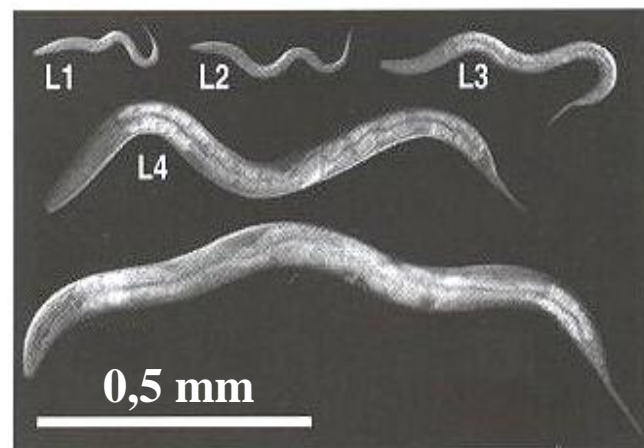
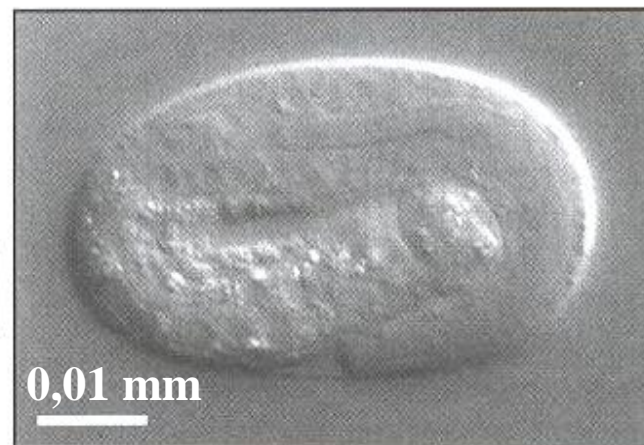
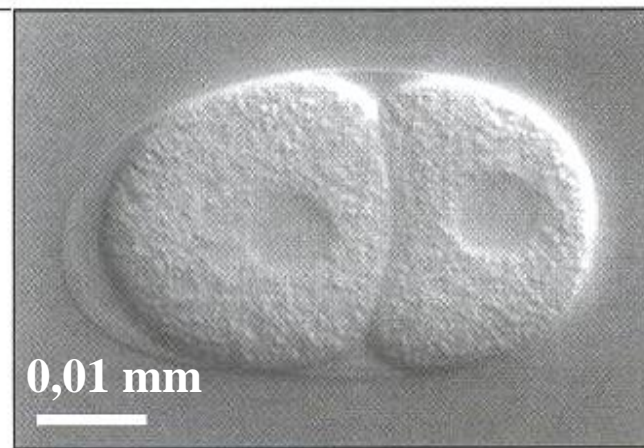
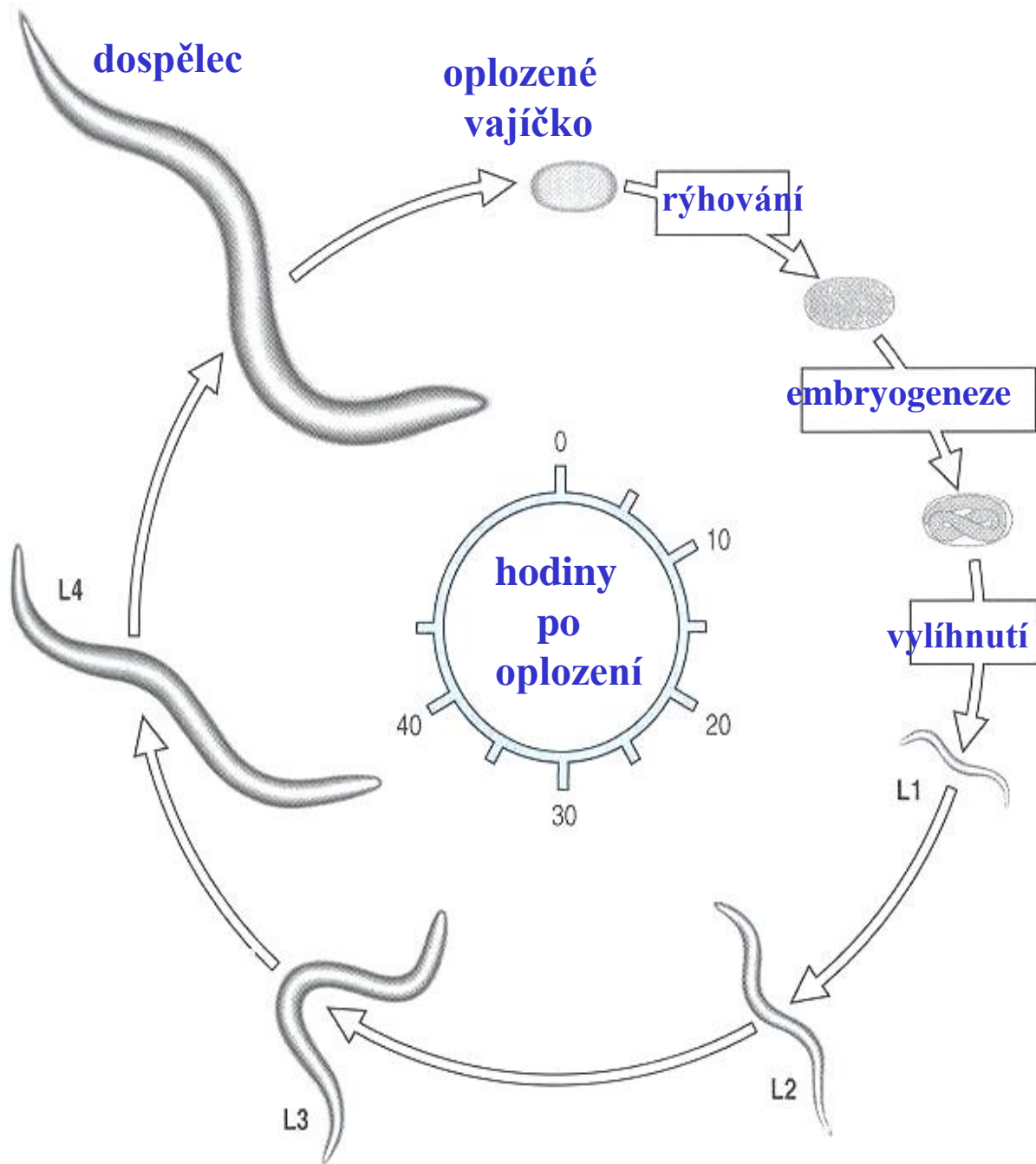


... v hlavní roli červi:

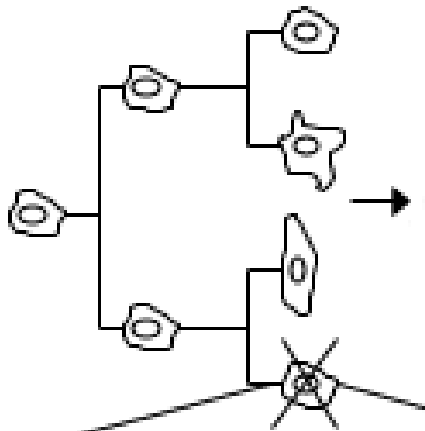
hlístice



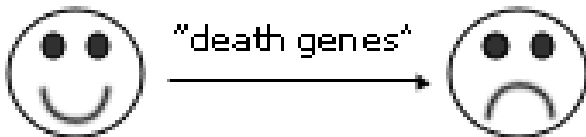
Nobelova cena 2002 za fyziologii a lékařství

za objevy genetické regulace
orgánového vývoje
a programované buněčné smrti
... na modelu *Caenorhabditis elegans*

Cell lineage (1090 cells)

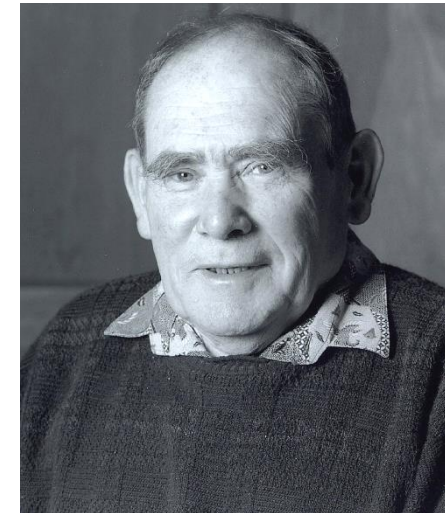


Programmed cell death (131 cells)



living cell

dead cell



Sydney Brenner
(1927, JAR)

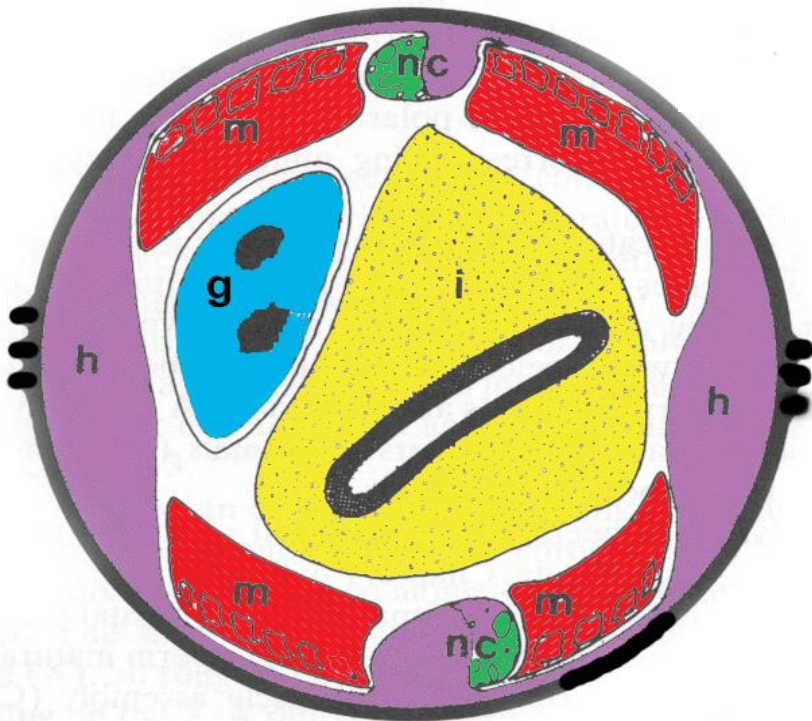
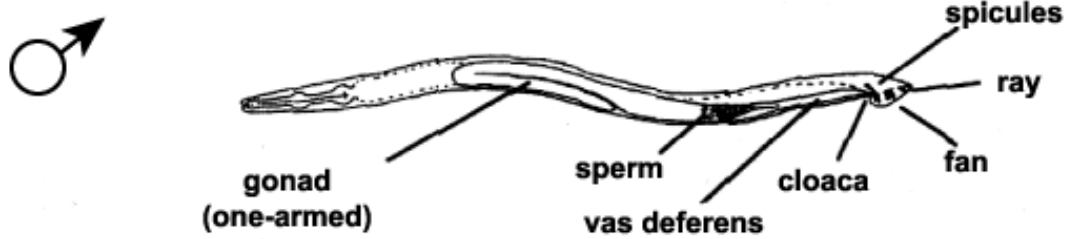
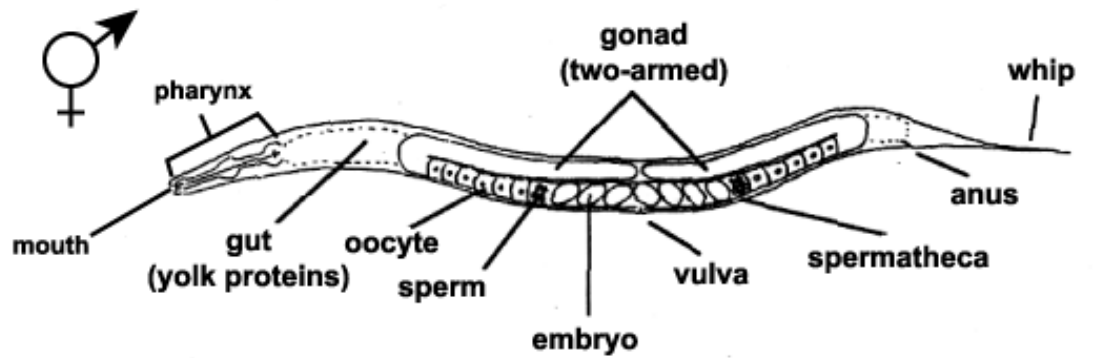


John Sulston
(1942, UK)



Robert Horvitz
(1947, USA)

Anatomie *C. elegans*



g – gonáda



h – hypodermis

i – střevo

m – svaly

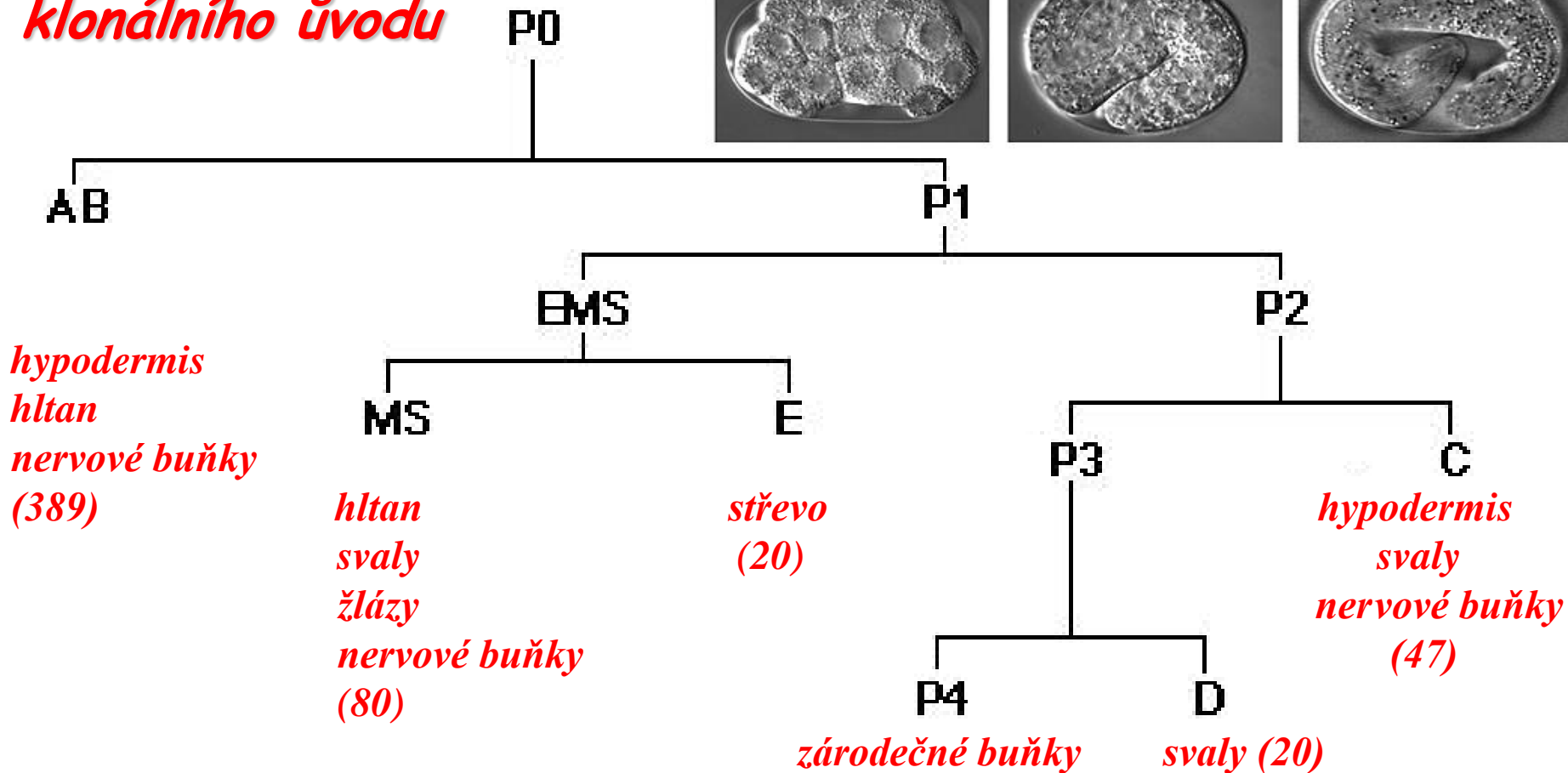
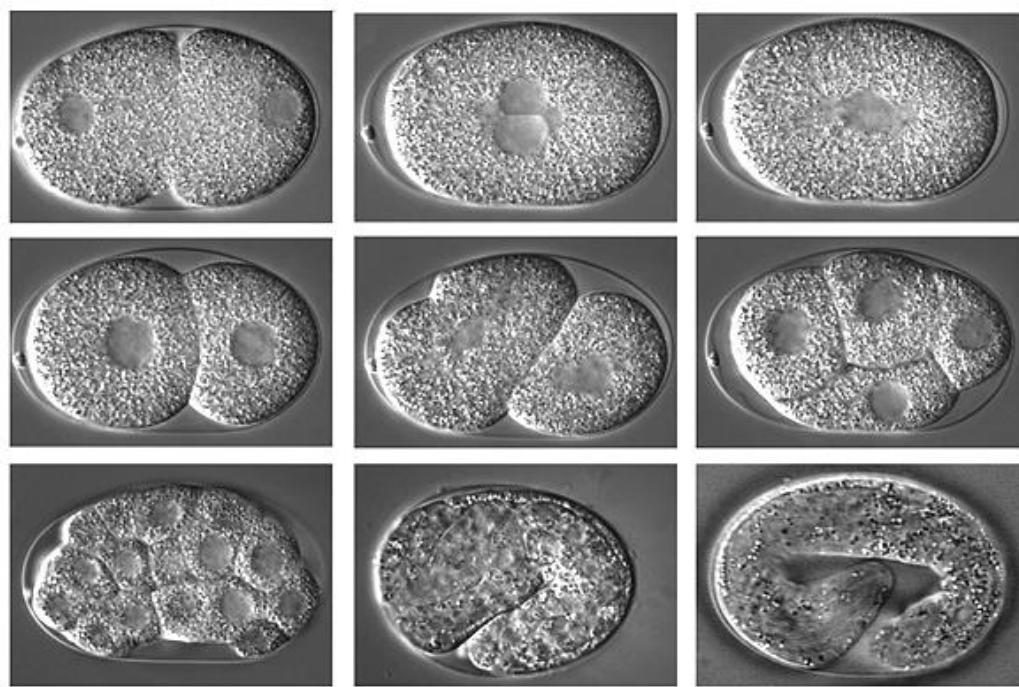
nc – nervová trubice

Osm dobrých důvodů, proč studovat *C. elegans* – model mozaikového vývoje

1. malá, snadno se kultivuje (živí se *E. coli*)
2. jednoduché tělo: 959 tělních buněk , 1031 u 
3. dobře diferencované tkáně včetně nervové soustavy
4. průhledné tělo po celý životní cyklus
5. krátká generační doba: 3,5 dne při 20°C
6. invariantní vývoj a anatomie
7. samooplození (a částečně křížitelná)
8. malý, již sekvencovaný genom
($\sim 10^8$ bp = 100 Mb = 0,1 pg)

Buněčná genealogie *C-elegans*

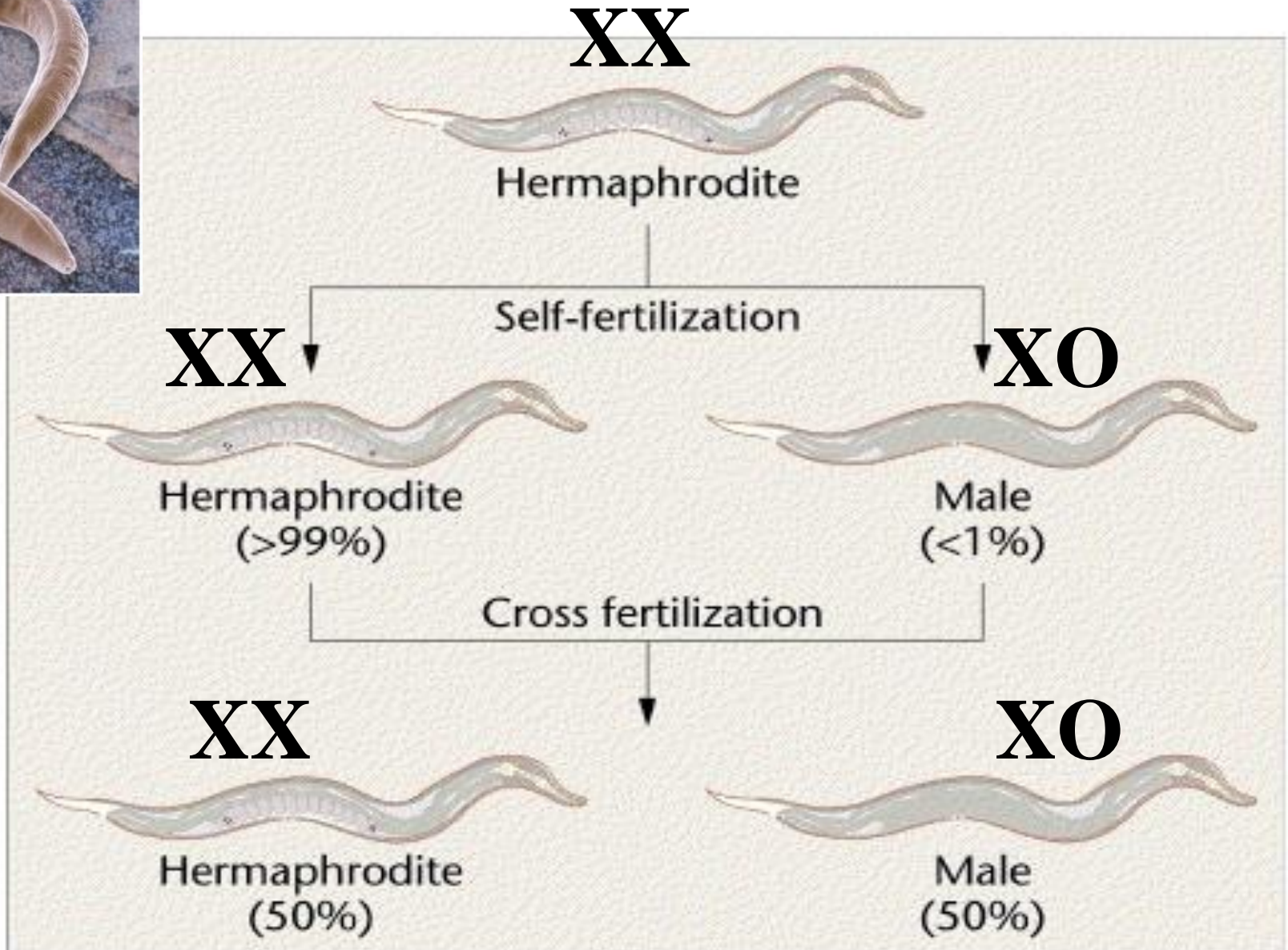
tkáně jsou polyklonálního úvodu



Základní genetická charakteristika *C. elegans*

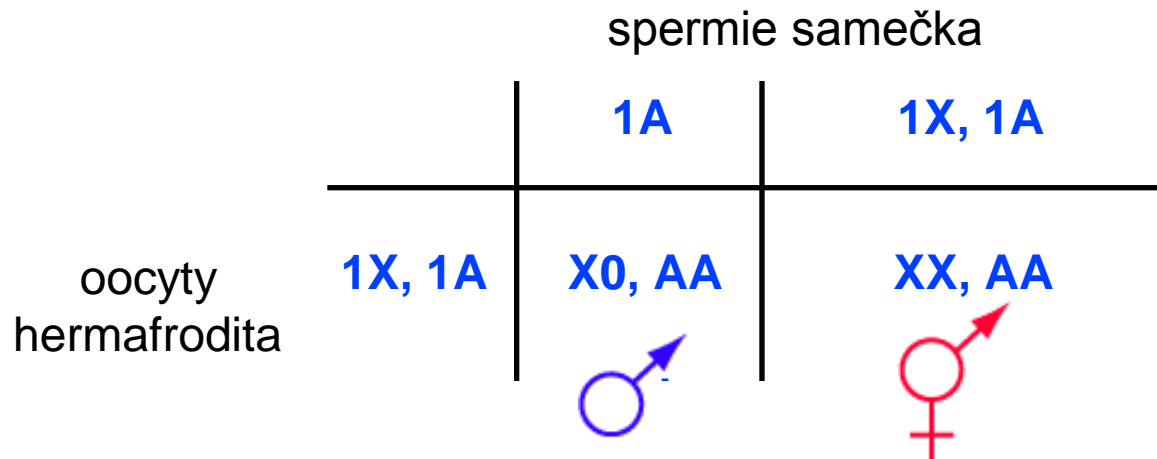
- základní životní cyklus je diploidní
- 6 vazebných skupin, odpovídá to 6 chromosomům
v haploidní sadě: 5 autosomů a 1 pohlavní chromosom X
- hermafrodit má dva chromosomy X v diploidní buňce
- hermafrodit tvoří ~ 300 spermií, pak tvoří oocyty
- meiosa u hermafrodita vytváří gamety s jednou sadou
autosomů a jedním X
- samooplození obvykle dává vznik embryu $2 X : 2 A =$
hermafroditu

Caenorhabditis elegans : vznik a dědičnost pohlaví



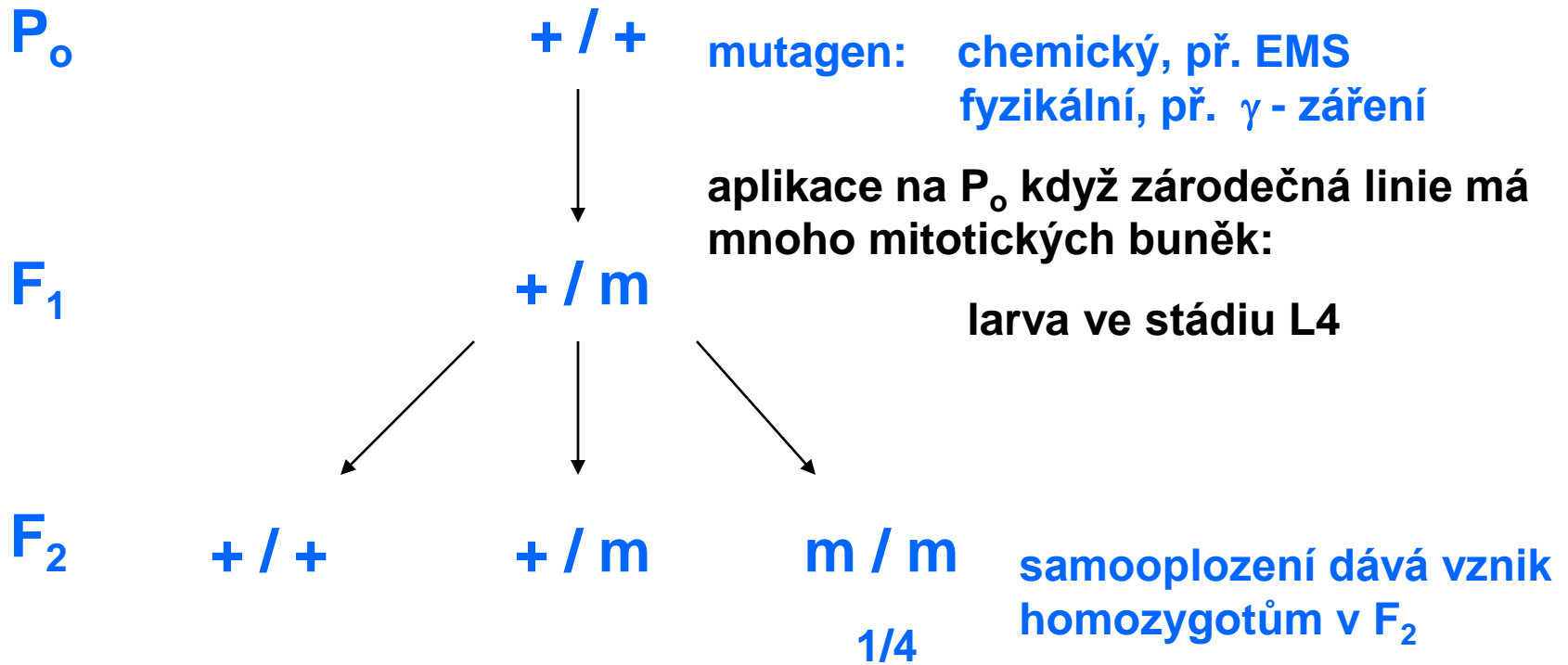
Pro genetiku jsou potřební samečci

- Příležitostná ztráta chromosomu X v průběhu meiosis u hermafrodita dává gamety bez X. Frekvence asi 1 na 500 meios. Když je gameta oplozena, výsledkem je diploidní živočich pouze s 1 X.
- Jedinec červa pouze s jedním chromosomem X v diploidní buňce se vyvíjí jako sameček.
- Žádný chromosom Y u *C. elegans* není, samečka značíme XO.
- V meiose u samečka segreguje jediný chromosom X a tvoří se dva druhy spermií: s jedním chromosomem X resp. žádným:



- Křížení samečka s hermafroditem dává v potomstvu stejné počty sameček a hermafroditů.

Mutagenеза *C. elegans*



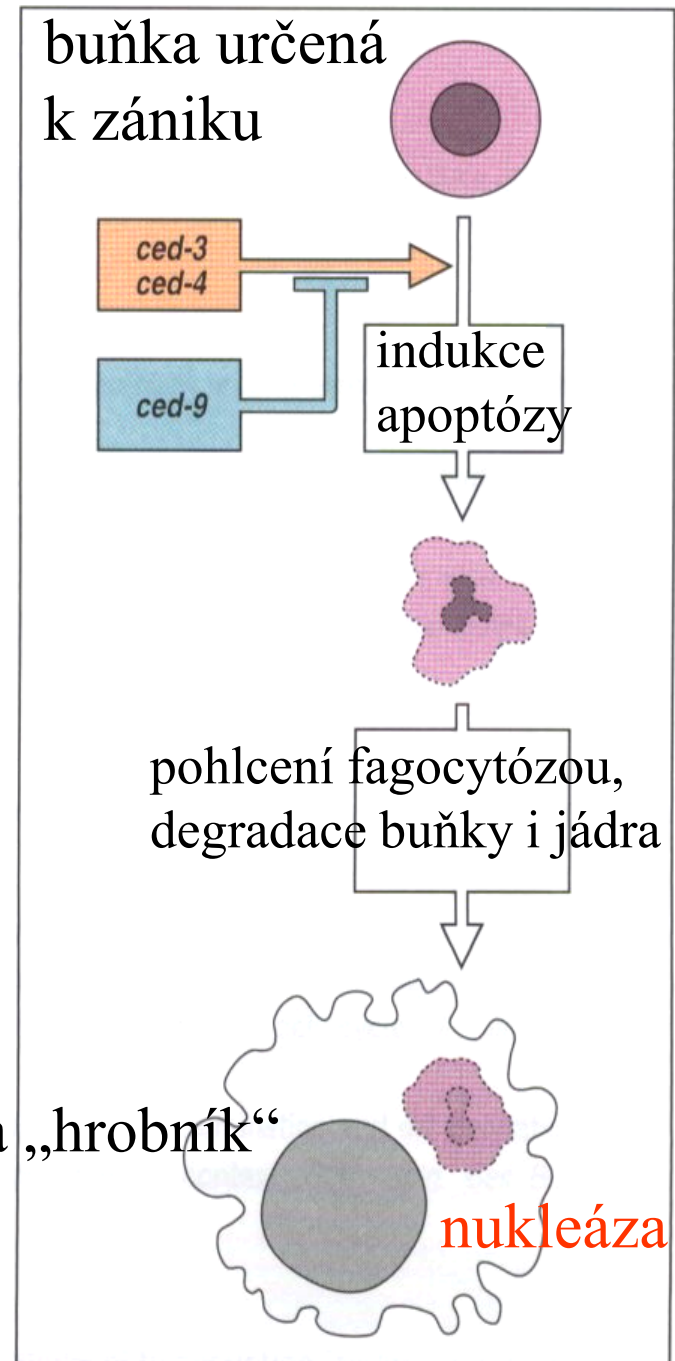
Účinek genů řídících
programovanou
buněčnou smrt
u hlístice :

geny cell death *ced-3* a *ced-4*
(produkující cytotoxiny)
jsou řízeny (inhibovány)
genem *ced-9*

- jestliže je tento gen aktivní,
buňka se nepodrobí apoptóze

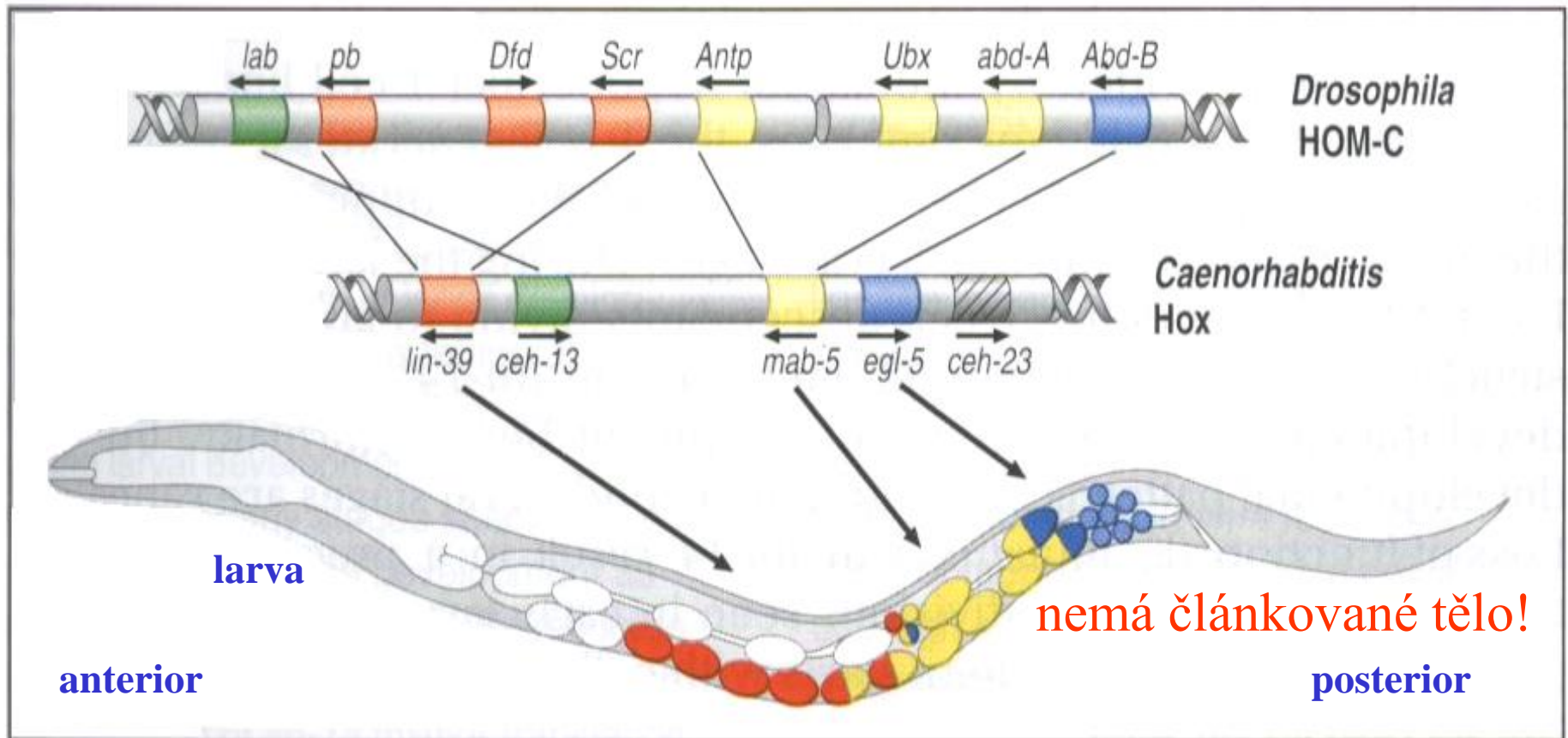
buňka „hrobník“

nukleáza



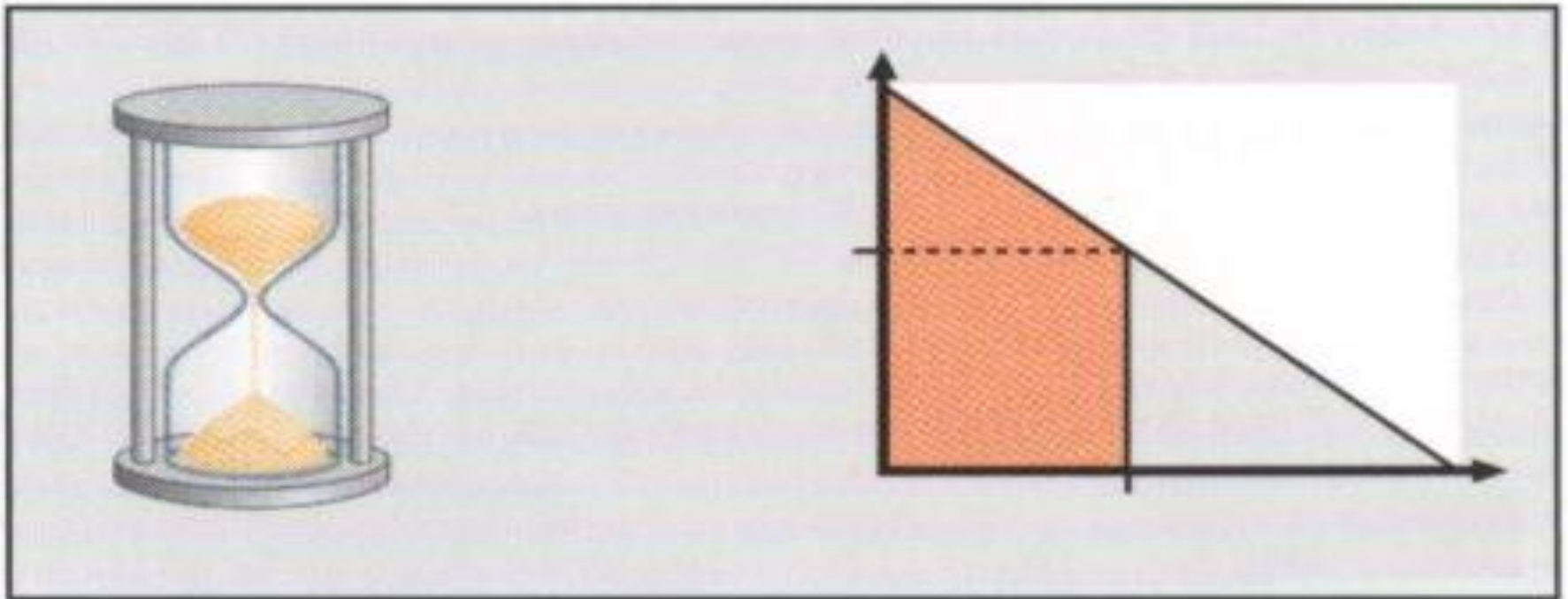
Buněčný osud hlístice podél antero-posteriorní osy je určován jediným (kolineárním) shlukem *Hox* genů

- s homologiemi ke čtyřem homeotickým genům z komplexu *Antennapedia* mouchy



Časování vývojových procesů,
zapínání a vypínání genů v závislosti
na koncentraci a čase, prahové hodnoty

HETEROCHRONNÍ GENY



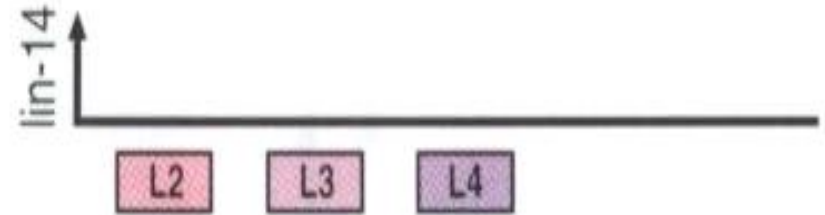
HETEROCHRONNÍ MUTACE

model řízení časového vývoje larvy C-elegans

specifická stádia larválního vývoje jsou určována hladinou proteinu lin-14

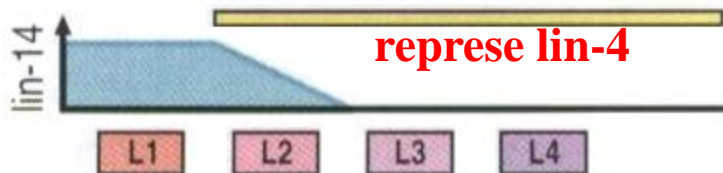


lin-14 mutace, „ztráta“ funkce

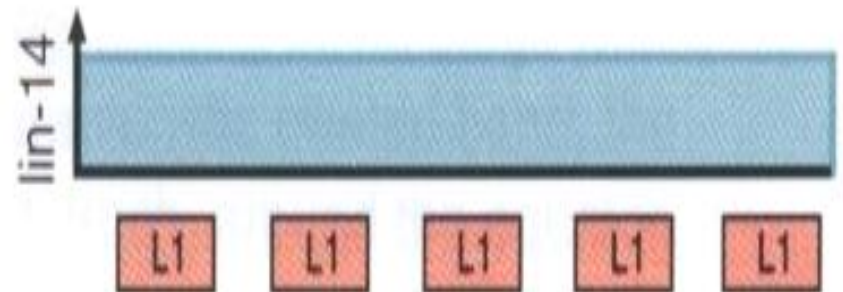


časový gradient lin-14 je výsledkem transkripční represe lin-14 proteinem lin-4, začínající při časném vývoji larvy

standardní typ



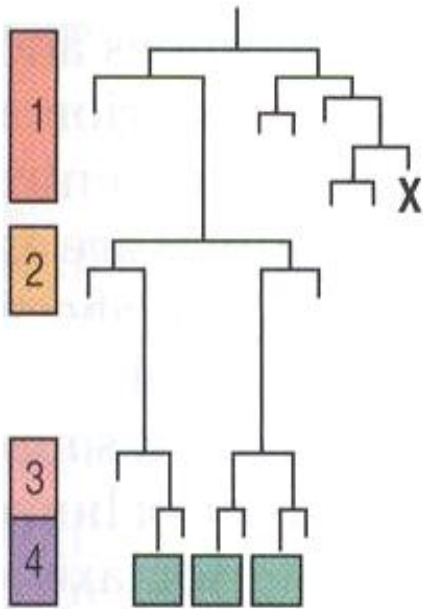
lin-14 mutace, „získání“ funkce, nebo „ztráta“ lin-4 funkce



Buněčná genealogie u WT a heterochronních mutantů *C-elegans*

standardní typ

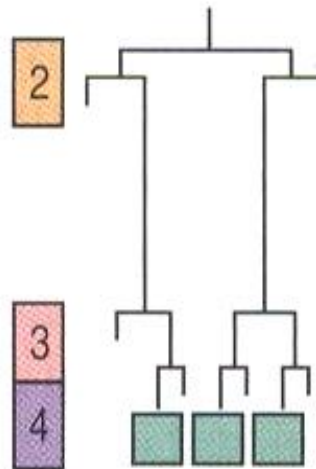
larvální stádia (1-4)



„předčasný“ mutant

lin-14 (lf)

mutace „ztráta funkce“

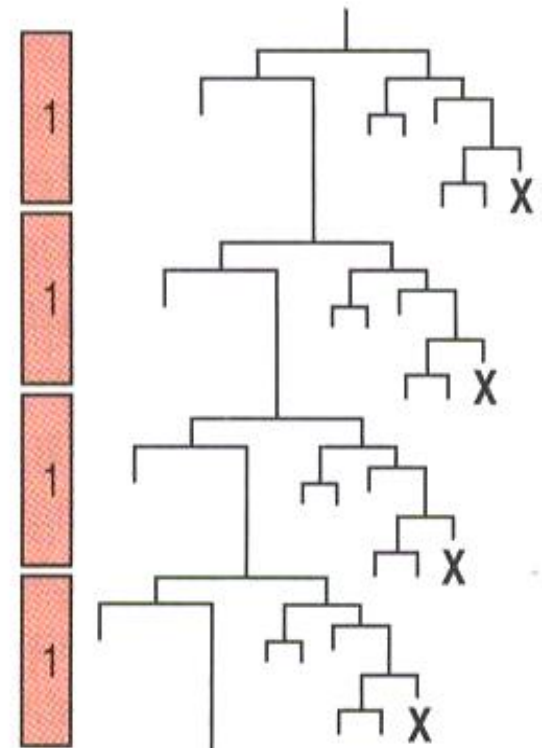


předčasná tvorba specifických linií

„opožděný“ mutant

ln-14 (gf)

mutace „získání“ funkce

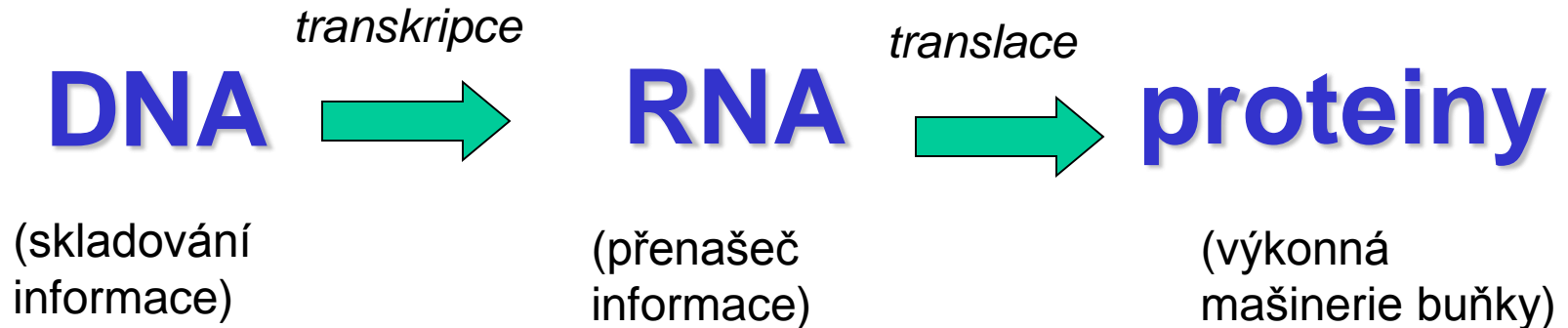


retardace vývoje linií, opakování vývojových typů

klíč :  =  X = buněčná smrt

Centrální dogma molekulární biologie

(Francis Crick)



Tento model má přinejmenším dva nedostatky :

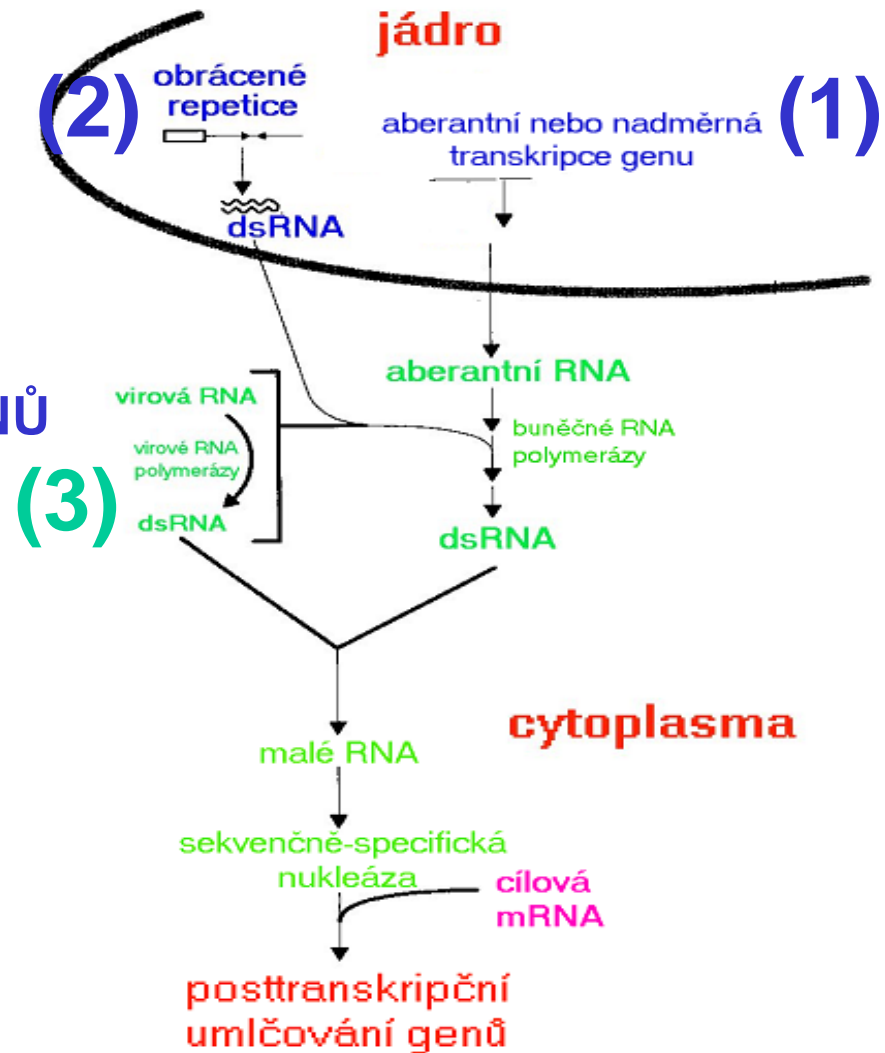
- nebere v úvahu mnoho faktorů, které modifikují genovou aktivitu v průběhu transkripce a translace

- DNA a RNA nejsou jedinými skladníky a přenašeči informace

2006: NOBELOVA CENA ZA FYSIOLOGII A LÉKAŘSTVÍ SELEKTIVNÍ UMLČOVÁNÍ GENŮ PROSTŘEDNICTVÍM RNA INTERFERENCE



Craig Mello, Andrew Fire
(Carnegie Institution 1998)



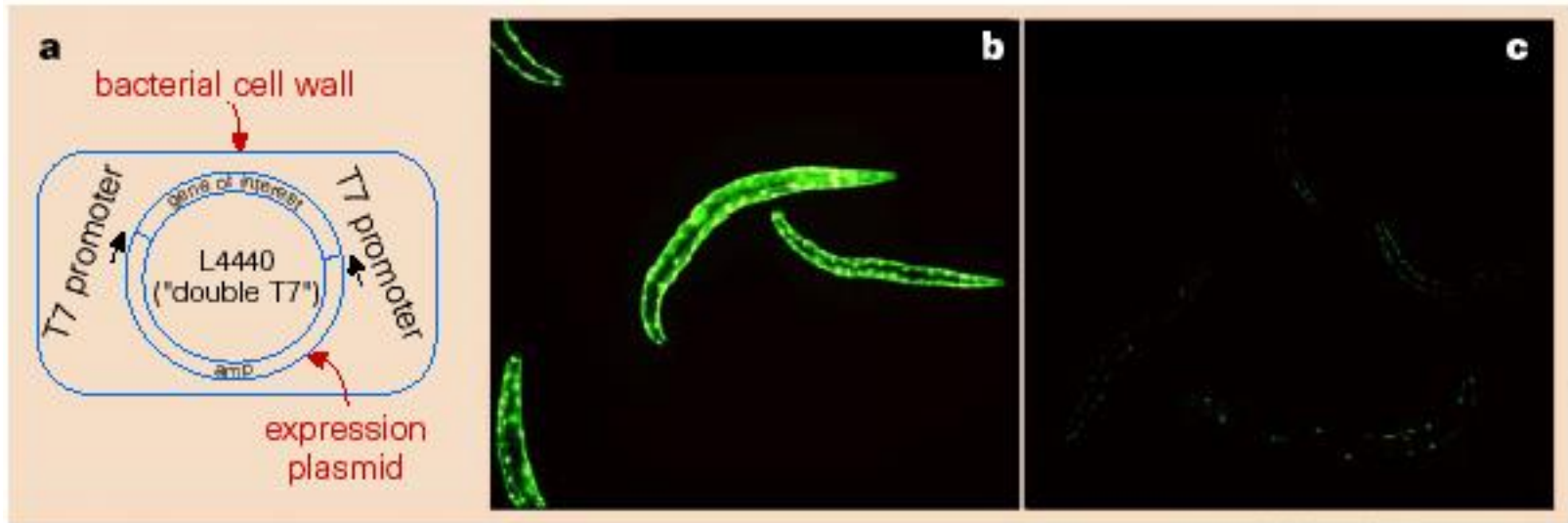
-
- (i) RNA-dependentní RNA polymeráza
ss RNA → ds RNA
 - (ii) Dicer : ribonukleáza
ds RNA → malé ds RNA (~ 22 nt)
 - (iii) Argonaut (RISC) - proteiny ribonukleázového komplexu : štěpení (endogenní homologní) mRNA

RNAi by ingesting dsRNA!

Timmons and Fire - Nature 295: 854, 1998

Baktérie
exprimující
dsRNA

GFP-exprimující červi



....pojídající
standardní
baktérie

....pojídající
baktérie
exprimující
GFP dsRNA

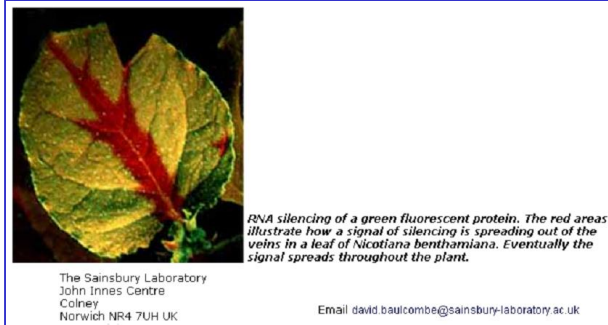
PostTranskripční genové umlčování a RNA interference - spojitost ?



**David
Baulcombe
(Norwich)**



**Marjori
Matzke
(Vienna)**



„PostTranskripční genové umlčování se vyskytuje u rostlin a hub transformovaných cizí nebo endogenní DNA a má následek v redukované akumulaci RNA molekul se sekvenční podobností k introdukované molekule nukleové kyseliny.“

Hamilton and Baulcombe, Science 286: 952, 1999

KOMPENZACE DÁVKY GENŮ VÁZANÝCH NA CHROMOZOM X

- Caenorhabditis
 - Drosophila
 - savci

KOMPENZACE DÁVKY GENŮ



Drosophila

XX

X_Y

savci

XX nebo XX

XY

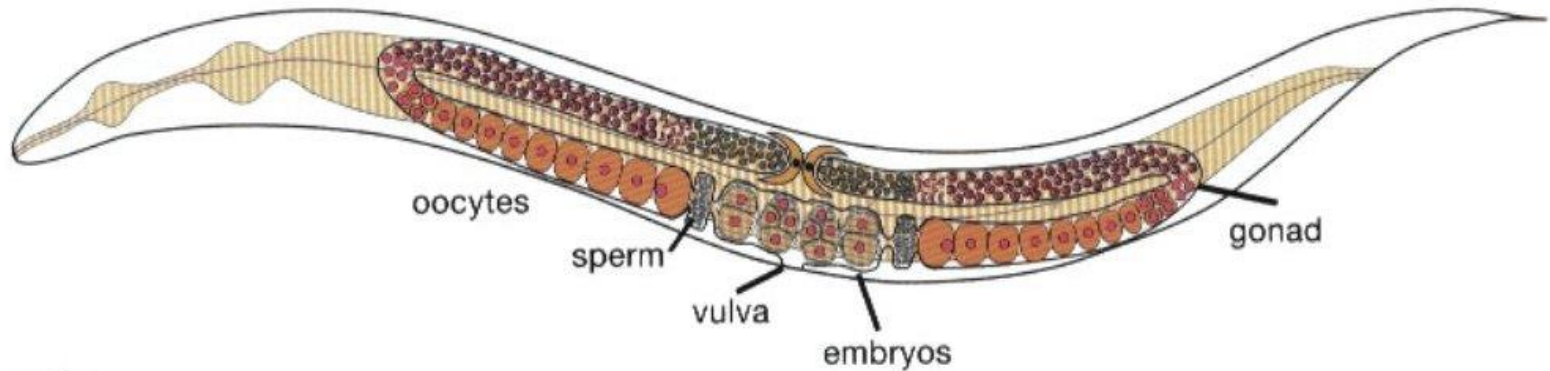
C-elegans

XX (hermafrodit)

XO

C-elegans

XX hermaphrodite



XO male



C. elegans XX and XO Anatomy

C. elegans naturally exists as two sexes, XX hermaphrodites and XO males. Hermaphrodites and males display several sex-specific anatomical features, most notably a male tail designed for mating, and a vulva on the ventral surface of hermaphrodites for reception of male sperm and for egg-laying. Their germ-line programs also differ. The two-armed gonad in hermaphrodites produces sperm initially and then oocytes throughout adulthood. The one-armed gonad in males produces sperm continuously.

XO ♂

XX ♀

embryo

soma : dosage compensation OFF

soma : dosage compensation ON

adult

germ line : X silenced

germ line : both Xs silenced



Somatic nuclei in XO:
no down-regulation of
the single X chromosome



Germline nuclei:
global silencing of
X chromosomes



Primordial germ cell



Somatic nuclei in XX:
50% down-regulation
of both X chromosomes



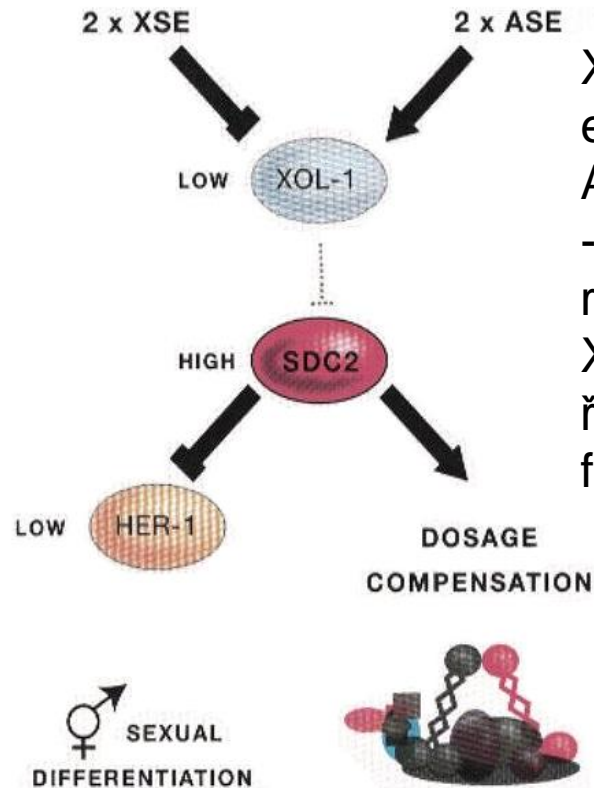
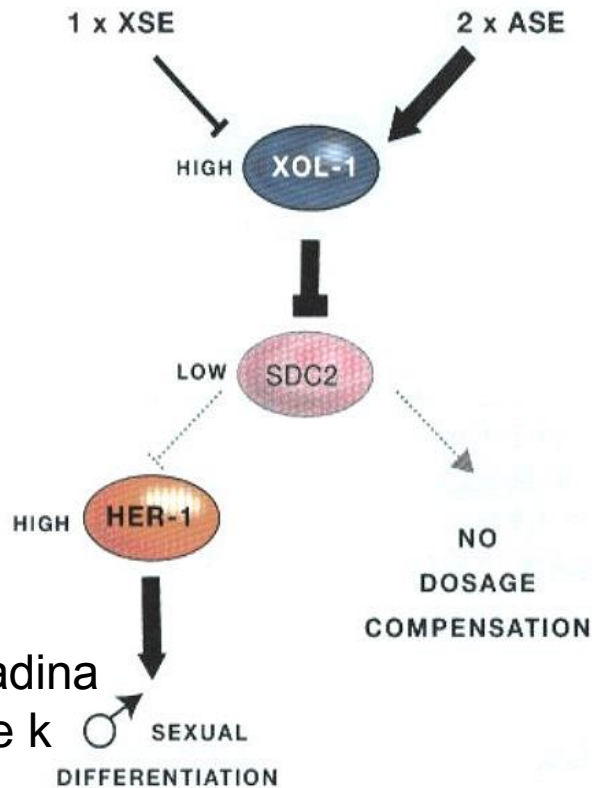
Partial reactivation of
X chromosomes
in oogenesis



Early embryos

Overview of X-Chromosome Regulation

Dosage compensation occurs in somatic tissues uniquely in XX hermaphrodites. Silencing of the Xs in the germ line occurs in both XO males and XX hermaphrodites. Hermaphrodites display late and partial activation of X-linked genes during late pachytene of oogenesis. The arrows point out the single primordial germ cell in the embryo that generates the germ line in the adult gonad.



XSE (X-signal elements) a ASE (autosomal-signal elements) regulují hladinu XOL-1, která řídí kaskádu k faktoru SDC2.

- nízká hladina HER-1 umožňuje tvorbu obou pohlavních orgánů

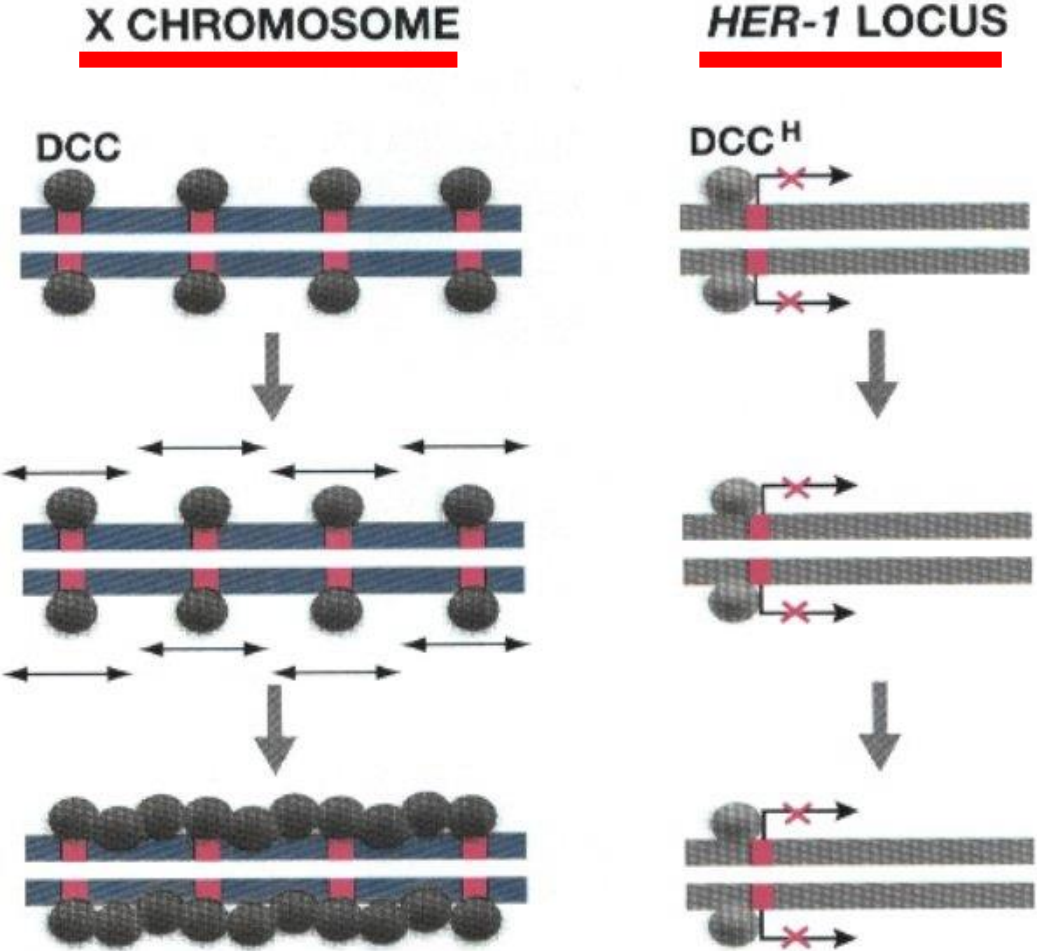
aktivace kondenzinových komplexů snižujících expresi obou X (DCcomplex)



- vysoká hladina HER-1 vede k samčí pohlavní dráze (potlačení samičí dráhy)

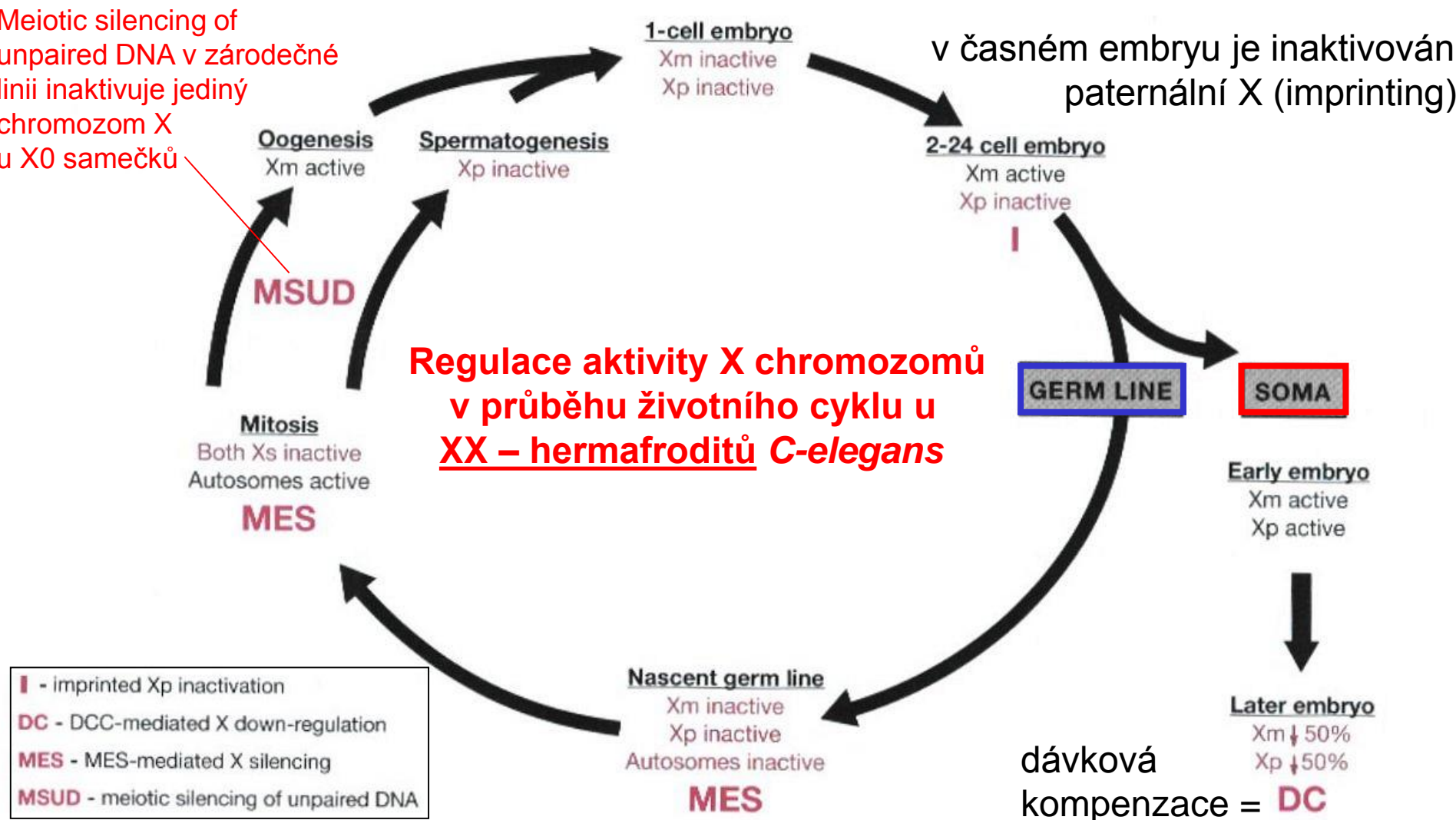
Vývojové dráhy vedoucí k determinaci pohlaví a X - dávkové kompenzaci u *C-elegans*

Dosage Compensation Complex zprostředkovává down-regulaci obou chromozomů X a autosomálního lokusu *HER-1* lokusu v somatických tkáních hermafrodita

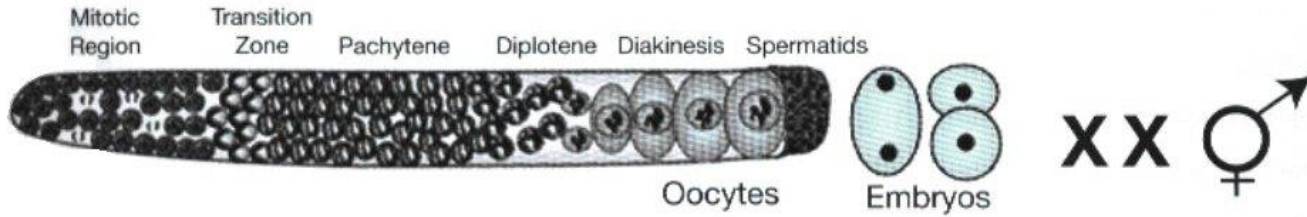


DCC komplex se vytváří v XX-červech, váže se a šíří po X-chromozomech, redukuje expresi X-genů ~ 2krát, po vazbě na autosomální *HER-1* redukce 20násobná.

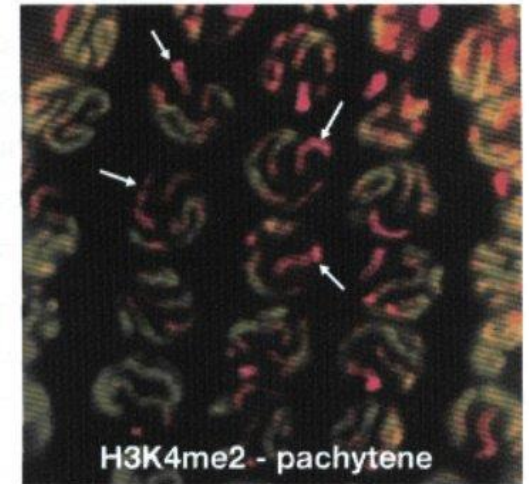
Meiotic silencing of unpaired DNA v zárodečné linii inaktivuje jediný chromozom X u XO samečků



Aktivita X-chromozomů je regulována v různých vývojových stádiích a v různých tkáních odlišnými mechanismy: imprintovaná inaktivace paternálního X v časném embryu (**I**), kompenzace dávky genů v somatických tkáních pozdnějšího embrya a dospělého (**DC**), a meiotic silencing v zárodečné linii (**MES**).

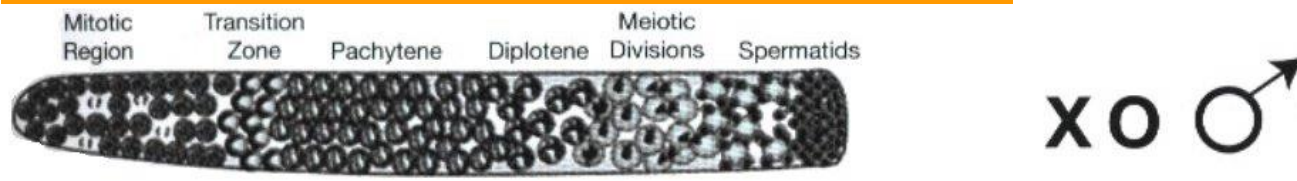


chromatin marks on the Xs

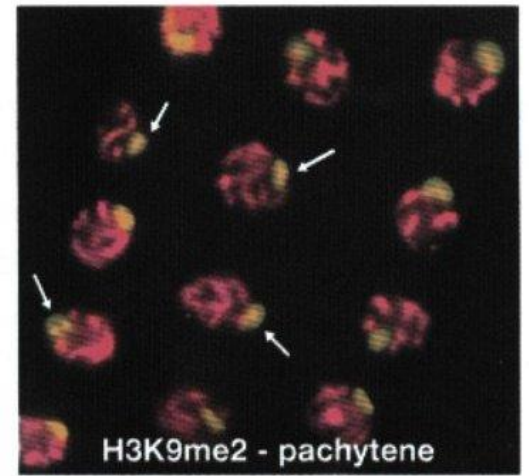
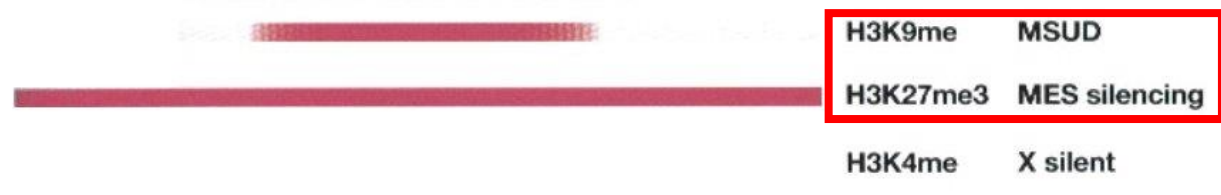


Modifikace chromatinu spermií u hermafrodita resp. u samečka jsou odlišné

odlišné imunobarvení spermií od hermafrodita a samečka



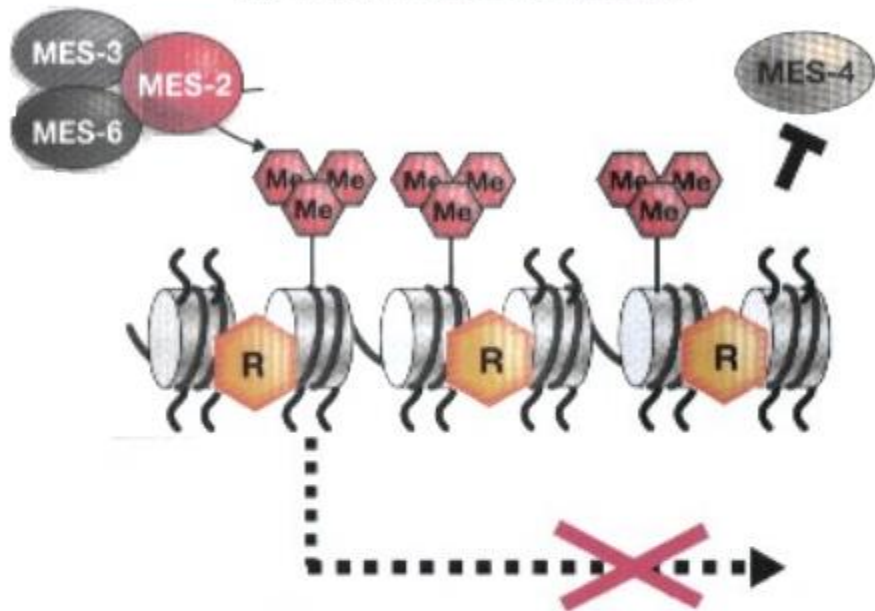
chromatin marks on the X



Epigenetické regulace chromozomu X v průběhu vývoje zárodečné dráhy: červeně jsou markery inaktivity (H3K9metyl a 27metyl), zeleně markery aktivity (H3K4metyl). Spermie obou pohlaví tedy získávají odlišnou epigenetickou informaci!!!

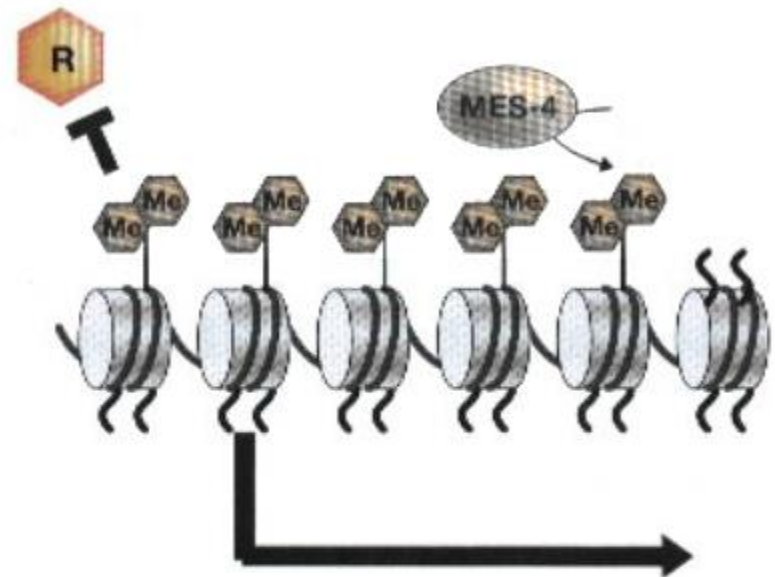
Modely prezentující, jak se „silencing“ (proteinové) meiotické komplexy (MES) podílejí na umlčování chromozomu X v zárodečné dráze

X chromosomes

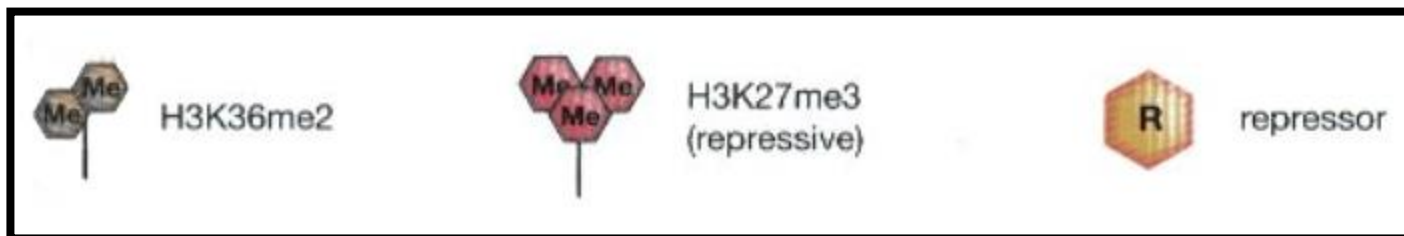


MES-2,3,6 se koncentrují na marker repress (H3K27metyl) na X a znemožňují vazbu MES-4

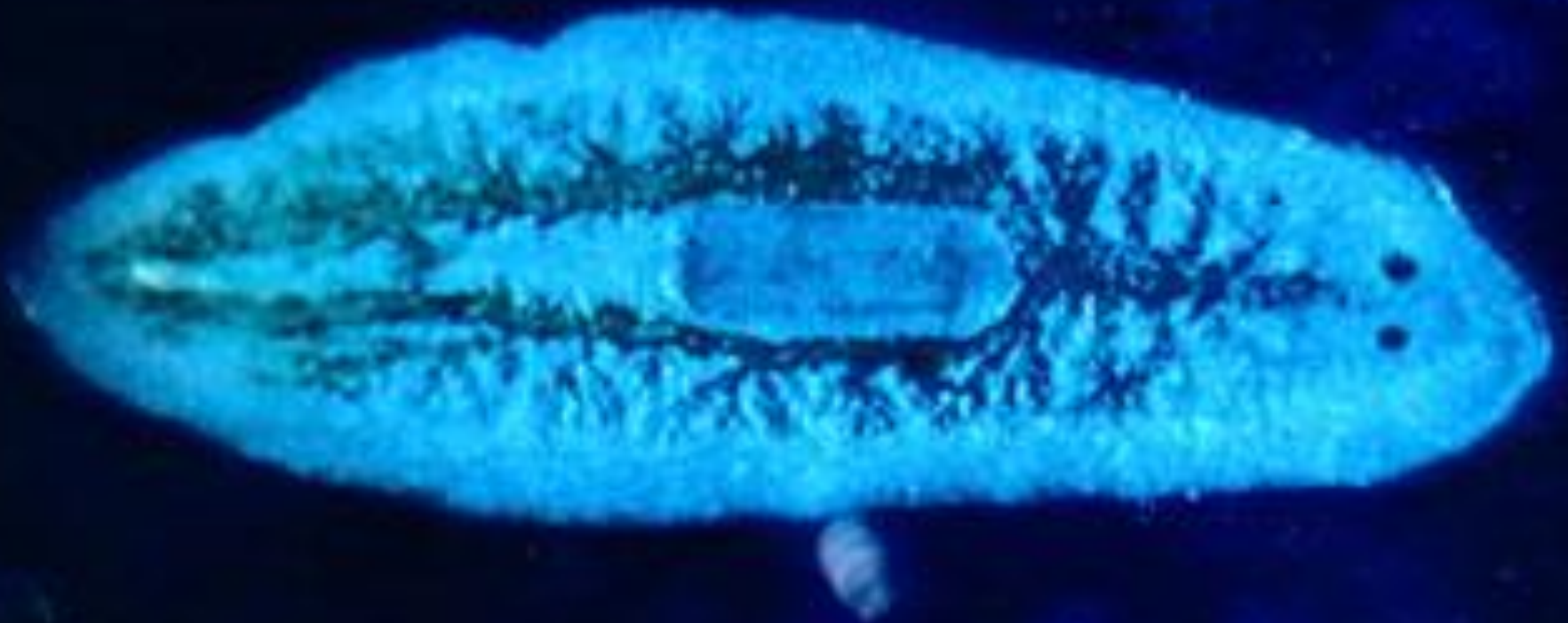
Autosomes



MES-4 se koncentruje na odlišný chromatinový marker (H3K36metyl) na autozomech, čímž brání vazbě repressoru



Proč máme rádi (červy)



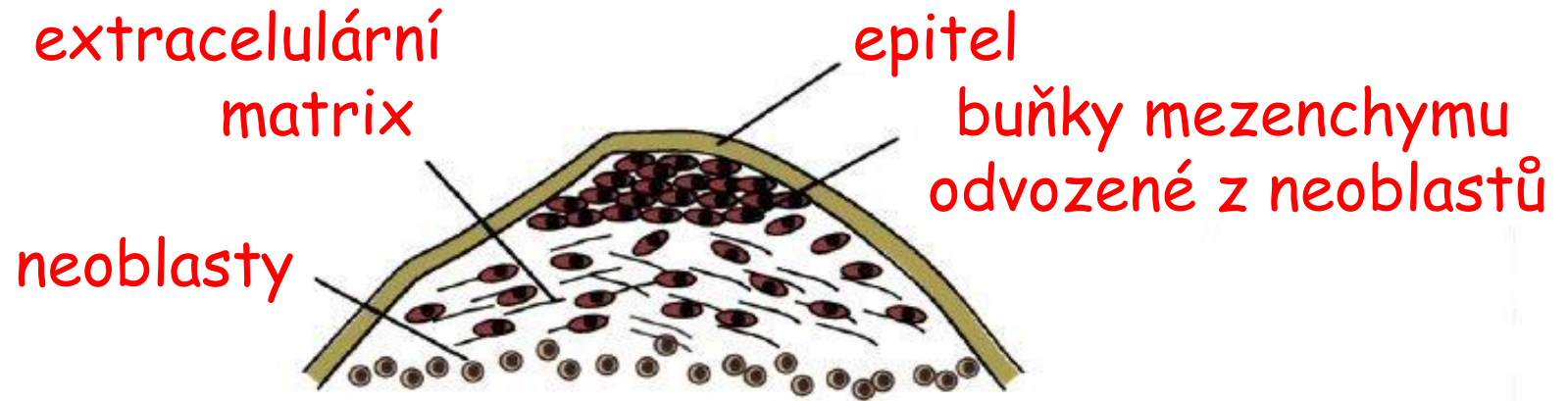
PLOŠTĚNKY

Ploštěnci (*Platyhelminthes*), ploštěnky (*Turbellaria*)

- první triblastičtí, bilaterálně souměrní (planární, obvykle trikladističtí sladkovodní) živočichové s diferencovanými orgány (tj. mezi nezmarem a hlísticí)
- model regenerační morfolaxe (tj. asexuální reprodukce)
- model studia kmenových buněk (neoblastů)
- nemají zárodečnou dráhu, ale funkční gen *Vasa*
- hermafroditismus a štěpení, resp. sexuální a asexuální (chromosomálně-podmíněné) klony

- znovuobjevení historického modelu regenerace (Darwin, Morgan)
- model vývoje nervové soustavy (úloha fibroblastového růstového faktoru - úloha genu *nou-darake*)
- photosensing system (negativní fototaxe) a úloha mozkových ganglií
- model psychologie - jednoduchých podmíněných reflexů
- model allometrie (regulace velikosti a proporcí těla)

Regenerace hlavy u ploštěnky *Dugesia dorotocephala*



amputace



1 den poté



2 dny



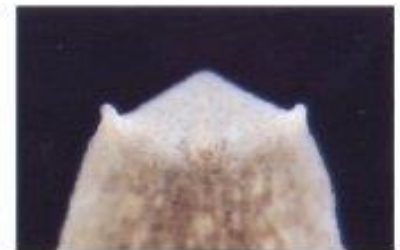
3 dny



4 dny



5 dnů



7 dnů

Thomas Hunt Morgan (1866-1945) received the Nobel Prize in Medicine or Physiology in 1933 for his discoveries concerning the role chromosomes play in heredity.



At the beginning of his career, however, Morgan spent considerable time and effort on the study of embryogenesis and regeneration, and published several important articles and books on these subjects. Of relevance to us is his 1901 book appropriately entitled "Regeneration". The work and ideas presented in this book remain relevant to the modern study of regeneration, and many of the incisive questions postulated in this work remain unanswered to this day.

However, Morgan eventually abandoned the study of regeneration since, in his own words, he felt that "we will never understand the phenomena of development and regeneration" (Berrill, N. J. "The pleasure and practice of biology" *Can. J. Zool.* 61: 947-951, 1983).

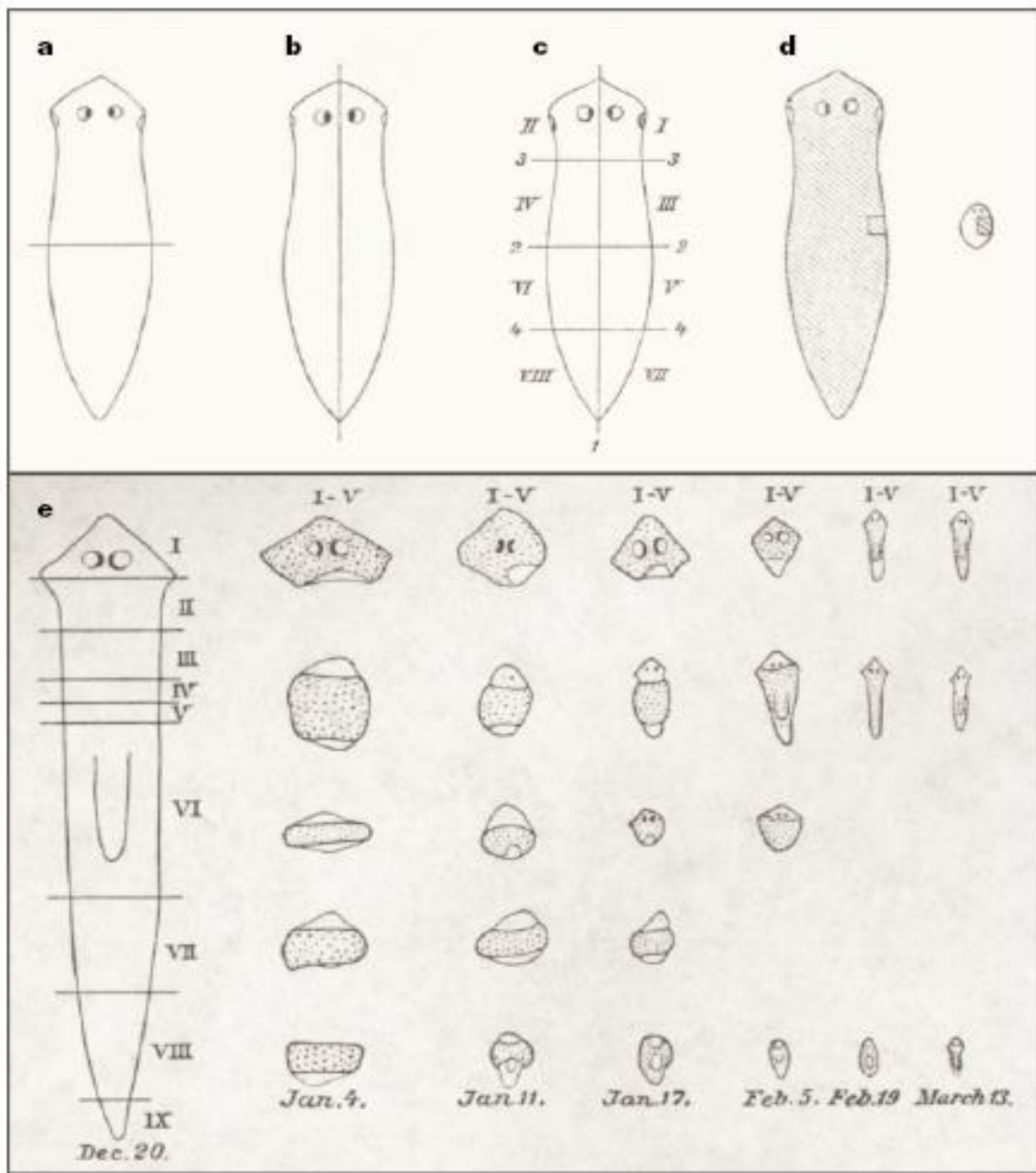


Figure 2 | The planarian's regenerative and remodelling abilities. The drawings illustrate

planarian (FIG Wilson at Bry Morgan credit "starting point"

Before his work on *Drosophila*, Morgan was publishing on subjects³⁰, including work on a planarian. Morgan also took a tail fragment 'known to the first suggestion account for this melling of tissue' erate was another Morgan. The (1898 paper) illustrates Amputation of and wide triangles weeks this fragmentionately narrow well-proportioned coined the word logically more transformation results in the re-takes place "with

One of the developmental grow and 'de-g' (FIG. 3). When they reach a maximum prolonged start



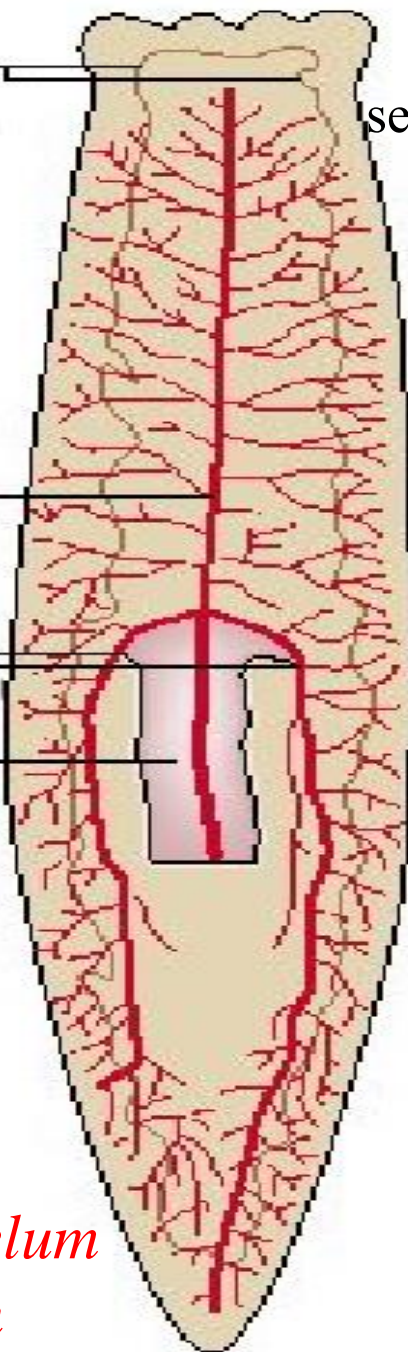
The planarian has a great capacity for regeneration. Even a tiny fragment cut from any part of the body can regenerate an entire individual planarian with the same antero-posterior and dorso-ventral body patterning within one week.

plaménkové
exkreační buňky

anteriorní větev
**gastrovaskulární
systém**
posteriorní větve

hltan

*Dendrocoelum
lacteum*



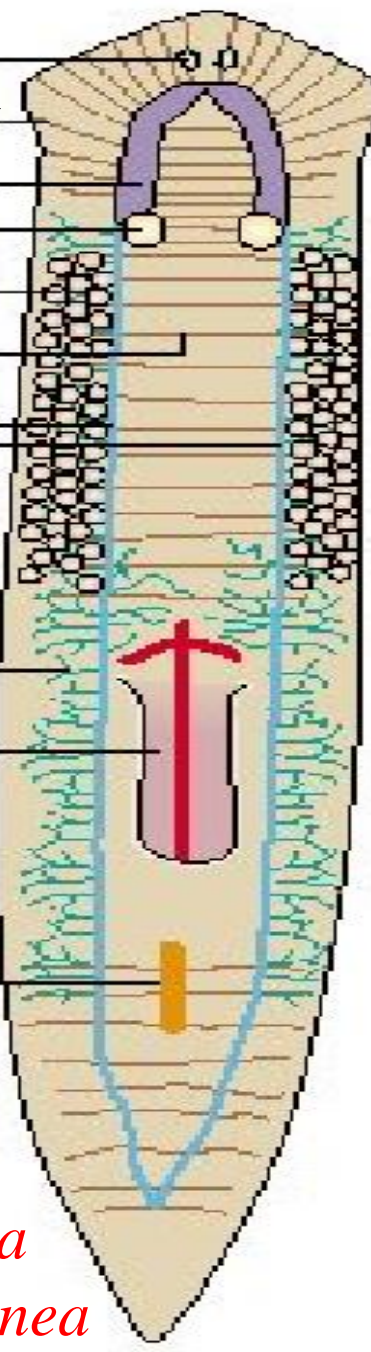
fotoreceptory
senzorové neurony
mozkové uzliny
ovária
žloutek
příčné spoje
**nervové
svazky**

testes

hltan

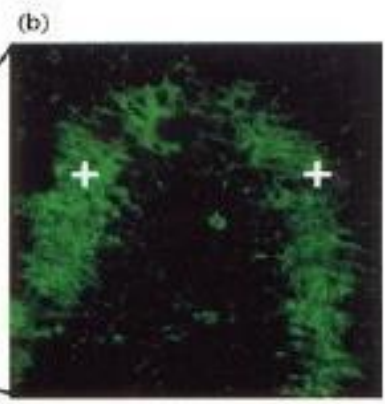
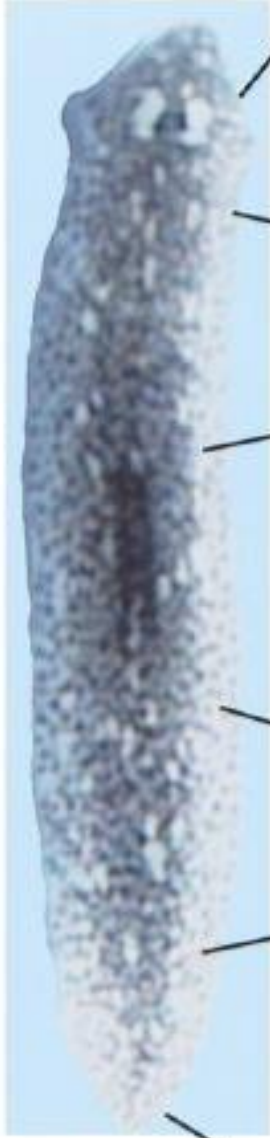
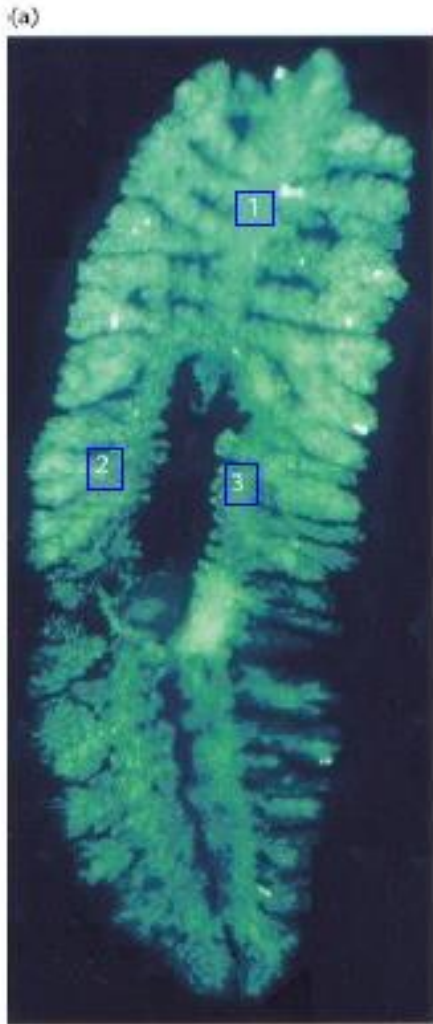
kopulační
aparát

*Schmidtea
mediterranea*

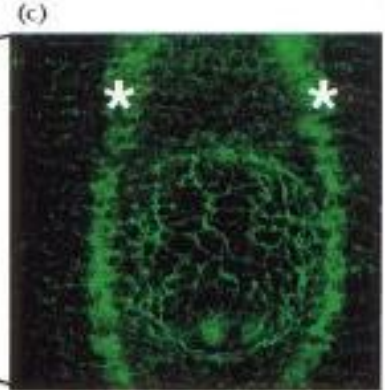


Vizualizace trávicí a nervové soustavy ploštěnky

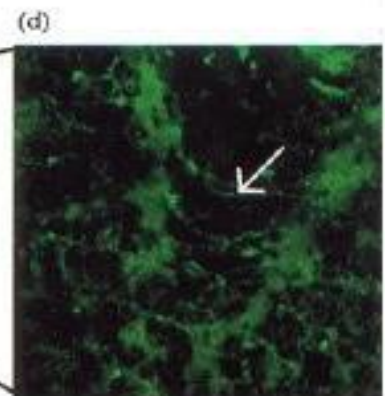
požití fluoreskujícího latexu



cerebrální ganglia



nervové provazce



příčné spojové neurony

nervový systém vizualizován protilátkou vůči neuropeptidu

Allometric Scaling and Proportion Regulation in the Freshwater Planarian *Schmidtea mediterranea*

Néstor J. Oviedo,^{1,2} Phillip A. Newmark,³ and Alejandro Sánchez Alvarado^{1*}

The regulation of scale and proportion in living organisms is an intriguing and enduring problem of biology. Regulatory mechanisms for controlling body size and proportion are clearly illustrated by the regeneration of missing body parts after amputation, in which the newly regenerated tissues ultimately attain a size that is anatomically congruent with the size of the rest of the organism. Understanding the molecular processes underpinning scaling would have deep consequences for our comprehension of tissue regeneration, developmental ontogeny, growth, and evolution. Although many theories have been put forward to explain this process, it is interesting that no satisfactory mechanistic explanation is currently available to explain scalar relationships. We chose to investigate the freshwater planarian, a commonly used model system for the study of metazoan regeneration, to delineate a strategy for the molecular dissection of scale and proportion mechanisms in metazoans. Here, we report on the cloning and discrete expression pattern of a novel planarian gene, which shares homology with the DEG/ENaC super-family of sodium channels. We have named H.112.3c *cintillo* (“head ribbon” in Spanish) and present a strategy for using the expression of this gene to monitor scale and proportion regulation during regeneration, growth and degrowth in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Developmental Dynamics* 226:326–333, 2003. © 2003 Wiley-Liss, Inc.

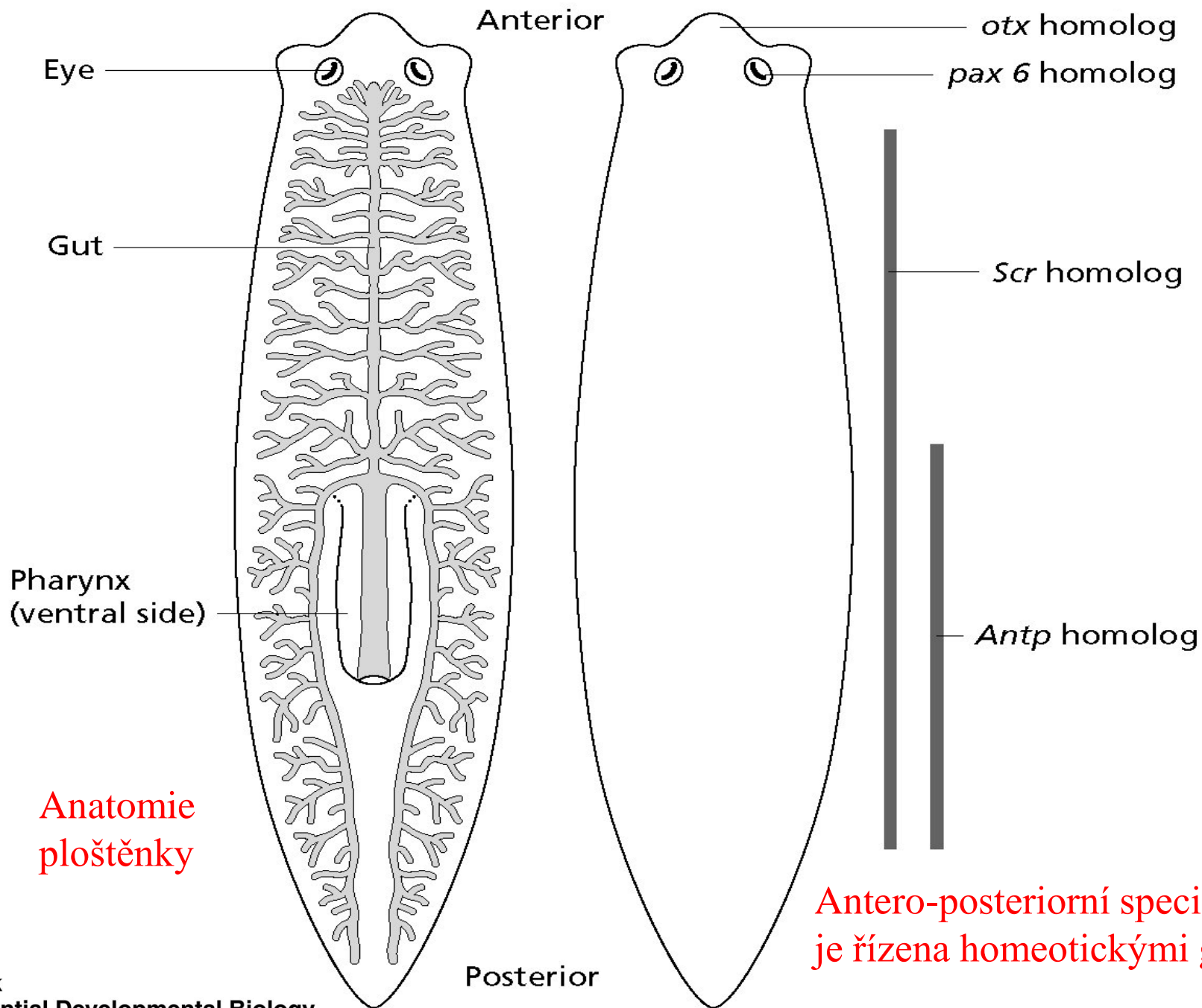
Regulace proporcí těla podle dostupné potravy - allometrie

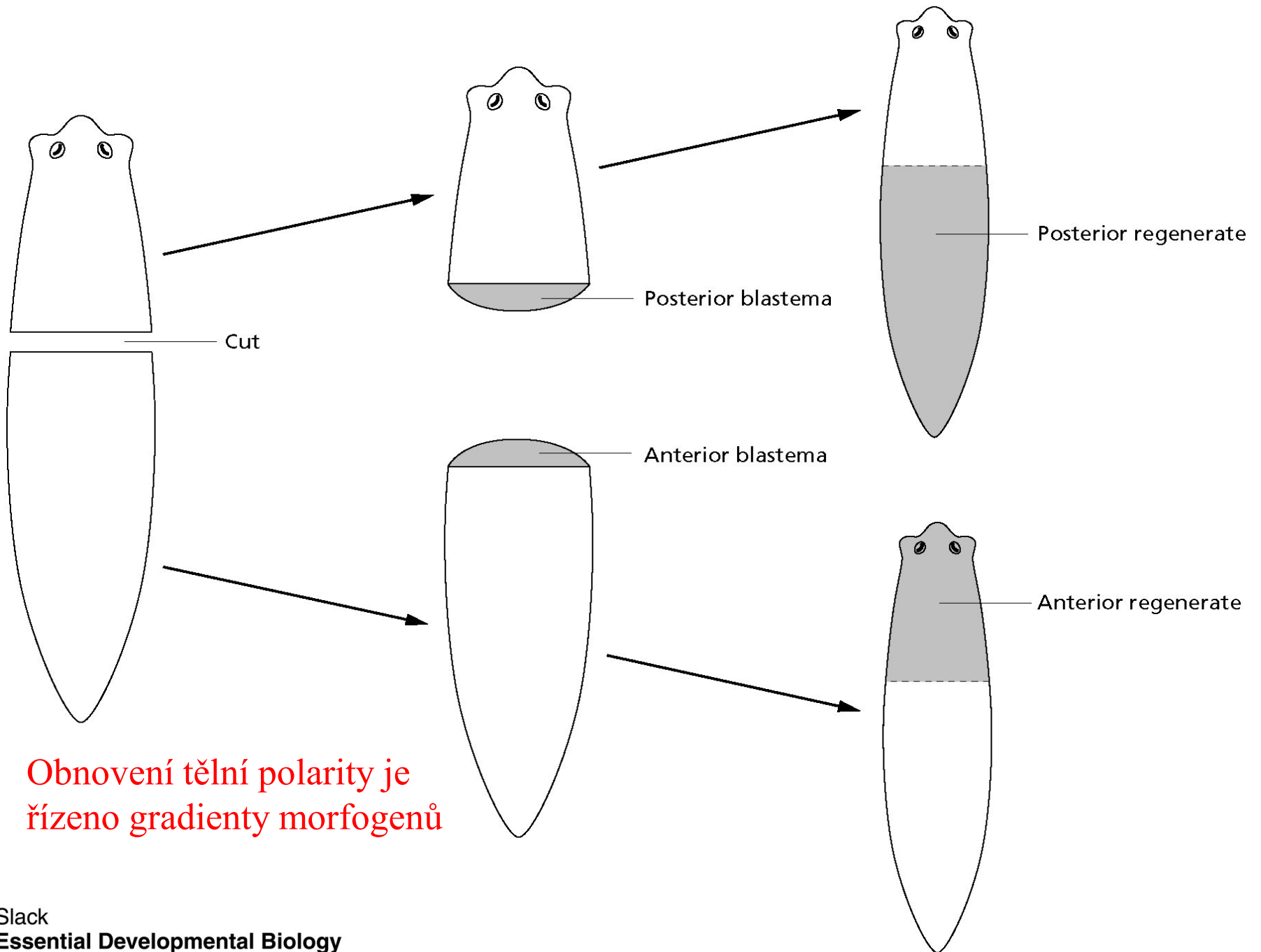
hladovění („degrowth“)



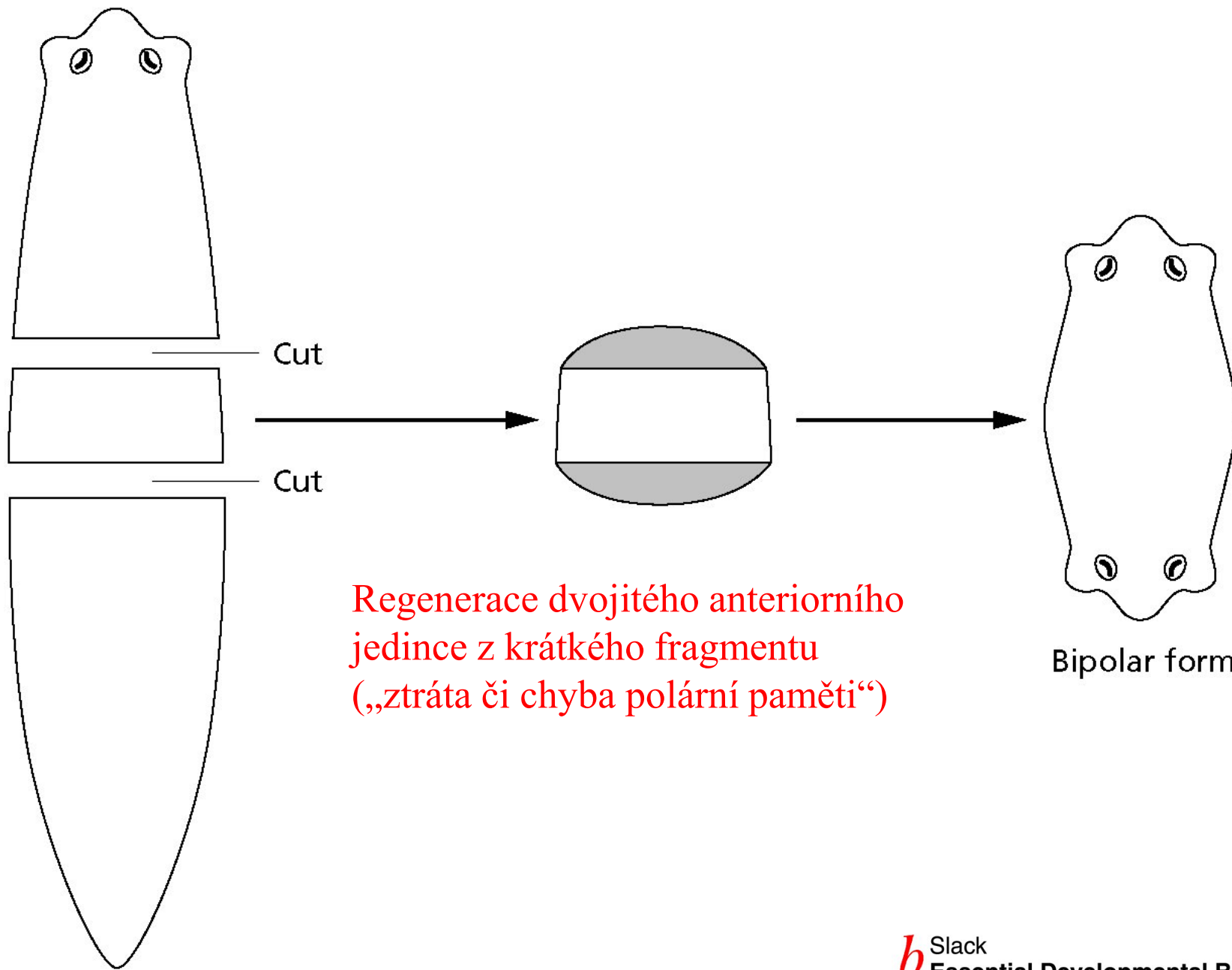
1 mm²

krmení („growth“)

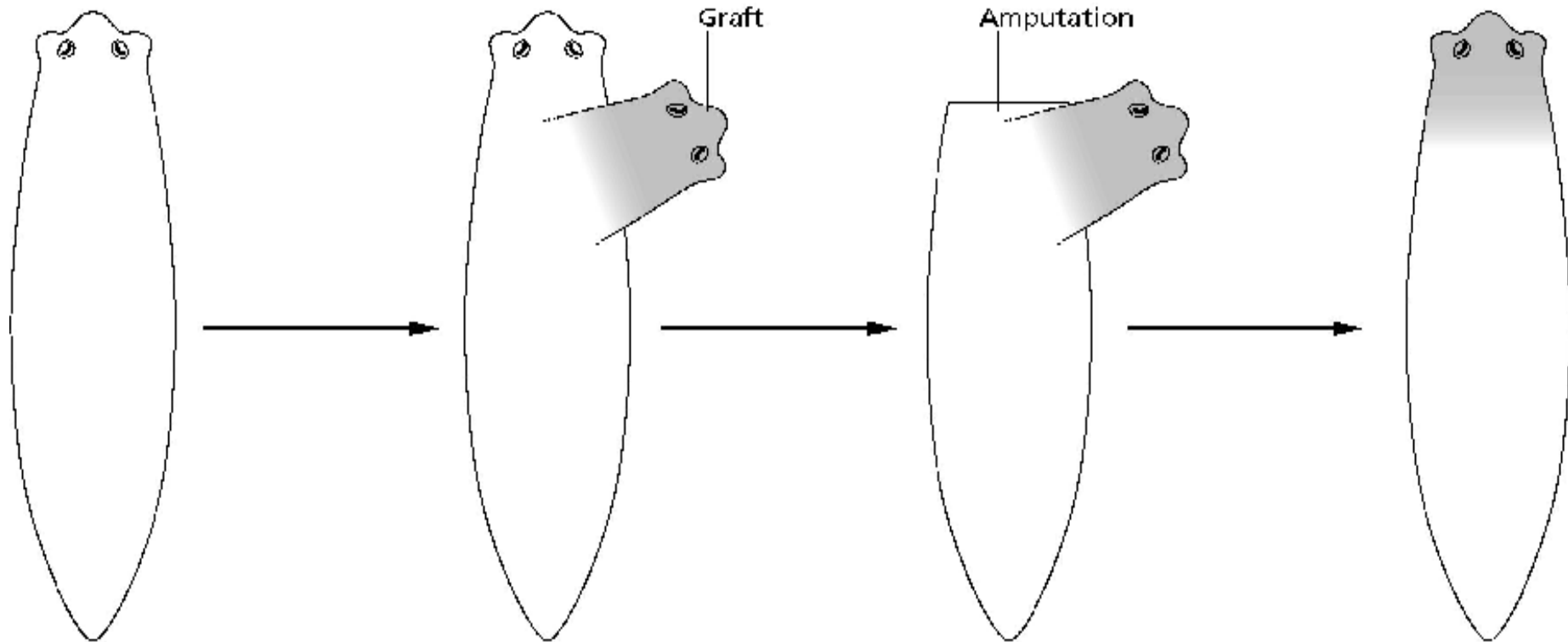




Obnovení tělní polarity je řízeno gradienty morfogenů



Transplantace druhé hlavy vede k potlačení regenerace amputované první hlavy (cf. nezmar) – tvorba hlavového inhibitoru ?



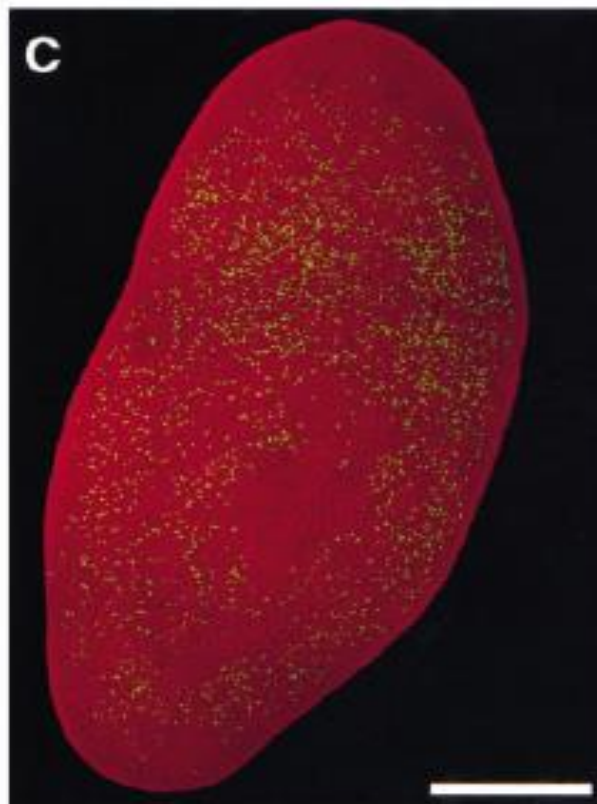
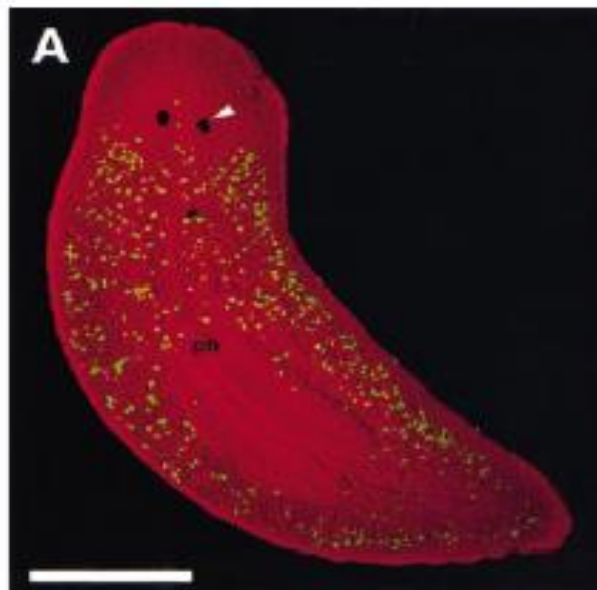
Detekce replikace DNA
s pomocí digesce BrdU

- dělí se pouze neoblasty

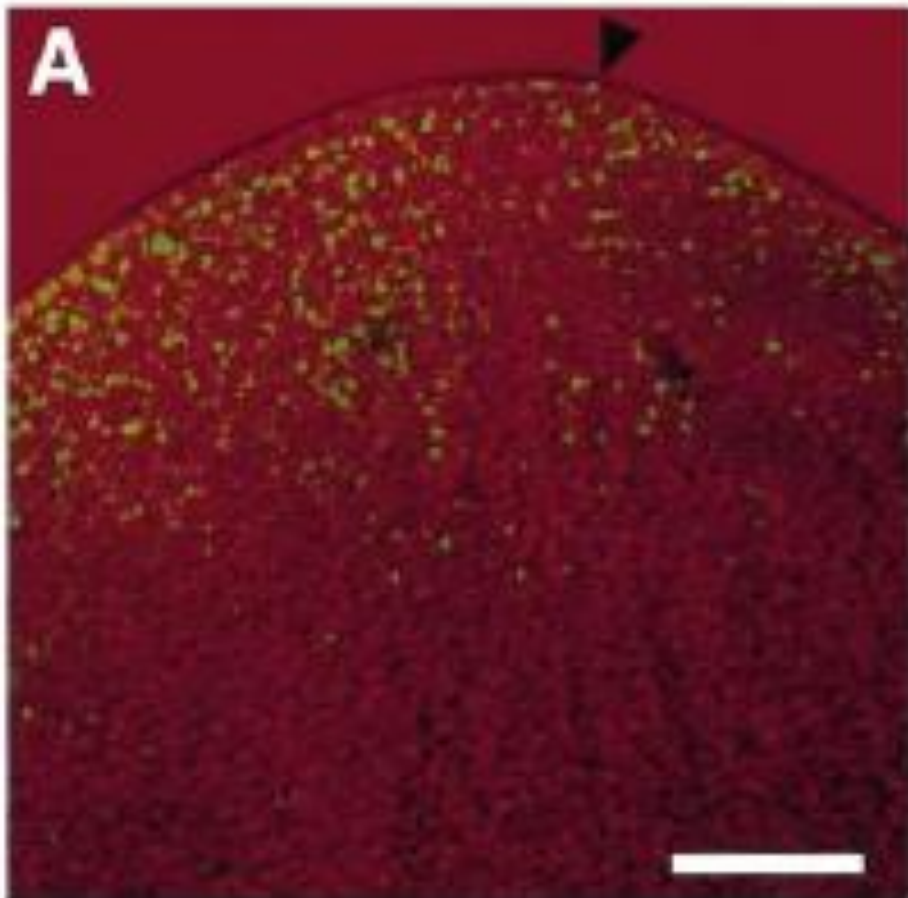
A) *Phagocata* sp.

B) *Girardia dorotocephala*

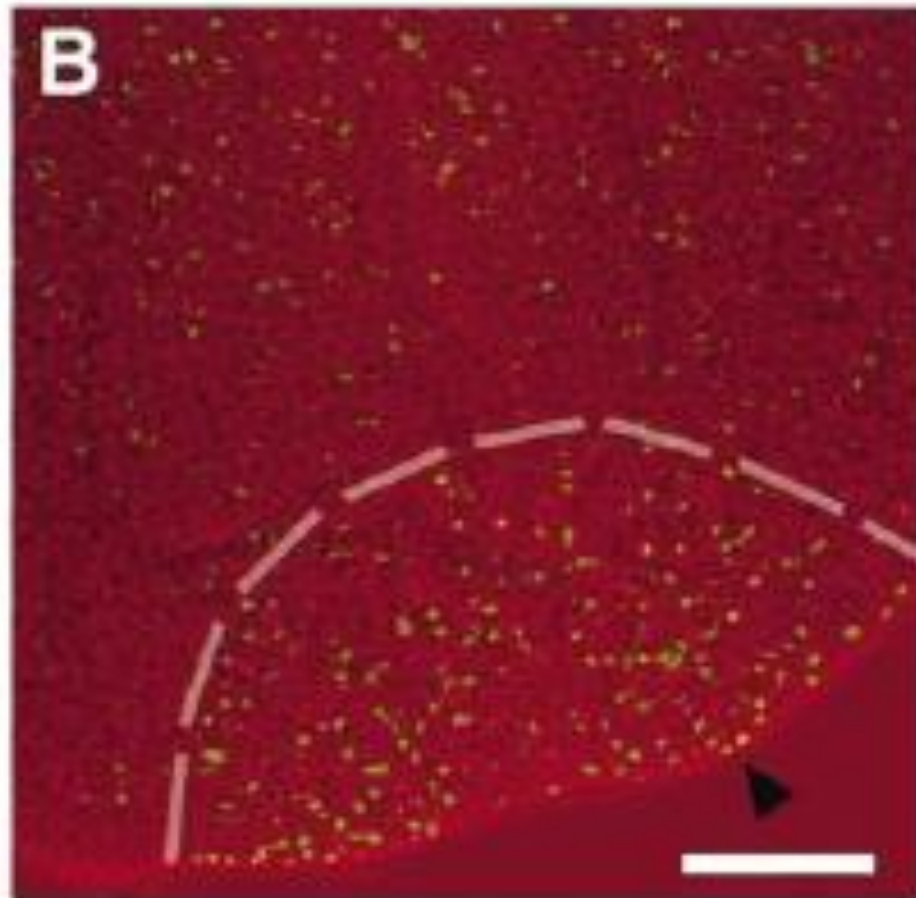
C) *Schmidtea mediterranea*



Akumulace nově se replikujících (dělících) buněk – neoplastů v oblastech regenerační blastémy 3 dny po amputaci anterioru či posterioru ploštěnky (značení a detekce BrdU)



anteriorní blastéma



posteriorní blastéma 100 um

Ploštěnka *Schmidtea mediterranea*



pohlavní kmen



nepohlavní kmen (aberrace)

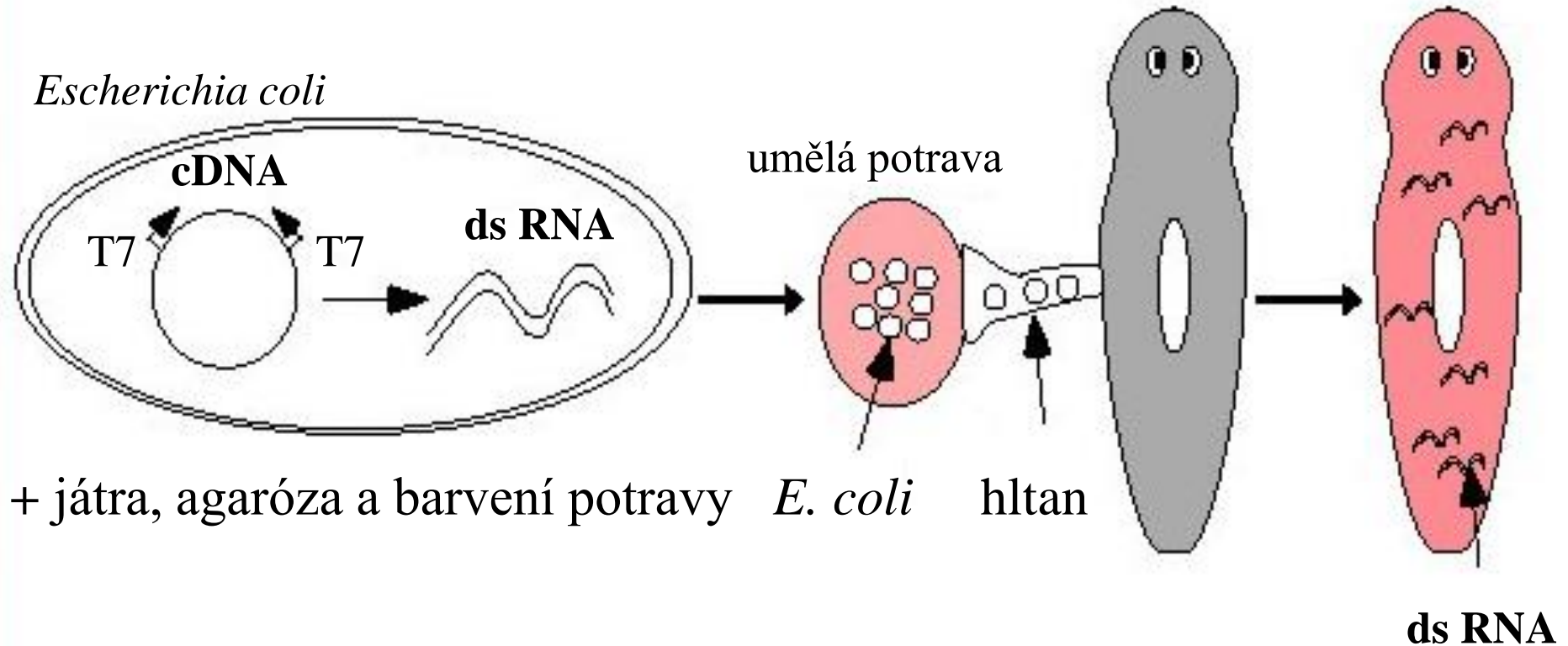


*Whole - mount in situ hybridizace
s cDNA sondami*



Ingesce bakteriálně exprimované dvouvláknové RNA inhibuje genovou expresi u ploštěnek

Escherichia coli

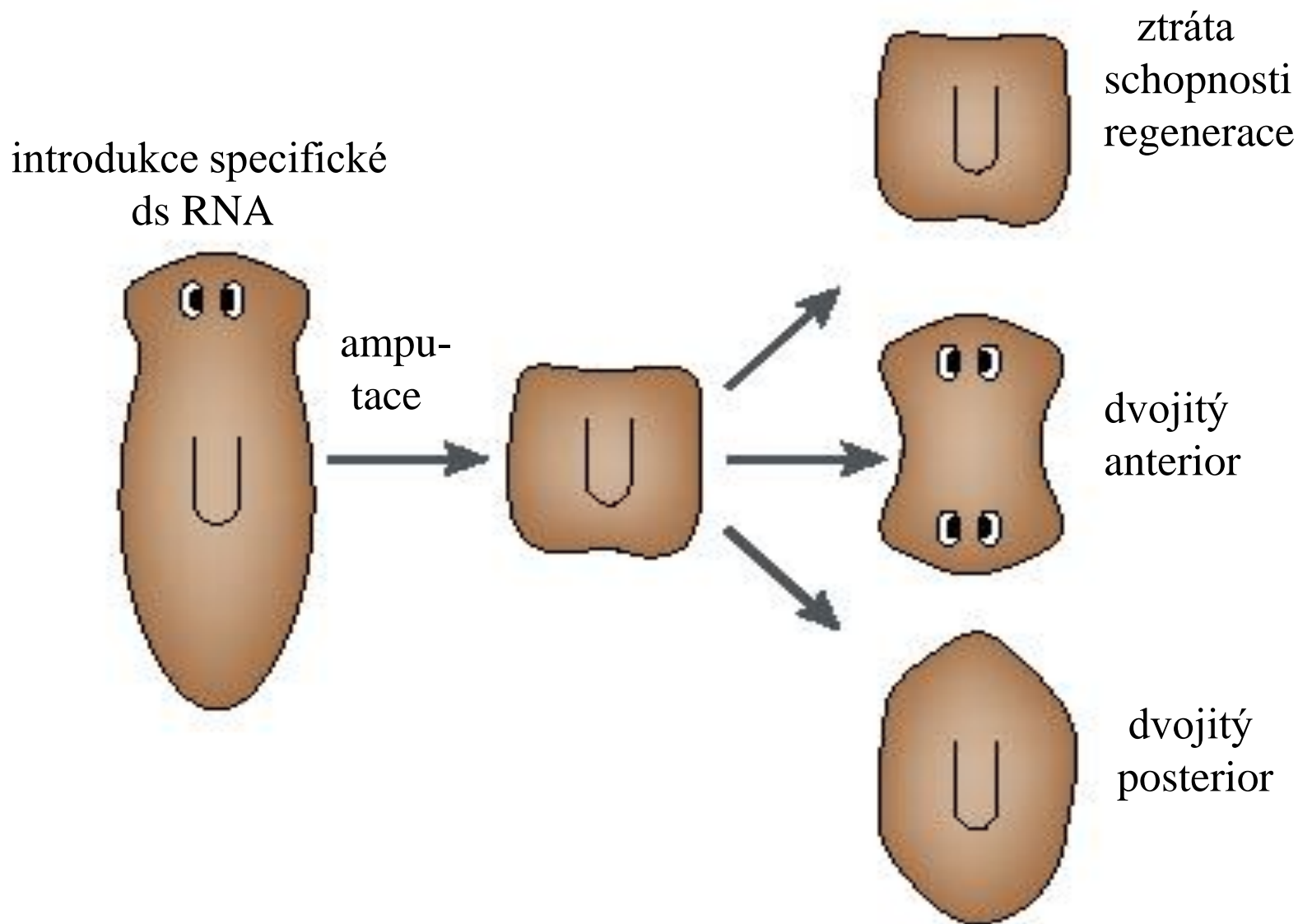


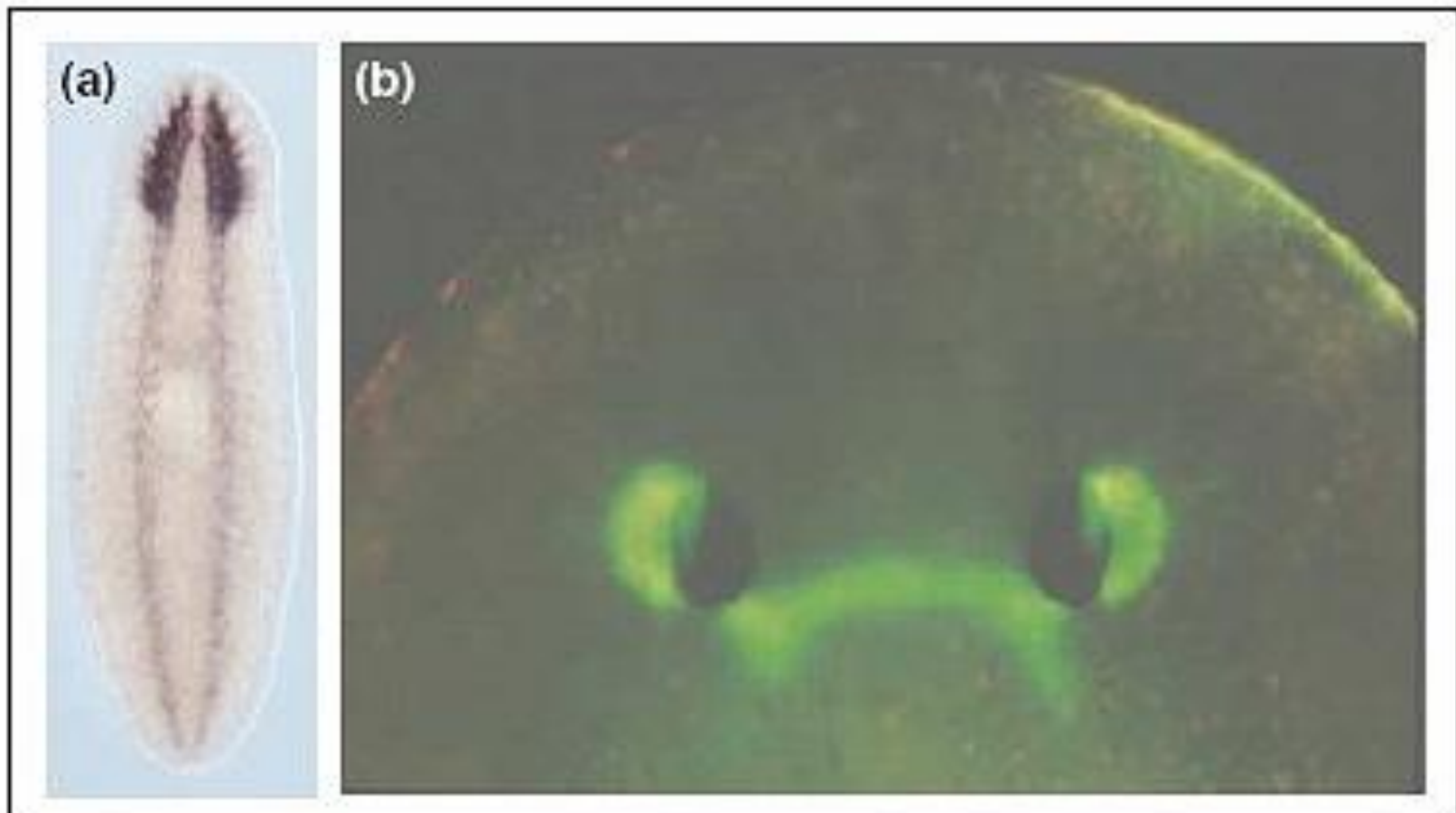
+ játra, agaróza a barvení potravy *E. coli* hltn

ds RNA

- mikroinjekce ds RNA či prosté krmení ds RNA produkujícími bakteriemi vede (stejně jako u *Caenorhabditis elegans*) k inhibici příslušných genů
- inhibice persistuje po regeneraci, což umožňuje analýzu fenotypů
- metoda transgenóze dosud nebyla u ploštěnek zvládnuta, ds RNA je tedy hlavním nástrojem identifikace funkce genů

Využití RNA interference k identifikaci genů vyžadovaných k regeneračním procesům





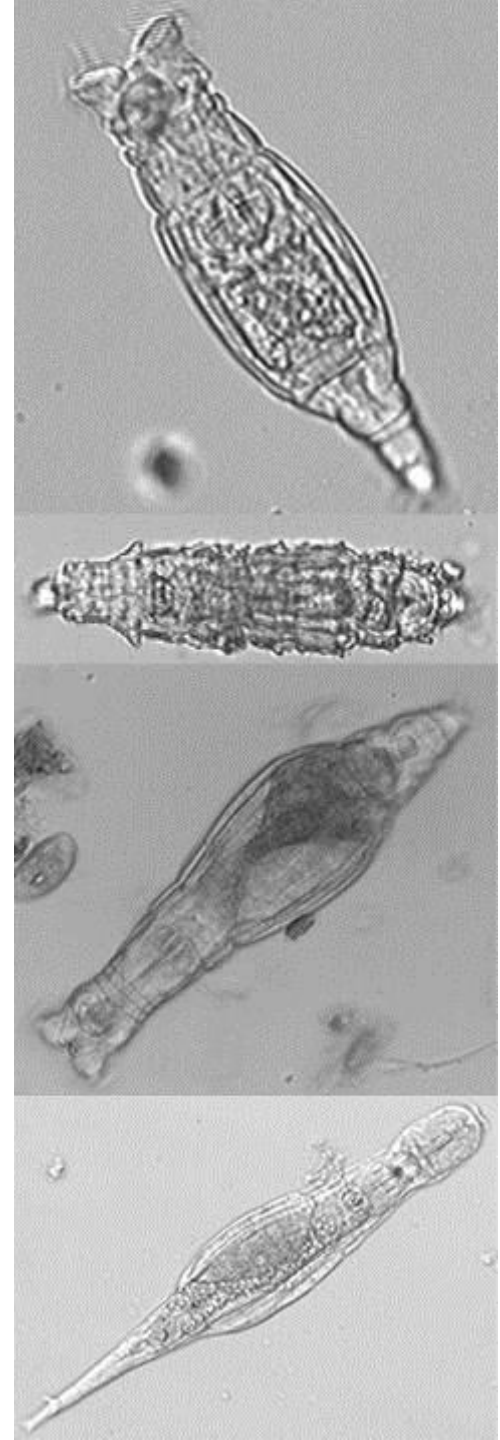
The planarian nervous and visual systems. **(a)** The planarian central nervous system is composed of a brain in the head region and a pair of ventral nerve cords. The figure shows a ventral view of whole-mount *in situ* hybridization with the DjPC2 probe **(b)** The structure of the planarian visual system. Visual axons form the optic chiasma. This figure is a dorsal view of a whole-mount staining using an anti-visual-cell monoclonal antibody

Pijavenky

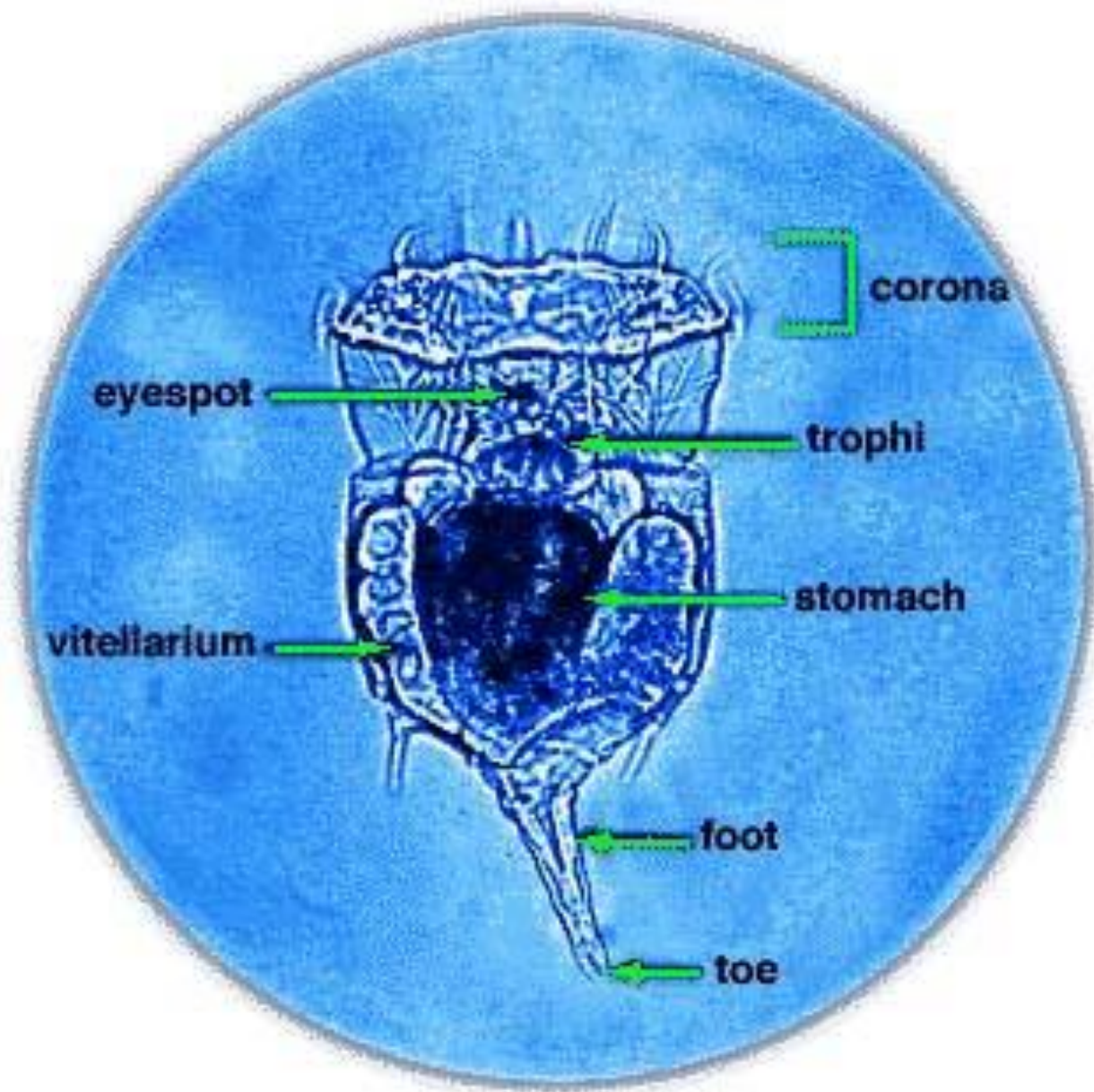
(Bdelloidea), kmen Vířníci (Rotatoria)

asexuální červi

(„EVOLUČNÍ SKANDÁL“, Maynard Smith)



Bdelloid rotifers vířníci





- mikroskopičtí mnohobuněční živočichové, červi (100 μ m až 1mm)
- velmi početní v mokřých stanovištích
- anhydrobióza: klidové stádium a šíření
- schopné fixovat fragmenty DNA (horizontální genový přenos)
- obligátní partenogeneze (samečci nejsou)
- asi 450 morphologicky rozlišitelných druhů
- radiorezistence (vysoká účinnost reparací)

Vířníci neznají genetickou rekombinaci, přesto se podrobují speciaci díky odlišné selekci a geografické izolaci. Dnes existuje asi 400 druhů starých přes 40 milionů let. Určitou genetickou variabilitu zajišťují kromě přirozené mutageneze i restrukturalizace genomu v průběhu anhydrobiózy (včetně fixace cizí DNA).

