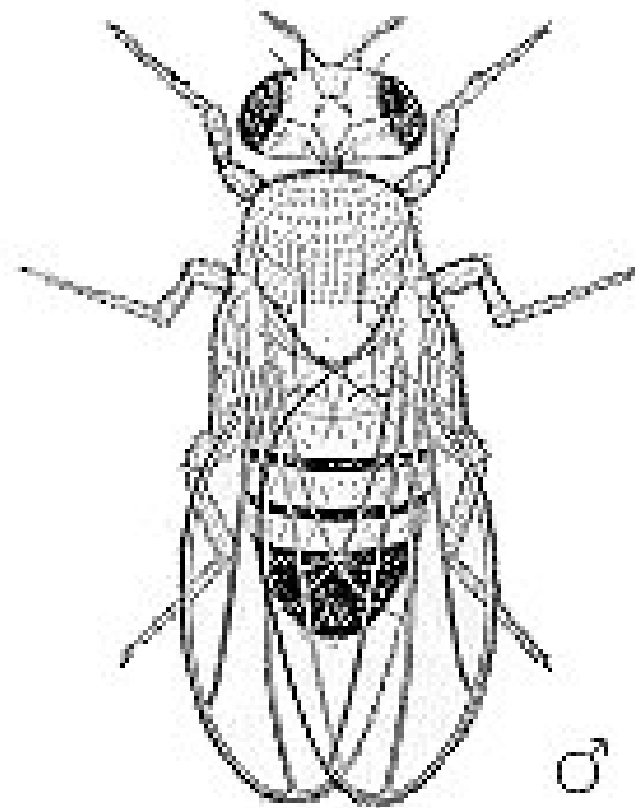
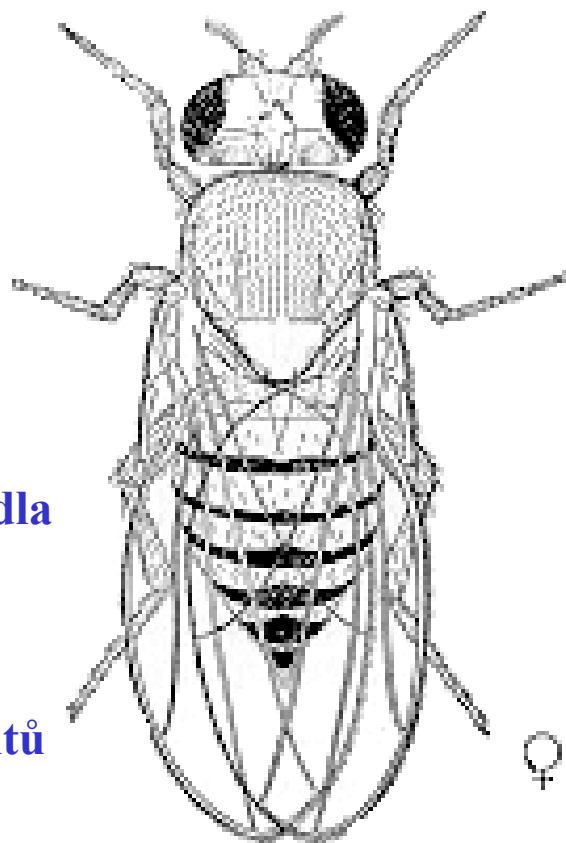


geny
maternální

velkých mezer

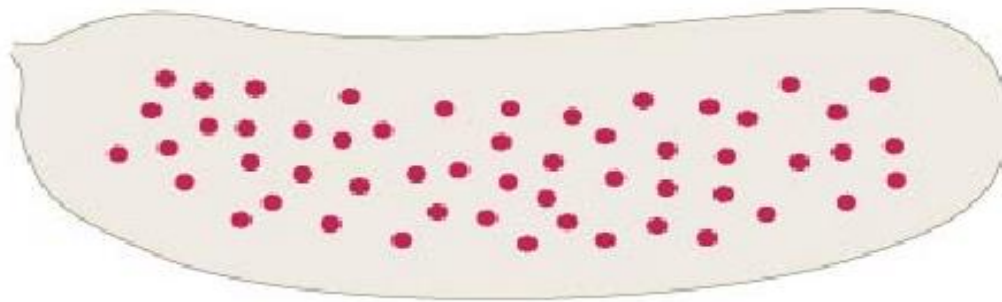
párového pravidla

polarity segmentů

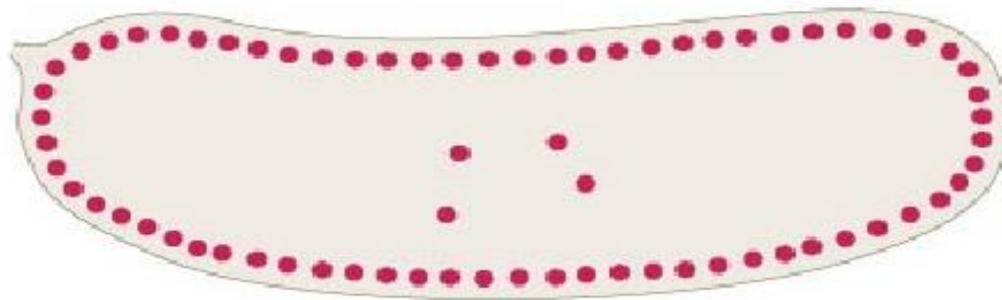




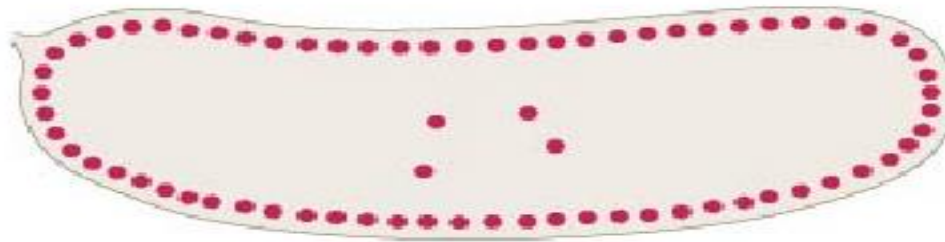
fúzí parentálních gamet vzniká diploidní zygota



9 cyklů dělení jader vytváří mnohojaderné cyncytium



jádra migrují k povrchu vajíčka – jaderný blastoderm

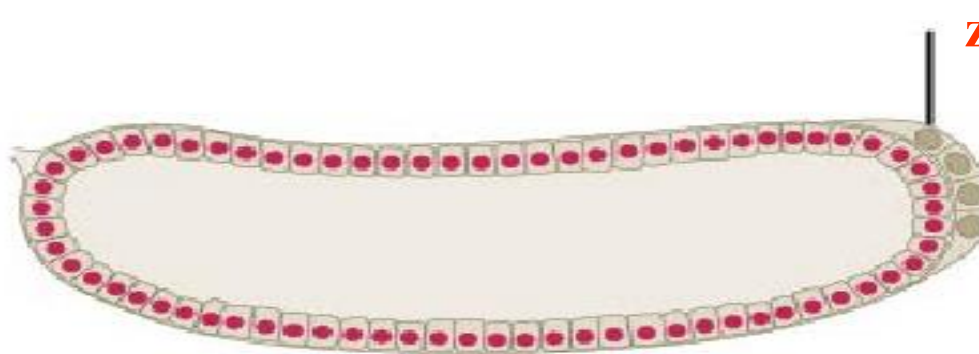


jádra migrují k povrchu vajíčka – jaderný blastoderm



**pólové buňky
tvoří posteriorní pól**

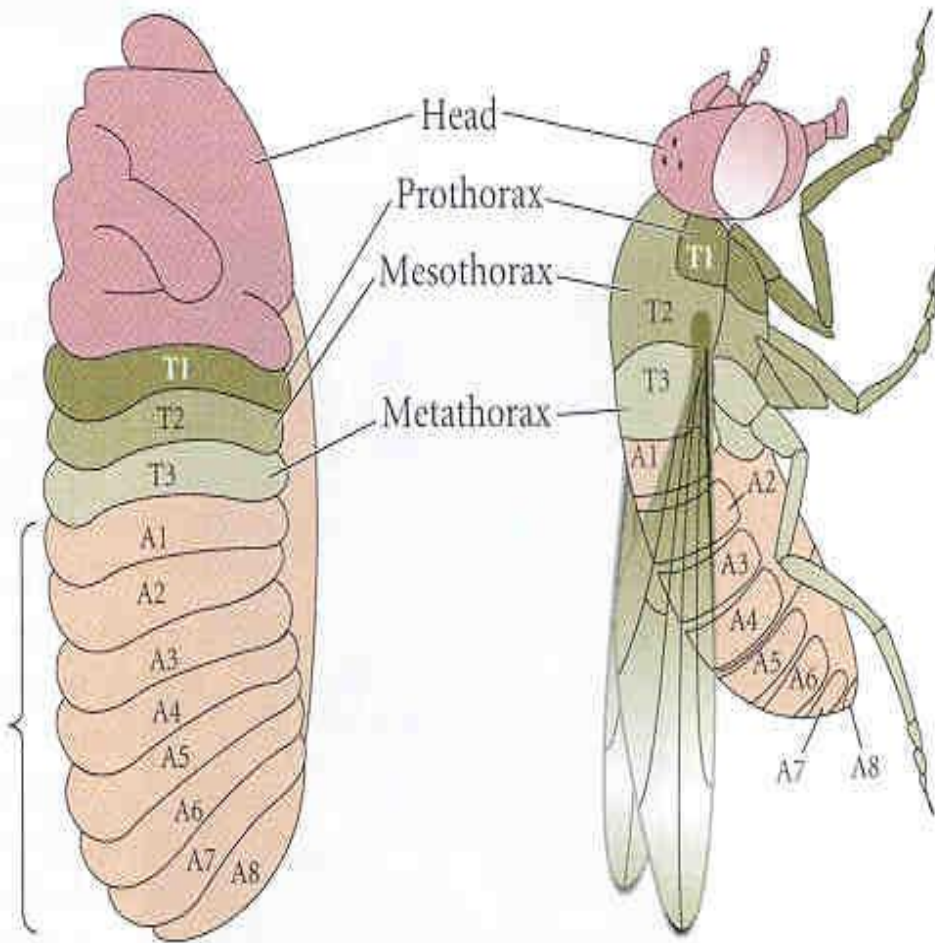
4 další cykly dělení jader u buněčného povrchu



záradečné buňky

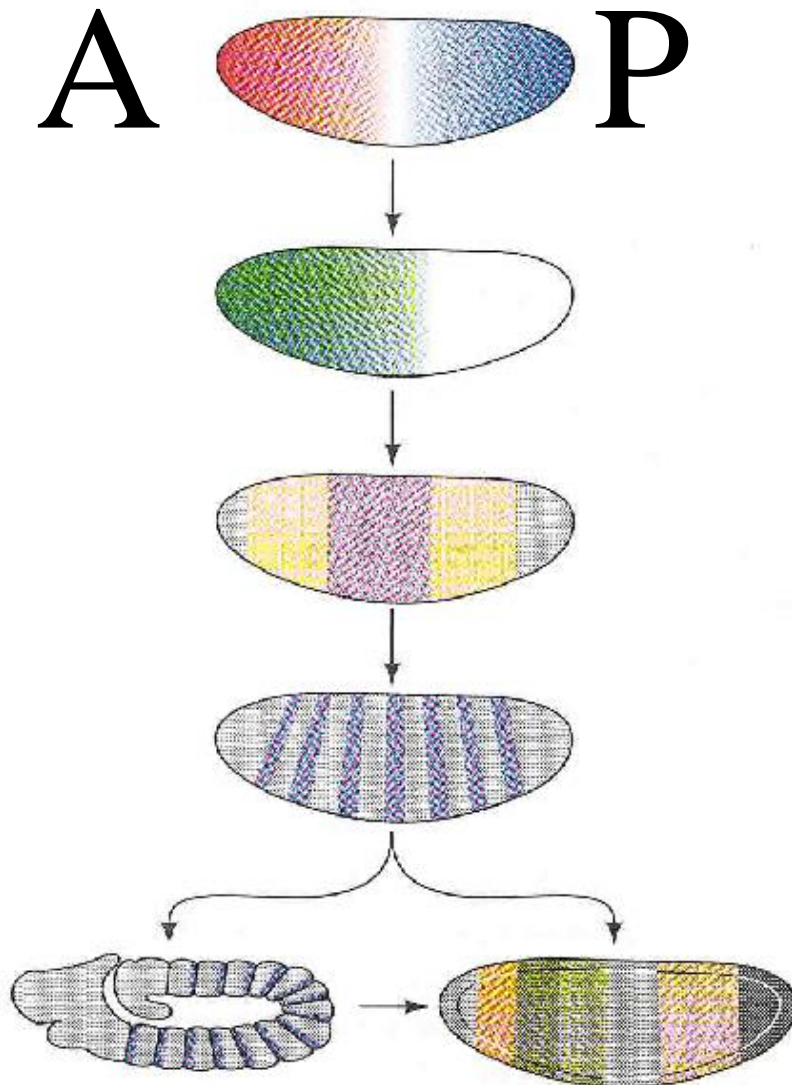
tvorba jednobuněčné vrstvy – buněčný blastoderm

Vývoj drosofily



- **rovnání larvální a adultní segmentace**
- **plán těla zahrnuje hlavovou oblast, hrudní články a zadečkové**
 - prothorax (T1) má jen nohy
 - mesothorax (T2) má nohy a křídla
 - metathorax (T3) má nohy a kyvadélka

Specifikace hlavní tělní osy

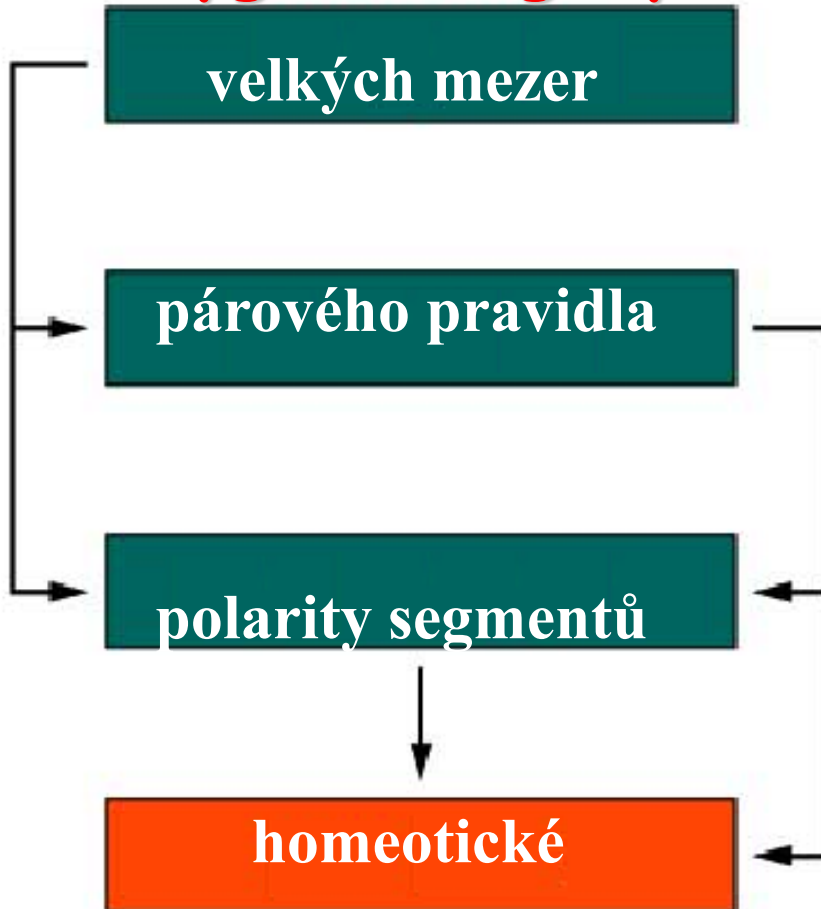


- anterior-posteriorní polarita
- geny s maternálním účinkem
- geny velkých mezer
- geny párového pravidla
- geny polarity segmentů
- homeotické geny

geny s maternálním účinkem



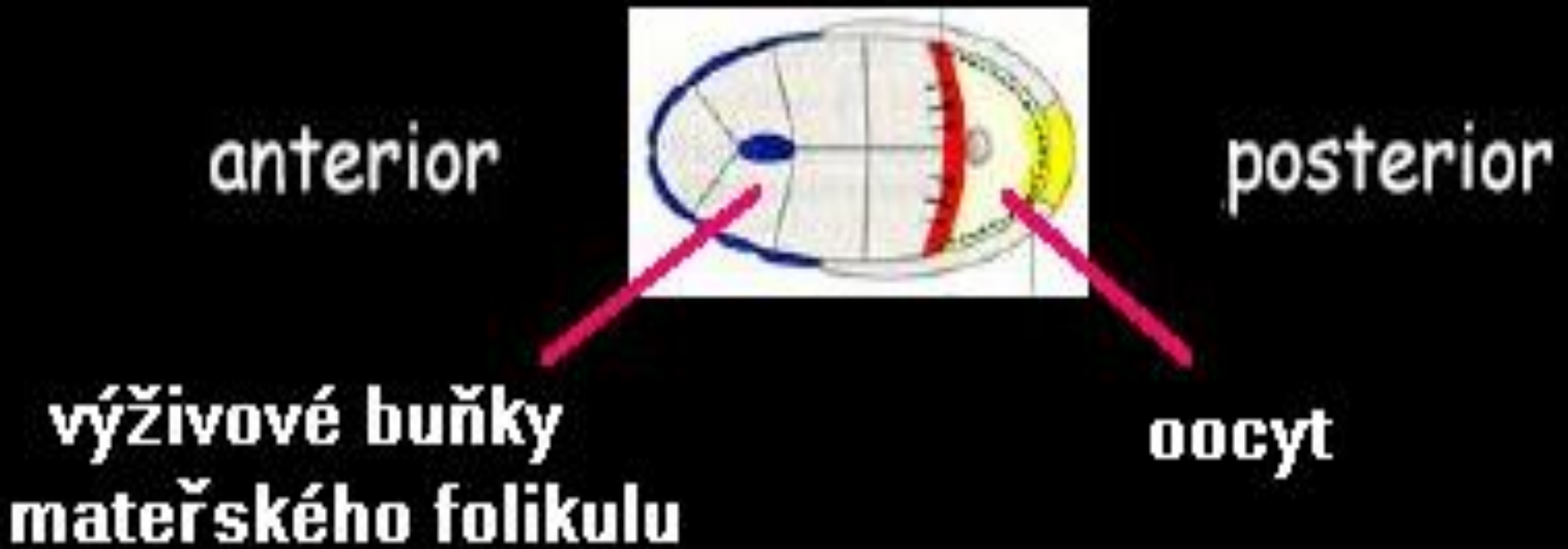
zygotické geny



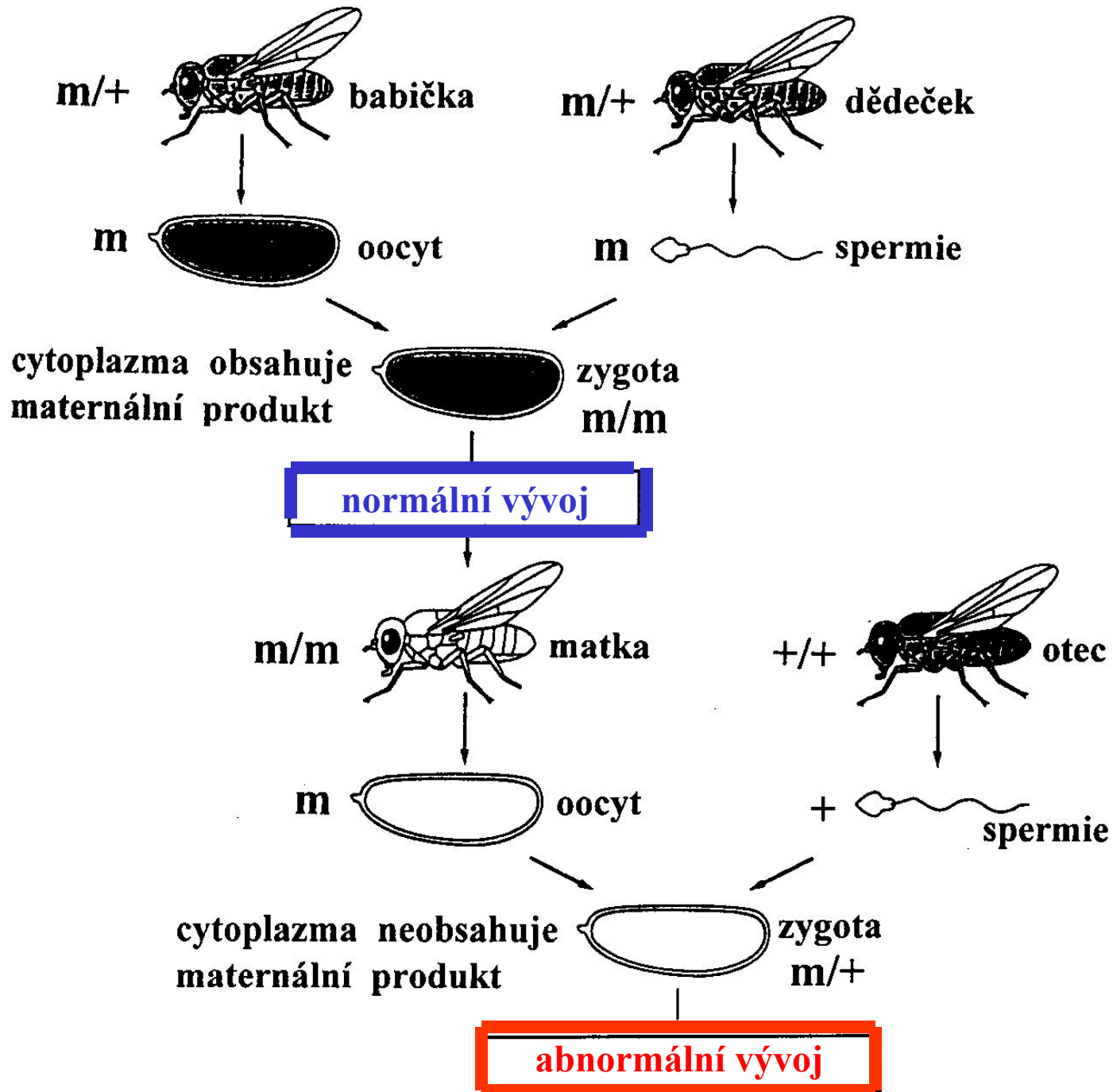
Geny s maternálním účinkem

- translace mRNA bicoid a nanos po fertilizaci
- gradient proteinu Bicoid aktivuje více transkripci genu hunchback v anterioru
- současně protein Bicoid inhibuje translaci caudal mRNA
- gradient proteinu Nanos v posterioru inhibuje translaci mRNA Hunchback, zatímco protein Caudal se tvoří v posterioru
- proteiny Bicoid a Hunchback aktivují geny odpovědné za specifikaci anteriorní části těla
- protein Caudal aktivuje geny odpovědné za posteriorní vývin
- nesegmentované anteriorní a posteriorní póly jsou regulovány aktivací proteinu Torso v anterior- a posterior-pólech

Embrya drosofily mají anteriorně-posteriorní a dorzo-ventrální osy, které jsou založeny prezygoticky maternálními genovými produkty.

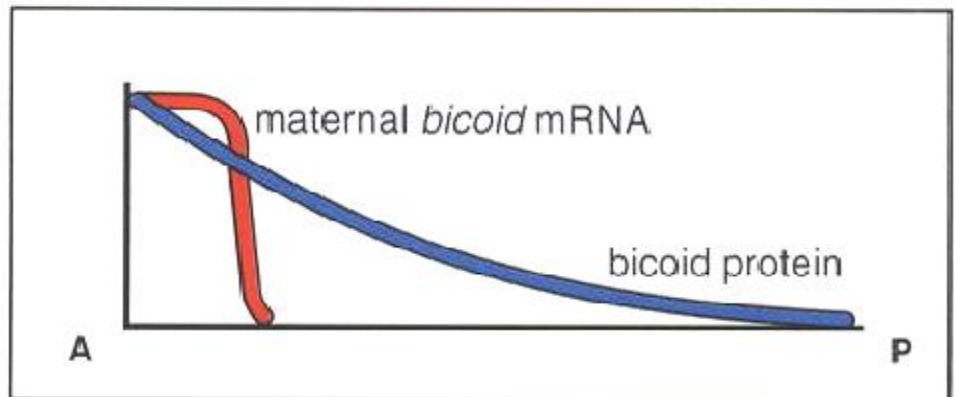
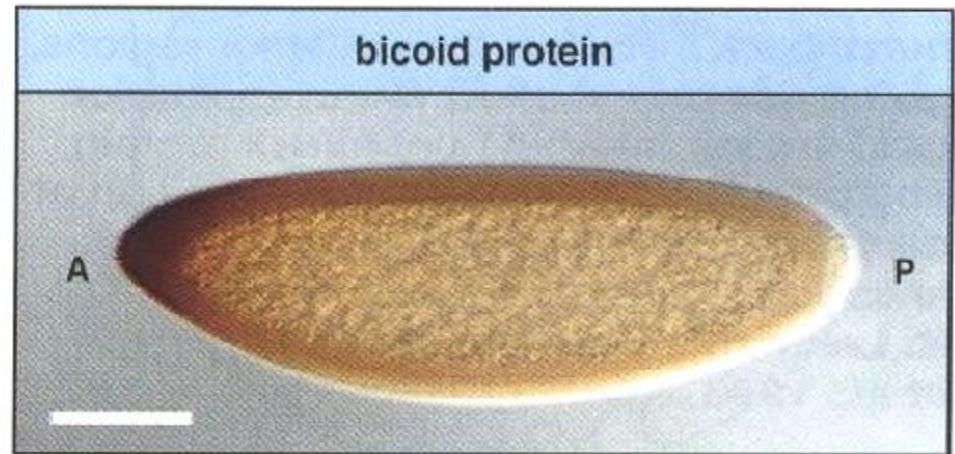
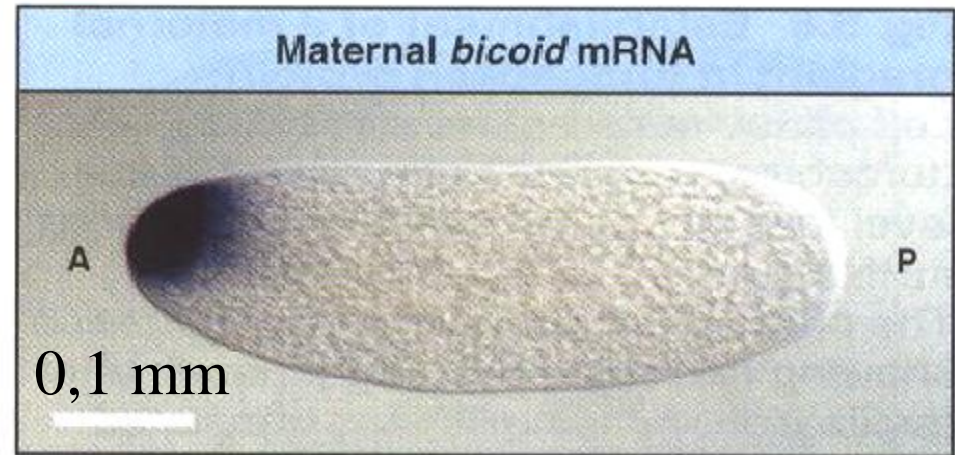


Dědičnost genů s maternálním účinkem



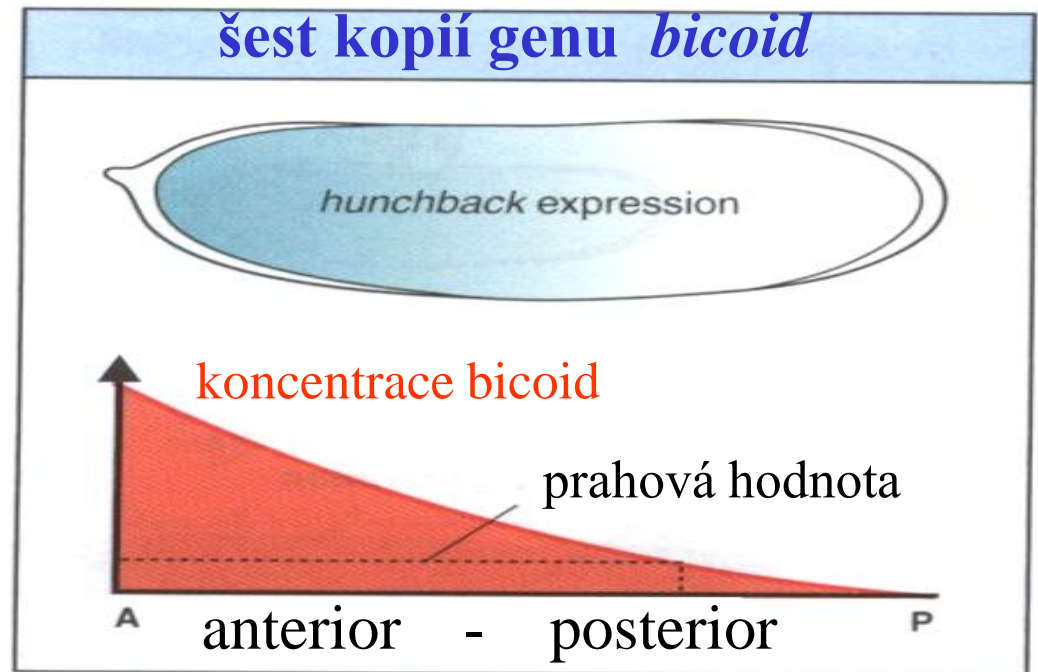
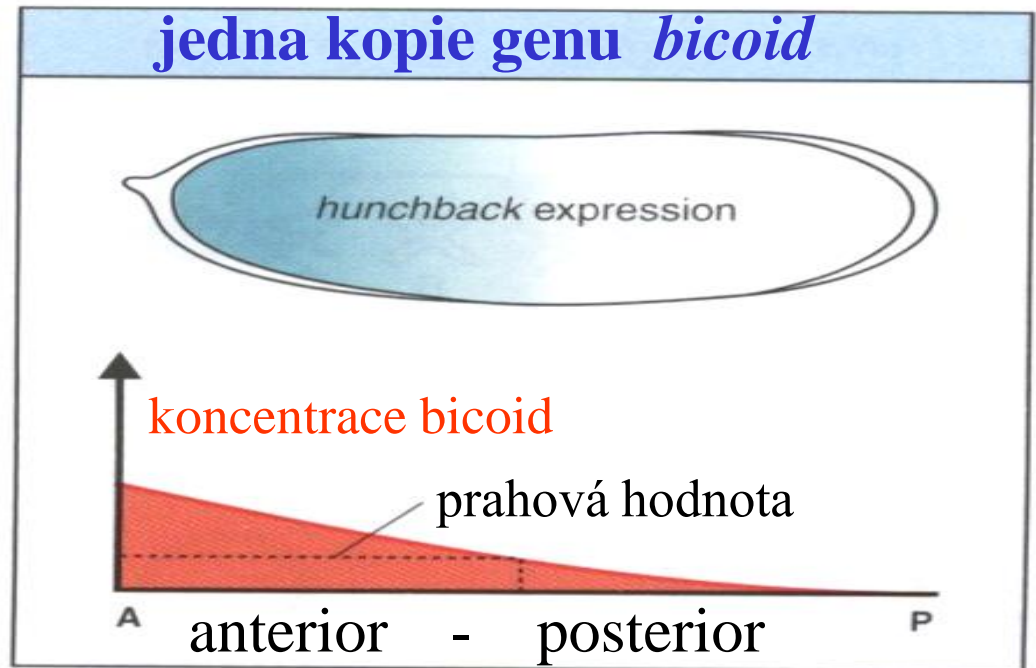
Distribuce maternální mRNA genu *bicoid* ve vajíčku

a proteinu *bicoid* po fertilizaci

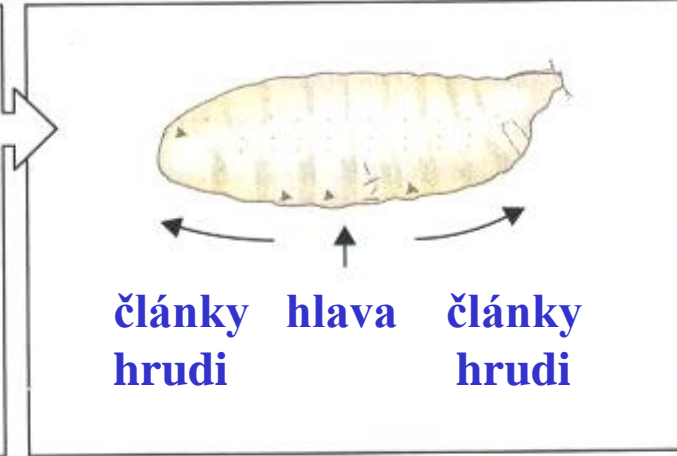
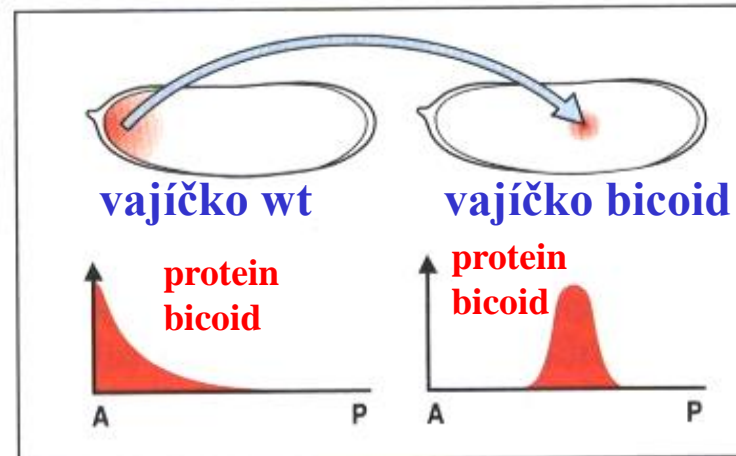
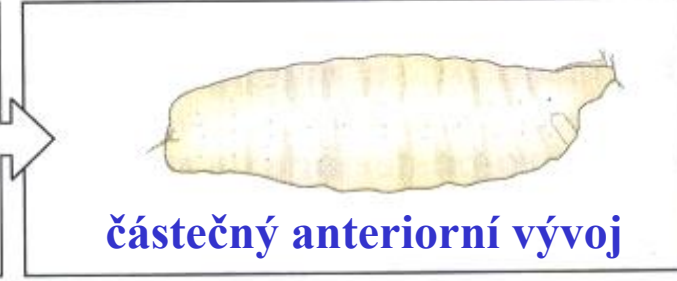
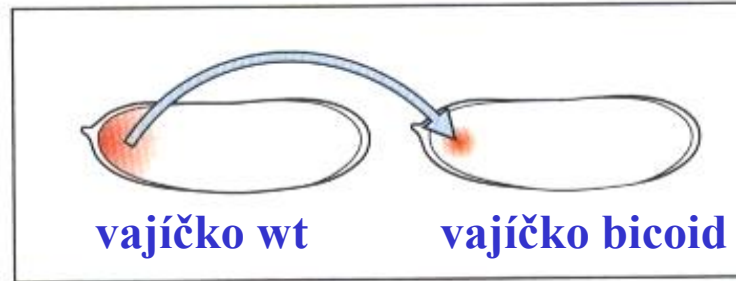
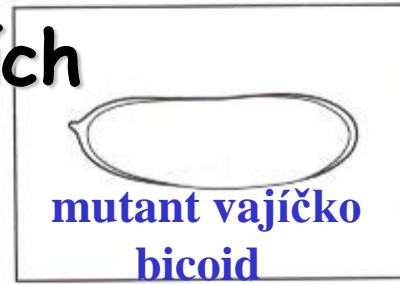
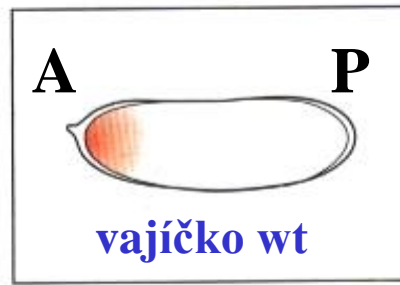


Hladina maternálníhoho proteinu bicoid řídí expresi zygotického genu *hunchback*

zvýšený počet funkčních maternálních kopií genu *bicoid* vede ke zvýšení koncentrace proteinu ve vajíčku i rozšíření účinku směrem k posterioru



Úloha produktu maternálního genu *bicoid* rozhoduje o tvorbě anteriorních struktur embrya drosofily



Transplantace pólové cytoplasmy může indukovat tvorbu zárodečné linie

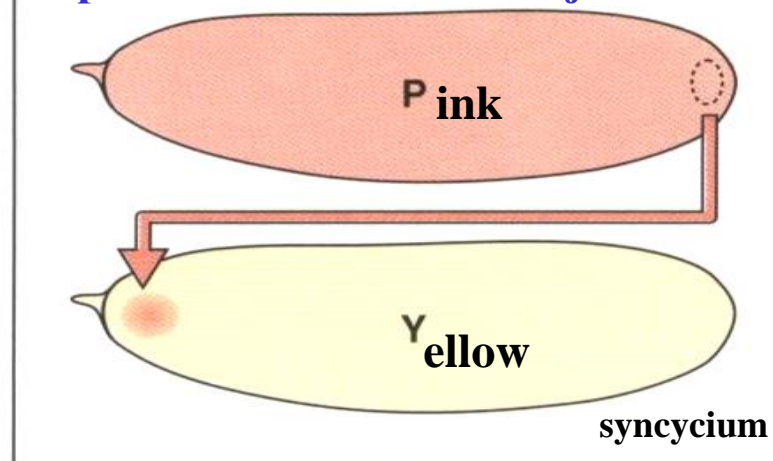
...

primordiální zárodečné buňky jsou prvními odlišnými, na posteriorním konci

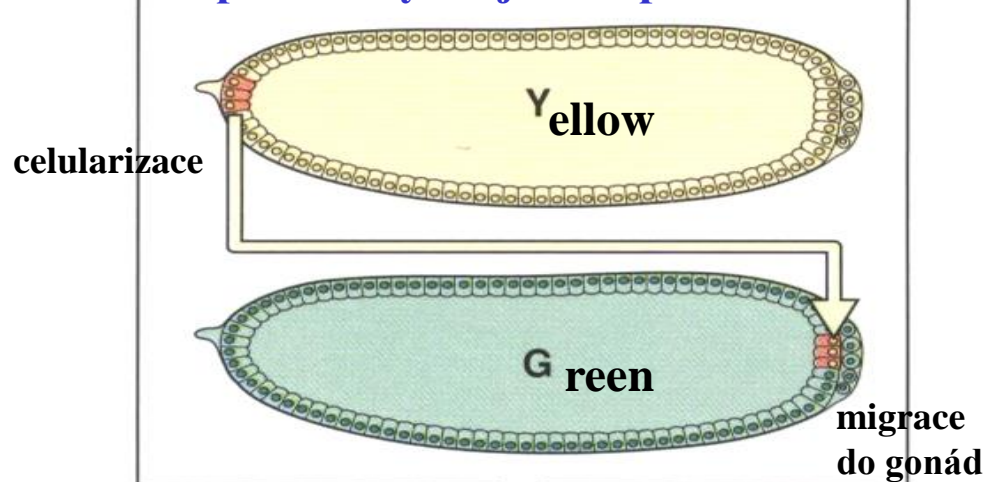
...

u drosofily, hlístice (granule P) a žab

cytoplasma posterioru oplozeného vajíčka přenesena do anterioru jiného



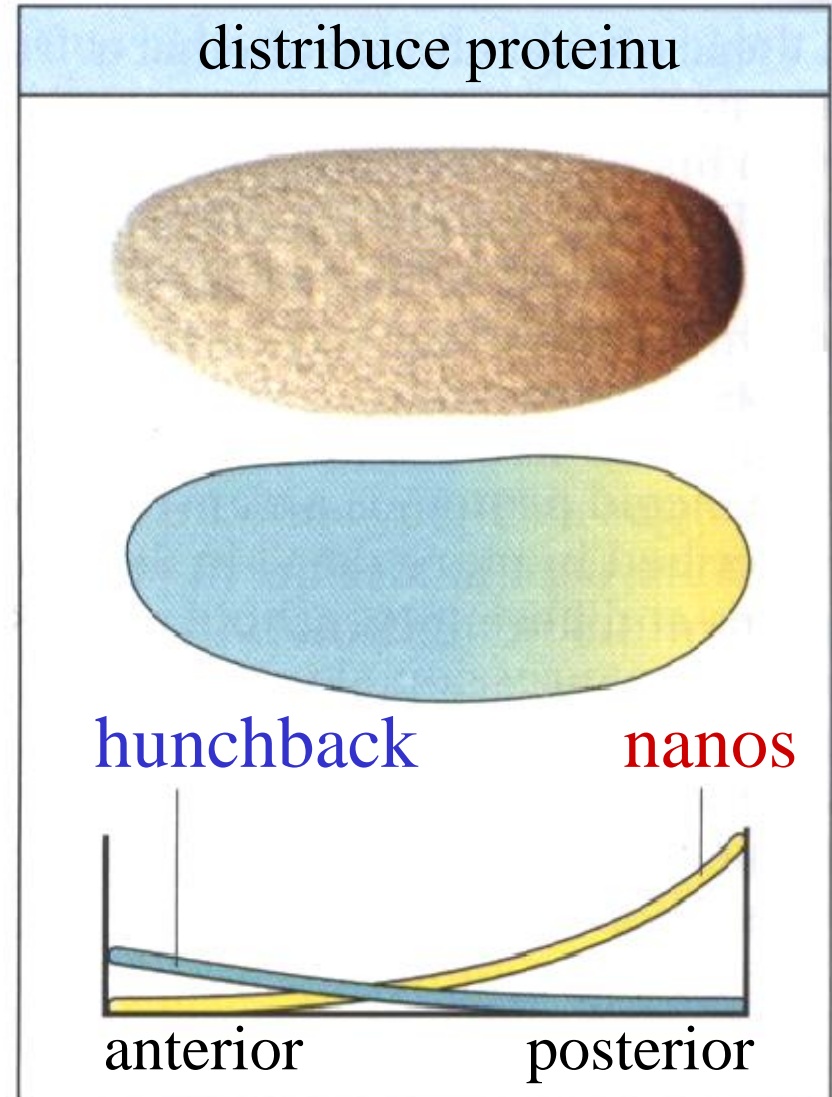
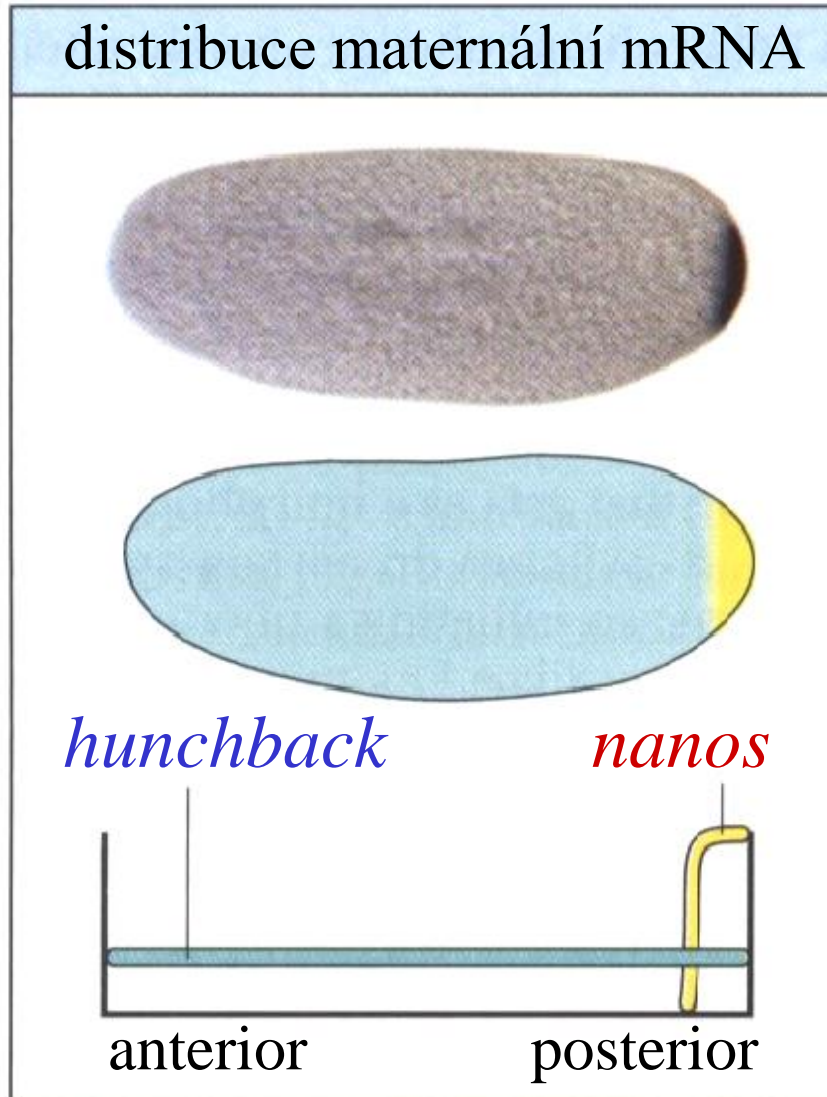
anteriorní buňky (s pólovou plasmou) přeneseny do jiného posterioru



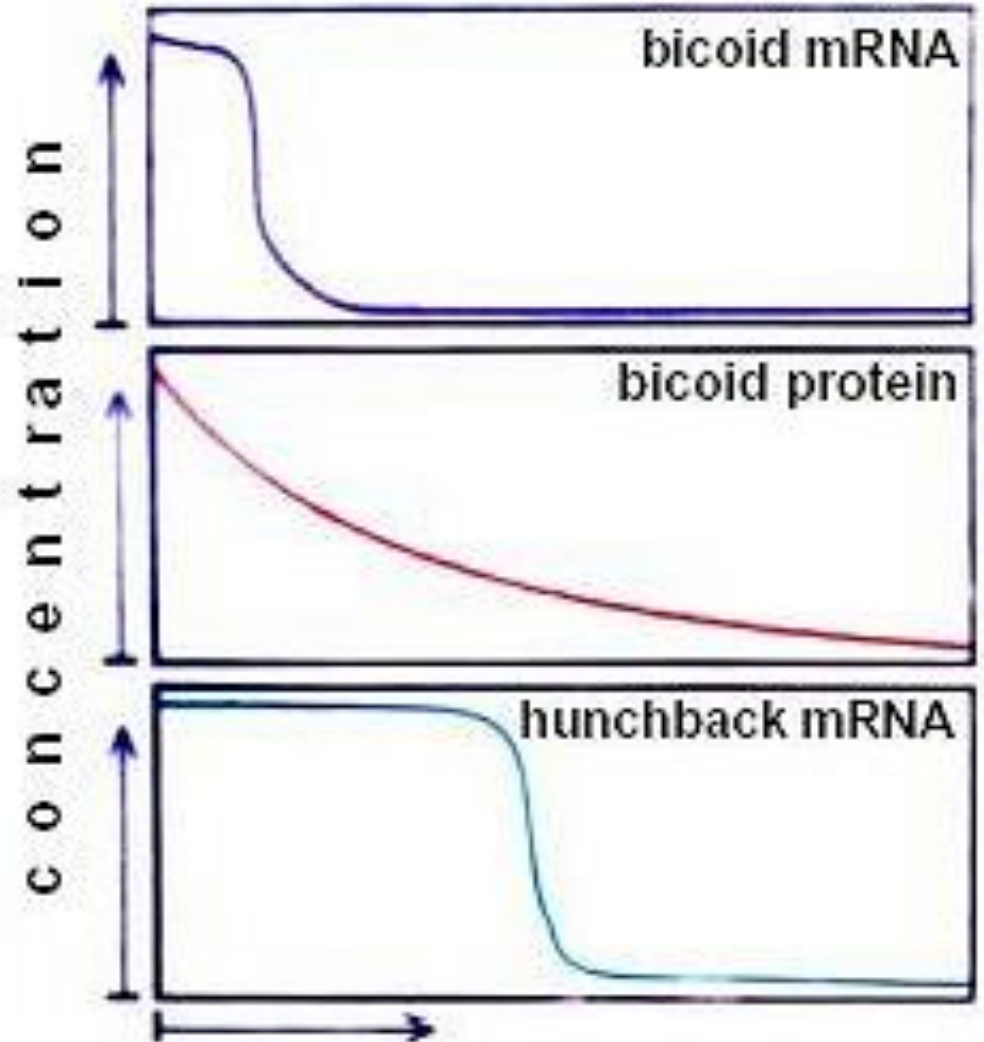
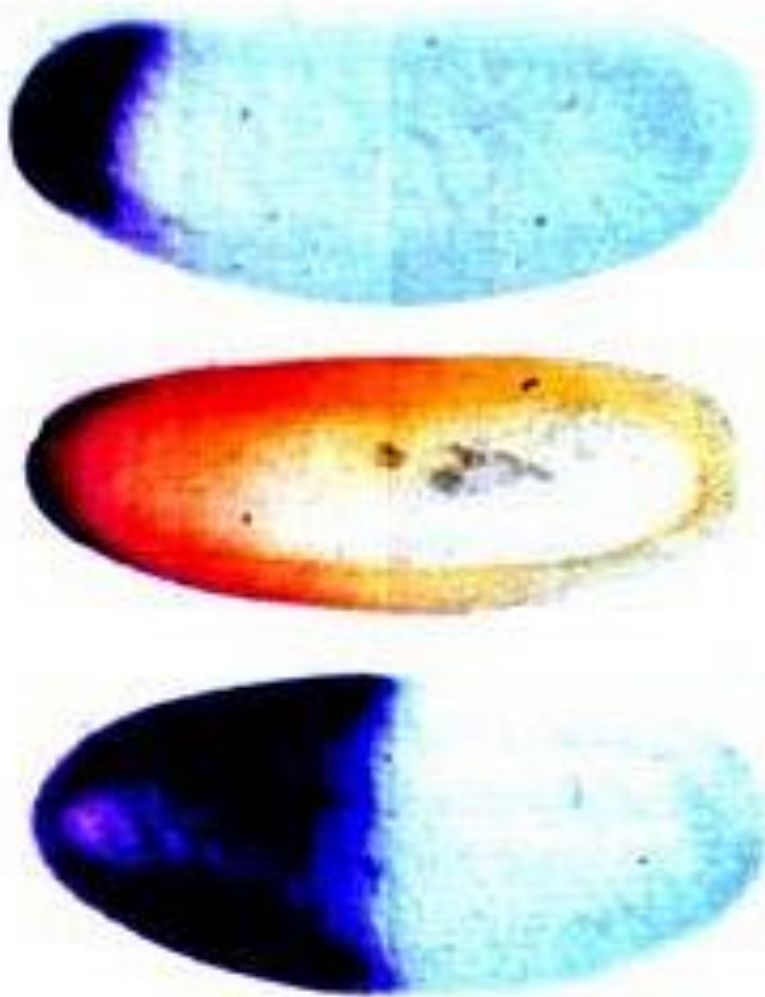
moucha G vytváří zárodečné buňky s genotypem G a Y

Maternální podstata A – P gradientu proteinu hunchback

- po fertilizaci je *nanos* mRNA translatována
a protein brání translaci *hunchback* mRNA v posterioru



Gradient maternální bicoid RNA v oocyty drosofily spouští transkripci zygotického genu velkých mezer



Exprese zygotického genu *hunchback* je řízena maternálním proteinem bicoid

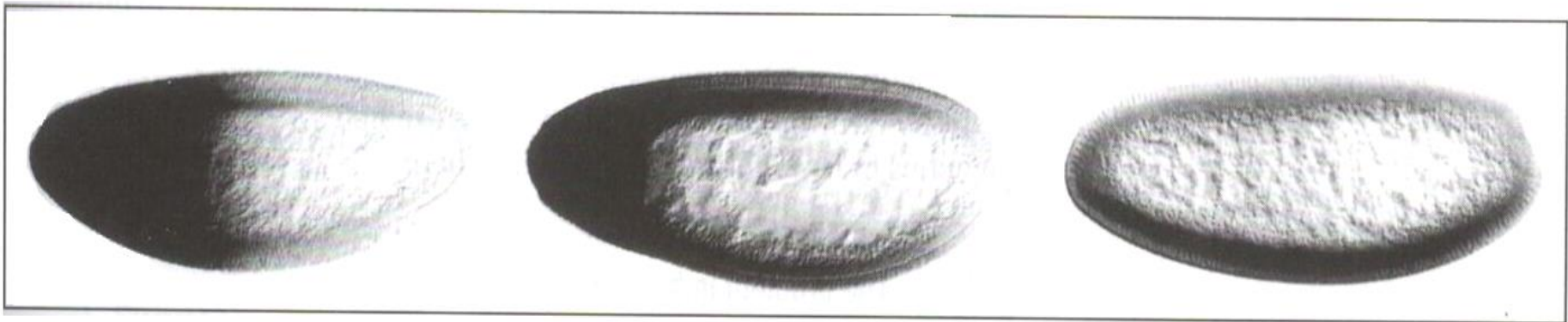
promotor genu *hunchback* má vazebné místo k proteinu bicoid

chimérický reportérový gen *hunchback*

normální promotor

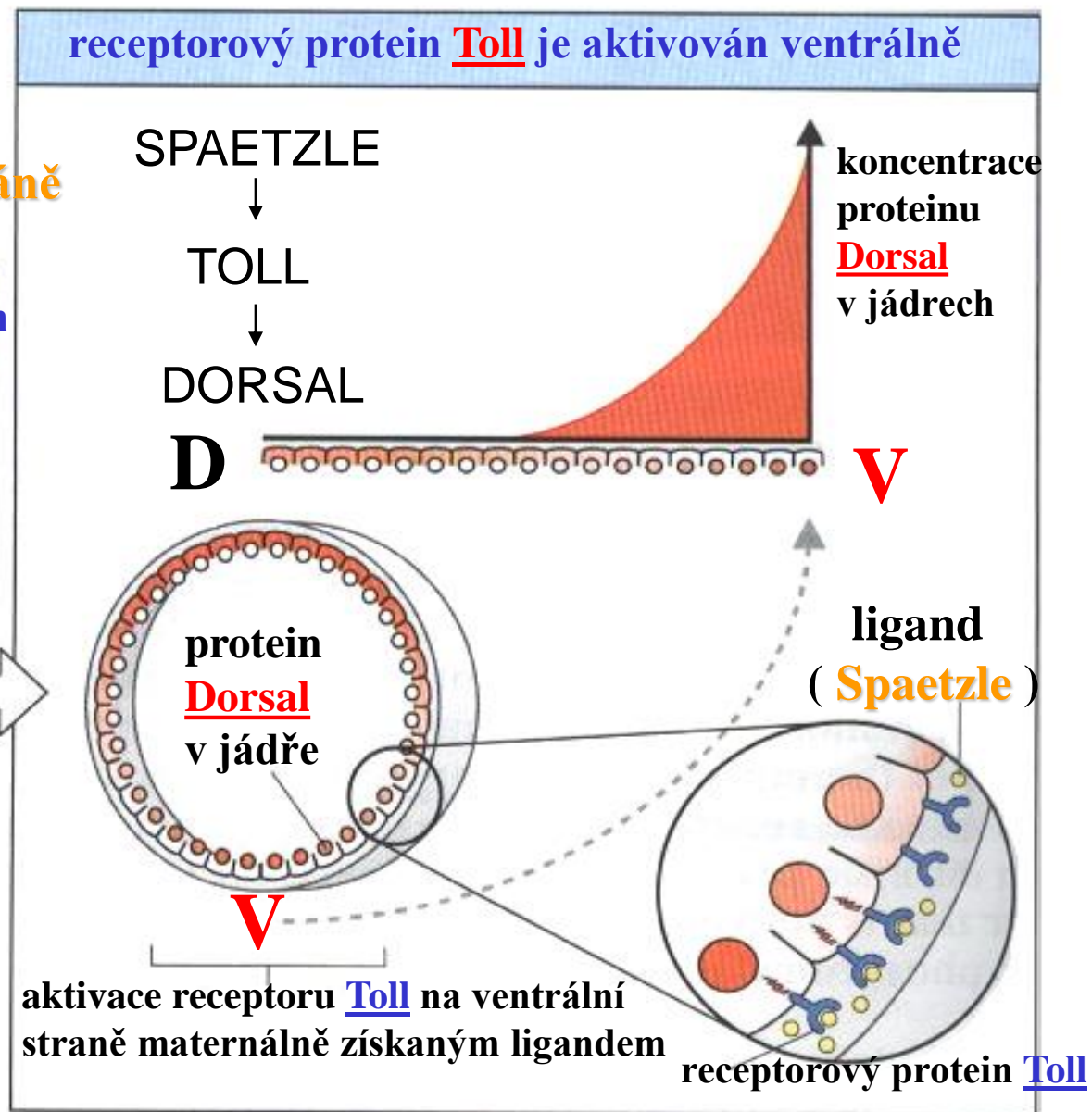
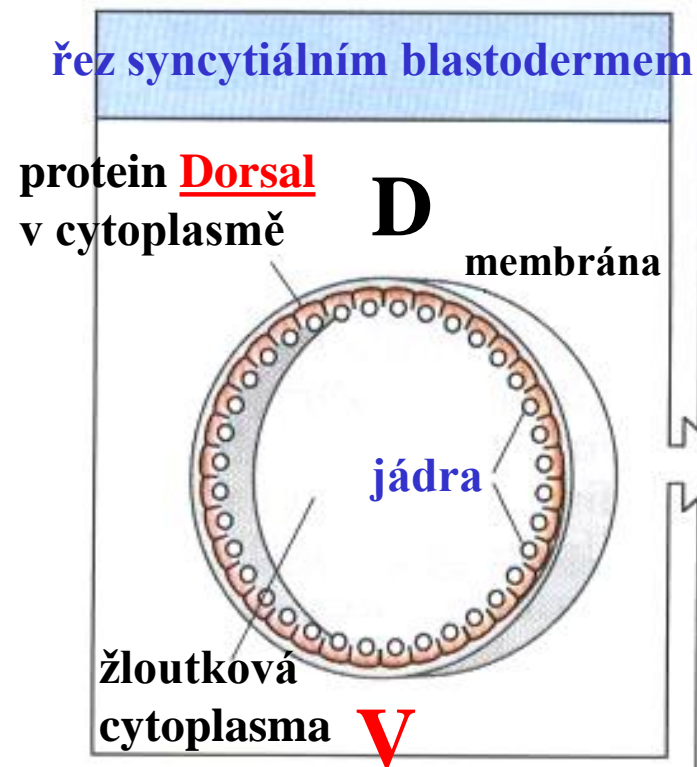
„částečný“ promotor

delece promotoru



Dorso-ventrální orientace embrya je určována maternálním faktorem

kaskáda vede od ventrální posttranslační úpravy maternálního proteinu Spaetzle uloženého v membráně

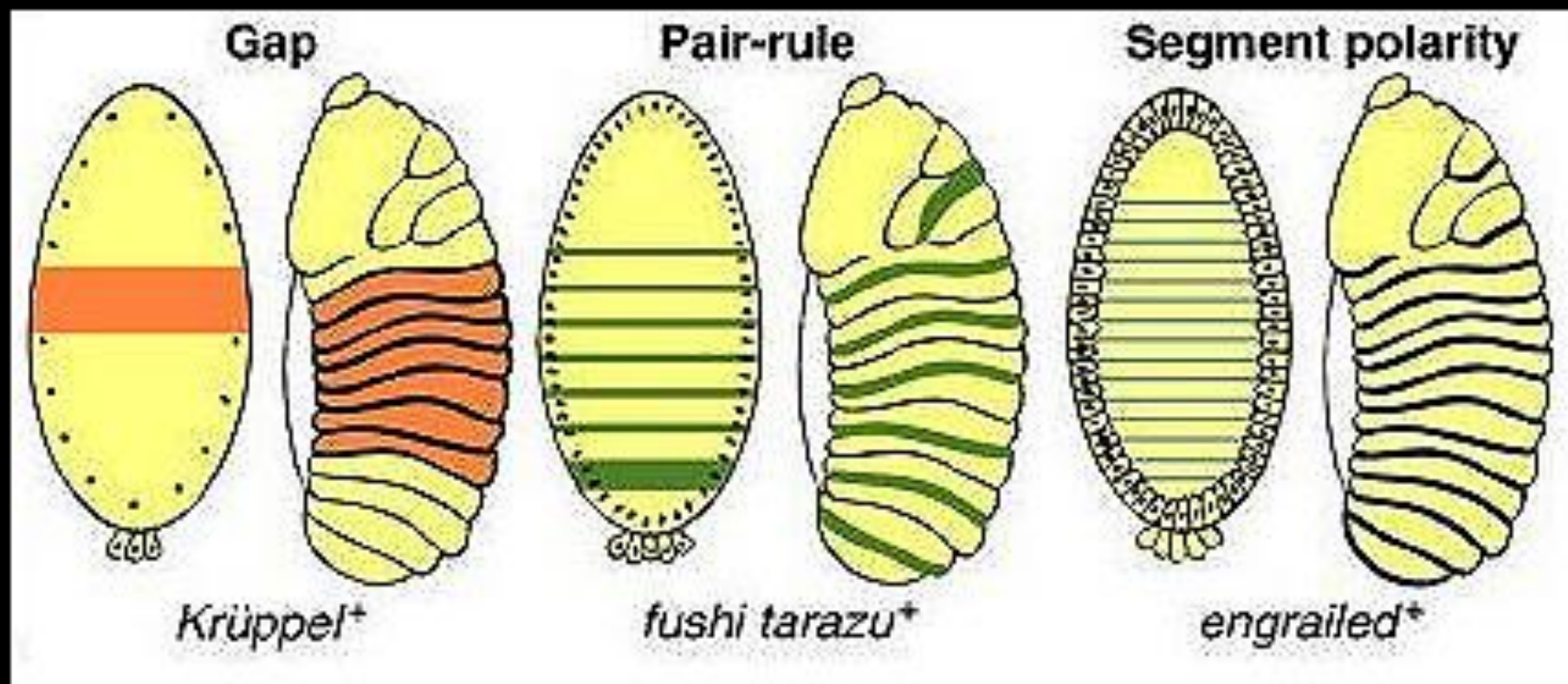


Vývojová kaskáda tvorby tělního plánu drosofily, SEGMENTAČNÍ GENY :

geny velkých mezer

geny párového účinku

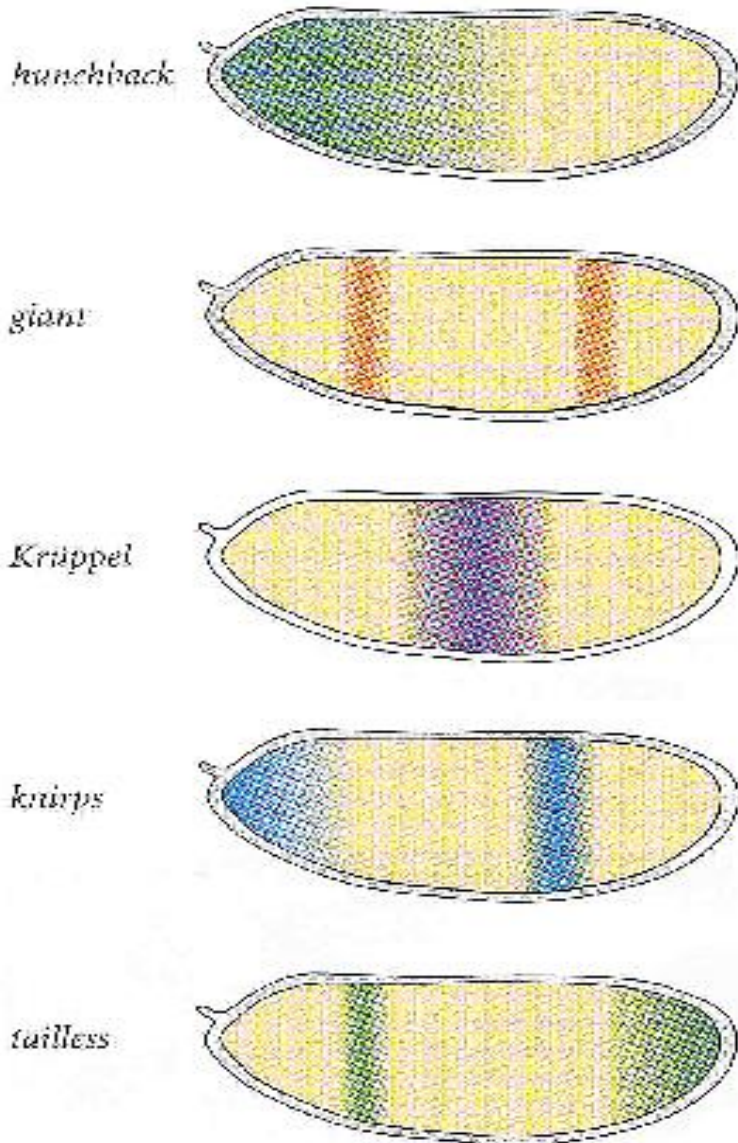
geny orientace tělních článků



Segmentační geny (zygotické)

- **vývojové určení buněk nastává ve dvou stádiích :**
 - **specifikace** – osud buňky je určován vnějšími vlivy, specifikace buněčného osudu je flexibilní a může být měněna signály z jiných buněk
 - **determinace** – buňka se nakonec podrobuje přechodu (transition) z „volného určení“ (loose commitment) na „konečný osud“ (fixed determination)
- **tranzice ze specifikace na determinaci je u drozofily zprostředkována segmentačními geny**
- **tyto geny dělí embryo na opakující se sérii segmentů podél A-P osy**
- **segmentační geny rozdělí embryo na 14 parasegmentů**

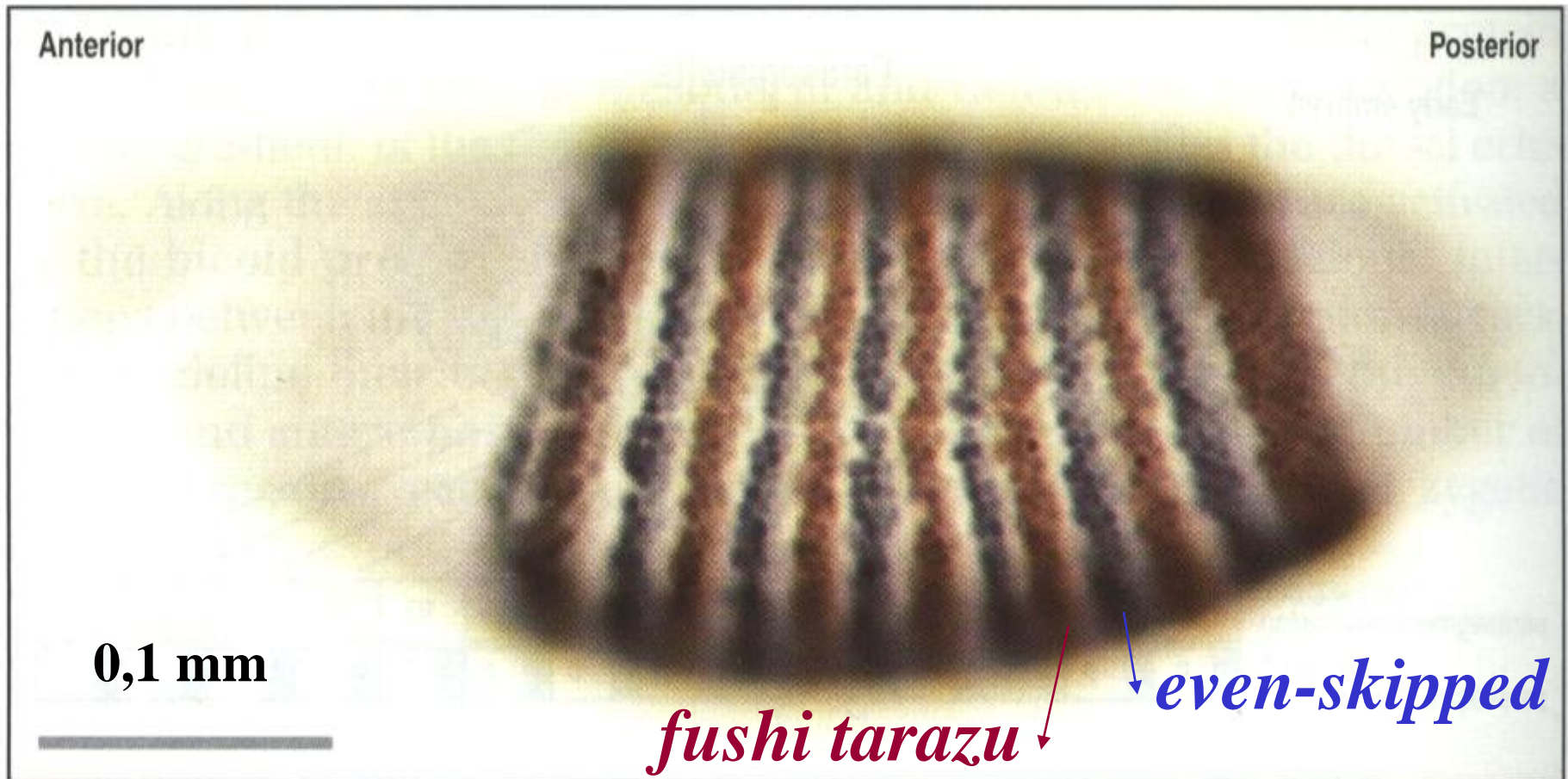
Geny velkých mezer (*gap genes*)



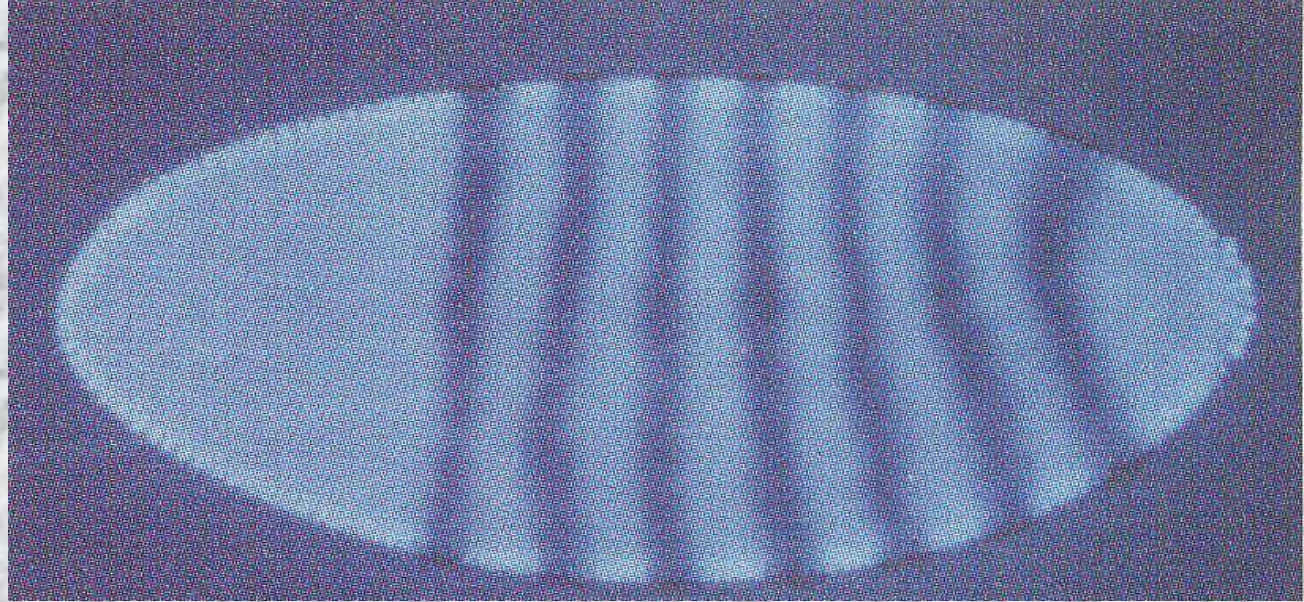
- gradienty maternálních transkripčních faktorů Bicoid, Caudal a Hunchback regulují transkripci genů „gap“
- vysoká hladina proteinu Hunchback indukuje expresi genů Giant, zatímco inhibuje transkripci Knirps
- transkript Kruppel se objeví v oblasti, kde klesá Hunchback
- exprese genů Giant je také regulována posteriorně produktem genu Caudal

Proužkované embryo

- parasegmenty (před celularizací) jsou určovány expresí „sudě-skákajících“ a „liše-skákajících“ párových genů



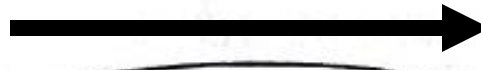
Geny párového účinku :



- Geny párového pravidla jsou exprimovány v průběhu 13. buněčného dělení, dělí embryo na 15 částí. Jeden vertikální proužek jader exprimuje „párový“ gen, další nikoli, následující opět ano.
- Je známo 8 genů párového pravidla. Ne všechna jádra exprimují stejné „párové“ geny. Uvnitř každého parasegmentu každá řada jader má svůj „pattern“ exprese „párových“ genů.
- „Pattern“ exprese „párových“ genů je určován distribucí produktů genů velkých mezer.

Časově-místní souslednost exprese segmentačních genů v embryu :

geny párového účinku



geny polarity segmentů

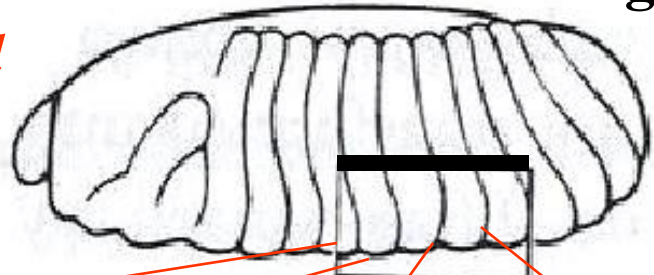
eve = even skipped

ftz = fushi tarazu

en = engrailed

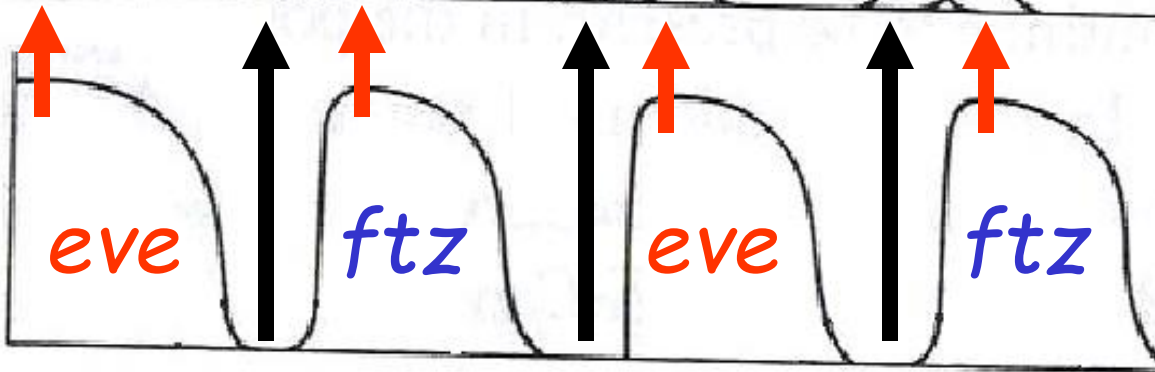
wg = wingless

koncentrace produktů genů



en *wg* *en* *wg* *en* *wg* *en*

hladiny proteinů
kódované geny
polarity článků



hladiny proteinů
kódované geny
párového účinku

A

.....

P

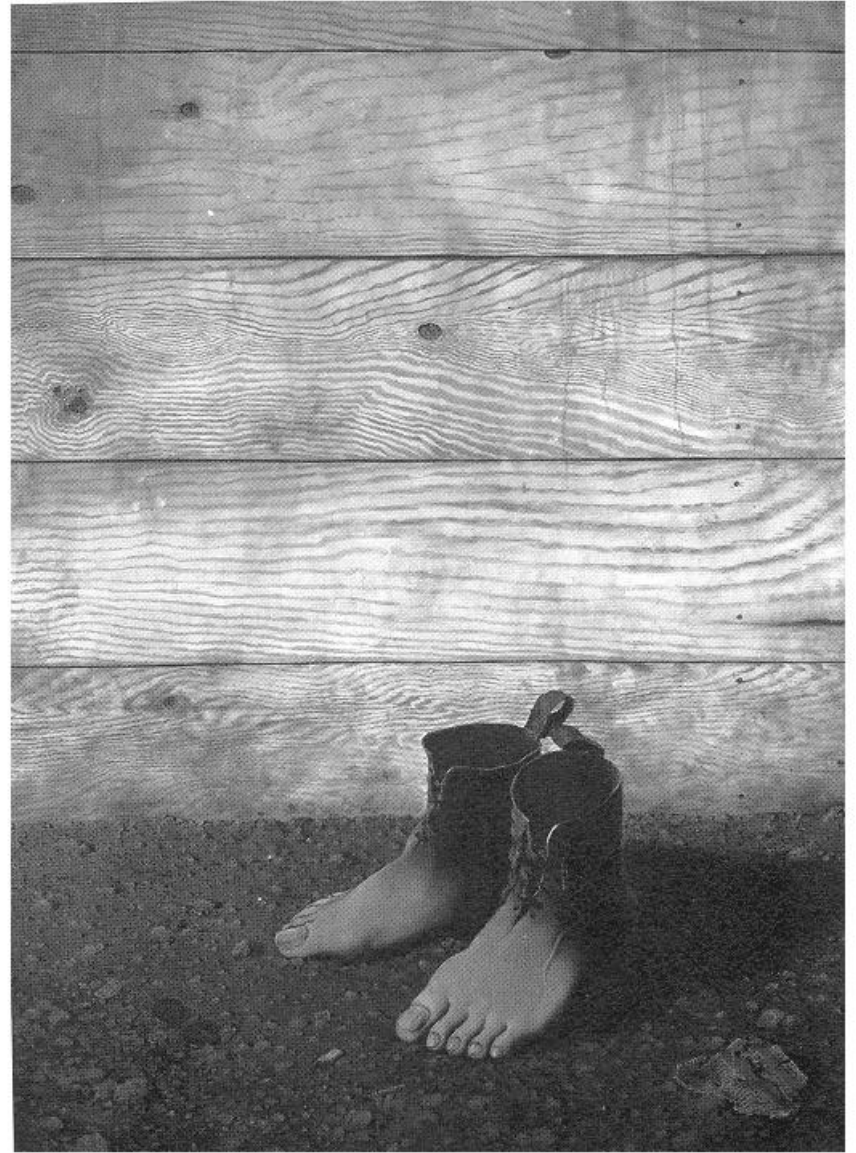


William Bateson

(1861-1926)

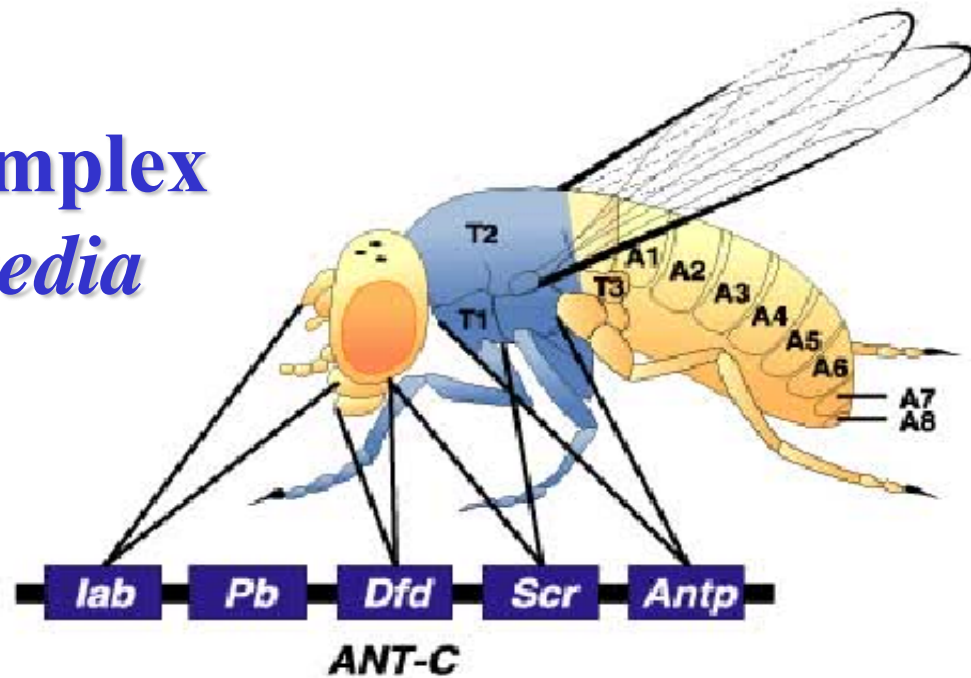
*Materials for the Study of
Variation (1894)*

... **HOMEOSIS** is a particular type of variation, in which one member of a repeating series assumes features that are normally associated with a different number ...

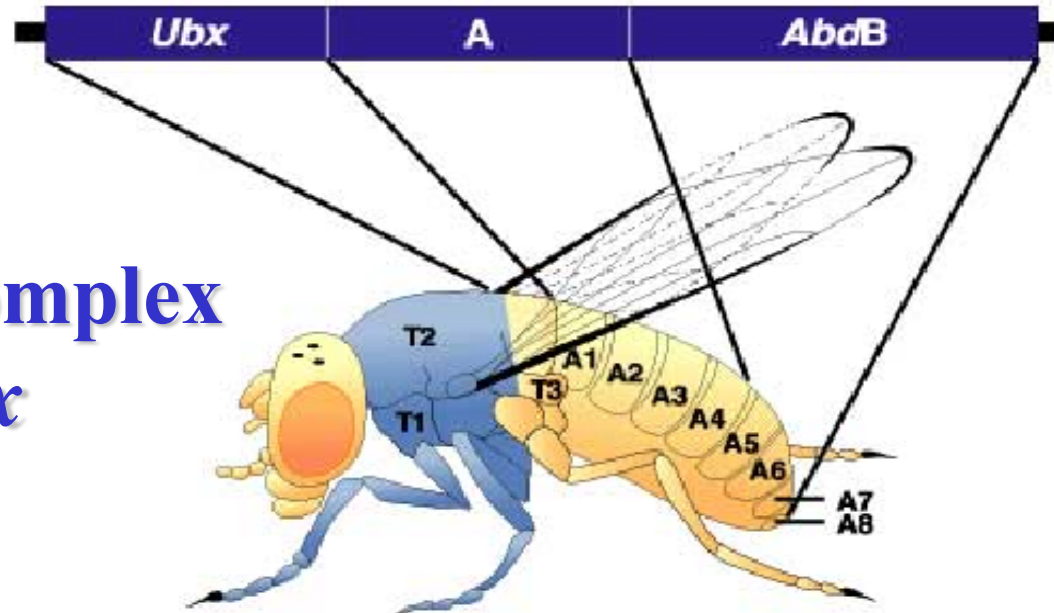


The Red Model, René Margritte (1935)

„přední“ komplex
Antennapaedia

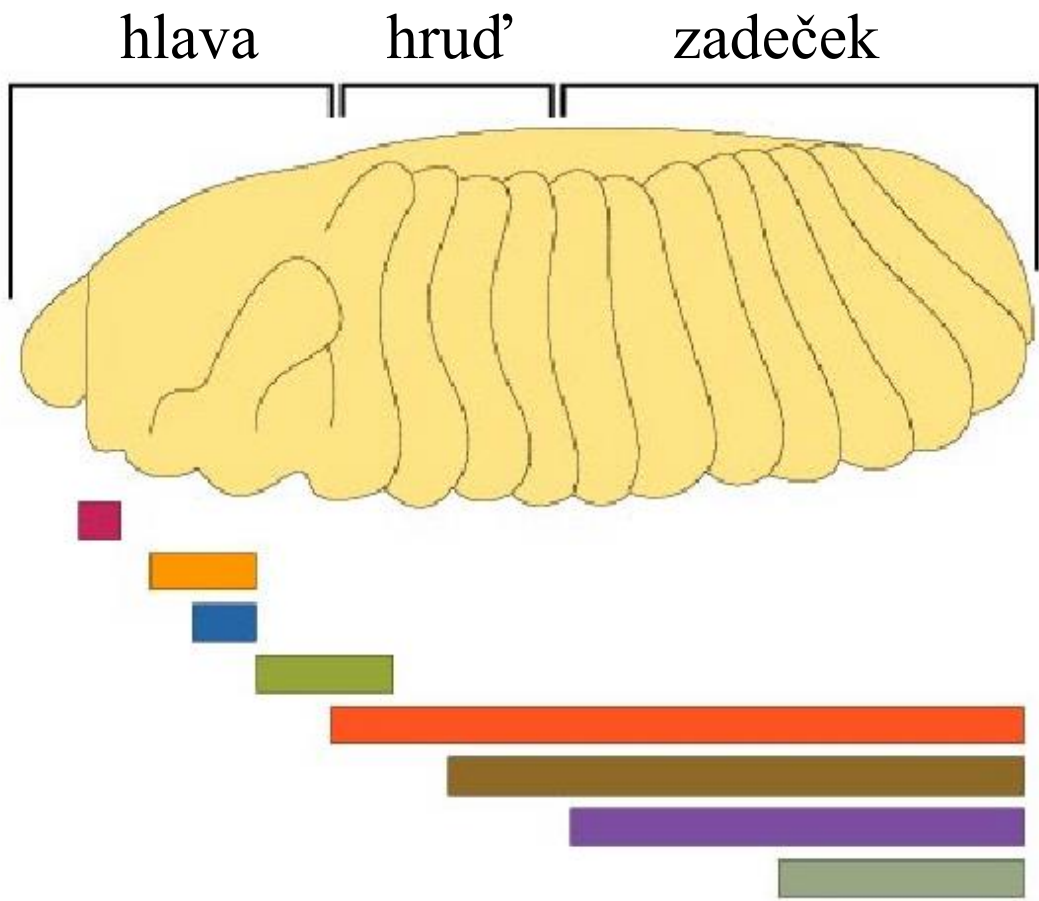


BX-C



„zadní“ komplex
Bithorax

Expresní domény homeotických genů podél předozadní osy embrya



Chromosomální lokalizace homeotických genů



Homeóza je výskyt správné struktury ...

Homeotická mutace je změna ...

Homeotický gen je odpovědný za ...

Homeobox je konzervativní úsek DNA ...

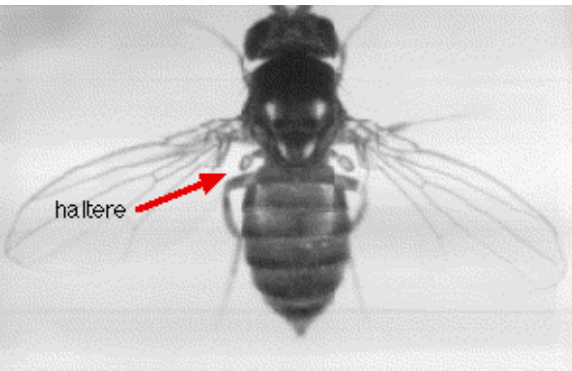
Homeodoména je část proteinu kódovaná ...

Ne všechny homeotické geny mají homeobox !

Ne všechny homeoboxové geny mohou způsobovat homeózu !

Homeotické geny (proteiny) jsou definovány strukturou či funkcí ...

HOMEOTICKÉ GENY - jeden z klíčů specifikace

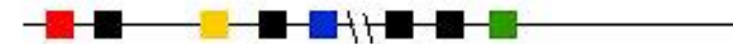


embryo → dospělec

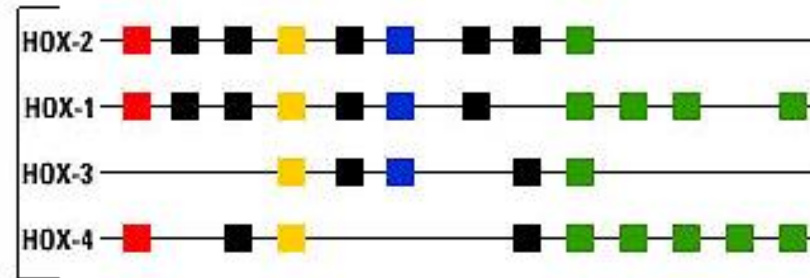


Antennapedia komplex (anterior) Bithorax komplex (posterior)

moucha



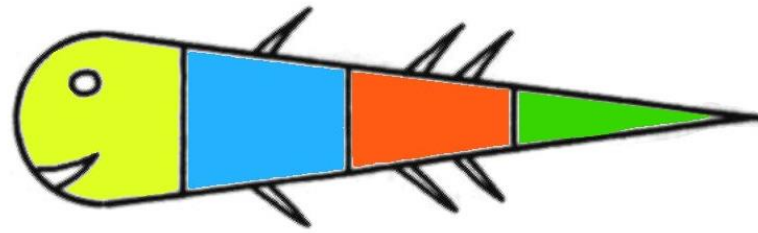
myš



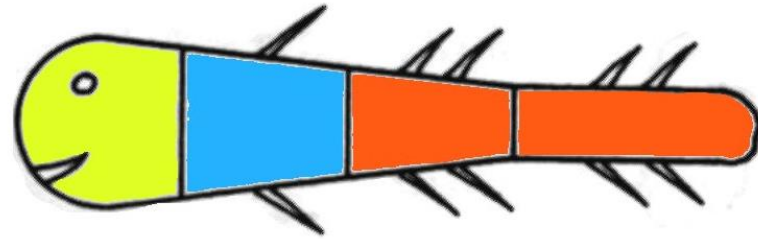
BITHORAX specifikuje třetí článek hrudi a zadeček: při ztrátě funkce – místo kyvadélek se tvoří druhý pár křídel (*more anterior phenotype*)

Edward Lewis (1963) : pravidlo spacio-temporální kolinearity

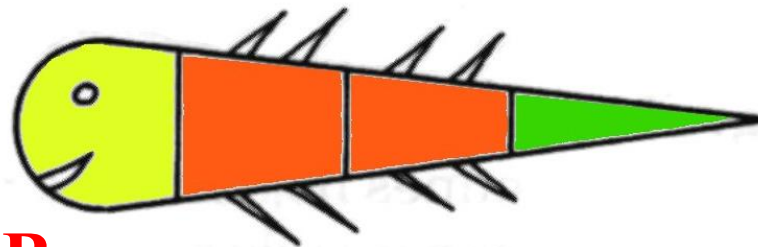
Homeotické geny
řídí anteriorně -
posteriorní
specifikaci těla :



WT



ztráta funkce genu C -
„více anteriorní“ fenotyp



ektopická exprese genu B -
„více posteriorní“ fenotyp

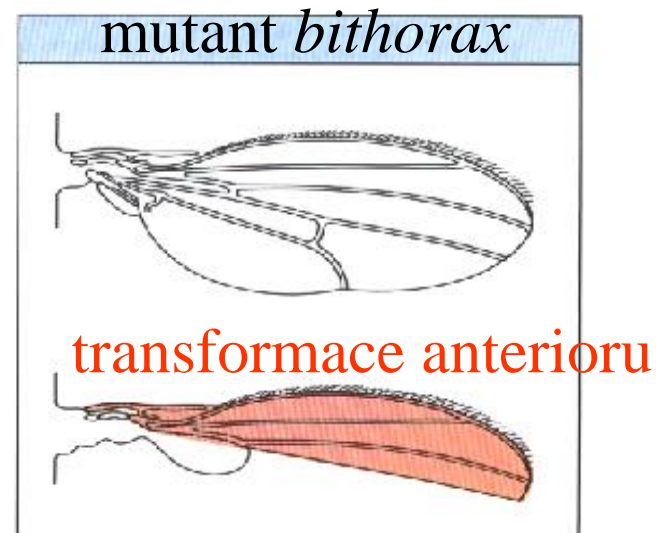
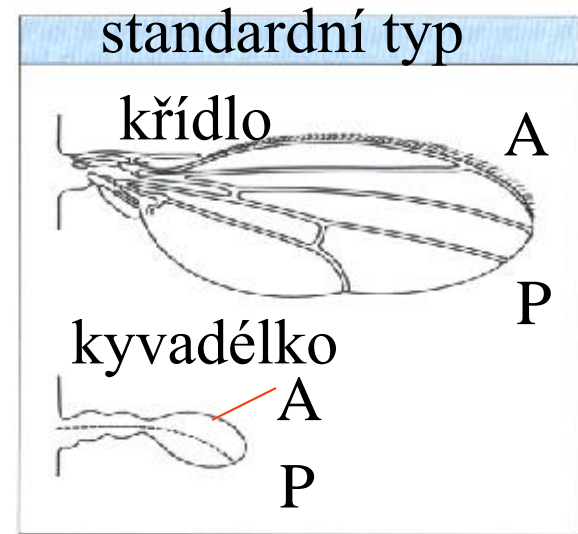


Homeotická transformace kyvadélek mutacemi komplexu bithorax

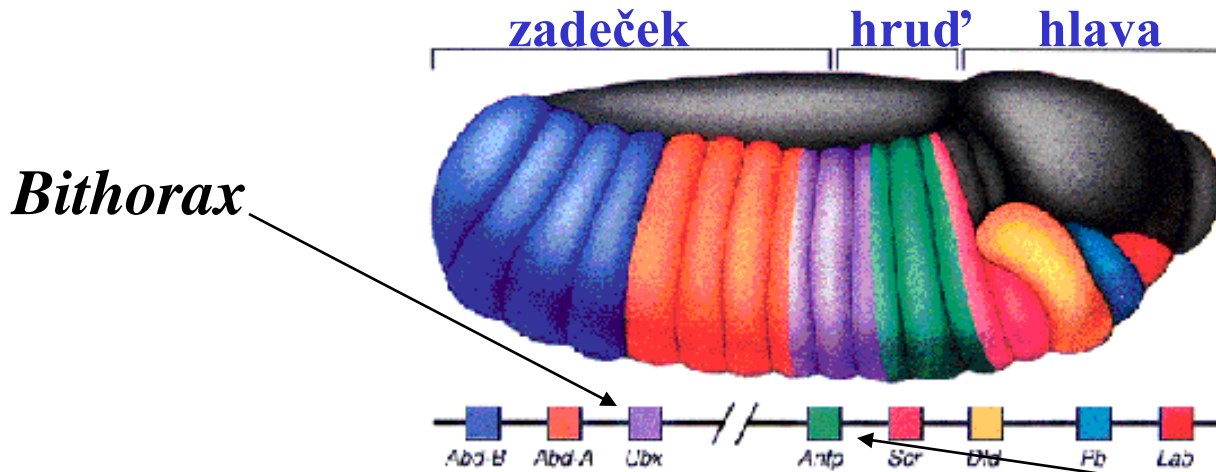
mutace *bithorax* mění
anteriorní kompartment
haltery ve tvar polo-křídla

mutace *bithorax* + *postbithorax*
působí aditivně a vytvářejí
dokonalé křídlo
- dva páry křídel, atavismus

úplná
transformace

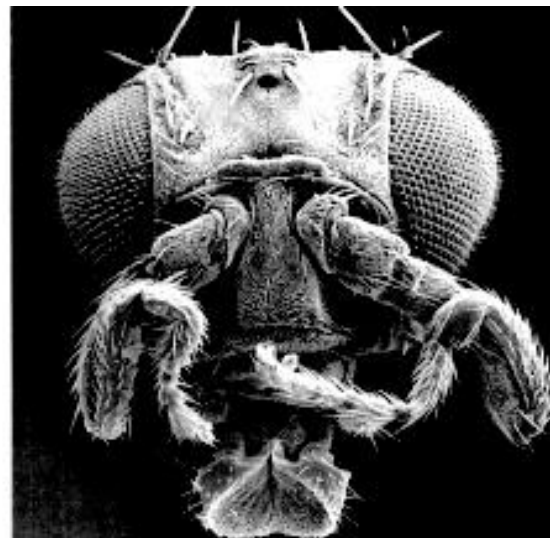
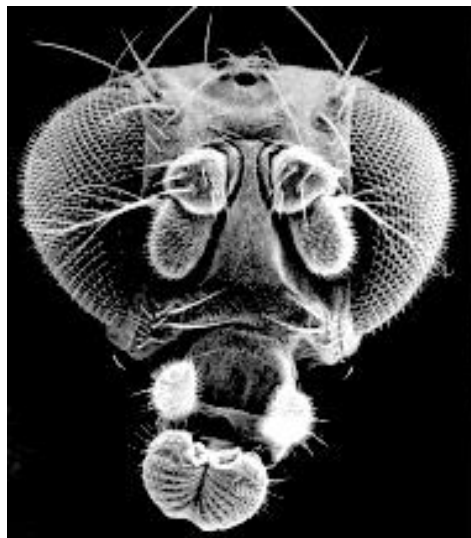


ANTENNAPEDIA specifikuje mesothorax (T2):
jeho ektopická „dominantní“ exprese vyvolává tvorbu
nohou na hlavě (*more posterior phenotype*)



Antennapedia

wt

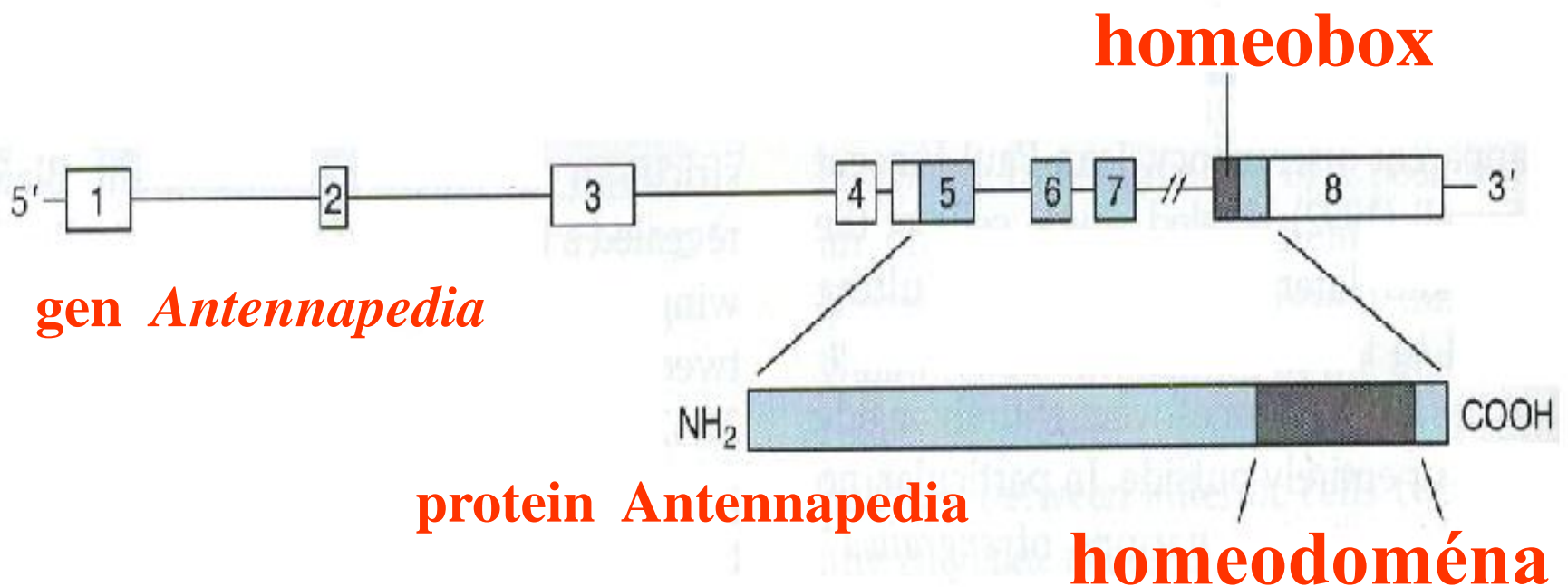


mutant

Evolution homeotických (selektorových) genů

- vysoký stupeň podobnosti mezi geny skupin *Antennapedia* a *Bithorax*, duplikace
- všechny obsahují homeobox, 180 bp
- kódují 60-amino-kyselinovou homeodoménu, která se váže k DNA
- příbuzné geny nalezeny i u všech jiných živočichů, člověka i rostlin

Strukturní organizace genu *Antennapedia* a jím kódovaného proteinu



- vysoce konzervativní je zejména homeodoména, u všech eukaryot
- homeobox má 180 nukleotidů, lokalizován v exonu 8
- homeodoména se nachází u karboxyterminálního konce

moucha

	1	10	20	30	40	50	60
<i>Antennapedia</i> ⁺	RKRGRQTYT	RYQTLELEKEFHFNRYLT	RRRRRIEIAHAL	CLTERQIKIWFQNR	RRMKWKKE		
<i>fushi tarazu</i> ⁺	SKRTRQTYT	RYQTLELEKEFHFNRYI	TRRRRIDIANALS	LSERQIKIWFQNR	RRMKSKKDF		
<i>Ultrabithorax</i> ⁺	RRRGRQTYT	RYQTLELEKEFHFNHYLT	RRRRRIEMAHAL	CLTERQIKIWFQNR	RRMKLKKKE		
<i>Hoxa-6</i> ⁺	GRRGRQTYT	RYQTLELEKEFHFNRYLT	RRRRRIEIANAL	CLTERQIKIWFQNR	RRMKWKKE		
<i>MM3</i> ⁺	RKRGRQTYT	RYQTLELEKEFHFNRYLT	RRRRRIEIAHVL	CLTERQIKIWFQNR	RRMKWKKE		
		Helix I			Helix II		Helix III

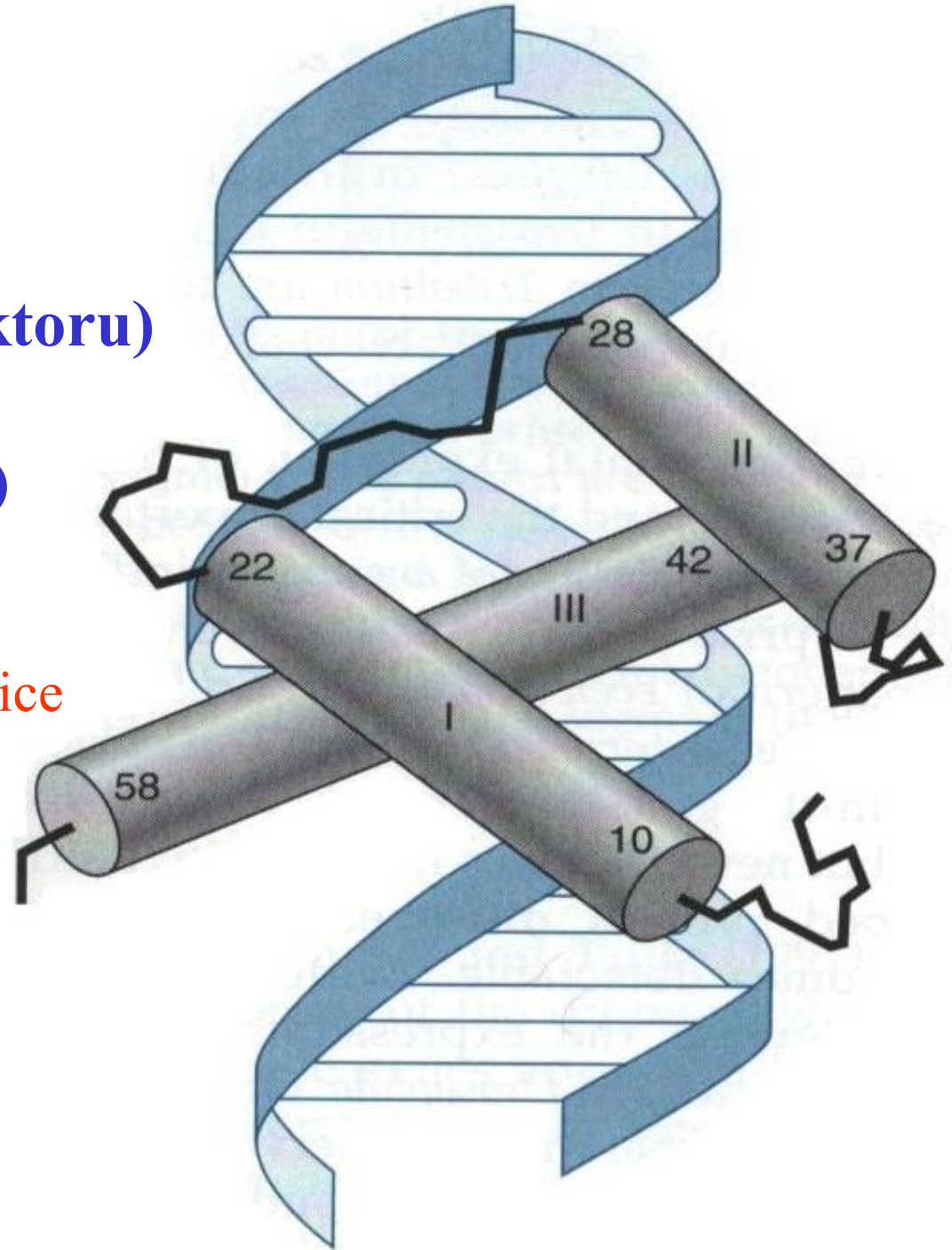
žába

myš

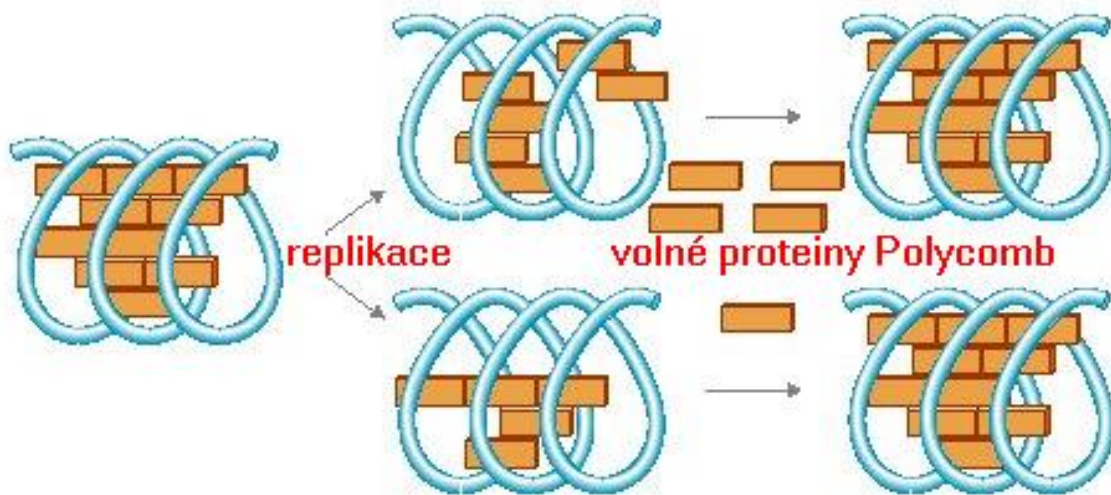
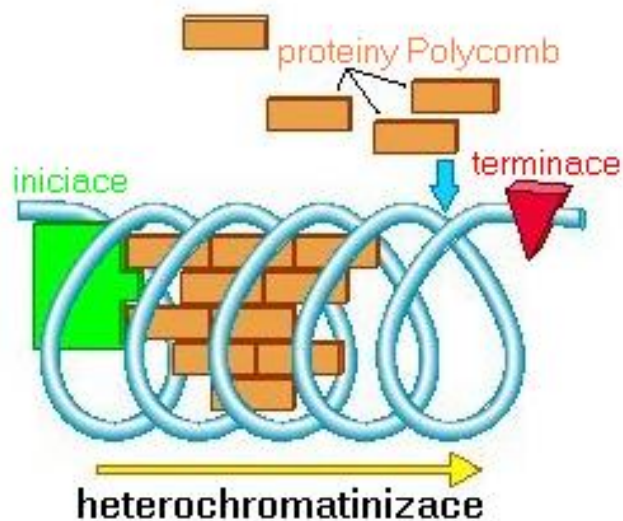
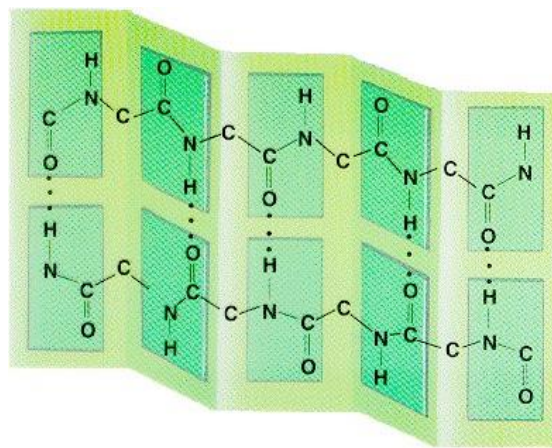
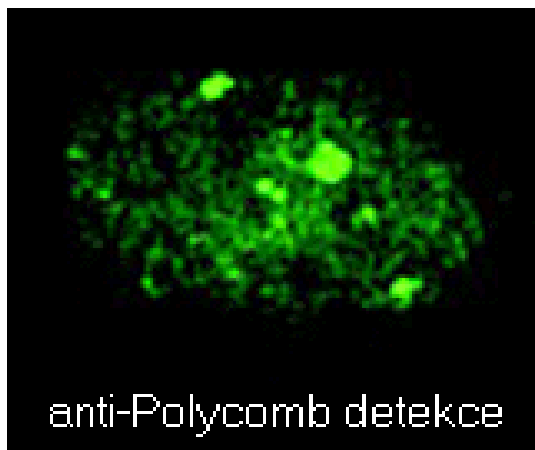
Amino acid sequences of homeodomains in proteins encoded by the *Drosophila* genes *Antennapedia*⁺, *fushi tarazu*⁺, and *Ultrabithorax*⁺; the mouse gene *Hoxa-6*⁺; and the *Xenopus* gene *MM3*⁺. The shaded areas indicate the three α helices formed within the homeodomain. Note that the three homeodomains from *Drosophila* differ in several amino acids, even in helix III, which generally shows the highest degree of conservation.

**Model vazby
homeodomény
(transkripčního faktoru)
na úsek DNA
(obvykle promotor)**

I, II, III – alfa-šroubovice
1 – 60 aminokyseliny

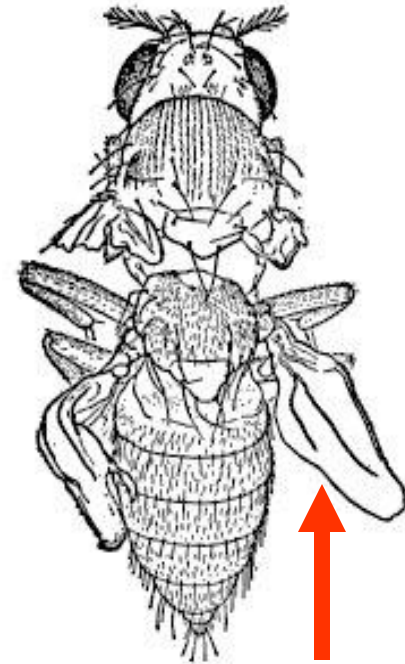
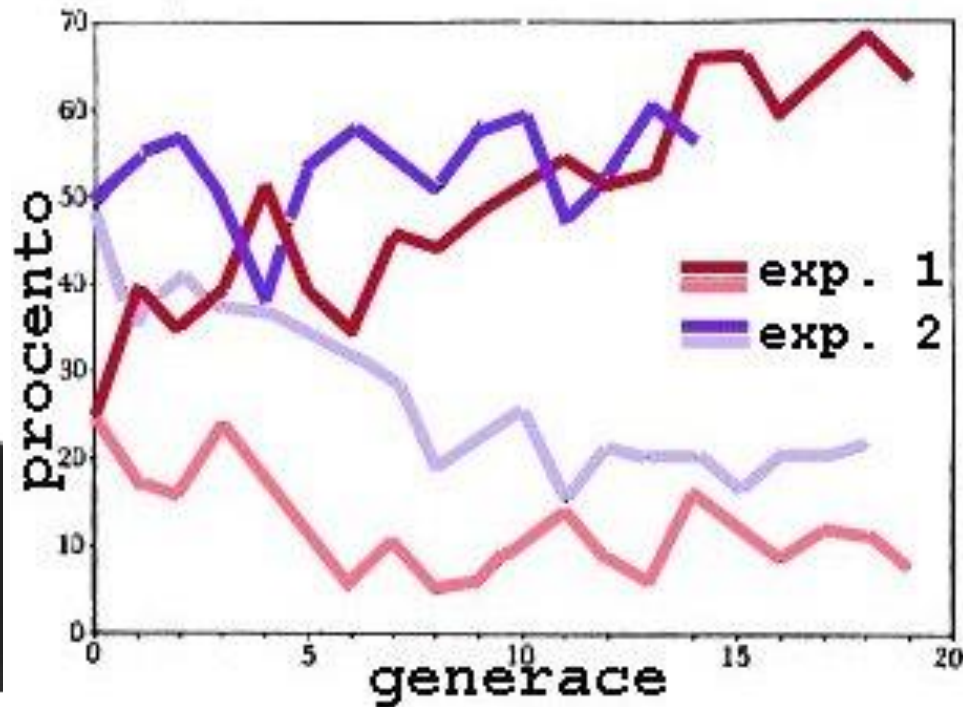


Proteiny POLYCOMB a TRITHORAX - klíčové regulátory struktury chromatinu a exprese (homeotických) genů



Genetická asimilace homeotického fenotypu Bithorax - specifita normy reakce

reakce embrya na éter – „křídlovité“ haltery - fenokopie
dlouhodobá fenotypová selekce vede ke stabilizaci změny



Conrad Waddington (1953)

Model buněčné paměti: zárodečné terčky

larva

metamorfóza

dospělec

slinné
žlázy

ústní
ústrojí

noha
tykadla

oko

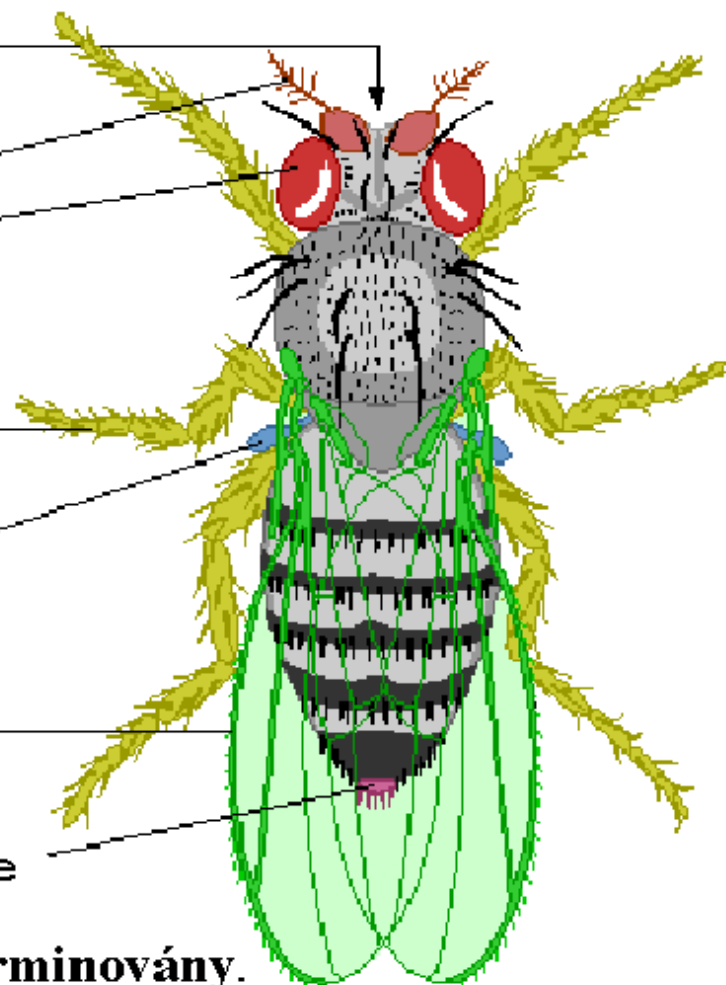
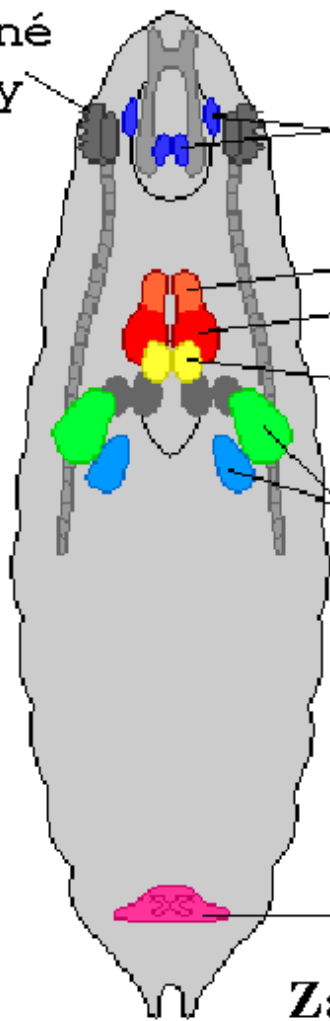
noha

kyvadélko

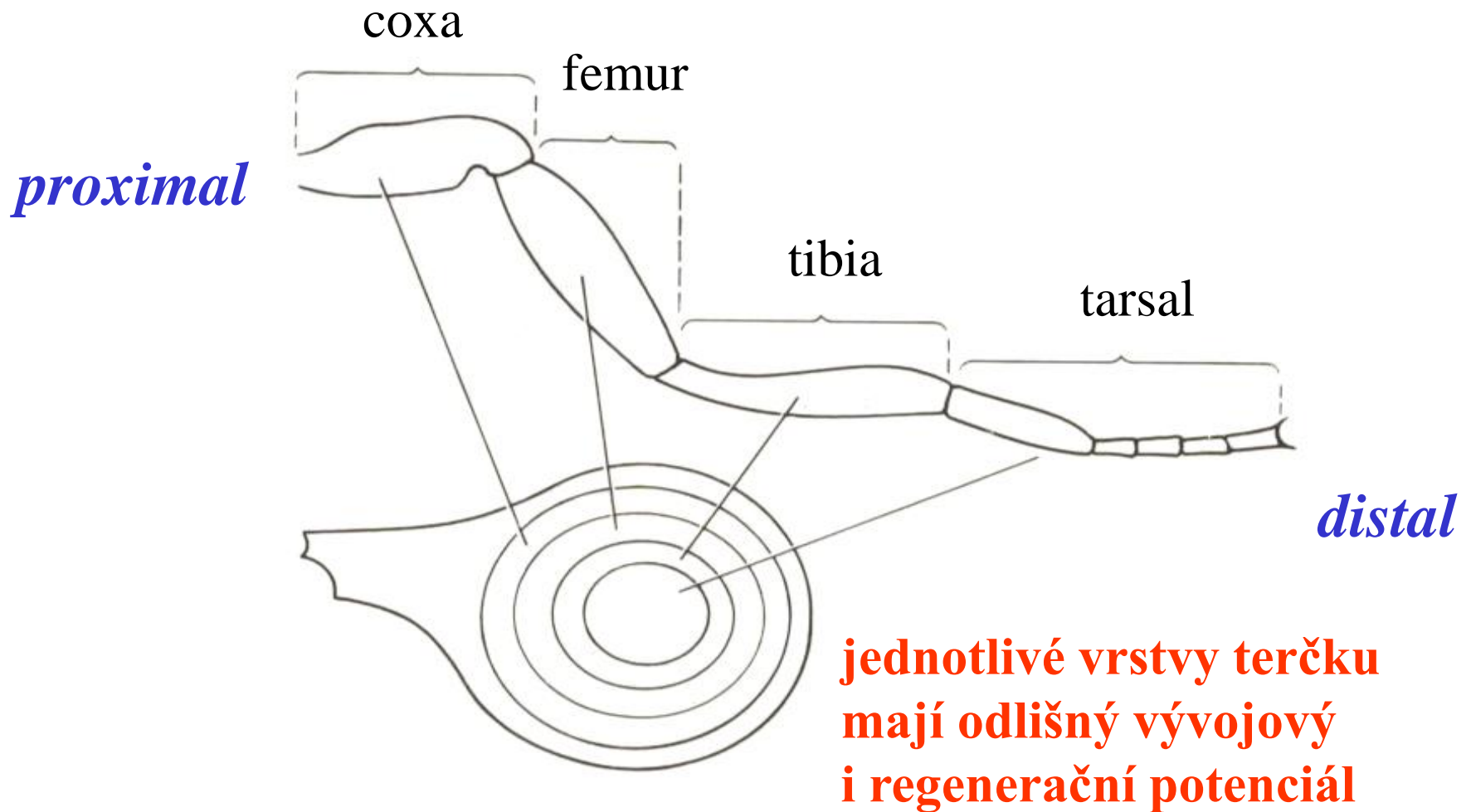
křídlo

genitálie

Zárodečné terčky jsou determinovány.

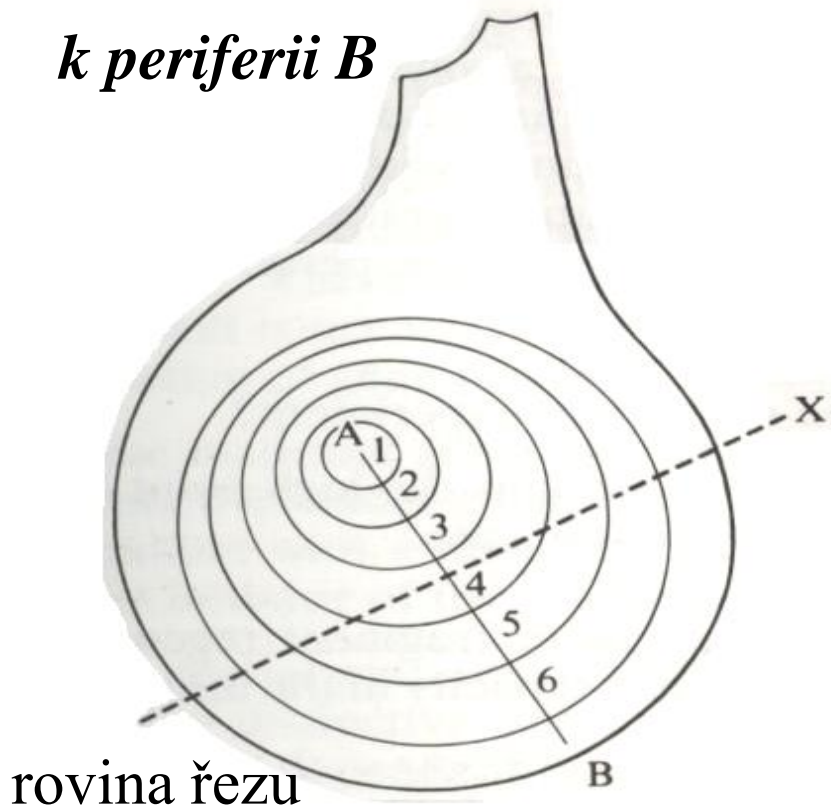


Vývojová mapa nožního terčku drosofily



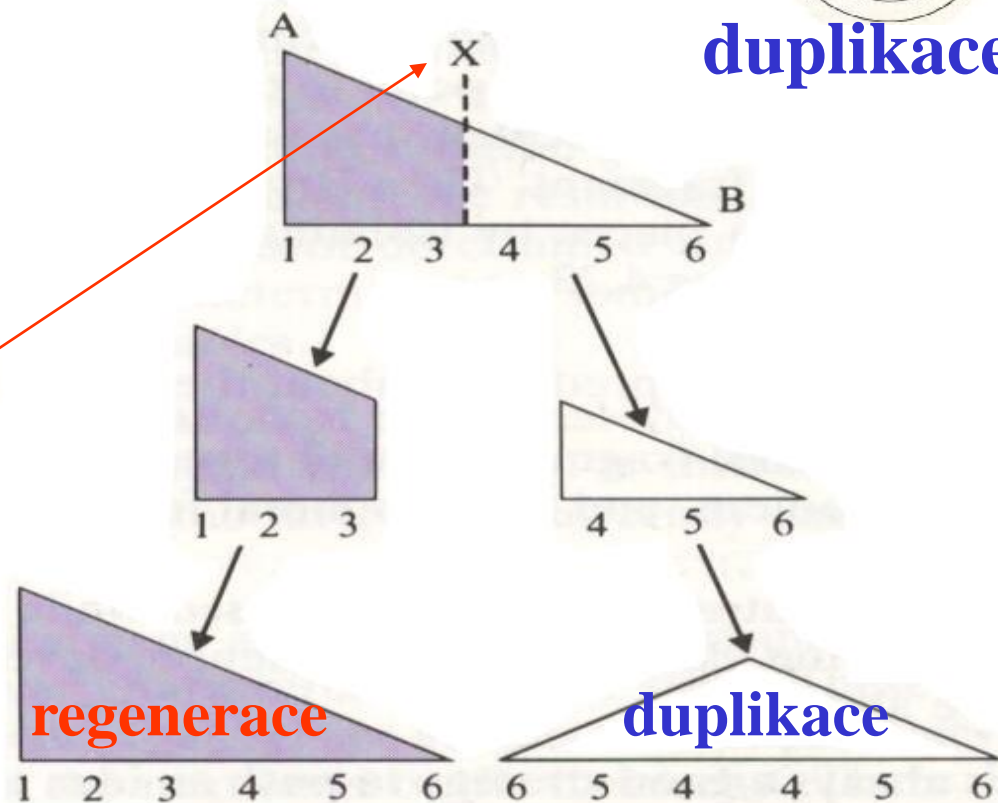
Imaginární terčky obsahují gradient vývojových schopností

klesající od centra A směrem k periferii B

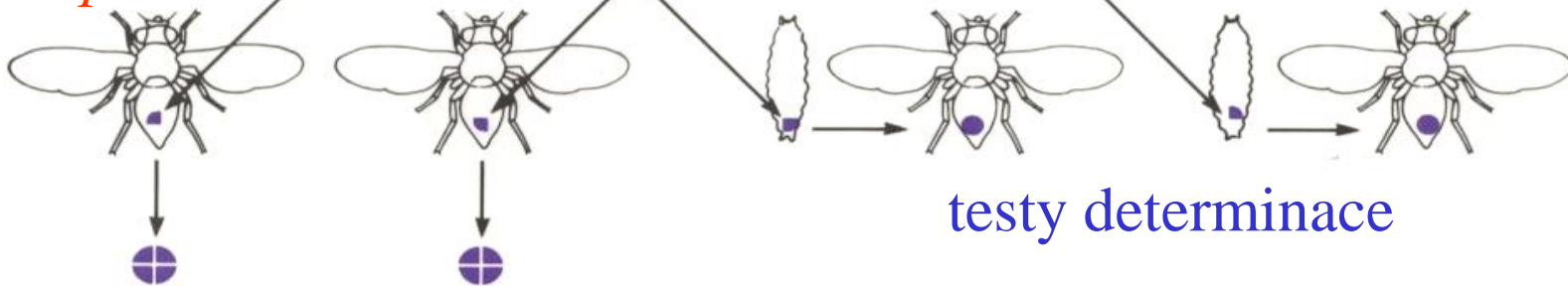
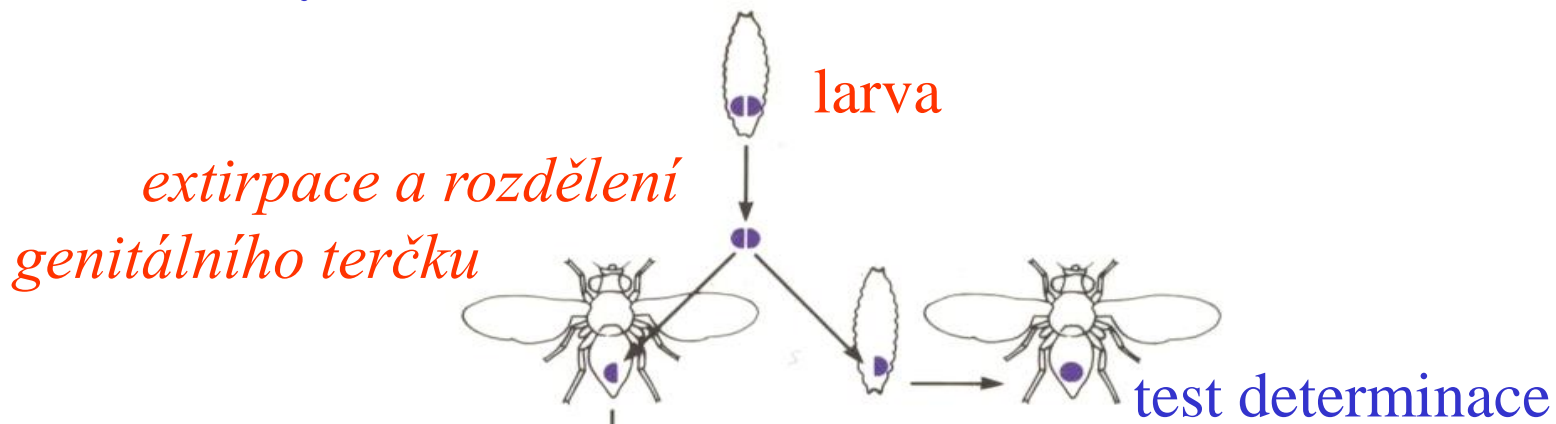


regenerace

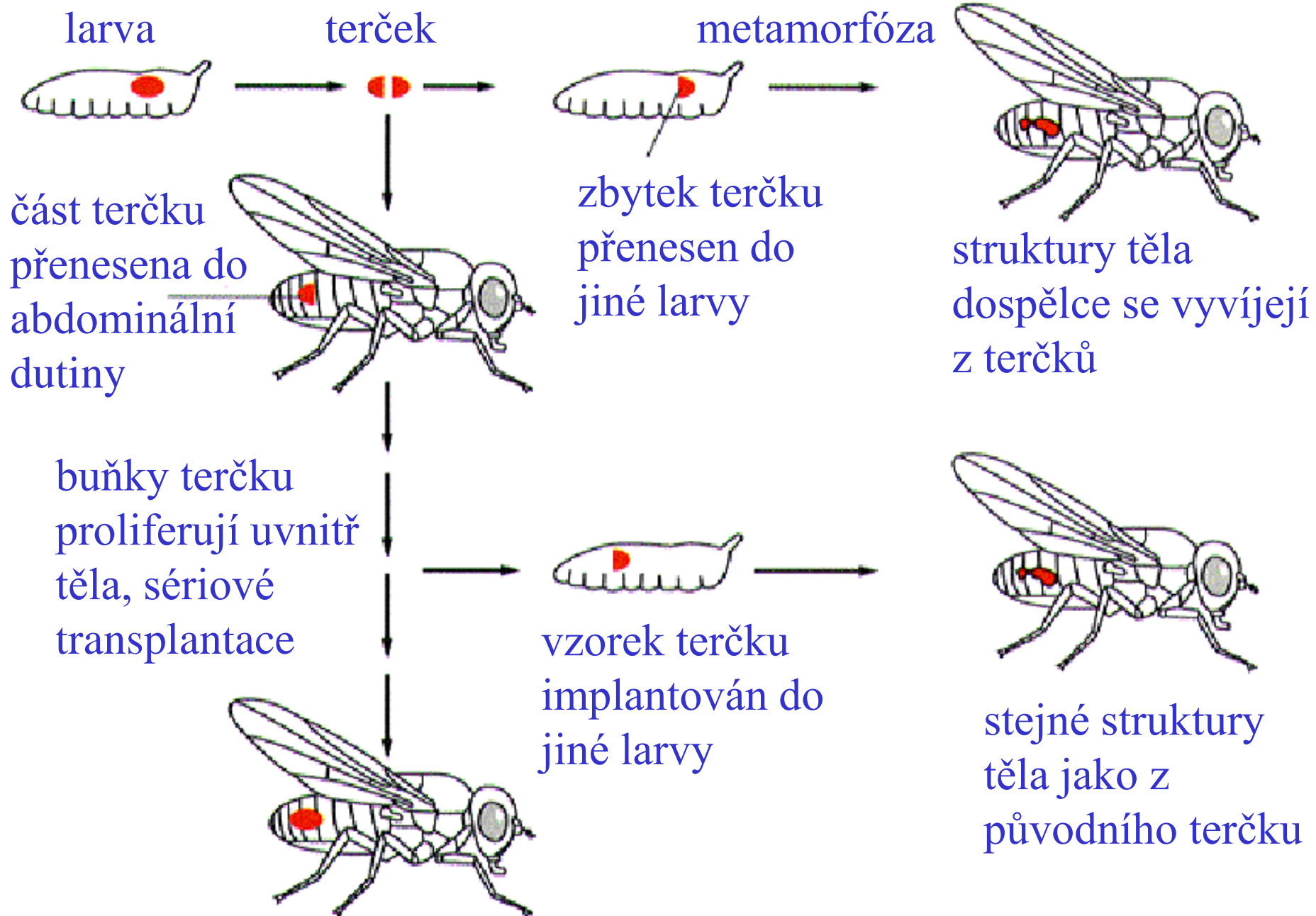
duplikace



Sériové transplantace (přenosy) buněk imaginárního terčku jako testovací systém ke studiu vývojového osudu a determinace



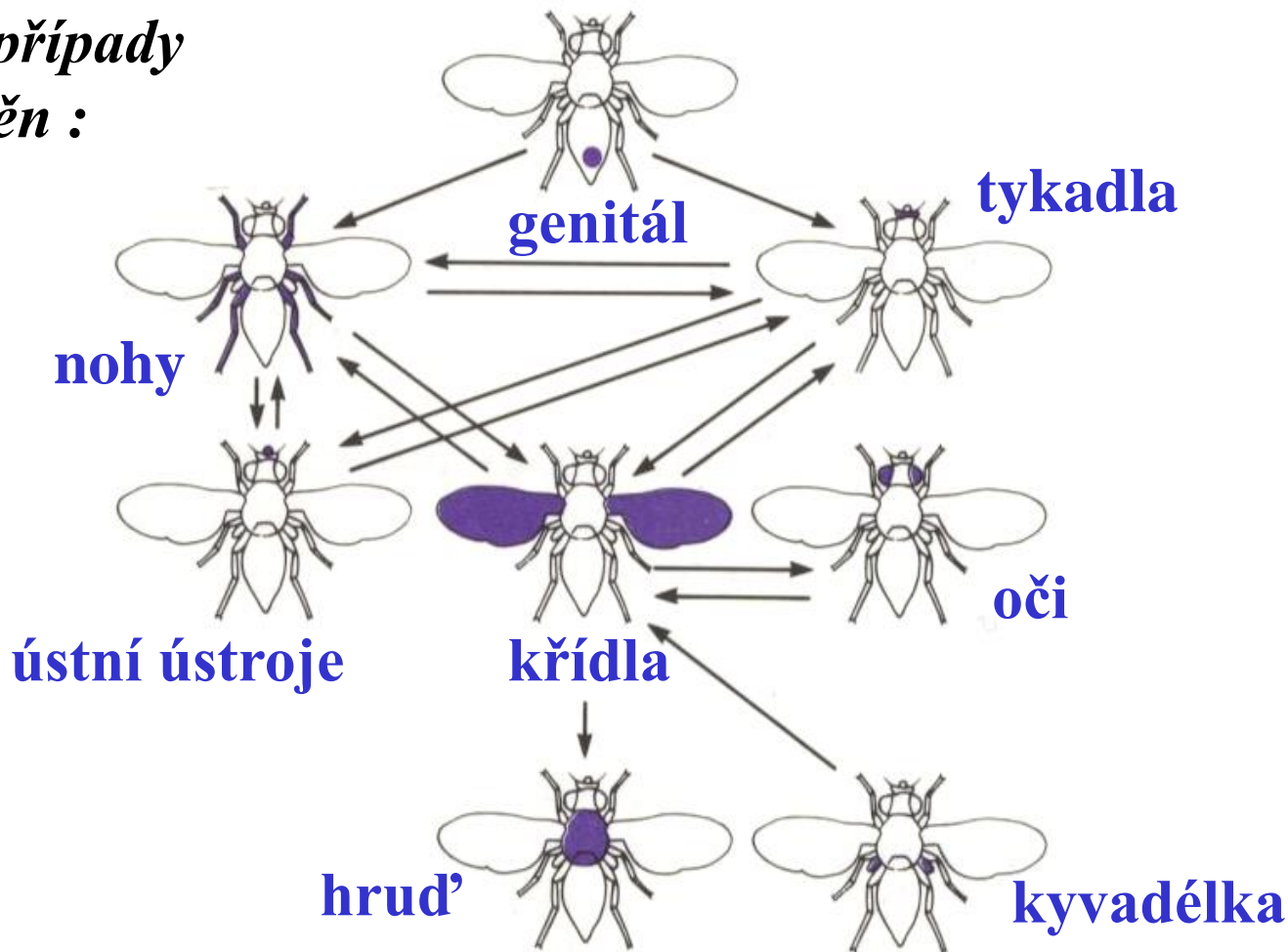
Determinace demonstrována kultivací zárodečných terčků



TRANSDETERMINACE

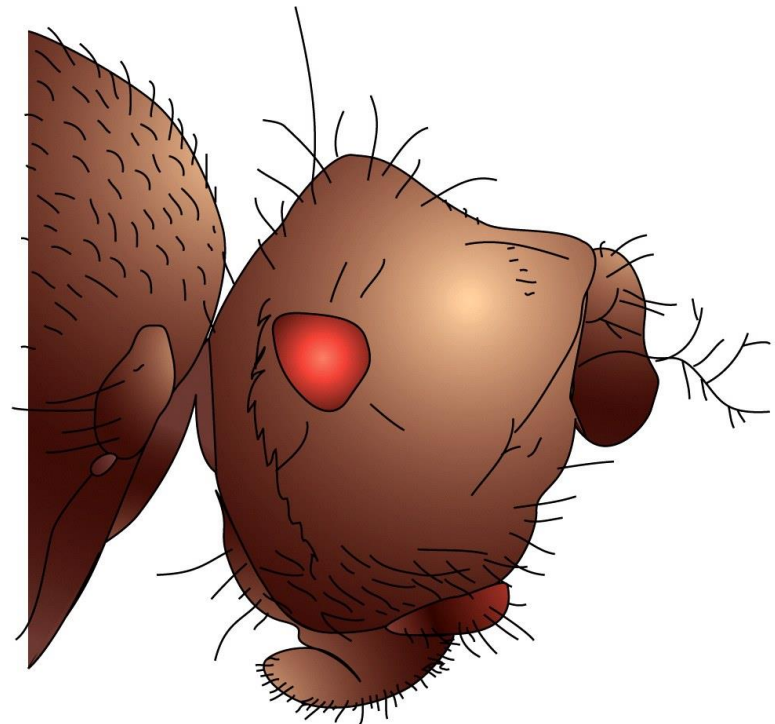
je unikátním případem ztráty buněčné (vývojové) paměti vlivem mnohočetného (ektopického) přenosu zárodečného terčku

*možné případy
změn :*

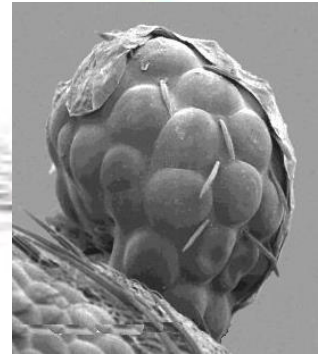


Gen *eyeless*

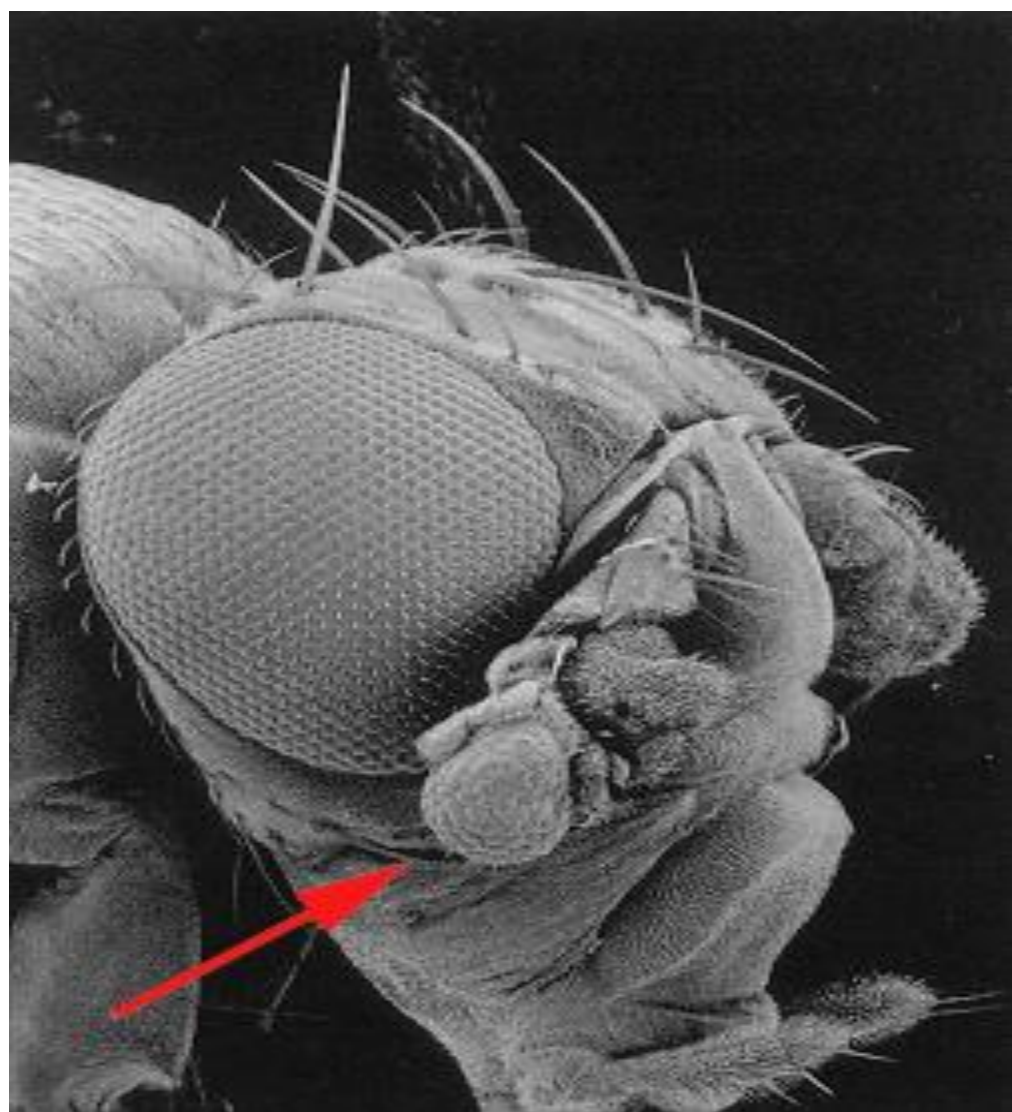
- Mutantní mušky nevytvářejí oči.
- Wild-type gen *eyeless* kóduje homeodoménový transcripční faktor, který aktivuje dráhu zahrnující tisíce genů.



Eyeless : homolog myšního genu *Pax* je odpovědný za tvorbu oka – monofyletický původ složených očí hmyzu a jednoduchého oka savců



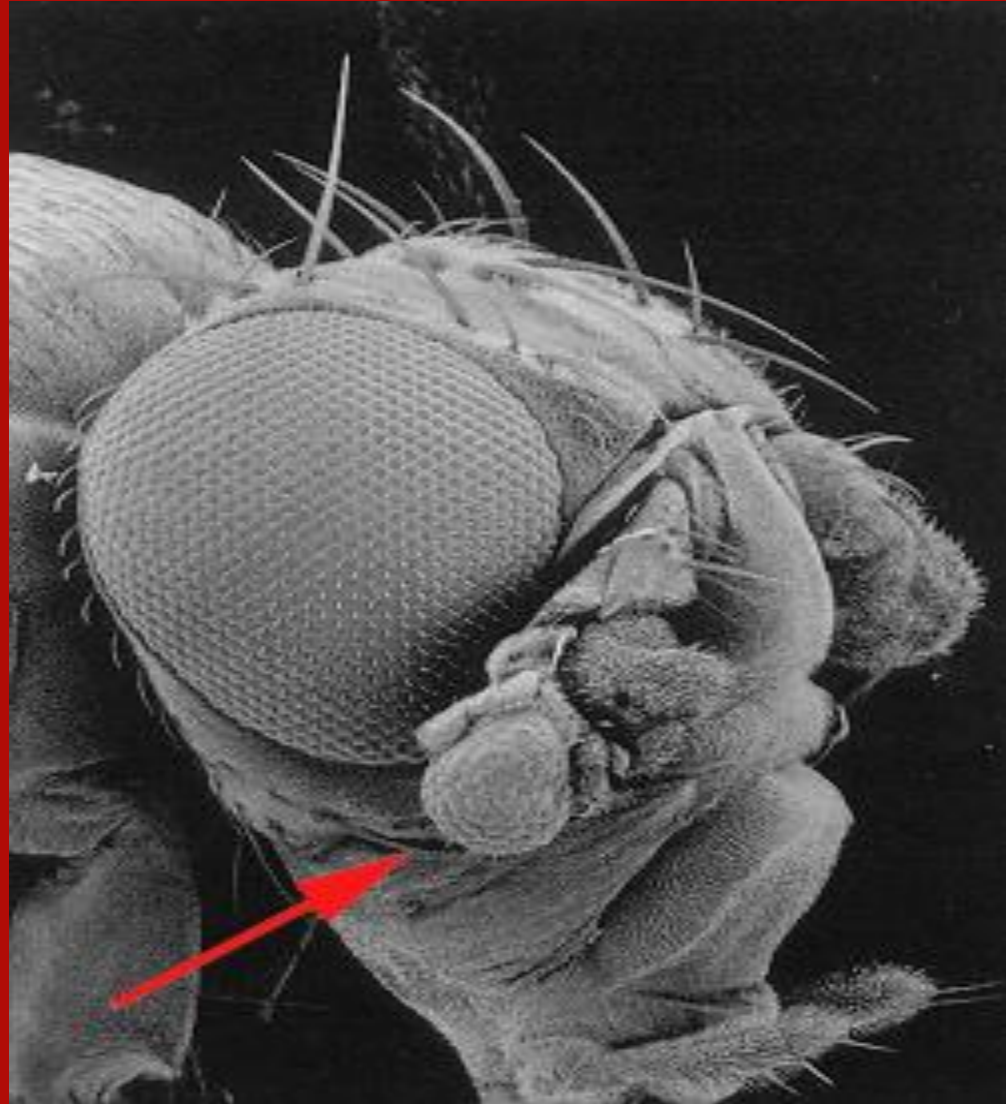
tvorba ektopických očí u transgenní mouchy



Savčí homology genu *eyeless*

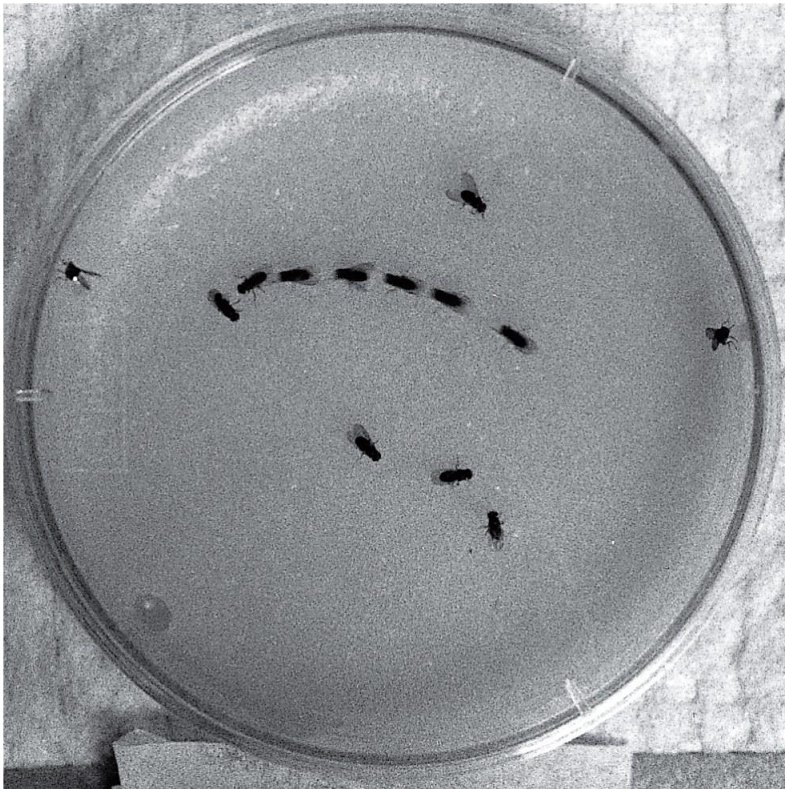
- Myší homolog genu *eyeless*, *Pax6*, pokud je přenesen do octomilky, vytváří přídatné oči.
- U myši vedou mutace homologa genu *eyeless* k reduci velikosti očí.
- Mutace homologního genu u člověka způsobují aniridii (chybění duhovky).

HOMOLOGNÍ GENY PRO ANALOGICKÉ ZNAKY ?!



myší gen *Pax 6* dává signál mouše ke tvorbě složeného oka na tykadle

Fruitless (fru)



- Samečci homozygotní pro mutaci genu *fru* jsou přitahováni jinými samečkami.
- Gen *fru* kóduje transkripční faktor, který reguluje geny samčího pohlavního chování.

Drosophila nemá pohlavní hormony:

bilaterální gyandromorfie

(ztráta jednoho chromosomu X-wt při prvním mitotickém dělení)

samčí **XO** část:
bílé oko,
miniaturní křídlo



samičí **XX** část:
heterozygotní
pro oba markery

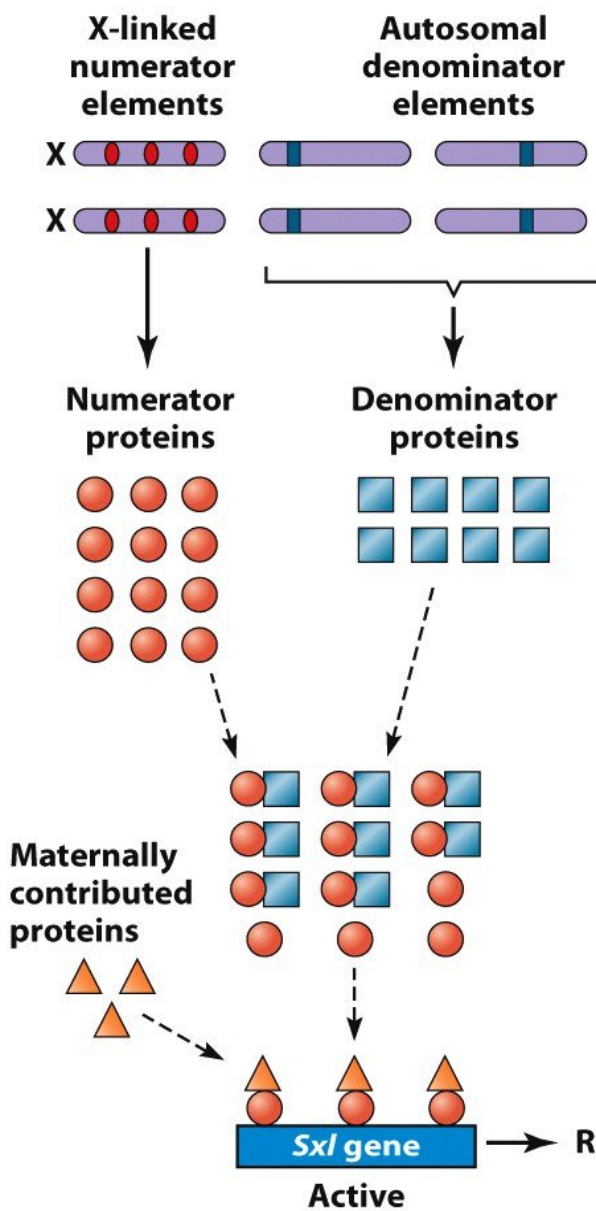
Zjišťování poměru X:A pomocí numerátorových a denominátorových elementů u octomilky.

Tento poměr je určován interakcemi mezi proteinovými produkty těchto genů.

$$\frac{\text{čítatel}}{\text{jmenovatel}} = \frac{\text{numerator}}{\text{denominator}}$$

XX embryo

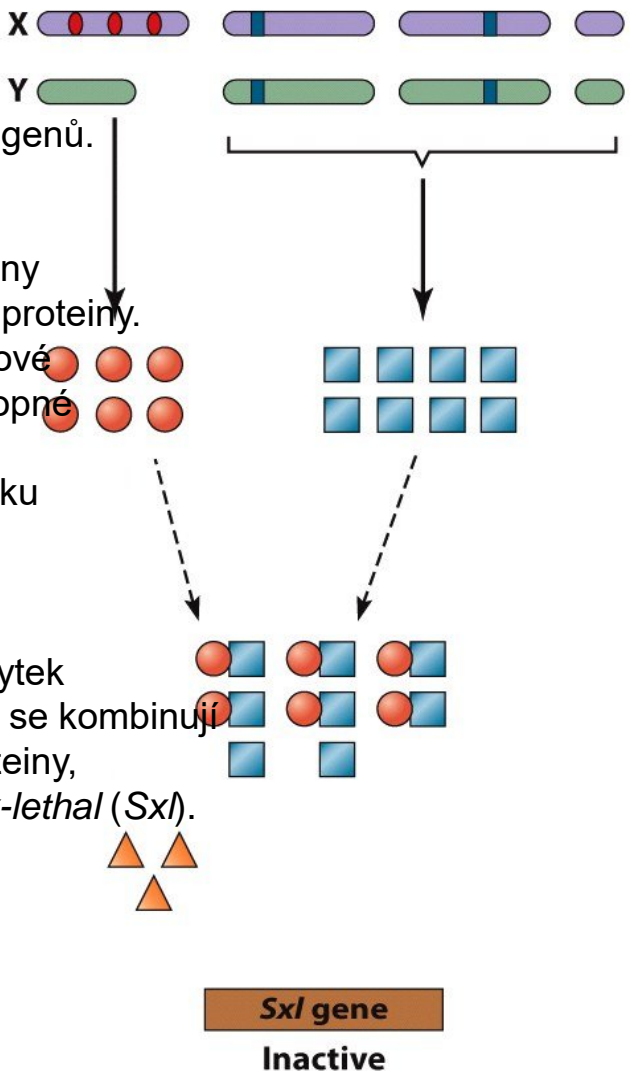
XY embryo



Krok 1: Numerátorové proteiny jsou tvořeny X-vázanými geny; denominátorové proteiny jsou produktem autozomálních genů.

Krok 2: Denominátorové proteiny antagonizují s numerátorovými proteiny. V embryích XX jsou numerátorové proteiny v přebytku a tudíž schopné aktivity. V embryích XY nejsou numerátorové proteiny v přebytku a tudíž nemohou být aktivní.

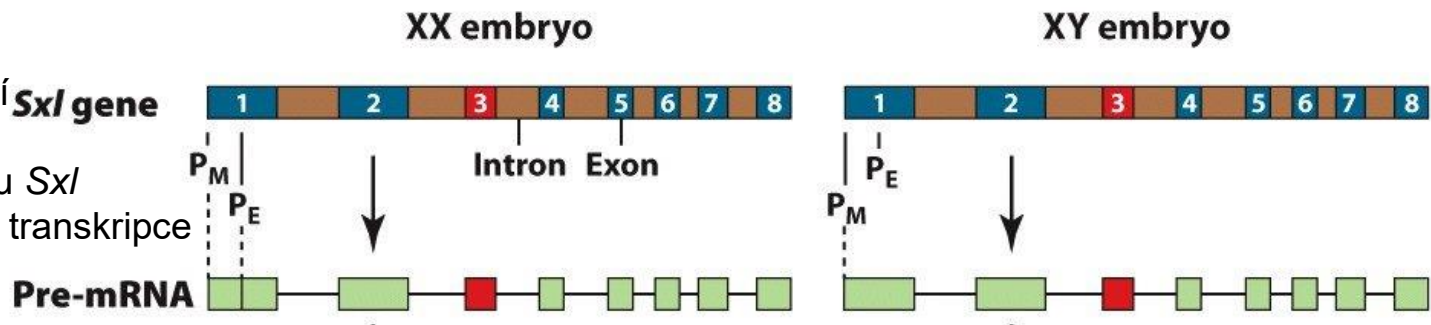
Krok 3: V embryích XX je přebytek numerátorových proteinů, které se kombinují s maternálně poskytnutými proteiny, k aktivaci transkripce genu *Sex-lethal* (*Sxl*). V embryích XY je nedostatek numerátorových proteinů, což brání v aktivaci genu *Sxl*.



Pohlavně specifická exprese genu *Sex-lethal (Sxl)* u octomilky. Ačkoli je tento gen transkribován jak v embryích XX tak i v embryích XY, alternativní sestřih této RNA omezuje syntézu proteinu SXL pouze na embrya XX, ze kterých se vyvinou samičky. Nepřítomnost proteinu SXL v embryích XY vede k vývoji samečka.

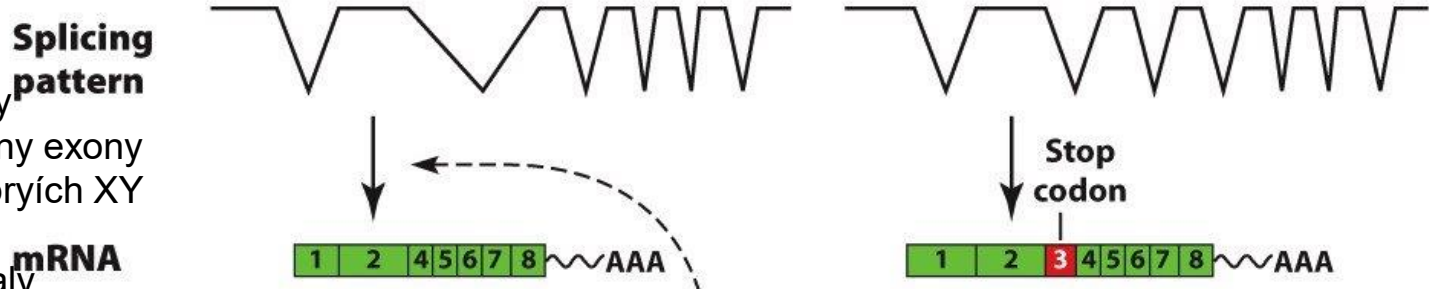
Krok 1: Transkripce:

V embryích XX molekulární signál založený na poměru X:A iniciuje transkripci genu *Sxl* z promotoru PE. Později je transkripce započata z promotoru PM v embryích XX i XY.



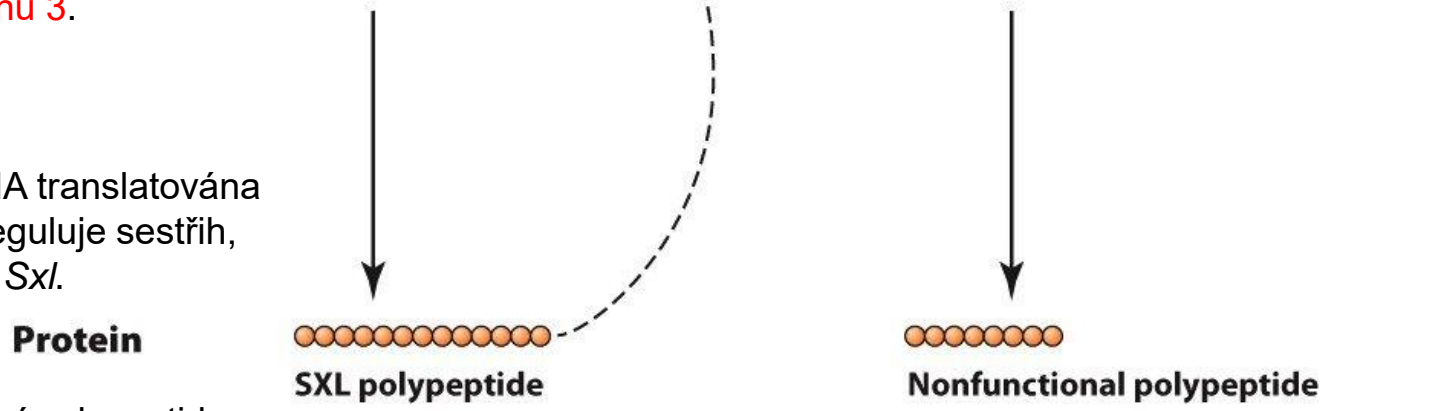
Krok 2: Sestřih:

V embryích XX jsou transkripty *Sxl* sestřihovány tak, aby obsahovaly všechny exony s výjimkou exonu 3. V embryích XY jsou *Sxl* transkripty sestřihovány, aby zahrnovaly všechny exony včetně exonu 3.



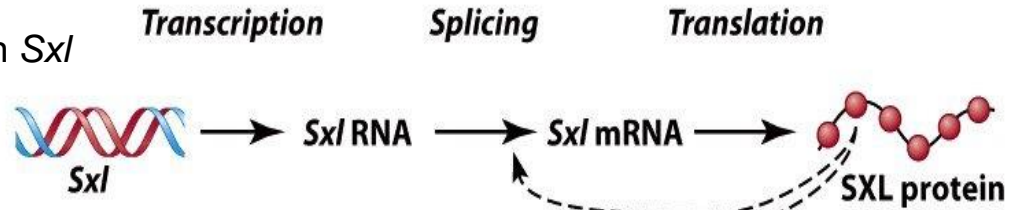
Krok 3: Translace:

V embryích XX je *Sxl* mRNA translatována v polypeptid (SXL), který reguluje sestřih, včetně sestřihu transkriptů *Sxl*. V embryích XY brání stop kodon v exonu 3 řádné translaci *Sxl* RNA ve funkční polypeptid.

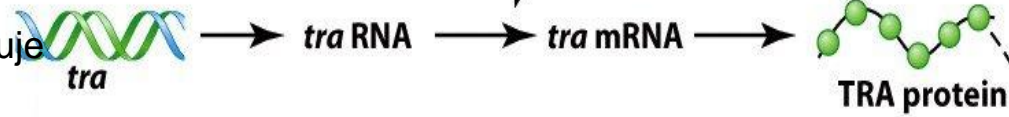


Regulace pohlavní determinace u octomilky řízená genem *Sex-lethal (Sxl)*. Gen *Sxl* reguluje expresi genu *transformer (tra)*, který dále reguluje expresi genu *doublesex (dsx)*. Gen *transformer2 (tra2)* se také podílí na regulaci *dsx*. Značky + a – naznačují přítomnosti či absenci různých proteinů.

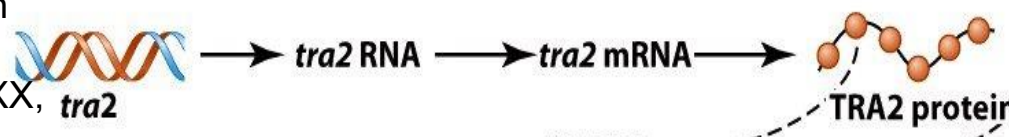
Krok 1: Alternativní sestřih *Sxl* RNA tvoří protein SXL v embryích XX, nikoli v embryích XY.



Krok 2: Protein SXL reguluje sestřih *Sxl* a *tra* RNA.



Krok 3: Alternativní sestřih *tra* RNA vede ke tvorbě proteinu TRA v embryích XX, nikoli v embryích XY.



Krok 4: Proteiny TRA a TRA2 regulují sestřih *dsx* RNA



Krok 5: Alternativní sestřih *dsx* RNA vede ke tvorbě dvou odlišných proteinů – u každého pohlaví jiného.

Krok 6: Proteiny DSX řídí somatický pohlavní vývoj.

	XX embryo	XY embryo
Krok 1: SXL protein	+	-
Krok 2: TRA protein	+	-
Krok 3: TRA2 protein	+	-
Krok 4: DSX protein	Female protein	Male protein
	Represses genes for male development	Represses genes for female development
	Embryo develops as a female	Embryo develops as a male

~~XXX~~

Časný embryonální vývoj octomilky

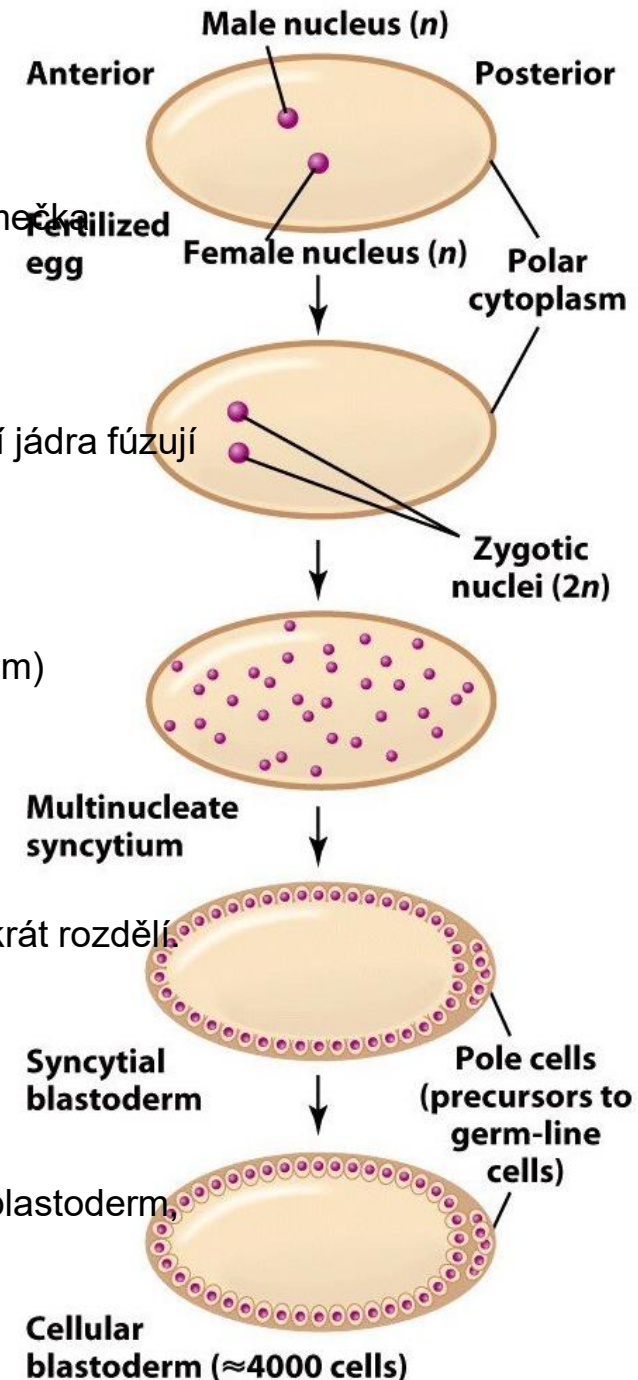
Krok 1: Oplozené vajíčko obsahuje dvě haploidní (n) jádra, jedno od samečka a jedno od samičky.

Krok 2: Obě haploidní jádra se jednou rozdělí a výsledná samčí a samičí jádra fúzíjí za vzniku dvou diploidních ($2n$) zygotických jader.

Krok 3: Zygotická jádra se rychle dělí a vytvářejí jedinou buňku (syncytium) a mnoha jádry.

Krok 4: Po devíti jaderných děleních migrují jádra do periferie syncytia a vytvářejí syncytiální blastoderm. Na periferii vajíčka se jádra ještě čtyřikrát rozdělí. Několik jader migruje do pólové cytoplazmy, kde vytvoří pólové buňky, základy zárodečné linie dospělého.

Krok 5: Kolem jader se vytvářejí buněčné membrány a vzniká buněčný blastoderm, složený z přibližně 4000 buněk.



Determinace antero-posteriorní osy octomilky maternálně poskytovanými RNA.

Tyto RNA pocházejí

z genů *hunchback*, *caudal*, *bicoid* a *nanos*.

Krok 1: Hunchback a caudal RNA jsou uniformně distribuovány v celém oocytu.

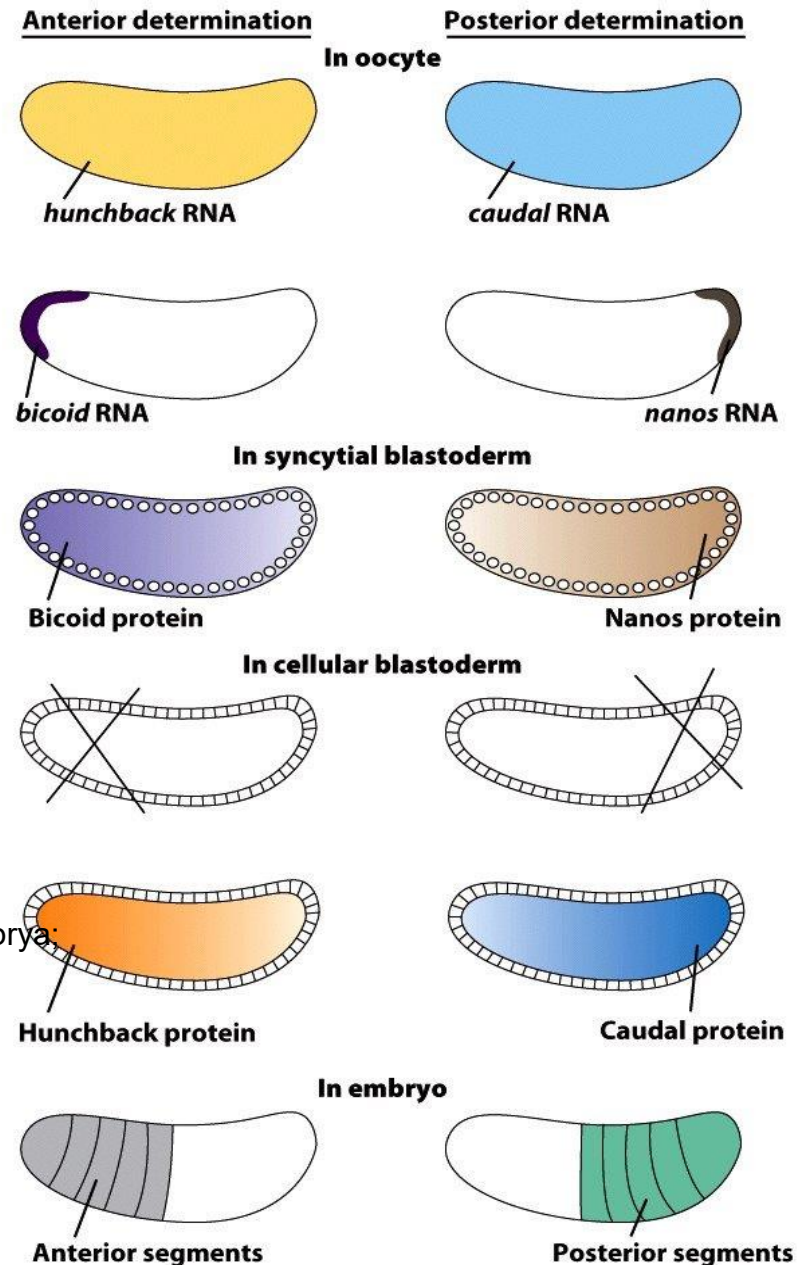
Krok 2: Bicoid a nanos RNA se akumulují na opačných koncích oocytu – bicoid RNA na anteriorním a nanos na posteriorním.

Krok 3: Bicoid a nanos RNA jsou v embryu translatovány lokálně. Výsledné proteiny difundují a vytvářejí gradienty, bicoid protein je koncentrován v anteriorní oblasti a nanos protein v posteriorní oblasti.

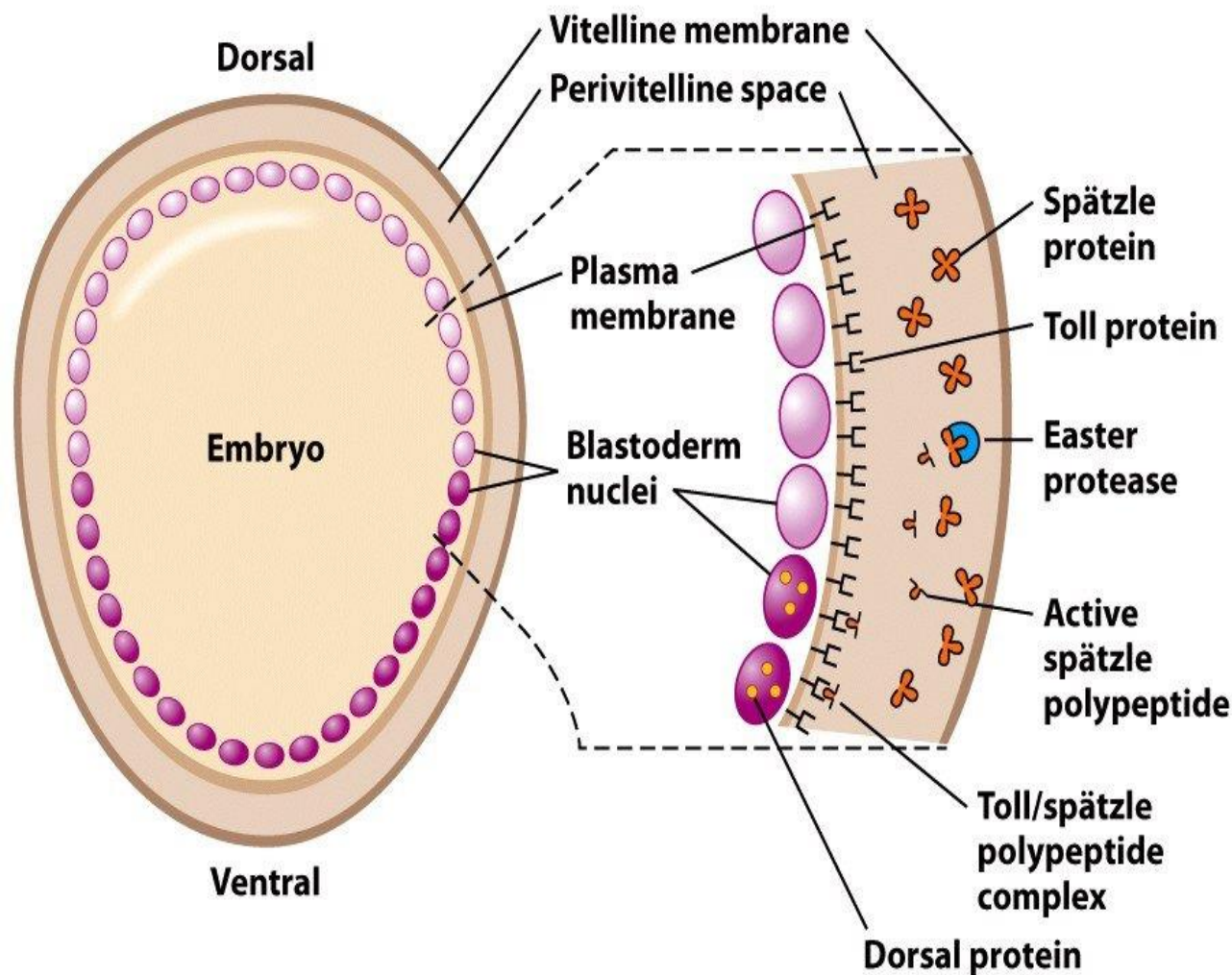
Krok 4: Protein bicoid brání translaci RNA caudal v anterioru embrya; protein nanos brání translaci RNA hunchback v posterioru.

Krok 5: Hunchback RNA je translatován v protein v anteriorní části embrya; caudal RNA je translatován v protein v posteriorní části.

Krok 6: Hunchback (a bicoid) proteiny působí jako transkripční faktory, které regulují funkci genů k diferenciaci anteriorní části embrya; protein caudal působí jako transkripční faktor, který reguluje geny k diferenciaci posteriorní části embrya.



Diferenciace dorzo-ventrální osy embrya octomilky. Příčný řez ukazuje interakci mezi membránovým receptorovým proteinem Toll a proteinem spaetzle, která indukuje diferenciaci podél dorzo-ventrální osy. Ke tvorbě interagujícího polypeptidu dochází v prostoru mezi plazmatickou membránou a žloutkovou membránou na ventrální straně embrya.



Krok 1: Receptorový protein Toll je uniformně distribuován na povrchu plazmatické membrány embrya. Protein spaetzle se nachází v prostoru mezi žloutkovou a plazmatickou membránou.

Krok 2: Proteáza easter štěpí protein spaetzle a vytváří tak aktivní polypeptid spaetzle.

Krok 3: Aktivní polypeptid spaetzle interaguje s receptorovým proteinem Toll.

Krok 4: Aktivní polypeptidový komplex Toll/spaetzle vpouští protein dorsal do jader (indikováno oranžově) na ventrální straně embrya (tmavočerveně).

Determinace dorzo-ventrální osy octomilky proteinem dorsal. Tento protein je transkripčním faktorem, který působí pouze v jádrech na ventrální straně embrya. Protein dorsal reguluje geny *twist*, *snail*, *zerknuellt* a *decapentaplegic*.

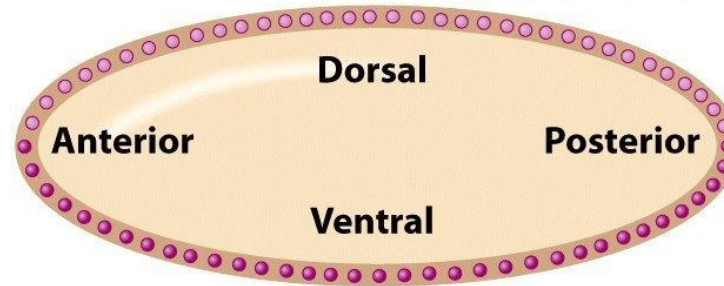
Krok 3a: Dorzální buňky diferencují v epidermis.



Krok 2a: Geny *twist* a *snail* jsou reprimovány.
Geny *zerknuellt* a *decapentaplegic* jsou indukovány.



Krok 1a: Dorzální transkripční faktor je vylučován z jader na dorzální straně.



Krok 1b: Transkripční faktor dorsal vstupuje do jader na ventrální straně (tmavočerveně).



Krok 2b: Geny *twist* a *snail* jsou indukovány.
Geny *zerknuellt* a *decapentaplegic* jsou reprimovány.



Krok 3b: Ventrální buňky diferencují v mezoderm.

Kaskáda genové exprese vedoucí k segmentaci embrya octomilky

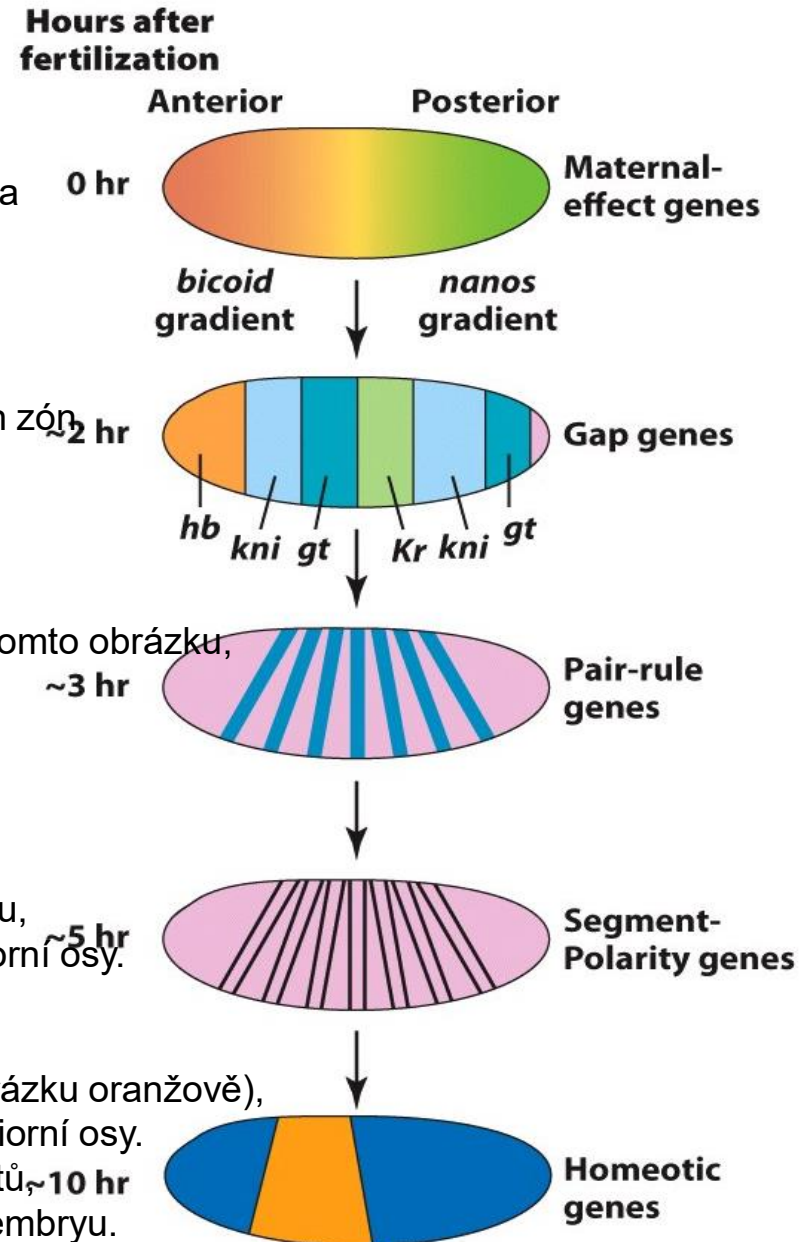
Krok 1: Počáteční antero-posteriorní polarita embrya je založena produkty genů s maternálním účinkem, jako jsou *bicoid* či *nanos*.

Krok 2: Exprese genů velkých mezer rozdělí embryo do širokých zón.

Krok 3: Geny párového pravidla, jako například *fushi tarazu* na tomto obrázku, jsou exprimovány v sedmi pruzích, dále dělí embryo podél antero-posteriorní osy.

Krok 4: Geny polarity segmentů, jako *engrailed* na tomto obrázku, jsou exprimovány ve 14 úzkých proužcích podél antero-posteriorní osy.

Krok 5: Homeotické geny, jako je například *Ultrabithorax* (na obrázku oranžově), jsou exprimovány ve specifických oblastech podél antero-posteriorní osy. Tyto geny, společně s geny párového pravidla a polarity segmentů, determinují identity jednotlivých tělních článků ve vyvíjejícím se embryu.

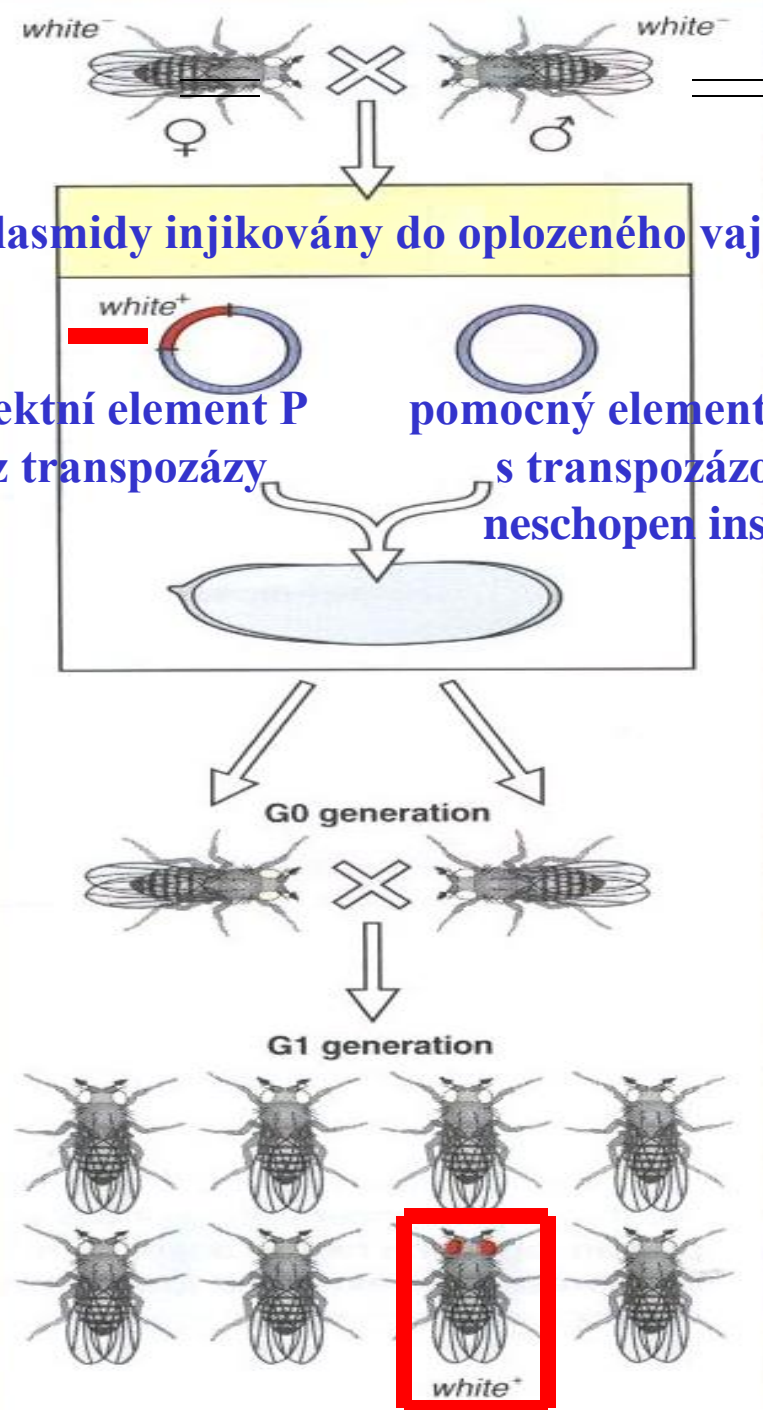


Konstrukce transgenní drosofily

dva plasmidy injikovány do oplozeného vajíčka

defektní element P
bez transpozázy

pomocný element P
s transpozázou,
neschopen inserce



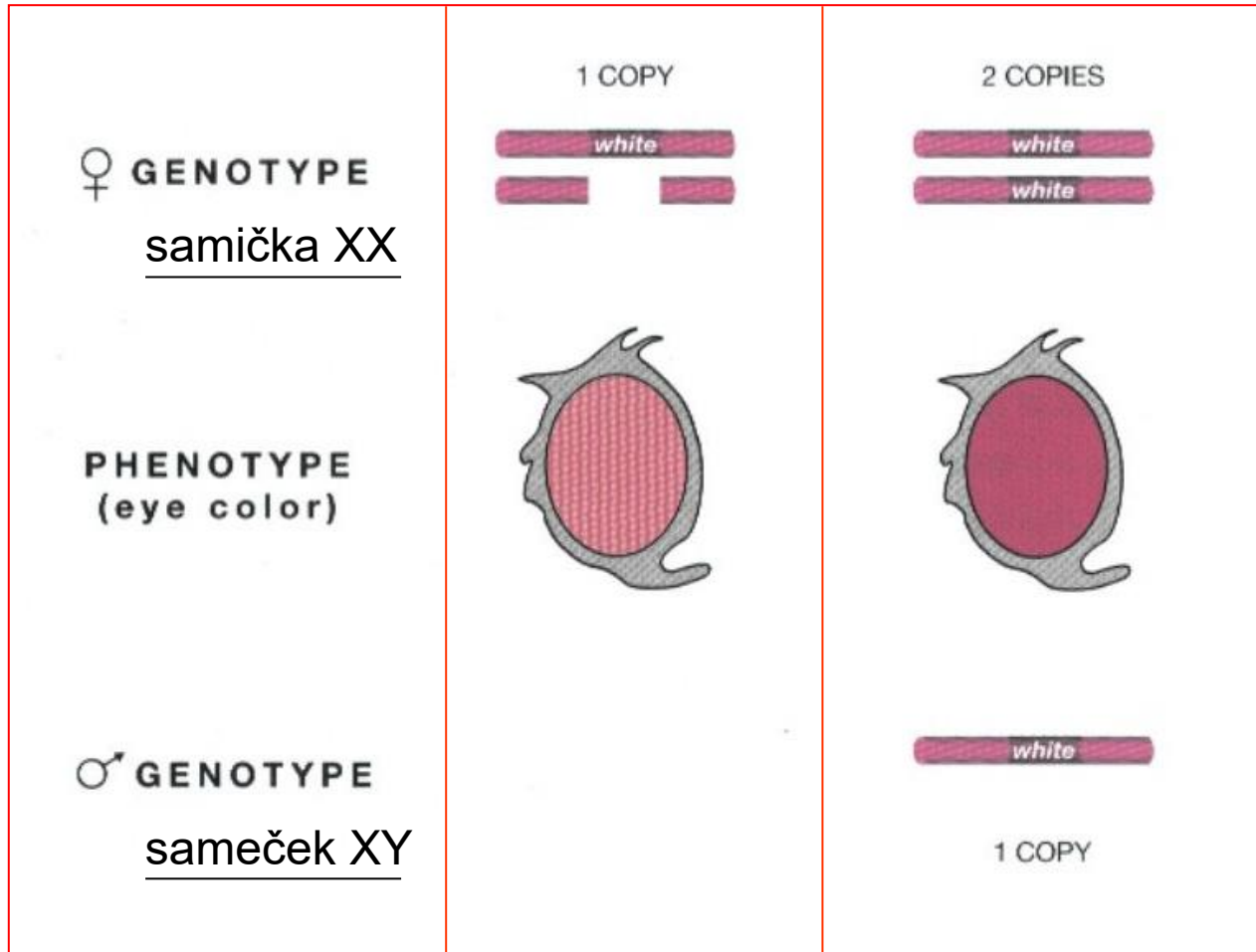
KOMPENZACE DÁVKY GENŮ VÁZANÝCH NA CHROMOZOM X

- Caenorhabditis
 - Drosophila
 - savci

Drosophila melanogaster



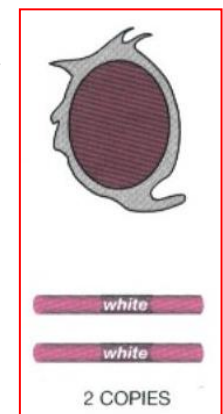
Hermann Joseph “H.J.” Muller (1930): paradox funkce genů vázaných na chromozom X u drosophily, hladina X-produktů je stejná u samic XX jako u samečků XY – **KOMPENZACE DÁVKY GENŮ** zdvojením intenzity X u samečků, odpovídá skupina genů **MSL – male specific lethal complex**, váže se na X u samečka, koreluje se specifickou acetylací H4K16.



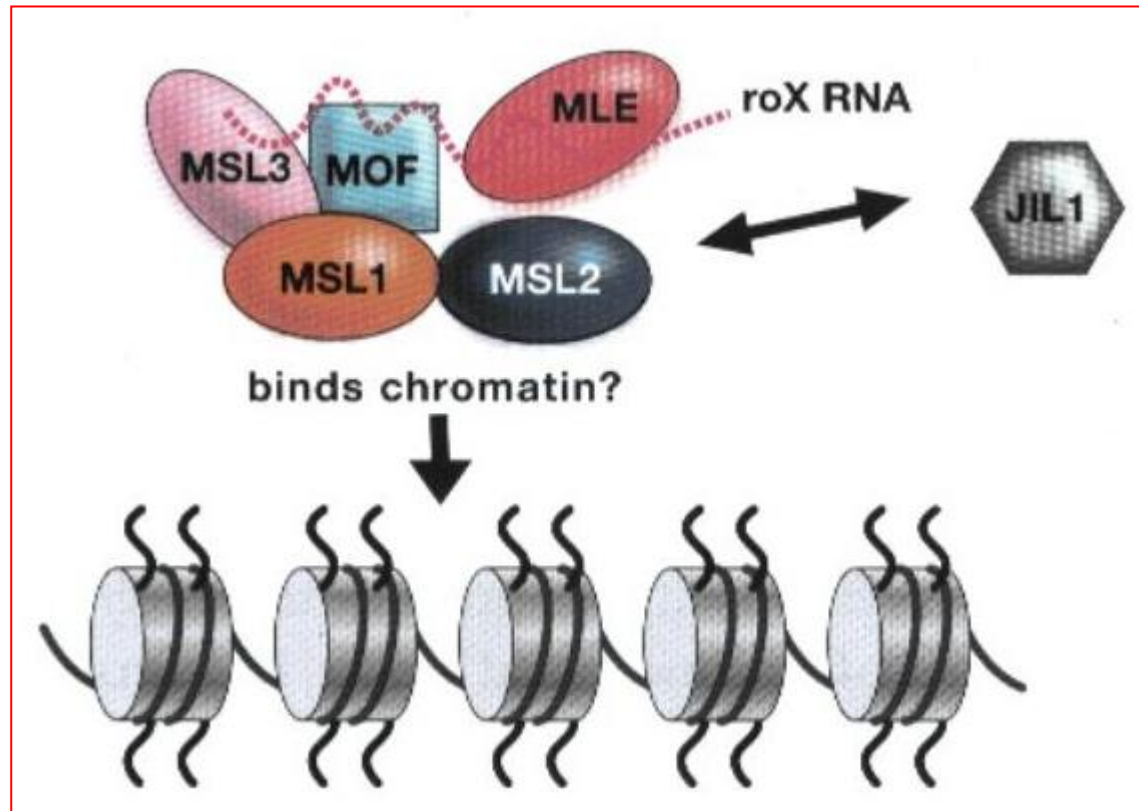
Analýza funkce hypomorfní X-mutace *white* odpovídající za tvorbu červeného pigmentu oka:

Intenzita barvy je úměrná genové expresi, samičky se dvěma X však mají stejnou barvu oka jako samečci XY.

Experimentální kontrolní konstrukt (bez vazby na X):

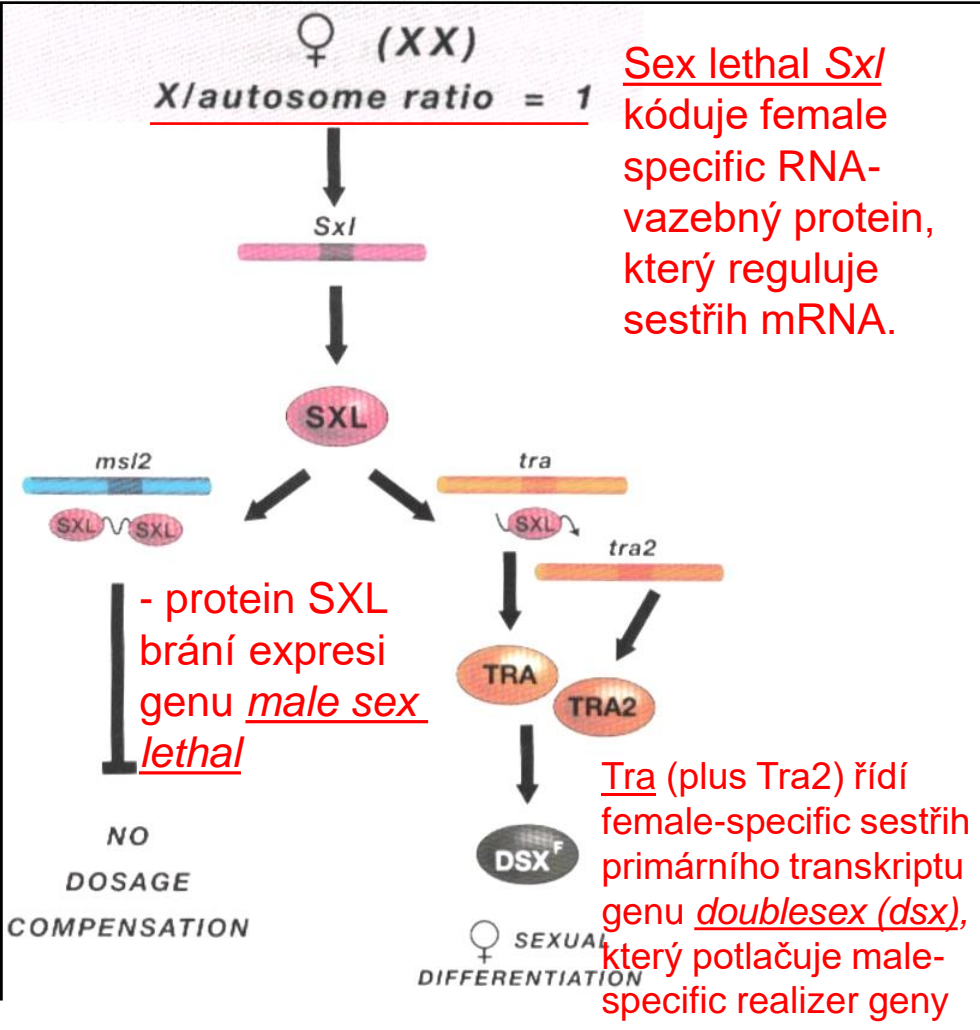
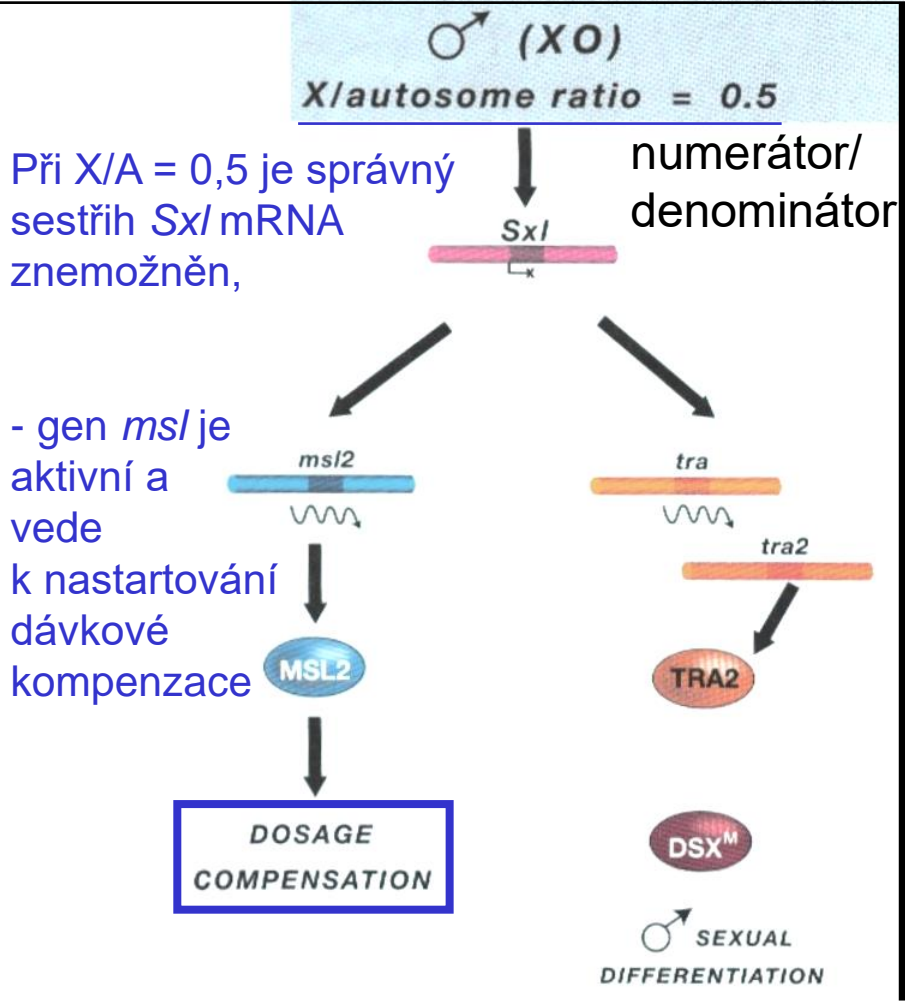


MSL – male specific lethal complex, váže se na X u samečka, koreluje se specifickou acetylací H4K16: vede k neutralizaci pozitivního náboje H4 a tedy k oslabení represivní internukleosomální struktury



Komponenty MSL vedou k acetylaci histonu H4 a rozvolnění nukleosomů (včetně fosforylace H3) - funkce **zesilovače transkripce X-genů u samečka**

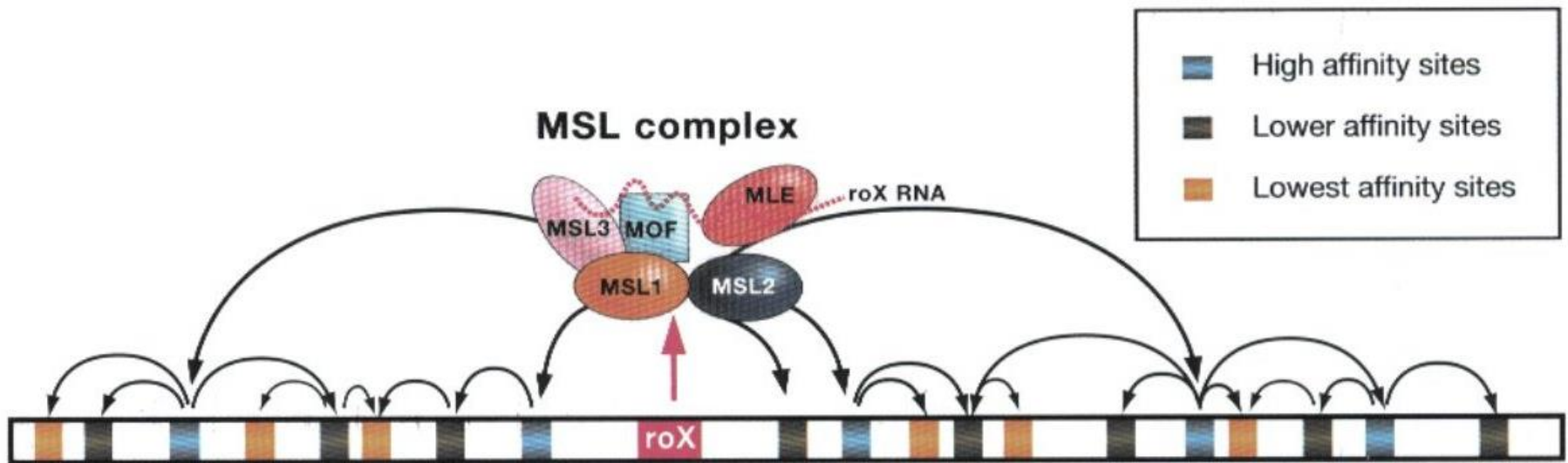
Regulace kompenzace genové dávky začíná – stejně jako pohlavní determinace - u měření poměru počtu X-chromozomů a sad autozomů



Gen *Sex lethal* je kódován X-chromozomem a je pozitivně regulován transkripčními faktory kódovanými X. Protein SXL pozitivně reguluje sestřih své vlastní mRNA. *Sxl* počíná samičí diferenciaci specifickou regulací sestřihu genu *transformer (tra)*.

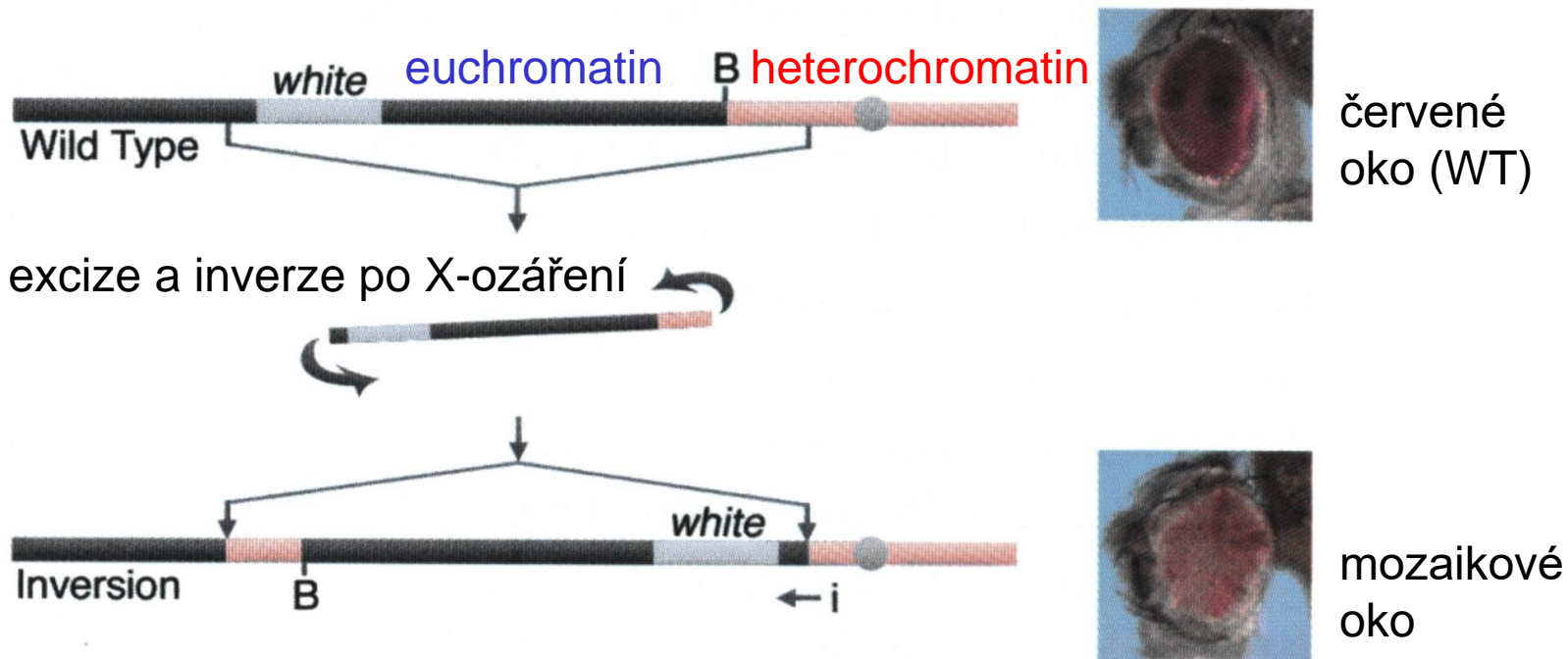
Gen *roX* je centrem aktivace jediného chromozomu X u sameček drosofily (podobně jako X-vázaný gen *Xist* u savců – kde však jde o inaktivační centrum)

Gen *roX* prostřednictvím svých mRNA atrahuje MLS (male specific lethal) komplex, ten se šíří po chromozomu X a více ho aktivuje.



Translokace *roX* lokusu na autozom přitahuje MLS komplex (a aktivuje) jeho geny.

Drosophila: poziční efekt (PEV)



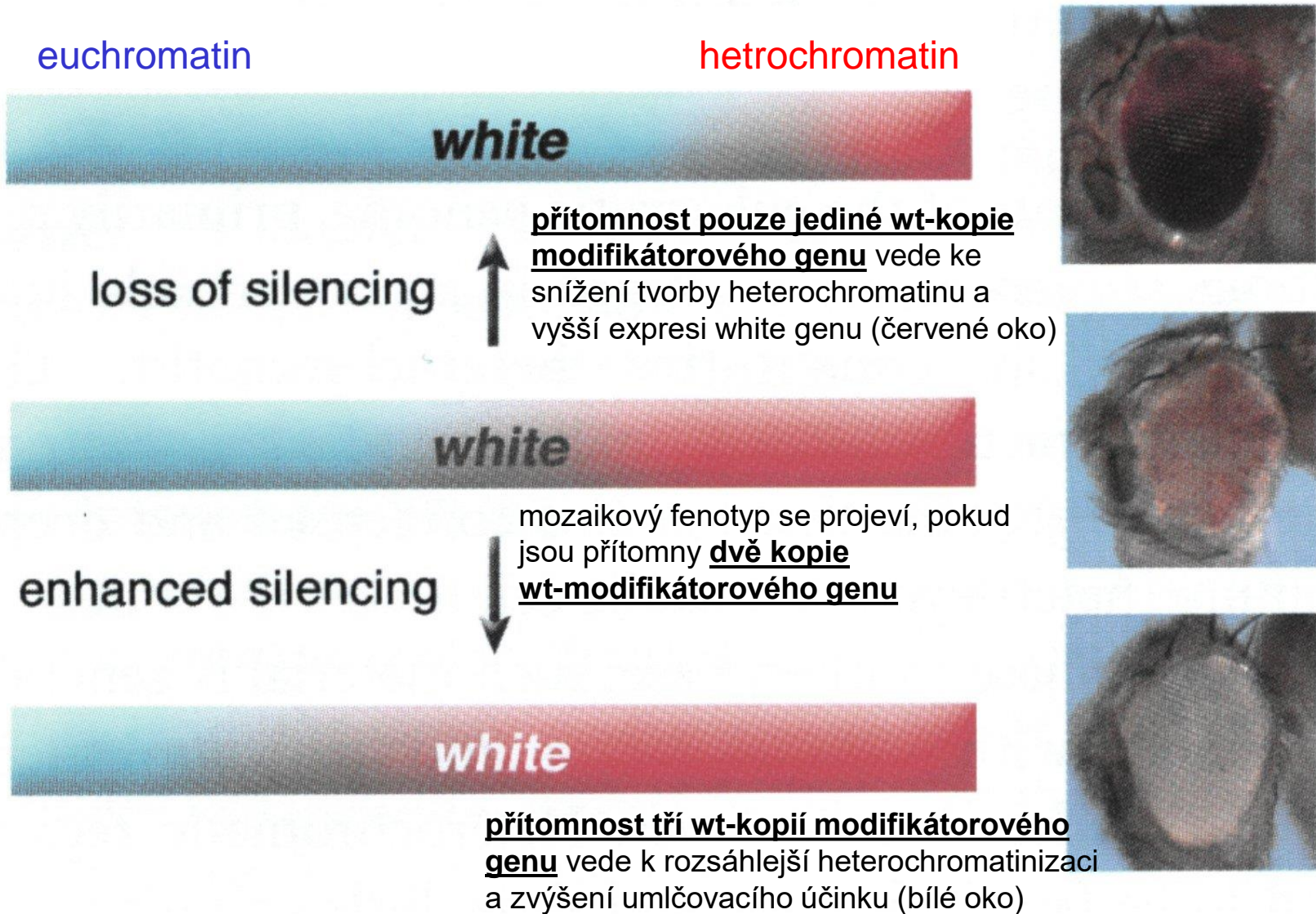
PEV efekt : Lokus *white* je standardně umístěn v euchromatinu, po inverzi pouze 25kb od pericentromerického heterochromatinu (Muller 1930), odtud se šíří restrukturační a umlčování euchromatinu. Ztráta umlčení v některých buňkách oka v procesu diferenciace vede k variegovanému fenotypu.



U much vykazujících PEV lze izolovat sekundární mutace, které buď suprimují fenotyp (*Su(var)* = ztráta umlčení, či zesilují fenotyp (*E(var)* = zvyšují umlčování).

Účinek modifikátorů na variegaci projevu mutace *white* je dávkově závislý

Modifikátory (~30) jsou strukturní proteiny heterochromatinu.

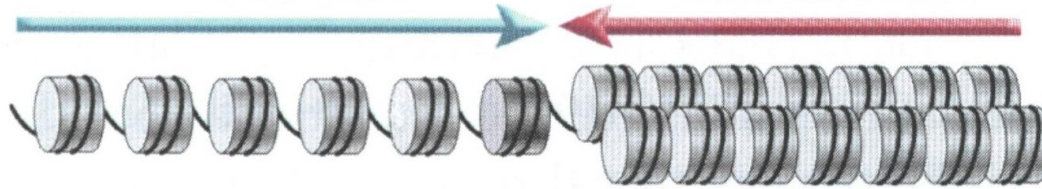


Přechod euchromatického stavu na heterochromatický vyžaduje sérii změn v histonových modifikacích

Removal of "active" histone marks

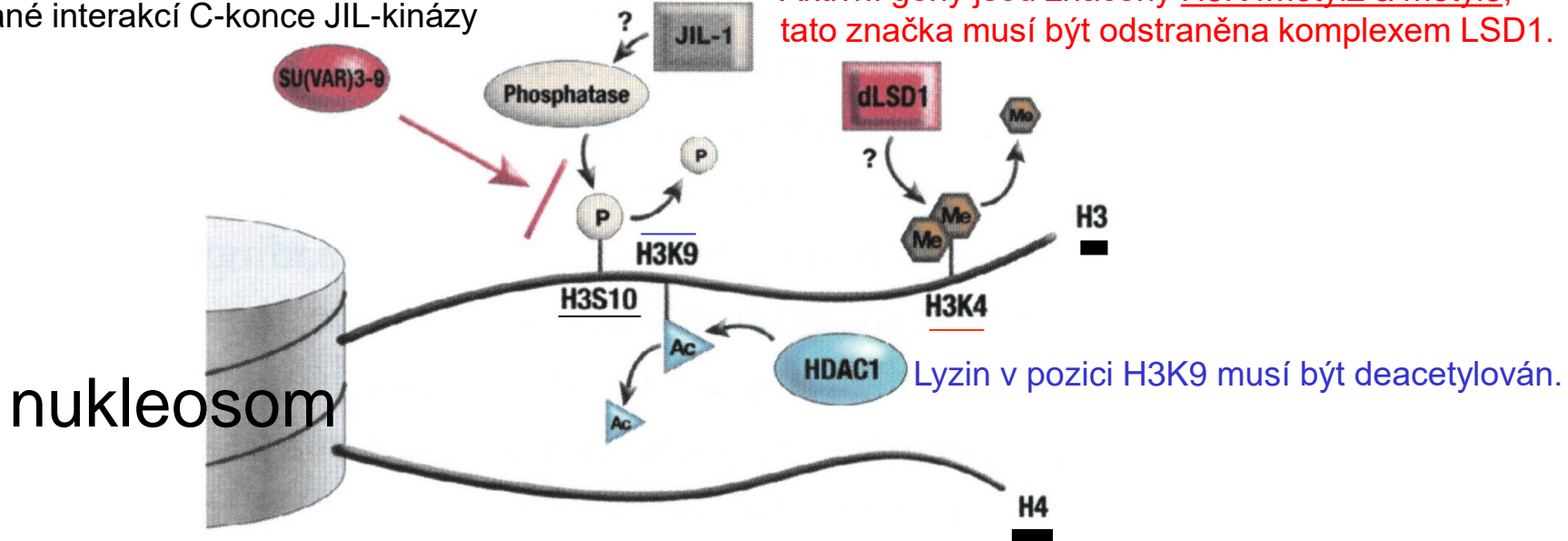
Euchromatin

Heterochromatin



Fosforylace H3S10 může interferovat s metylací H3K9; defosforylace nastává účinkem fosfatázy směřované interakcí C-konce JIL-kinázy

Aktivní geny jsou značeny H3K4metyl2 a metyl3, tato značka musí být odstraněna komplexem LSD1.

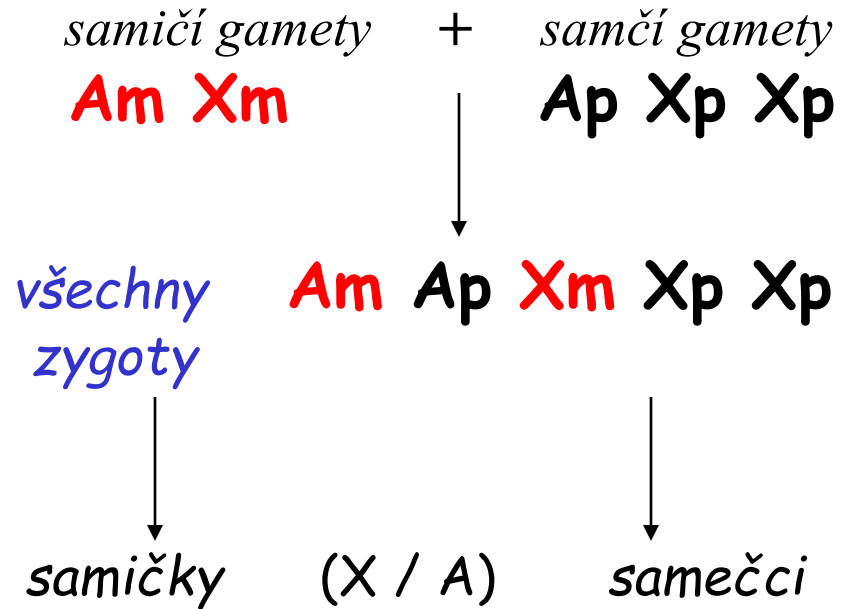


V euchromatinu je H3K9 acetylován, tato značka je odstraněna histon deacetylázou HDAC1.

EPIGENETICKÁ DETERMINACE POHLAVÍ

Sciara coprophilia, moucha smutnice XX/XO

(specifická eliminace paternálního X, Metz 1938)



somatické buňky

Am Ap Xm Xp

Am Ap Xm

zárodečné buňky

Am Ap Xm Xp

Am Ap Xm Xp

(zde nastane nondisjunkce X chromozomů!)

PSEUDOARRHENOTOKIE

selektivní umlčování či eliminace paternálních chromosomů

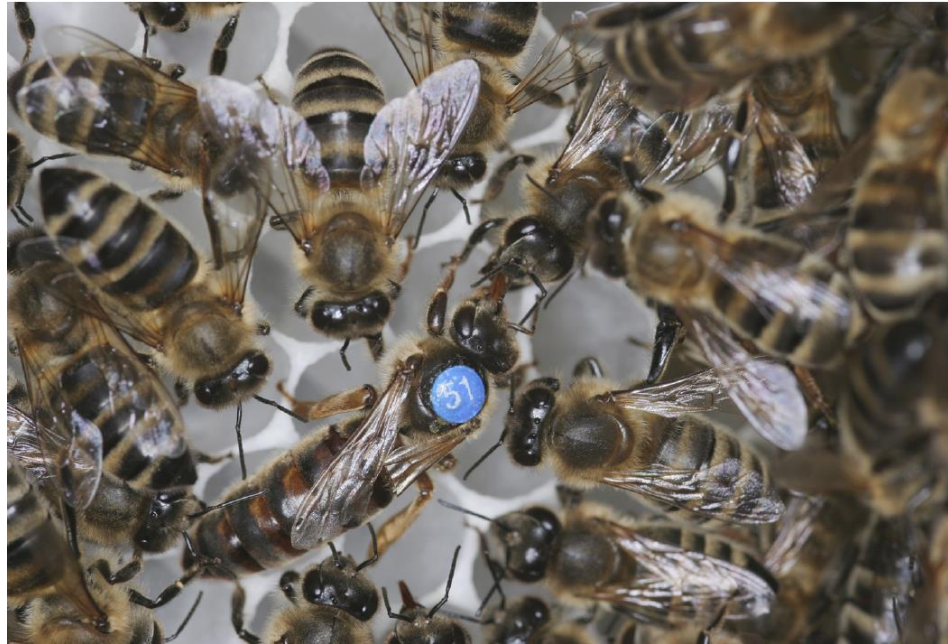


červec citroníkový *Planococcus citri*, Homoptera
fakultativní heterochromatinizace paternálních chromosomů (Uzi Nur 1990, Rochester)



Není včelka jako včelka, i když mají shodný genotyp (AAXX):
královna a dělnice

Dva odlišné fenotypy samic: královna a dělnice



dělnice

královna

hmotnost těla	100 mg	250 mg
dosažený věk	38 – 140 dnů	1 – 3 roky
pylový váček	ano	ne
voskové žlázy	ano	ne
počet vaječnicků	2 – 12	150 - 180

Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation

R. Kucharski,* J. Maleszka,* S. Foret, R. Maleszka†

Fertile queens and sterile workers are alternative forms of the adult female honeybee that develop from genetically identical larvae following differential feeding with royal jelly. We show that silencing the expression of DNA methyltransferase Dnmt3, a key driver of epigenetic global reprogramming, in newly hatched larvae led to a royal jelly–like effect on the larval developmental trajectory; the majority of Dnmt3 small interfering RNA–treated individuals emerged as queens with fully developed ovaries. Our results suggest that DNA methylation in *Apis* is used for storing epigenetic information, that the use of that information can be differentially altered by nutritional input, and that the flexibility of epigenetic modifications underpins, profound shifts in developmental fates, with massive implications for reproductive and behavioral status.

standardní výživa
→ **dělnice**

**diploidní
XX larva**
→ *mateří kašička*
královna

*inhibice
metylace DNA*
→ **královna**

SCIENCE VOL 319 28 MARCH 2008

