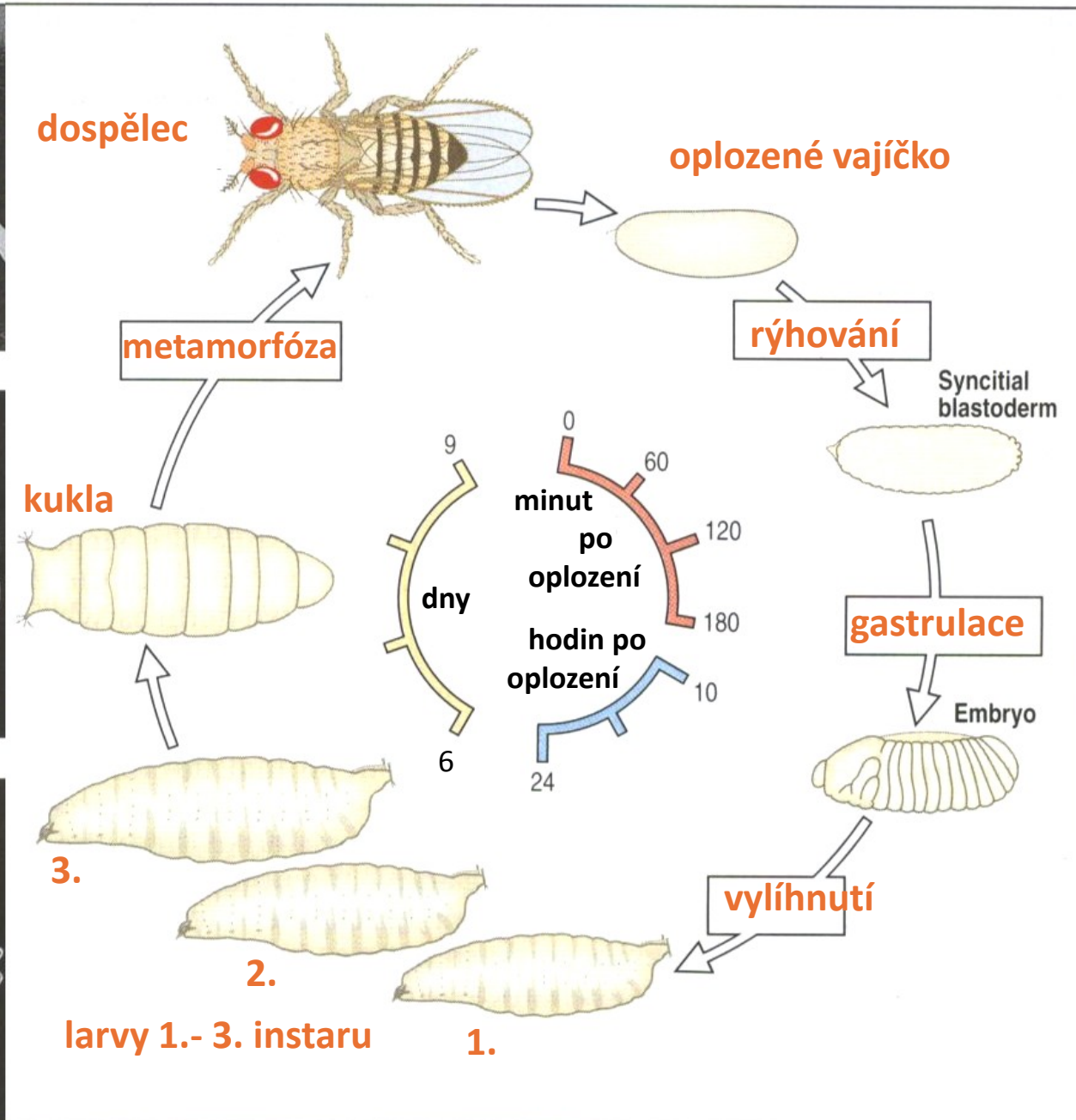
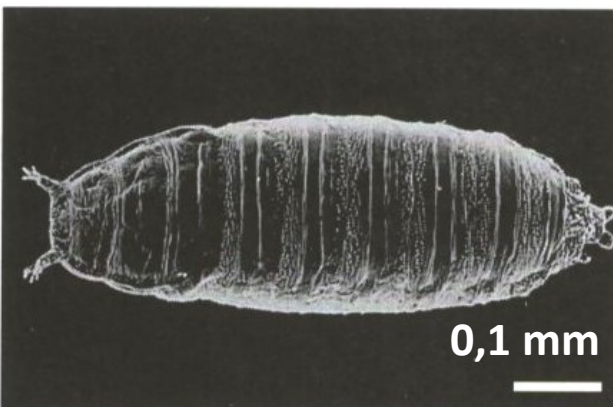
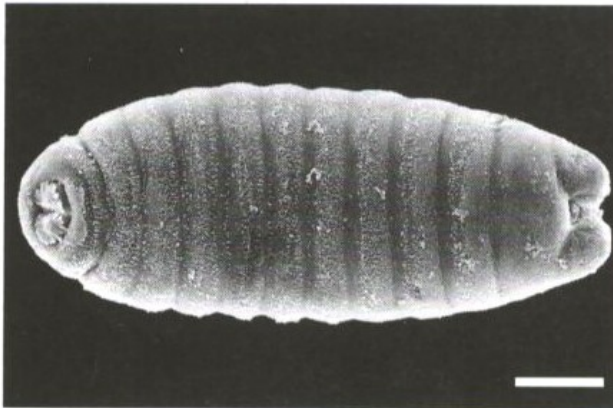
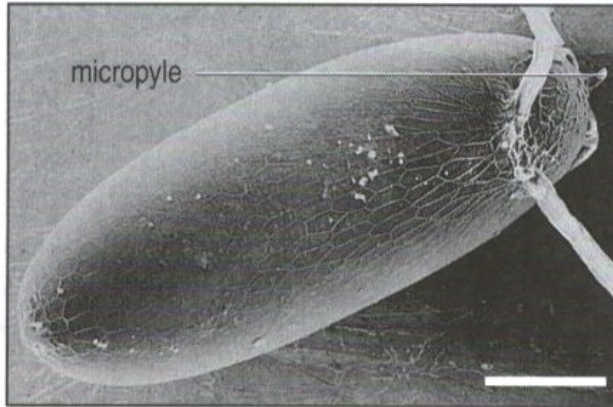




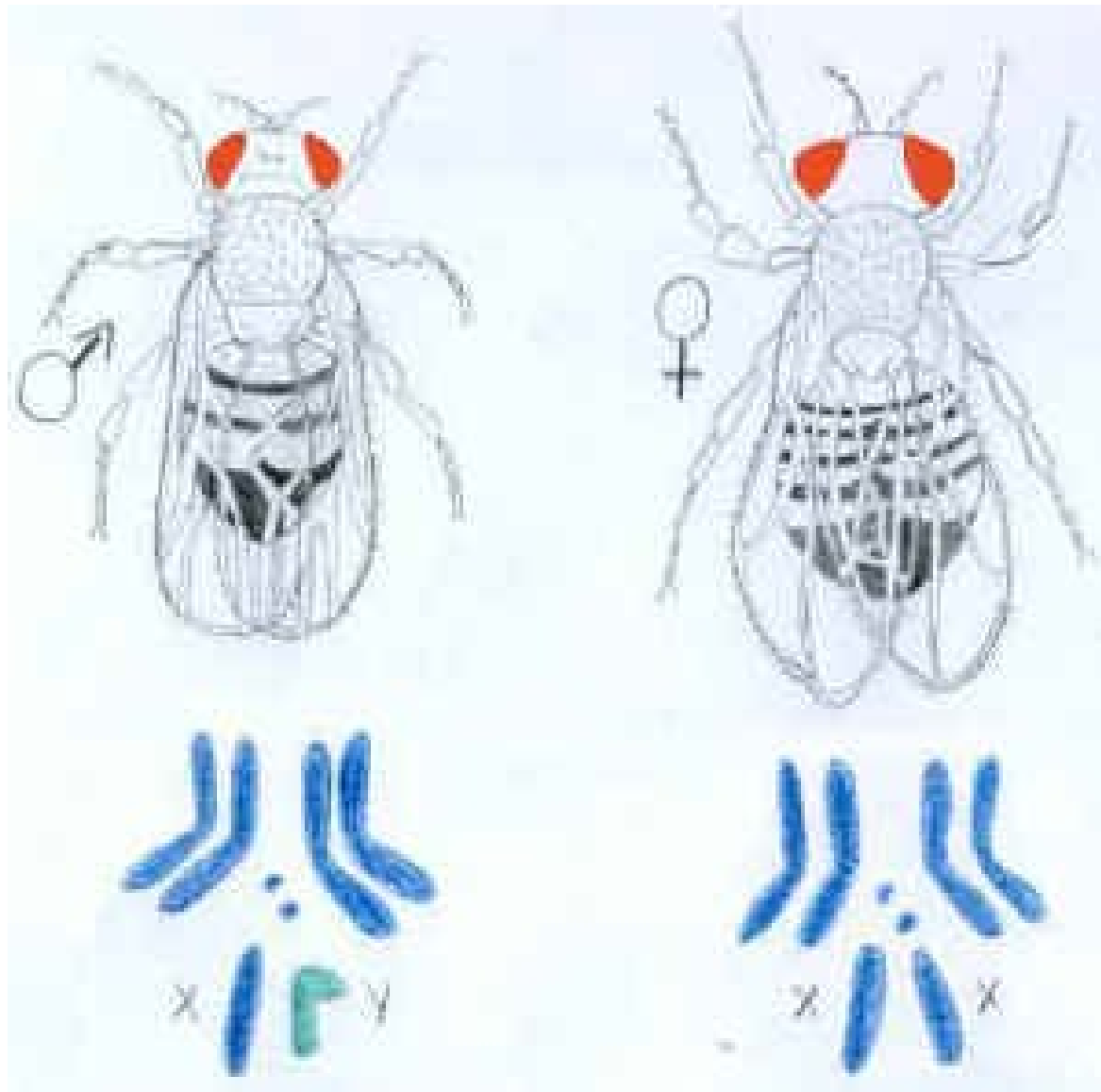
Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster : životní cyklus

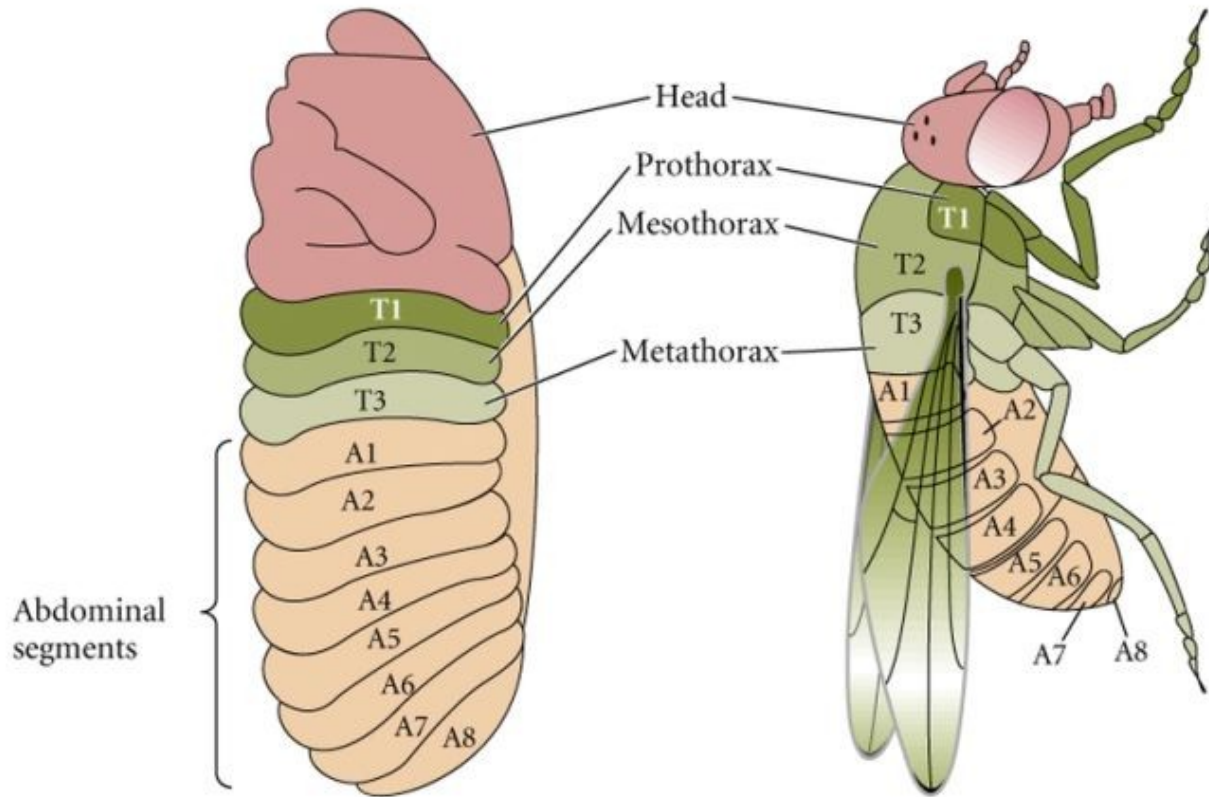


Chromosomy *Drosophila*

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

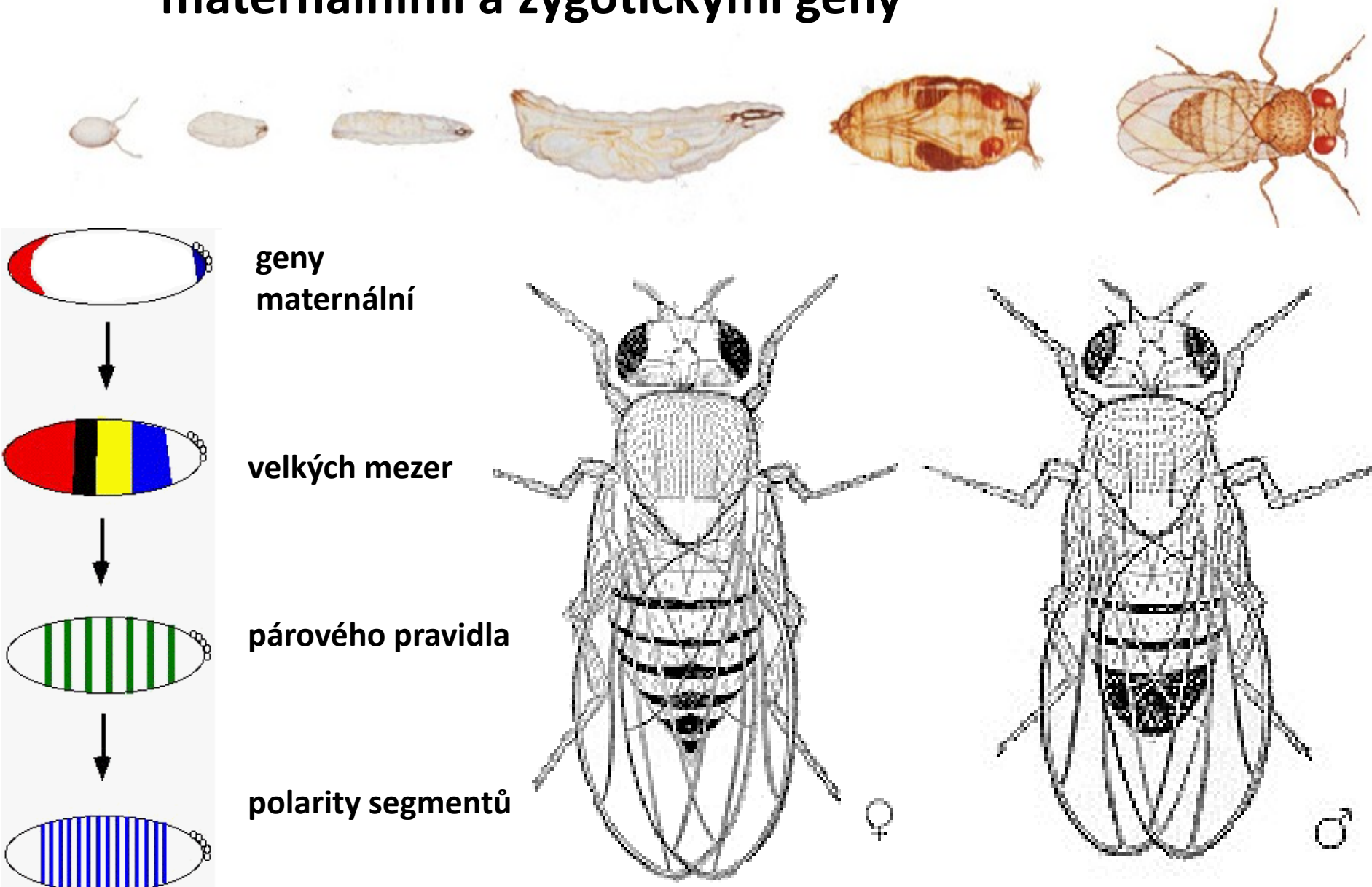


Vývoj drosofily



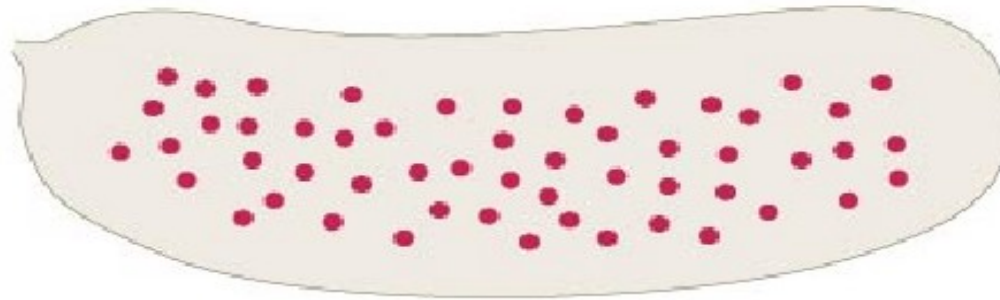
- srovnání larvální a adultní segmentace
- plán těla zahrnuje hlavovou oblast, hrudní články a zadečkové
 - prothorax (T1) má jen nohy
 - mesothorax (T2) má nohy a křídla
 - metathorax (T3) má nohy a kyvadélka

Individuální vývin octomilky je kaskádou řízenou maternálními a zygotickými geny

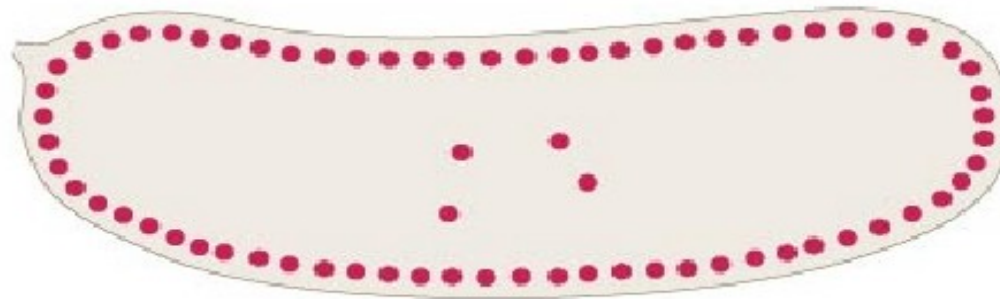




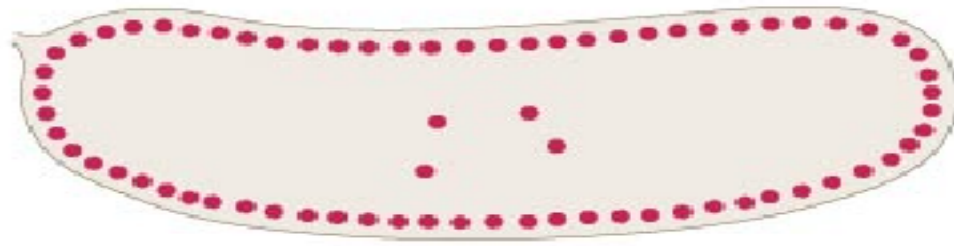
fúzí parentálních gamet vzniká diploidní zygota



9 cyklů dělení jader vytváří mnohojaderné cyncytium



jádra migrují k povrchu vajíčka – jaderný blastoderm

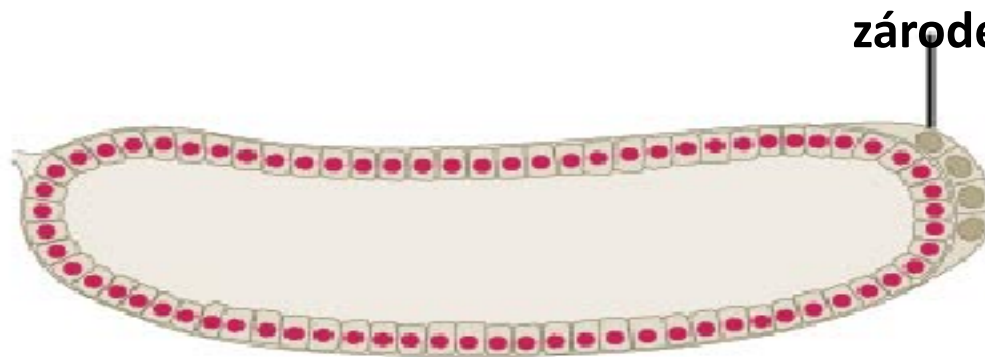


jádra migrují k povrchu vajíčka – jaderný blastoderm



pólové buňky
tvoří posteriorní pól

4 další cykly dělení jader u buněčného povrchu



zárodečné buňky

tvorba jednobuněčné vrstvy – buněčný blastoderm

Časný embryonální vývoj octomilky

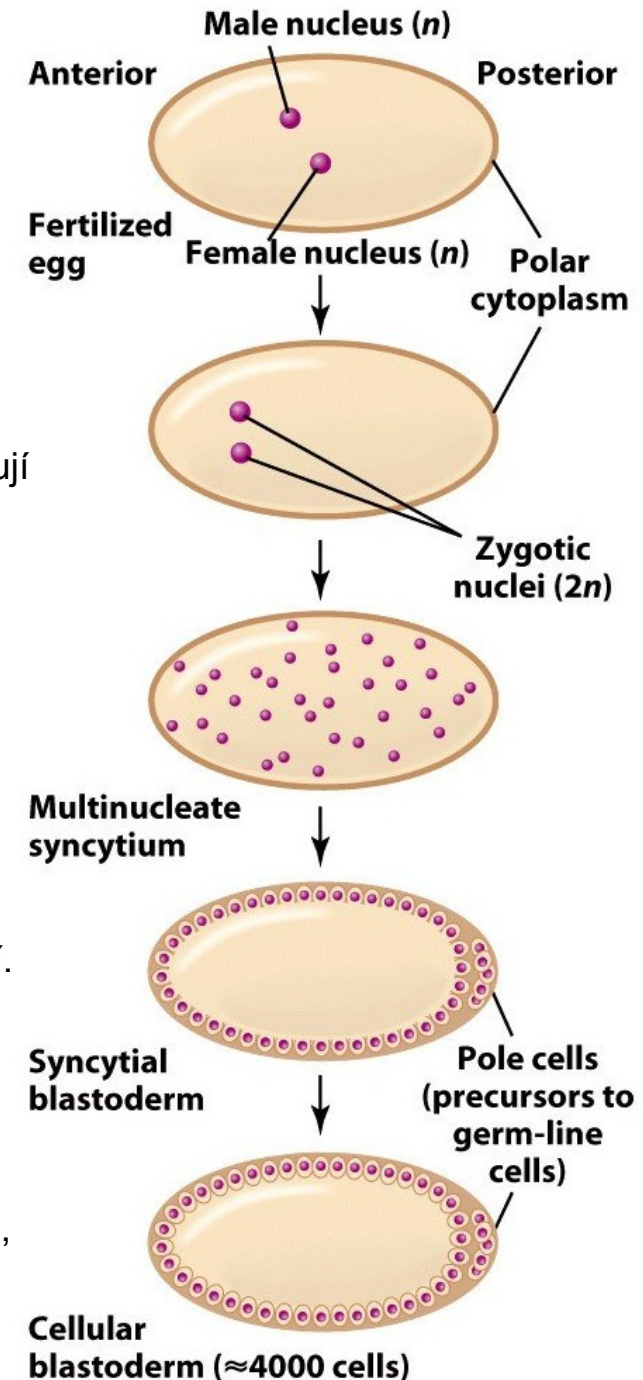
Krok 1: Oplozené vajíčko obsahuje dvě haploidní (n) jádra, jedno od samečka a jedno od samičky.

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

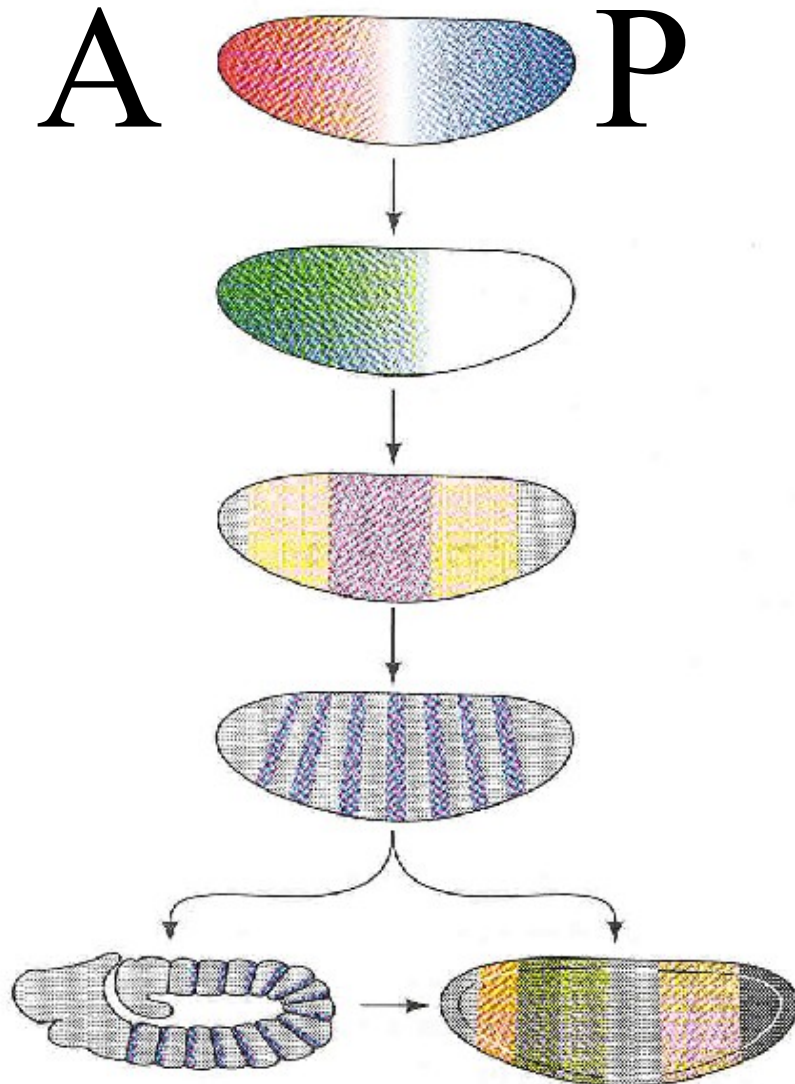
Krok 3: Zygotická jádra se rychle dělí a vytvářejí jedinou buňku (syncytium) a mnoha jádry.

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.

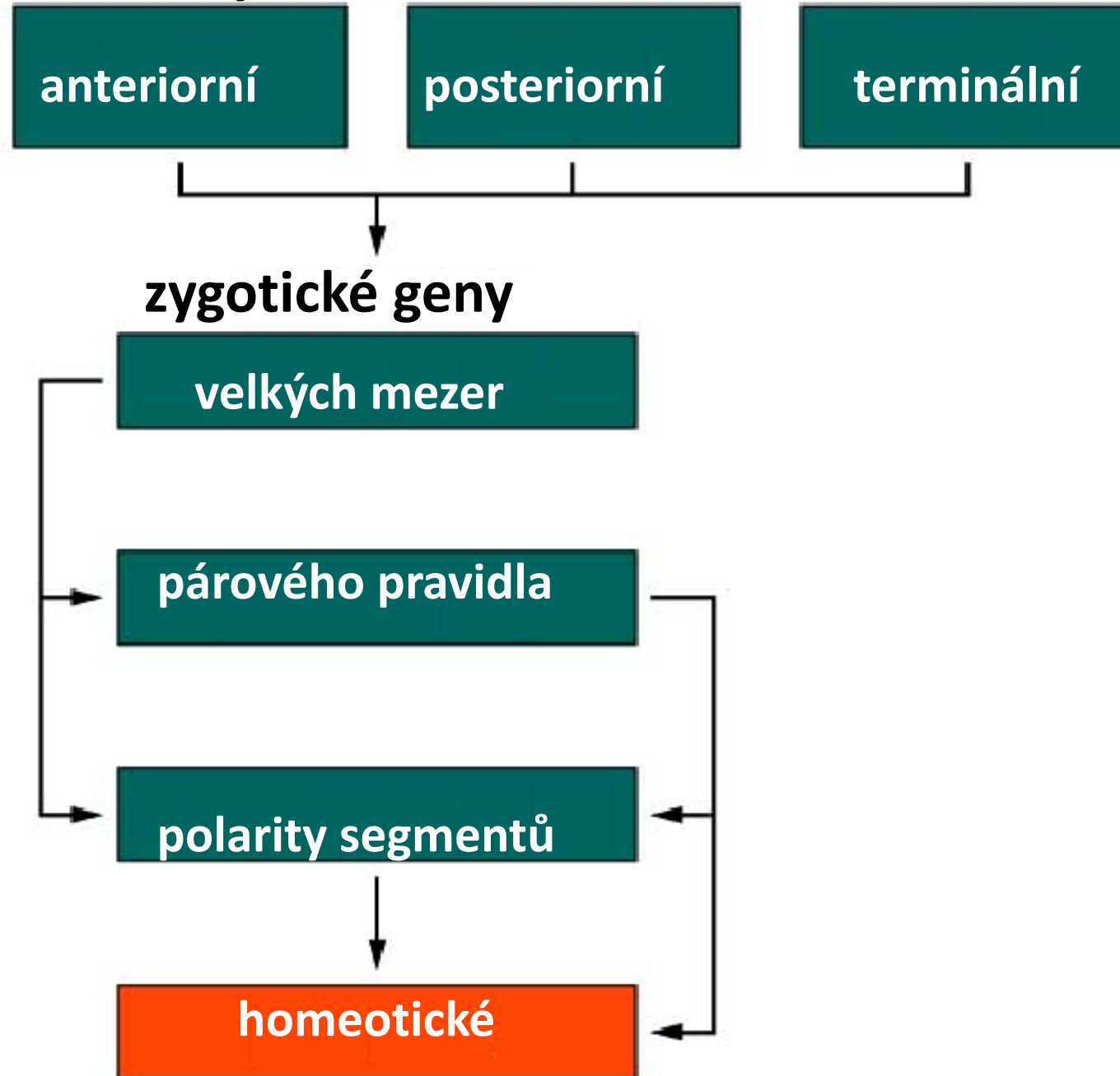


Specifikace hlavní tělní osy

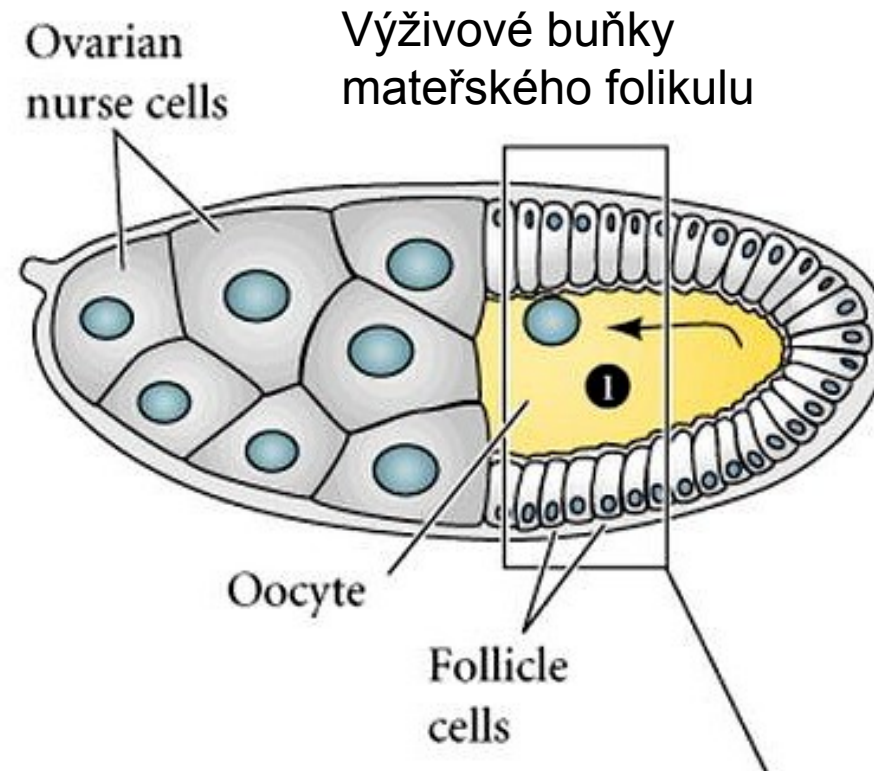


- anterior-posteriorní polarita
- geny s maternálním účinkem
- geny velkých mezer
- geny párového pravidla
- geny polarity segmentů
- homeotické geny

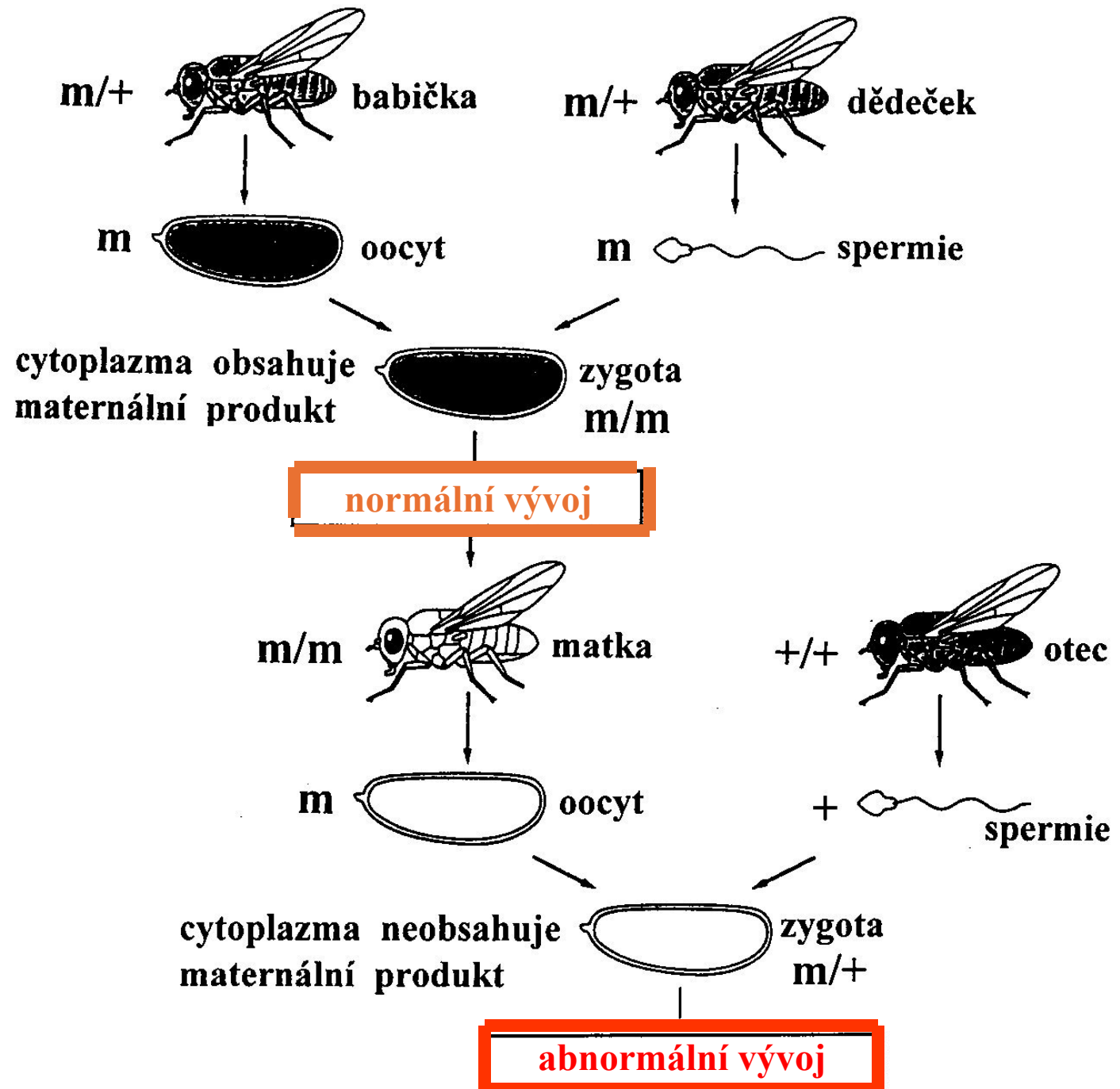
Geny s maternálním účinkem



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

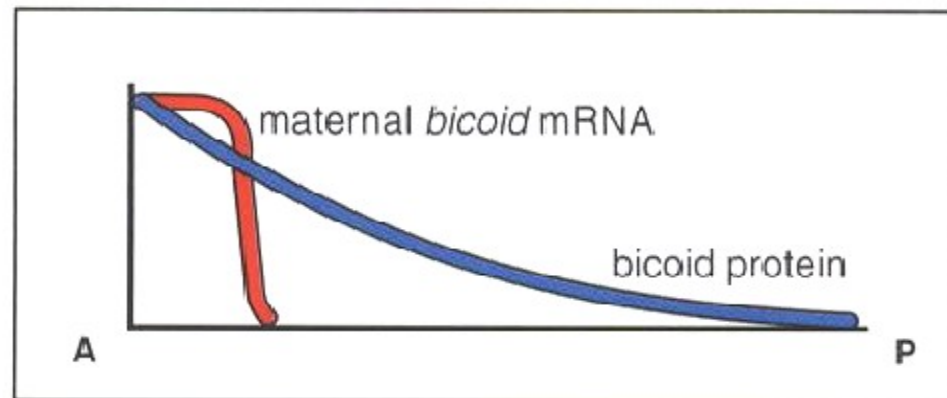
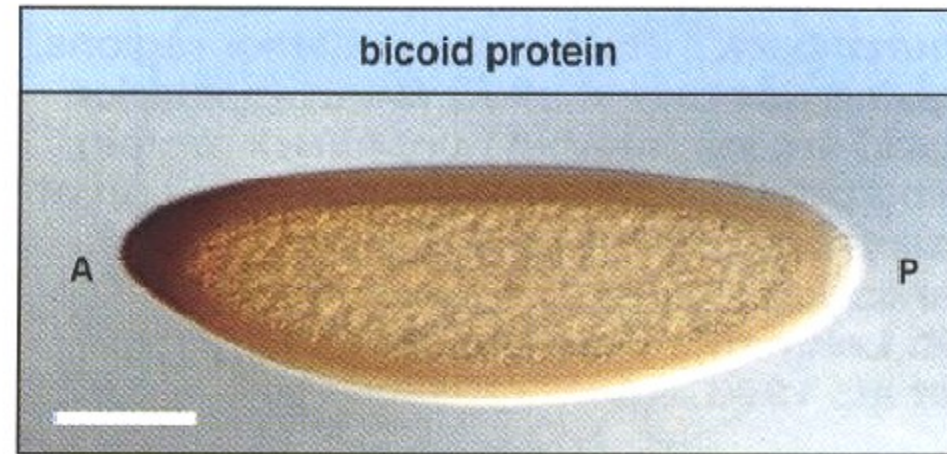
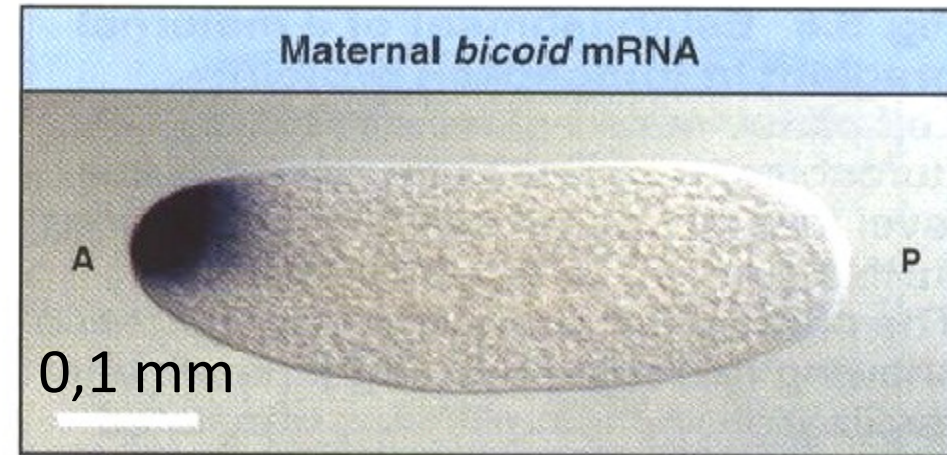


Dědičnost genů s maternálním účinkem



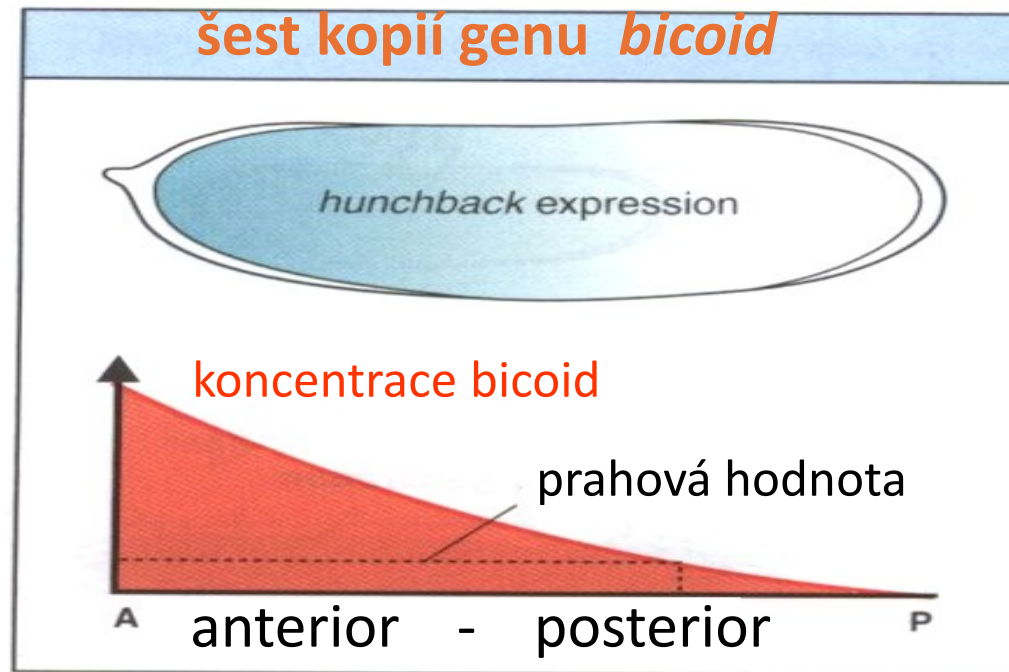
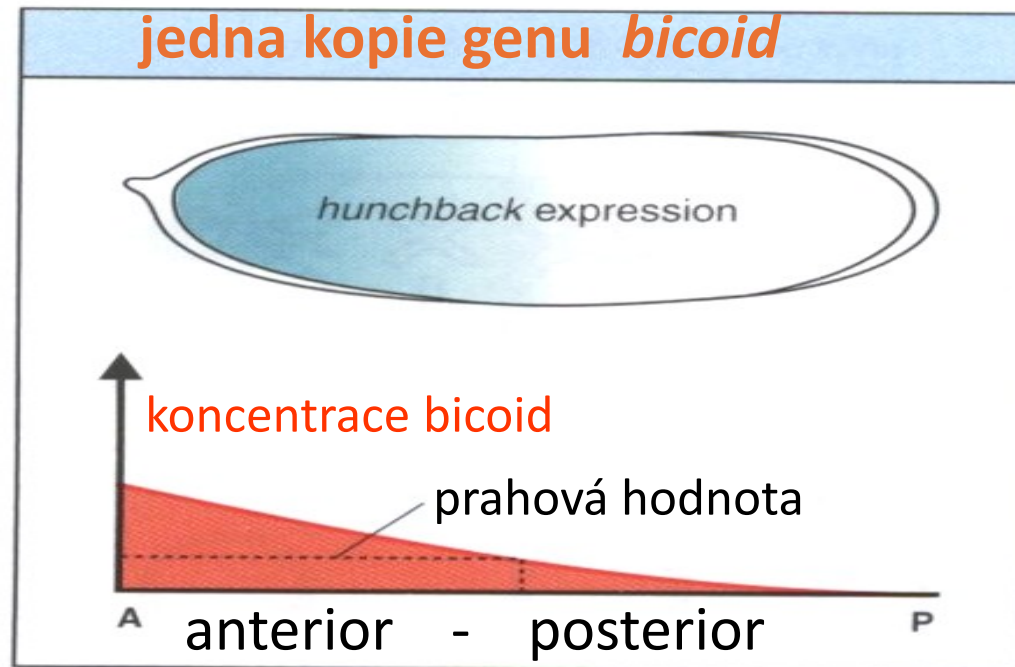
Distribuce maternální mRNA genu *bicoid* ve vajíčku

a proteinu *bicoid* po fertilizaci

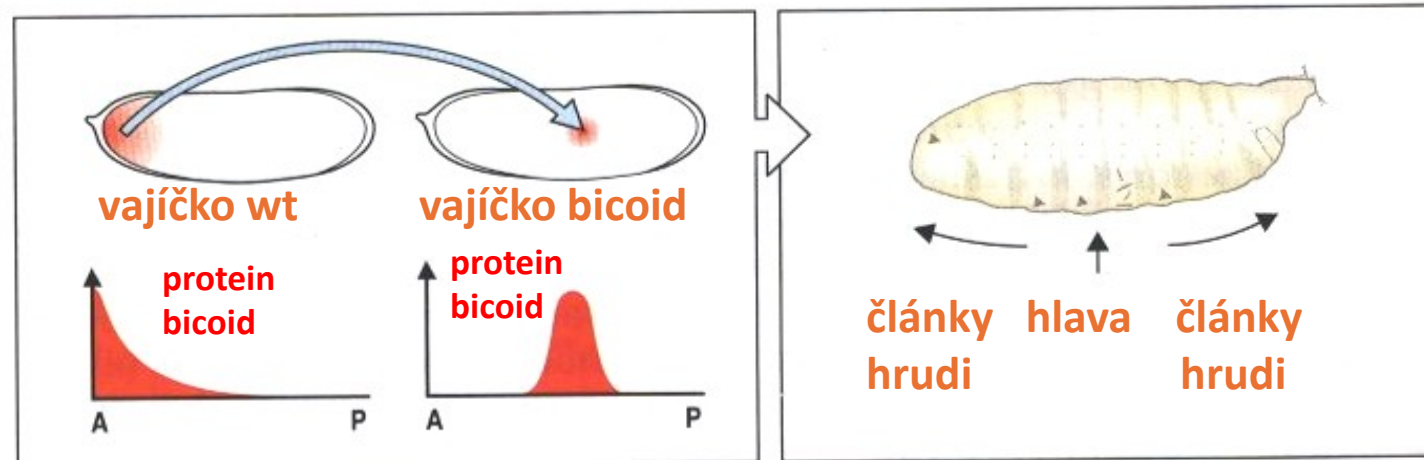
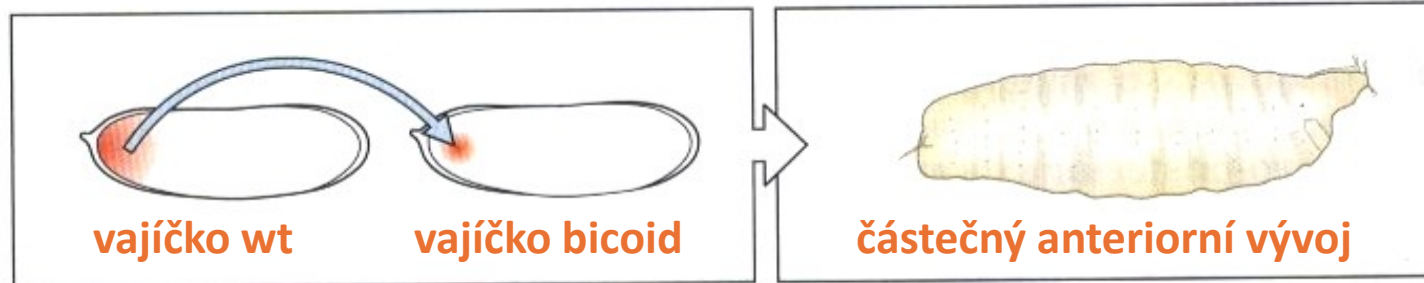
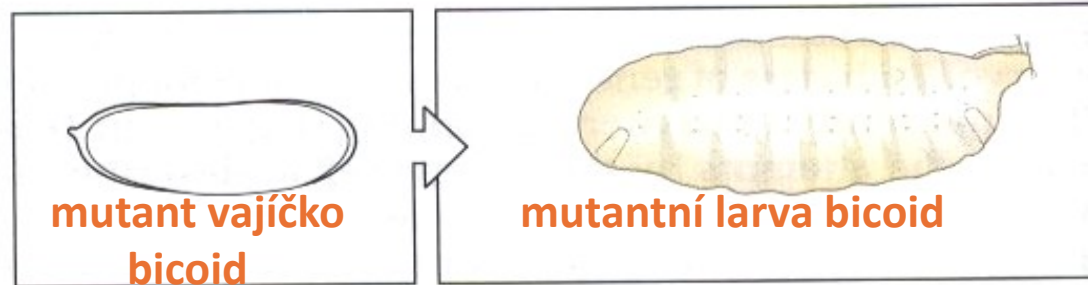
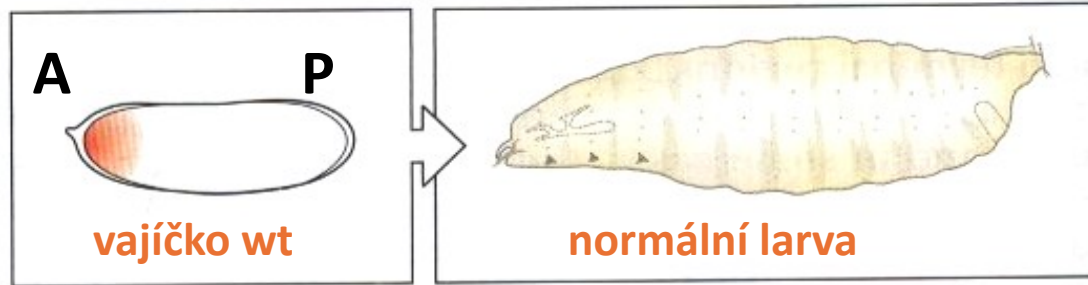


Hladina maternálního proteinu bicoid řídí expresi zygotického genu *hunchback*

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



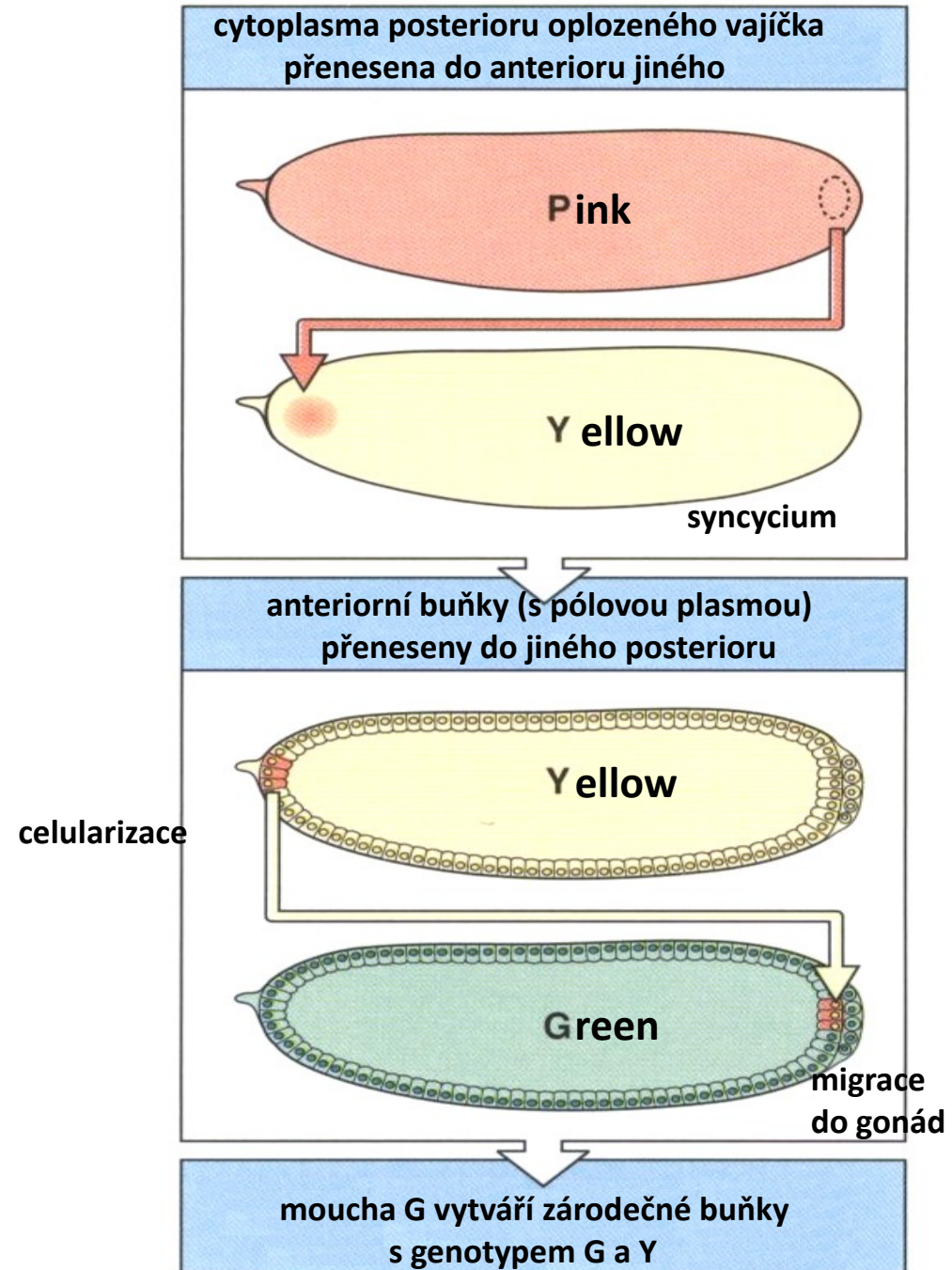
Transplantace pólové cytoplasmy může indukovat tvorbu zárodečné linie

...

primordiální zárodečné buňky jsou prvními odlišnými, na posteriočním konci

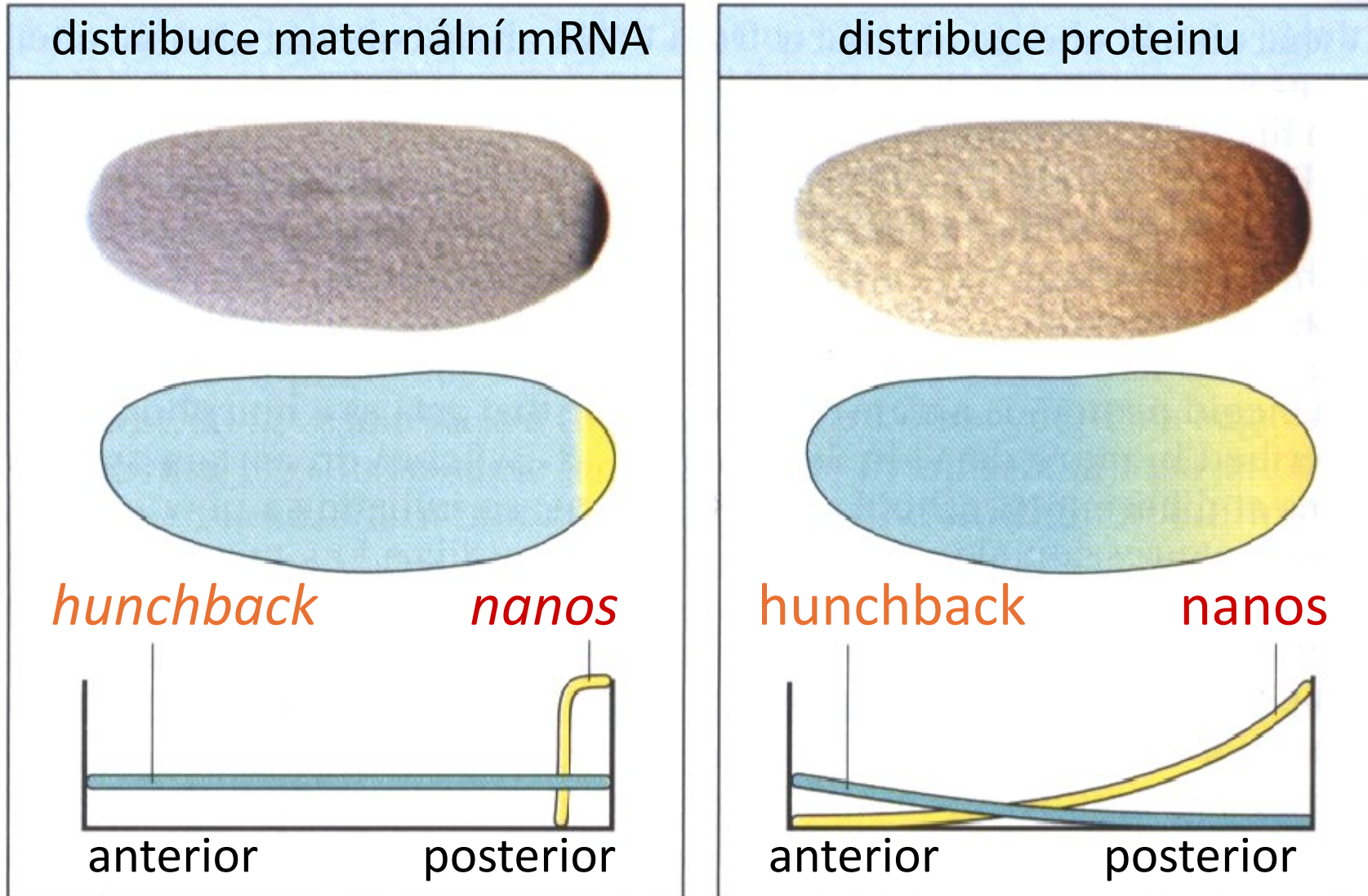
...

u drosofily,
hlístice (granule P)
a žab

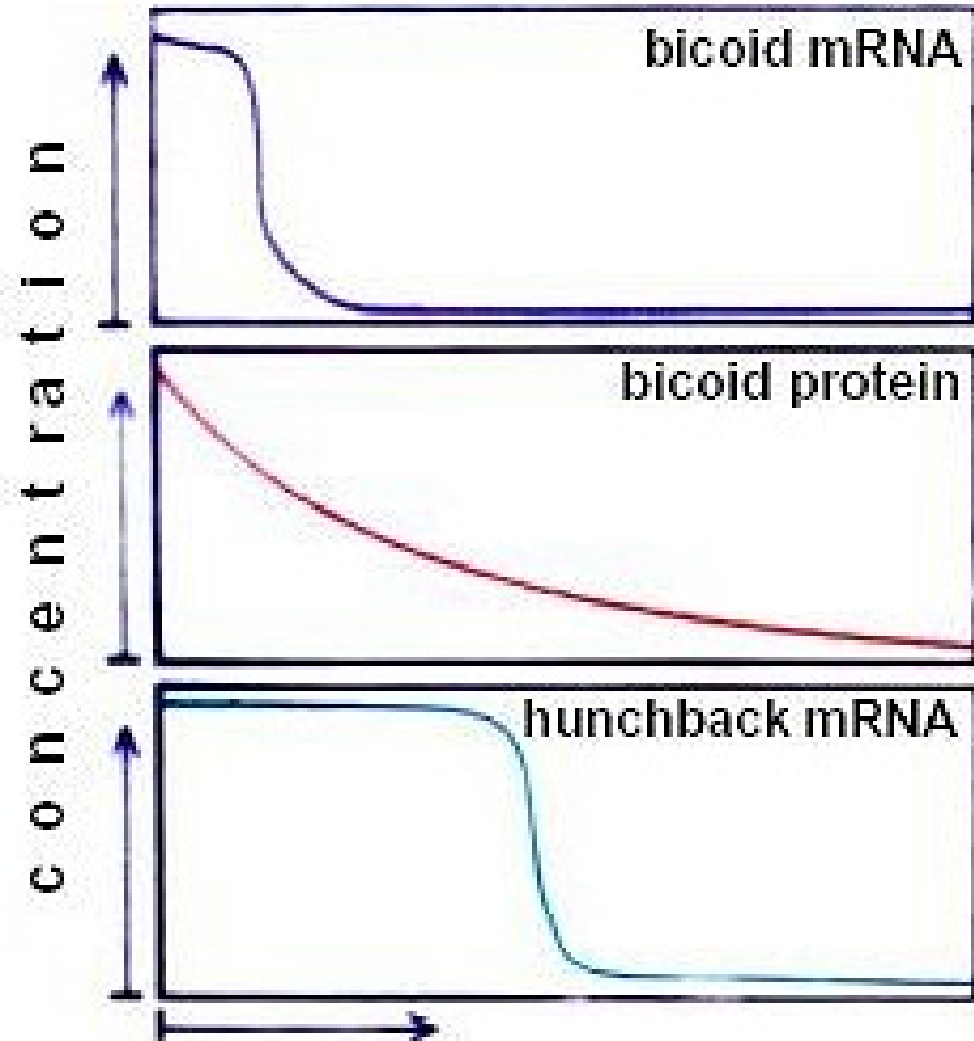
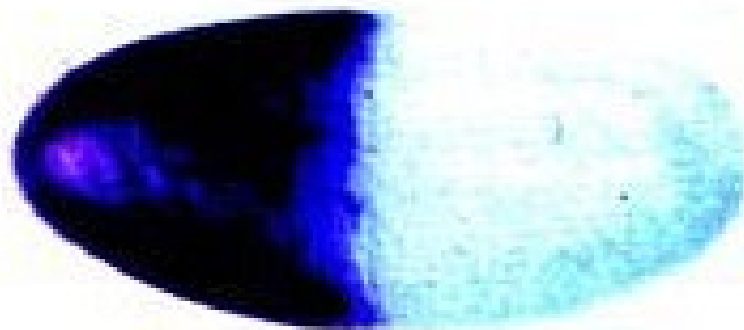
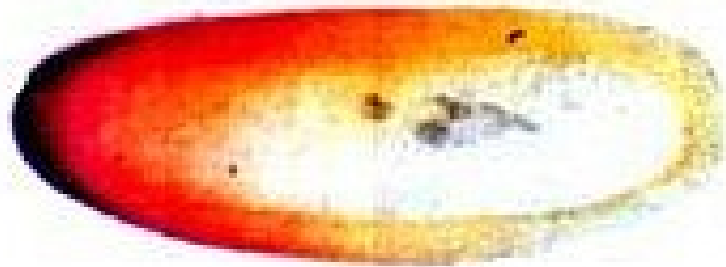
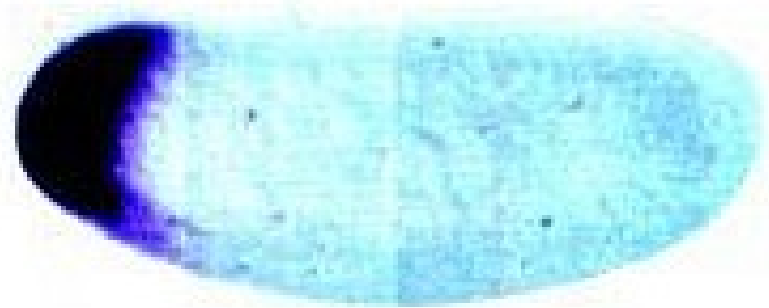


Maternální podstata A – P gradientu proteinu hunchback

- 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

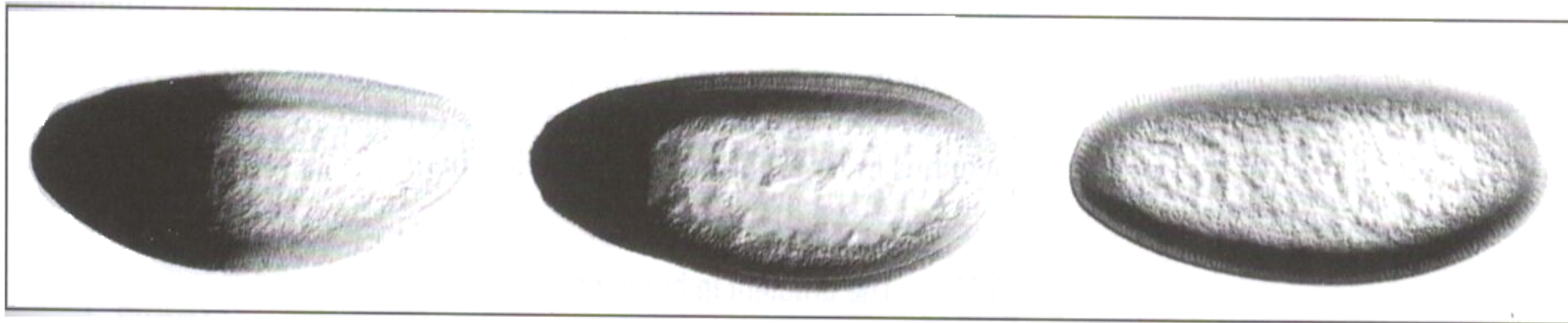
promotor genu *hunchback* má vazebné místo k proteinu bicoid

chimérický reportérový gen *hunchback*

normální promotor

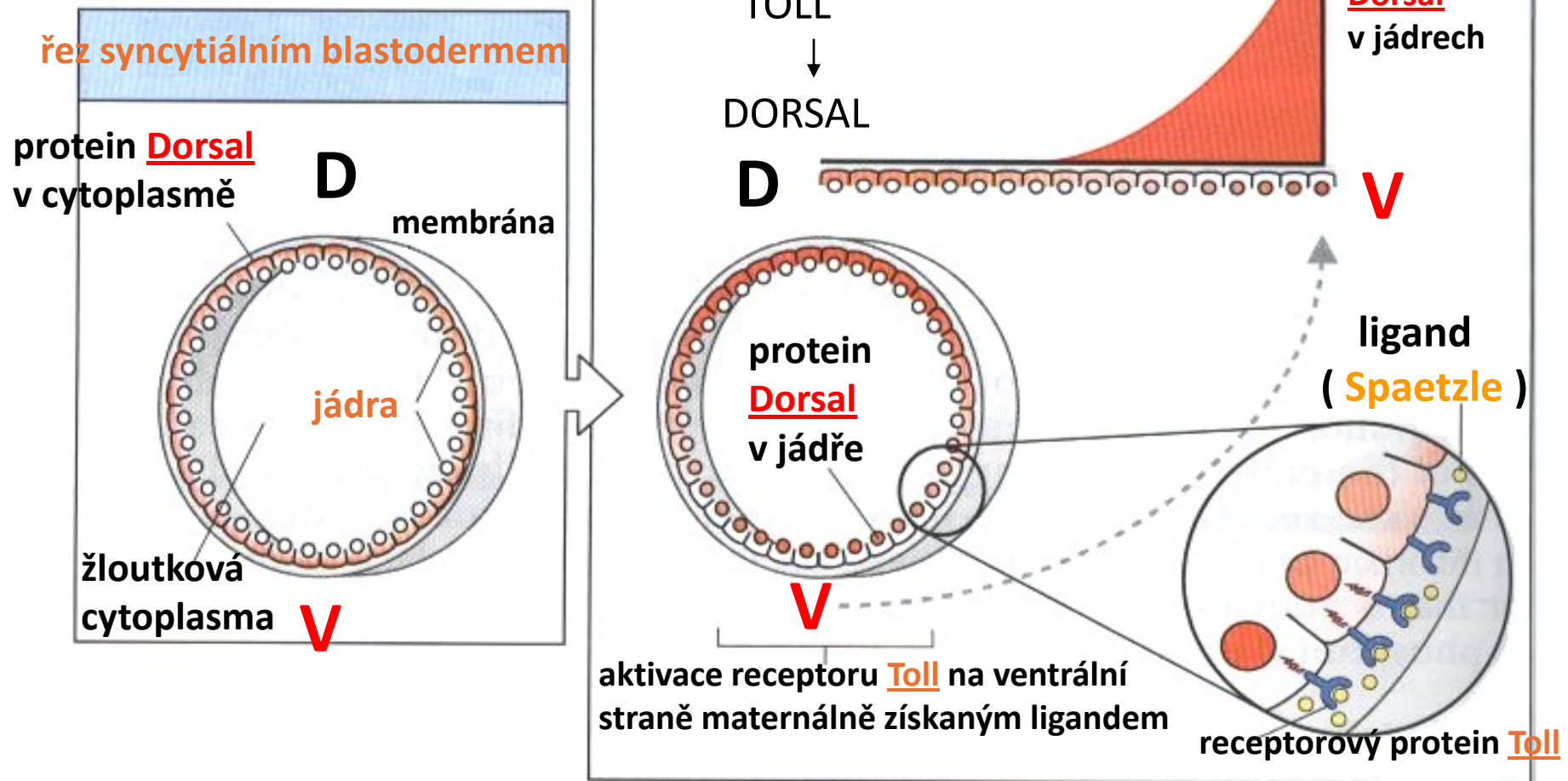
„částečný“ promotor

delece promotoru



Dorso-ventrální orientace embrya je určována maternálním faktorem

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



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

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.

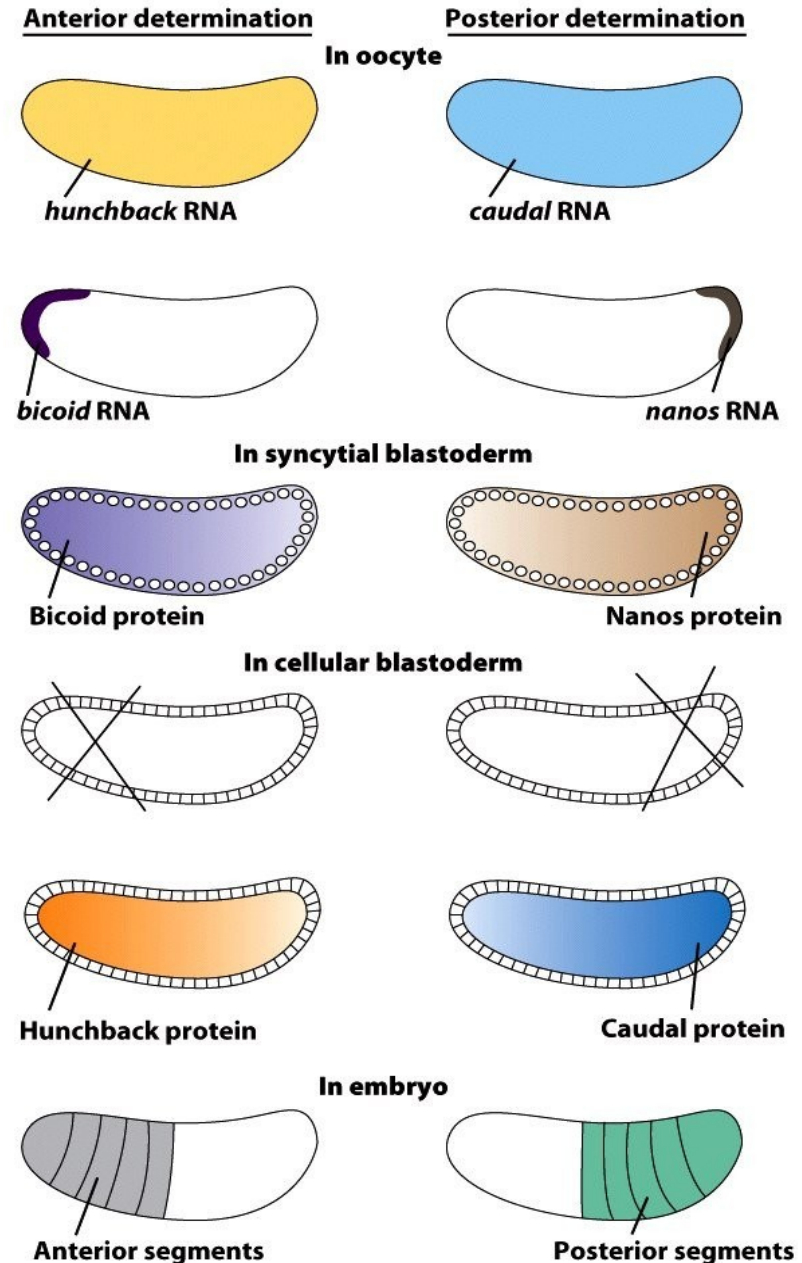
Krok 2: Bicoid a nanos RNA se akumulují na opačných koncích oocytu – bicoid RNA na anteriorním a nanos na posteriorním.

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.

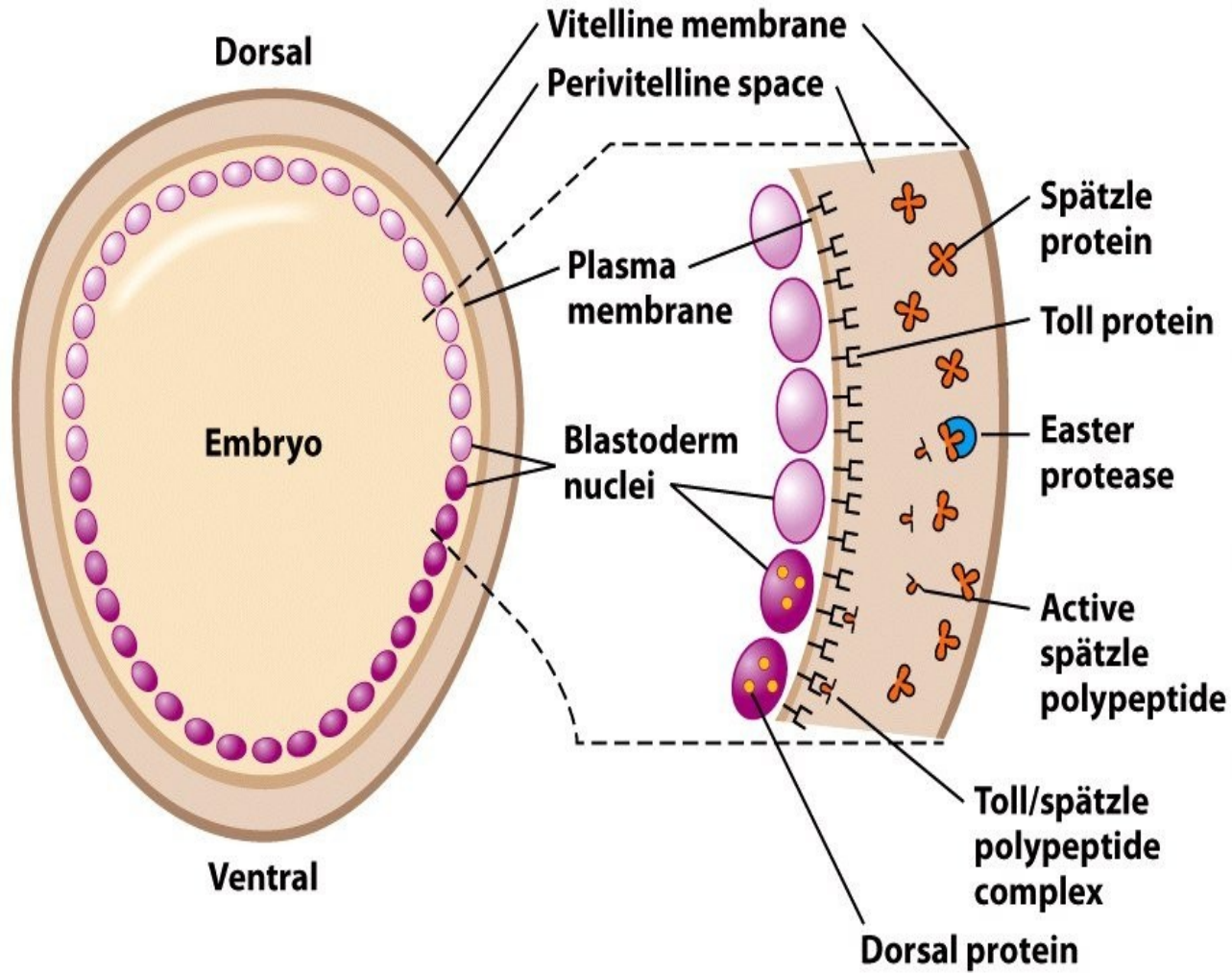
Krok 4: Protein bicoid brání translaci RNA caudal v anterioru embrya; protein nanos brání translaci RNA hunchback v posterioru.

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.

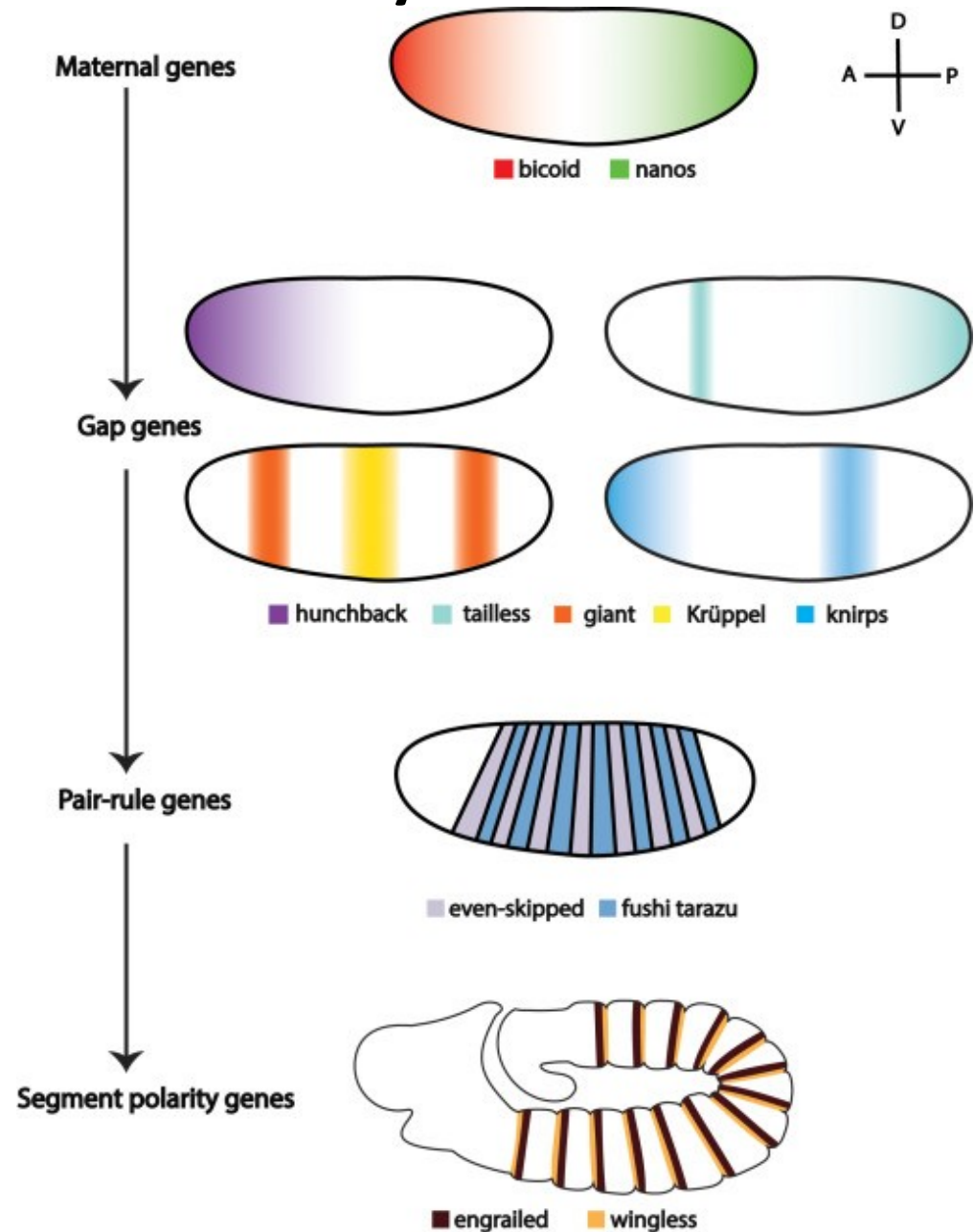
Krok 3: Aktivní polypeptid spaetzle interaguje s receptorovým proteinem Toll.

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

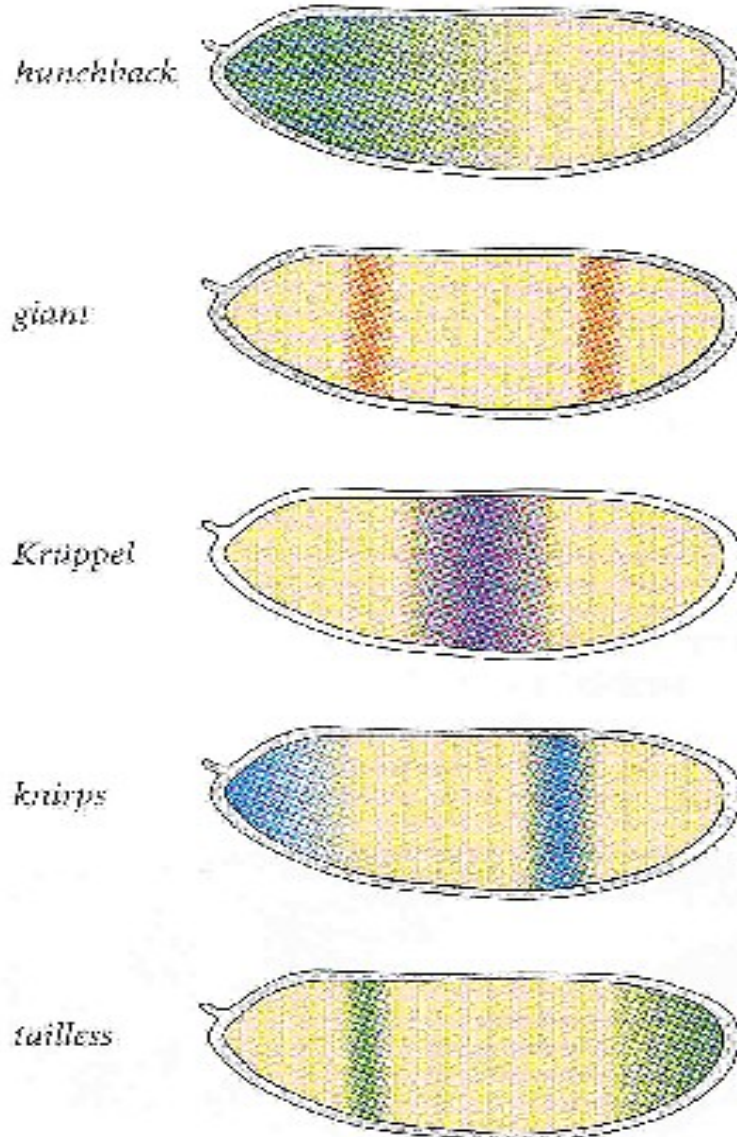
Vývojová kaskáda tvorby tělního plánu drosofily

SEGMENTAČNÍ GENY :

- geny velkých mezer
- geny párového účinku
- geny orientace tělních článků



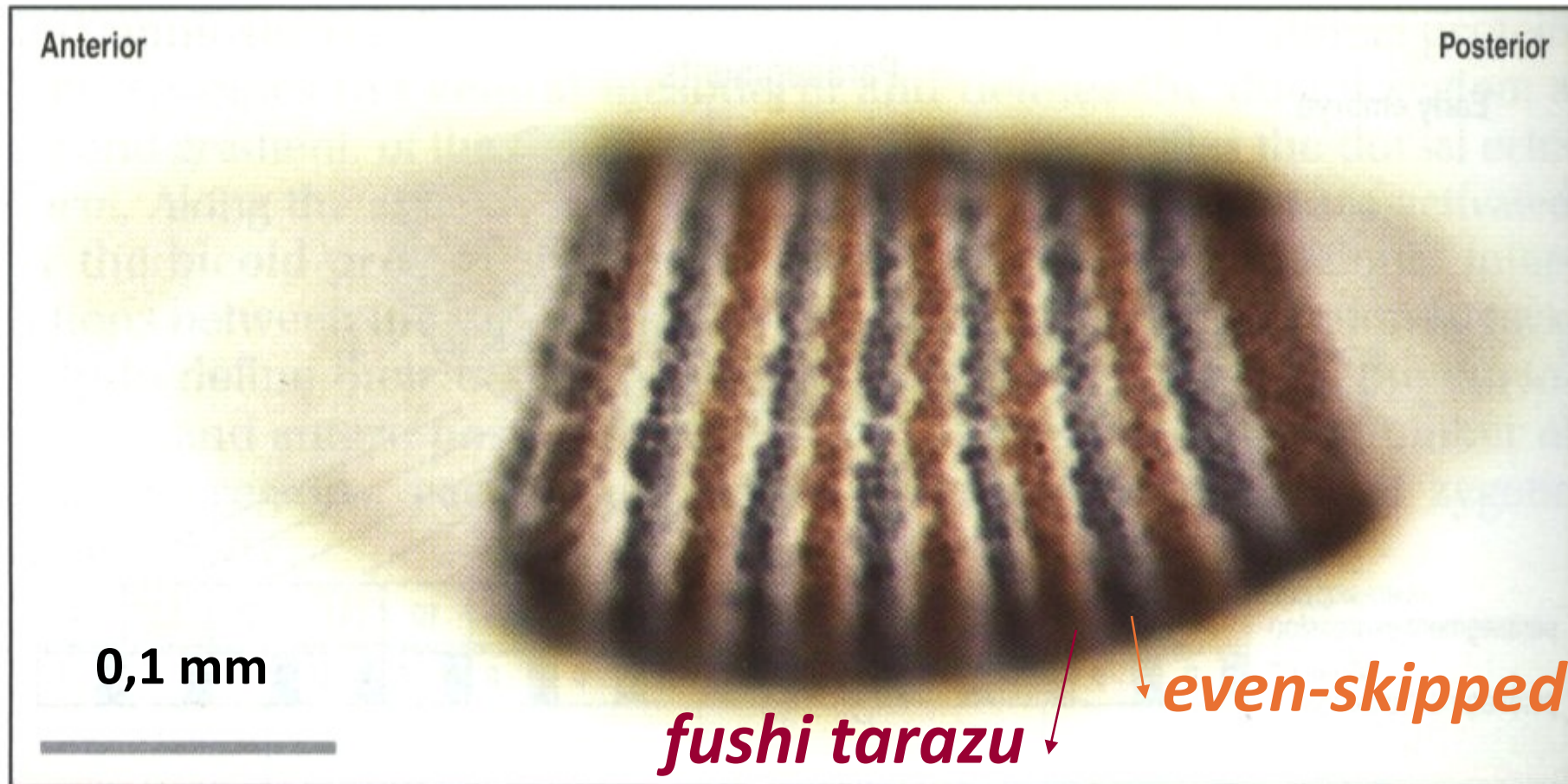
Geny velkých mezer (*gap genes*)



- 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 Krüppel se objeví v oblasti, kde klesá Hunchback
- exprese genů Giant je také regulována posteriorně produktem genu Caudal

Geny párového účinku

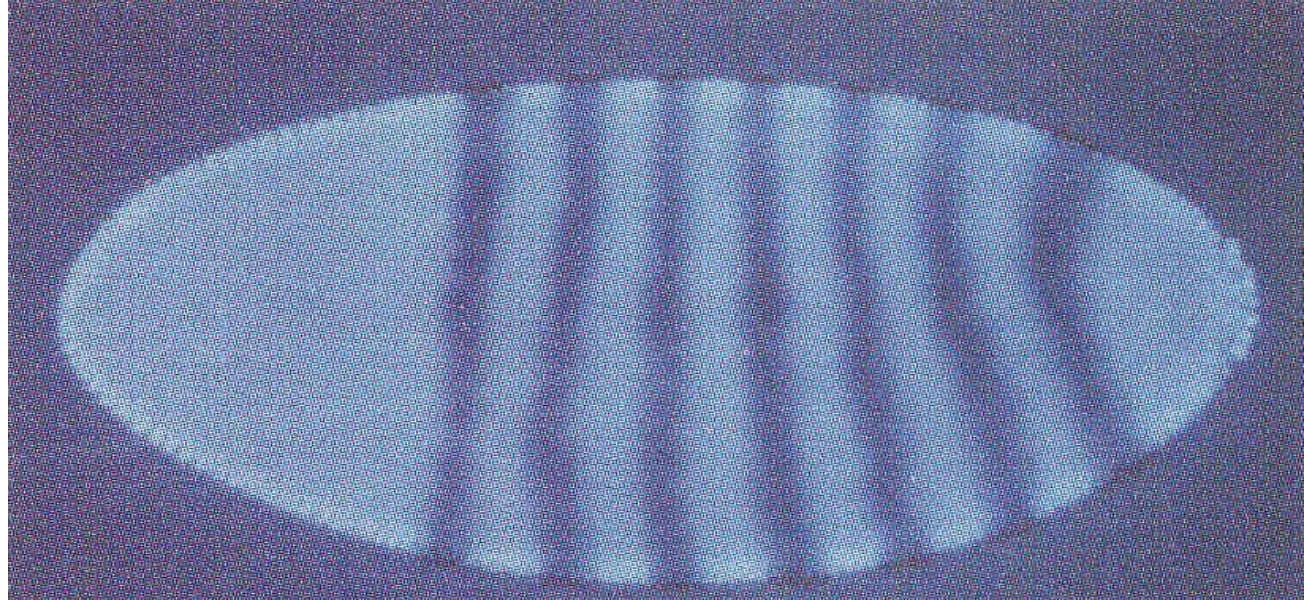
- parasegmenty (před celularizací) jsou určovány expresí „**sudě-skákajících**“ a „**liše-skákajících**“ párových genů



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**

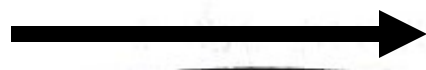
Geny párového účinku :



- 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

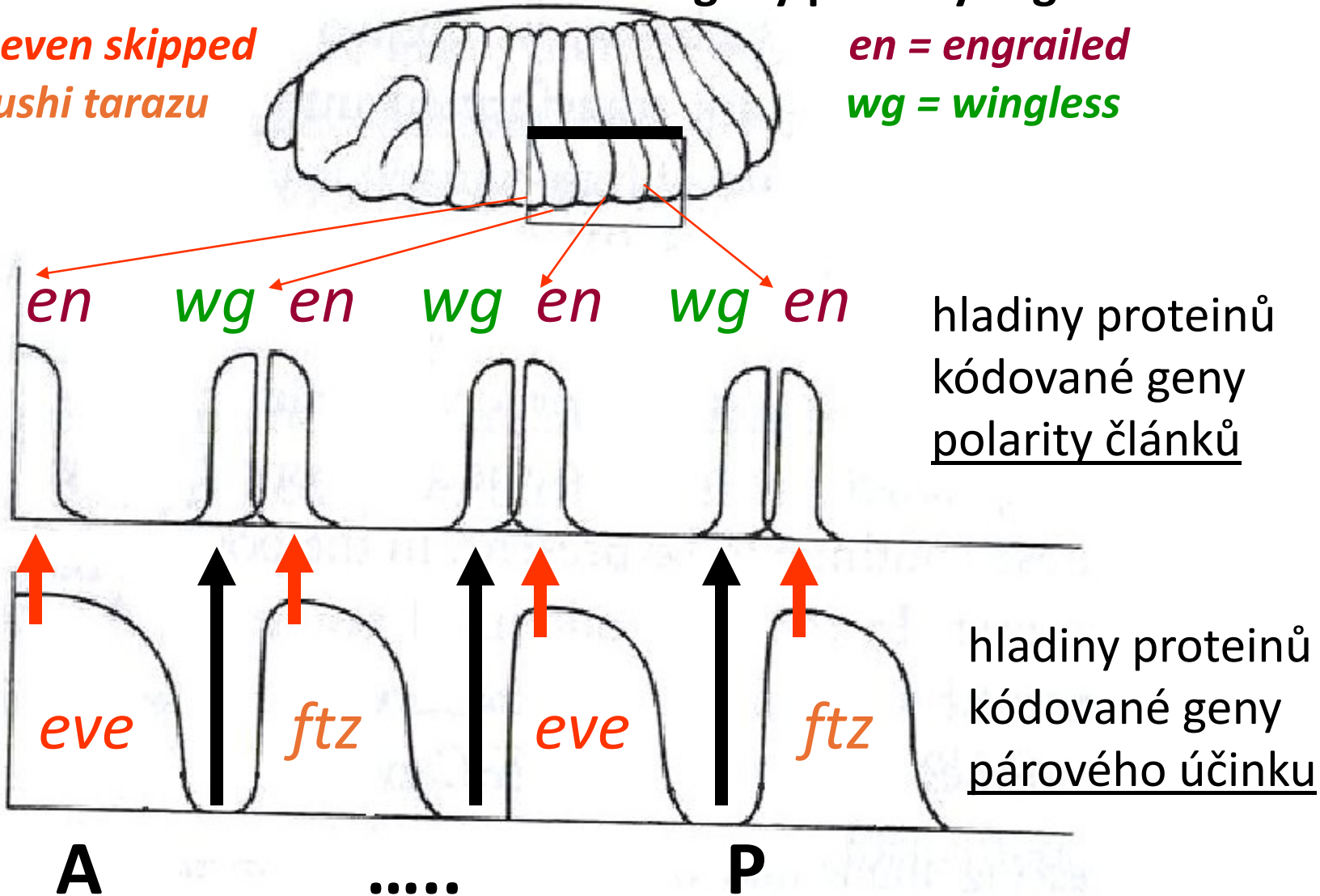
eve = *even skipped*

ftz = *fushi tarazu*

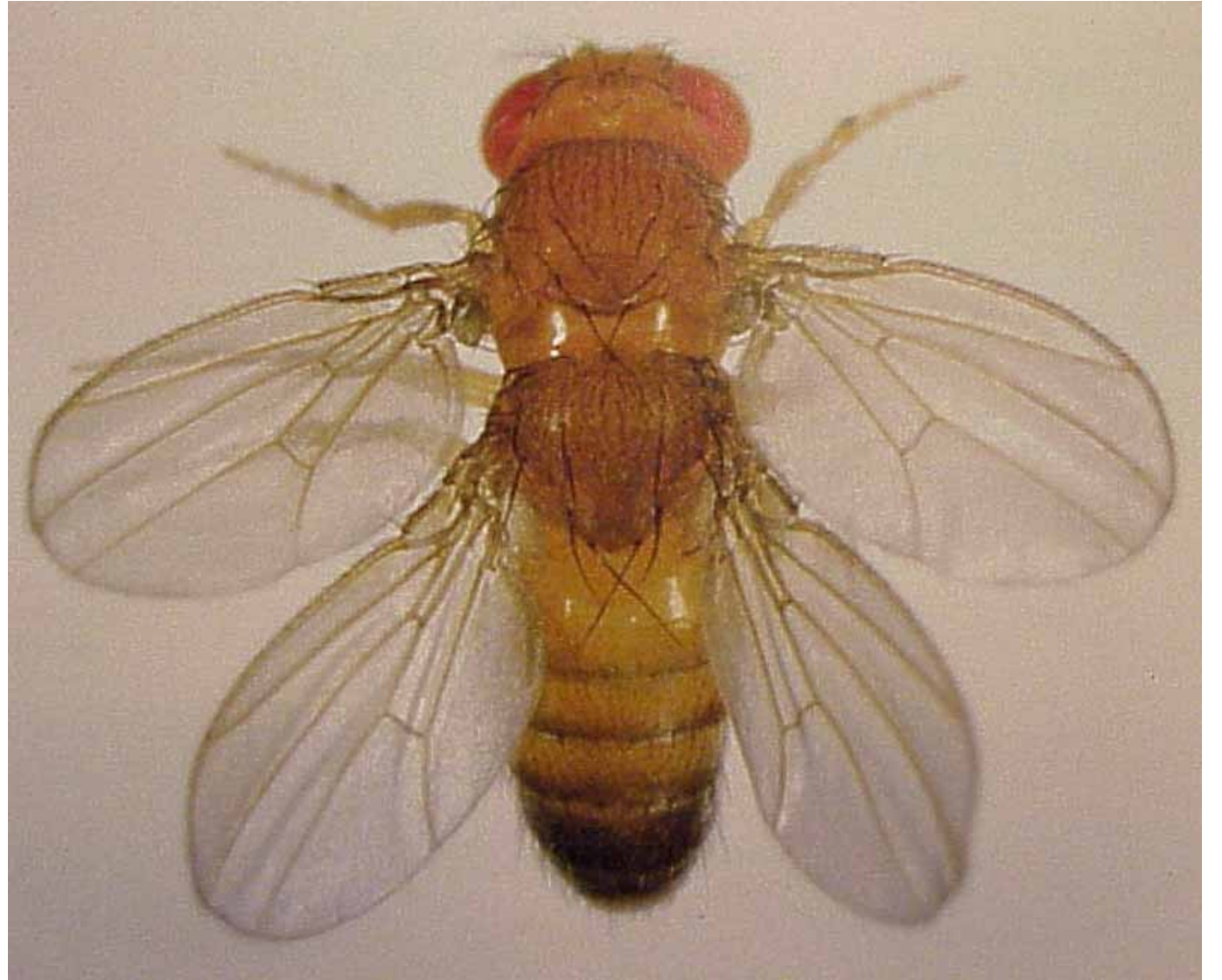
en = *engrailed*

wg = *wingless*

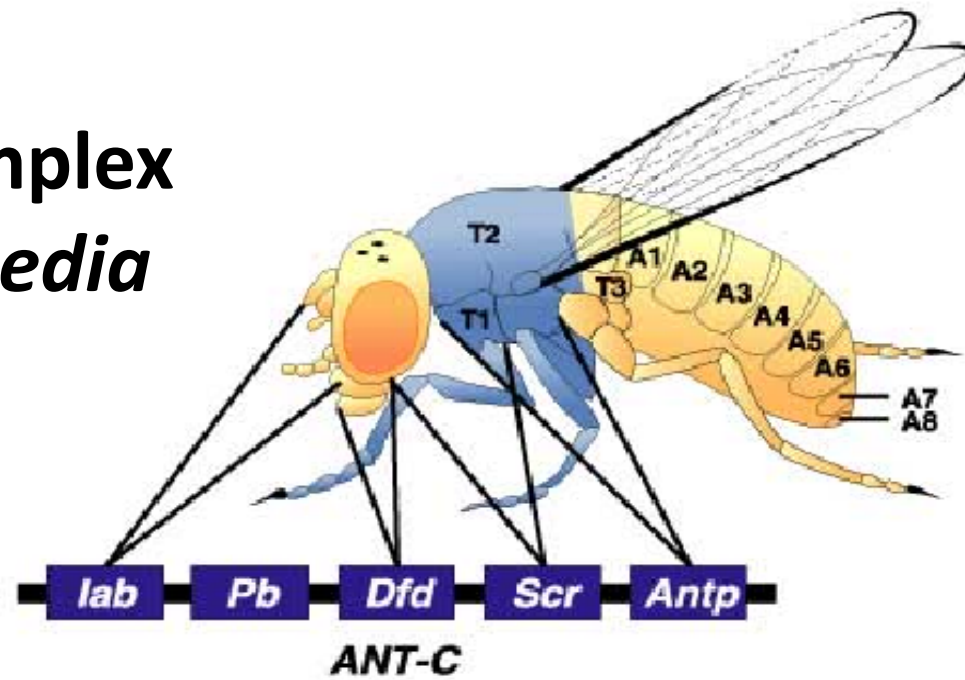
koncentrace produktů genů



Homeóza a homeotické geny

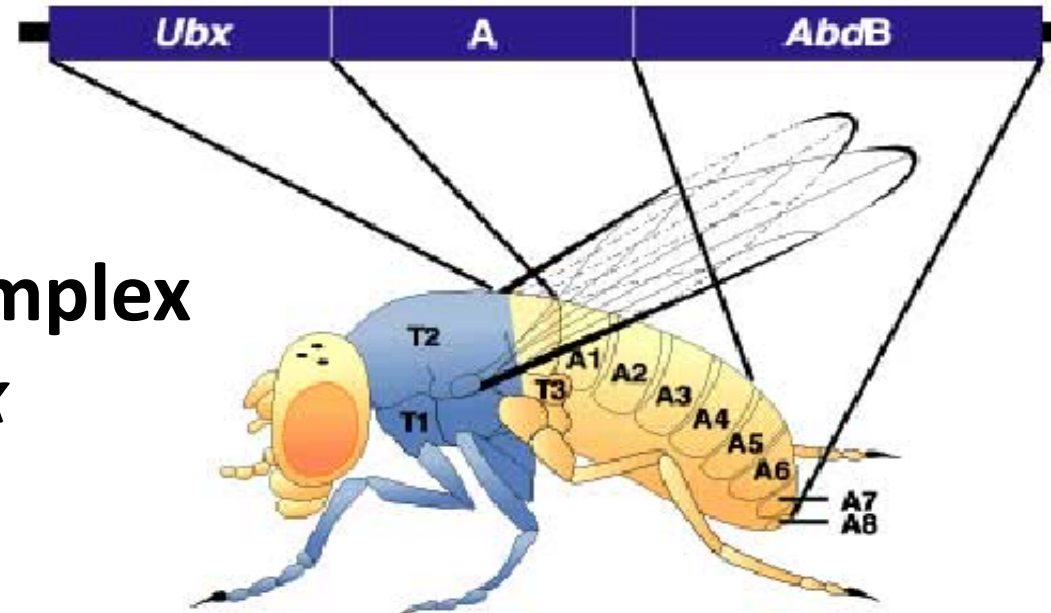


„přední“ komplex
Antennapedia

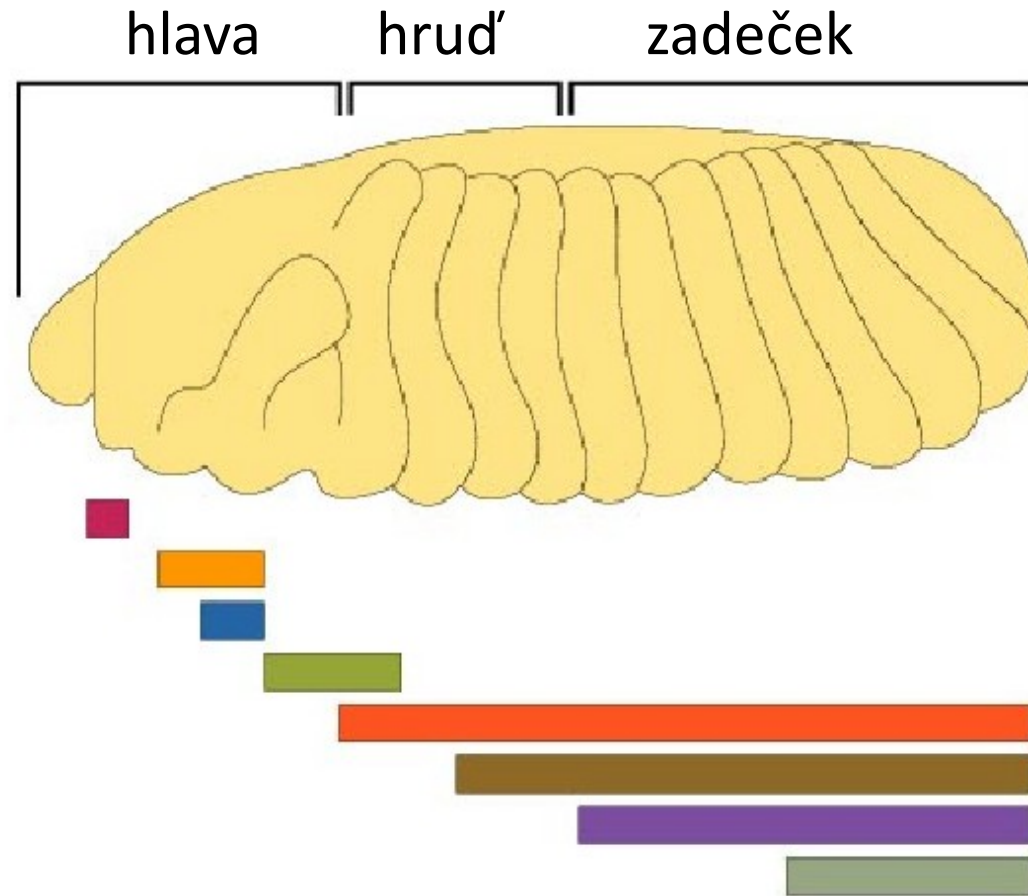


BX-C

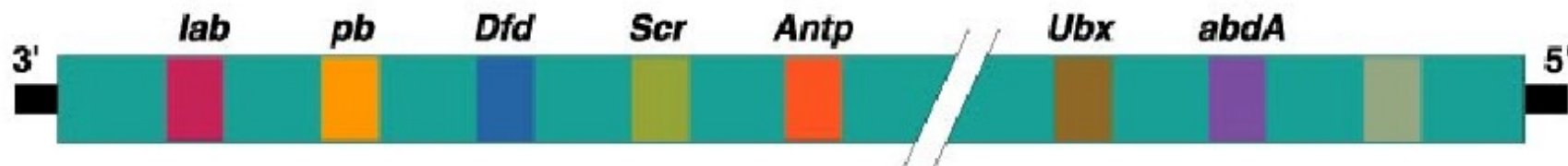
„zadní“ komplex
Bithorax



Expresní domény homeotických genů podél předozadní osy embrya



Chromosomální lokalizace homeotických genů



Homeóza je ...

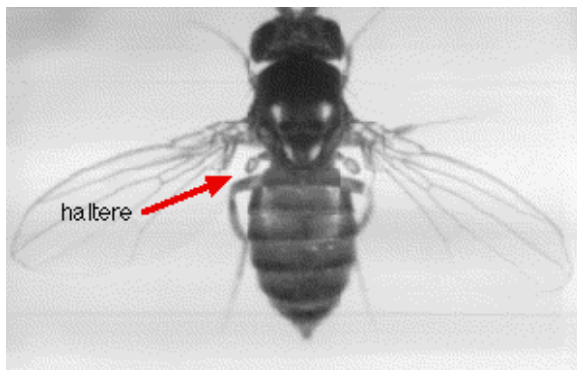
Homeotická mutace je ...

Homeotický gen je ...

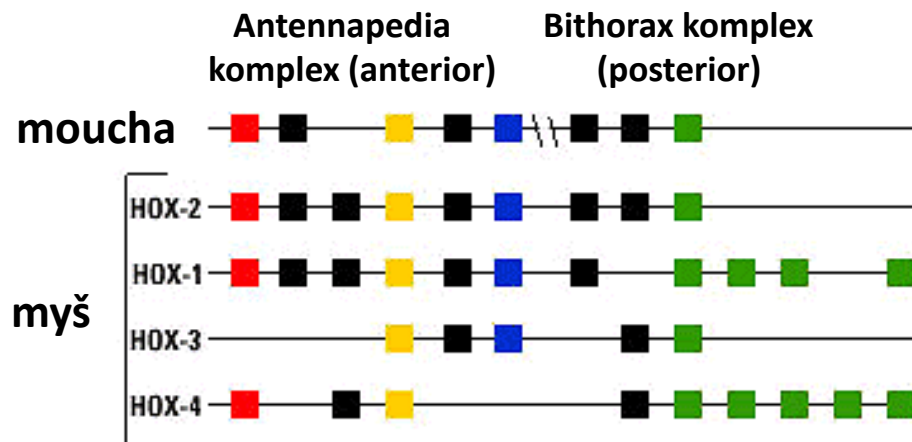
Homeobox je ...

Homeodoména je ...

HOMEOTICKÉ GENY - jeden z klíčů specifikace



embryo → dospělec

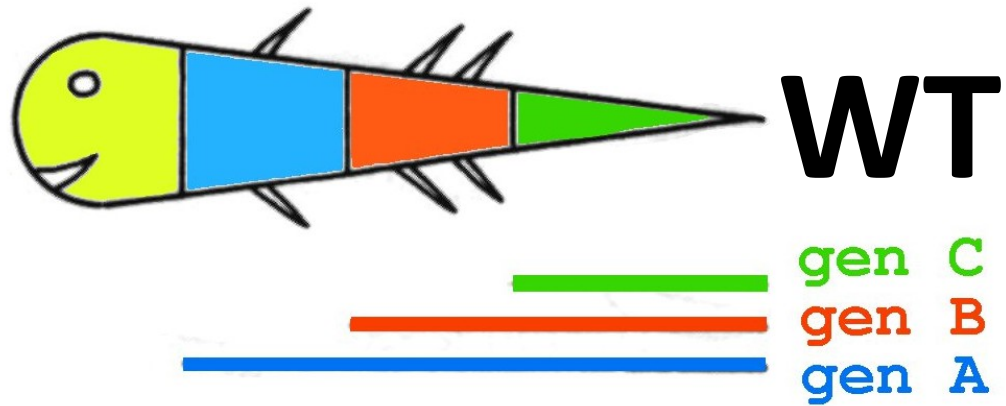


BITHORAX specifikuje třetí článek hrudi a zadeček: při ztrátě funkce – místo kyvadélek se tvoří druhý pár křídel (*more anterior phenotype*)

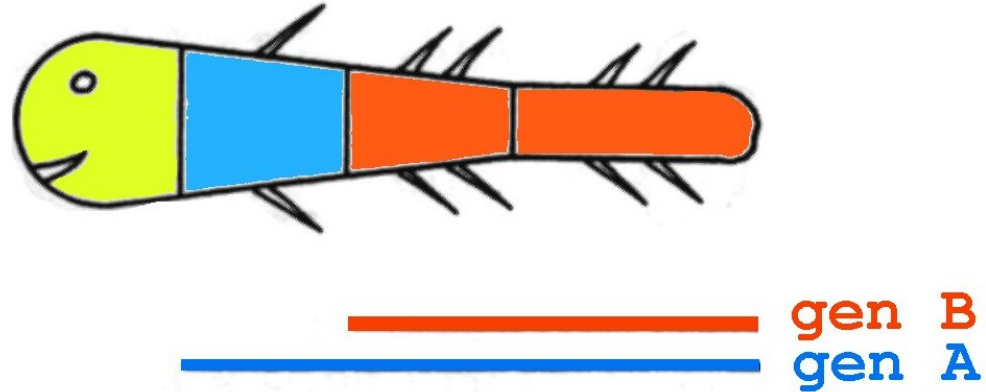
Edward Lewis (1963) :

pravidlo spacio-temporální kolinearity

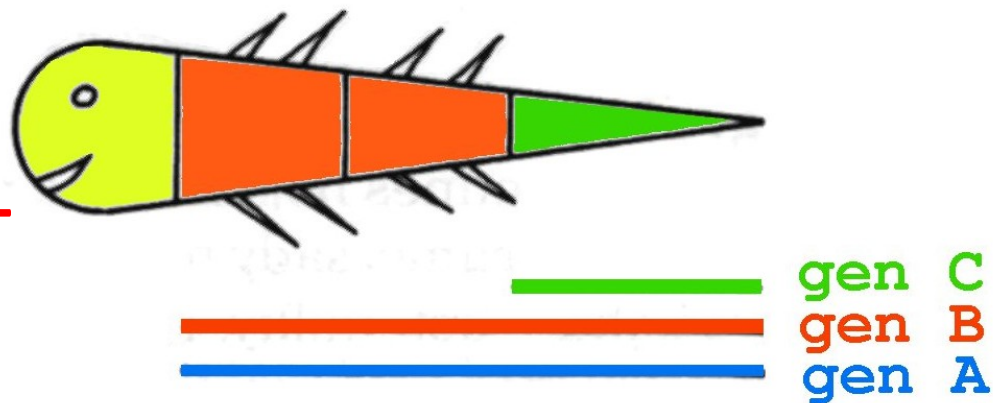
Homeotické geny řídí
anteriorně -
posteriorní
specifikaci těla :



ztráta funkce genu C -
„více anteriorní“ fenotyp



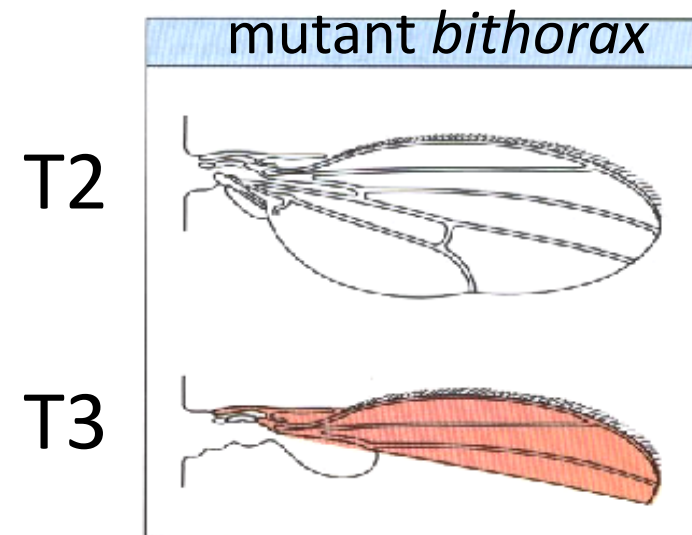
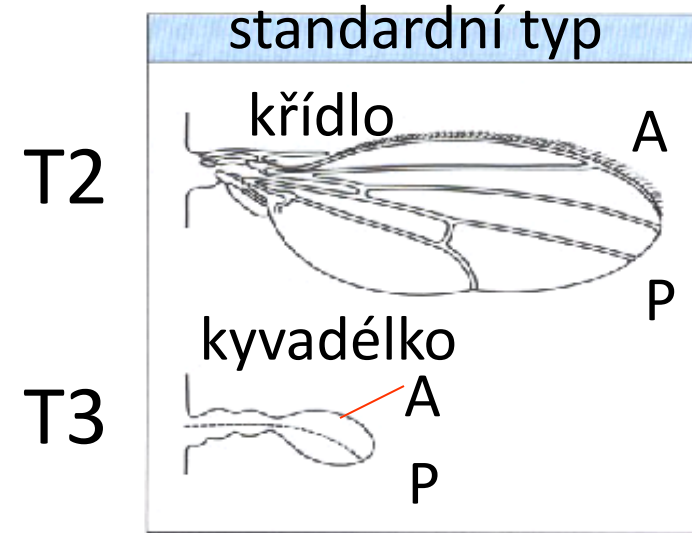
ektopická exprese genu B -
„více posteriorní“ fenotyp



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

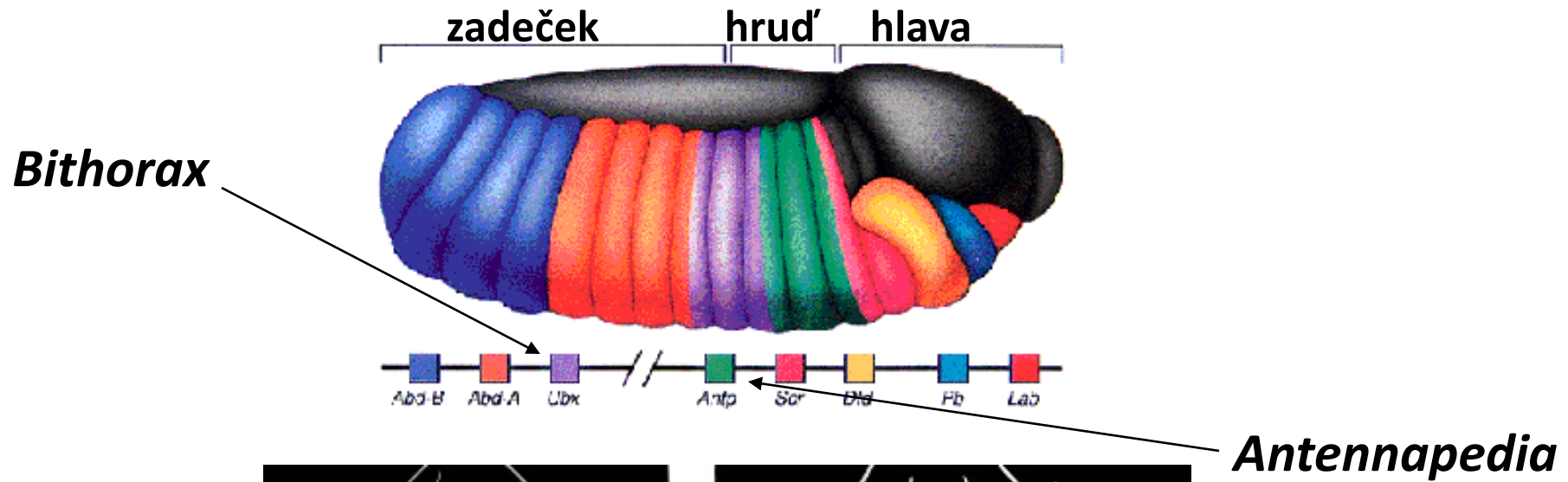


transformace
anterioru

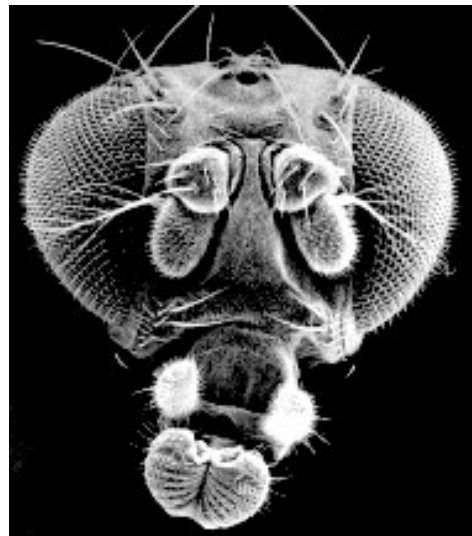


úplná
transformace

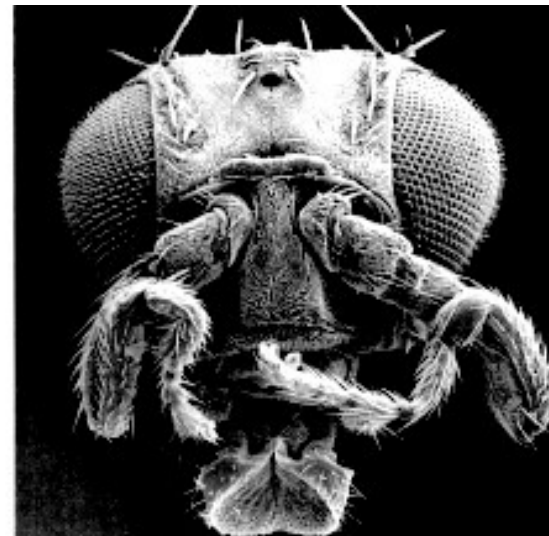
ANTENNAPEDIA specifikuje mesothorax (T2):
jeho ektopická „dominantní“ exprese vyvolává tvorbu
nohou na hlavě (*more posterior phenotype*)



wt

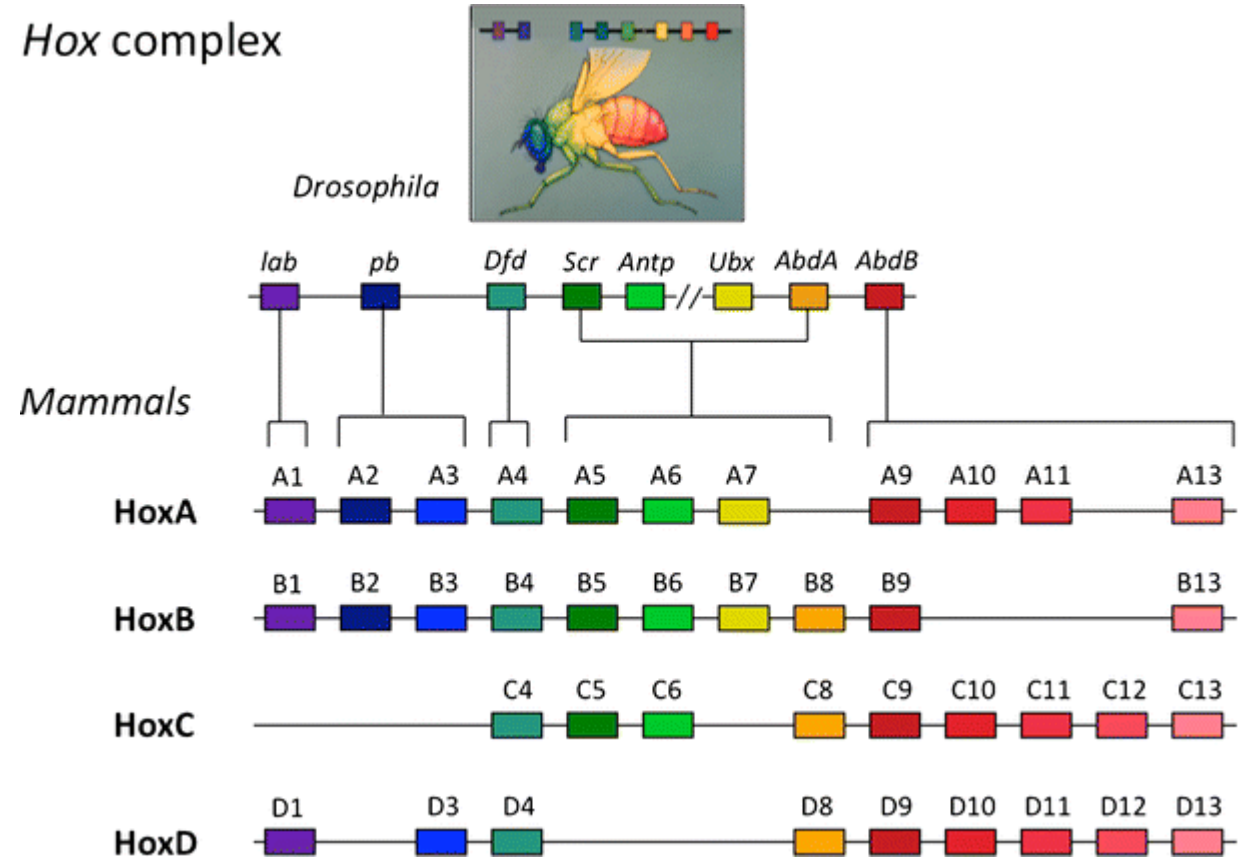


mutant

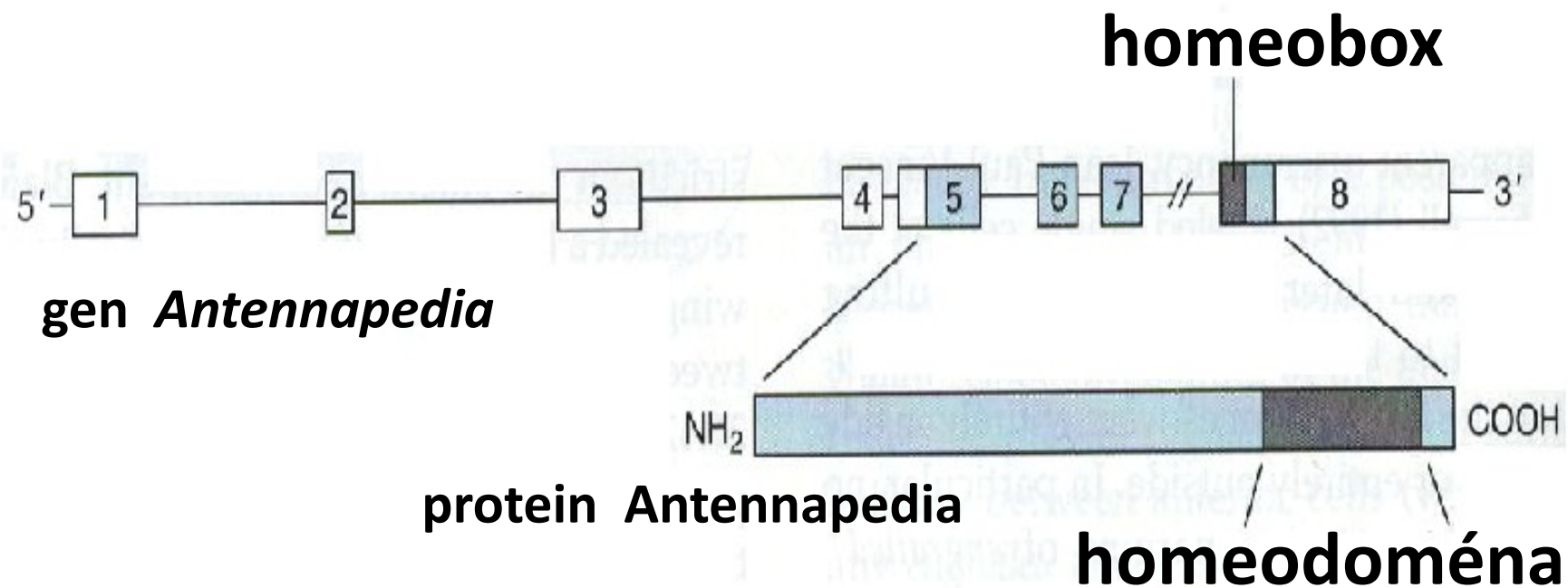


Evoluce homeotických (selektorových) genů

- 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

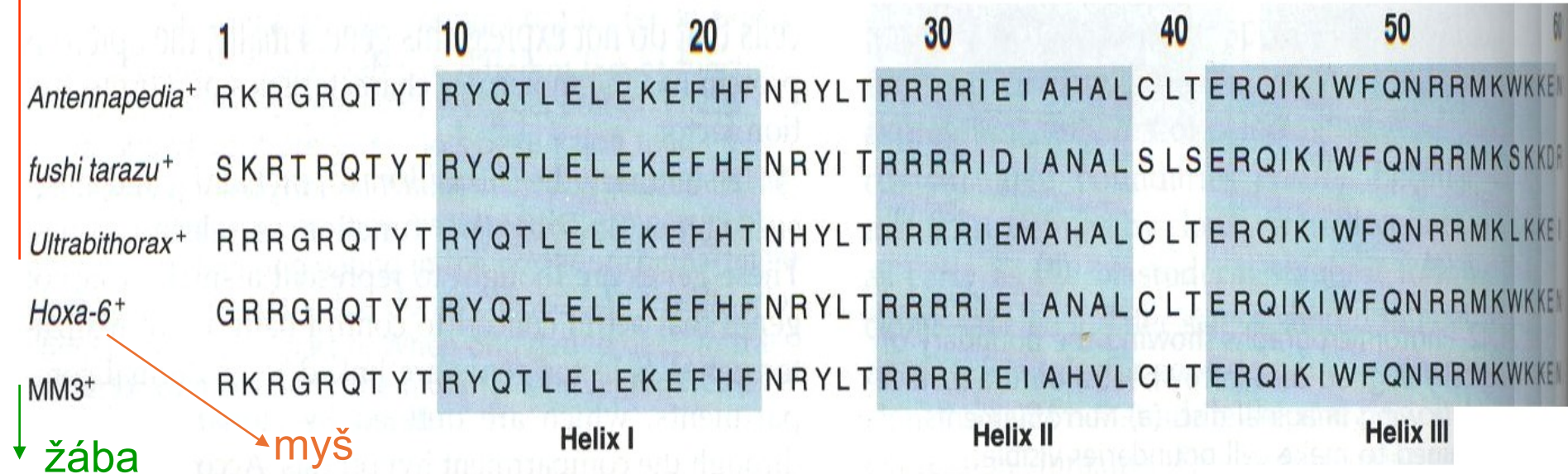


Strukturní organizace genu *Antennapedia* a jím kódovaného proteinu



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

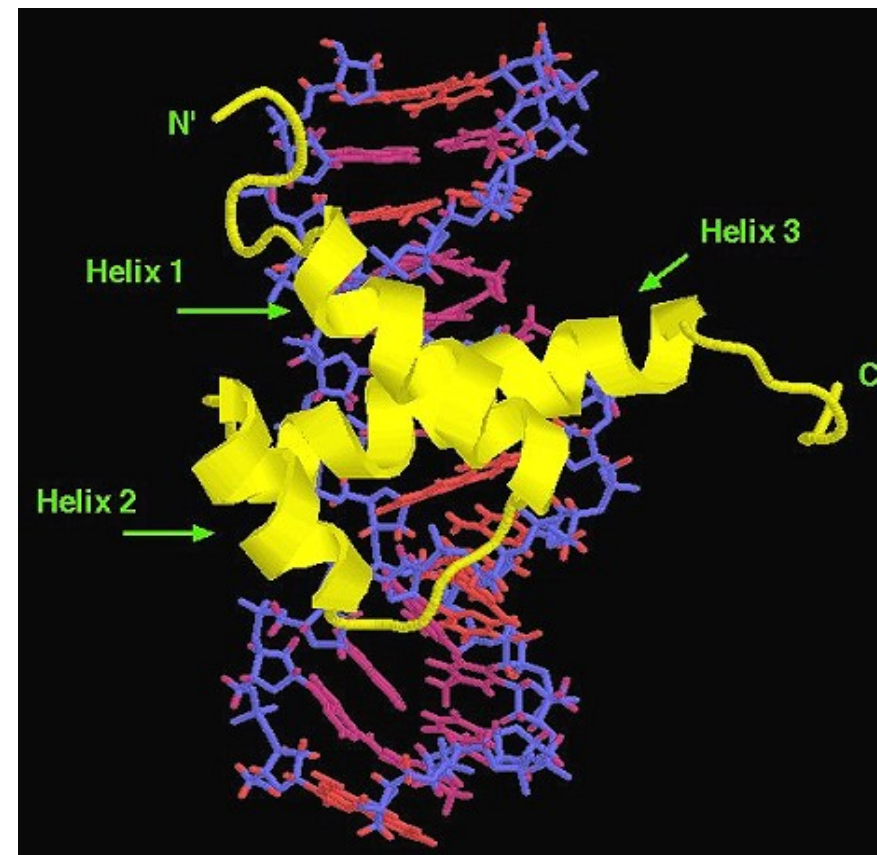
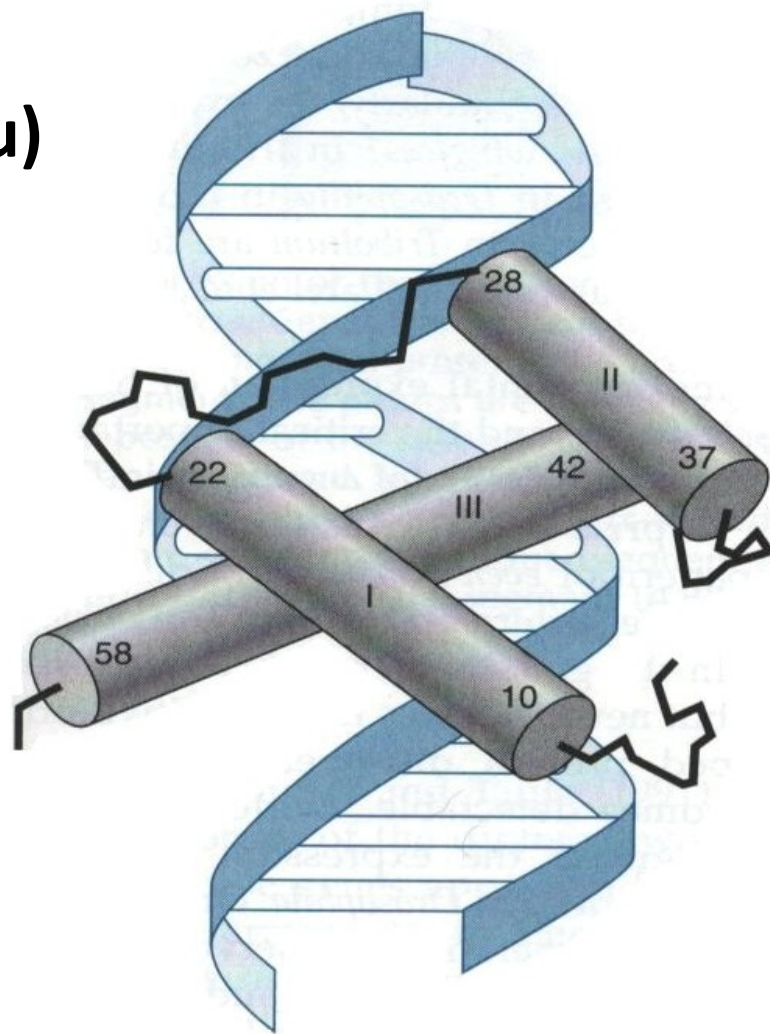
↑ moucha



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



Kaskáda genové exprese vedoucí k segmentaci embrya octomilky

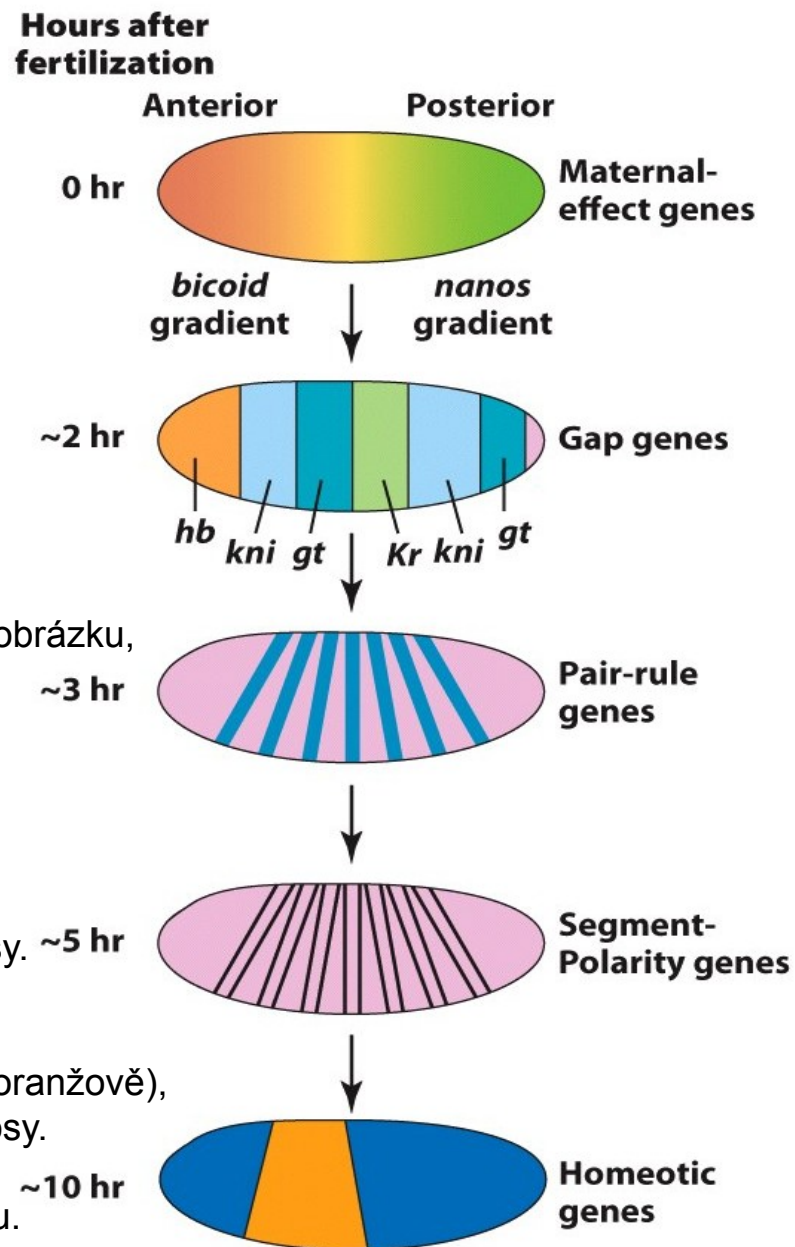
Krok 1: Počáteční antero-posteriorní polarita embrya je založena produkty genů s maternálním účinkem, jako jsou *bicoid* či *nanos*.

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

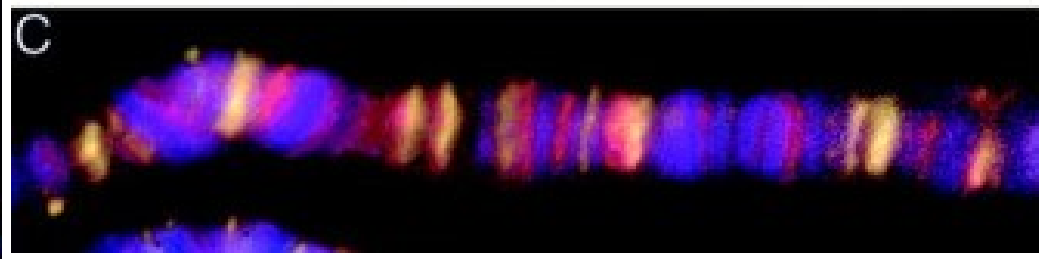
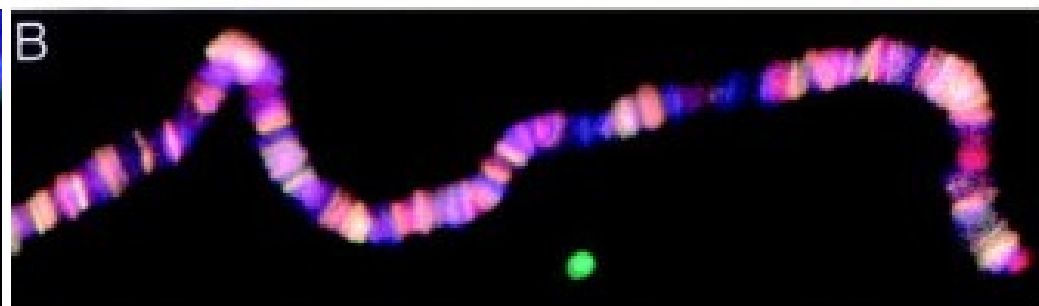
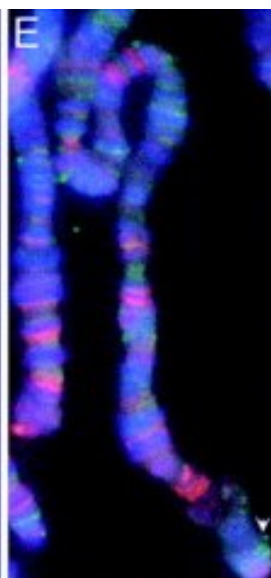
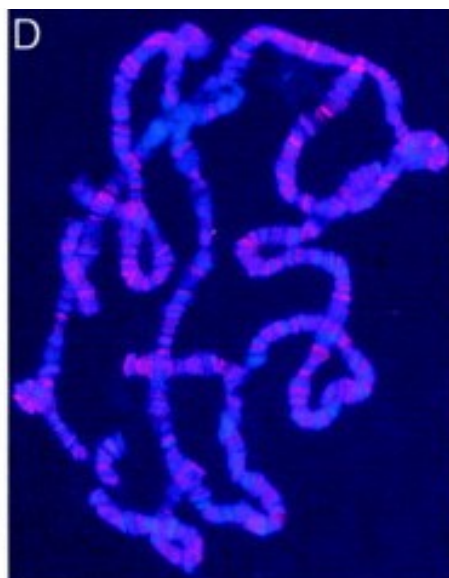
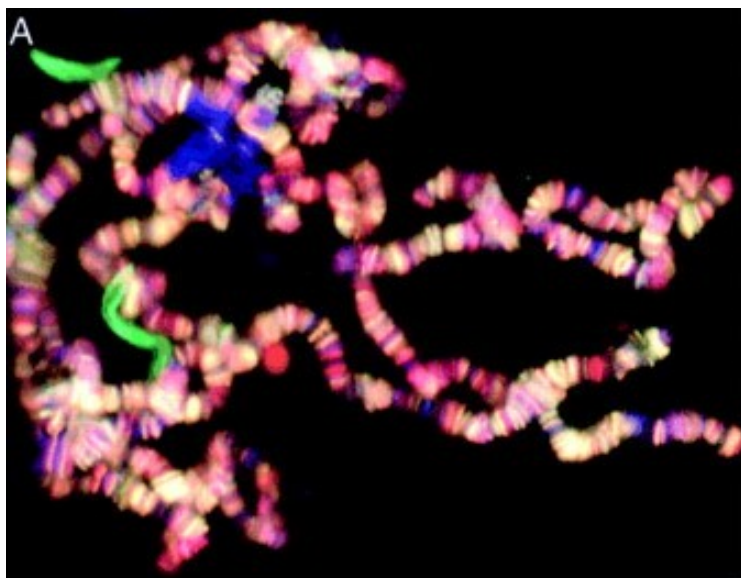
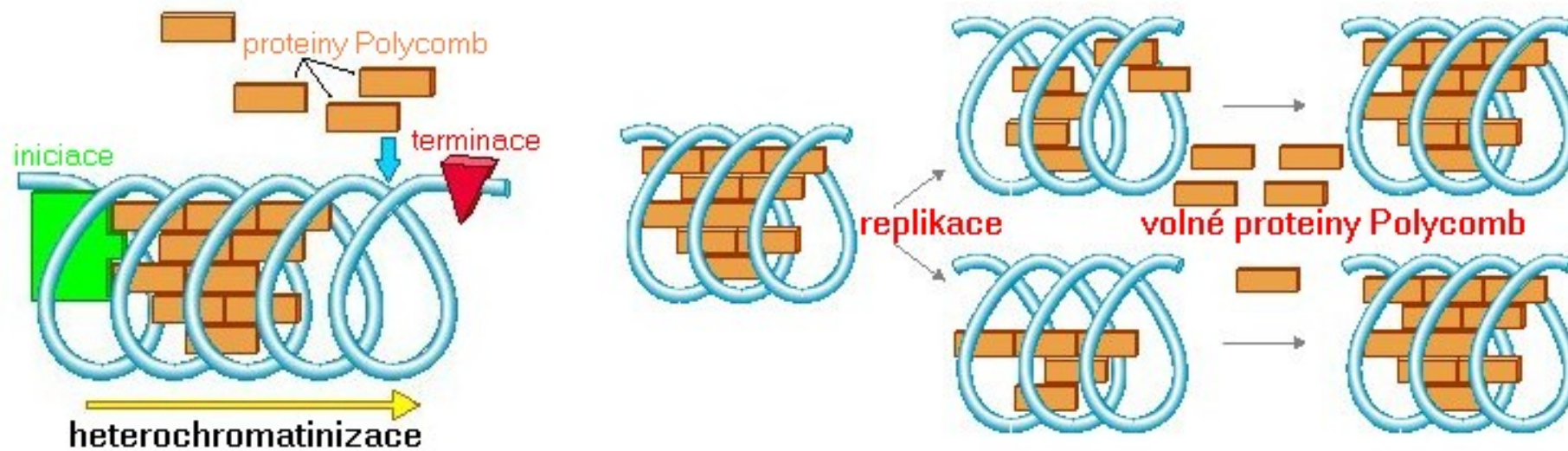
Krok 3: Geny párového pravidla, jako například *fushi tarazu* na tomto obrázku, jsou exprimovány v sedmi pruzích, dále dělí embryo podél antero-posteriorní osy.

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

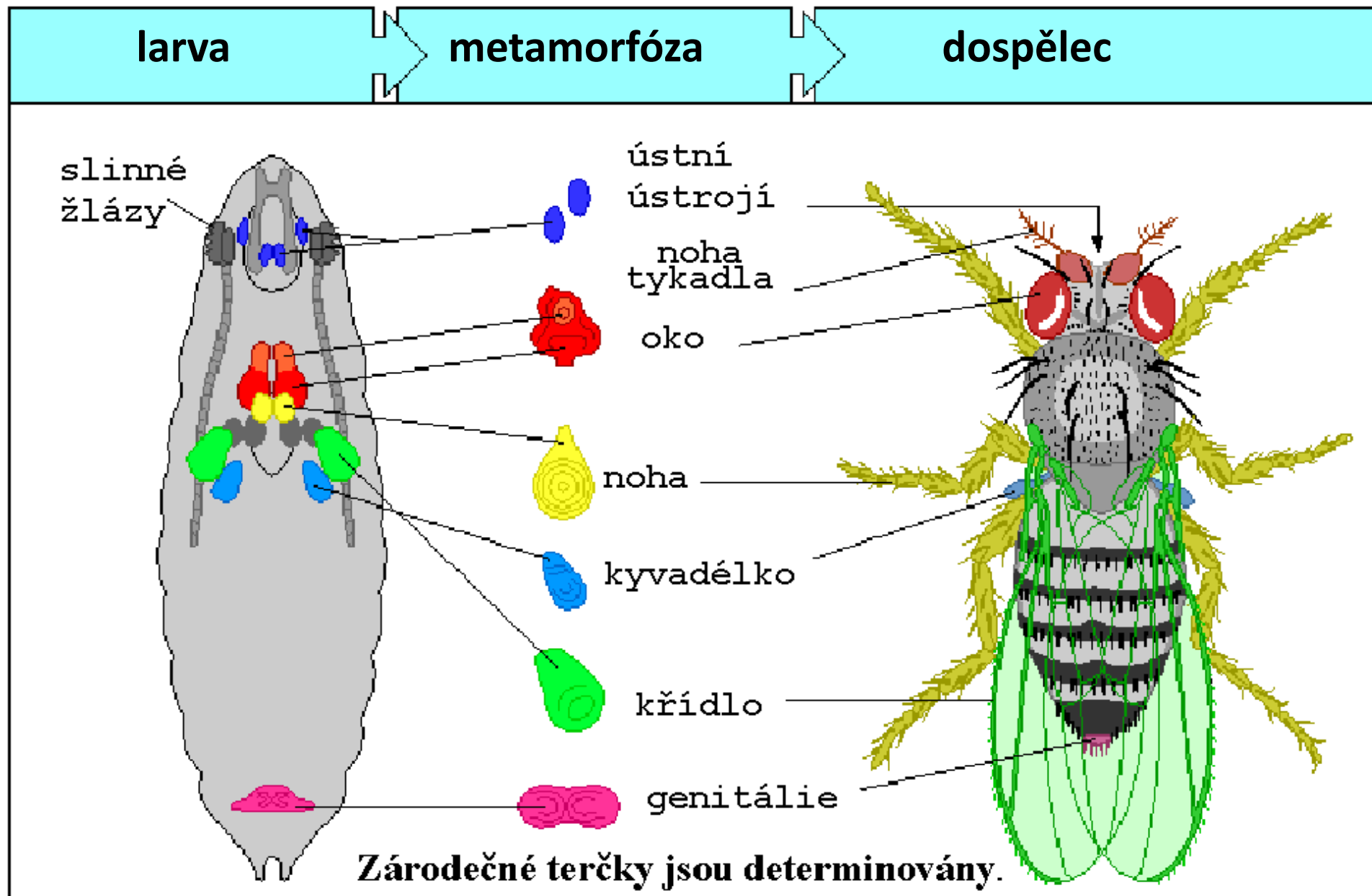
Krok 5: Homeotické geny, jako je například *Ultrabithorax* (na obrázku oranžově), jsou exprimovány ve specifických oblastech podél antero-posteriorní osy. Tyto geny, společně s geny párového pravidla a polarity segmentů, determinují identity jednotlivých tělních článků ve vyvíjejícím se embryu.



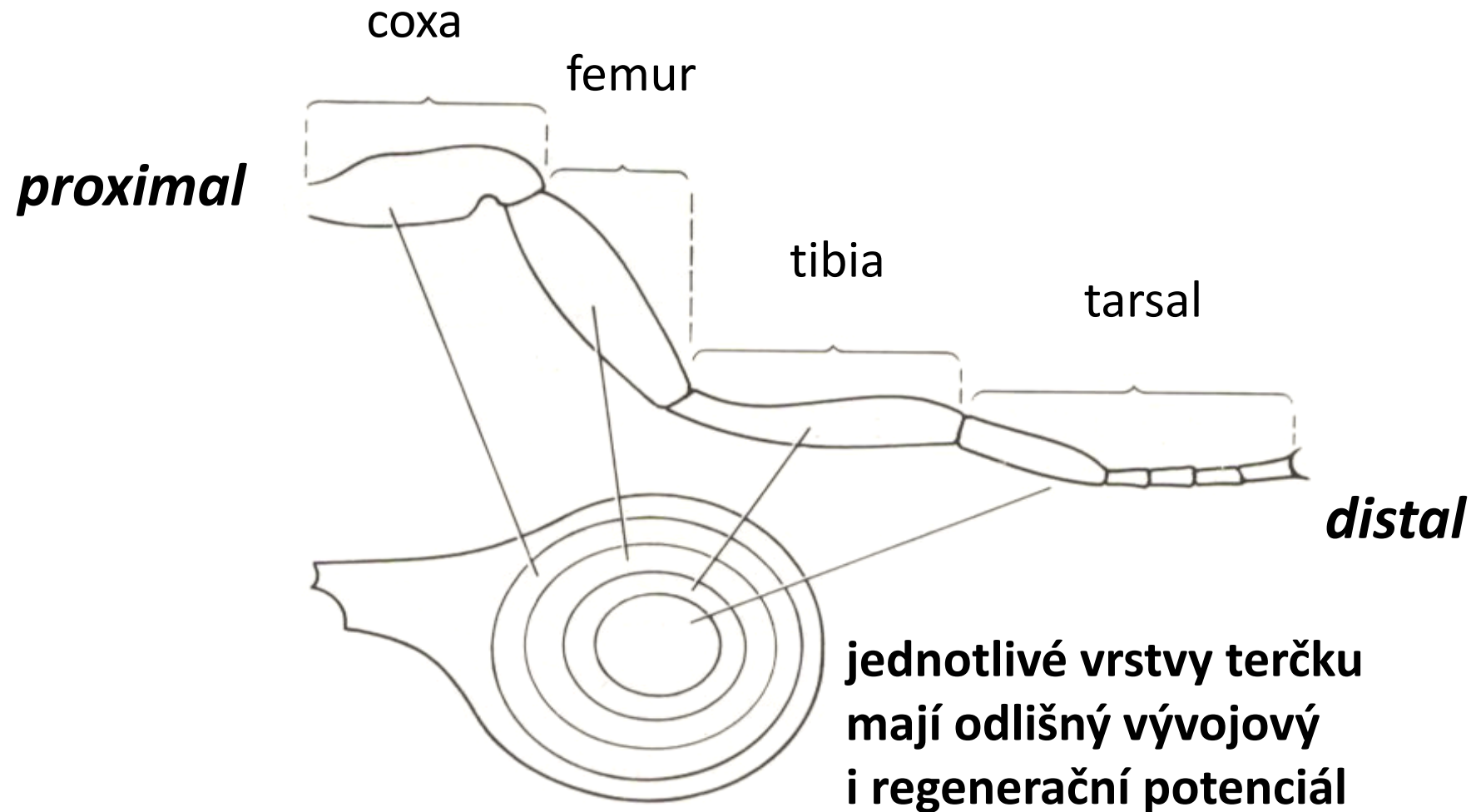
Proteiny POLYCOMB a TRITHORAX - klíčové regulátory struktury chromatinu a exprese (homeotických) genů



Model buněčné paměti: zárodečné terčky

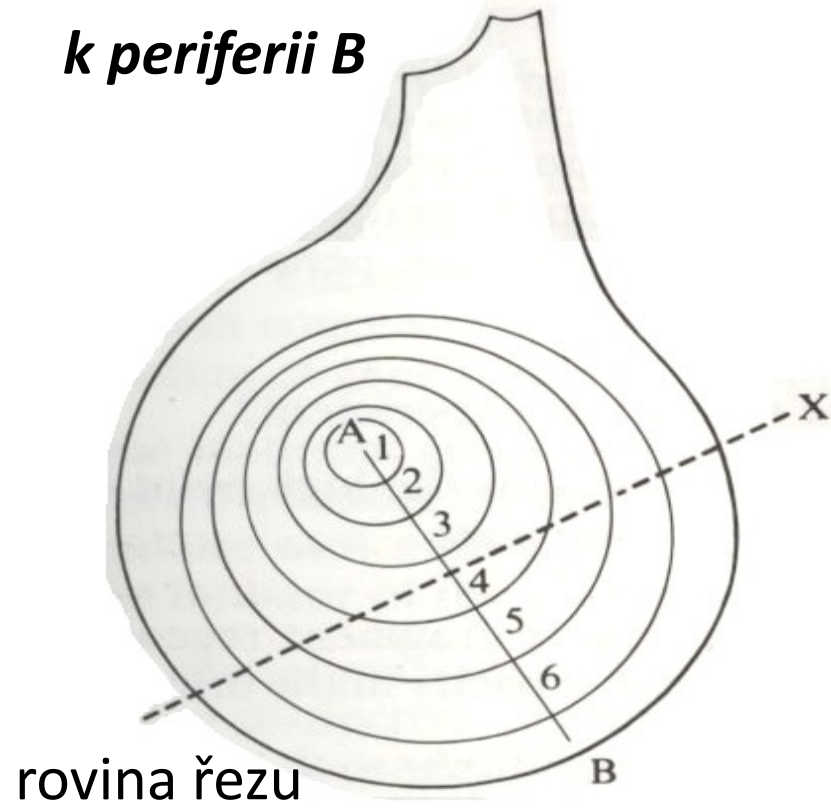


Vývojová mapa nožního terčku drosofily



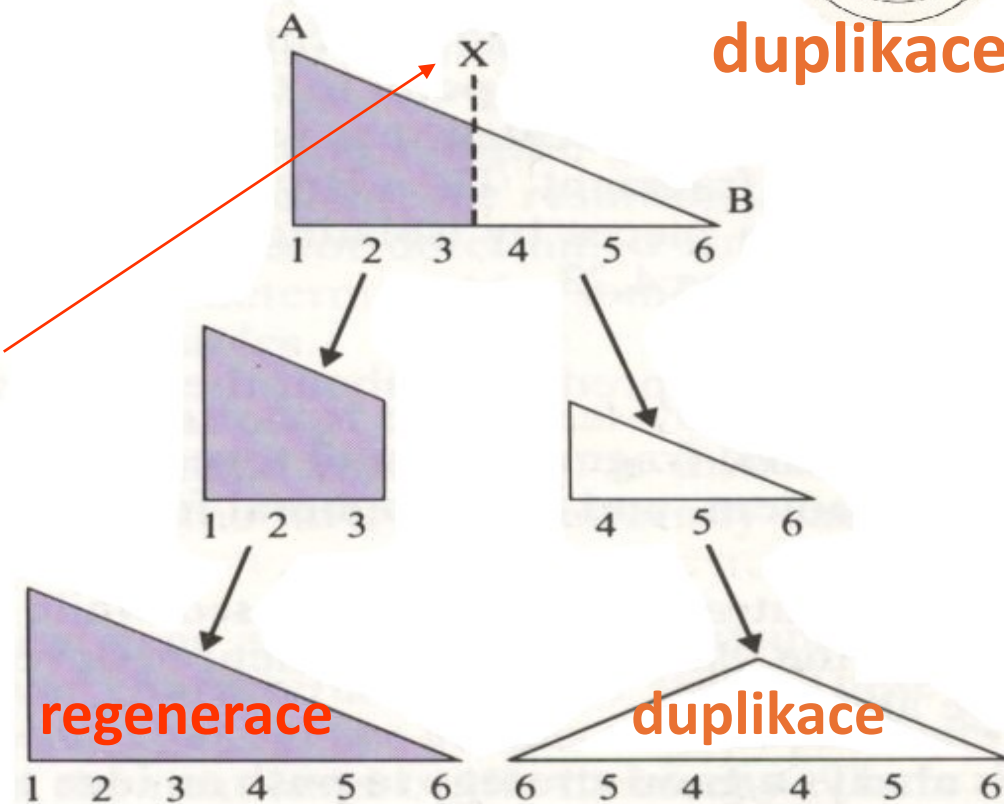
Imaginární terčky obsahují gradient vývojových schopností

klesající od centra A směrem k periferii B

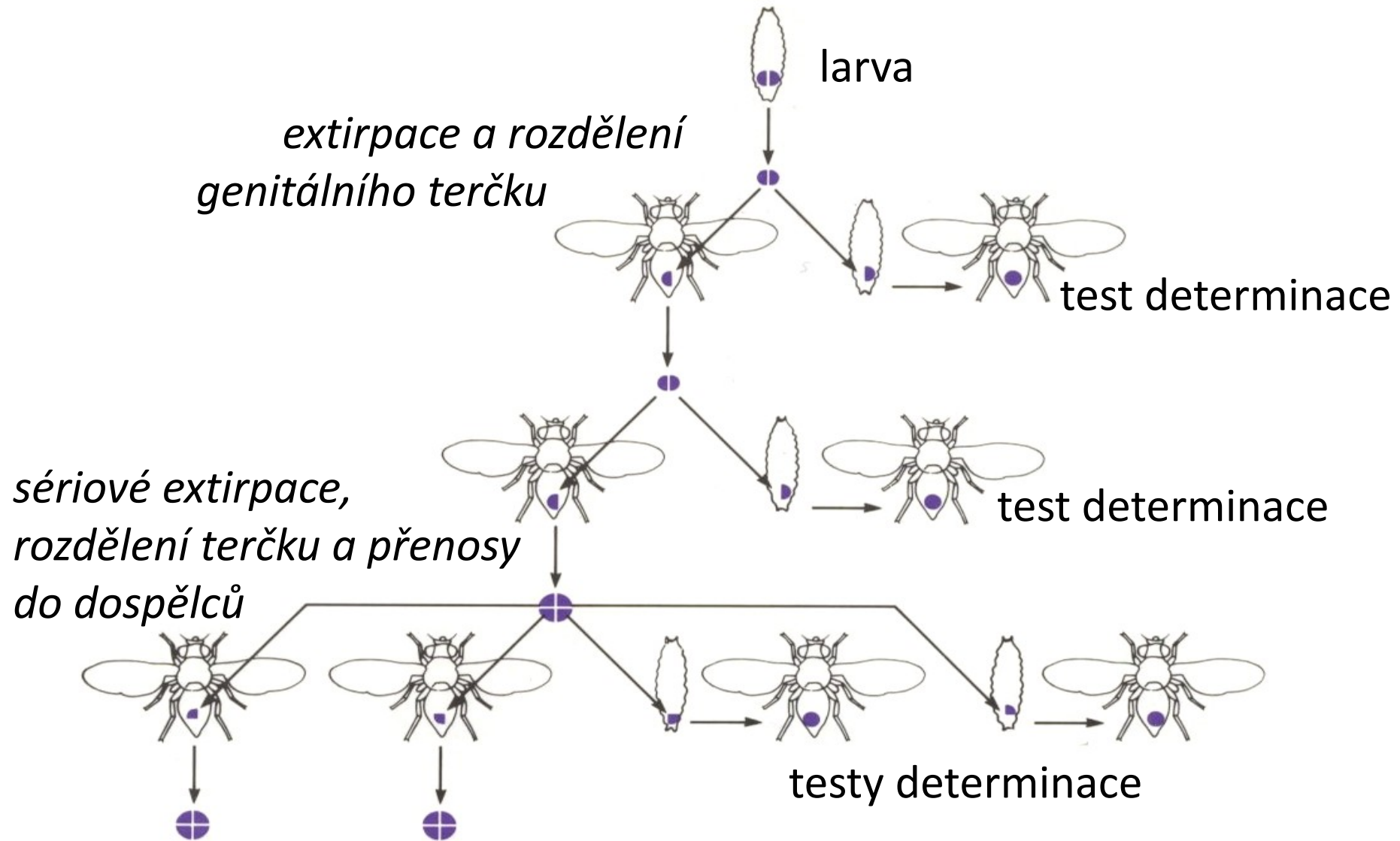


regenerace

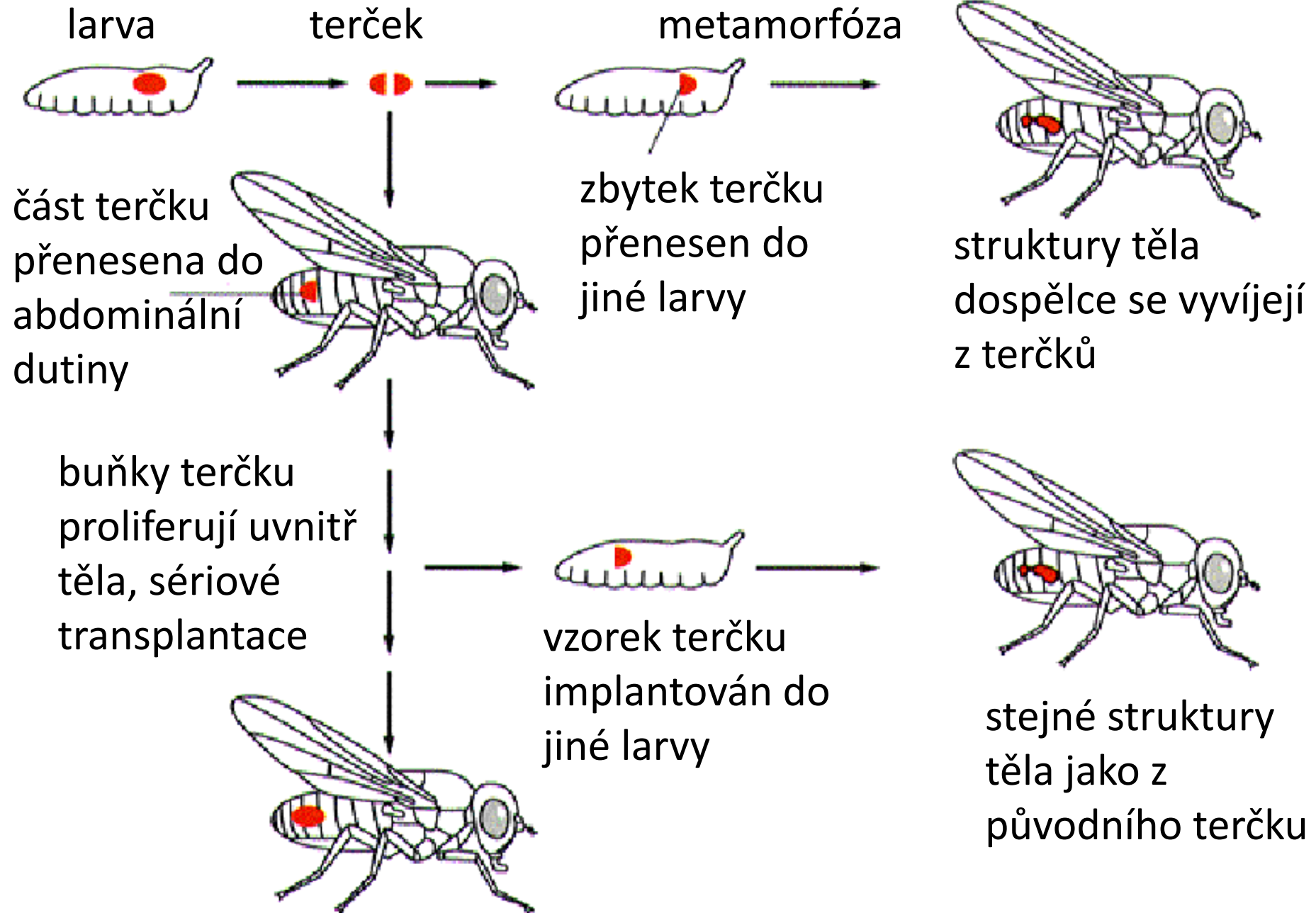
duplikace



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



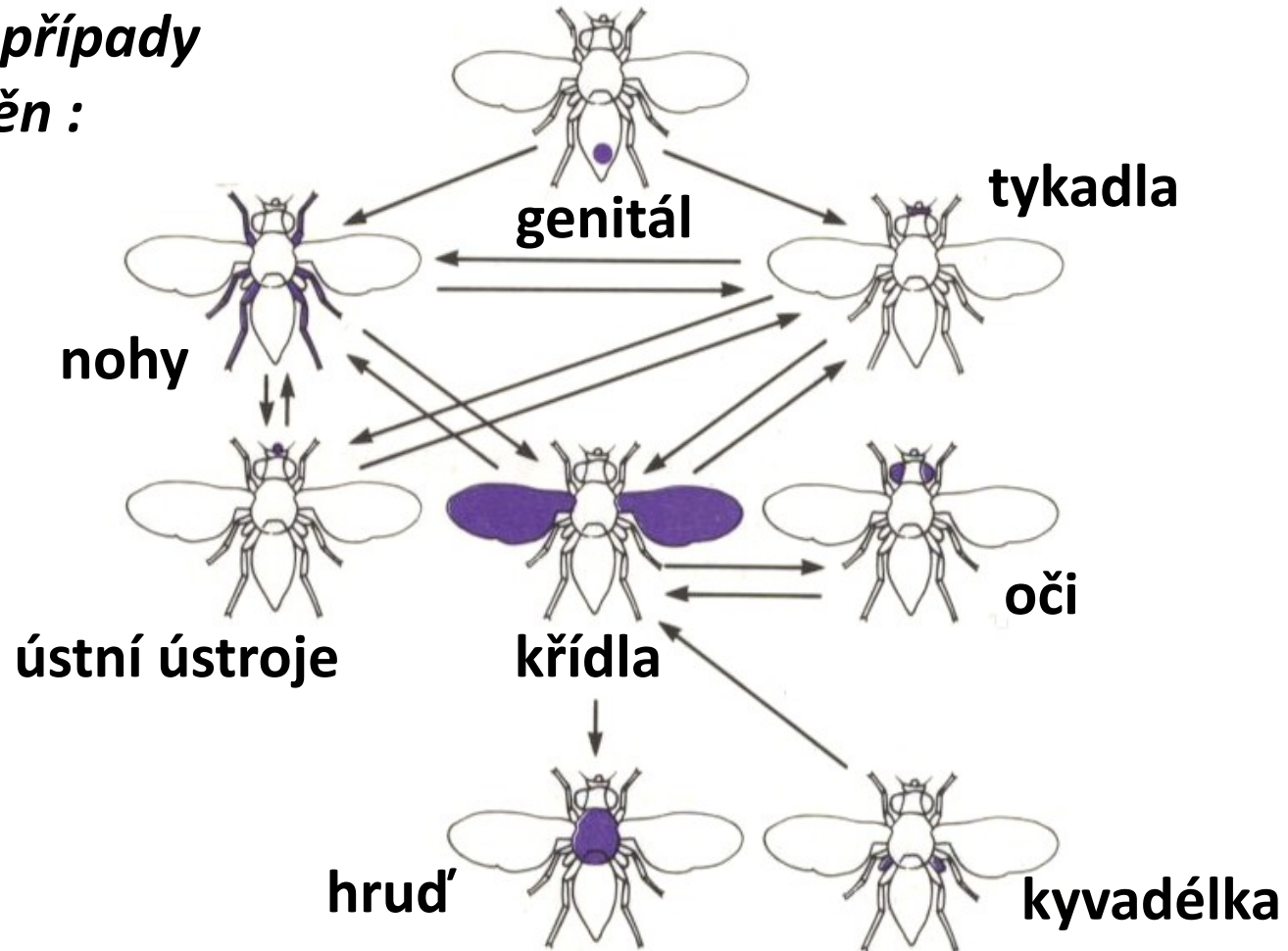
Determinace demonstrována kultivací zárodečných terčků



TRANSDETERMINACE

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

*možné případy
změn :*

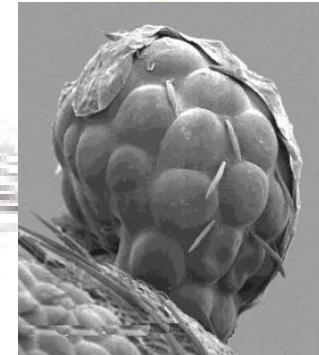
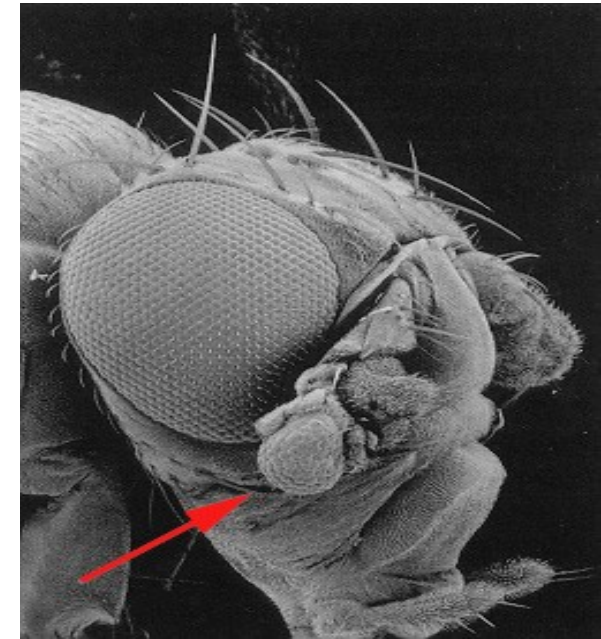


Gen *eyeless*

- 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).

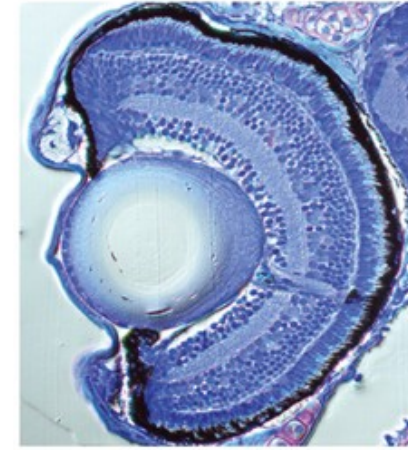
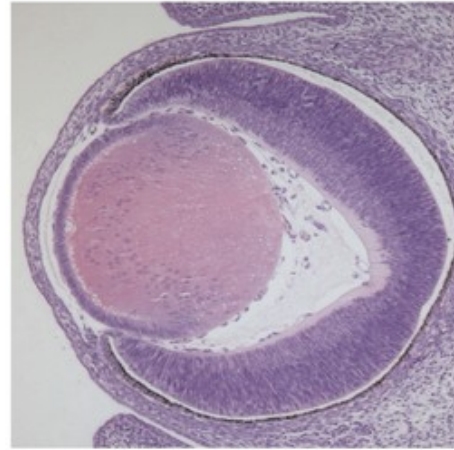
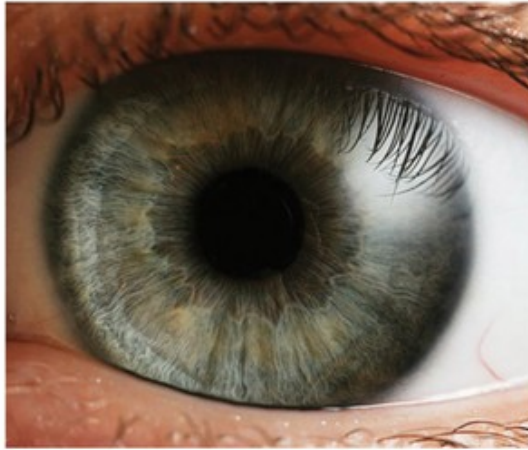
Human

Mouse

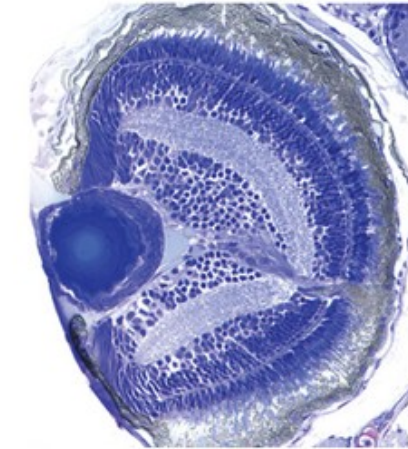
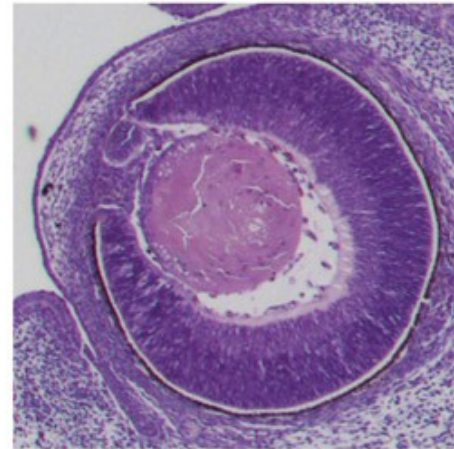
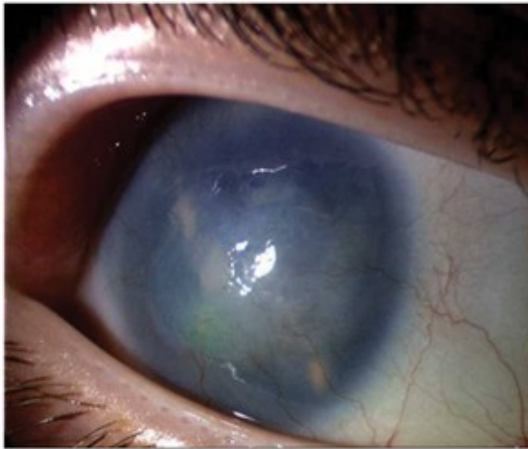
Zebrafish

Drosophila

WT



mut



PAX6^{+/-}

Pax6^{-/-}

pax6b^{-/-}

ey^{-/-}

EQs

cornea opaque
iris absent
retina degenerate
lens opaque
aqueous humor of eyeball
increased pressure

eye decreased size
lens fused_to cornea
iris morphology
anterior chamber
absent

eye decreased size
lens decreased size
retina malformed

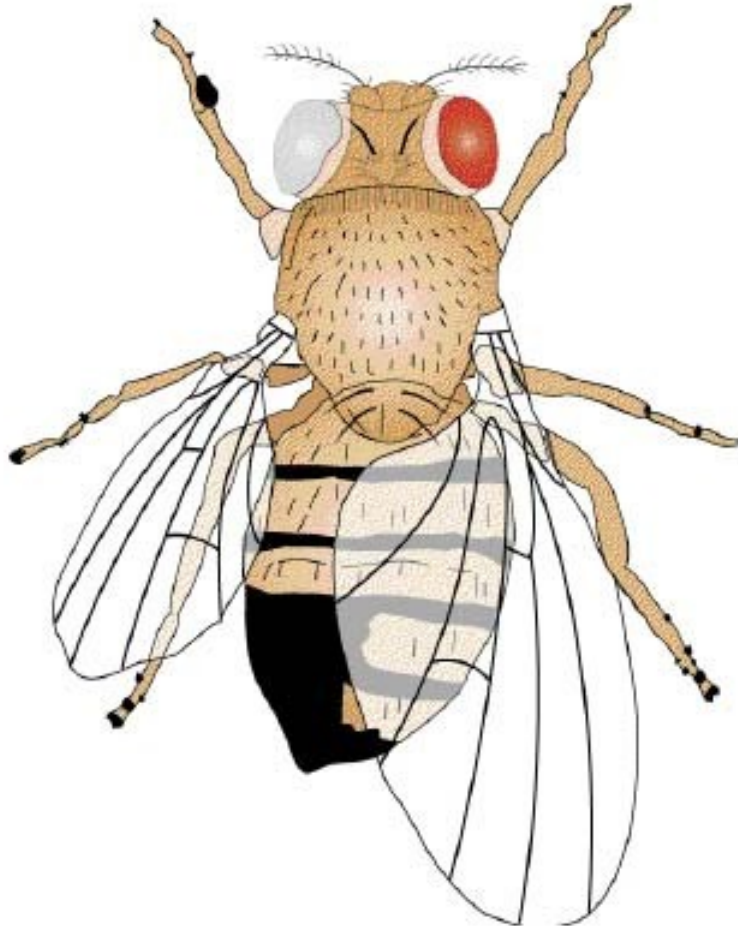
eye absent

**Drosophila nemá pohlavní hormony:
gyandromorfie**

bilaterální

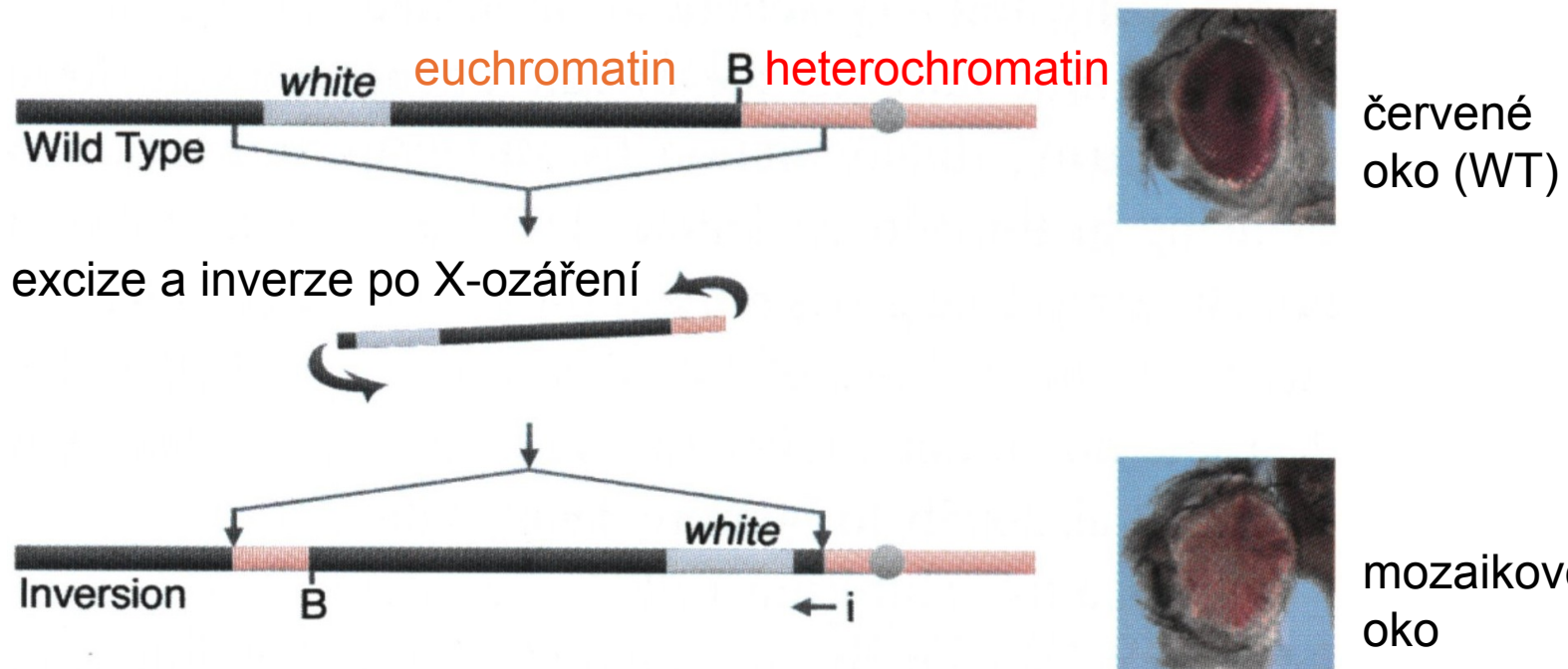
(ztráta jednoho chromosomu X-wt při prvním mitotickém dělení)

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



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

Drosophila: poziční efekt (PEV)

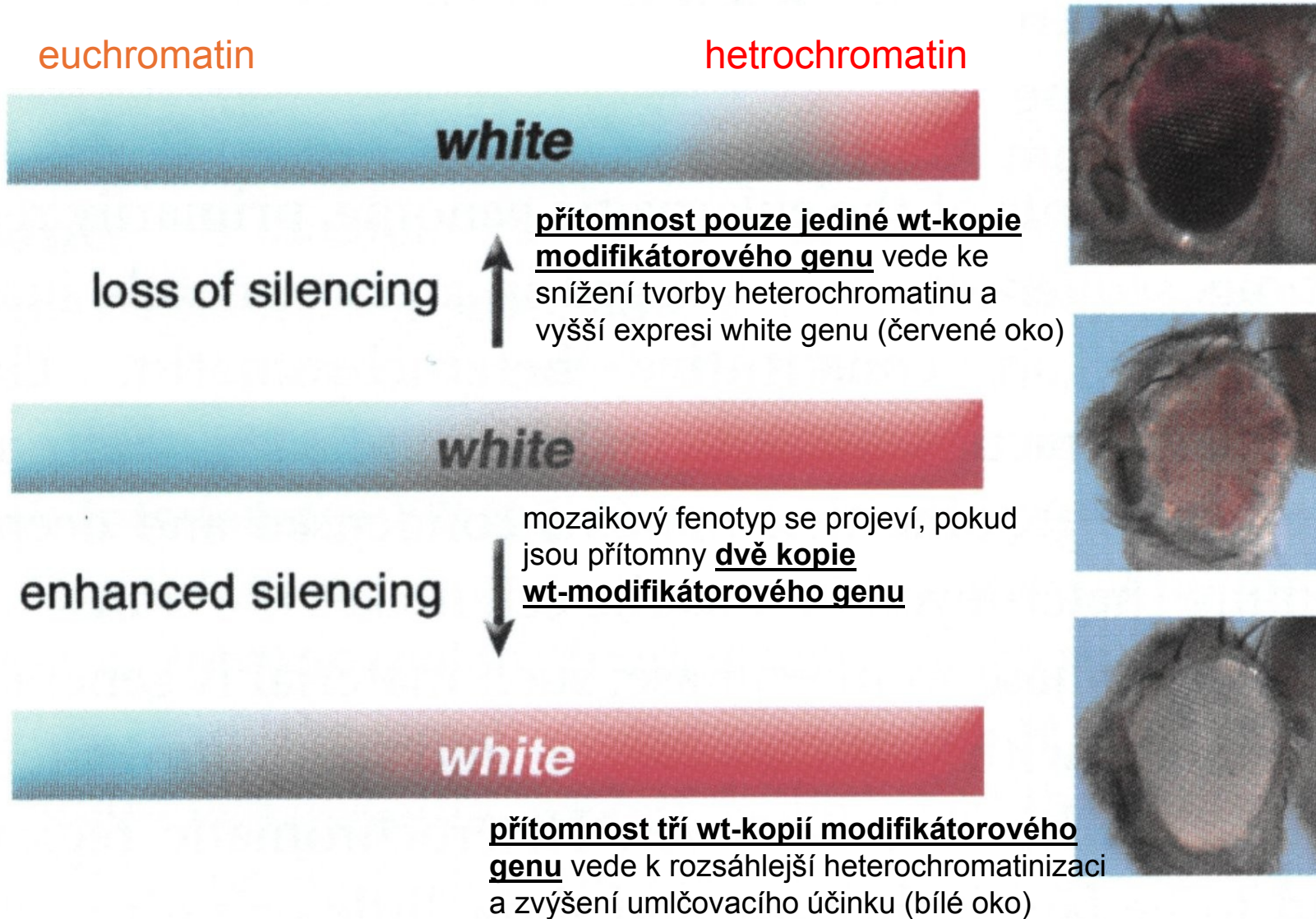


PEV efekt : Lokus *white* je standardně umístěn v euchromatinu, po inverzi pouze 25kb od pericentromerického heterochromatinu (Muller 1930), odtud se šíří restrukturační a umlčování euchromatinu. Ztráta umlčení v některých buňkách oka v procesu diferenciace vede k variegovanému fenotypu.



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

