

# Genetické riadenie vývinu živočíchov



# Modelové organizmy



*Drosophila melanogaster*  
8 chromozómov



*Caenorhabditis elegans*  
12 chromozómov

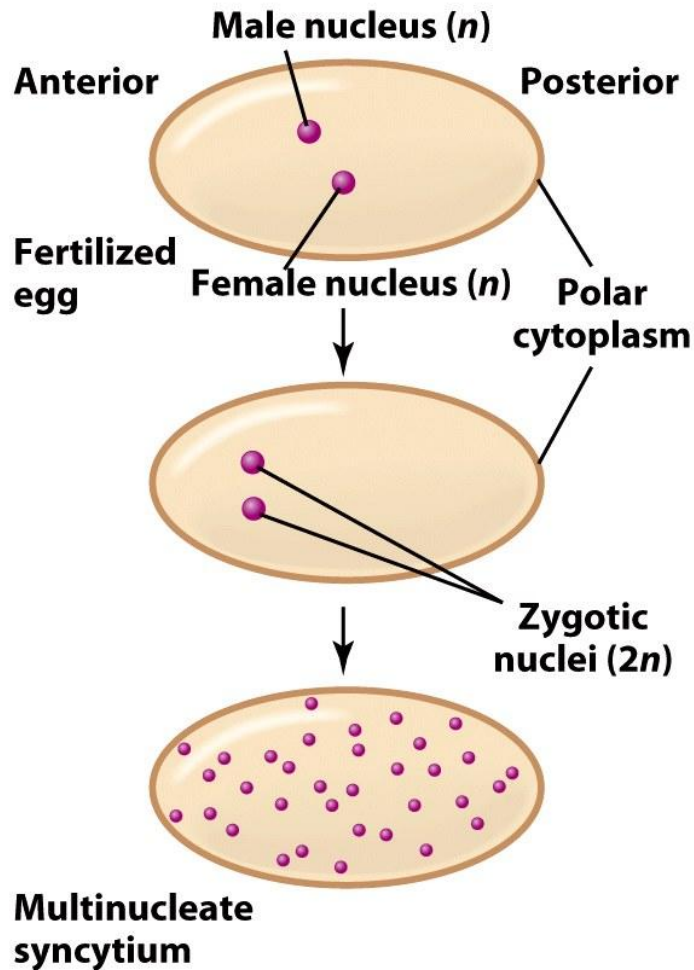


*Danio rerio*  
50 chromozómov

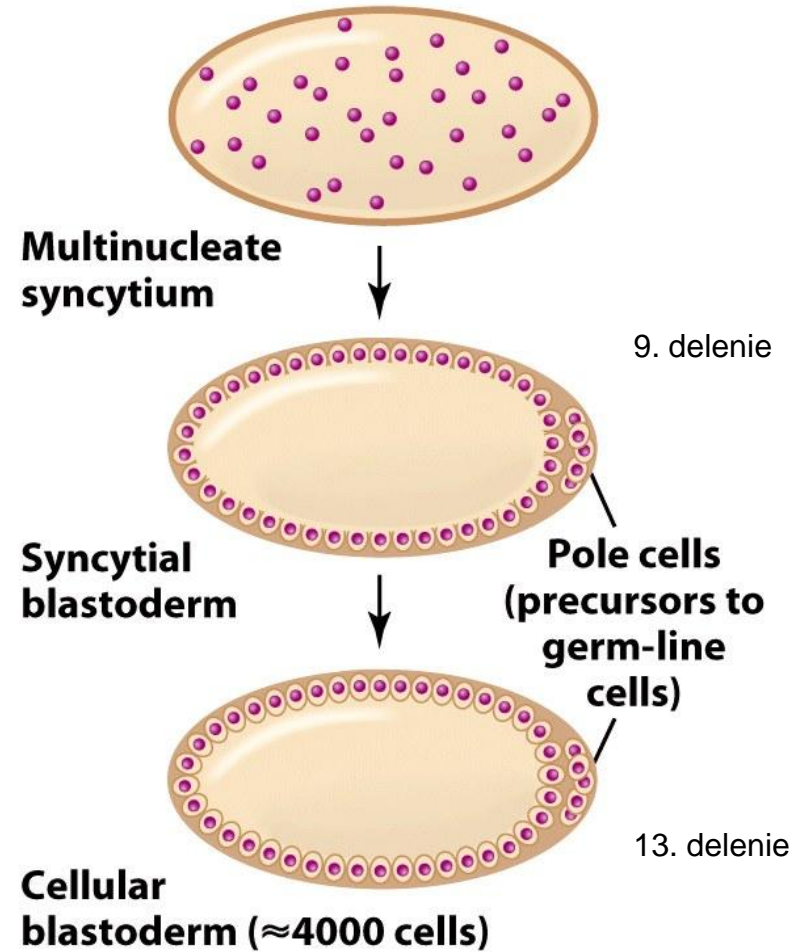


*Mus musculus*  
40 chromozómov

# Embryogenéza *D. melanogaster*

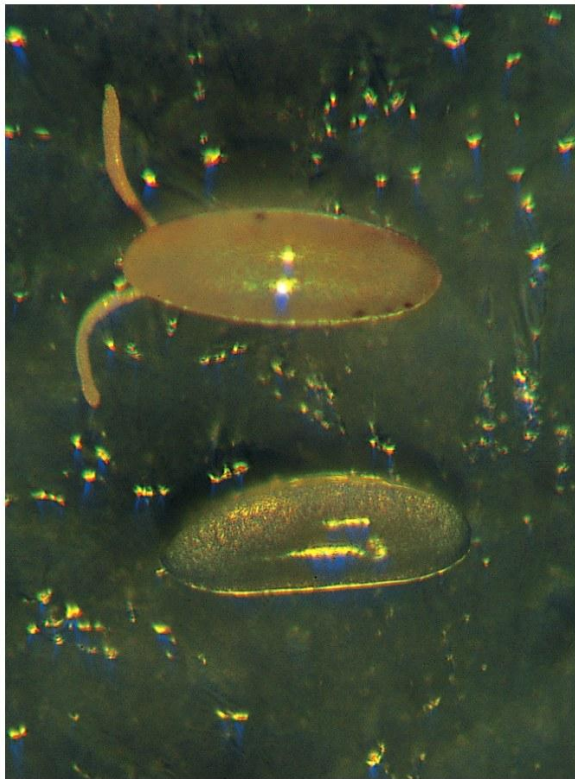


© 2009 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.



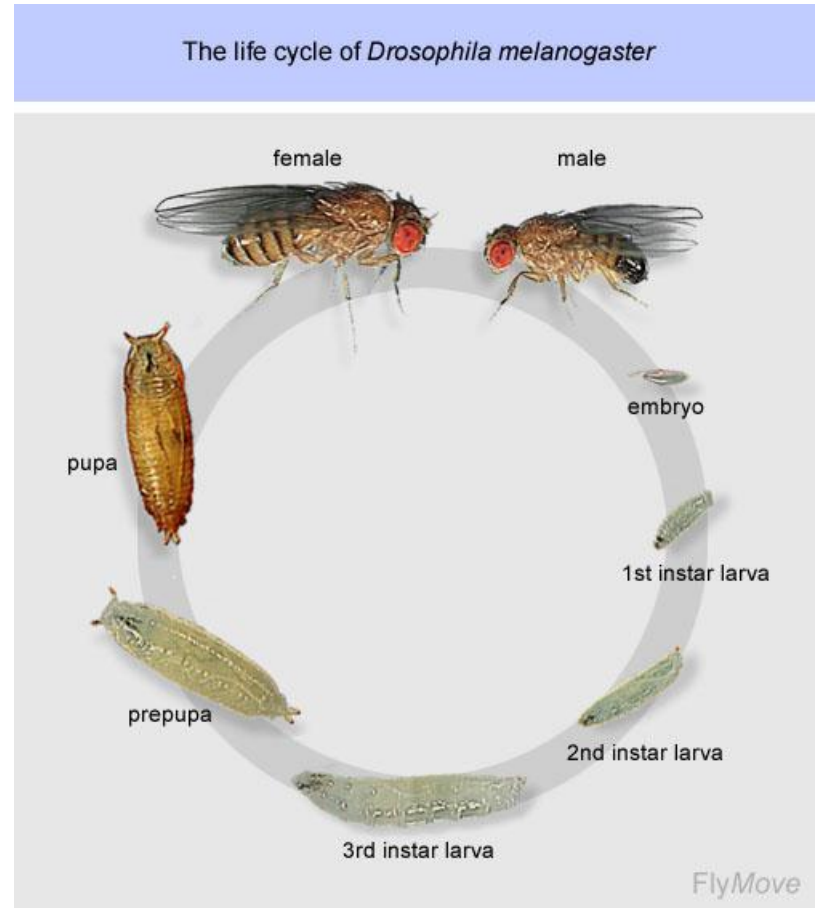
© 2009 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

# Vývin *Drosophila melanogaster*



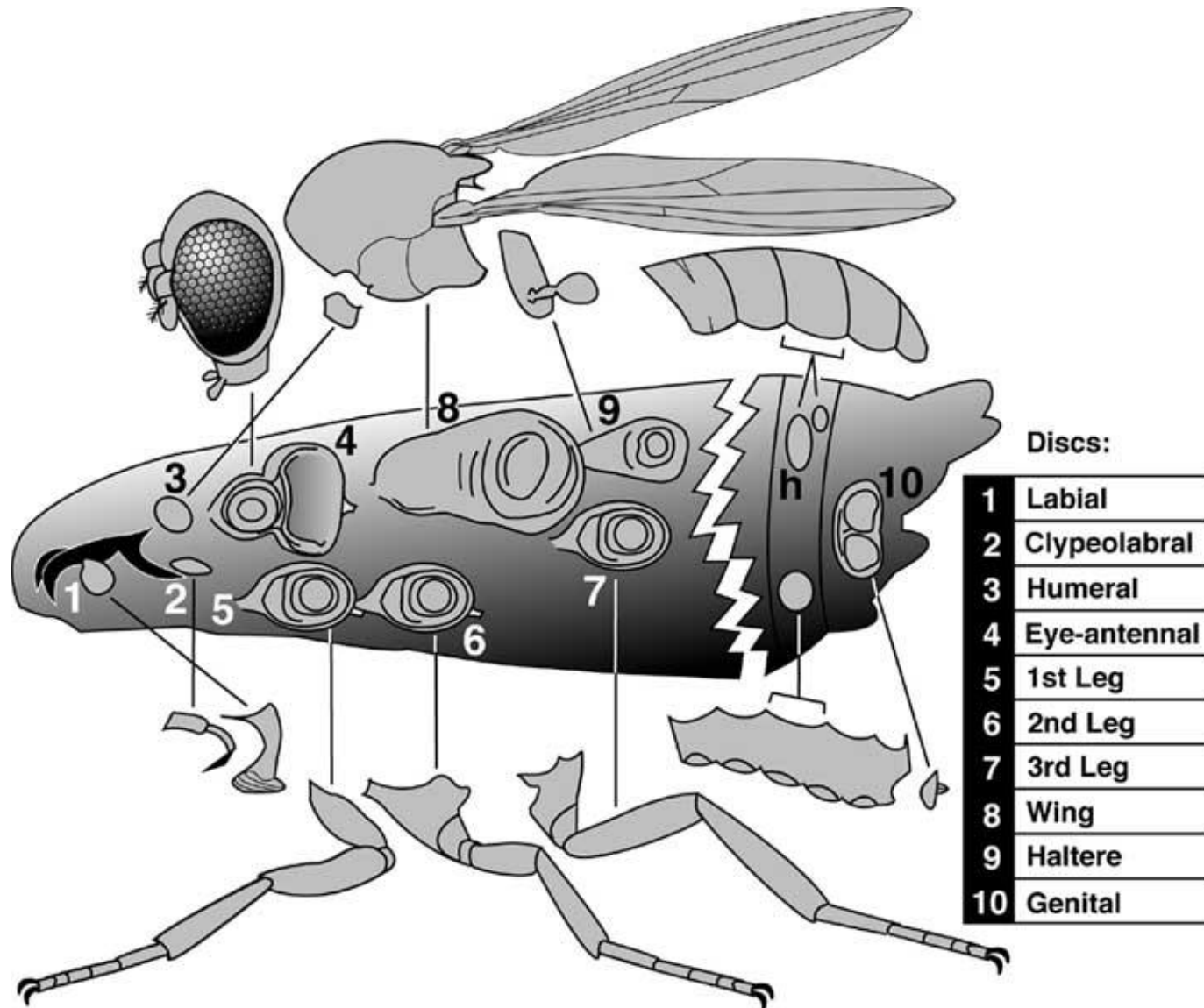
1 mm

Filamenty, mikropyle



Trvanie životného cyklu cca 14 dní

# Drosophila imaginálne disky

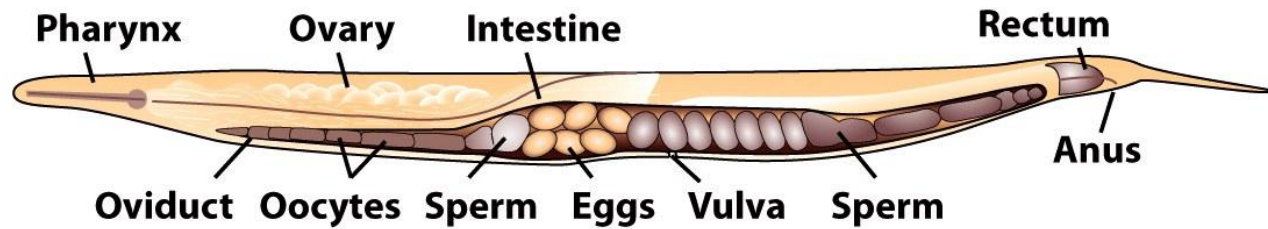
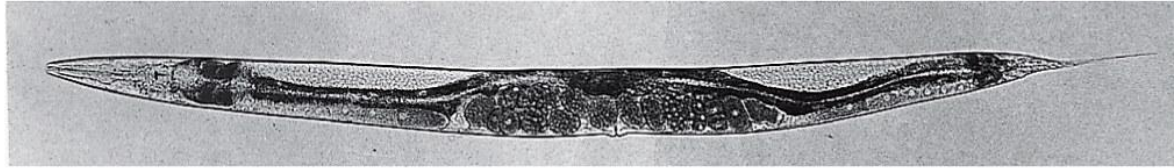




# *Caenorhabditis elegans*

## Hermaphrodite

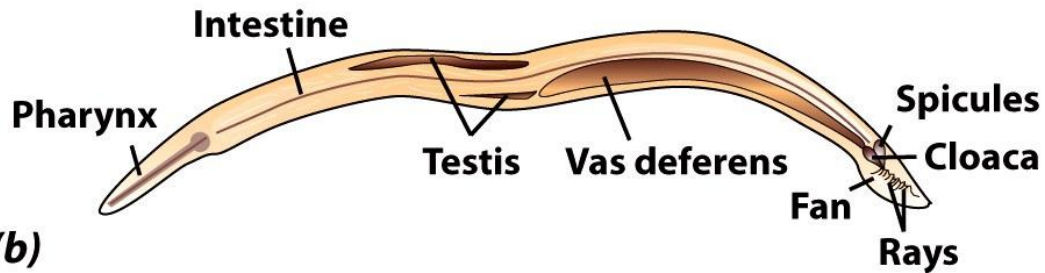
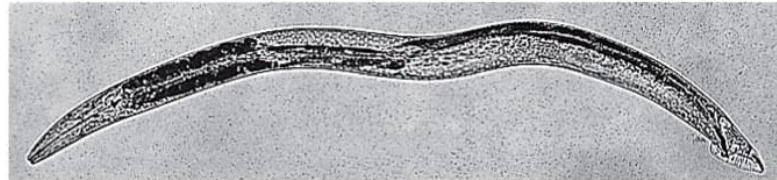
XX



(a)

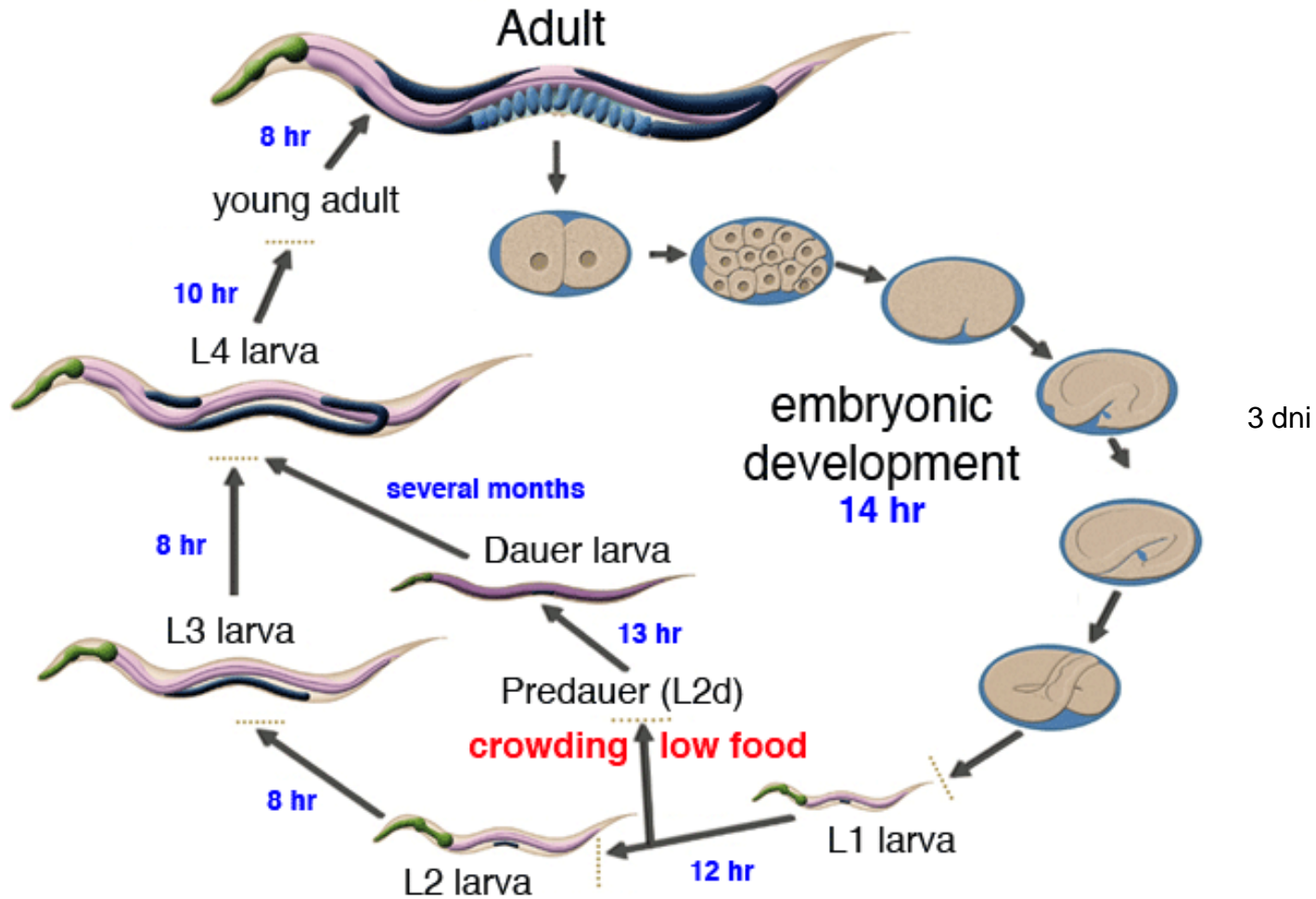
## Male

X0



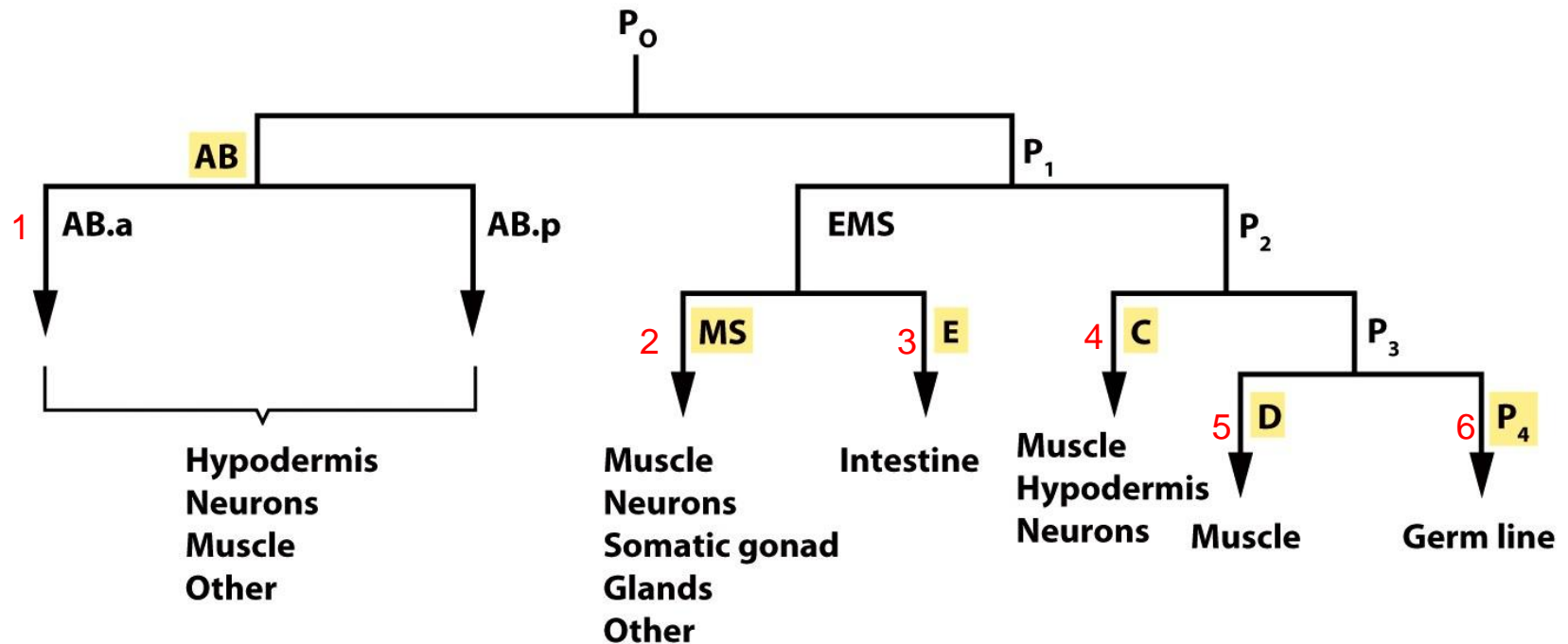
(b)

# Životný cyklus *C. elegans*



# Základové bunky *C. elegans*

Embryo – asymetrické delenie - 6 „základových“ buniek



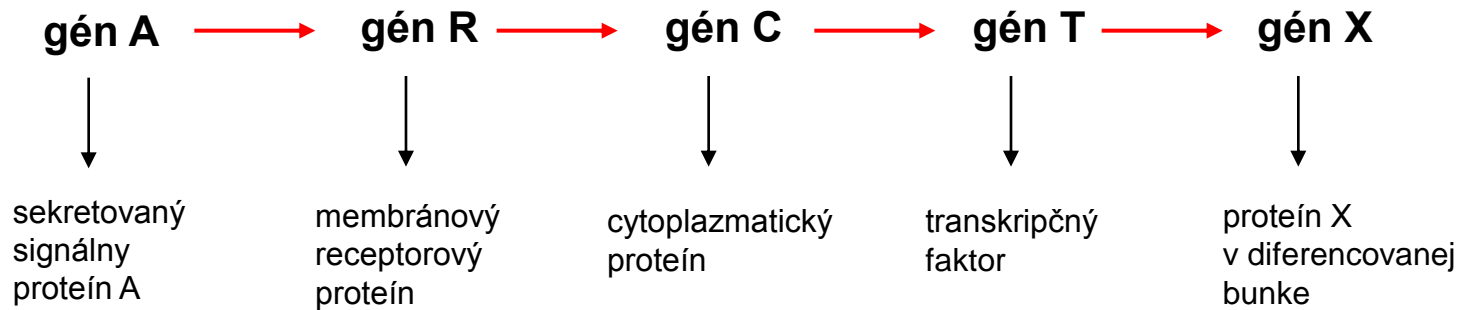
hermafrodit – 959 somatických buniek, niektoré sú mnohoadrové, 6 základových buniek

*C. elegans* – model pre štúdium apoptózy, determinácie pohlavia, starnutia....



# Genetická analýza vývojových dráh

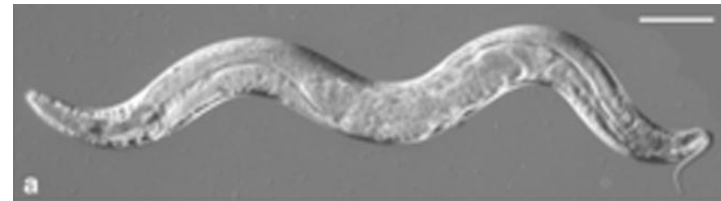
Fenotyp – výsledok série krokov v metabolickej dráhe  
analýza mutácií



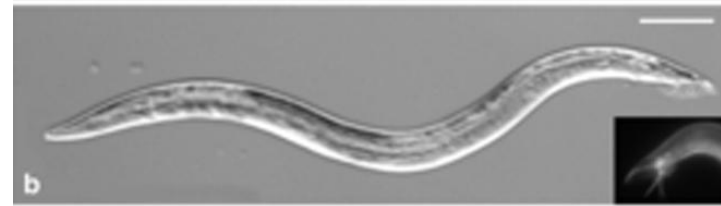
# Determinácia pohlavia u *D. melanogaster* a *C. elegans*



♀



♂



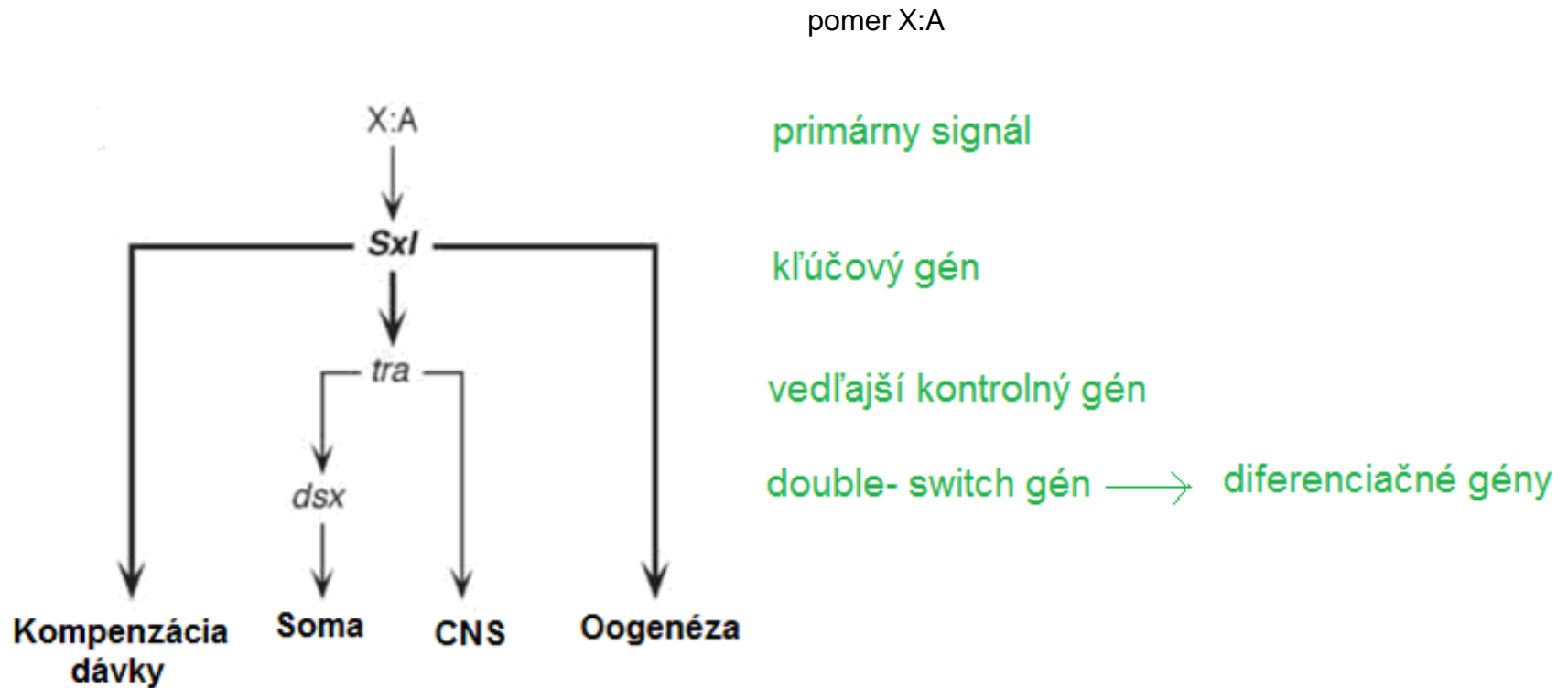
Pomer X chromozómov ku sadám autozómov

$$\text{♀} \geq 1 \quad \text{♂} \leq 0,5$$

<http://jasminefwy.blogspot.com/2009/04/best-illustrations-of-my-recent-life.html>

[http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007\\_s12035-008-8041-0-1](http://www.springerimages.com/Images/LifeSciences/1-10.1007_s12035-008-8041-0-1)

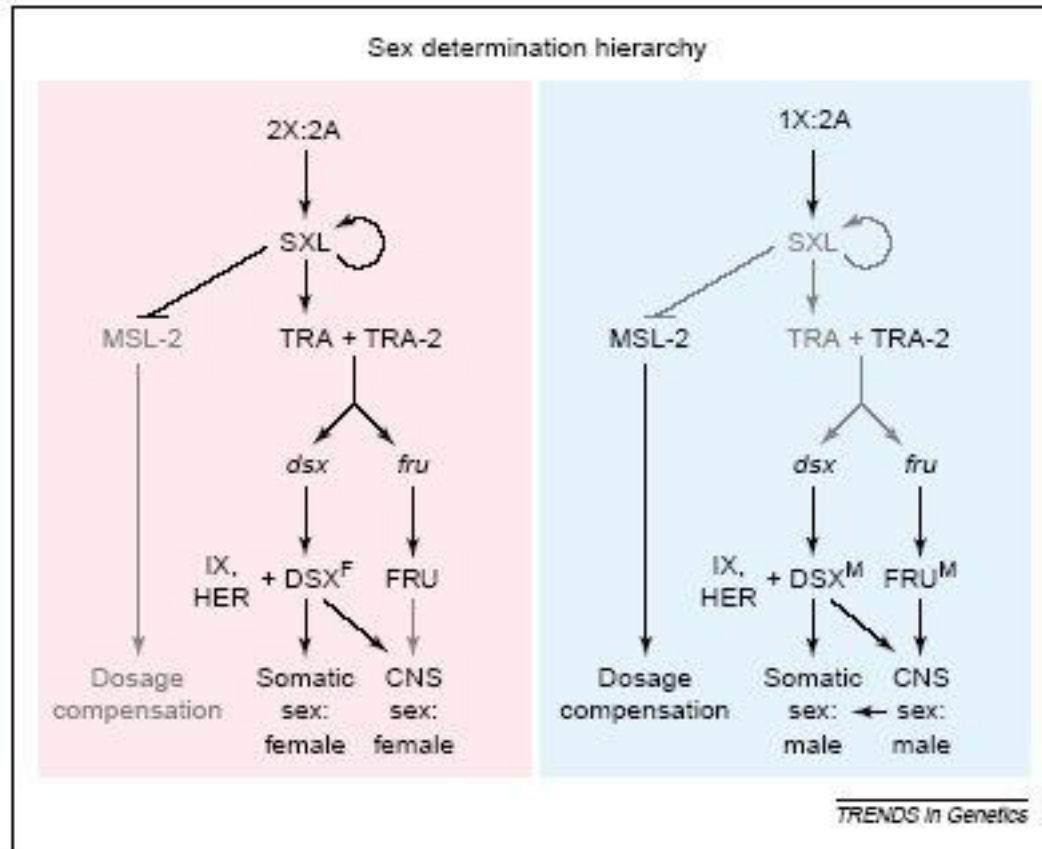
# Dráha determinácie pohlavia u *D. melanogaster*



(Schütt a Nöthiger, 2000)

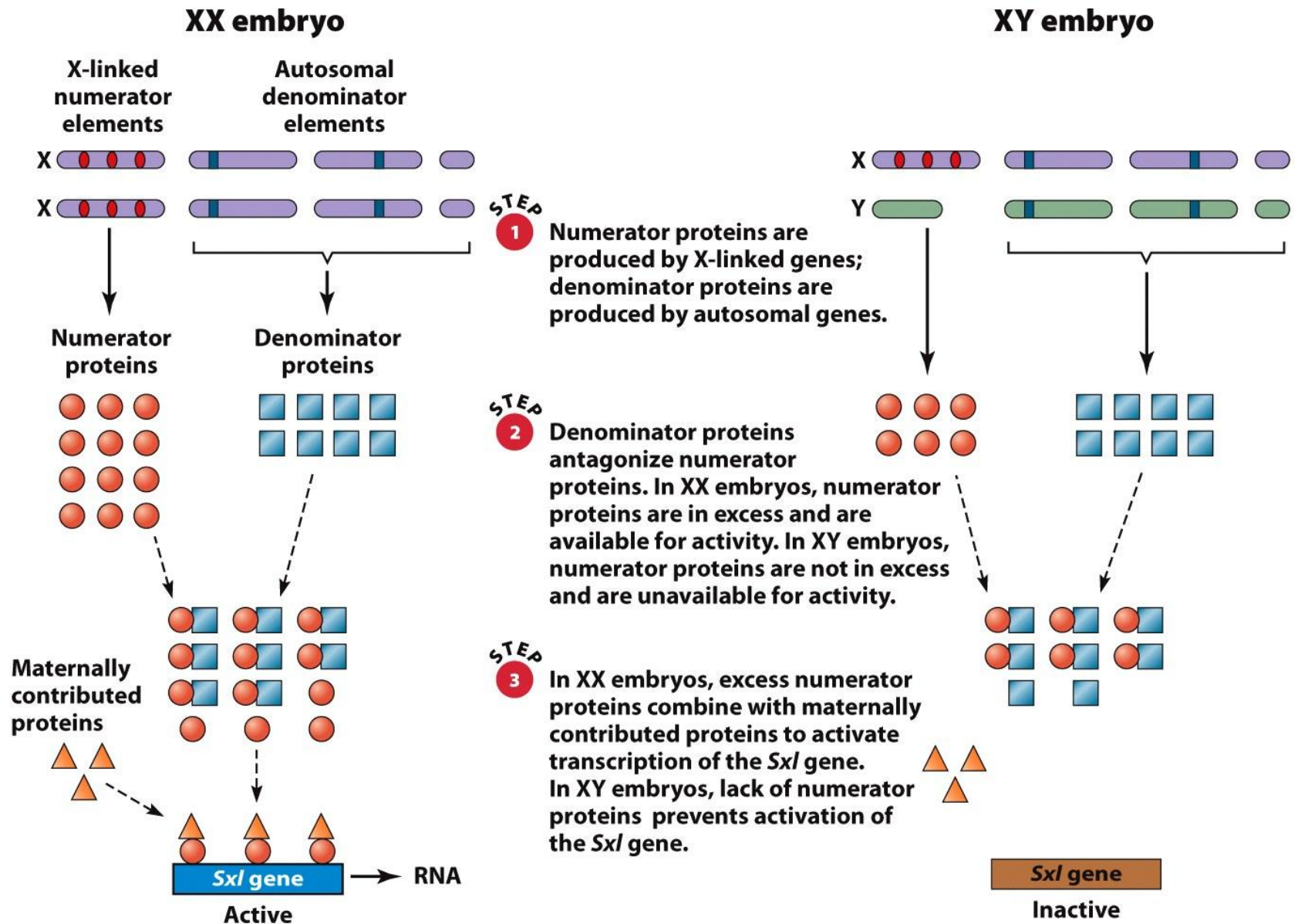
Kompenzácia dávky – tolerovanie odlišných dávok pohlavných chromozómov. ♂↑

# Genetická dráha determinácie pohlavia u *D. melanogaster*



Určenie X:A pomeru, konverzia pomeru na vývojový signál, reakcia iného systému na vývojový signál

# Zistenie pomeru X:A



Antagonizmus numerátor a denominátor elementov

# Sxl expresia

STEP

1

## Transcription:

In XX embryos, a molecular signal based on the X:A ratio initiates transcription of the *Sxl* gene from promoter  $P_E$ .

Later, transcription is initiated at promoter  $P_M$  in both XX and XY embryos.

STEP

2

## Splicing:

In XX embryos, the *Sxl* transcripts are spliced to contain all the exons except exon 3.

In XY embryos, the *Sxl* transcripts are spliced to contain all the exons, including exon 3.

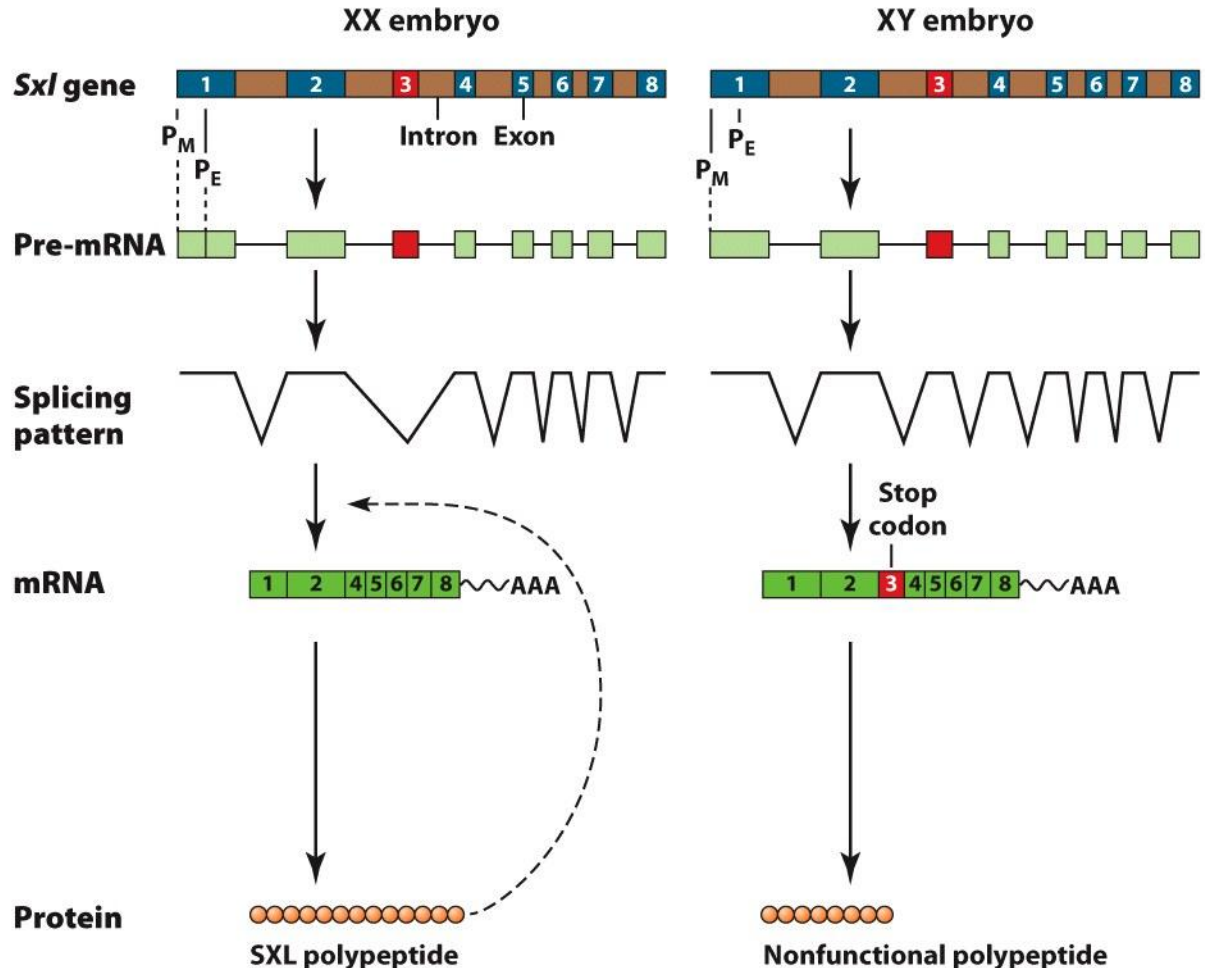
STEP

3

## Translation:

In XX embryos, the *Sxl* mRNA is translated into a polypeptide (SXL) that regulates splicing, including the splicing of *Sxl* transcripts.

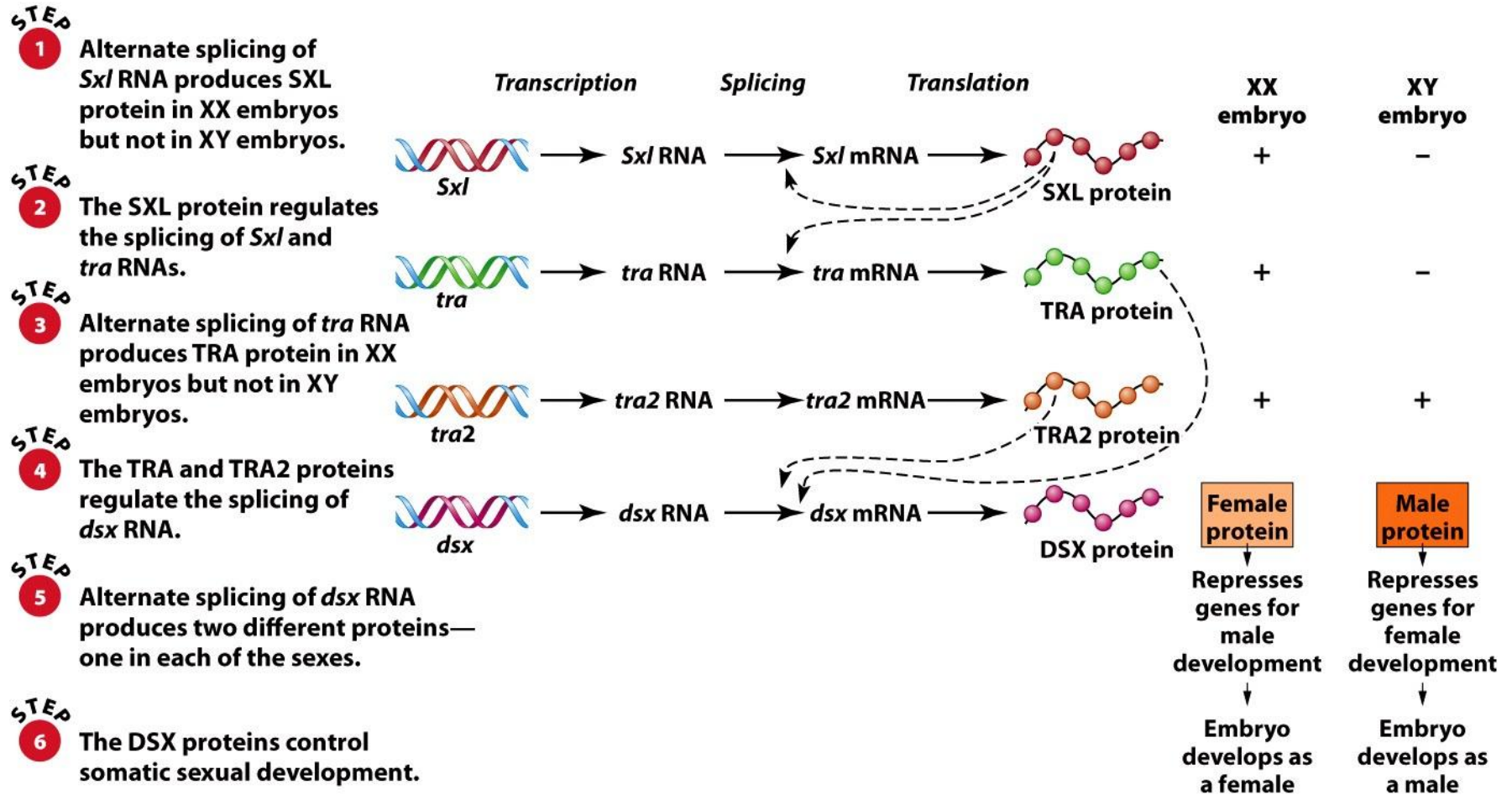
In XY embryos, a stop codon in exon 3 prevents the *Sxl* mRNA from being translated into a functional polypeptide.



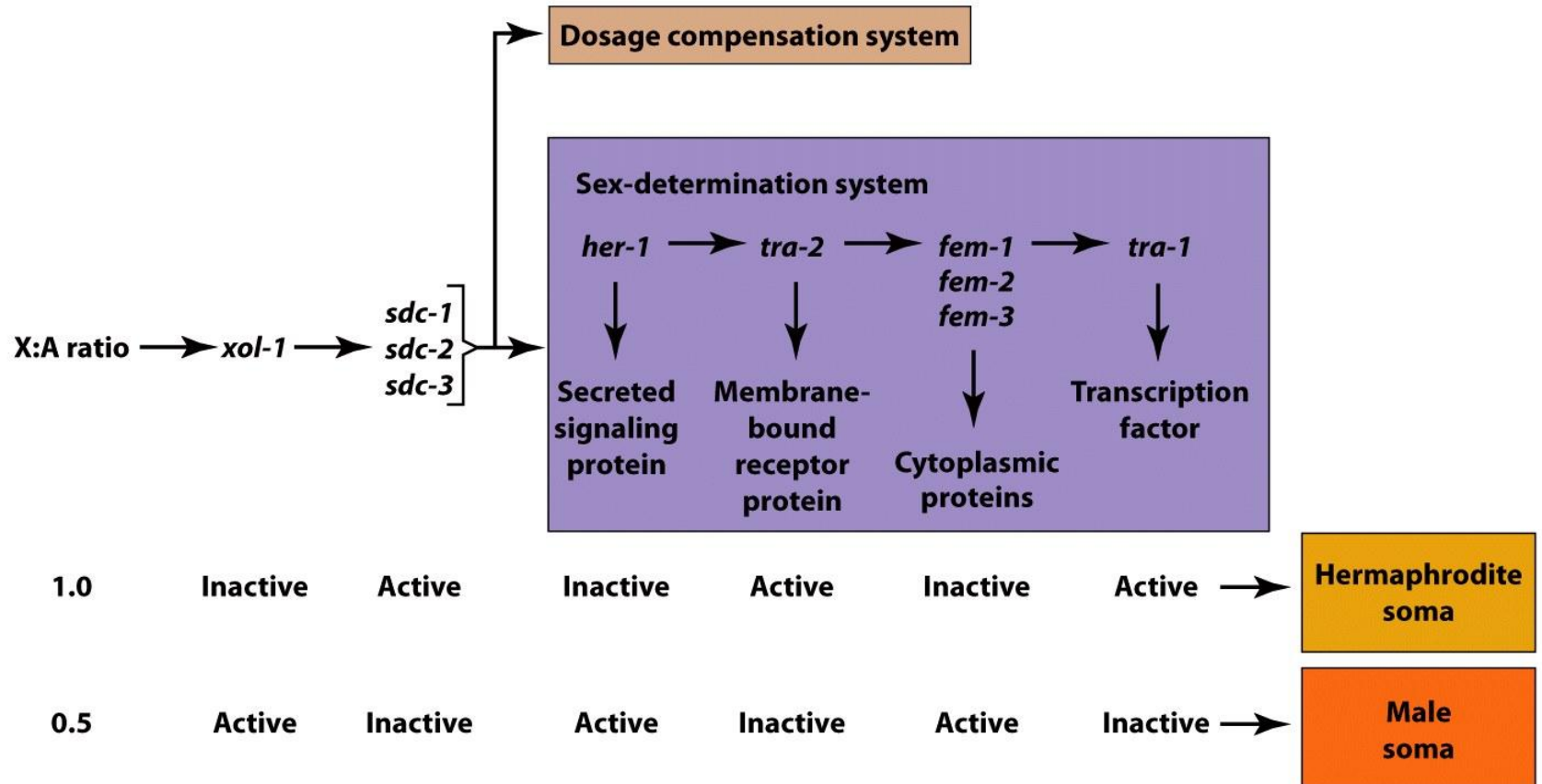
Pozitívny regulátor vlastnej syntézy



# Mechanizmus regulácie determinácie pohlavia génom Sxl

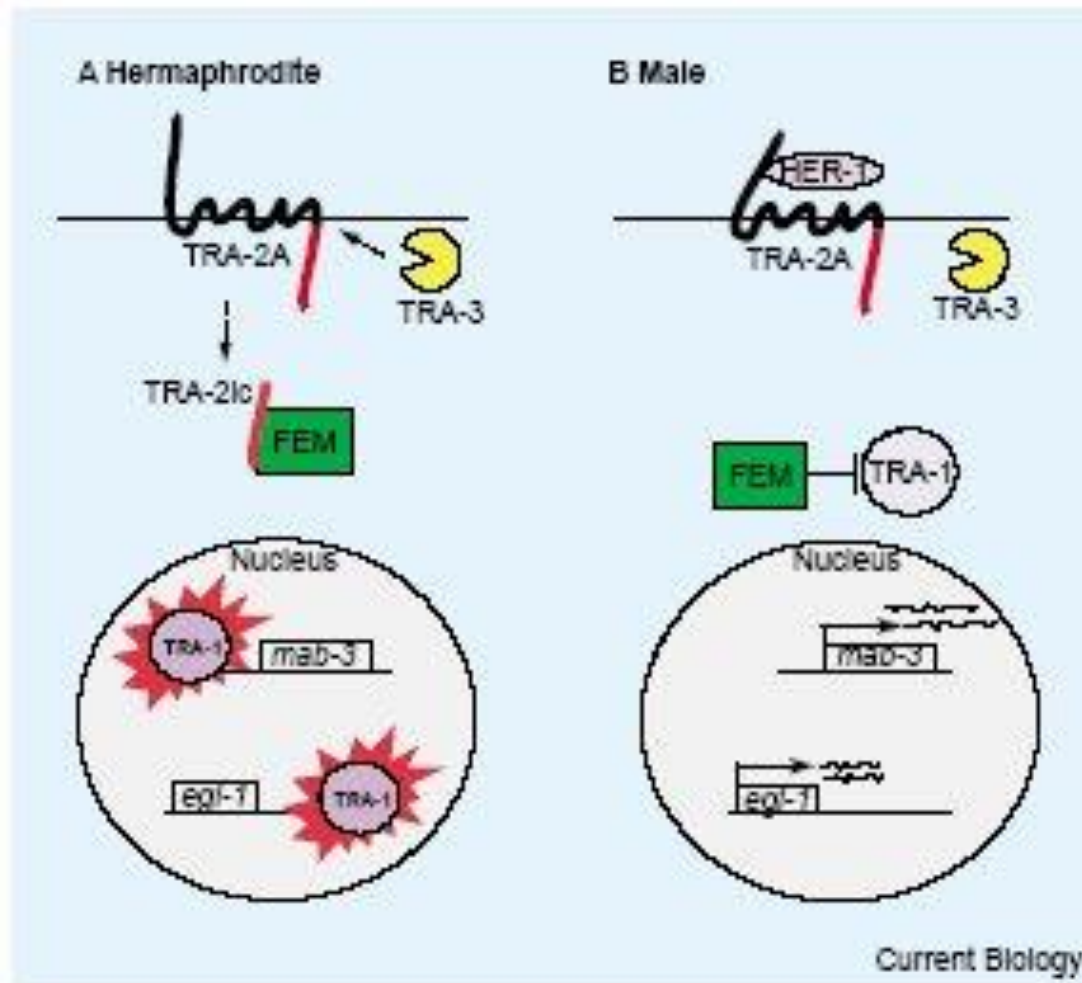


# Determinácia pohlavia u *C. elegans*



Kompenzácia dávky – XX jedince ↓

# Mechanizmus účinku signálneho proteínu Her-1



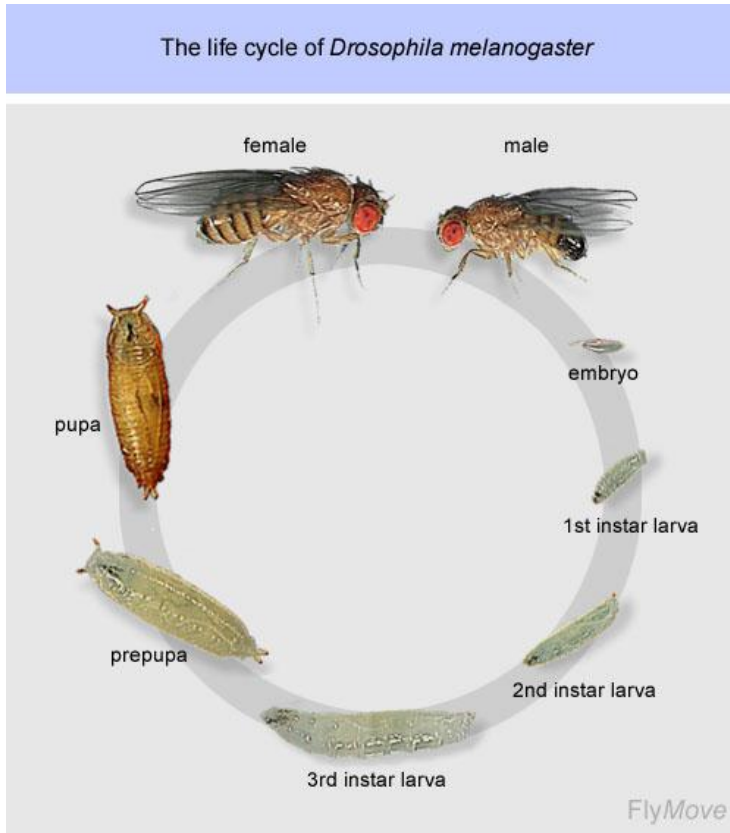
► **TABLE 21.1**

**Phenotypes of Loss-of-Function Mutations in Sex-Determination Genes in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*<sup>a</sup>**

<b>Gene</b>	<b>XX Mutant Phenotype</b>	<b>XY (or XO) Mutant Phenotype</b>
<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>		
Numerator gene	lethal	no effect
Denominator gene	no effect	reduced viability
<i>Sxl</i>	lethal	no effect
<i>tra</i>	male	no effect
<i>tra2</i>	male	sterile male
<i>dsx</i>	sterile intersex	sterile intersex
<b><i>Caenorhabditis elegans</i></b>		
<i>xol-1</i>	no effect	lethal
<i>sdc-1</i>	masculinized	no effect
<i>sdc-2</i>	masculinized	no effect
<i>sdc-3</i>	no sex-determination effect	no effect
<i>her-1</i>	no effect	fertile hermaphrodite
<i>tra-2</i>	male	no effect
<i>fem-1</i>	female	female
<i>fem-2</i>	female	female
<i>fem-3</i>	female	female
<i>tra-1</i>	male	minor effects in gonad

<sup>a</sup>Source: Parkhurst, S. M., and P. M. Meneely. 1994. *Science* 264:924–932.

# Vývinová genetika *D.melanogaster*



gény s maternálnym efektom –  
základný plán tela embrya  
A-P, D-V časti tela

gény so zygotickým efektom

zygotická génová expresia – expresia génov embrya/zygoty

Vajíčko – zdroj proteínov potrebných pre skoré štádiá  
embryogenézy

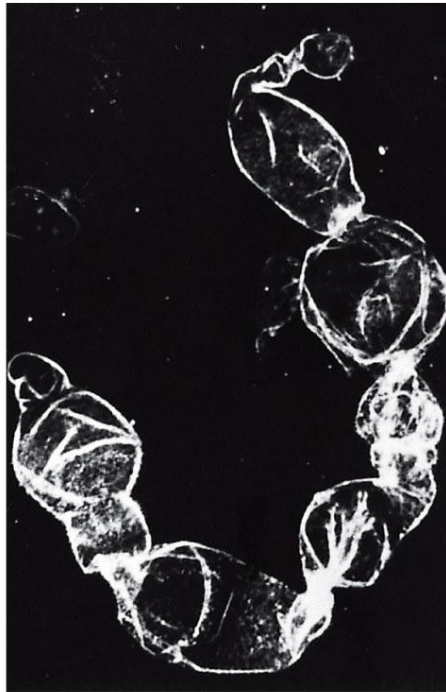


# gén *dorsal* – maternálny účinok

$$\frac{dl}{dl} \text{♀} \times \frac{+}{+} \text{♂}$$



**Mutant embryo due  
to maternal effect**



$$\frac{+}{+} \text{♀} \times \frac{dl}{dl} \text{♂}$$



**Wild-type embryo**



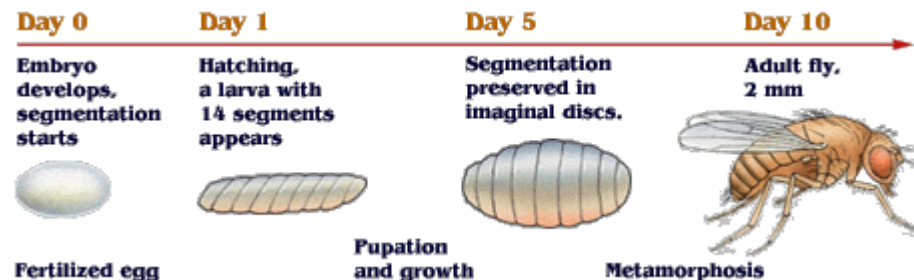
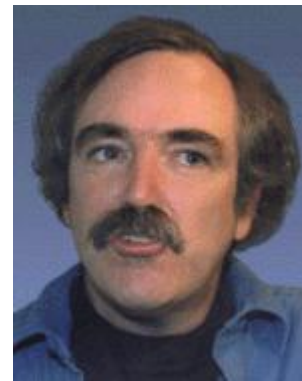
kóduje transkripčný faktor  
diferenciácia dorzálnej a ventrálnej strany

*dl* – žiadna expresia v embryu, len v samičej  
zárodočnej dráhe

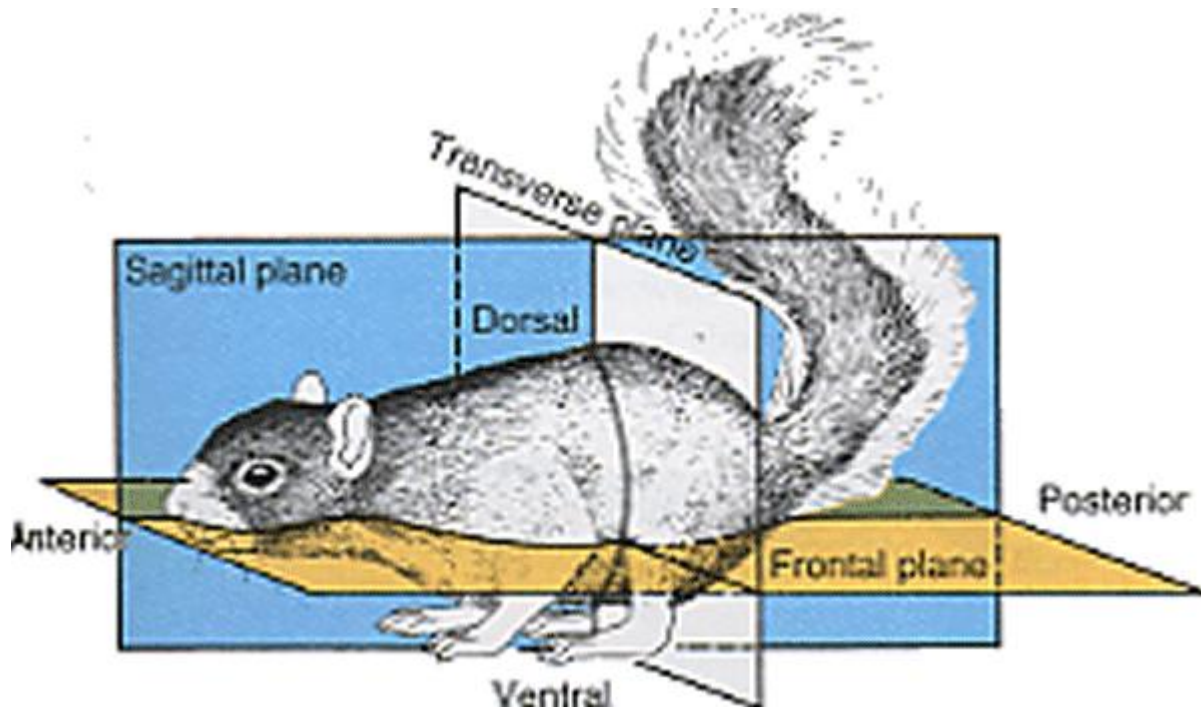


## Nobelova cena za fyziológiu a medicínu rok 1995

The Nobel Assembly at the Karolinska Institute in Stockholm, Sweden, has awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1995 to **Edward B. Lewis**, **Christiane Nüsslein-Volhard** and **Eric Wieschaus** for their discoveries concerning "the genetic control of early embryonic development".

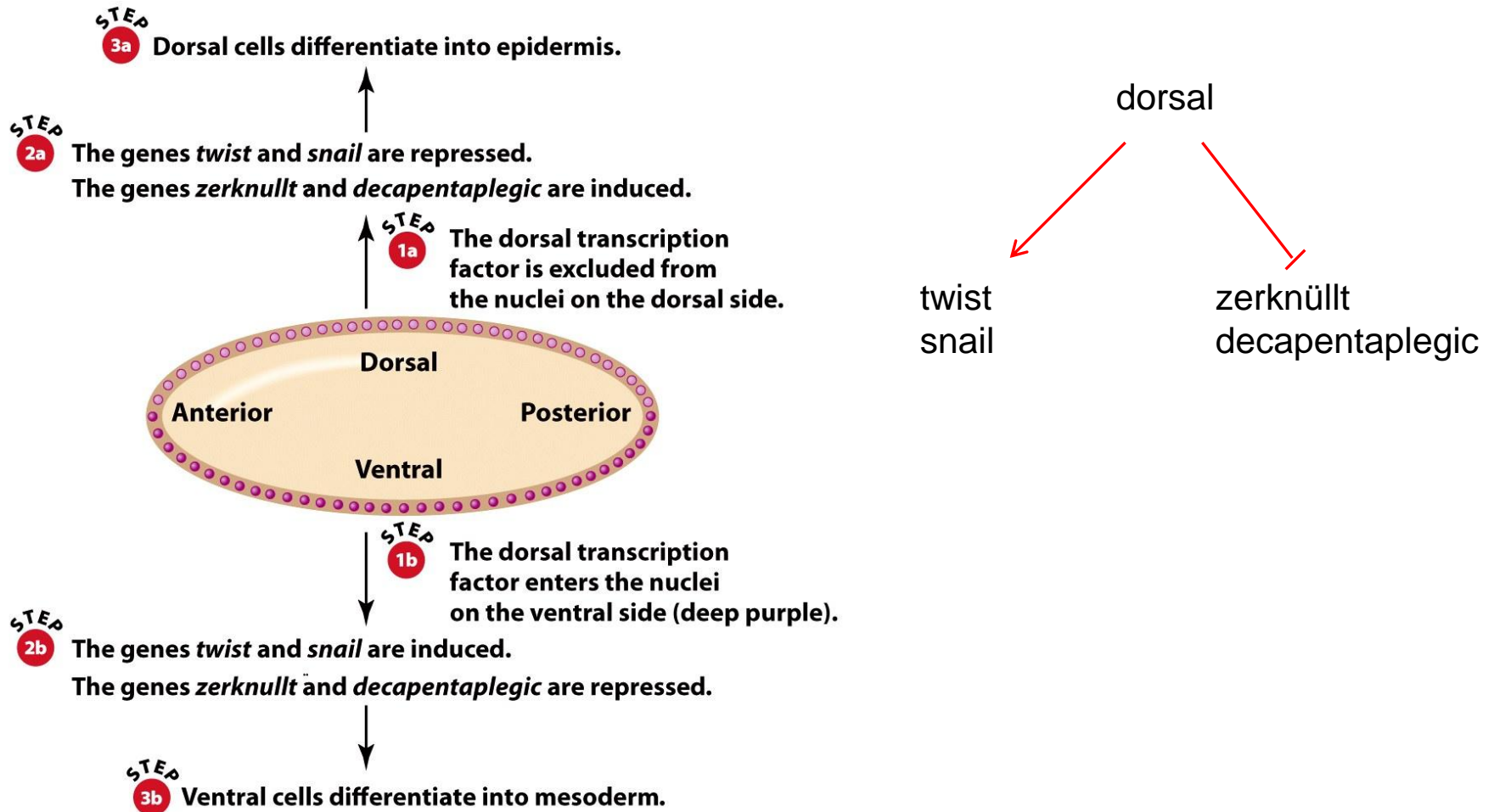


# Bilaterálne symetrické organizmy – telové osi

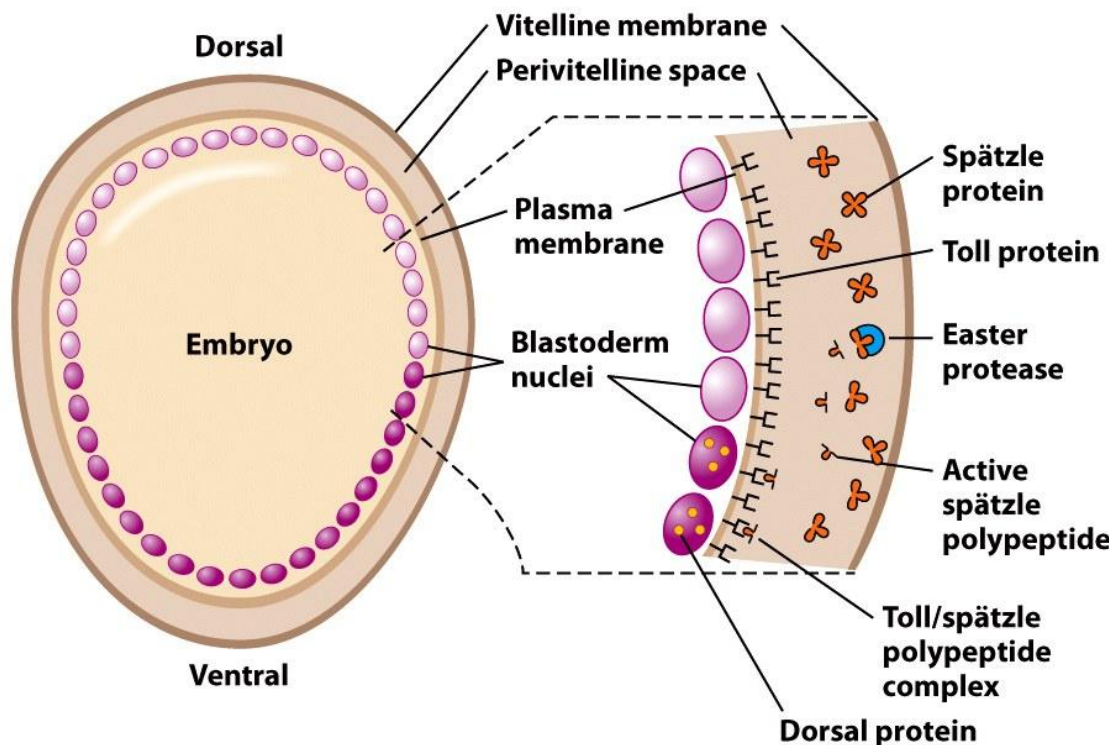


<http://www.mindcreators.com/DevelopmentalSim/DorsalVentral.htm>

# Určenie dorzálnovo-ventrálnej osi u *D. melanogaster*



# Dorzálno-ventrálna os *D.melanogaster*



- STEP 1** The Toll receptor protein is distributed uniformly on the surface of the embryo's plasma membrane. The spätzle protein is distributed throughout the perivitelline space.
- STEP 2** The easter protease cleaves the spätzle protein to produce an active spätzle polypeptide.
- STEP 3** The active spätzle polypeptide interacts with the Toll receptor protein.
- STEP 4** The active Toll/spätzle polypeptide complex triggers the dorsal protein (orange) to enter the nuclei on the ventral side of the embryo (deep purple).

# Formovanie anteriórno-posteriórnej osi u *D. melanogaster*

STEP

1

*hunchback* and *caudal* RNAs are distributed uniformly throughout the oocyte.

STEP

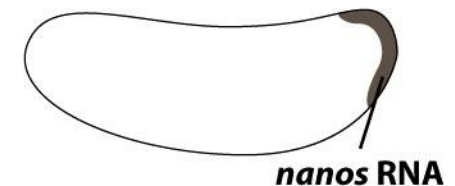
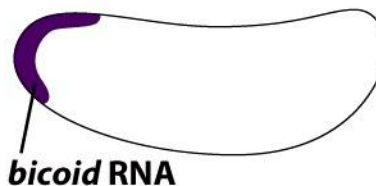
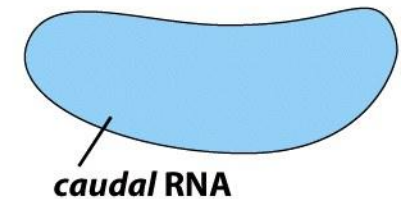
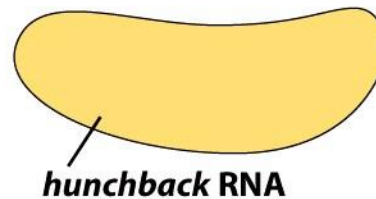
2

*bicoid* and *nanos* RNAs accumulate at opposite ends of the oocyte—*bicoid* RNA at the anterior and *nanos* RNA at the posterior.

Anterior determination

In oocyte

Posterior determination



bicoid – TF

Hunchback, caudal – maternálna kontribúcia  
Bicoid, nanos – maternálna kontribúcia



# Formovanie anteriórno-posteriórnej osi u *D. melanogaster*

STEP

3

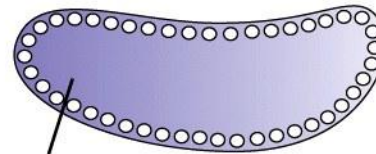
*bicoid* and *nanos* RNAs are translated locally in the embryo. The resulting proteins diffuse to form gradients, with *bicoid* protein concentrated in the anterior region and *nanos* protein concentrated in the posterior region.

STEP

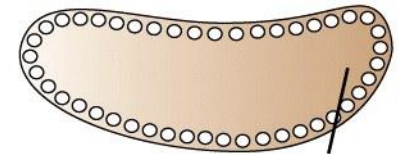
4

*Bicoid* protein prevents the translation of *caudal* RNA in the anterior of the embryo; *nanos* protein prevents the translation of *hunchback* RNA in the posterior of the embryo.

In syncytial blastoderm

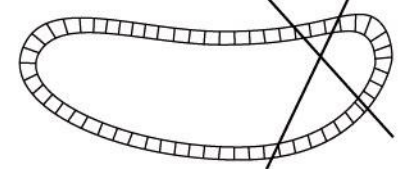
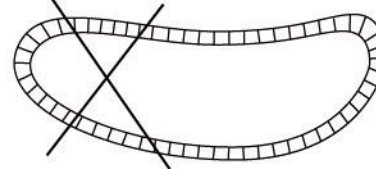


Bicoid protein



Nanos protein

In cellular blastoderm





# Formovanie anteriórno-posteriórnej osi u *D. melanogaster*

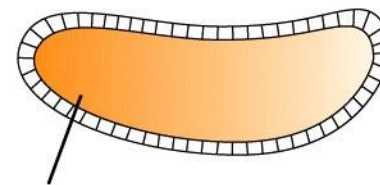
STEP  
5

*hunchback* RNA is translated into protein in the anterior of the embryo; *caudal* RNA is translated into protein in the posterior of the embryo.

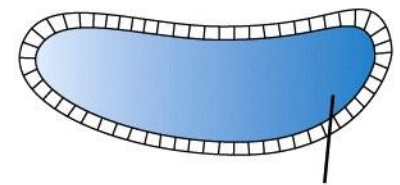
STEP  
6

Hunchback (and bicoid) protein acts as a transcription factor to regulate the genes for differentiation of the anterior region of the embryo; caudal protein acts as a transcription factor to regulate the genes for differentiation of the posterior region of the embryo.

In cellular blastoderm

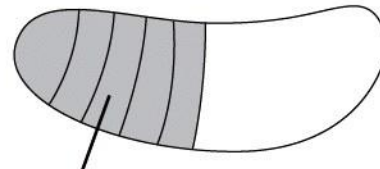


Hunchback protein

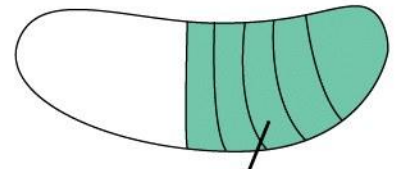


Caudal protein

In embryo



Anterior segments



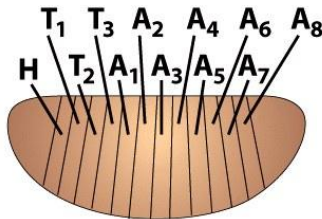
Posterior segments

bicoid, nanos – morfogény – látky riadiace vývinové procesy v závislosti na ich koncentrácii

# Aktivita zygotických génov vo vývoji

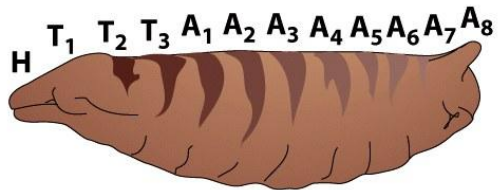
## Segmentácia tela u *D. melanogaster*

### Blastoderm



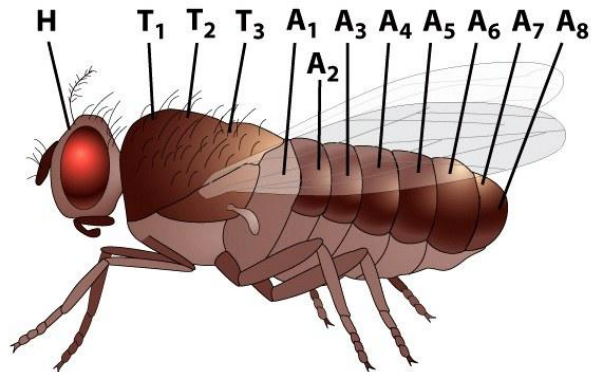
(a)

### Larva



(b)

### Adult



(c)

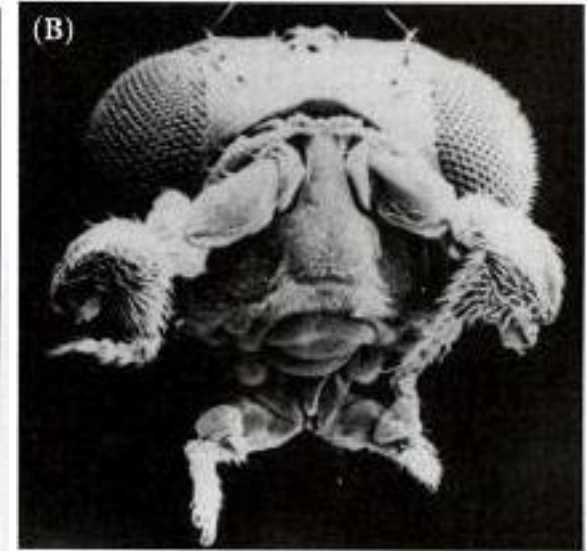
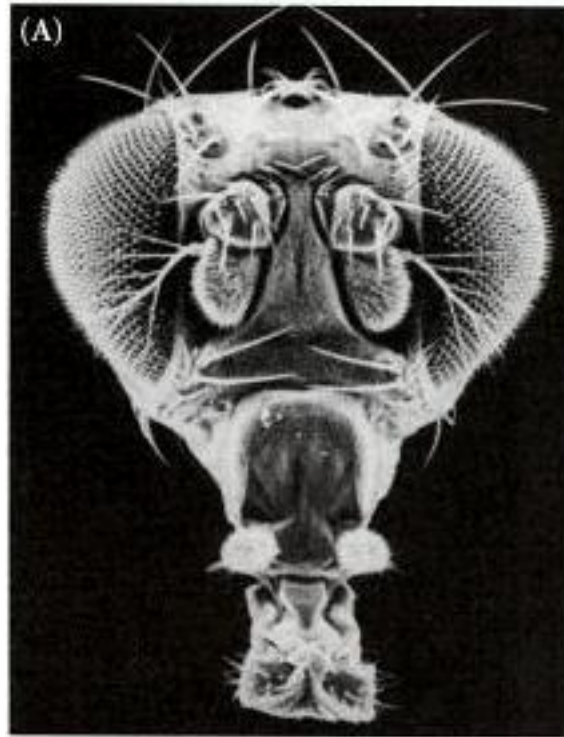
Zygotická génová expresia

H – hlava  
T – thorax  
A - abdomen

Rok 1915 Calvin Bridges – bithorax  
Objav homeotických génov  
Štúdium genetiky segmentácie tela

# Homeotické gény

*Bithorax* mutant in adult *Drosophila*



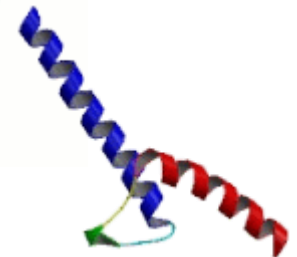
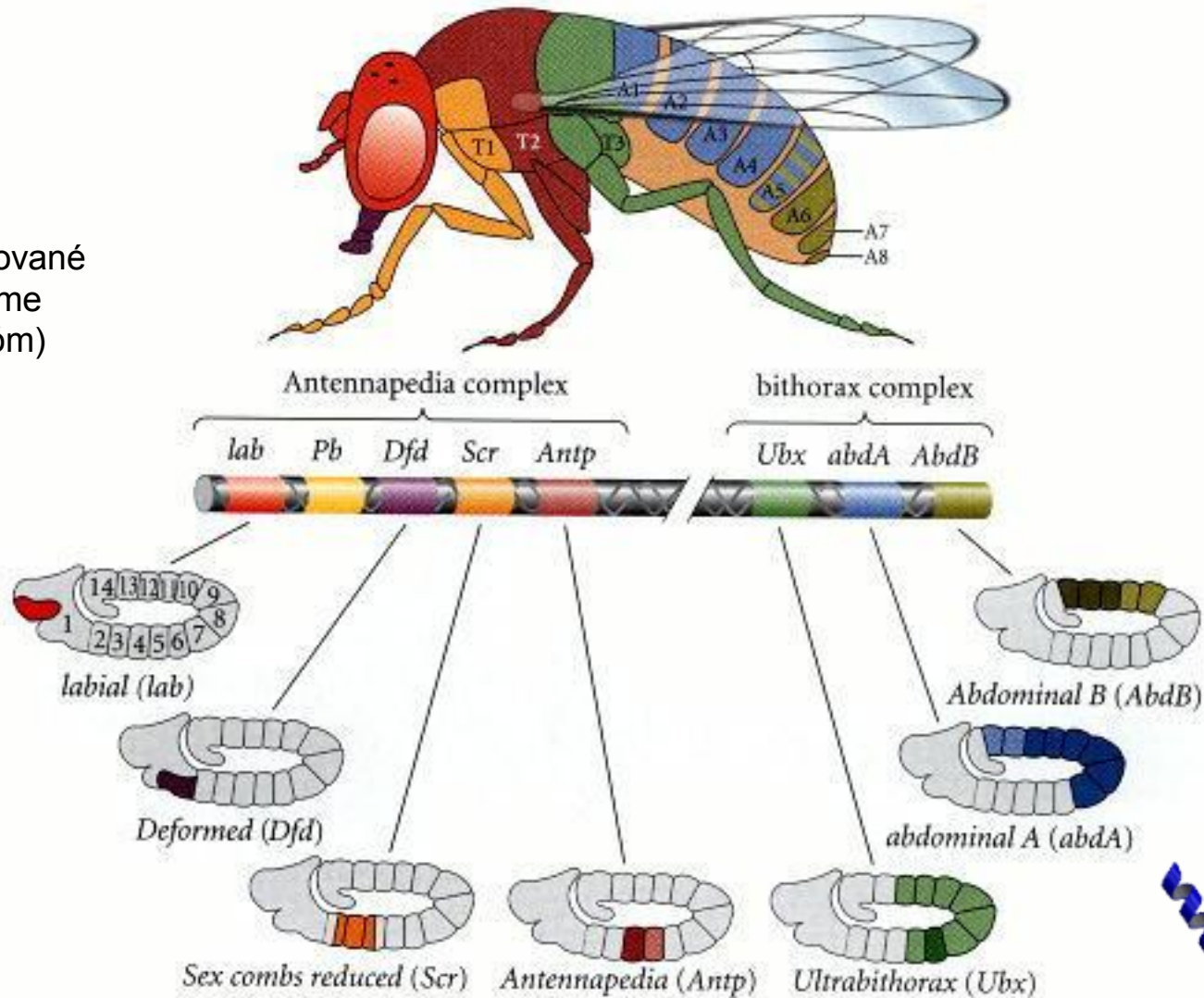
Antennapedia

transformácia segmentu na iný segment

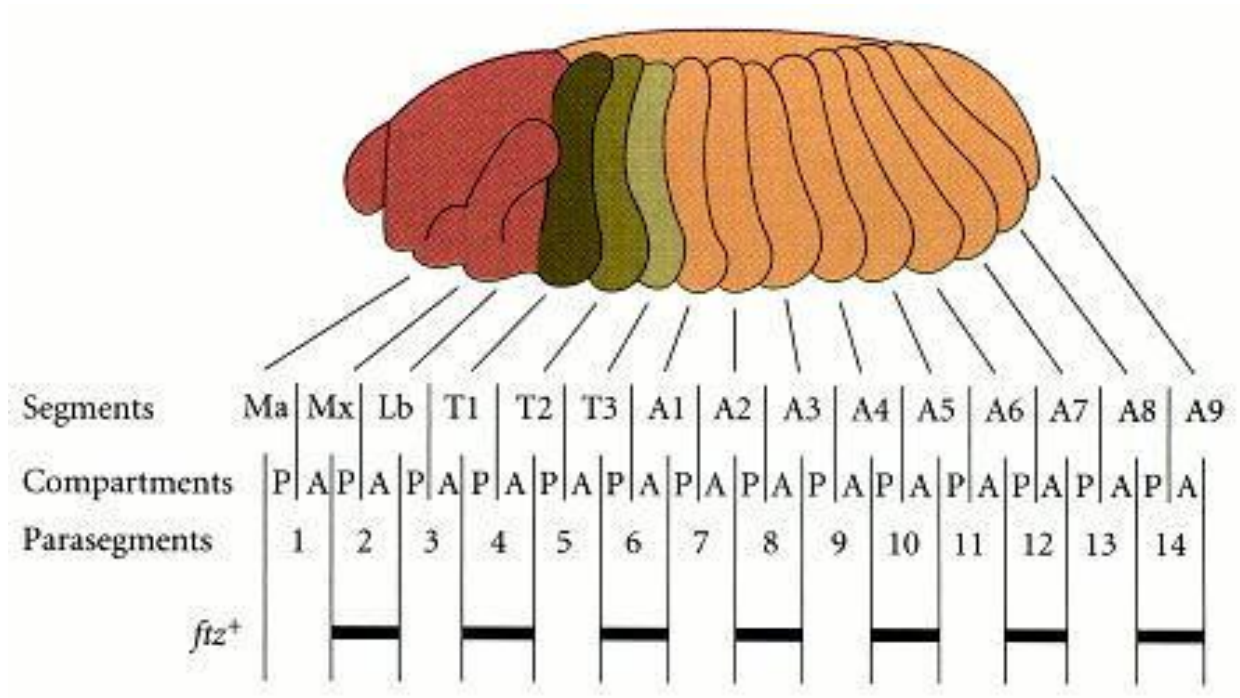
Homeotické gény – riadené segmentačnými génmi

# Homeotické gény

Gény lokalizované  
na 1 autozóme  
(3. chromozóm)



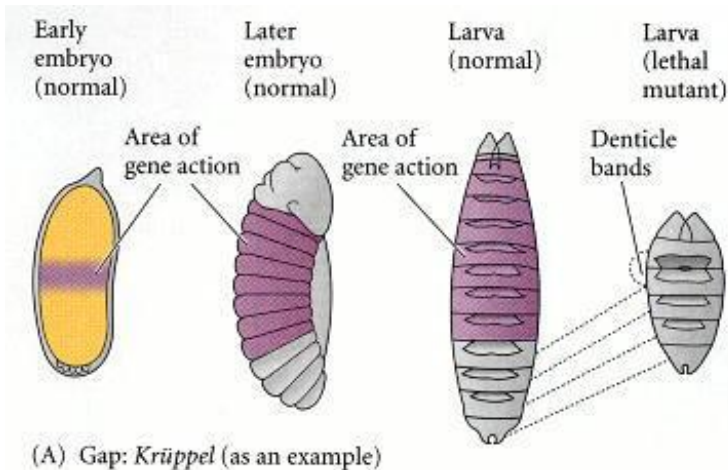
# Segmentácia embrya



Homeotické gény – kontrolované segmentačnými génmi



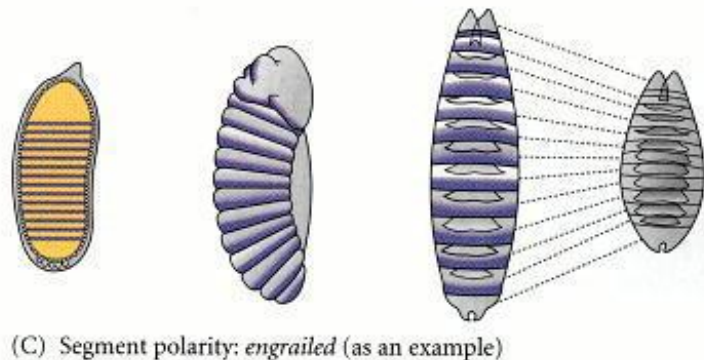
# Segmentačné gény



**Gény veľkých medzier** – určujú segmentačné oblasti embrya  
*Krüppel, giant, hunchback, knirps*

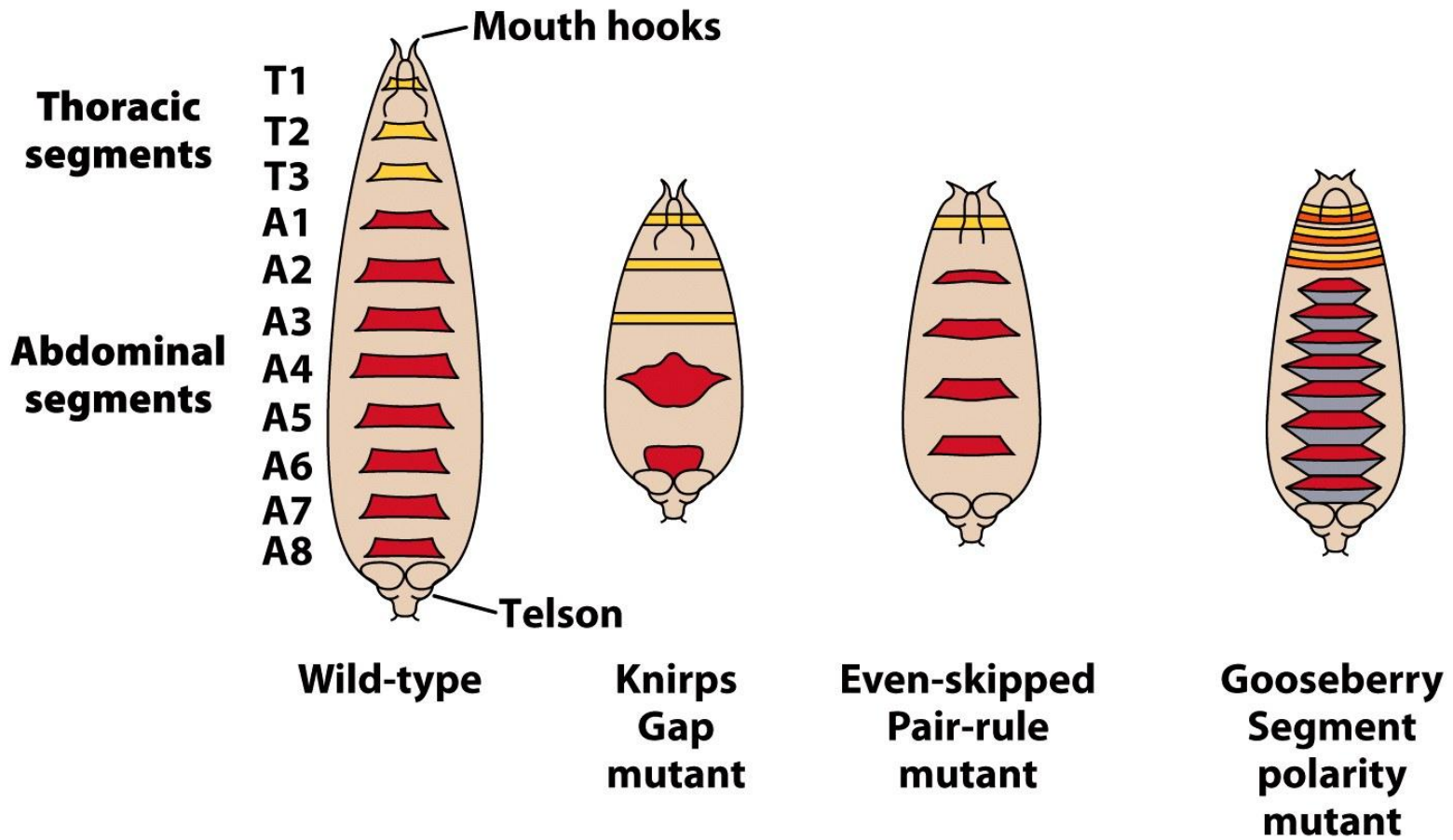


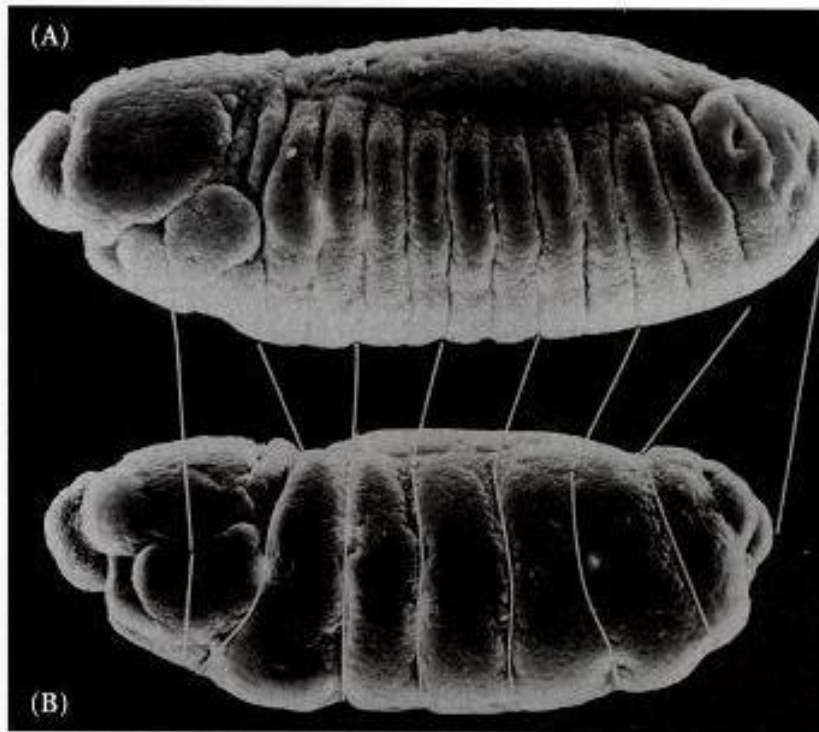
**Gény párového pravidla** – určujú usporiadanie článkov vnútri embrya.  
Rozdelenie embrya na parasegmenty.  
*fushi tarazu, even-skipped*



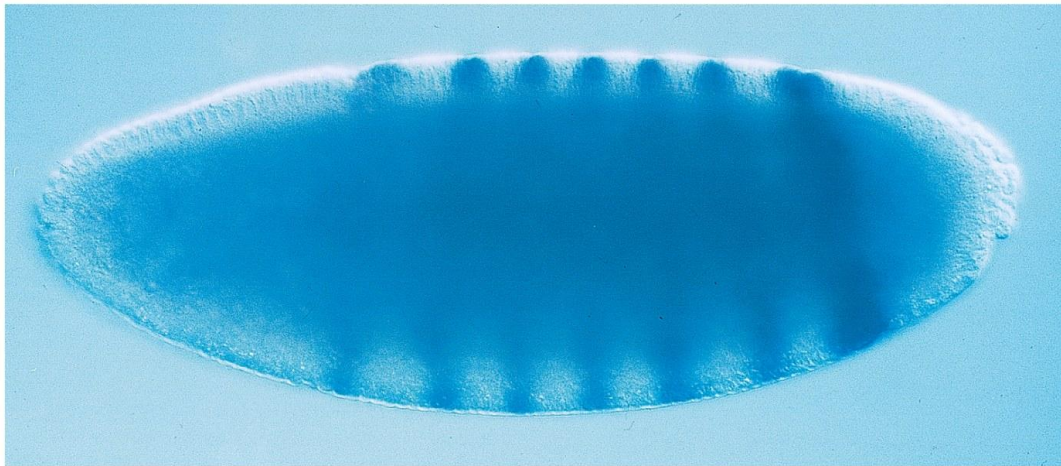
**Gény polarity segmentov** – určujú anteriórne a posteriórne časti telových článkov.  
*engrailed, wingless*





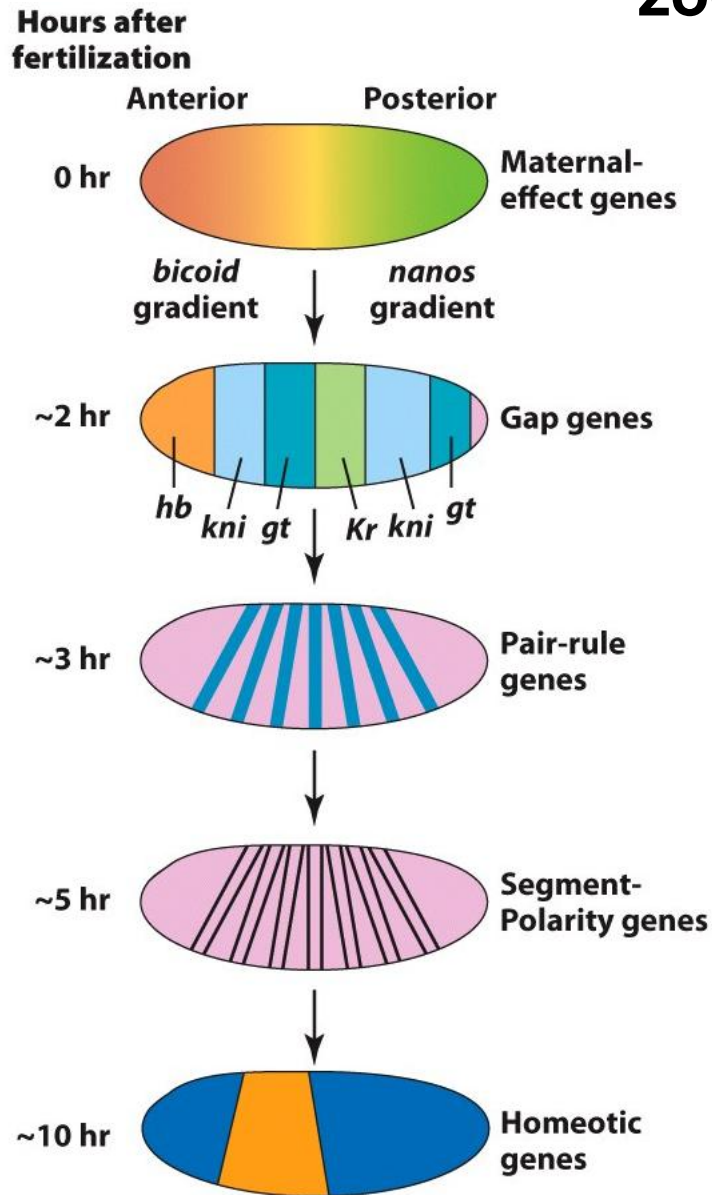


fushi tarazu



**0.1 mm**

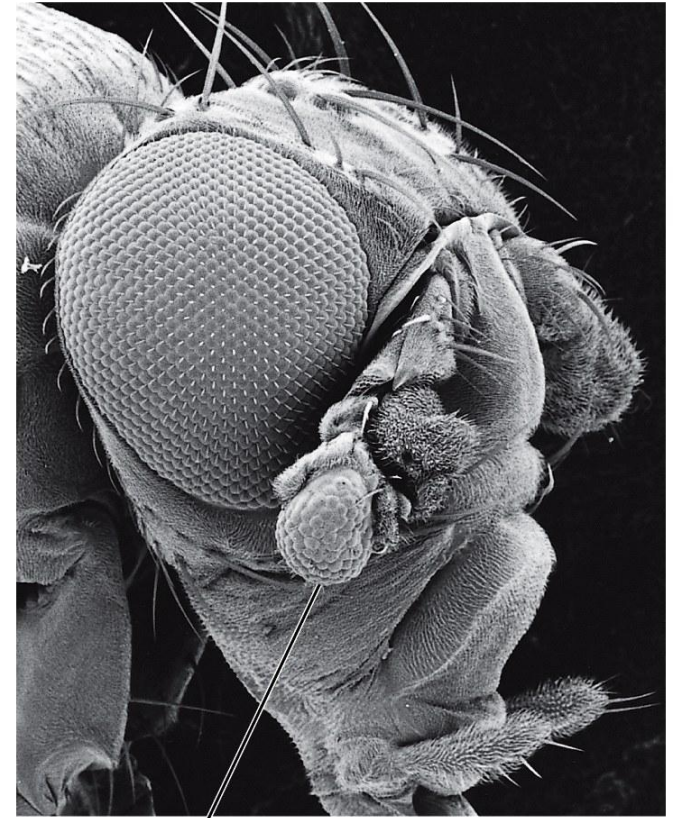
# Kaskáda expresie génov zodpovedných za segmentáciu embrya



# Vznik orgánov



Mutácia  
Ektopická expresia



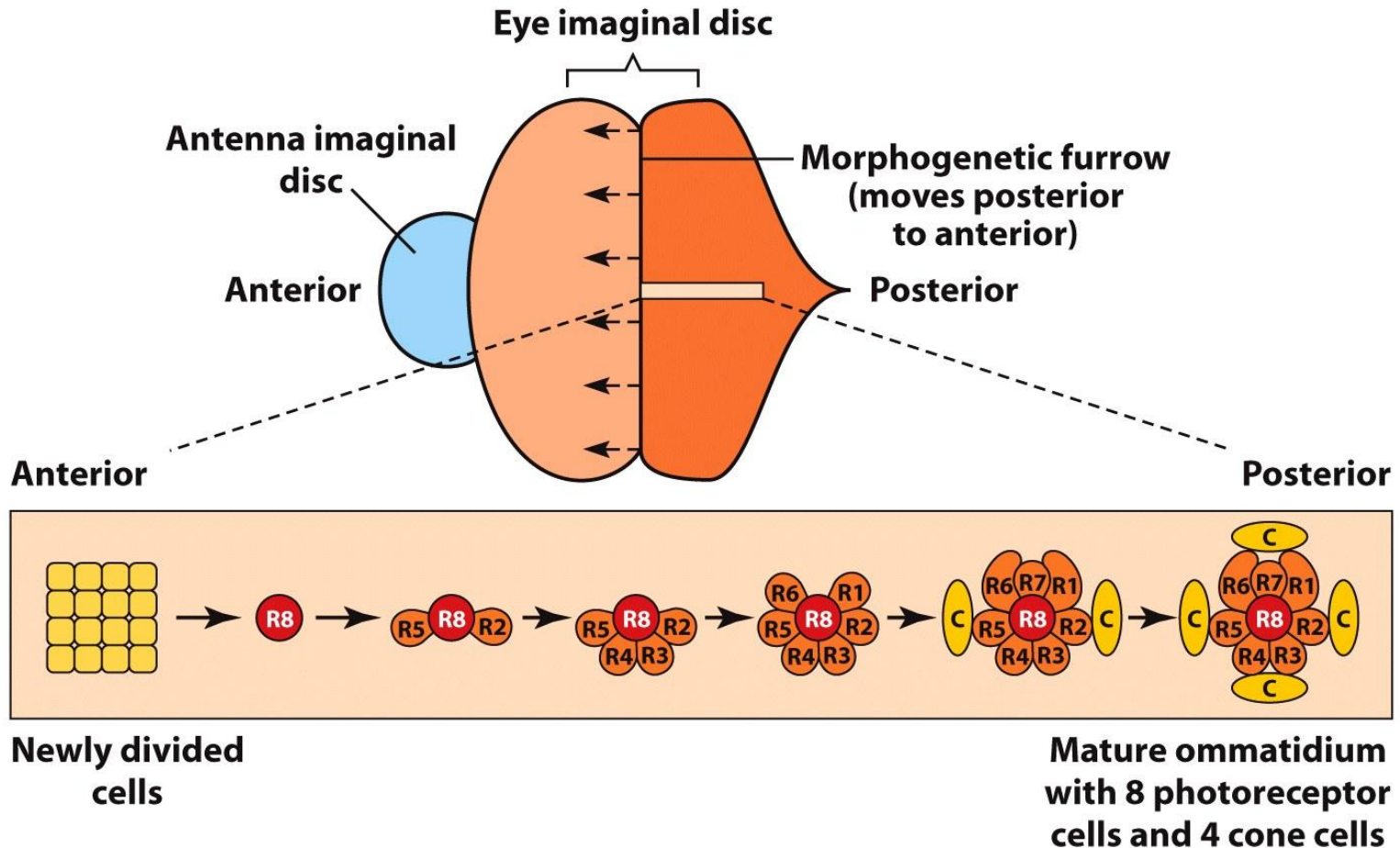
**Extra eye**

eyeless – homeodoménový TF

Pax6 – cicavčí homológ

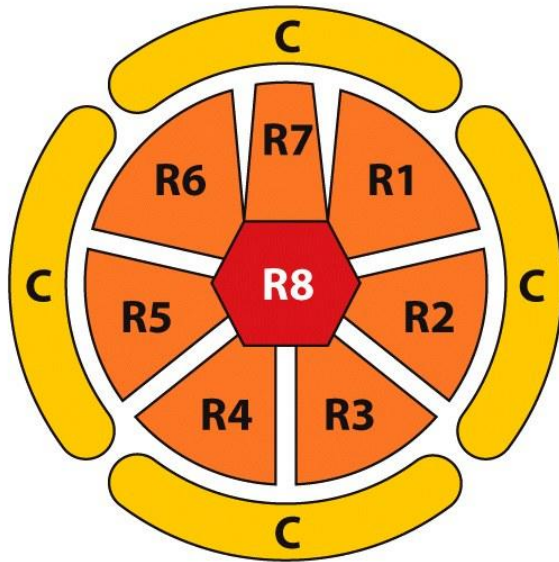


# Diferenciácia buniek oka *D. melanogaster*



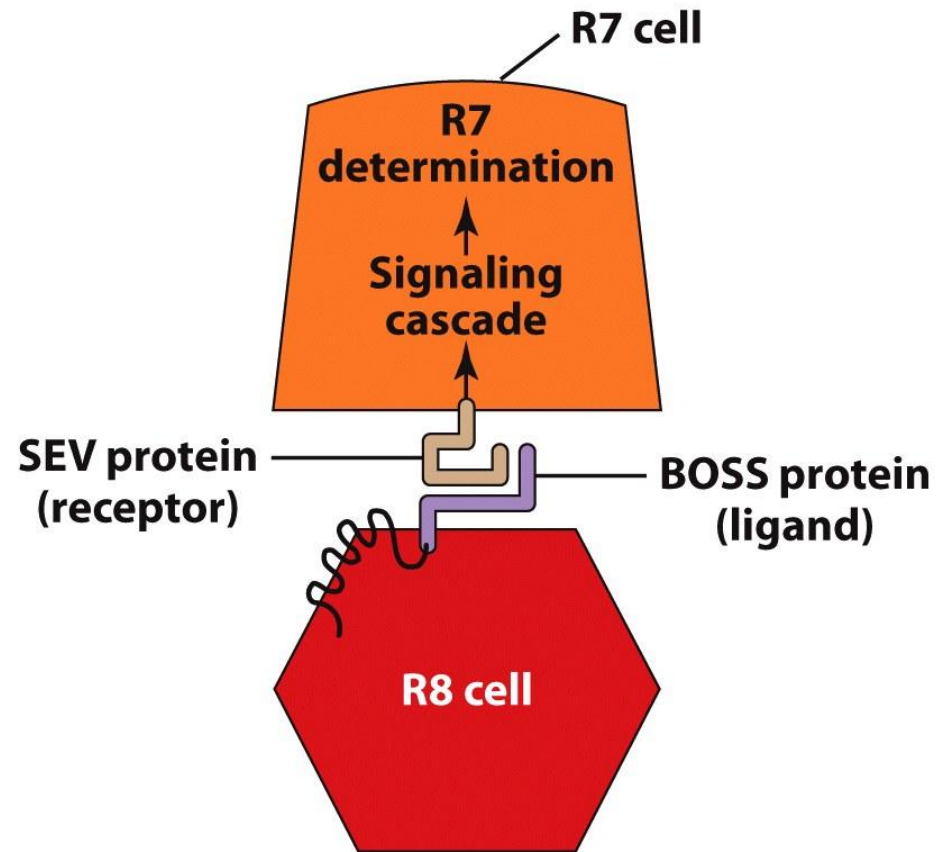
800 faciet – 1 faceta = 20 buniek → 8 fotoreceptorových neurónov  
 4 čapíkové bunky  
 6 ochranných buniek  
 2 bunky – senzorické vlásky na povrchu oka

# Determinácia fotoreceptora R7



(a)

sevenless – tyrozínkináza



(b)

**indukcia** – proces determinujúci osud nediferencovanej bunky signálom z diferencovanej bunky

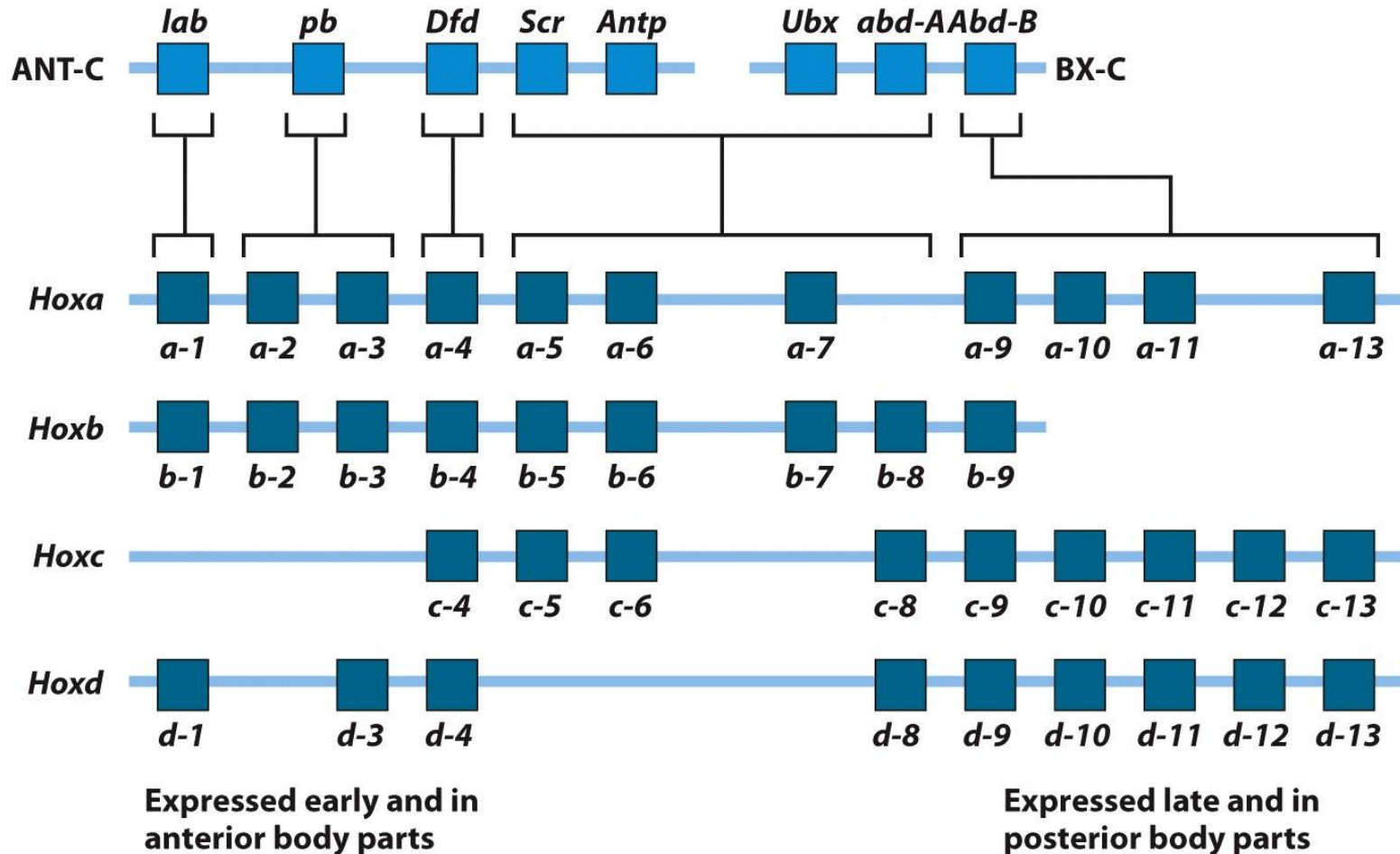


# Genetická analýza vývoja stavovcov

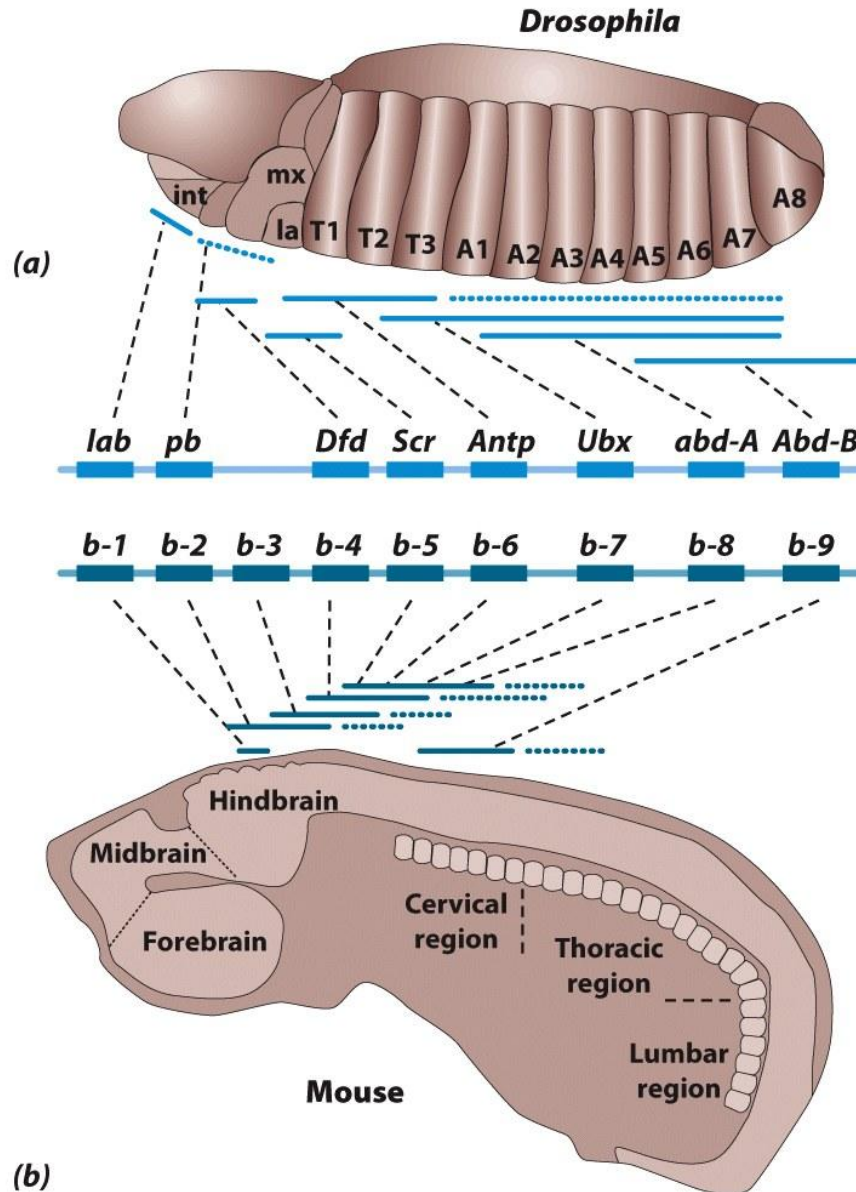
- využitie poznatkov zo štúdia bezstavovcov
- hľadanie homologických génov
- evolučná konzervovanosť
- Hox gény – homológy homeotických génov drozofily (Southern hybridizácia)
- 38 Hox génov v 4 zhľukoch (a, b, c, d) (120 kb)
- každý zhľuk je umiestený na inom chromozóme
- kvadruplikácia pred 500-600 miliónmi rokov

# Genetická analýza vývoja stavovcov

## Cicavčie Hox gény



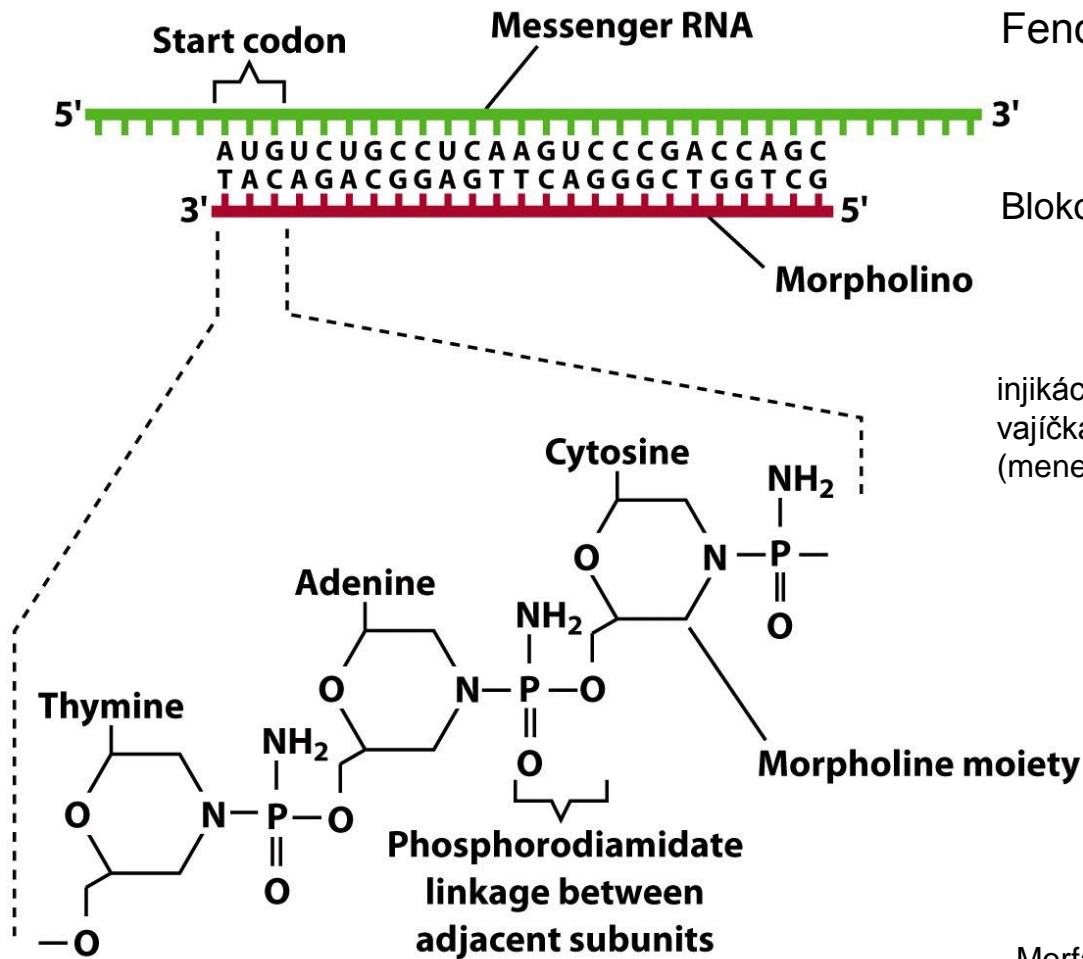
# Poradie expresie homeotických génov drozofily a myši



kolinearita

„Knokaut“ mutácie u myší

# Danio rerio morfolino mutanty



Fenokópie mutantného fenotypu

Blokovanie alebo zoslabenie expresie

injikácia < 10ng morfolina do žltka oplodneného  
vajčka alebo skorého embrya  
(menej ako 16 buniek)

Morfant – morfolinom indukovaný fenotyp

# Cicavčie kmeňové bunky

- Totipotencia – schopnosť bunky deliť sa a diferencovať na všetky typy buniek (zygota)
- Pluripotencia – schopnosť bunky diferencovať sa na každú z 3 zárodočných vrstiev (endoderm, mezoderm, ektoderm)
- Multipotencia – schopnosť bunky diferencovať sa na viacero typov bunkových línií (hematopoetické bunky), ale limitovaného množstva línií
- Oligopotencia - schopnosť bunky diferencovať sa len na niekoľko bunkových typov (lymfoidné, myeloidné kmeňové bunky)
- Unipotencia – schopnosť diferencovať sa len na jeden bunkový typ (hepatocyty)

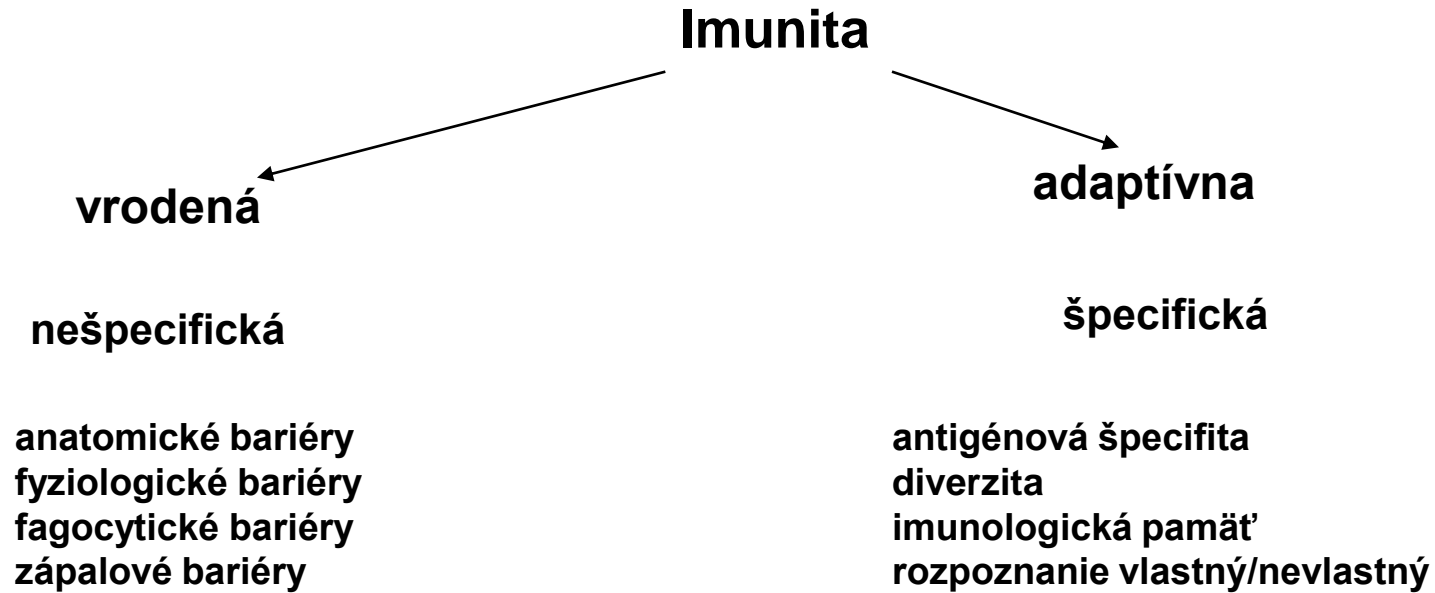
## Kmeňové bunky dospelého jedinca

## Embryonálne kmeňové bunky

štúdium génov zapojených do bunkovej diferenciácie  
embryoidné telieska

**terapeutické klonovanie vs reprodukčné klonovanie**

# Diferenciácia buniek imunitného systému stavovcov





# Genetické zmeny v diferenciácii imunitných buniek stavovcov

väčšina buniek – identický obsah DNA, výnimka – bunky imunitného systému

2 významné skupiny buniek imunitného systému:

B lymfocyty – produkcia imunoglobulínov (protilátok)

T lymfocyty – tvoria proteíny s reaktívnym povrchom, pôsobia ako receptory pre rôzne substráty

**Rozpoznávanie antigénu (cudzorodej molekuly)**

T-bunkové receptory, protilátky – proteíny kódované génmi

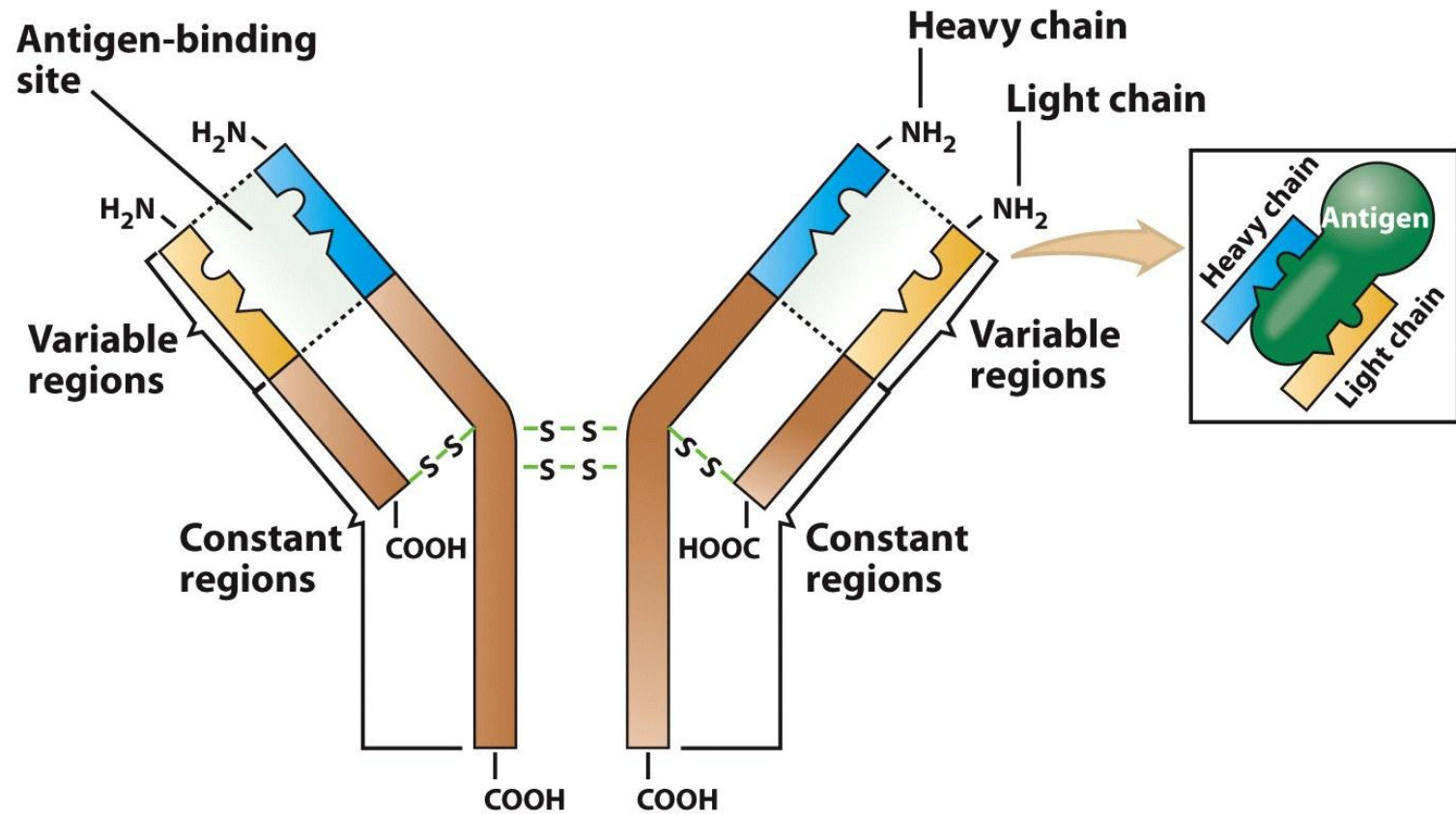
# Protilátka

- tetramér zo 4 polypeptidov , 2 identické ľahké a 2 identické ťažké reťazce
- ľahký reťazec 220 aa, ťažký reťazec 445 aa
- N-koncová variabilná oblasť
- C-koncová koštantná oblasť
  
- ľahký reťazec 2 lokusy – kappa ( $\kappa$ ) (2.crm) a lambda ( $\lambda$ ) (22.crm)
- ťažký reťazec 1 lokus (14. crm)
  
- každý lokus má zložito usporiadané génové segmenty

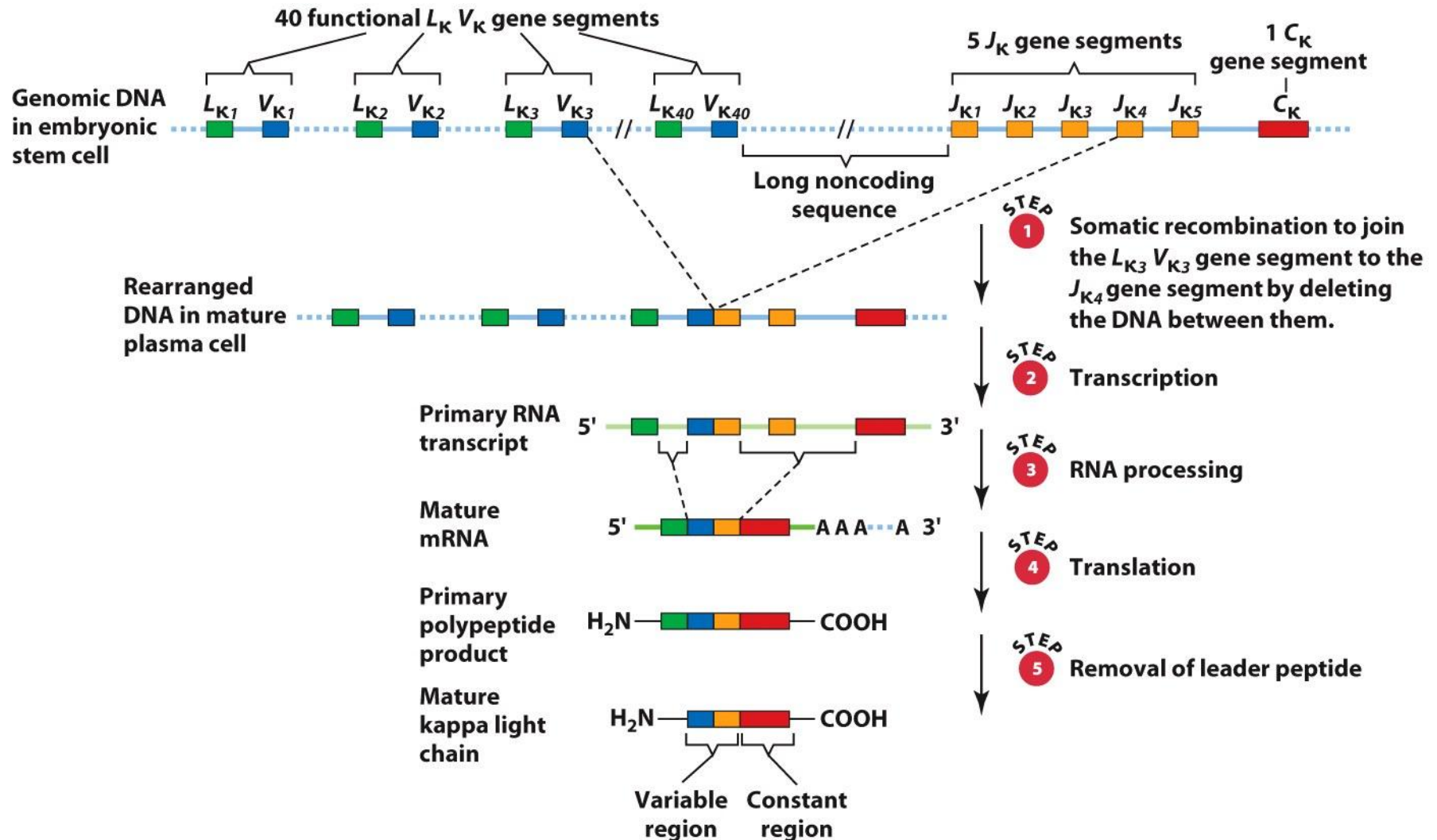
Príklad: kappa lokus

- Génový segment  $L_{\kappa}V_{\kappa}$  kóduje zavádzací peptid a (95aa) N-variabilnej oblasti (76 génových segmentov, 40 funkčných)
- Génový segment  $J_{\kappa}$  kóduje posledných 13 aa variabilnej oblasti (5 génových segmentov)
- Génový segment  $C_{\kappa}$  kóduje konštantnú oblasť (1 génový segment)
  
- proces rekombinácie génových segmentov umožňuje vytvárať 2 112 000 rôznych protilátok

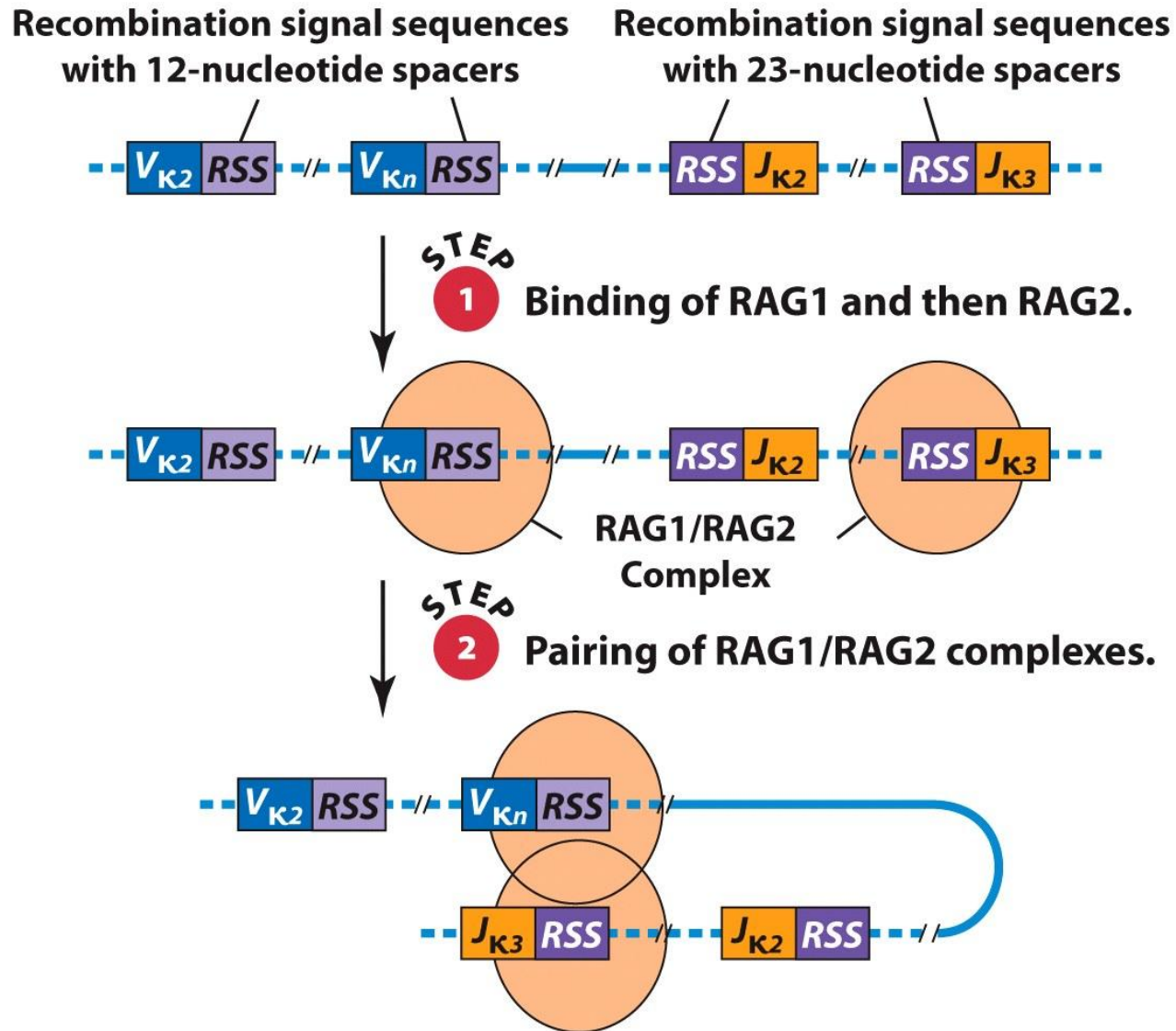
# Štruktúra molekuly protilátky



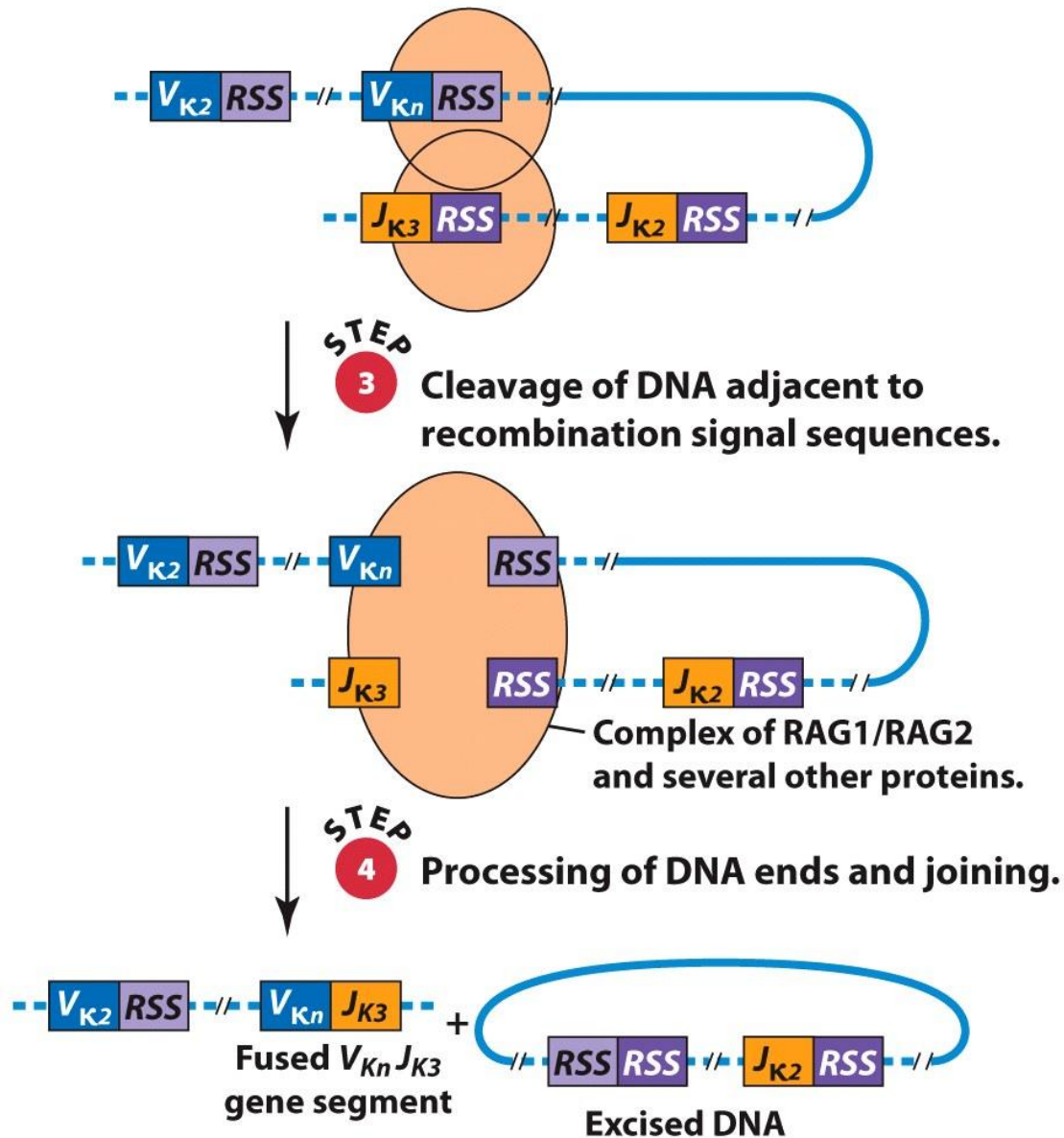
# Genetické riadenie tvorby ľahkých reťazcov



# Zjednodušený model spájania $V_K$ - $J_K$ segmentov



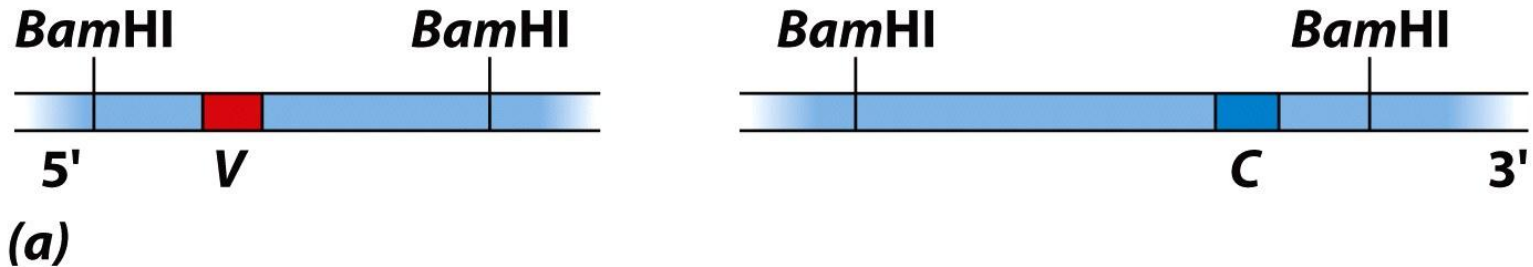
# Zjednodušený model spájania $V_K$ - $J_K$ segmentov





# Dôkaz DNA prestavby počas diferenciácie buniek imunitného systému

## DNA from embryo cells



## DNA from antibody-producing cell

