

Kapitola 21

Genetické řízení vývoje živočichů

OSNOVA KAPITOLY

- ▶ Modelové organizmy pro genetickou analýzu vývoje
- ▶ Genetická analýza vývojových drah
- ▶ Aktivita maternálních genů ve vývoji
- ▶ Aktivita zygotických genů ve vývoji
- ▶ Genetická analýza vývoje obratlovců

▶ Terapie pomocí kmenových buněk

Kmenové buňky jsou středem pozornosti a o jejich možném využití diskutují nejen vědci, ale i politici, teologové, novináři, oběti nemocí, jako například Parkinsonovy choroby, diabetes nebo artrózy, či dokonce filmové hvězdy. Přestože samotné kmenové buňky jsou nediferencované, mají schopnost vytvářet potomstvo, které se může diferencovat ve speciální buněčné typy, jako jsou svalová vlákna, lymfocyty, neurony či kostní buňky. Proto mohou být kmenové buňky využity k regeneraci nefunkčních tkání, k náhradě ztracených orgánů nebo částí těla, k léčbě zranění či ke zmírnění metabolických vad. Tyto perspektivy zvyšují význam studia pochodů, jakými odlišné typy buněk získávají své specializované funkce a jakými se v mnohobuněčných organizmech vytvářejí tkáně a orgány patřičným způsobem a v určitém čase. Jinými slovy, zvyšují



Lidský plod v pozdním stadiu vývoje.

význam pochopení procesu vývoje – od oplozeného vajíčka k embryu a dospělému jedinci. Terapie pomocí kmenových buněk ovšem vyvolává i důležité etické otázky. Musí se kmenové buňky získávat destrukcí embryí? Může být život embrya obětován kvůli prodloužení či zlepšení života

dospělého člověka? Je přijatelné vytvářet embrya výhradně s cílem odebrat z nich kmenové buňky pro terapeutické účely? Lidé z celého světa i jejich vlády se těmito otázkami zabývají, zatímco vědci pokračují ve studiu vlastností kmenových buněk a jejich využití.

▶ Modelové organizmy pro genetickou analýzu vývoje

Drosophila melanogaster a *Caenorhabditis elegans* jsou hlavními modelovými organizmy pro genetickou analýzu vývoje živočichů.

Vývoj mnohobuněčného živočicha z oplozeného vajíčka demonstruje význam řízené genové exprese. Geny musí být exprimovány v přesně daném čase, aby řídily buněčnou specializaci, řádné uspořádání buněk do tkání a orgánů a tvorbu živočišného těla. Proces živočišného vývoje proto závisí na přesném plnění genetického programu zakódovaného v DNA živočicha. Není proto překvapením, že především genetika významně přispěla k pochopení vývojového procesu.

Klasické anatomické a embryologické studie poskytly detailní obraz vývojových procesů – dělení oplozeného vajíčka s následným vytvořením embrya, pohyb buněk uvnitř embrya vedoucí k tvorbě primitivních tkání a následná diferenciace buněk uvnitř těchto tkání, jež vede k vytváření odlišných orgánů. Tyto výzkumy se z praktických důvodů zaměřovaly na několik živočišných druhů, zvláště pak na ježovky, žáby a kuřata. S vajíčky uvedených druhů lze experimentálně manipulovat a jejich embrya se vyvíjejí mimo matčino tělo. Embryologové proto mohou pozorovat, jak se embryo vyvíjí jako odpověď na experimentální podnět. Když se začali studiem vývoje zabývat genetici, zaměřili se na živočišné druhy, které se dají snadno kultivovat, obzvláště na mušku octomilku (*Drosophila melanogaster*) a hlístici (*Caenorhabditis elegans*). Cílem jejich výzkumů byla identifikace genů, jejichž produkty jsou začleněny v důležitých vývojových událostech. Standardní cestou k dosažení takového cíle je pro genetika dostupnost mutací. Například při studiu vývoje křídla octomilky je nezbytné připravit mutace, které mění či brání tvorbě křídla. Tyto mutace se pak testují na alelizmus a mapují na chromozomy k určení polohy příslušných genetických lokusů. Když jsou tyto lokusy identifikovány, genetici kombinuje reprezentativní mutace z každého lokusu v párech, aby se zjistilo, zda některé mutace nejsou vůči jiným epistatické. Nalezení epistaze může poskytnout důležitou informaci, jak odlišné geny přispívají k vývojovému procesu (viz kapitola 4). Konečně, k objasnění molekulární podstaty funkce genů a odhalení úlohy, jakou genové produkty hrají ve vývoji, je důležité jednotlivé geny klonovat a dále je studovat s využitím celé škály dnes dostupných technik – sekvenování, přenos RNA a proteinů na membránu, RT-PCR, značení pomocí fluorescenčních barviv, konstrukce transgenických organizmů atd. (viz kapitoly 15 a 17).

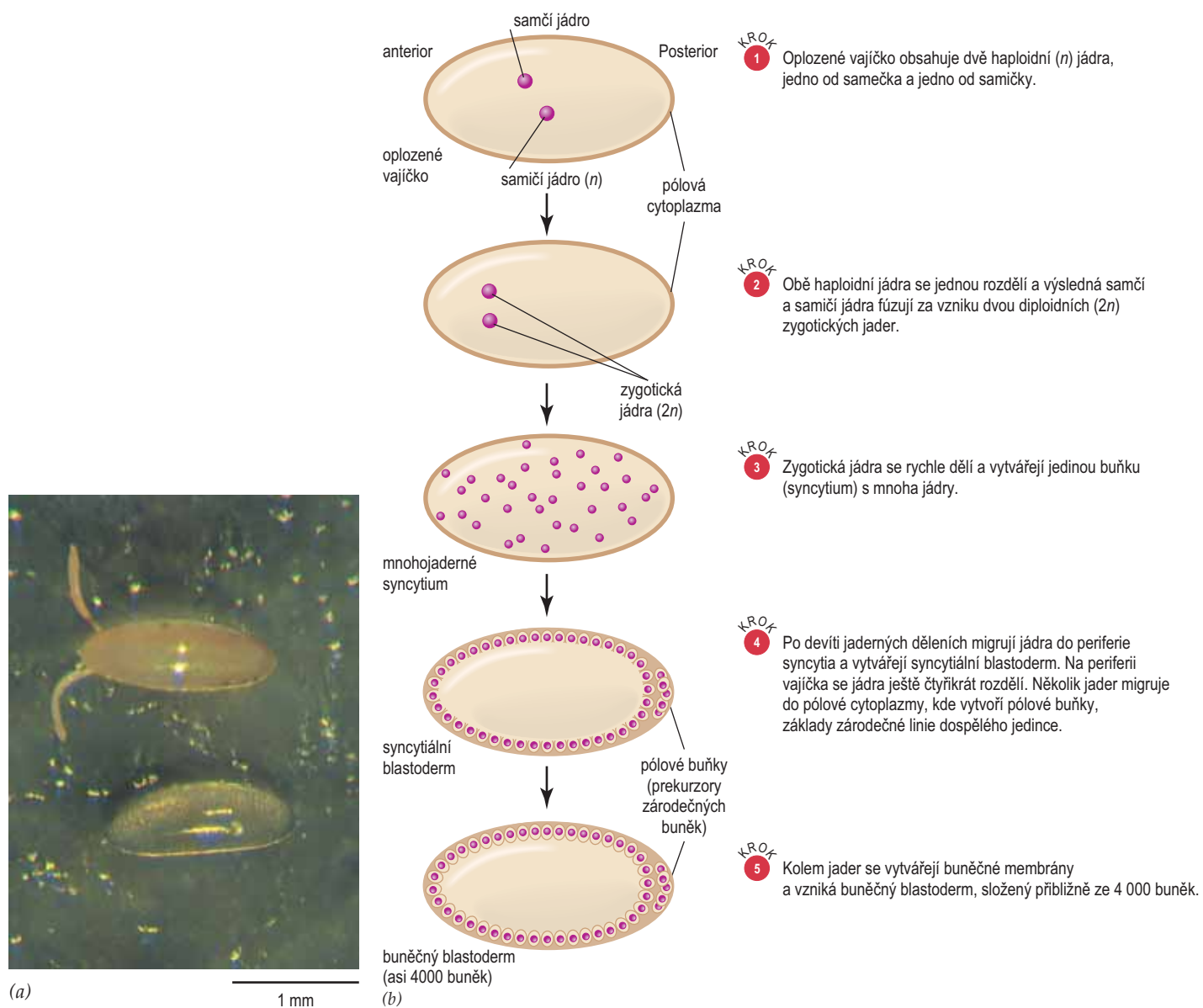
Touto strategií objasnili genetici velkou část procesů, které probíhají při vývoji drozofily a hlístice. Nyní již víme poměrně hodně o tom, jak se buňky specializují, jak se tvoří tkáně a orgány či jak vzniká tělní plán. Tyto vědomosti jsou také základem ke studiu vývoje jiných živočišných druhů,

včetně obratlovců, jako jsou myš nebo ryba zebřička. Studium modelových obratlovců zase poskytlo řadu informací o procesu vývoje člověka. Než se budeme zabývat touto problematikou, musíme charakterizovat základní rysy vývoje u dvou hlavních živočišných modelů, které se používají ke studiu genetického řízení vývoje – *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*.

CHARAKTERISTIKA VÝVOJE DROZOFILY

Dospělý jedinec drozofily (octomilky) se vyvíjí z elipsovitého vajíčka, která jsou asi 1 mm dlouhá a uprostřed 0,5 mm široká (**obr. 21.1a**). Každé vajíčko je obklopeno chorionem, obalem, který se tvoří z látek syntetizovaných somatickými buňkami ve vaječném obalu. Anteriorní konec vajíčka je rozlišen dvěma filamenti, které pomáhají do vajíčka přivádět kyslík. Spermie vstupuje do vajíčka skrze jinou anteriorní strukturu – *mikropyle*. Buněčná dělení, která po oplození nastávají, jsou tak rychlá, že se ani nevytvoří membrány mezi dceřinými buňkami. Proto je výsledné časné embryo octomilky ve skutečnosti jedinou buňkou s mnoha identickými jádry; taková buňka se nazývá *syncytium* (**obr. 21.1b**). Po devíti cyklech dělení je v syncytiu 512 jader, která se pohybují směrem k periférii vajíčka, cytoplazmatické membráně, kde ještě čtyřikrát pokračují v dělení. Některá jádra navíc migrují k posteriornímu pólu embrya. Po 13. cyklu dělení se všechna jádra syncytia oddělí buněčnými membránami, čímž vzniká jedna vrstva buněk na povrchu embrya. Tato buněčná vrstva se nazývá *buněčný blastoderm* a dává vznik všem somatickým konci vznikají pólové buňky, které vytvoří zárodečnou dráhu dospělého živočicha. Ve velmi časném stadiu vývoje se tedy oddělí somatická a zárodečná linie.

Trvá zhruba jeden den, než se embryo octomilky vyvine v červovitou strukturu – larvu. Ta se vylíhne tak, že se prožvýká skrze vaječný obal a začne hltavě přijímat potravu. Dvakrát svléká svůj obal, aby se přizpůsobila růstu, a poté, asi pět dnů po vylíhnutí, se stává imobilní a její obal se zpevní; vytváří se kukla. V průběhu dalších čtyř dnů většina larválních tkání zaniká a určité shluky buněk, které se vytvořily v průběhu larválních stadií, expandují a diferencují se v orgány dospělého, jako jsou tykadla, oči, křídla a nohy. Protože dospělý hmyz je též nazýván *imagem*, těmto shlukům buněk se říká *imaginální terčíky* (jejich umístění v larvě je znázorněno na **obr. 2.17**). Když je tato anatomická reorganizace ukončena, vylíhne se z kukly velmi odlišný živočich, který umí létat a rozmnožovat se.



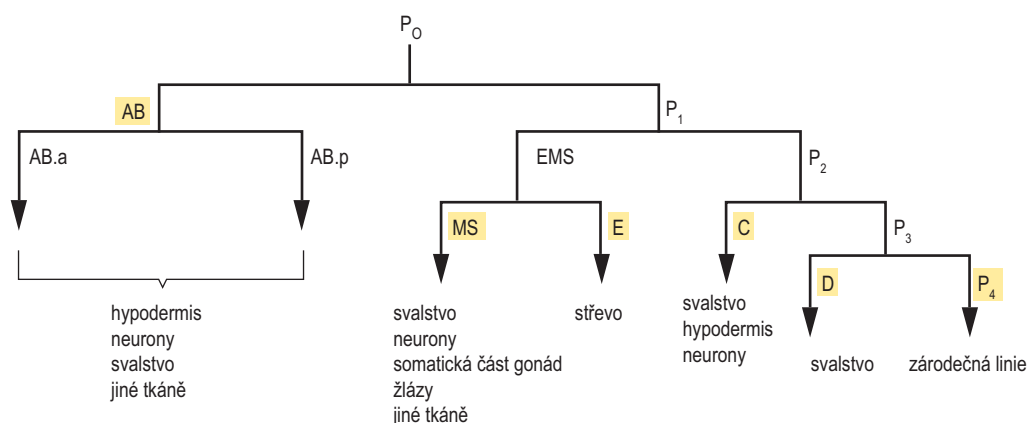
Obr. 21.1 ▶ Základní stadia vývoje drozofily. (a) Fotografie vajíček, nahoře s chorionem, dole již bez něj. (b) Časný embryonální vývoj.

CHARAKTERISTIKA VÝVOJE HLÍSTICE *C. ELEGANS*

Hlístice *C. elegans* (hádátka obecné) je asi 1 mm dlouhá, tedy obdobné velikosti jako vajíčko drozofily. Životní cyklus tohoto malého živočicha trvá jen asi tři dny. *C. elegans* je druhem hermafroditním (viz **obr. 2.18**, kde jsou diagramy hermafroditní a samčí formy živočicha). Hermafrodit tvoří spermie i vajíčka a může se množit samooplozením. Pro výzkum je možnost samooplození velmi vhodnou cestou k přípravě homozygotních recesivních mutantů. Hermafroditi mají dva chromozomy X a pět párů autozomů. Meiotickou nondisjunkcí příležitostně vznikají jedinci s jediným chromozomem X a pěti páry autozomů; tito živočichové jsou samečci, kteří vytvářejí pouze spermie,

nikoli vajíčka. Samečci s karyotypem X0 mohou být kříženi s hermafroditou XX s cílem rekombinačního mapování a testování komplementace.

C. elegans je živočich s průhledným tělem, což umožňuje v průběhu vývoje pozorovat každou buňku. John Sulston se spolupracovníky takto sledovali linie všech buněk počínaje jednobuněčnou zygotou a konče dospělým červem (**obr. 21.2**). Jejich výzkum ukázal, že jednotlivé události ve vývoji *C. elegans* jsou v podstatě konstantní. Každý dospělý hermafrodit sestává z 959 somatických jader (některé buňky jsou mnohojaderné), stejně tak je standardní i počet buněk zárodečné dráhy. Zygota *C. elegans* prochází přes řadu asymetrických buněčných dělení vedoucích k tvorbě šesti „zák-



Obr. 21.2 ▶ Část buněčných linií hermafrodita *C. elegans*. Buňka P₀ je oplozené vajíčko, ze kterého vzniknou dělením dvě buňky označované jako AB a P₁. Každá z těchto buněk se poté dělí a vytváří dva páry buněk, jeden pár označovaný AB.a a AB.p a druhý pár jako EMS a P₂. Další dělení těchto buněk a buněk z nich odvozených vede k tvorbě všech buněk dospělého hermafrodita. Šest základových buněk je vyznačeno žlutou barvou.

ladových“ buněk. Jedna z nich dá nakonec vznik celé zárodečné dráze, jedna střevu a jedna svalstvu. Ostatní tři základové buňky vytvářejí především nervy a další svalové buňky. Konstantní buněčné linie, které vytvářejí tkáň dospělého, činí z *C. elegans* jedinečný model studia vývoje.

Dalším charakteristickým rysem vývoje *C. elegans* je skutečnost, že některé buňky nepřežívají až do dospělosti. Tyto buňky mají naprogramovanou smrt. Jev buněčné smrti, nazývaný *apoptóza*, se vyskytuje v průběhu života u mnoha živočichů. Nejznámějším příkladem je smrt buněk mezi vyvíjejícími se prsty a palcem lidského embrya, což nakonec

vede k oddělení prstů. V kapitole 22 uvidíme, jakou roli hraje programovaná buněčná smrt v obraně proti tvorbě nádorů.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- ▶ U drozofily jsou vývojovými stadii vajíčko, embryo, larva, kukla a dospělec; časné embryo je syncytium – mnoho jader v jedné buňce.
- ▶ Dospělec *C. elegans* má konstantní buněčné linie, které lze zpětně sledovat až do úrovně jednobuněčné zygoty.

▶ Genetická analýza vývojových drah

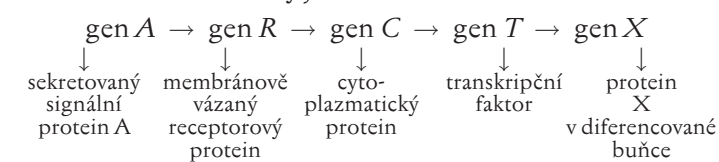
Vývojové dráhy lze studovat pomocí identifikace genů, jejichž produkty hrají roli v diferenciaci specifických fenotypů.

Myšlenka, že fenotypy jsou výsledkem série kroků v metabolické dráze a že geny řídí každý z těchto kroků, se objevila už ve 30. a 40. letech dvacátého století v genetických a biochemických studiích. V té době již bylo známo, že v buňkách probíhá velké množství biochemických reakcí katalyzovaných specifickými enzymy a že některé reakce mohou hrát roli při tvorbě určité vývojové dráhy (viz kapitola 14). Genetický výzkum ukázal, že každý enzym dráhy je kódován jedním genem. Mutace v některém z těchto genů by proto mohly inaktivovat důležitý enzym blokující celou dráhu a vedoucí k mutantnímu fenotypu. Bylo zřejmé, že studium takových mutací umožňuje identifikovat každý krok dráhy. Analýzou více párů mutací lze někdy navíc zjistit kroky i ve správném časovém sledu. Tato genetická analýza biochemických drah byla brzy rozšířena studiem dalších biologických procesů, včetně vývojových.

Vývojová dráha sestává z událostí hrajících roli v diferenciaci tkání a orgánů. Na těchto událostech se podílejí různé genové produkty, včetně takových, jako jsou signální molekuly, signální receptory, přenašeči signálu či tran-

skripční faktory. Mohou tu být zapojeny i jiné druhy regulačních proteinů. V dráze nakonec vzniknou komponenty, které vytvářejí struktury specifických tkání a orgánů. Tak se vytváří fenotyp.

Komponenty dráhy jsou uspořádány způsobem, který umožňuje vytvoření fenotypu. Gen *A* může vytvářet sekretovaný protein, který působí jako signál ke stimulaci transkripce genu *X*, jehož produkt je složkou diferencované – to je strukturálně a funkčně specializované – buňky. Tato stimulace může být zprostředkována jinými genovými produkty, jako jsou například membránový receptor pro protein *A*, který aktivuje intracelulární proteiny. Jeden nebo více transkripčních faktorů reagují na tuto aktivaci vazbou na zesilovače poblíž genu *X*, a tím indukují jeho expresi. Celková struktura dráhy je



V této vývojové dráze jsou různé proteiny uspořádány do kauzálního řetězce, který nakonec vytváří protein charakteristický pro určitou diferencovanou buňku. Šipky mezi geny v této dráze naznačují časovou posloupnost, ve které musí genové produkty přispívat k diferencovanému stavu.

Příkladem genetické analýzy vývojové dráhy mohou být procesy pohlavní diferenciaci u drozofily a hlístice. Detailně byly u těchto dvou organismů prozkoumány dráhy pohlavní diferenciaci somatických tkání v samčí nebo samičí struktury. Jiné dráhy, dosud méně prostudované, určují vývoj tkání uvnitř samčí či samičí zárodečné linie. Jak bylo zjištěno, somatické dráhy určující pohlaví u drozofily a hlístice zahrnují zcela odlišné molekulární mechanismy. Zatímco u drozofily klíčové geny kódují proteiny, které regulují sestřih RNA, u hlístice kódují signální molekuly, jejich receptory a transkripční faktory. U obou živočišných modelů však dráha určující pohlaví reaguje na stejný základní signál, kterým je poměr chromozomů X vůči sadám autozomů. Když je tento poměr roven 1 či vyšší, dráha vytváří samičí fenotyp (případně hermafroditní, jako je tomu u hlístice),

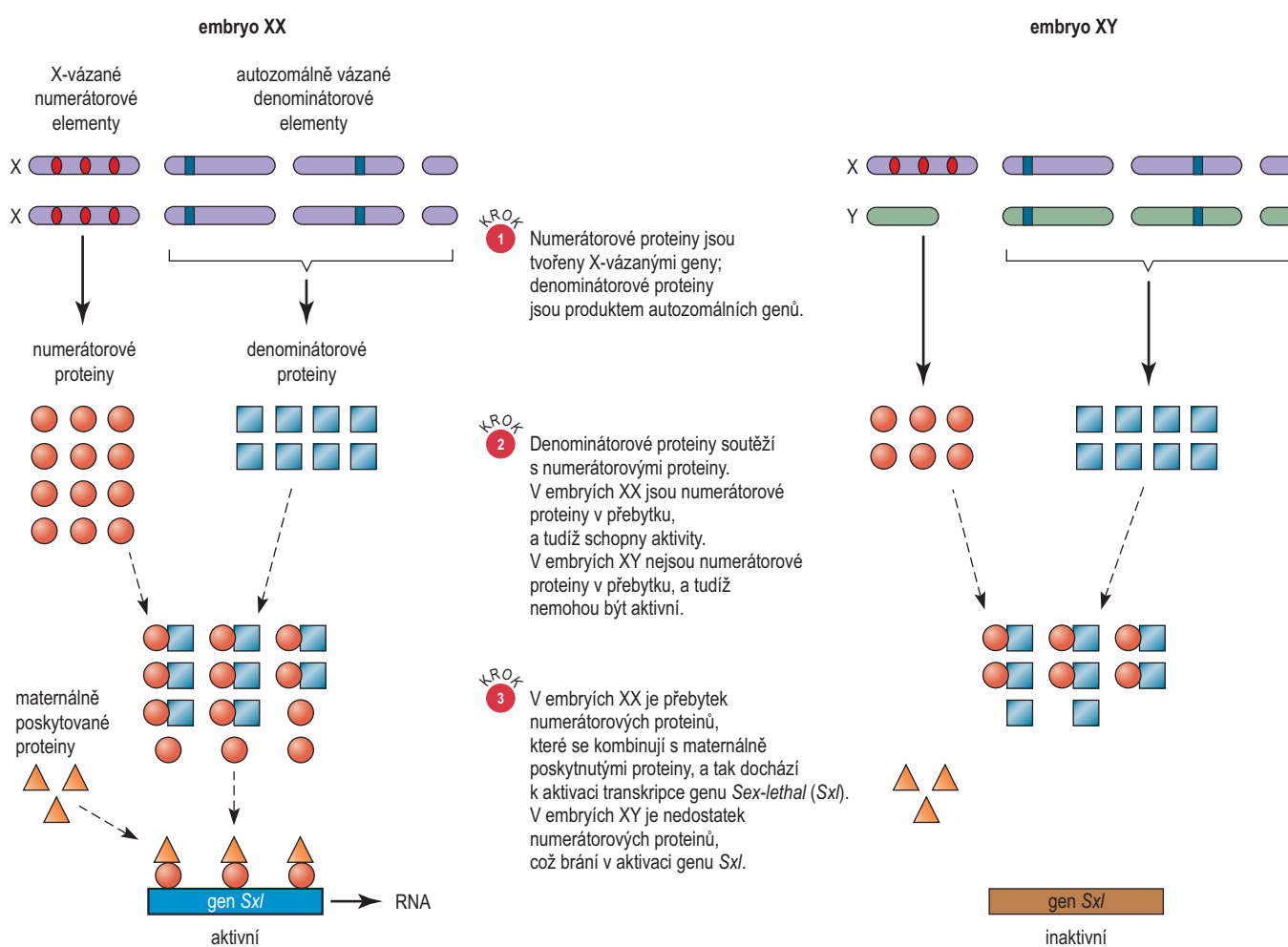
a pokud je tato hodnota 0,5 či nižší, dráha vede k samčímu fenotypu.

DETERMINACE POHLAVÍ U DROZOFILY

Dráha určující pohlaví má u drozofily tři základní komponenty: (1) systém ke zjištění poměru X:A ve velmi časném embryu, (2) systém konverze tohoto poměru ve vývojový signál a (3) systém, který reaguje na tento signál tvorbou buď samčích, nebo samičích struktur.

Zjišťování poměru X:A

Podstatou zjišťování poměru X:A jsou interakce mezi maternálně syntetizovanými proteiny, uloženými do cytoplazmy vajíčka, a embryonálně syntetizovanými proteiny, které jsou kódovány několika geny vázanými na chromozom X (**obr. 21.3**). Z důvodu striktní dávkové závislosti mají tyto X-vázané proteiny dvakrát vyšší hladinu v embryích s konstitucí XX než v embryích XY, a tím umožňují „počítání“ přítomných chromozomů X. Protože



Obr. 21.3 ▶ Zjišťování poměru X:A pomocí numerátorových a denominátorových elementů u drozofily. Tento poměr je určován interakcemi mezi proteinovými produkty příslušných genů.

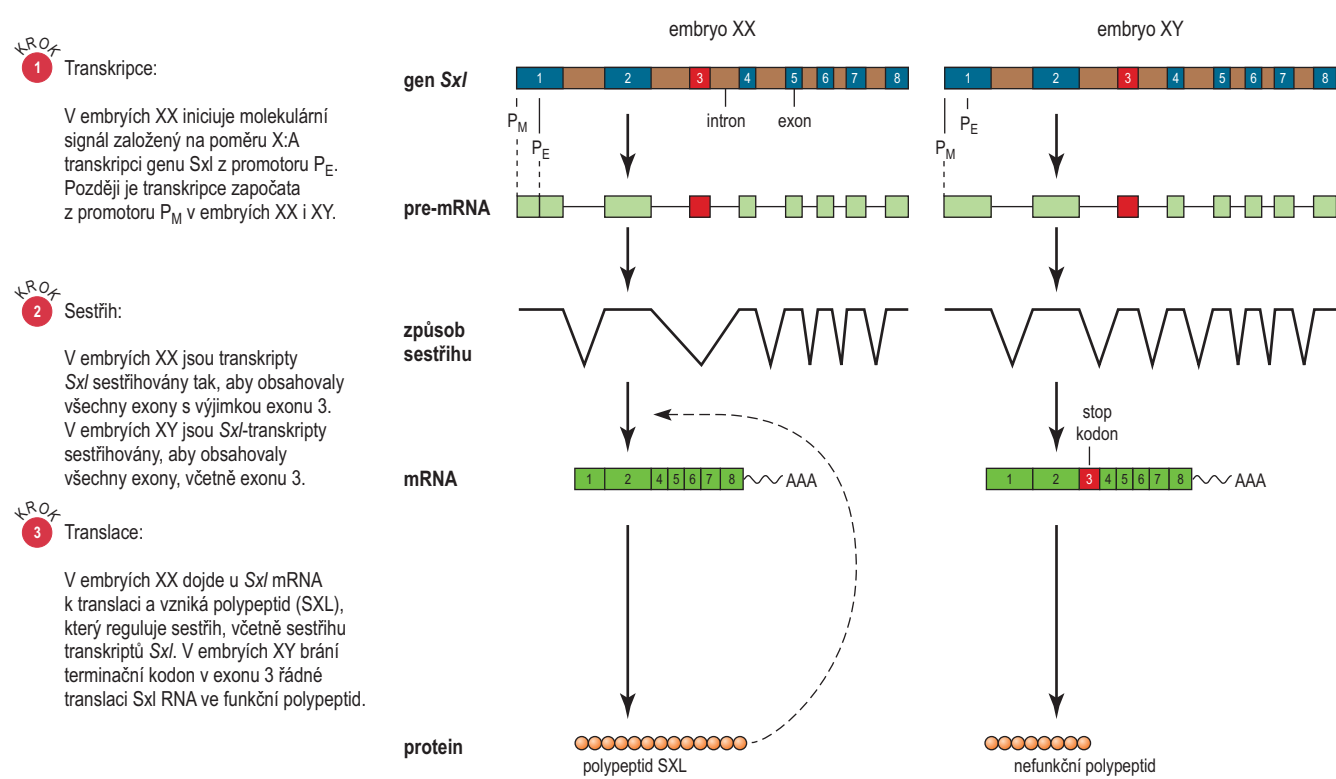
geny, které kódují tyto proteiny, ovlivňují čísel (numerátor) poměru X:A, nazývají se *numerátorovými elementy*. Jiné geny, které jsou lokalizovány na autozomech, ovlivňují jmenovatel (denominátor) zlomku X:A. Tyto tzv. *denominátorové elementy* kódují proteiny, které soutěží s produkty numerátorových elementů. Pokud je dávka denominátorových elementů zvýšena, vnímaná dávka numerátorových elementů pochopitelně poklesne a počet přítomných chromozomů X je vlastně podhodnocen. Tento proces se vyskytuje u drozofily se dvěma chromozomy X a třemi sadami autozomů (genotyp XX; AAA); takoví jedinci jsou spíše intersexuálního typu než samičího. Systém zjišťování poměru X:A je tedy založen na antagonismu mezi X-vázanými (numerátorovými) a autozomálními (denominátorovými) genovými produkty.

Vznik vývojového signálu

Po zjištění poměru X:A dojde k jeho převedení na molekulární signál, který řídí expresi X-vázaného genu *Sex-lethal* (*Sxl*), klíčového regulátoru determinace pohlavní dráhy (**obr. 21.4**). V časném vývoji tento signál aktivuje transkripci genu *Sxl* z P_E , což je jeho „časný“ promotor, avšak pouze v embryích XX. „Časné“ transkripty z tohoto promotoru jsou sestřihány a po translaci se vytvoří funkční

protein Sex-lethal, označovaný SXL. Po několika málo cyklech dělení je transkripce z promotoru P_E nahrazena transkripcí z jiného promotoru P_M , tzv. udržovacího promotoru genu *Sxl*. Je zvláštní, že transkripce z promotoru P_M začíná také v embryích XY. Transkripty z promotoru P_M jsou řádně sestřihovány pouze za přítomnosti funkčního proteinu SXL. Proto v embryích XY, kde se tento protein nevytváří, jsou transkripty *Sxl* alternativně sestřihovány a ponechán je exon s terminačním kodonem. Po translaci těchto alternativně sestřihovaných transkriptů se vytváří pouze krátký polypeptid bez regulační funkce. Alternativní sestřih *Sxl*-transkriptů tedy nevede k tvorbě funkčního proteinu SXL, a při jeho absenci se embrya vyvíjejí jako samečci. V embryích XX, kde SXL původně vzniká v reakci na X:A signál, jsou *Sxl*-transkripty z promotoru P_M sestřihovány, aby kódovaly další protein SXL. V embryích XX je tedy tento protein pozitivním regulátorem své vlastní syntézy – zvláštní zpětnovazebný mechanismus, který udržuje expresi proteinu SXL v embryích XX a brání expresi v embryích XY.

Protein SXL také reguluje sestřih transkriptů dalšího genu dráhy určující pohlaví, genu *transformer* (*tra*) (**obr. 21.5**). Tyto transkripty mohou být upravovány dvěma různými cestami. U samečků XY, kde protein SXL není přítomen, sestřihový aparát vždy ponechává terminační



Obr. 21.4 ▶ Pohlavně specifická exprese genu *Sex-lethal* (*Sxl*) u drozofily. 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.

kodon ve druhém exonu *tra* RNA. Po translaci takto sestřižené *tra* RNA se vytváří poškozený (a nefunkční) polypeptid. U samiček, kde je protein SXL přítomen, je tento předčasný stop kodon alespoň v některých transkriptech odstraněn alternativním sestřihem. Při translaci pak vzniká funkční protein *transformer* (označovaný TRA). Protein SXL tedy umožňuje syntézu funkčního proteinu TRA v embryích XX, avšak nikoli v embryích XY.

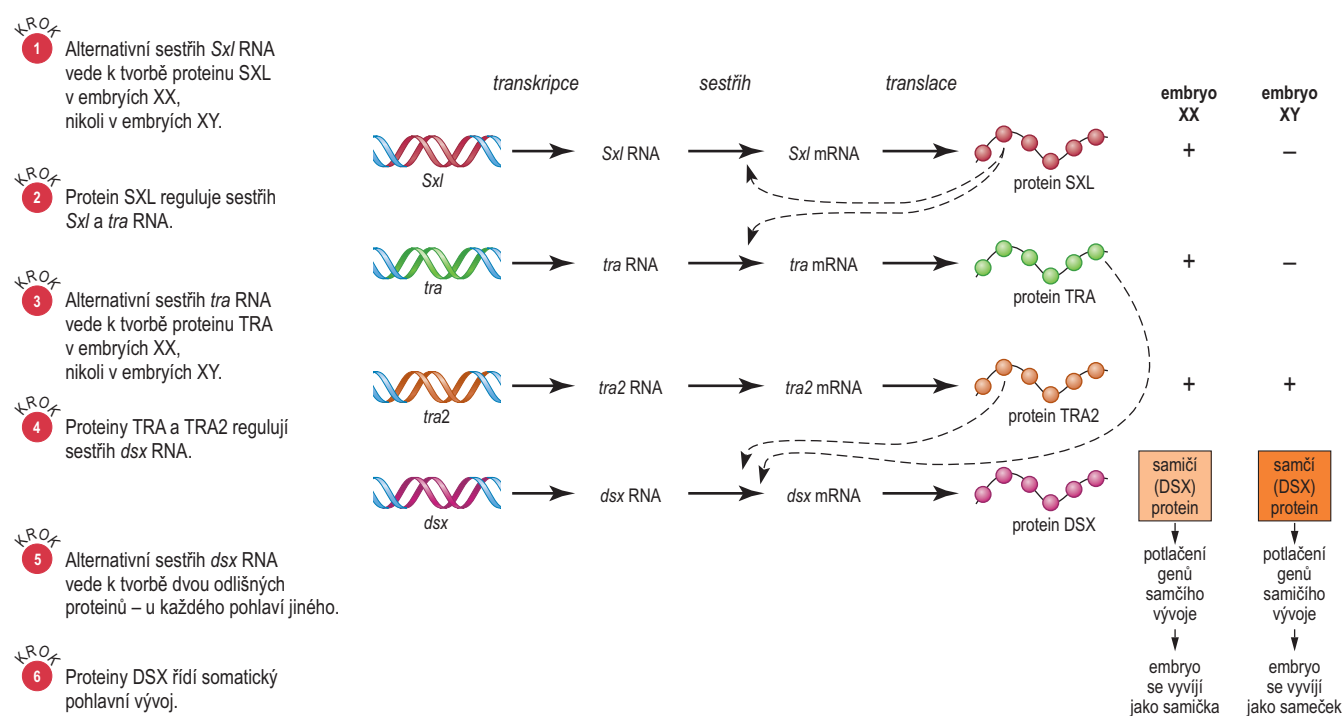
Diferenciace jako reakce na signál

Protein TRA je také regulátorem sestřihu RNA. Společně s TRA2, proteinem kódovaným genem *transformer2* (*tra2*), řídí expresi *doublesex* (*dsx*), autozomálního genu, který může vytvářet alternativním sestřihem své RNA dva odlišné proteiny. V embryích XX, kde je protein TRA přítomen, jsou *dsx*-transkripty upravovány ke kódování proteinu DSX, který potlačuje geny nutné pro samčí vývoj. Taková embrya se proto vyvinou v samičky. V embryích XY, kde není protein TRA přítomen, jsou transkripty *dsx* sestřihovány ke kódování proteinu DSX, který potlačuje expresi genů nutných pro samčí vývoj. Tato embrya se vyvinou jako samečci. Proteiny TRA a TRA2 také řídí úpravy transkriptů jiného autozomálního genu zvaného *fruitless* (*fru*). V části Zaměřeno na: *fruitless* se popisuje, jak byla objasněna úloha tohoto genu v pohlavní diferenciaci.

Mutace genů určujících pohlaví

Od každého genu v pohlaví určující dráze u drozofily byly získány mutace (tab. 21.1). Mutace genu *Sxl* vedoucí ke ztrátě jeho funkce brání tvorbě proteinu SXL u samiček. Homozygotní mutanti by se proto měli vyvinout jako samečci; hynou však v embryonálním stadiu. Tato embryonální letalita není důsledkem počínající pohlavní transformace, ale spíše abnormalitou systému kompenzace dávky genů (kapitola 20). Gen *Sxl* reguluje kromě vývoje pohlaví také kompenzaci dávky genů. Ačkoli mechanismus ještě není zcela objasněn, gen *Sxl* zřejmě brání hyperaktivaci X-vázaných genů v jedincích XX. Pokud tato hyperaktivace nastane, jako je tomu u homozygotních mutantů *Sxl*, embrya XX hynou, protože dojde k příliš vysoké expresi X-vázaných genů. U jedinců XY však mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *Sxl* nemá žádný projev, což je v souladu se skutečností, že protein SXL normálně u samečků nevzniká.

Mutace genů *transformer* a *transformer2* vedoucí ke ztrátě jejich funkce mají stejný fenotyp: jedinci XX i XY se vyvíjejí jako samečci. Pohlavní transformace jedinců XX ukazuje, že oba geny, *tra*⁺ i *tra2*⁺ jsou nezbytné k samičímu vývoji; jsou však zcela postradatelné pro vývoj samečka. Mutace genu *dsx* vedoucí ke ztrátě funkce způsobují, že embrya XX i XY se vyvíjejí jako intersexuální. Tento intersexuální fenotyp



Obr. 21.5 ▶ 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 přítomnost či absenci různých proteinů.

▶ Tab. 21.1

Fenotypy mutací „ztráty funkce“ genů určujících pohlaví u *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*^a

gen	mutantní fenotyp jedinců XX	mutantní fenotyp jedinců XY (nebo X0)
<i>Drosophila melanogaster</i>		
numerátorový gen	letální	bez projevu
denominátorový gen	bez projevu	omezená životnost
<i>Sxl</i>		letální
<i>tra</i>	sameček	bez projevu
<i>tra-2</i>	bez pohlavně specifického projevu	sterilní sameček
<i>dsx</i>		sterilní intersex
<i>Caenorhabditis elegans</i>		
<i>xol-1</i>	bez projevu	letální
<i>sdc-1</i>	maskulinizace	bez projevu
<i>sdc-2</i>	maskulinizace	bez projevu
<i>sdc-3</i>	bez pohlavně specifického projevu	bez projevu
<i>her-1</i>	bez projevu	fertilní hermafrodit
<i>tra-2</i>	sameček	bez projevu
<i>fem-1</i>	samička	samička
<i>fem-2</i>	samička	samička
<i>fem-3</i>	samička	samička
<i>tra-1</i>	sameček	menší projev na gonádách

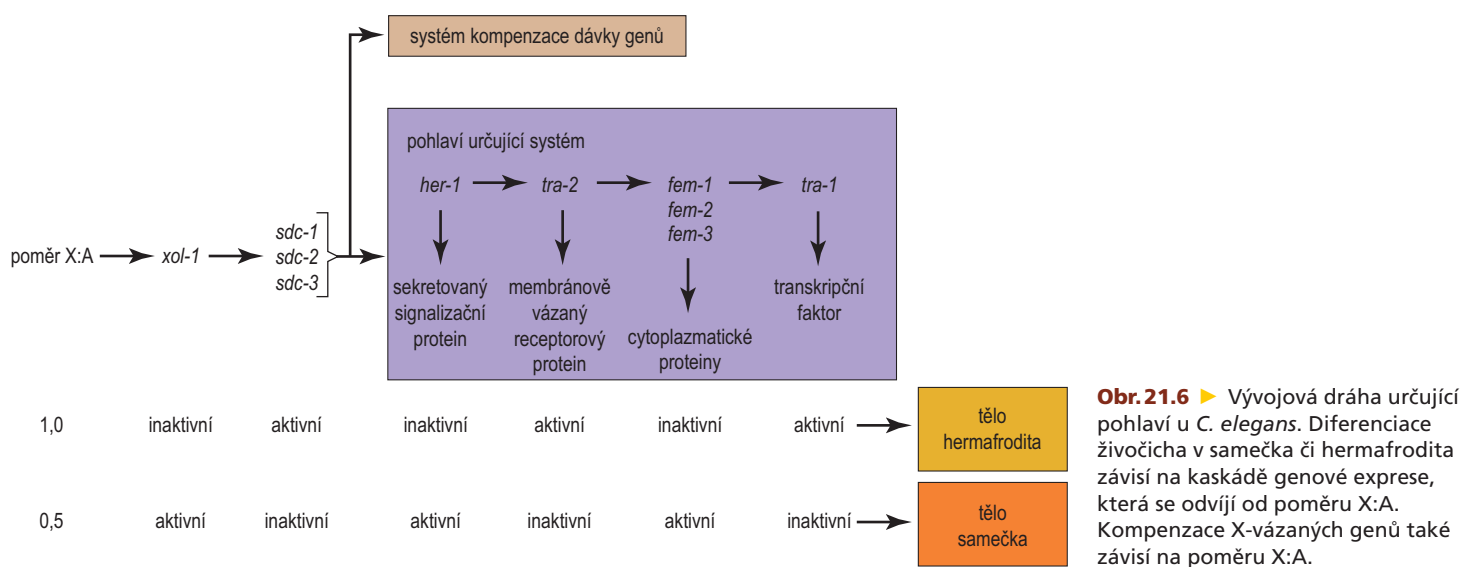
^aZdroj: Parkhurst, S. M., P. M. Meneely. 1994. *Science* 264:924–932.

vzniká proto, že v *dsx*-mutantech jsou aktivovány jak samčí, tak i samičí vývojové dráhy.

DETERMINACE POHLAVÍ U CAENORHABDITIS ELEGANS

Somatická pohlaví určující dráha u *C. elegans* obsahuje přinejmenším deset různých genů (obr. 21.6). Podobně jako u drozofily mění mutace těchto genů pohlavní vývoj

(tab. 21.1). Například ztrátové mutace dvou genů *transformer* – *tra-1* a *tra-2* (jde o jiné geny *transformer* než u drozofily) vedou k tomu, že jedinci XX se vyvíjejí jako samečci, a ztráta funkce genu *hermaphrodite* (*her-1*) způsobuje, že jedinci X0 se vyvinou jako hermafroditi. Tyto fenotypové změny ukazují, že produkty genů *tra-1* a *tra-2* jsou potřebné k normálnímu vývoji hermafrodita a že produkt genu *her-1* je nezbytný k normálnímu vývoji samečka. Mutace vedoucí ke ztrátě funkce jiných tří genů – *fem-1*, *fem-2* a *fem-3* (naz-



vány podle vlivu na feminizaci) způsobují, že jedinci X0 se vyvinou jako samičky. Tento feminizovaný fenotyp ukazuje, že produkty genů *fem* jsou potřebné k řádnému vývoji samečka.

Uvedených šest genů se podařilo uspořádat do signální vývojové dráhy. První gen, *her-1*, kóduje sekretovaný protein, který je signální molekulou. Druhý gen, *tra-2*, kóduje protein vázaný na membránu, který funguje jako receptor pro signalizační protein *her-1*. Produkty genů *fem* jsou cytoplazmatickými proteiny, které přenášejí signál *her-1*. Posledním genem v dráze je *tra-1* kódující transkripční faktor s doménou zinkových prstů, který reguluje geny důležité pro pohlavní diferenciaci.

Pohlavní determinační dráha u *C. elegans* zřejmě zahrnuje sérii negativních regulátorů genové exprese. Sekretovaný genový produkt *her-1* u jedinců X0 zjevně interaguje s genovým produktem *tra-2*, čímž ho inaktivuje. Tato interakce aktivuje tři genové produkty *fem* a tyto společně inaktivují genový produkt *tra-1*, který je pozitivním regulátorem samičí diferenciaci. Protože se jedinec bez aktivního proteinu *tra-1* nemůže vyvinout jako hermafrodit, vyvine se z něj sameček. Jedinci XX nevytvářejí protein *her-1*; jeho receptor – protein *tra-2* – zůstává aktivní. Aktivní protein *tra-2* způsobuje, že produkty genů *fem* jsou inaktivní, což dále umožňuje proteinu *tra-1* stimulovat samičí diferenciaci. Živočich se proto vyvíjí jako hermafrodit.

Pohlavní vývoj u hlístice v podstatě závisí, podobně jako u drozofily, na poměru X:A. Tento poměr je převeden na

molekulární signál, který řídí pohlavní diferenciaci. Signál kromě toho řídí i mechanismus kompenzace dávky genů, čímž *C. elegans* snižuje aktivitu obou chromozomů X u hermafrodita (kapitola 20). Signál z poměru X:A je usměrněn do obou drah, pohlavně-determinační a dávkově-kompenzační, prostřednictvím další dráhy, která obsahuje alespoň čtyři geny. Jeden z nich, *xol-1*, je nezbytný u samečků, ale nikoli u hermafroditů. Mutace genu *xol-1* vedoucí ke ztrátě jeho funkce způsobuje, že jedinci X0 hynou, proto se gen nazývá *X0-lethal*. Další tři geny – *sdc-1*, *sdc-2* a *sdc-3* (zkratky pro pohlavní determinaci a kompenzaci dávky) jsou negativně regulovány *xol-1*. Ztráta funkce těchto genů buď jedince XX zabíjí, nebo je promění v samečky. Geny *sdc* jsou tedy nezbytné pro vývoj hermafrodita, a nikoli samečka.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- ▶ U drozofily obsahuje dráha, která řídí pohlavní diferenciaci, několik genů, jež zjišťují poměr X:A, dále geny převádějící tento poměr ve vývojový signál a další geny, které reagují na tento signál vytvářením buď samčích, nebo samičích struktur.
- ▶ Gen *Sex-lethal (Sxl)* hraje v pohlavním vývoji octomilky klíčovou úlohu, neboť reguluje sestřih svého vlastního transkriptu, včetně sestřihu dalšího genu *tra*.
 - ▶ U hlístice obsahuje pohlavní determinační dráha geny, které kódují signalizační proteiny, jejich receptory, přenašeče signálu a transkripční faktory.

▶ Vývojová aktivita maternálních genů

Látky transportované do vajíčka v průběhu oogeneze hrají hlavní roli v embryonálním vývoji.

Důležité procesy se odehrávají ve vývoji živočišného těla dokonce ještě předtím, než je vajíčko oplozeno. V této době jsou do vajíčka transportovány výživné i determinační látky z okolních buněk, čímž dochází k vytváření zásobních zdrojů a následnému vývoji vajíčka – „molekulární ekvivalent mateřské lásky“. Tyto látky jsou vytvářeny expresí genů samičího reprodukčního systému, některé jsou exprimovány v somatických reprodukčních tkáních a jiné přímo v zárodečných tkáních. Cílem všech těchto genových aktivit je pomoci vajíčku ve vývoji po oplození. U některých druhů tyto maternální genové produkty ustavují základní plán embrya tak, že rozlišují hlavu od ocasu a hřbet od břicha. Tyto maternálně poskytované látky lze tedy považovat za koordinovaný molekulární systém, který slouží embryu jako návod k vývoji.

GENY S MATERNÁLNÍM ÚČINKEM

Mutace genů, které přispívají k tvorbě zdravých vajíček, nemusí mít přímý účinek na životnost nebo vzhled samičky,

která tato vajíčka vytváří. Jejich účinky se však mohou objevit v další generaci. Takové mutace nazýváme **mutacemi s maternálním účinkem**, protože mutantní fenotyp potomstva je způsoben mutantním genotypem matky.

Geny, které byly zjištěny takovými mutacemi, se nazývají **geny s maternálním účinkem**. Dobrým příkladem takového genu je *dorsal (dl)* u drozofily (**obr. 21.7**). Křížení mezi jedinci homozygotními pro recesivní mutaci tohoto genu dává neživotaschopné potomstvo. Tento letální efekt je striktně maternální. Křížení mezi homozygotními samičkami a homozygotními samečkami standardního typu vede k neživotaschopnému potomstvu, zatímco reciproké křížení (homozygotní mutantní samečci × homozygotní standardní samičky) tvoří životaschopné potomstvo. Letální účinek mutace *dorsal* se tedy manifestuje pouze u homozygotních samiček. Genotyp samečka tu nehraje žádnou roli.

Molekulární charakteristika genu *dorsal* odhalila podstatu jeho maternálního účinku. Gen *dorsal* kóduje transkripční faktor, který se vytváří v průběhu oogeneze a ukládá se ve vajíčku. Včasném vývoji hraje tento transkripční



▶ ZAOSTŘENO NA: *fruitless*

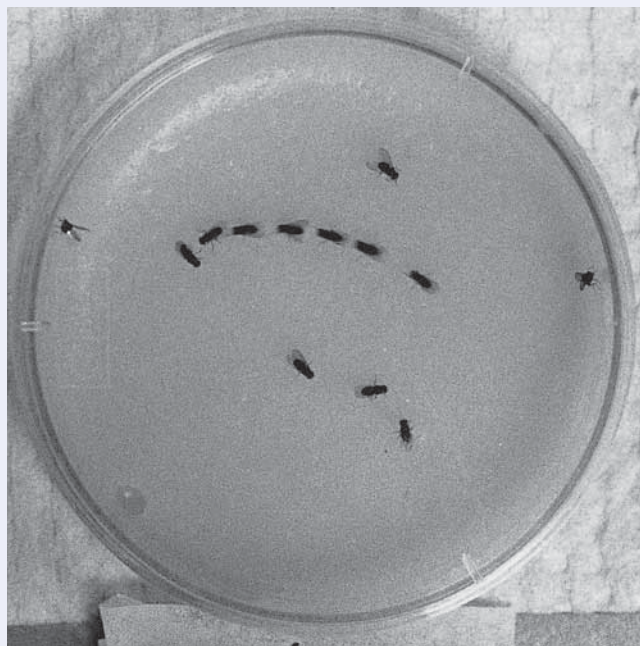
V roce 1963 na výroční konferenci Americké zoologické společnosti oznámil Kulbir Gill objev nové mutace, která vede k samčí sterilitě u drozofily. Samečci homozygotní pro tuto mutaci se nepokoušejí pářit se samičkami, dokonce ani když jim samičky samy nadbíhají. Navíc se mutantní samečci ucházejí o přízeň jiných samečků, jak mutantních, tak i standardních. Toto chování bylo velmi dobře patrné, když Gill umístil skupinu mutantních samečků do společné kultury. Samečci vytvořili dlouhé řetězce či kruhy, kde každý ze samečků byl přitahován samečkem před ním (**obr. 1**). Tato mutace způsobující samčí sterilitu však neměla žádný účinek na samičky. Homozygotní mutantní samičky se snadno křížily se standardními samečkami a vytvářely potomstvo.

Po mnoho let byla mutace samčí sterility, kterou Gill objevil, jen laboratorní kuriozitou. Teprve koncem 70. a počátkem 80. let minulého století provedli Jeffrey Hall se svými spolupracovníky pokusy o mapování této mutace a detailnější charakterizaci jejích fenotypových účinků. Mutace také dostala své jméno, *fruitless* (*fru*), což označuje samčí sterilitu.

V devadesátých letech se pak vědci z několika různých laboratoří pustili do společného úsilí klonovat gen *fru*. Jejich práce, publikovaná v roce 1996 Lisou Rynerovou jako hlavní autorkou,¹ ukázala, že *fru* kóduje transkripční faktor s motivem zinkových prstů, který reguluje geny pro samčí pohlavní chování či samčí sexuální preference u drozofily.

Dřívější genetické pokusy Barbary Taylorové naznačily, že *fru* by mohl řídit jednu větev dráhy určující pohlaví u drozofily (**obr. 22.9**). Proteiny TRA a TRA2 regulují sestřih *dsx* RNA. Alternativní sestřih transkriptů *dsx* u samečků a samiček vytváří odlišné formy transkripčního faktoru (DSX-samčí a DSX-samčí), které specificky regulují geny pro pohlavní diferenciaci. Taylorová si však všimla, že tvorba zvláštního abdominálního svalu u samečků není řízena genem *dsx*. Toto zjištění vedlo k závěru, že dráha determinující pohlaví má jednu větev, která není regulována genem *dsx*, ale jiným, dosud neznámým genem, a že neznámý gen by mohl, podobně jako *dsx*, kódovat pohlavně specifické transkripční faktory. Navíc se zdálo pravděpodobné, že tento neznámý gen by mohl být posttranskripčně regulován sestřihovými faktory, proteiny TRA a TRA2.

Proteiny TRA a TRA2 se vážou na sekvence RNA dlouhé 13 nukleotidů. Tato sekvence se v transkriptech genu *dsx* mnohokrát opakuje. Když Rynerová a její spolupracovníci začali klonovat gen *fru*, hledali také jiné geny, které na své RNA mají TRA/TRA2 místa dlouhá 13 nukleotidů. Jejich výzkum je přivedl k lokusu na chromozomu 3, kam byl gen *fru* mapován. Klonování a analýza DNA tohoto lokusu



Obr. 1 ▶ Samečci drozofily homozygotní pro mutaci genu *fruitless* (*fru*) jsou navzájem přitahováni. Každý sameček v řetězci je přitahován samečkem před ním.

odhalila molekulární strukturu genu *fru*. Obsahuje tři kopie vazebné sekvence pro TRA/TRA2 dlouhé 13 nukleotidů, a jak se očekávalo, jeho exprese je regulována na úrovni sestřihu proteiny TRA a TRA2.

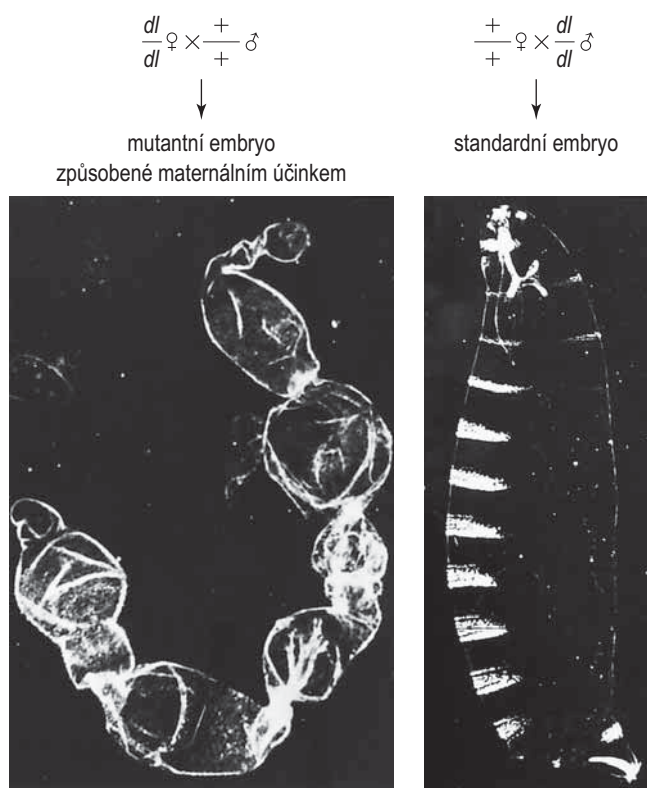
Charakteristika exprese genu *fru* je složitá; má několik promotorů a transkripty tohoto genu jsou sestřihovány alternativně u samečků a samiček. U samečků je alespoň jeden z produktů *fru* transkripčním faktorem; není jasné, jestli odlišná verze tohoto transkripčního faktoru se tvoří u samiček. RNA hybridizace *in situ* naznačují, že exprese *fru* je omezena jen na relativně malý počet neuronů v centrálním nervovém systému drozofily. O některých z nich se předpokládá, že řídí samčí sexuální chování.

Objev genu *fru* u drozofily naznačil, že sexuální orientace je geneticky řízena také u jiných druhů, včetně člověka. Například Dean Hamer se svými spolupracovníky se domnívají, že určitý gen na delším rameni chromozomu X přispívá k homosexualitě u mužů.² Povaha tohoto genu – pokud vůbec existuje³ – je však dosud neznámá.

¹Ryner, L. C., S. F. Goodwin, D. H. Castrillon, A. Anand, A. Vilella, B. S. Baker, J. C. Hall, B. J. Taylor, S. A. Wasserman. 1996. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell* 87: 1079–1089.

²Hamer, D. H., S. Hu, V. L. Magnuson, N. Hu, A. M. L. Pattatucci. 1993. A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation. *Science* 261:321–327.

³Rice, G., C. Anderson, N. Risch, G. Ebers. 1999. Male homosexuality: absence of linkage to microsatellite markers at Xq28. *Science* 284:665–667.



Obr. 21.7 ▶ Maternální účinek mutace genu *dorsal* (*dl*) u octomilky. Mutantním fenotypem je embryo, které postrádá ventrální tkáň; je tedy dorzalizované.

faktor významnou roli při diferenciaci dorzální a ventrální částí embrya. Když chybí, ventrální část se vytváří nesprávně, jako by byla na dorzální straně, a tvoří se embryo se dvěma dorzálními povrchy. Tomuto letálnímu stavu nelze zabránit standardní alelou *dorsal* zděděnou od otce, protože gen *dorsal* není v embryu transkribován. Exprese genu *dorsal* je v podstatě omezena jen na samičí zárodečnou dráhu. Mutace *dorsal* je tedy letální mutací se striktně maternálním účinkem.

DETERMINACE DORZO-VENTRÁLNÍ A ANTERIO-POSTERIORNÍ OSY EMBRYA DROZOFILY

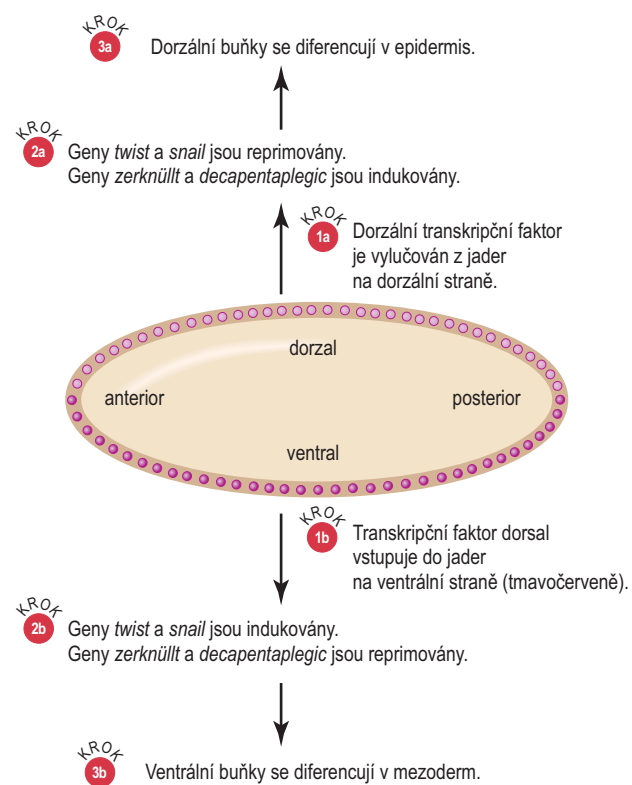
Živočichové s bilaterální souměrností mají dvě základní tělní osy, jednu rozlišující hřbet od břicha (dorzální strana od ventrální) a druhou odlišující hlavu od ocasu (anteriorní od posteriorní). Obě tyto osy jsou založeny ve velmi časném vývoji, u některých druhů dokonce ještě ve vajíčku před oplozením. U drozofily byly procesy tvorby os analyzovány geneticky pomocí mutací, které ovlivňují časný embryonální vývoj.

V sedmdesátých a osmdesátých letech 20. století prováděli rozsáhlé vyhledávání takových mutací Christiana Nüsslein-Volhardová, Eric Wieschaus, Trudi Schüpbachová, Gerd Jürgens a další. Tito vědci používali chemické mutageny

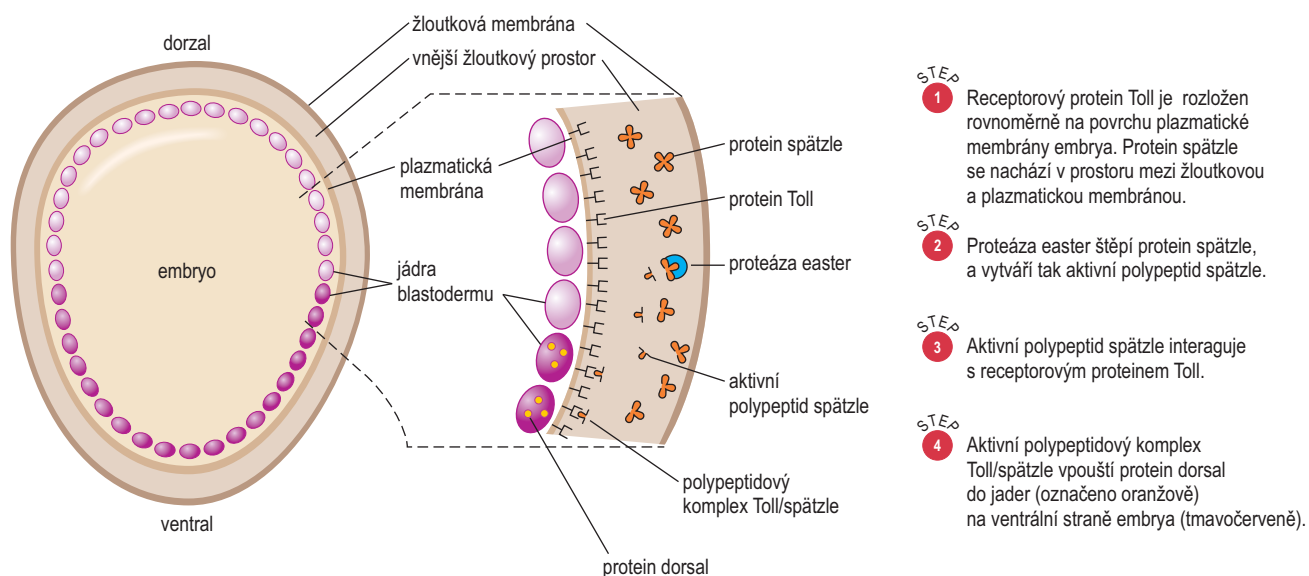
k indukci mutací na každém z chromozomů drozofily. Byly identifikovány četné mutace včetně letálních účinků maternálních genů, jako je například *dorsal*. Molekulární a genetická analýza těchto mutací přispěla k porozumění procesům časného vývoje octomilky.

Tvorba dorzo-ventrální osy

Diferenciace embrya drozofily podél dorzo-ventrální osy závisí na účinku transkripčního faktoru kódovaného genem *dorsal* (**obr. 21.8**). Tento protein je syntetizován maternálně a je ukládán v cytoplazmě vajíčka. Při tvorbě blastodermu vstupuje protein *dorsal* do jader na ventrální straně embrya a indukuje transkripci dvou genů zvaných *twist* a *snail* (žertovné názvy jsou odvozeny podle mutantních fenotypů). Ve stejných jádrech reprimuje protein *dorsal* geny *zerknüllt* (z německého výrazu „zmačkaný“) a *decapentaplegic* (z řeckých slov „15“ a „úder“). Selektivní indukce a represe genů způsobuje, že ventrální buňky se diferencují v primitivní embryonální vrstvu tkáně zvanou mezoderm. Na opačné straně embrya, kde protein nevstupuje do jader, nejsou geny *twist* a *snail* indukovány a geny *zerknüllt* a *decapentaplegic* nejsou potlačeny. Tyto buňky se následně diferencují v jinou primitivní tkáň, embryonální epidermis. Vstup transkripčního faktoru *dorsal* do ventrálních jader a jeho



Obr. 21.8 ▶ Determinace dorzo-ventrální osy drozofily proteinem *dorsal*. Tento protein je transkripčním faktorem, který působí pouze v jádrech na ventrální straně embrya. Protein *dorsal* reguluje geny *twist*, *snail*, *zerknüllt* a *decapentaplegic*.



Obr. 21.9 ► Diferenciace dorzo-ventrální osy embrya drozofily. Příčný řez ukazuje interakci mezi membránovým receptorovým proteinem Toll a polypeptidem proteinu spätzle, která indukuje diferenciaci podél dorzo-ventrální osy. K tvorbě interagujícího polypeptidu dochází v prostoru mezi plazmatickou membránou a žloutkovou membránou na ventrální straně embrya.

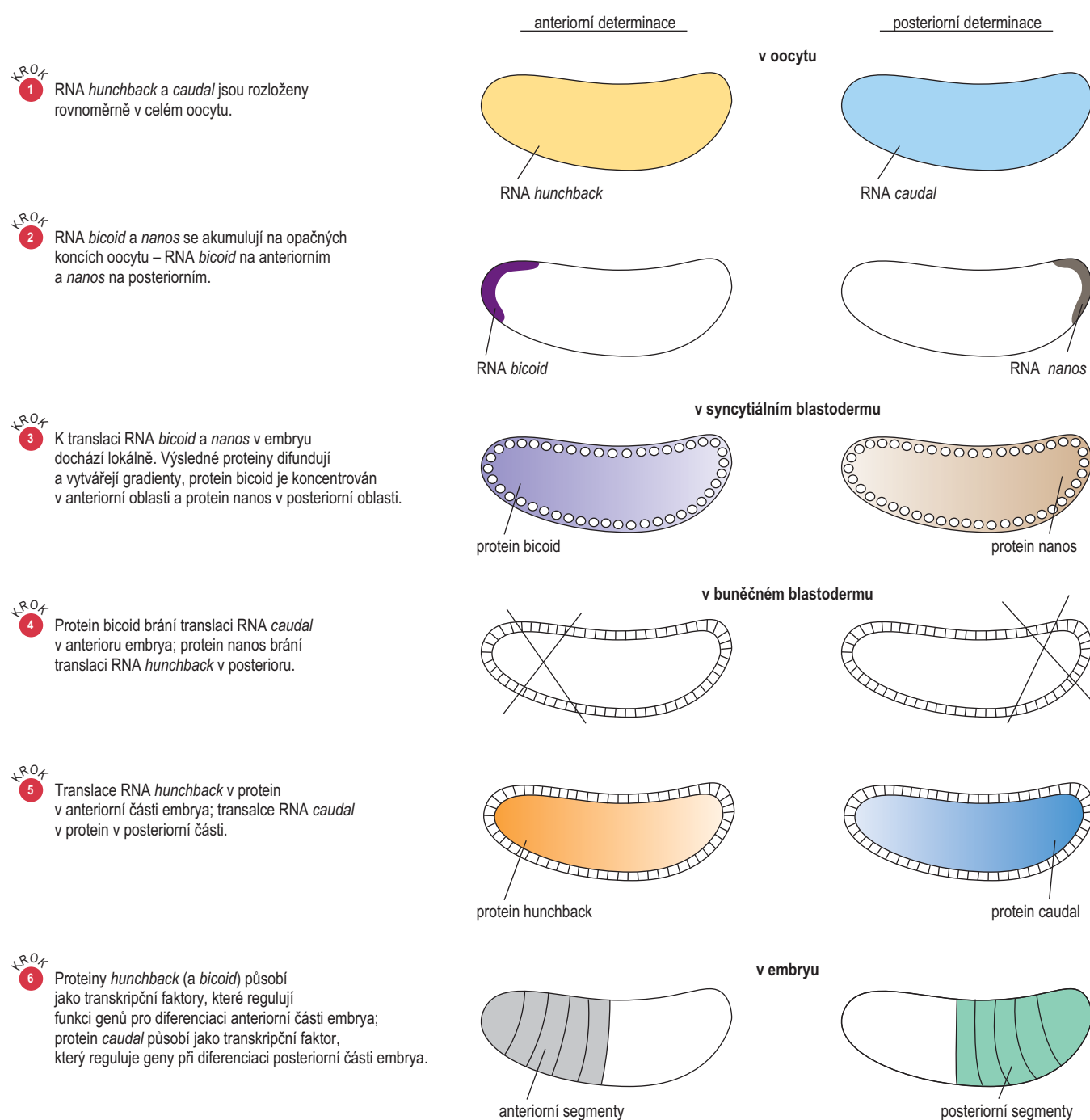
vyločení z dorzálních jader tak zahajuje diferenciaci podél dorzo-ventrální osy.

Co ale spouští pohyb proteinu dorsal do jader pouze na jedné straně embrya? Je to interakce mezi dvěma proteiny na ventrálním povrchu vyvíjejícího se embrya (**obr. 21.9**). Jeden protein, produkt genu *Toll* (z německého výrazu pro „chomáč“), je rozložen rovnoměrně na povrchu embrya; tento protein je zanořen v plazmatické membráně, která embryo obklopuje. Tím druhým proteinem je produkt genu *spätzle* (z německého výrazu pro „malý nok“), který se nachází ve vnějším žloutkovém prostoru, tj. tekutině v prostoru mezi plazmatickou membránou a vnější žloutkovou membránou. Účinkem proteázy kódované genem *easter* (protože byla objevena na Velikonoční neděli) je protein spätzle štěpen za tvorby polypeptidu, který interaguje s proteinem Toll. Protože však buňky, které obklopovaly vajíčko ve vaječníku, neposkytovaly maternální látky rovnoměrně, nastává štěpení proteinu spätzle pouze ve vnějším žloutkovém prostoru na ventrální straně embrya. Když protein Toll interaguje s ventrálně vznikajícím polypeptidem spätzle, vzniká uvnitř embrya kaskáda dějů, které nakonec vysílají protein dorsal do embryonálních jader. Tak působí protein dorsal jako transkripční faktor, který reguluje expresi genů *twist*, *snail*, *zerknüllt* a *decapentaplegic*. Membránový protein Toll tedy funguje jako receptor pro determinující polypeptid spätzle a fyzikální interakce mezi těmito dvěma molekulami působí jako signál ke spuštění genetického programu pro diferenciaci embrya podél jeho dorzo-ventrální osy.

Tvorba antero-posteriorní osy

Anterio-posteriorní osa těla drozofily je započata místně specifickou syntézou transkripčních faktorů kódovaných geny *hunchback* a *caudal* (**obr. 21.10**). Tyto dva geny jsou transkribovány ve výživových buňkách maternální zárodečné linie. Tyto zvláštní buňky podporují růst a vývoj oocyty. Maternální transkripty genů *hunchback* a *caudal* jsou pak přeneseny z výživových buněk do oocyty, kde se uniformně distribuují v cytoplasmě. Avšak k translaci obou typů transkriptů dochází v různých částech embrya; RNA *hunchback* je jen v anteriorní části, zatímco RNA *caudal* pouze v posteriorní části embrya. Tato odlišná translace vytváří koncentrační gradienty proteinů kódovaných těmito dvěma geny; protein *hunchback* je koncentrován v anteriorní části embrya a protein *caudal* v posteriorní části. Oba proteiny pak fungují jako aktivátory nebo represory genů, jejichž produkty jsou důležité pro diferenciaci embrya podél jeho antero-posteriorní osy.

Jaké faktory omezují translaci RNA *hunchback* do anteriorní části embrya a RNA *caudal* do posteriorní části? Ukázalo se, že zde hrají významnou roli dvě maternálně poskytované RNA, jedna z genu *bicoid* a druhá z genu *nanos*. Obě tyto RNA jsou syntetizovány ve výživových buňkách maternální zárodečné linie a poté jsou transportovány do oocyty. RNA *bicoid* se koncentruje na anteriorním konci vyvíjejícího se oocyty a RNA *nanos* na posteriorním konci. Po oplození vajíčka dochází k translaci každého typu RNA lokálně, načež výsledné proteinové produkty difundují skrz embryo a vytvářejí koncentrační gradienty; protein *bicoid* je



Obr. 21.10 ▶ Determinace antero-posteriorní osy drozofily maternálně poskytovanými RNA. Tyto RNA pocházejí z genů *hunchback*, *caudal*, *bicoid* a *nanos*. V každém obrázku oocytu či embrya je anterior vlevo a posterior vpravo.

tedy koncentrován na anteriorním a protein *nanos* na posteriorním konci.

Protein *bicoid* má dvě funkce. Jednak působí jako transkripční faktor, který stimuluje syntézu RNA z několika genů včetně *hunchback*. Tyto RNA jsou pak překládány do proteinů, které řídí tvorbu anteriorních struktur embrya. Dále působí protein *bicoid* jako zábrana translace *caudal*

RNA vazbou na sekvence v 3'-netranslatované oblasti její RNA. Kdekoli je tedy protein *bicoid* abundantní (tj. v anteriorní části embrya), nedochází k translaci RNA *caudal* v protein. Naopak všude, kde je hladina proteinu *bicoid* nízká (tj. v posterioru embrya), k translaci RNA *caudal* v protein dochází. Translační regulace RNA *caudal* proteinem *bicoid* je proto odpovědná za gradient proteinu

caudal, který se vytváří v embryu. Protože protein caudal je specifickým aktivátorem genů, které řídí posteriorní diferenciaci, vyvíjí se část embrya s nejvyšší koncentrací proteinu caudal v posteriorní struktury.

Na rozdíl od proteinu bicoid nepůsobí nanos jako transkripční faktor. Avšak, podobně jako bicoid, je translačním regulátorem. Protein nanos je koncentrován v posteriu embrya a tam se váže na 3'-netranslatovanou oblast hunchback RNA a způsobuje její degradaci. Následkem toho není protein hunchback v posteriu embrya syntetizován. Jeho syntéza je omezena na anteriorní část embrya, kde působí jako transkripční faktor regulující expresi genů důležitých v anteriorně-posteriorní diferenciaci. Tam, kde je protein hunchback syntetizován, vyvíjí se embryo v anteriorní struktury.

Proteiny bicoid a nanos jsou příklady morfogenů – látek, které řídí vývojové procesy v závislosti na jejich kon-

centraci. Koncentrační gradienty těchto dvou morfogenů jsou vůči sobě obrácené: kde je bicoid abundantní, nanos je nízký, a obráceně. Anterio-posteriorní osa těla drozofily je tedy určována vysokými koncentracemi těchto morfogenů na opačných koncích časného embrya.

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- Proteiny a RNA kódované geny s maternálním účinkem, jako jsou *dorsal*, *hunchback*, *bicoid* a *nanos*, jsou transportovány do vajíčka drozofily v průběhu oogeneze.
- Produkty genů s maternálním účinkem jsou důležité pro determinaci dorzo-ventrální a anterio-posteriorní osy embrya drozofily.
- Recesivní mutace genů s maternálním účinkem se fenotypově projevují jen v embryích tvořených samičkami, které jsou pro danou mutaci homozygotní.

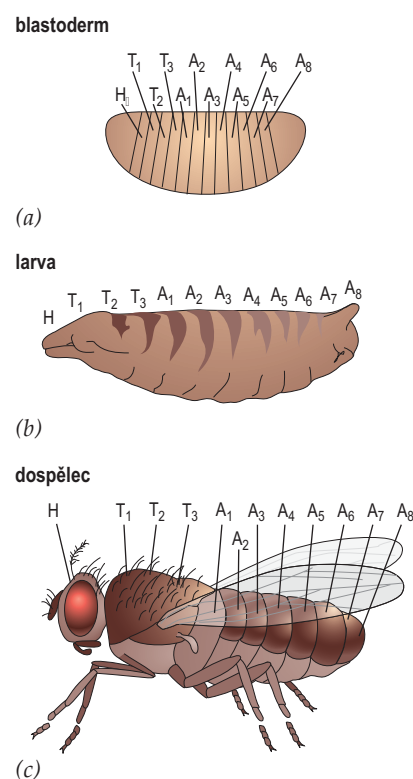
► Vývojová aktivita zygotických genů

Diferenciace buněčných typů a tvorba orgánů závisí na genech, které jsou aktivovány v určitém prostorovém a časovém sledu.

Nejranější procesy živočišného vývoje jsou řízeny maternálně syntetizovanými faktory. Avšak v určité fázi vývoje jsou geny v embryu specificky aktivovány a vytvářejí se nové látky. Tento proces je nazýván zygotickou genovou expresí, protože se odehrává až poté, co je vajíčko oplodněno. Počáteční vlna zygotické genové exprese je reakcí na maternálně syntetizované faktory. Například u drozofily maternálně poskytnutý transkripční faktor *dorsal* aktivuje zygotické geny *twist* a *snail*. Jak vývoj embrya pokračuje, vede aktivace jiných zygotických genů ke složité kaskádě genové exprese. Nyní se podíváme, jak tyto zygotické geny řídí další proces vývoje.

ČLÁNKOVÁNÍ TĚLA

U mnoha druhů bezobratlých živočichů je tělo tvořeno opakováním přilehlých částí těla zvaných segmenty či články. Dospělá drozofila má například hlavu, tři odlišné hrudní články a osm článků zadečku. Každý článek hrudi a zadečku může být specifikován barvou, uspořádáním chloupků a typem přívěšků k nim připojených. Tyto články jsou rozpoznatelné i v embryu a larvě (**obr. 21.11**). U obratlovců není toto segmentační uspořádání u dospělého tak zjevné, ale lze jej rozpoznat v embryu ze způsobu, jak nervová vlákna vybíhají z centrálního nervového systému, nebo z tvorby žaberních oblouků na hlavě či z uspořádání svalové hmoty podél anterio-posteriorní osy. Později ve vývoji jsou tyto rysy modifikovány a původní segmentační uspořádání se stává nečitelným. Článkování těla je však klíčovým znakem



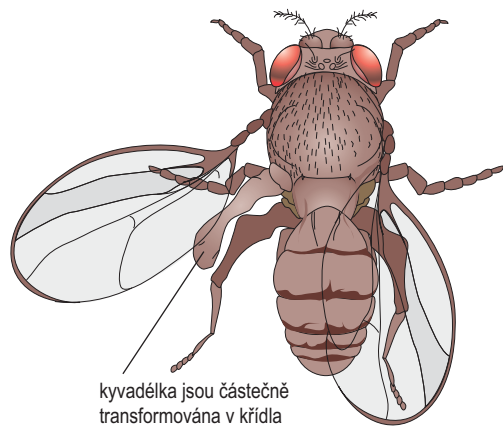
Obr. 21.11 ► Článkování těla drozofily ve vývojových stádiích (a) blastodermu, (b) larvy a (c) dospělého. Ačkoli články nejsou v blastodermu viditelné, jejich buňky jsou již předurčeny k tvorbě článků, jak je znázorněno v obrázku; H, hlavový článek (head); T, hrudní článek (torax); A, zadečkový článek (abdomen).

celého tělního plánu jak u obratlovců, tak u mnoha bezobratlých živočichů.

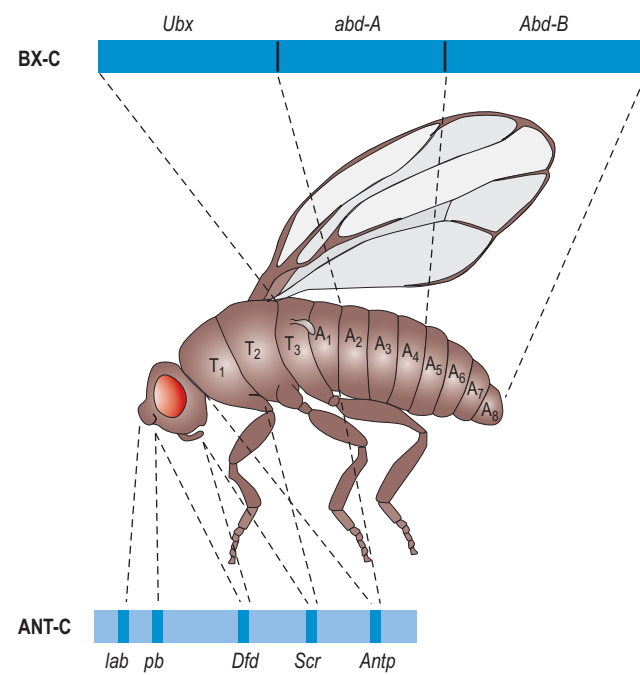
Homeotické geny

Zájem o genetické řízení článkování těla započal objevem mutací, které transformují jeden segment v jiný. První takovou mutaci objevil u drozofily v roce 1915 Calvin Bridges. Nazval ji *bithorax* (*bx*), protože ovlivňovala dva hrudní segmenty. U tohoto mutanta byl částečně transformován třetí hrudní článek ve druhý článek. To způsobilo, že drozofila vytvořila menší druhý, rudimentární pár křídel namísto struktur zvaných kyvadélka sloužících jen k balancování (**obr. 21.12**). Později byly u drozofily nalezeny i jiné mutace s transformací článků, například *Antennapedia* (*Antp*), mutant s tykadly na hlavě částečně transformovanými v nohy, které se jinak nacházejí na hrudi. Tyto mutace se začaly nazývat **mutace homeotické**, protože způsobují, že jedna část těla vypadá jako jiná. Slovo homeotický pochází od Williama Batesona, který zavedl termín *homeóza* jako označení případů, ve kterých „něco bylo změněno do podoby něčeho jiného“. Podobně jako řada jiných termínů, které zavedl Bateson, se homeóza stala standardním termínem moderního genetického slovníku.

Bithoraxový komplex byl prvním ze dvou homeotických genových komplexů, které byly analyzovány geneticky. Výzkum započal koncem 40. let minulého století prací Edwarda Lewise. Studium mutací BX-C Lewis ukázal, že standardní funkce každé části tohoto komplexu je omezena na specifickou oblast vyvíjejícího se živočicha. Pozdější analýzy tento závěr dále upřesnily. Studium ANT-C začalo v 70. letech minulého století, zejména prací Thomase Kaufmana, Matthew Scotta a jejich spolupracovníků. Ti kombinací genetických a molekulárních analýz ukázali, že geny ANT-C jsou také exprimovány místně specifickým způsobem. Geny ANT-C jsou však experimentovány více anteriorně než geny BX-C. Uspořádání exprese genů ANT-C a BX-C podél antero-posteriorní osy překvapivě ukázalo, že přesně odpovídá pořadí genů na chromozomu (**obr. 21.13**); dosud není jasné, proč tomu tak je. Vývojová dráha, kterou se každá buňka ubírá, tak zřejmě závisí na sadě



Obr. 21.12 ▶ Fenotyp mutace *bithorax* u drozofily.



Obr. 21.13 ▶ Homeotické geny komplexů bithorax (BX-C) a Antennapedia (ANT-C) u drozofily. Vyznačeny jsou části těla, kde jsou jednotlivé geny exprimovány.

homeotických genů, které jsou v nich exprimovány. Protože homeotické geny hrají klíčovou úlohu ve výběru identity jednotlivých buněk, jsou často nazývány **selektorovými geny**.

Proteiny kódované homeotickými geny jsou homeodoménové transkripční faktory. Tyto proteiny se vážou na regulační sekvence v DNA, včetně samotných regulačních sekvencí uvnitř komplexů bithorax a Antennapedia. Proteiny UBX a ANTP se například vážou na sekvenci uvnitř promotoru genu *Ubx*, což ukazuje, že homeotické geny se mohou regulovat navzájem. Byly identifikovány i jiné genové cíle homeodoménových transkripčních faktorů včetně těch, které kódují jiné typy transkripčních faktorů. Homeotické geny tedy zřejmě řídí regulační kaskádu cílových genů, které naopak determinují článkovou identitu jednotlivých buněk. Homeotické geny však nestojí na vrcholu regulační kaskády. Jejich aktivity jsou řízeny jinou skupinou genů exprimovaných ve vývoji časněji.

Segmentační geny

Většina homeotických genů byla identifikována mutacemi, které mění fenotyp dospělé drozofily. Stejně mutace však mají fenotypové účinky i na embryonální a larvální stadia. Tento závěr naznačil, že v segmentaci by mohly být vyhledáváním mutací nalezeny i jiné geny, které způsobují embryonální a larvální defekty. V 70. a 80. letech minulého století našli Christiane Nüsslein-Volhardová a Eric Wieschaus takovéto geny (viz Milníky genetiky: Mutace, které narušují segmentaci u drozofily v této kapitole). Našli celou novou sadu genů potřebných k segmentaci podél

anterio-posteriorní osy. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus rozdělili tyto **segmentační geny** do tří skupin podle mutantního fenotypu embryí.

- 1. Geny velkých mezer.** Tyto geny určují segmentační oblasti embrya. Dojde-li k jejich mutaci, pak celá sada navazujících tělních článků chybí; vytvářejí tedy anatomickou mezeru podél antero-posteriorní osy. Detailně byly analyzovány čtyři takové geny: *Krüppel* (z německého výrazu „mrzák“), *giant*, *bunchback* a *knirps* (z německého výrazu „trpaslík“). Každý z těchto genů je exprimován v určité oblasti časného embrya pod kontrolou genů s maternálním účinkem *bicoid* a *nanos*. Geny velkých mezer kódují transkripční faktory.
- 2. Geny párového pravidla.** Tyto geny určují uspořádání článků uvnitř embrya. Geny párového pravidla jsou regulovány geny velkých mezer a jsou exprimovány v sedmi alternujících pruzích podél antero-posteriorní osy, v podstatě dělící embrya na 14 odlišných zón zvaných *parasegmenty* (**obr. 21.14**). Některé mutace genů párového pravidla vedou k tvorbě embrya pouze s polovinou parasegmentů ve srovnání se standardním embryem. U těchto mutantů chybí vždy každý druhý parasegment, i když chybějící parasegmenty nejsou u všech mutantů genů párového pravidla stejné. Jako příklad můžeme uvést geny *fushi tarazu* (z japonského výrazu „něco chybí“) a *even-skipped*. U mutantů *fushi tarazu* chybějí parasegmenty s lichým pořadovým číslem; u mutantů *even-skipped* zase chybějí sudé parasegmenty. Také geny párového pravidla kódují transkripční faktory.
- 3. Geny polarity segmentů.** Tyto geny určují anteroiorní a posteriorní části jednotlivých tělních článků podél antero-posteriorní osy. Mutace **genů polarity segmentů** způsobují, že část každého článku je nahrazena zrcadlovou kopií sousední poloviny článku. Například mutace genu *gooseberry* způsobují, že posteriorní polovina



Obr. 21.14 ▶ Expresí RNA genu párového pravidla *fushi tarazu* (*ftz*) podmiňující uspořádání sedmi pruhů ve stadiu blastodermu embrya drozofily. RNA byla detekována hybridizací *in situ* se sondou specifickou pro *ftz*. Anteroiorní konec je vlevo, dorzální nahoře. Jiné geny párového pravidla vykazují odlišné uspořádání se sedmi proužky.

každého článku je nahrazena zrcadlovou kopií sousední anteroiorní poloviny článku. Mnoho genů polarity segmentů je exprimováno ve 14 úzkých proužcích podél antero-posteriorní osy. Tyto geny upřesňují uspořádání článků ustavené již geny párového pravidla. Příklady nejlépe prostudovaných genů polarity segmentů jsou *engrailed* a *wingless*; *engrailed* kóduje transkripční faktor a *wingless* kóduje signální molekulu.

Uvedené tři skupiny genů vytvářejí regulační hierarchii (**obr. 21.15**). Geny velkých mezer, které jsou regionálně aktivovány geny s maternálním účinkem, regulují expresi genů párového pravidla, jež zase regulují expresi genů polarity segmentů. V tomto procesu spolupůsobí homeotické geny, které jsou aktivovány geny velkých mezer a párového pravidla, a tak poskytují jedinečnou identitu segmentů podél antero-posteriorní osy. Interakce mezi produkty všech těchto genů pak upřesňují a stabilizují rozhraní mezi segmenty. Touto cestou je embryo drozofily postupně děleno na menší a menší jednotky.

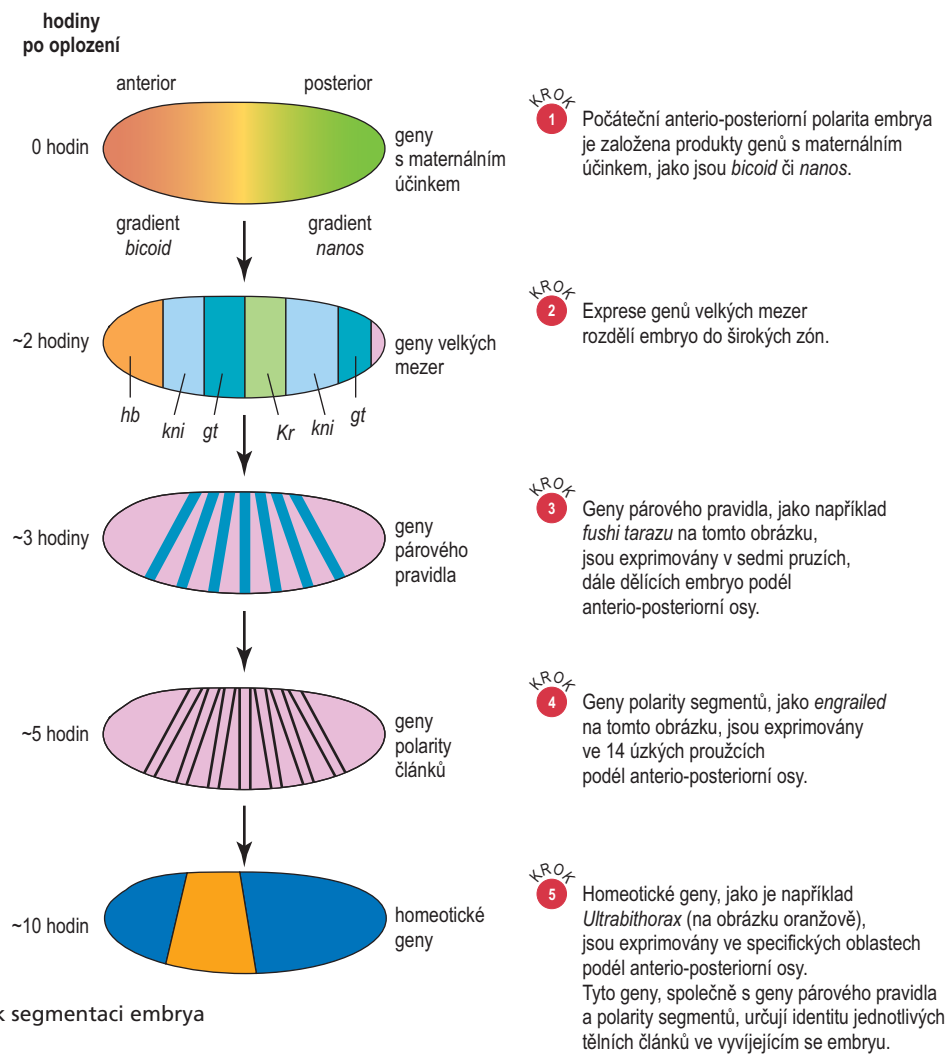
TVORBA ORGÁNŮ

Je-li větší množství odlišných typů buněk uspořádáno za specifickým účelem, vytvoří orgán. Jedním z význačných rysů orgánu je, že tvoří specifickou část těla. Tvorba srdce na hlavě či oka na hrudi drozofily by například byly extrémní raritou a my bychom se zajímali, co se stalo špatně. Anatomicky přesná tvorba orgánu je zjevně geneticky řízena.

Genetici získali představu o povaze tohoto řízení ze studia jednoho genu u drozofily. Tento gen je nazýván *eyeless* podle fenotypu, který mutace vyvolává (**obr. 21.16**). Standardní gen *eyeless* kóduje homeodoménový transkripční faktor, jehož účinek zapíná vývojovou dráhu, která zahrnuje několik tisíc genů. Na počátku je aktivováno několik podřízených regulačních genů. Jejich produkty pak spouštějí kaskádu dějů, které vytvářejí specifické buněčné typy uvnitř vyvíjejícího se oka.

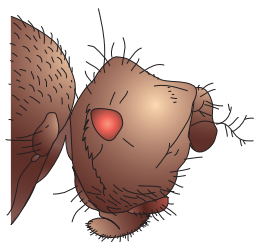
Úloha genu *eyeless* byla demonstrována jeho expresí ve tkáních, které normálně oko netvoří (**obr. 21.17**). Walter Gehring se svými spolupracovníky to dokázal konstrukcí transgenní mouchy, ve které byl gen *eyeless* fúzován s promotorem, který může být aktivován ve specifických tkáních. Aktivace tohoto promotoru způsobila transkripci genu *eyeless* mimo svou normální oblast exprese. Tato ektopická transkripce způsobila, že se oči vytvářely na nestandardních místech, jako jsou křídla, nohy a tykadla. Tyto extra (či ektopické) oči byly anatomicky v pořádku a potenciálně funkční; jejich fotoreceptory reagovaly na světlo.

Ještě více překvapivé bylo zjištění, že savčí homolog genu *eyeless* zvaný *Pax6* také vytváří tyto extra oči, když je vložen do chromozomů drozofily. Gehring se svými spolupracovníky použil myší homolog genu *eyeless* k transformaci drozofily a dosáhl stejného výsledku jako v případě genu *eyeless* samotného. Tento experiment prokázal, že myší gen,



Obr. 21.15 ▶ Kaskáda genové exprese vedoucí k segmentaci embrya drozofily.

který také kóduje homeodoménový protein, je funkčně ekvivalentní genu drozofily; reguluje dráhu vedoucí k tvorbě oka. Když je však myší gen vložen do drozofily, vytváří se oči složité, nikoli myší. Je tomu tak proto, že geny reagující na regulační příkaz vloženého myšího genu jsou normálními geny drozofily, které ovšem musí specifikovat její tvorbu oka. U myši vedou mutace homologu genu *eyeless* k redukci velikosti očí; proto je mutantní fenotyp nazýván *Small eye*. Homolog genů *eyeless* a *Small eye* byl také zjištěn u člověka. Mutace tohoto genu způsobují syndrom očních defektů



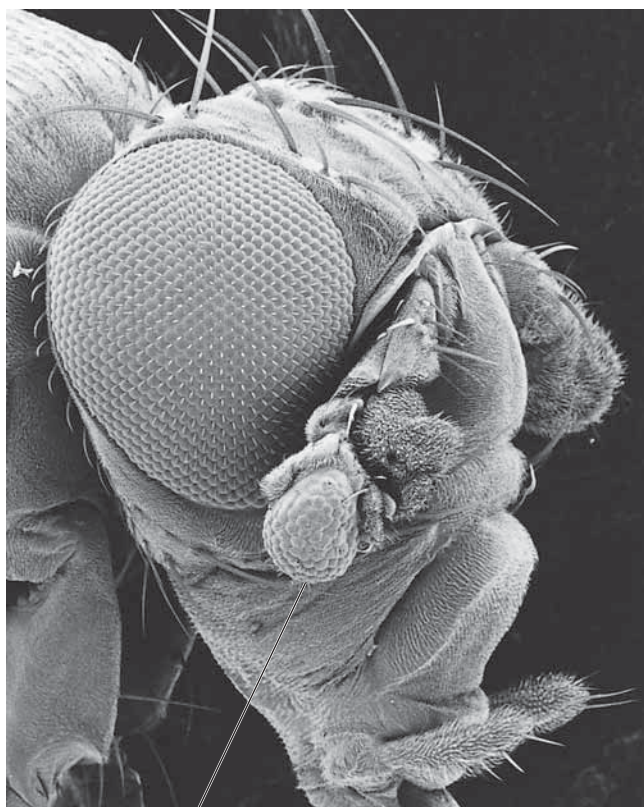
Obr. 21.16 ▶ Fenotyp mutantu *eyeless* u drozofily.

nazývaných *aniridia*, při kterém je duhovka redukována, nebo zcela chybí.

Odhalení homologických genů, které řídí vývoj oka u různých organismů, je významné z evolučního hlediska. Znamená to, že funkce těchto genů je velmi pradávna a datuje se do doby společného předka octomilky a savců. Je možné, že oči tohoto pravěkého organismu nebyly ničím jiným než shlukem světločivných buněk organizovaných prostřednictvím regulačních účinků primitivního genu *eyeless*. V průběhu evoluce tento gen pokračoval v regulaci zvýšeného počtu složitých procesů vývoje oka, takže dnes jsou i tak odlišné typy očí – hmyzu a savců – stále pod jeho řízením.

SPECIALIZACE BUNĚČNÝCH TYPŮ

Uvnitř orgánů se buňky diferencují specifickými cestami. Některé se například stávají neurony, zatímco jiné podpůrnými buňkami neuronů. Mechanizmy, které regulují tuto diferenciaci, byly studovány u několika odlišných



přidatné oko

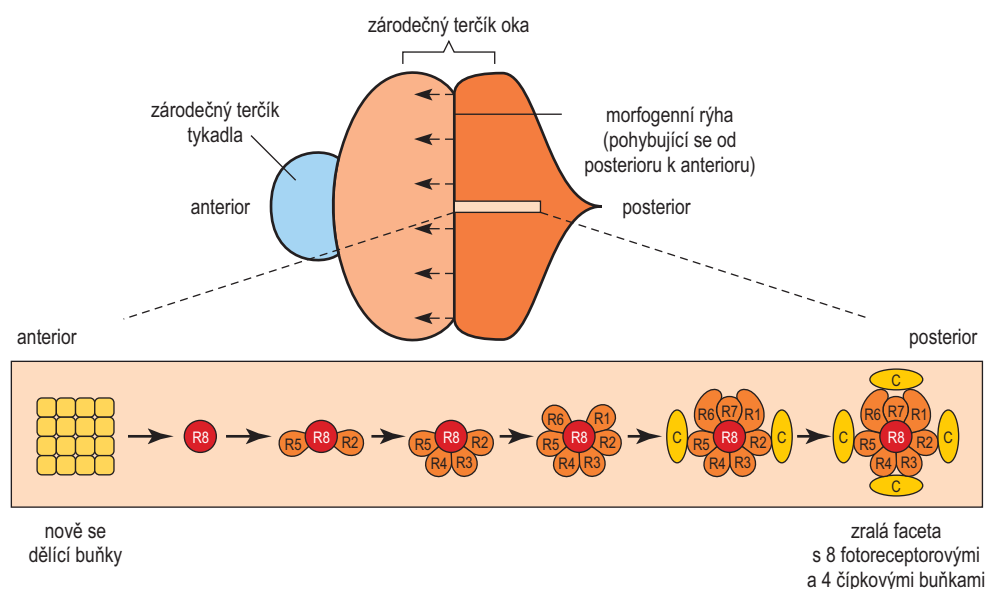
Obr. 21.17 ▶ Přidatné oko u drozofily vytvořené expresí standardního genu *eyeless* na tykadle.

buněčných typů. Dobrým příkladem takové situace je vývoj oka drozofily (**obr. 21.18**).

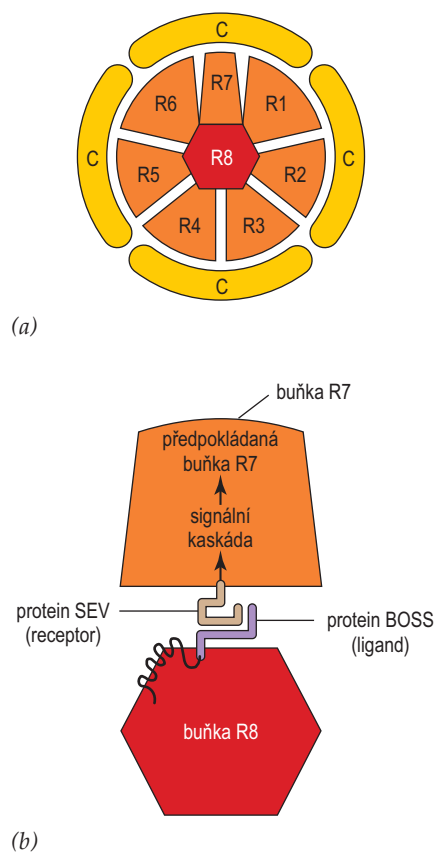
Každé z velkých složených očí octomilky začíná jako plochá rovina buněk v jednom z imaginálních terčků. Na počátku vypadají všechny buňky této epitelové vrstvy stejně, ale později v průběhu larválního stadia se poblíž posteriorního okraje objeví rýha. Tato rýha se pohybuje k anteriornímu konci skrze terčik, čímž spouští vlnu buněčných dělení. Nově rozdělené buňky se pak diferencují ve specifické buněčné typy, až vytvoří 800 jednotlivých facet dospělého oka. Každá faceta sestává z 20 buněk. Z toho je 8 fotoreceptorových neuronů specializovaných na příjem světla; 4 jsou čípkové buňky, které sekretují látky vytvářející čočku k zaostření světla do fotoreceptorů; 6 jsou buňky ochranného obalu s úkolem izolace a podpory a 2 zbývající buňky jsou senzory vlákna na povrchu oka. Z toho, co bylo jen holou plochou identických buněk, se tak vyvíjí vysoko uspořádaná struktura složitě diferencovaných facet. Čím je tato transformace způsobena?

Gerald Rubin se svými spolupracovníky se pokusil odpovědět na tuto otázku studiem mutací, které narušují vývoj oka. Jejich výzkum ukázal, že specifikace buněčných typů uvnitř každé facety závisí na sérii mezibuněčných komunikací. Toto je znázorněno diferenciací 8 fotoreceptorových buněk označených jako R1, R2, ... R8 (**obr. 21.19**). V plně vytvořené facetě je 6 fotoreceptorů (R1–R6) uspořádáno v kruhu kolem dvou zbývajících (R7, R8). Jedna z centrálních buněk, R8, je první, která se diferencuje ve vyvíjející se facetu. Následuje diferenciaci periferních buněk R2 a R5, potom R3 a R4, R1 a R6; nakonec se druhá centrální buňka R7 diferencuje ve fotoreceptor.

Rubin se svými spolupracovníky studovali diferenciaci buňky R7 a zjistili, že závisí na příjmu signálu z již diferen-



Obr. 21.18 ▶ Vývoj oka drozofily. Jak se morfogenní rýha pohybuje směrem k anterioru zárodečného terčiku oka, indukuje vlnu buněčných dělení. Nově rozdělené buňky se začínou diferencovat ve specifické typy. Dolní obrázek ukazuje diferenciaci fotoreceptorových (R1–R8) a čípkových (C) buněk, které vytvářejí každou facetu složeného oka.



Obr. 21.19 ▶ Determinace fotoreceptoru R7 facety složeného oka drozofily. (a) Uspořádání osmi fotoreceptorů (R1–R8) a čtyř čípkových buněk (C) ve facetě. (b) Signalizace mezi diferencovanou buňkou R8 a předpokládanou buňkou R7. Protein BOSS (kódovaný *bride of sevenless*) buňky R8 je ligandem pro receptorový protein *sevenless* (SEV) na povrchu buňky R7. Aktivace tohoto receptoru zahajuje signální kaskádu uvnitř buňky R7, a tím vyvolává její diferenciaci.

cované buňky R8. K přijetí tohoto signálu musí buňka R7 syntetizovat specifický receptor, membránový protein kódovaný genem zvaným *sevenless* (*sev*). Mutace tohoto genu narušují funkci receptoru a brání buňce R7 v diferenciaci v neuron; místo toho taková buňka diferencuje v čípkovou buňku. Signál pro receptor R7 je vytvářen genem zvaným

bride of sevenless (*boss*) a je specificky exprimován na povrchu buňky R8. Kontakt mezi diferencovanou buňkou R8 a nediferencovanou R7 spočívá na signálu R8, tak zvaném **ligandu**, který interaguje s receptorem R7, čímž jej aktivuje. Tato aktivace spouští kaskádu změn uvnitř buňky R7, které ji nakonec podnítí k diferenciaci v světločivný neuron. Diferenciace je pravděpodobně zprostředkována jedním nebo více transkripčními faktory, které působí na geny uvnitř jádra R7. Tak je signál z buňky R8 přenášen do jádra R7, kde mění typy genové exprese. Analýza vývoje oka drozofily tedy ukazuje, že **indukce**, proces determinující osud nediferencované buňky signálem z buňky diferencované, může hrát významnou úlohu ve specifikaci buněčných typů.

Protein kódovaný genem *sev* je tyrozinkináza, což je enzym, který fosforyluje zbytky tyrozinů v jiných proteinech. Když je protein SEV aktivován kontaktem s ligandem BOSS, fosforyluje jiné proteiny uvnitř buňky R7. Tyto intracelulární proteiny jsou dalšími efekty signálu BOSS. Nakonec aktivují transkripční faktory stimulující expresi genů, které hrají roli v diferenciaci buňky R7 jako fotoreceptoru. K objasnění signální dráhy BOSS-SEV si můžete prostudovat část **Zaostřeno na problém: Analýza drah buněčné diferenciaci s využitím mutací.**

NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

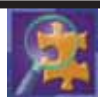
- ▶ Zygotické geny jsou po oplození aktivovány jako reakce na produkty maternálních genů.
- ▶ U drozofily regulují produkty segmentačních genů rozdělení embrya na sérii článků podél antero-posteriorní osy.
- ▶ Identita každého tělního článku je určována produkty komplexů homeotických genů *bithorax* a *Antennapedia*.
- ▶ Tvorba orgánu může záviset na produktu jediného regulačního genu, jako je u drozofily *eyeless*.
- ▶ U drozofily dochází po ustavení identity segmentů k diferenciaci specifických buněčných typů.
- ▶ Diferenciace může proběhnout jako interakce mezi signálem vyslaným jednou buňkou a receptorem druhé buňky, který signál přijímá.

▶ Genetická analýza vývoje obratlovců

Vývoj obratlovců lze studovat na základě vědomostí získaných ze studia bezobratlých, analýzou mutací a fenokopii mutantních genů u modelových obratlovců, jako jsou myš a ryba zebříčka, či zkoumáním diferenciaci kmenových buněk.

Poznatky o genetickém řízení vývoje pocházejí ze studií modelových bezobratlých – *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*. Genetici se ovšem snaží rozšířit tyto

poznatky i na jiné skupiny živočichů, zejména na obratlovce. Jednou ze strategií vedoucích k tomuto cíli je využití poznatků získaných ze studia genů bezobratlých k identifi-



▶ ZAOSTRĚNO NA PROBLÉM:

Analýza drah buněčné diferenciace s využitím mutací

ZADÁNÍ

Interakce mezi proteiny SEV a BOSS dává signál buňkám R7 drozofily k diferenciaci ve fotoreceptory ve faceti složeného oka; když tato interakce nefunguje, buňky R7 se diferencují jako čípkové buňky. Proteiny SEV a BOSS nejsou potřebné pro vývoj žádného jiného orgánu u daného druhu. (a) Určete fenotyp drozofil, které jsou homozygotní pro recesivní mutaci vedoucí ke ztrátě funkce v genu *sev*, resp. v genu *boss*. (b) Uveďte fenotyp jedince heterozygotního pro dominantní mutaci, jež konstitutivně aktivuje protein SEV. (c) Představme si, že jedna kopie této dominantní mutace („zisk funkce“) *sev* byla vnesena do genomu drozofily, která byla homozygotní pro recesivní mutaci vedoucí ke

ztrátě funkce genu *boss*. Jaký by byl fenotyp takového jedince? (d) Alela *sev^{B4}* je teplotně senzitivní; při 22,7 °C vyvíjejí homozygotní jedinci normální fotoreceptory R7, ale při 24,3 °C tuto schopnost ztrácejí. *sos^{2A}* je recesivní mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *son of sevenless (sos)*. Drozofily genotypu *sev^{B4}/sev^{B4}, sos^{2A}/+* ztrácejí schopnost vytvářet receptory R7, pokud se teplota zvýší na 22,7 °C. *sos^{2A}* tedy působí při této teplotě jako dominantní zesilovač mutantního fenotypu *sev^{B4}*. Kde pravděpodobně působí proteinový produkt standardního genu *sos*, nazývaný SOS, který by měl působit v dráze pro diferenciaci R7?

FAKTA A VÝCHODISKA

1. Mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu eliminuje funkci příslušného genového produktu.
2. Mutace způsobující zisk funkce genu vede k tvorbě genového produktu s novou funkcí.
3. Protein, který je konstitutivní, si uchovává svou funkci po celý život.
4. Protein kódovaný teplotně senzitivní mutací funguje při jedné teplotě, ale funkci ztrácí (popřípadě funguje špatně) při jiné teplotě, obvykle vyšší.

5. SEV je membránový protein tyrozinkináza, který přenáší extracelulární signál BOSS fosforylací tyrozínových zbytků na intracelulární proteiny.
6. Proteiny fosforylované SEV mohou působit jako další efektorové signály BOSS.
7. Podřízené efektorové proteiny nakonec aktivují geny potřebné k diferenciaci buněk R7.

ROZBOR A ŘEŠENÍ

Tento problém je zaostřen na vývoj oka drozofily – diferenciaci fotoreceptorové buňky R7. Klíčovým krokem tohoto vývoje je signalizace mezi ligandovou molekulou BOSS, která se nachází v membráně již diferencované buňky R8, a receptorem SEV, který je lokalizován v membráně dosud nediferencované buňky R7 (viz obr. 21.19). Ztráta funkce kteréhokoli z těchto proteinů zabrání signálu, aby vývojový proces pokračoval. **a.** Recesivní mutace vedoucí ke ztrátě funkce – ať už genu *sev*, či *boss* – proto povede k tvorbě jedinců, kteří nebudou mít v očních facetách fotoreceptory R7. **b.** Dominantní mutace způsobující zisk funkce však konstitutivně aktivuje protein SEV, který je nezbytný k diferenciaci

R7. **c.** Tato diferenciace je očekávána i tehdy, kdy má drozofila recesivní mutaci vedoucí ke ztrátě funkce genu *boss*, protože s konstitutivně aktivovaným proteinem SEV je funkce BOSS zbytečná. **d.** Jestliže je protein SEV aktivován – buď ligandem BOSS, nebo mutací vedoucí k zisku funkce genu *sev* – může defektní efektorový protein zastavit indukci diferenciace buňky R7. Protein SOS je zřejmě dalším efektozem v dráze k diferenciaci R7, protože když je snížen mutací jedné kopie genu *sos*, vykazují jedinci s částečně funkčním proteinem SEV mutantní fenotyp – přenos vývojového signálu prostřednictvím SEV a jemu podřízených efektorových proteinů je oslaben.

fikaci vývojově významných genů u obratlovců. Jinou strategií je studium modelových obratlovců pomocí podobných technik, jaké se užívají u drozofily a hlístice.

HOMOLOGIE GENŮ OBRATLOVCŮ A BEZOBRATLÝCH

Jestliže je určitý gen izolován a sekvenován, mohou se procházet databáze sekvencí DNA a hledat homologické geny u jiných organismů. Jestliže je genová sekvence v průběhu evoluce silně konzervována, funguje tento postup

dokonce i u velmi vzdálených druhů. Tak bylo možné identifikovat geny různých druhů obratlovců, které jsou homologické s geny drozofily či hlístice. Identifikace genu obratlovce pak umožňuje další experimentální analýzu, včetně studia genové exprese na úrovni RNA i proteinů.

Jednou z nejvýznamnějších aplikací tohoto přístupu byl objev homologů homeotických genů drozofily. Tyto tzv. geny *Hox* byly původně zjištěny Southernovou hybridizací myši a lidské DNA, kde jako sondy byly použity segmenty homeotických genů drozofily. Tyto hybridizující fragmenty

byly následně klonovány, mapovány s pomocí restričních endonukleáz a sekvenovány. Výsledky ukázaly, že myš, člověk a mnoho jiných obratlovců mají ve svých genomech 38 genů *Hox* (**obr. 21.20**). Tyto geny jsou obvykle organizovány ve čtyřech shlucích (*a*, *b*, *c*, a *d*), každý asi 120 kb dlouhý; u myši a člověka je každý shluk umístěn na jiném chromozomu. Zdá se, že čtyři shluky genů *Hox* vznikly kvadruplikací primordiálního shluku velmi časně v evoluci obratlovců, asi před 500 či 600 miliony let.

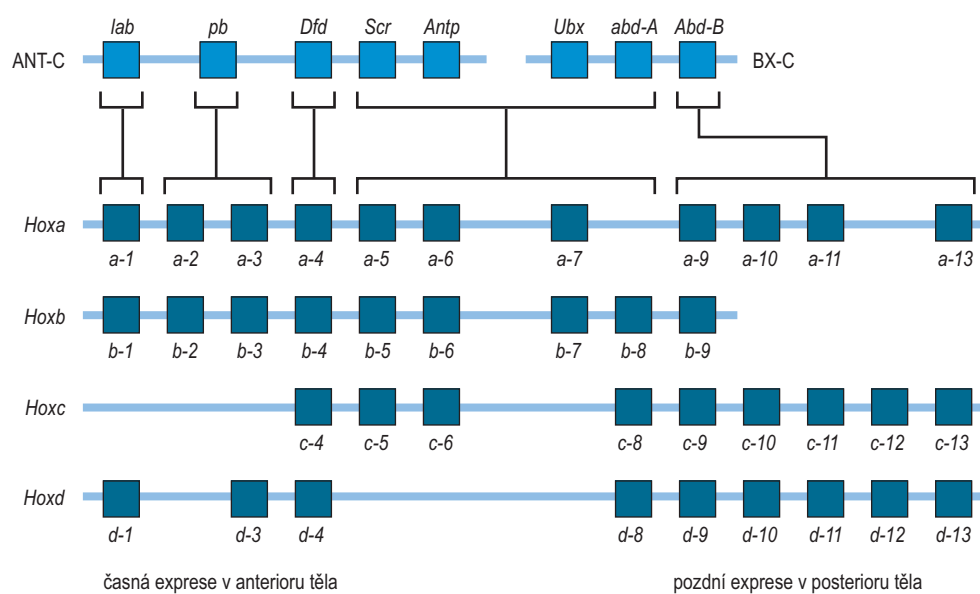
Molekulární analýza genů *Hox* u obratlovců odhalila výrazné strukturní a funkční podobnosti s homeotickými geny komplexů bithorax a Antennapedia u drozofily – jsou členy velkého shluku, zvaného HOM-C, který se v průběhu evoluce rozštěpil přestavbou chromozomu. U jiných typů hmyzu, jako je potěmník moučný, *Tribolium castaneum*, jsou komplexy bithorax a Antennapedia spojeny v jednom shluku. Srovnání mezi obratlovcem a bezobratlými ukazuje, že základní organizace HOM/*Hox* zůstala v evoluci zachována. Strukturní homologie genů ANT-C jsou na jednom konci každého genového shluku Hox obratlovců a strukturní homologie genů BX-C na druhém konci. Navíc fyzické pořadí genů *Hox* v každém shluku odpovídá místu jejich exprese podél antero-posteriorní osy embrya, stejně jako je tomu u homeotických genů o drozofily (**obr. 21.21**). S jedinou výjimkou, kterou je gen *Deformed* u drozofily, jsou všechny geny HOM a *Hox* transkribovány ve stejném směru, s expresí probíhající z jednoho konce shluku ke druhému, jak prostorově (od anterioru embrya k posterioru), tak časově (od časného k pozdějšímu vývoji). Tento jev nazývaný *kolinearita* (jde o jiný význam než termín použitý v kapitole 14 k popisu lineární sekvence míst v genu a jeho polypeptidovém produktu) naznačuje, že geny HOM a *Hox* představují obecný molekulární mechanismus k ustavení identity specifických oblastí mnoha různých typů embryí.

NÁHODNÉ MUTACE A GENOVĚ SPECIFICKÉ „KNOKAUT“ MUTACE U MYŠÍ

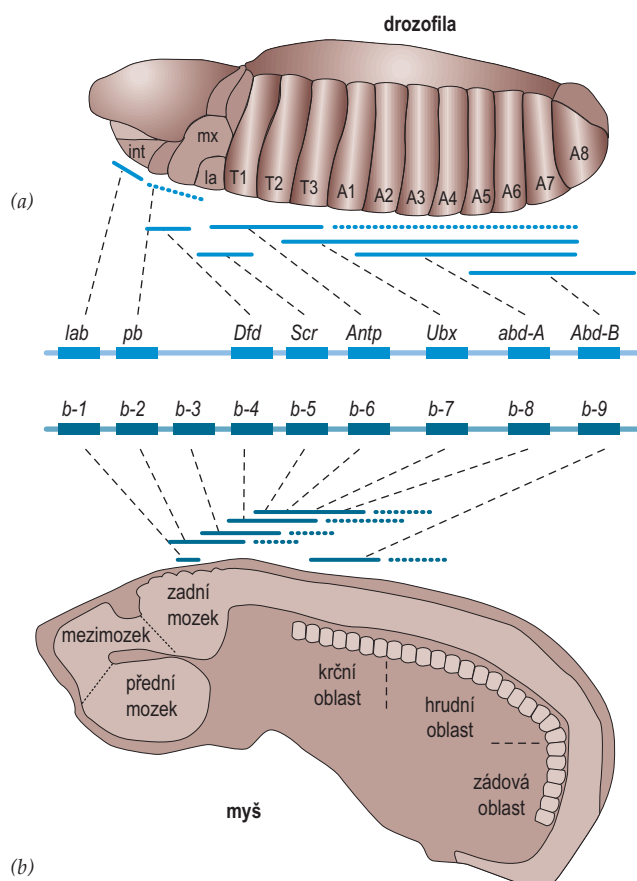
Genetické řízení vývoje nelze u obratlovců studovat do stejné hloubky jako u bezobratlých, třeba u drozofily. Zjevně tomu brání technické a logistické překážky. Obratlovci mají značně delší životní cyklus, jejich chov je náročný a je obtížné získat a analyzovat mutantní kmeny, obzvláště vývojové mutanty. Navzdory těmto překážkám se podařilo udělat pokrok v genetické analýze vývoje u dvou složitých obratlovců – myši a ryby zebříčky.

U myši bylo identifikováno více než 500 lokusů odpovědných za genetické choroby, z nichž některé také hrají významnou roli ve vývojových procesech. Většina těchto lokusů byla objevena při izolaci spontánních mutací. Taková práce vyžaduje chov velkého počtu myši a jejich fenotypovou analýzu a u jakýchkoli odchylek je testována jejich dědičnost. Tato usilovná a náročná práce může být prováděna pouze v několika laboratořích na světě. Nalezená mutace je dále mapována na chromozomy a poté se mutovaný gen může analyzovat na molekulární úrovni. Tento proces urychlily techniky indukce mutací inzercemi známých úseků DNA do genů. Inzerční mutace se pak daleko snadněji mapují a analyzují než spontánní mutace, protože jsou označeny vloženou DNA. Místo vložení sekvence – buď transpozonu, či inaktivovaného retroviru – obvykle není příliš specifické, proto jsou geny mutovány do jisté míry náhodně. Mohou tak vzniknout mutace v mnoha genech, které hrají roli ve vývojových procesech.

Genetici také vyvinuli postupy, jak u myši dosáhnout mutací specifických genů. V těchto postupech, jež jsou popsány v kapitole 17, je narušena integrita genu inzercí, která je do genu specificky cílena. Taková porucha, zvaná knockaut mutace, může odhalit, jakou roli ve vývoji hraje



Obr. 21.20 ▶ Organizace a exprese savčích genů *Hox* homologických ke genům v BX-C a ANT-C drozofily. Homologie jsou znázorněny svorkami. Všechny tyto geny s výjimkou *Dfd* jsou transkribovány zprava doleva. Je znázorněno časování a anatomické umístění exprese.



Obr. 21.21 ▶ Pořadí exprese homeotických genů drozofily a myši. (a) 10 hodin staré embryo drozofily s přibližnou expresí homeotických genů v epidermis. *Int*, *mx* a *la* označují interkalární, maxilární a labiální segmenty hlavy. Segmenty hrudi a zadečku jsou označeny jako T1–T3, resp. A1–A8. (b) 12 dnů staré embryo myši s přibližnou expresí genů *Hoxb* v centrálním nervovém systému. Čárkované symboly naznačují rozšíření exprese směrem k posterioru.

normální gen. Například myš, která je homozygotní pro knockaut mutaci genu *Hoxc-8*, vyvine přídatný pár žeber k posterioru standardní sady žeber; tyto myši mají také ohnuté prsty na předních končetinách. Fenotyp s přídatným párem žeber myši je reminiscencí transformace článků těla, které jsme viděli u homeotických mutantů drozofily. Myší gen *Hoxc-8* tedy hraje roli v ustavení identit tkání podél antero-posteriorní osy a také při vývoji prstů.

Genetická analýza vývoje myši je vodítkem k poznání vývoje člověka. Například mutace přinejmenším dvou různých myších genů napodobují vývoj abnormální levo-pravé asymetrie u člověka. Standardně lidé, myši a jiní obratlovci vykazují struktury, které jsou souměrné podél levo-pravé tělní osy. Srdeční trubice se vždy vychyluje doprava a játra, žaludek a střeva jsou posunuta buď vlevo, nebo vpravo od střední linie těla. U mutantů nejsou tyto asymetrie zjevné, zřejmě v důsledku defektu mechanismů, které usta-

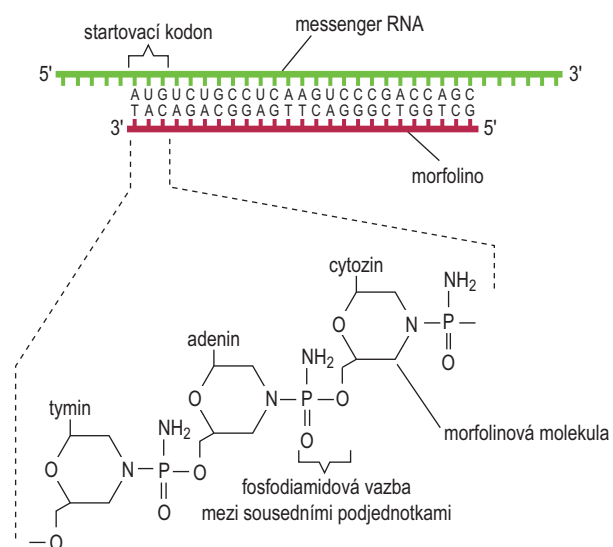
vují základní plán těla. Studium takových mutantů u myši proto může pomoci objasnit, jak je řízeno rozmístění orgánů v těle člověka.

MORFOLINOVÉ „KNOKDAUN“ MUTACE U RYB ZEBŘÍČEK

Podobně jako u myši byly i u zebřičky vyvinuty náročné programy mutagenese k identifikaci genů významných pro vývojové procesy. K urychlení tohoto procesu byly vyvinuty i postupy, které napodobují účinky mutací specifických genů. Nejedná se přitom o indukci mutací, nejde tedy o změnu struktury DNA. Namísto toho tyto postupy blokují nebo zeslabují expresi informace kódované DNA. Narušení genové exprese v embryu zebřičky je dosaženo injekcí syntetických molekul, které se vážou na specifické sekvence v molekulách mRNA, a tak brání mRNA v translaci do polypeptidů (**obr. 21.22**). Injikovanou látkou je stabilní analog DNA, který je strukturován sekvenčně specificky k 5'-oblasti mRNA, včetně startovacího kodonu. Protože cukr-fosfátová kostra analogu DNA je složena z morfolinových prvků, je injikovaná molekula nazývána **morfolino**. K účinnému narušení genové exprese po značně dlouhou dobu stačí méně než 10 nanogramů morfolinu injikovaného do žloutku oplozeného vajíčka či časného embrya (obsahujícího méně než 16 buněk) zebřičky. Živočiškové, kteří se vyvíjejí z těchto injikovaných vajíček nebo embryí, mají fenotypy zcela shodné s mutanty, kteří byli získáni změnou cílového genu. Jsou to tedy **fenokopie** mutantního fenotypu. Po přečtení genomu zebřičky se nyní používají morfoliny k potlačování (knockdown) genové exprese a ke zjišťování, zda má určitý genový produkt významnou roli ve vývoji. Například Benjamin Feldman a Derek Stemple použili morfolino k potlačení exprese genu *no tail* (*ntl*). Tento gen je homologický s myším genem *brachyury*, také známým jako gen *tail-length* (*T*, viz kapitola 4). Feldman a Stemple zjistili, že injekce pouhých několika nanogramů morfolinu syntetizovaného tak, aby se párovalo se startovacím kodonem genu *ntl* a 22 nukleotidy ve směru transkripce, vede k tvorbě krátkého ocasu embrya. Tento morfolinem indukovaný fenotyp, zvaný morfant, je tedy napodobeninou mutantního fenotypu způsobeného skutečnou mutací genu *ntl*.

STUDIE NA SAVČÍCH KMENOVÝCH BUŇKÁCH

Terminálně diferencované buňky lidského těla – lymfocyty, neurony, svalová vlákna atp. – se obvykle nedělí. Když jsou tyto typy buněk ztraceny nebo zahynou, musí být nahrazeny, jinak by příslušná tkáň atrofovala. Tato náhrada se odehrává tak, že nespécializované buňky přítomné v tkáni se dělí a vytvářejí buňky, které následně diferencují v specializované typy. Tyto nespécializované prekurzory specializovaných buněk se nazývají **kmenové buňky**. Například dřevě ve stehenní kosti člověka obsahuje nediferencované buňky,



Obr. 21.22 ▶ Technika morfolino pro párování se sekvencí kolem startovacího kodonu mRNA genu *no tail* u ryby zebříčky. Morfolina mají obvykle 20 až 25 jednotek. Každá sestává z morfolinové molekuly vázané k dusíkaté bázi (A, T, U, G nebo C). Jednotky jsou vázány jedna k druhé fosfodiesterovou vazbou namísto fosfodiesterové vazby, jak je tomu v DNA a RNA.

kteří nahrazují různé typy krvinek. Tyto hematopoetické kmenové buňky zásobují oběhový systém lymfocyty, erytrocyty a krevními destičkami. Tkáň v některých orgánech, jako je třeba srdce, mají velmi málo kmenových buněk; následkem toho je jejich schopnost regenerovat ztracený či poškozený materiál nízká. Jiné tkáň, jako jsou stěvní výstelka či pokožka, mají velké populace kmenových buněk, které rychle nahradí ztracené diferencované buňky. Protože tyto typy kmenových buněk se vyskytují u vyvinutých organismů, nazývají se kmenovými buňkami dospělých organismů.

Kmenové buňky se také vyskytují ve vyvíjejících se organizmech. Obecně má většina buněk v nejranějších stádiích vývoje charakter buněk kmenových. Buňky odebrané z myšního embrya mohou být například kultivovány *in vitro* a následně transplantovány do jiného myšního embrya, kde se dále dělí a přispívají k tvorbě mnoha druhů tkání a orgánů. Embryonální kmenové buňky proto mají obrovský vývojový potenciál; jsou **pluripotentní** – schopné vývoje mnoha buněčných typů.

Bez ohledu na to, zda jsou odvozeny z embryonálních či dospělých tkání, poskytují kmenové buňky příležitost studovat mechanismy diferenciace speciálních buněčných typů. Kmenové buňky mohou být získány z řady savců, včetně myši, opic či člověka. Mohou být kultivovány *in vitro* nebo transplantovány do hostitelského organismu a testovány na schopnost diferenciace. Pokud rostou v kultuře, mohou být na kmenové buňky aplikovány různé vlivy, aby se

zjistilo, co spouští jejich vývoj specifickým směrem. Molekulární techniky, včetně čipových technologií, umožňují určovat, které geny jsou v buňkách při rozvíjení jejich vývojových programů exprimovány.

Embryonální kmenové (ES) buňky jsou vhodné pro tento druh analýzy, protože mají největší vývojový potenciál; jsou obvykle odvozeny z vnitřní buněčné hmoty embrya, které vzniklo oplozením *in vitro*. Buňky izolované z této hmoty jsou očkované na vrstvu mitoticky neaktivních „výživových buněk“, které poskytují růstové faktory ke stimulaci dělení. Doba jednoho buněčného dělení je pro myši ES buňky v kultuře asi 12 hodin; pro lidské ES asi 36 hodin. Poté co jsou izolované embryonální buňky pěstovány po určitou dobu na výživových buňkách, jsou odloučeny a znovu vysety k založení nových buněčných populací, které mohou být i zmrazeny pro dlouhodobé skladování. Klonální buněčná populace je taková, která pochází z jediné původní buňky.

ES buňky se počínají diferencovat po přenesení z kultury výživových buněk do suspenzní kultury s vhodným médiem. V těchto podmínkách vytvářejí **embryoidní tělíška**, která jsou mnohobuněčnými agregáty sestávajícími z diferencovaných a nediferencovaných buněk. V některých případech připomínají embryoidní tělíška časná embrya. Buňky v těchto tělíškách mohou diferencovat v typy specializovaných buněk, které jsou odvozeny z každé ze tří primárních tkáňových vrstev – ektodermu, mezodermu a endodermu. Mohou například vytvářet neurony, které jsou odvozeny z ektodermu; buňky hladkého svalstva nebo rytmicky se kontrahující srdeční buňky, které jsou derivátem mezodermu; nebo buňky Langerhansových ostrůvků slinivky, které jsou odvozeny z endodermu. Pozorováním takového procesu v různých buněčných liniích – například v těch, kde byl určitý gen mutován – je možné analyzovat genetické sítě interakcí, které hrají roli v diferenciaci různých buněčných typů.

Otázka izolace a analýzy lidských ES buněk je ovšem kontroverzní. Nyní používané linie lidských ES buněk byly odvozeny z embryí, jež byla poskytnuta lidmi, kteří vyhledali lékařskou pomoc k otěhotnění prostřednictvím oplození *in vitro*. Totiž ve skutečnosti se při této proceduře vytvoří mnohem více embryí, než je nakonec použito k asistované reprodukci. Manželský pár se pak může rozhodnout, zda daruje nepoužitá embrya pro výzkumné účely. Izolace ES buněk z takových embryí nezbytně vyžaduje zničení embrya. Podle některých názorů je destrukce časných embryí přijatelnou praxí; jiní ji považují za nemorální. Kontroverze provázející tuto praxi vedly k tomu, že mnoho vlád odmítlo či omezilo finanční podporu výzkumu na lidských kmenových buňkách. Ve Spojených státech amerických je například poskytována podpora ze strany federální vlády pouze těm projektům, které využívají linie lidských kmenových buněk izolované před 9. srpem 2001. Financování projektů využívajících linie připravené po tomto datu musí pocházet z jiných zdrojů.

Financování výzkumu lidských kmenových buněk má větší podporu v případech využívání lidských ES buněk k léčbě chorob, které vznikají v důsledku ztráty specifických buněčných typů, jako je například cukrovka diabetes mellitus (kde nefungují Langerhansovy ostrůvky slinivky) nebo Parkinsonova choroba (kde odumřely některé neurony v určité části mozku). Terapie pomocí ES buněk se předpokládá také při léčbě invalidity, způsobené například poškozením míchy. V budoucnu by se buňky odvozené z linií ES mohly transplantovat do nemocné nebo poraněné tkáně a tyto buňky by mohly regenerovat ztracené či poškozené části tkáně. Pokusy prováděné na myších a krysách naznačují, že by tato strategie mohla být účinná i u člověka. Předtím však musí být vyřešena řada technických problémů. Dosud například není možné získat čisté kultury specifického diferencovaného buněčného typu. Když se lidské ES buňky vyvíjejí v kultuře, diferencují se v mnoho druhů buněk; izolace jediného typu – například buněk srdečního svalů – je nelehkým technickým problémem.

Zastánci terapie pomocí lidských kmenových buněk musí také řešit řadu jiných problémů. Buňky odvozené z kultury *in vitro* se mohou nekontrolovatelně dělit a po transplantaci do těla hostitele vytvářet nádory, nebo mohou být zničeny hostitelským imunitním systémem. K překonání tohoto druhého problému bylo navrženo transplantovat buňky, které jsou geneticky totožné s buňkami hostitele. Takové geneticky totožné buňky mohou být vytvářeny s použitím hostitelských somatických buněk k tvorbě buněčných populací ES. Somatická buňka hostitele může být fúzována s enukleovanou vaječnou buňkou získanou od ženy-dárkyně (není nezbytné, aby to byla hostitelka). Jestliže geneticky změněné vajíčko, které je diploidní, dá vznik embryu, mohou být buňky izolované z takového embrya použity k vytvoření buněčné linie ES, která pak poskytne geneticky identický materiál ke zpětné transplantaci do hostitele.

Tvorba ES buněk přenosem jádra ze somatické buňky do enukleovaného vajíčka se nazývá **terapeutické klonování**. Kmenové buňky by se také daly získat indukci reverze somatických buněk k nediferencovanému stavu. Nové pokusy realizované ve Spojených státech a Japonsku naznačují, že tento přístup by mohl být reálný. Například buňky kůže byly indukovány k pluripotenci genetickou transformací se směsí čtyř klonovaných genů. Pokud jsou ovšem některé z těchto genů nepatřičně exprimovány, je transformace provázena maligním růstem. Bude tedy zapotřebí vyvinout ještě značné badatelské úsilí, než bude možné využívat pluripotentní buňky v ES terapii.

REPRODUKČNÍ KLONOVÁNÍ

Terapeutické klonování je odlišné od **klonování reprodukčního**, které si klade za cíl tvorbu úplného jedince přenosem jádra somatické buňky z donora do enukleovaného vajíčka, které může dát vznik geneticky identické kopii

dárce. V roce 1996 vědci z Roslin Institutu ve Skotsku připravili prvního klonovaného savce – ovci jménem Dolly (viz kapitola 2). Dolly vznikla nahrazením jádra vajíčka jádrem vyjmutým z buňky vemene dospělé ovce. Transplantované jádro zjevně obsahovalo veškerou genetickou informaci nezbytnou k řízení vývoje ovce Dolly, i když pocházela z diferencované buňky. Od data vzniku Dolly připravili vědci mnoho jiných savců cestou reprodukčního klonování – myši, kočky, krávy a kozy. Diferencované buňky tedy zjevně mají genetický potenciál k řízení vývoje.

Živočichové připravení reprodukčním klonováním však občas trpí vývojovými abnormalitami a mají zkrácenou délku života. Často dobře neprospívají. Tato ztráta vitality naznačuje, že somatická jádra použitá v reprodukčním klonování jsou nějakým způsobem odlišná od zygotických jader vzniklých normálním oplozením. Somatická jádra mohou akumulovat mutace nebo se zjevně podrobují změnám svázaným s genetickým imprintingem nebo inaktivací chromozomů – metylací některých nukleotidů, modifikací nukleozomových histonů apod. Takové změny mohou být v somatickém jádře a v jádře zygotickém zásadně odlišné. Právě kvůli problémům spojeným s reprodukčním klonováním živočichů nepovažuje mezinárodní vědecká komunita klonování člověka za bezpečné. Z toho vyplývá i všeobecná shoda, že o reprodukční klonování člověka by se nemělo ani usilovat.

GENETICKÉ ZMĚNY V DIFERENCIACI IMUNITNÍCH BUNĚK OBRAŤLOVCŮ

Ačkoli z reprodukčního klonování máme důkaz o tom, že diferencované buňky mají stejný obsah DNA jako oplozené vajíčko, známe některé typy diferencovaných buněk obratlovců, u kterých to neplatí. Tyto buňky vytvářejí systém, který brání živočichy před infekcí virem, bakteriemi, houbami a prvky – imunitní systém.

U savců, na které je zaměřena většina výzkumů, sestává imunitní systém z několika odlišných typů buněk odvozených z kmenových buněk, které se nacházejí v kostní dřeni. Tyto kmenové buňky se dělí a vytvářejí jednak sobě podobné buňky a jednak prekurzory specializovaných imunitních buněk. Dvě významné skupiny specializovaných imunitních buněk se přímo podílejí na boji proti invazním patogenům. Plazmatické buňky B vytvářejí a vylučují proteiny zvané **imunoglobuliny**, známé také jako **protilátky**, a zabíječské buňky T vytvářejí proteiny se silně reaktivním povrchem, které působí jako receptory pro různé substráty. Jak B-buněčné protilátky, tak T-buněčné receptory jsou schopny rozpoznávat jiné molekuly – například cizí látky vnesené patogenem – prostřednictvím mechanismu zámku a klíče. Cizí molekula, zvaná **antigen**, je klíčem, který přesně padne do zámku tvořeného B-buněčnou protilátkou nebo T-buněčným receptorem (**obr. 21.23**). Specifita této přesnosti je základem schopnosti živočicha bránit se vůči

patogenům. Protože však existuje mnoho odlišných potenciálních patogenů, musí být živočich schopen vytvářet mnoho odlišných typů protilátek a T-receptorů za účelem obrany proti infekci.

Protilátky a T-buněčné receptory jsou proteiny a proteiny jsou kódovány geny. Aby si živočich vytvořil rozsáhlou sadu protilátek a T-receptorů potřebných k obraně proti všem možným patogenům, musel by mít enormní počet genů – příliš mnoho, než aby se vůbec vešly do genomu člověka. Toto dilema mátló genetiky po mnoho let. V poslední čtvrtině 20. století však bylo zjištěno, že živočich může vytvářet velký počet odlišných protilátek a T-receptorů rekombinací malých genetických elementů ve funkční geny. Kódující potenciál dosažený touto kombinací genových segmentů je vskutku ohromující. Se skromným množstvím DNA určené pro funkce imunitního systému může živočich tvořit stovky tisíc, ne-li miliony protilátek a T-receptorů, každý s odlišnou schopností vázat se na cizí molekulu z invazního organismu.

Abychom viděli, jak tento rekombinační systém pracuje, zaměříme se na tvorbu protilátek. Každá protilátka je tetramerem složeným ze čtyř polypeptidů, dvou identických lehkých řetězců a dvou identických těžkých řetězců, spojených disulfidovými vazbami (obr. 21.24). Lehké řetězce mají asi 220 aminokyselin a těžké řetězce okolo 445 aminokyselin. Každý řetězec, lehký i těžký, má N-koncovou variabilní oblast, uvnitř které se sekvence aminokyselin různí u rozličných typů protilátek, jež živočich vytváří, a C-koncovou konstantní oblast, uvnitř které jsou sekvence aminokyselin stejné pro všechny protilátky určité skupiny.

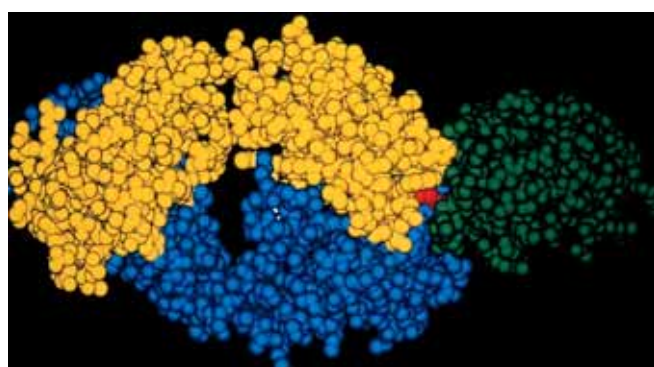
Lehké a těžké řetězce protilátky jsou kódovány odlišnými lokusy v genomu. U člověka jsou dva lokusy pro lehké řetězce, kappa (κ) lokus na chromozomu 2 a lambda (λ) lokus na chromozomu 22, a jeden lokus pro těžký řetězec, umístěný na chromozomu 14. Každý z těchto lokusů sestává

ze složitě uspořádaných genových segmentů. Zaměříme se na lokus kappa, abychom viděli, jak jsou tyto segmenty uspořádány a jak se rekombinují v souvislé kódující sekvence k tvorbě odlišných polypeptidů.

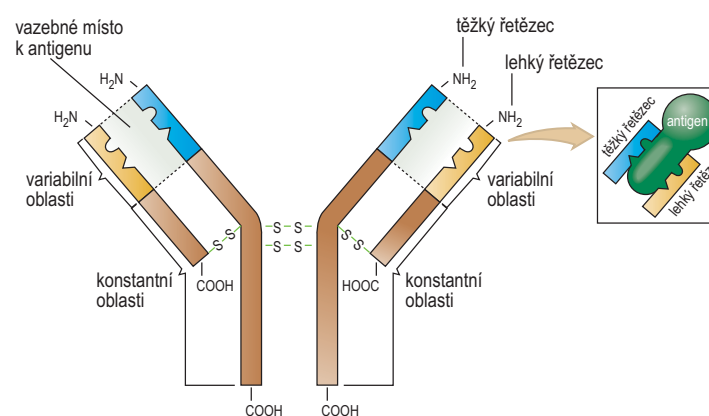
Polypeptid kappa je kódován třemi typy genových segmentů:

1. Genový segment $L_{\kappa}V_{\kappa}$, který kóduje zaváděcí (*leader*) peptid a 95 aminokyselin N-koncové variabilní (*variable*) oblasti lehkého řetězce kappa; zaváděcí peptid je odstraněn z lehkého řetězce kappa odštěpením, poté co zavede vznikající polypeptid skrze membránu endoplazmatického retikula do plazmatické buňky syntetizující protilátku.
2. Genový segment J_{κ} kóduje posledních 13 aminokyselin variabilní oblasti lehkého řetězce kappa; symbol J_{κ} se pro tento genový segment používá proto, že peptid spojuje (*joins*) N-koncový peptid kódovaný $L_{\kappa}V_{\kappa}$ segmentem s C-koncovým peptidem kódovaným dalším typem genového segmentu.
3. Genový segment C_{κ} kóduje konstantní (*constant*) oblast lehkého řetězce kappa.

U člověka obsahuje lokus kappa 76 $L_{\kappa}V_{\kappa}$ genových segmentů (ačkoli jen 40 je jich funkčních), 5 genových segmentů J_{κ} a jediný genový segment C_{κ} . Genové segmenty J_{κ} jsou lokalizovány mezi genové segmenty $L_{\kappa}V_{\kappa}$ a genový segment C_{κ} . V buňkách zárodečné linie je 5 segmentů J_{κ} odděleno od segmentů $L_{\kappa}V_{\kappa}$ dlouhou nekódující sekvencí a od genového segmentu C_{κ} jinou nekódující sekvencí dlouhou přibližně 2 kb (obr. 21.25). V průběhu vývoje určitého typu buňky B se gen pro lehký řetězec kappa, který bude exprimován, sestaví z jednoho segmentu $L_{\kappa}V_{\kappa}$, jednoho segmentu J_{κ} a jednoho segmentu C_{κ} procesem somatické rekombinace. Kterýkoli ze 40 funkčních genových



Obr. 21.23 ▶ Trojrozměrná struktura vazby antigen-protilátka. Je znázorněno pouze jedno ze dvou vazebných míst antigenu a typické protilátka. Antigen (zeleně) je enzym lysozym. Vazebné místo protilátka je tvořeno N-koncovými oblastmi lehkého řetězce (žlutě) a těžkého řetězce (modře). Glutaminové reziduum, které vycínívá z lysozymu, kde se protilátka váže, je vybarveno červeně. Tato struktura je založena na X-difrakčních údajích.



Obr. 21.24 ▶ Struktura molekuly protilátka. Obrázek vpravo ukazuje interakci zámku a klíče mezi antigenem a protilátkou, která ho rozpoznává.



MILNÍKY GENETIKY: Mutace, které narušují segmentaci těla drozofily

Těla mnoha živočišných druhů jsou tvořena z článků. Například tělo hmyzu má tři hlavní části – hlavu, hrud a zadeček –, přičemž hrud a zadeček jsou dále složeny z malých segmentačních jednotek. Dokonce i obratlovci vykazují segmentovanou anatomii, obzvláště v průběhu časných stadií vývoje, kdy se v pravidelných intervalech vytvářejí podél páteře oddělené masy tkáně zvané somity. Zdá se tedy, že článkování je charakteristickým rysem plánu vývoje živočišného těla.

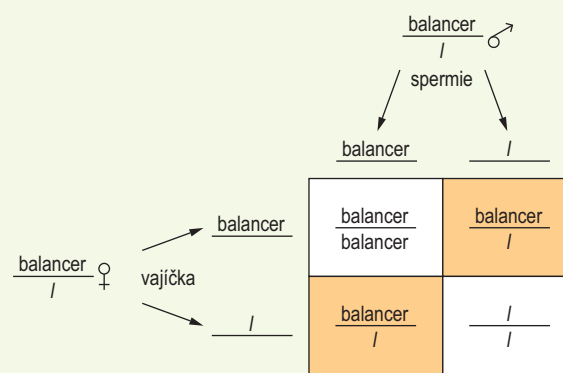
Anatomové a embryologové prostudovali způsoby tvorby a řazení segmentů prostřednictvím pitvání živočichů v různých vývojových stadiích. Také genetici studovali segmentaci, ovšem bez skalpelů a nožů. Místo nich používali mutace, které definují a analyzují geny důležité v segmentačních procesech.

Genetická analýza segmentace udělala obrovský pokrok, když v roce 1980 Christiane Nüsslein-Volhardová a Eric Wieschaus publikovali práci popisující mutace, které mění počet, velikost a složení segmentů embryí a larev drozofily.¹ Nüsslein-Volhardová a Wieschaus již věděli, že prostorová organizace embryí drozofily je ovlivněna produkty maternálních genů. Tyto genové produkty se ukládají ve vajíčku a po oplození řídí vývoj embrya podél jeho antero-posteriorní a dorzo-ventrální osy. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus také věděli, že v pozdějších stadiích vývoje drozofily jsou důležité produkty homeotických genů, jako je třeba *Ultrabithorax*. Tyto genové produkty specifikují osud jednotlivých segmentů těla. Některé oblasti diferencují v segmenty hrudi a jiné diferencují v segmenty zadečku. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus tedy dospěli k závěru, že musí existovat další skupina genových produktů, které působí poté, co geny s maternálním účinkem založily základní plán těla, ale předtím, než se dostanou ke slovu produkty homeotických genů. Snažili se nalézt tyto genové produkty hledáním mutací, které narušují segmentaci embryí a larev drozofily.

¹Nüsslein-Volhard, C., E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.

Protože takové mutace mohou působit jako recesivně letální, navrhli Nüsslein-Volhardová a Wieschaus jejich indukci aplikací mutagenu etylmetansulfonátu na dospělé jedince. Mutagenizované chromozomy se přenesly do další generace v heterozygotním stavu a poté, prostřednictvím série křížení s testovacími chromozomy, byly převedeny do homozygotního stavu. Zde byla provedena analýza, zda nebyla indukována nová, recesivně letální mutace. V jednom pokusu, ve kterém testovali celkem 5800 mutagenizovaných chromozomů, se u 4500 objevily nové recesivní letální mutace. Když byly tyto mutantní chromozomy identifikovány, udržovaly se v heterozygotním stavu v balancovaných kmenech.

Balancované letální kmene segregují každou generaci recesivní letální homozygoty (**obr. 1**). Jestliže letální mutace působí v časném vývoji, embrya v homozygotním stavu se vůbec nevyvíjejí z vajíčka. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus při hledání mutací ovlivňujících



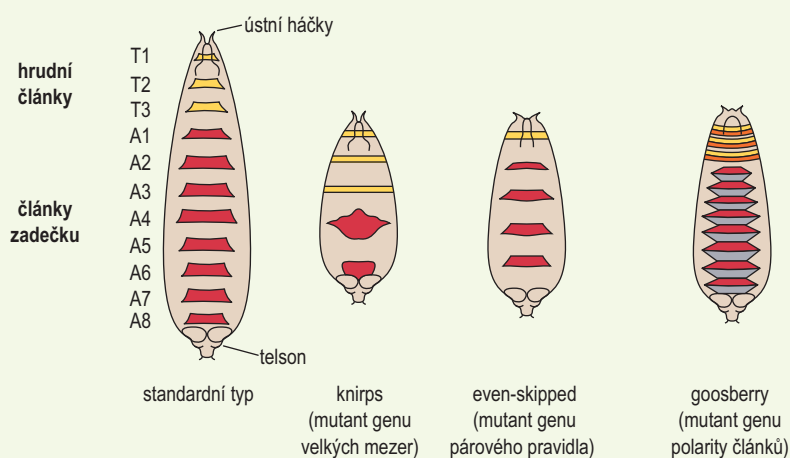
Obr. 1 ▶ Segregace embryí homozygotních pro nově indukovanou recesivní letální mutací (l) v balancovaném kmeni drozofily. Testovací chromozom (balancer) nese dominantní marker a mnohonásobné inverze k zabránění rekombinace mezi ním a chromozomem s letální mutací. Většina testovacích chromozomů nese také recesivní letální mutaci, která není alelní s letální mutací na druhém chromozomu. Potomstvo, které je homozygotní pro testovací chromozom (balancer), a také potomstvo homozygotní pro nově indukovanou letální mutaci hynie během vývoje.

segmentů $L_k V_k$ může být v tomto procesu spojen s kterým-koli z pěti segmentů J_k ; DNA mezi těmito spojenými segmenty prostě zmizí (**obr. 21.26**). Proces spojení je zprostředkován místy zvanými rekombinační signální sekvence (RSS), které sousedí s každým genovým segmentem. Tato místa jsou složena ze 7 nebo 9 opakování párů bází oddělených 12 nebo 23 bp dlouhými mezerami. Opakování uvnitř RSS bezprostředně po směru transkripce $L_k V_k$ gen-

ového segmentu jsou komplementární k opakováním uvnitř RSS bezprostředně ve směru transkripce genového segmentu J_k . Když se tyto repetice párují, může proteinový komplex mezi nimi katalyzovat rekombinaci, která spojuje $L_k V_k$ segment k segmentu J_k . Proteiny kódované rekombinačně aktivujícími geny 1 a 2 (RAG1 a RAG2) jsou významnými složkami tohoto komplexu; společně řídí specifitu rekombinačního procesu.

Obr. 2 ▶ Embrya drozofily vykazující fenotypy mutací tří odlišných segmentačních genů: knirps (gen velkých mezer), even-skipped (gen párového pravidla) a gooseberry (gen polarity článků). Vybarvené oblasti jsou proužky zoubků (krátké vlasovité výběžky pokožky embrya) spojené s anteriorní částí jednotlivých segmentů hrudi a zadečku u standardního embrya. Tyto zoubky slouží k identifikaci článků a částí článků ve vyvíjejících se embryích. U mutantů knirps ukazuje uspořádání zoubků, že většina zadečkových článků chybí. U mutantů even-skipped se nevyvíjejí alternující články podél těla. U mutantů gooseberry pak je deletována posteriorní část každého článku a nahrazena zrcadlovou kopií anteriorní části, což je vidět podle zoubků; zrcadlové kopie anteriorní části jsou vybarveny oranžově v hrudi a šedě v zadečku.

Zdroj: Podle Nüsslein-Volhard a Wieschaus, 1980. *Nature* 287:795–801. Obr. 1, strana 796.



časný vývoj tedy zkoumali ve svých sbírkách klonů nevylihnutá embrya. Speciálně se zajímali o embrya, ve kterých bylo narušeno uspořádání tělních článků.

Usilovný výzkum byl úspěšný. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus identifikovali v 15 různých genech mutace narušující článkování. Mutace tří z těchto genů vytvářely mezery v segmentaci, mutace šesti genů způsobovaly nepřítomnost alternujících částí článkovaného uspořádání a mutace šesti jiných genů vyřadily části segmentů a nahrazovaly je duplikáty jiných částí (**obr. 2**). Byly tím definovány geny velkých mezer, párového pravidla a polarity segmentů. Další výzkum ukázal, že produkty těchto genů hrají klíčovou roli v založení článkovaného uspořádání embrya drozofily. Homology těchto genových produktů působí také v embryonálním vývoji jiných organismů.

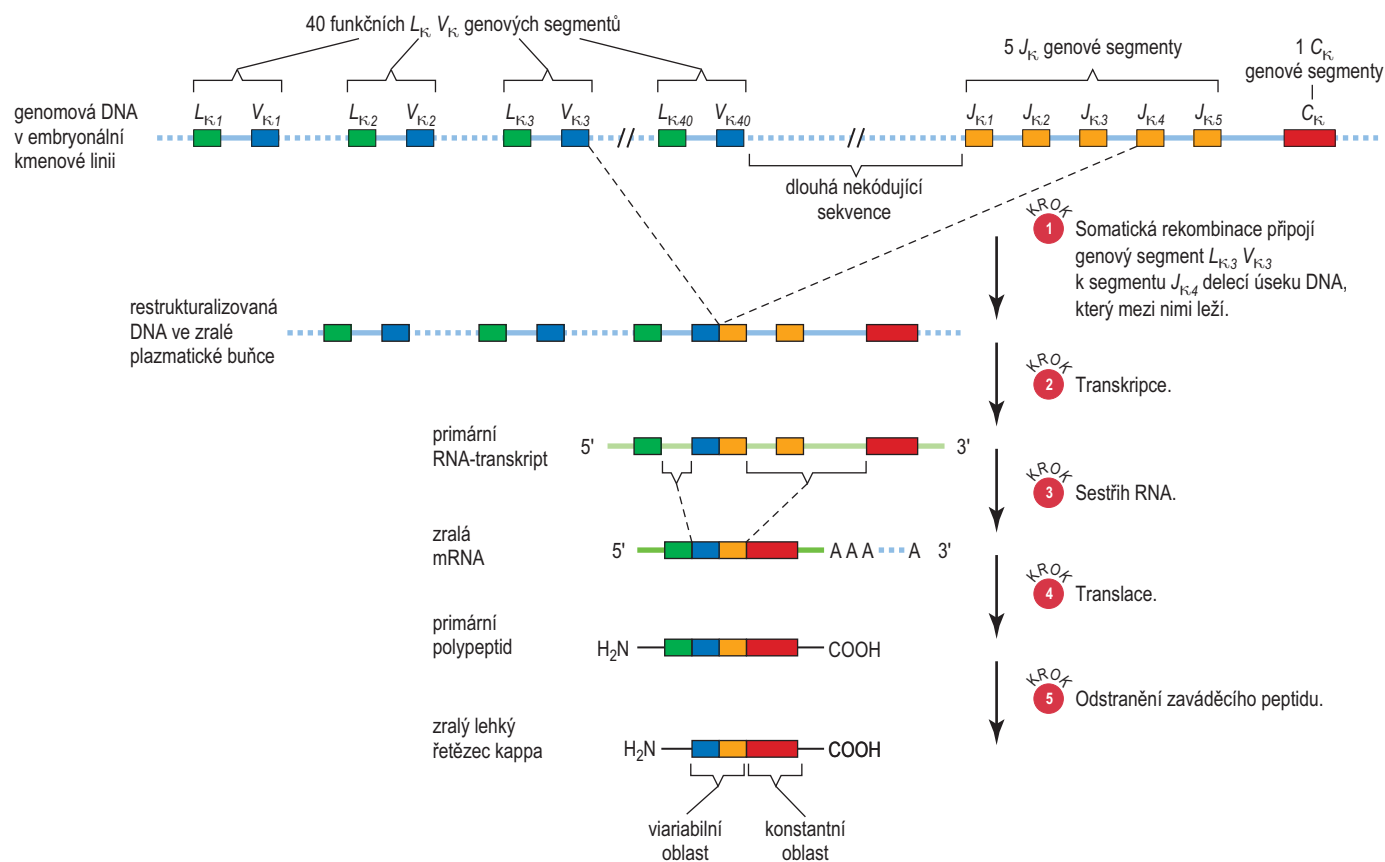
Za tuto objevnou práci obdrželi v roce 1995 Nüsslein-Volhardová a Wieschaus Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Spolunositel cesty se stal také Edward Lewis za svou pionýrskou práci na homeotických genech drozofily.

OTÁZKY K DISKUZÍ

1. Nüsslein-Volhardová a Wieschaus hledali mutantní fenotypy v nevylihnutých embryích. Než Nüsslein-Volhardová a Wieschaus začali svou práci, většina genetiků pracujících s drozofilou hledala mutantní fenotypy u dospělců. Co nám to říká o významu „úhlu pohledu“ či „zorného pole“ při hledání nových faktů?
2. Jsou-li segmentační geny určovány mutacemi, musí být také na molekulární úrovni charakterizovány klonováním, expresní analýzou atp. A jsou-li charakterizovány na molekulární úrovni, mohou být sondy připravené z těchto genů použity ke studiu homologických genů u jiných organismů. Co by bylo zajímavé studovat u jiných článkovaných organismů, jako jsou krabi nebo ploštěnky, nebo u nečlánkovaných organismů, jako jsou medúzy či mořské hvězdice?

Fúze $L_k V_k J_k$, která je takto vytvořena rekombinací, kóduje variabilní část lehkého řetězce kappa. Celá sekvence DNA – $L_k V_k J_k$ – nekódující úsek $-C_k$ – v restrukturalizovaném lokusu kappa je pak transkribována. Nekódující sekvence mezi fúzovanými $L_k V_k J_k$ segmenty a segmentem C_k je odstraněna v průběhu sestřihu RNA, podobně jako introny jiných genů, a poté dojde k translaci výsledné mRNA v polypeptid. N-koncový zaváděcí peptid je z tohoto

polypeptidu odštěpen a vzniká finální řetězec kappa. Celkový počet funkčních lehkých řetězců kappa, který může být vytvořen tímto mechanismem, je 40 (počet funkčních genových segmentů $L_k V_k$) $\times 5$ (počet genových segmentů J_k) $\times 1$ (počet genových segmentů C_k) = 200 . Podobnou cestou může rekombinace genových segmentů dát vznik 120 různým lehkým řetězcům a 6600 odlišným těžkým řetězcům lambda. Kombinatorické uspořádání všech těchto řetězců



Obr. 21.25 ▶ Genetické řízení tvorby lehkých řetězců protilátek u člověka. Každý lehký řetězec kappa je kódován genem uspořádaným z odlišných typů genových segmentů uvnitř imunoglobulinového lokusu kappa (*IGK*) na chromozomu 2. Toto uspořádání nastává v průběhu diferenciaci plazmatických buněk B imunitního systému.

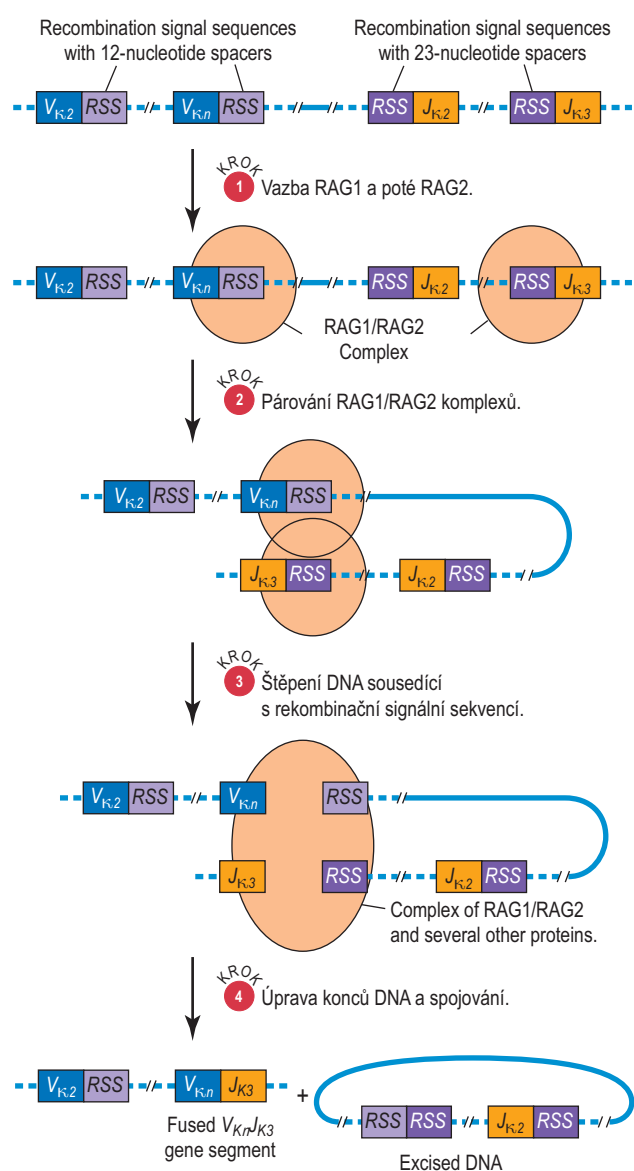
umožňuje člověku vytvářet $(200 + 120) \times 6600 = 2\,112\,000$ odlišných protilátek. Skutečný počet různých protilátek je však dokonce vyšší z důvodu mírné odlišnosti v místech, kde se rekombinace odehrává, a hypermutability v sekvencích, které kódují variabilní oblasti řetězců protilátek. Všechny tyto události se nezávisle odehrávají v prekurzorech plazmatických B-buněk. Když se tyto buňky diferencují, každá z nich získává schopnost vytvářet odlišnou protilátku.

První experimentální důkaz restrukturalizace DNA sekvencí v průběhu diferenciaci imunitních buněk publikovali v roce 1976 Nobumichi Horzumí a Susumu Tonegawa. Tito vědci prokázali, že sekvence DNA kódující variabilní a konstantní oblasti lehkých řetězců kappa jsou přítomny na stejném restriční fragmentu *Bam*HI v genomové DNA buněk vytvářejících protilátky, zatímco v genomové DNA

embryonálních buněk byly lokalizovány na odlišných fragmentech *Bam*HI (**obr. 21.27**). Tonegawa a jeho spolupracovníci dále prokázali, že sekvence DNA kódující lehké řetězce a těžké řetězce lambda jsou v buňkách tvořících protilátky také restrukturalizovány. Za tuto práci získal Tonegawa v roce 1987 Nobelovu cenu v oblasti fyziologie a medicíny.

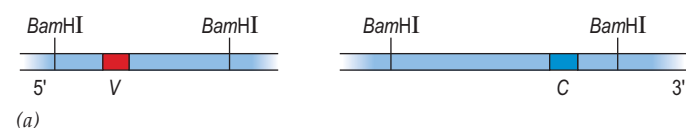
NEJDŮLEŽITĚJŠÍ POZNATKY

- ▶ Mnoho genů u obratlovců – například geny *Hox* – bylo identifikováno na základě homologie s geny izolovanými z modelových organismů, jako jsou *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*.
- ▶ Z obratlovců je ke studiu mutací ovlivňujících vývoj nejvhodnější myš a ryba zebřička.



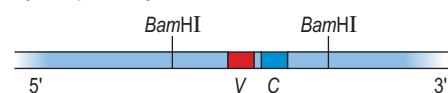
Obr. 21.26 ▶ Zjednodušený model spojování $V_{\kappa}J_{\kappa}$. Spojovací proces je zprostředkován specifickou vazbou RAG1 a RAG2 k rekombinačním signálním sekvencím (RSS) sousedícím s genovými segmenty V_{κ} a J_{κ} . RSS sousedící s každým segmentem V_{κ} obsahuje 12nukleotidové mezerníky; ty, které sousedí se segmenty J_{κ} , mají mezerníky o 23 párech bází. Komplex RAG1/RAG2 katalyzuje rekombinaci pouze tehdy, když jedna sekvence RSS obsahuje 12nukleotidový mezerník a druhá RSS má 23nukleotidový mezerník.

DNA izolovaná z embryonálních buněk



(a)

DNA z buněk vytvářejících protilátky



(b)

Obr. 21.27 ▶ Důkaz restrukturalizace DNA v průběhu diferenciace buněk imunitního systému. (a) V embryonálních buňkách jsou sekvence, které kódují variabilní (V) a konstantní (C) oblasti lehkých řetězců kappa po štěpení restriční endonukleázou *Bam*HI ve dvou odlišných fragmentech. (b) V buňkách vytvářejících protilátky se tyto sekvence nacházejí společně v jednom fragmentu *Bam*HI.

- ▶ Injekcí protismyslných molekul morfolina do vajíček nebo embryí obratlovců lze narušit expresi příslušných genů a vytvářet mutantní fenokopie, které odhalují vývojovou funkci těchto genů.
- ▶ Savčí kmenové buňky, obzvláště ty odvozené z embryí, mohou být kultivovány *in vitro* s cílem studia mechanismů, které řídí diferenciaci.
- ▶ Živočiškové vytvoření reprodukčním klonováním potvrzují, že diferencované buňky mají stejný genetický potenciál jako zygota.
- ▶ Rekombinace mezi genovými segmenty v průběhu diferenciace imunitních buněk umožňuje vznik sekvencí, které kódují lehké a těžké řetězce protilátek.

▶ Cvičení

OBJASNĚNÍ ZÁKLADŮ GENETICKÉ ANALÝZY

1. Uspořádejte následující vývojová stadia drozofily v chronologickém pořadí od nejčasnějších po nejpozdnější: kukla, blastoderm, zygota, neoplozené vajíčko, larva, dospělec.

Odpověď: neoplozené vajíčko, zygota, blastoderm, larva, kukla, dospělec.

2. Jaká dráha přenosu signálu způsobuje samčí fenotyp u *C. elegans* s poměrem X:A 0,5?

Odpověď: Při poměru X:A 0,5 je exprimován protein *her-1*, který funguje jako sekretovaný signál. Tento signál interaguje s membránovým receptorem *tra-2*, čímž jej inaktivuje. Jakmile je

protein *tra-2* inaktivován, dochází k aktivaci cytoplazmatických proteinů kódovaných třemi geny *fem*. Jejich aktivita umožňuje proteinu *tra-1* působit jako transkripční faktor a stimulovat expresi genů hrajících roli v samčím vývoji.

3. Samičky drozofily homozygotní pro nově získanou recesivní autozomální mutaci kladou vajíčka, ze kterých se nevyvíjejí larvy, bez ohledu na genotyp párovaných samečků. Samičky však samy nevykazují žádnou zjevnou abnormalitu. Jaký typ genu je touto novou mutací odhalen?

Odpověď: Nová mutace odhalila gen s maternálním účinkem.

4. Předpovězte fenotyp oka drozofily homozygotní pro recesivní mutaci ztráty funkce genu *sevenless*. Měl by mít jedinec homozygotní pro recesivní mutaci vedoucí ke ztrátě funkce genu *bride of sevenless* stejný fenotyp?

Odpověď: U drozofily homozygotní pro mutaci *sevenless* se ve facétách složených očí nevytváří fotoreceptor R7. Gen *sevenless*

kóduje membránový receptor pro extracelulární ligand, který spouští diferenciaci buňky R7; tento ligand je kódován genem *bride of sevenless*. Jedinec homozygotní pro mutaci *bride of sevenless* by tedy měl mít stejný fenotyp.

5. Genetik chce využít morfolina k potlačení exprese genu v embryích ryby zebřičky. Jaký triplet bazí by byl absolutně nejlepší, aby zajistil účinek morfolina v tomto experimentu?

Odpověď: 3'-TAC-5', protože tento triplet je komplementární ke startovacímu kodonu 5'-AUG-3' obsaženému v mRNA genu.

6. Předpokládejme, že lehký řetězec protilátky je sestaven ze tří odlišných genových segmentů. Kolik různých řetězců může být vytvořeno, jestliže genom obsahuje 5, 20 a 200 kopií těchto tří genových segmentů?

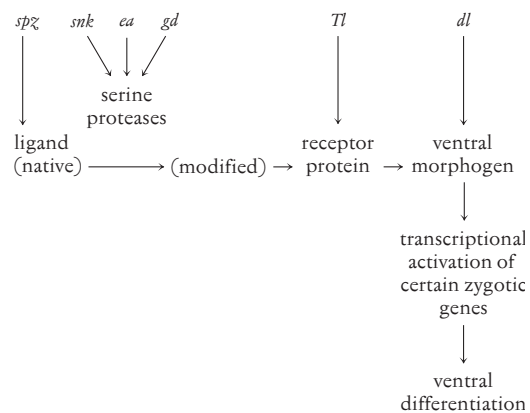
Odpověď: Jestliže každý gen vzniká z jediné kopie každého genového segmentu, bude možných $5 \times 20 \times 200 = 20\,000$ odlišných genů.

▶ Testing Your Knowledge

INTEGRATE DIFFERENT CONCEPTS AND TECHNIQUES

1. Proteinový produkt genu *dorsal* (*dl*) drozofily byl nazván ventrálním morfogenem – tedy látkou, která způsobuje tvorbu ventrálních struktur embrya na základě její vysoké koncentrace v jádrech na ventrální straně blastodermu. Protein *dorsal* však může vstoupit do těchto ventrálních jader pouze tehdy, když je aktivován receptorem na ventrálním povrchu embrya. Tento receptor je kódován genem *Toll* (*Tl*). Extracelulární ligand pro receptor *Toll* je kódován genem *spätzle* (*spz*). Tento ligand může existovat ve dvou stavech, „nativním“ a „modifikovaném“, přičemž pro aktivaci receptoru *Toll* je vyžadován stav modifikovaný. Produkty tří genů – *snake* (*snk*), *easter* (*ea*) a *gastrulation defective* (*gd*) – jsou nutné ke konverzi nativního ligandu v ligand modifikovaný. Všechny tyto tři genové produkty jsou serinové proteázy schopné štěpit jiné proteiny v serinových zbytcích polypeptidového řetězce. Vytvořte diagram vývojové dráhy, která v konečném stavu způsobuje, že dorzální protein indukuje tvorbu ventrálních struktur v embryu drozofily.

Odpověď: Viz obrázek.



Proteinový produkt genu *spz* je modifikován serinovými proteázami syntetizovanými geny *snk*, *ea* a *gd*. Ve své modifikované formě je tento ligand schopen aktivovat receptorový protein *Toll*, ale tato aktivace je omezena jen na ventrální stranu embrya. Když je receptor *Toll* aktivován (pravděpodobně vazbou modifikovaného ligandu *spätzle*), přenáší signál do cytoplazmy embrya. Tento signál pak způsobuje, že protein *dorsal* vstupuje do jader na ventrální straně embrya, kde působí jako transkripční faktor k regulaci exprese zygotických genů zahrnutých v diferenciaci ventrální části.

2. Vycházíme-li ze znalosti výše uvedené dráhy, jaké budou fenotypy recesivních mutací vedoucích ke ztrátě funkce genů *spz* a *Tl*?

Odpověď: Mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *dl* s maternálním účinkem jsou letální; tedy embrya z matek *dl/dl* hynou v průběhu vývoje. Když byla tato embrya zkoumána, zjistilo se, že postrádají ventrální struktury. Genetici říkají, že jsou „dorzalizovaná“. Tento zvláštní fenotyp je způsoben ztrátou transkripčního faktoru *dorsal*, který jinak indukuje správný vývoj ventrálních jader embrya. Při absenci této indukce se ventrální buňky diferencují, jako by byly na dorzální straně embrya. Mutace genů *spz* a *Tl* by měly mít stejný fenotypový účinek, protože blokují dráhu, která finálně způsobuje, že protein *dorsal* indukuje ventrální diferenciaci. Recesivní mutace *spz* a *Tl* jsou tedy letální s maternálním účinkem. Samičky homozygotní pro tyto mutace vytvářejí dorzalizovaná embrya, která hynou v průběhu vývoje.

▶ Otázky a úlohy

K HLUBŠÍMU POCHOPENÍ A ROZVÍJENÍ ANALYTICKÝCH SCHOPNOSTÍ

21.1 U *C. elegans* jsou buněčné linie v průběhu vývoje invariantní. Proč je to výhodou pro vědce, který zkoumá vývojové procesy?

21.2 Jaké mechanismy obohacují cytoplazmu vaječné buňky výživnými a determinujícími látkami v průběhu oogeneze?


21.3 Odhadněte fenotyp drozofily, která se vyvíjí z embrya, u něhož byly laserem zničeny posteriorní pólové buňky.

21.4 V časném vývoji *C. elegans* se buňka EMS rozdělí ve dvě buňky, MS a E. Buňka MS se následně vyvine ve svalové buňky, neurony a některé jiné buňky, zatímco buňka E se vyvine v buňky střeva. Co by se stalo, kdyby buňka E byla zničena přesným laserem krátce po svém vzniku? Co by se stalo, kdyby materiál extrahovaný z buňky MS jednoho embrya byl injikován do buňky E jiného embrya?

21.5 Shrňte hlavní kroky genetické analýzy vývoje u modelových organizmů, jako jsou *D. melanogaster* či *C. elegans*.

21.6 Proč je časné embryo drozofily syncytiem?

21.7 Které larvální tkáně drozofily vytvářejí externí orgány dospělé?

21.8  Homozygotní stav mutace *dumpy* (*dpy*) u hlístice způsobuje, že živočich je kratší než standardní typ. Pokud by byl hermafrodit heterozygotní pro tuto mutaci samooplozen, jaká frakce jeho potomstva bude *dumpy*?

21.9 Vědec chce provést komplementační test mezi dvěma nezávisle izolovanými mutacemi *dumpy* u *C. elegans*. Obě mutace jsou autozomálně recesivní. Kromě stavu homozygotnosti pro mutaci *dumpy* je jeden kmen navíc homozygotní pro X-vázanou recesivní mutaci (*unc*), která způsobuje nekoordinovaný pohyb hlístice. Druhý kmen je homozygotní pouze po mutaci *dumpy*. Jak by měl být komplementační test proveden?

21.10 Mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *Sxl* u drozofily způsobuje smrt samiček, avšak nemá žádný projev u samečků. Jaký fenotyp by měla mít mutace způsobující „zisk funkce“?

21.11 V pokusech s drozofilou byla odhalena autozomálně recesivní mutace, která způsobuje, že jedinci XX se vyvíjejí ve sterilní samečky. Navrhněte schéma pokusu ke zjištění, zda je tato mutace alelou genu *tra* nebo *tra2*.

21.12 Načrtněte diagram dráhy určující pohlaví u drozofily.

21.13 Jaký fenotyp by měl mít jedinec XX, který je homozygotní pro mutaci vedoucí ke ztrátě funkce jak genu *tra*, tak i *dsx*? Zdůvodněte.

21.14 Odhadněte pohlavní fenotyp (vzhledem k anatomii i chování) následných mutantních genotypů drozofily: (a) XY; *tra fru/tra fru*; (b) XX; *tra fru/tra fru*; (c) XY; *dsx/dsx; fru/fru*; (d) XX; *dsx/dsx; fru/fru*.


21.15 Navrhněte pokus k důkazu, že exprese genu *fru* drozofily je řízena produkty genů *tra* a *tra2*, a nikoli produktem genu *dsx*.

21.16 Triploidní drozofila se dvěma chromozomy X se vyvine jako intersex. Vysvětlete vznik tohoto fenotypu.

21.17 Odhadněte fenotyp X0 a XX jedinců *C. elegans*, kteří jsou homozygotní v mutacích vedoucích ke ztrátě funkce jak genu *tra-1*, tak i *fem-1*.

21.18 Mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *xol-1* způsobuje u *C. elegans* smrt samečků, zatímco mutace ztráty funkce genu *Sxl* u drozofily způsobuje smrt samiček. Jak vysvětlíte tyto opačné účinky?


21.19 Proč ženy, a nikoli muži, homozygotní pro mutantní alelu způsobující fenylketonurii, mají děti, které jsou fyzicky a duševně retardované?

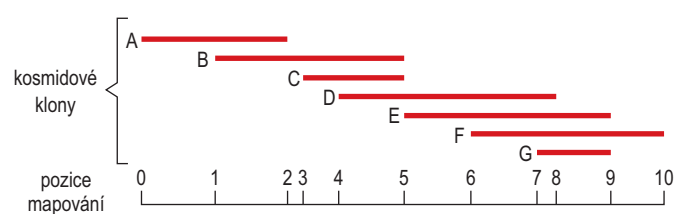
21.20  U drozofily je *bicoid* – podobně jako *dorsal* – striktně genem s maternálním účinkem; to tedy znamená, že nemá žádnou zygotickou expresi. Recesivní mutace *bicoid* (*bcd*) způsobují embryonální smrt tím, že zabraňují tvorbě anteriorních struktur. Odhadněte následující fenotypy: (a) *bcd/bcd* vytvořené křížením heterozygotních samečků a samiček; (b) *bcd/bcd* připravené křížením samiček *bcd/bcd* se samečkem *bcd/+*; (c) *bcd/+* vytvořené křížením samiček *bcd/bcd* se samečkem *bcd/+*; (d) *bcd/bcd* připravené křížením samiček *bcd/+* se samečkem *bcd/bcd*; (e) *bcd/+* vytvořené křížením samiček *bcd/+* se samečkem *bcd/bcd*.

21.21 Recesivní mutace genu drozofily určujícího dorzoventrální osu *dorsal* (*dl*) způsobují dorzalizovaný fenotyp v embryích tvořených matkami *dl/dl*; nevyvinou se ventrální struktury. Odhadněte fenotyp embryí tvořených samičkami homozygotními pro recesivní mutaci anterio-posteriorního genu *nanos*.

21.22 Přípravuje se analýza mutací maternálních genů, které řídí časně události ve vývoji drozofily. Jaké fenotypy by se měly hledat, aby byly identifikovány geny s maternálním účinkem?

21.23 Vědci plánují vyhledat a analyzovat mutace genů velkých mezer, které řídí první kroky v segmentaci embryí drozofily. Jaké fenotypy by se měly hledat, aby byly nalezeny geny velkých mezer?

21.24  Cílem výzkumu je klonovat gen *dpy-3* hlístice. Recesivní mutace tohoto genu způsobují, že červ je kratší než standard, fenotyp se proto nazývá „dumpy“ (zavalitý). Byl mapován gen *dpy-3* vzhledem k jiným genům na jeden chromozom *C. elegans* a s použitím mapovacích údajů byly získány kosmidové klony standardní DNA z blízkosti genu *dpy-3*. K nalezení klonu, který obsahuje gen *dpy-3*, byly do gonád hermafroditů homozygotních pro recesivní mutaci *dpy-3* injikovány jednotlivé kosmidové klony. Potom se sledovalo transgenní potomstvo odvozené z těchto injikovaných hermafroditů s ohledem na fenotyp dumpy. Na který kosmidový klon by měl být mapován gen *dpy-3*?



kosmidový klon	fenotyp transgenního potomstva
A	zavalitý
B	zavalitý
C	zavalitý
D	standardní
E	standardní
F	zavalitý
G	zavalitý

21.25 Načrtněte dráhu, která bude znázorňovat příspěvky genů *sevenless (sev)* a *bride of sevenless (boss)* k diferenciaci fotoreceptoru ve facétách očí drozofily. Kde by byl začleněn gen *eyeless (ey)*?

21.26 Když je myší gen *Pax6*, který je homologem genu *eyeless* u drozofily, exprimován v drozofile, tvoří přídavné složené oči s facetami, podobně jako normální oči drozofily. Jaký účinek byste očekávali, kdyby byl gen *eyeless* drozofily vložen do myši a zde exprimován?

21.27 Jak byste prokázali, že dva myší geny *Hox* jsou exprimovány v různých tkáních a v různých časových periodách vývoje?

21.28 Metylace DNA, acetylace a jiné modifikace histonů a uspořádání DNA v chromatinu prostřednictvím určitých druhů proteinů jsou nazývány epigenetickými modifikacemi. Tyto modifikace jsou jistými překážkami v reprodukčním klonování. Mohou přinášet i problémy v terapeutickém klonování a ve využití kmenových buněk k léčení chorob a zranění, která souvisejí se ztrátou určitých buněčných typů?

21.29 Předpokládejme, že živočich je schopen vytvořit 100 milionů různých protilátek a že každá protilátka obsahuje lehký řetězec dlouhý 220 aminokyselin a těžký řetězec dlouhý 450 aminokyselin. Jak velká by musela být genomová DNA, aby postačovala na kódující sekvence těchto genů?

21.30 Jakou technikou (s odkazem na **obr. 21.27**) byste mohli demonstrovat, že V- a C-oblasti lehkého řetězce kappa spočívají v různých restričních fragmentech *Bam*HI v genomové DNA izolované z embryí a v jediném fragmentu *Bam*HI v genomové DNA izolované z diferencované plazmatické buňky tvořící protilátku? Jaký výsledek byste očekávali, kdyby tato technika byla aplikována na DNA připravenou z diferencovaných fibroblastů (kožních buněk)?

21.31 Každý genový segment L_n, V_n v lokusu pro lehký řetězec kappa na chromozomu 2 sestává ze dvou kódujících exonů, jednoho pro zaváděcí peptid a jednoho pro variabilní část lehkého řetězce kappa. Očekávali byste, že na konci kódující sekvence ve druhém (V_n) exonu se nachází terminační kodon?

▶ Genomika na webu on the Web

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

1. Obrázky ilustrující anatomii a vývojová stadia drozofily jsou archivovány na webových stránkách Flybase. Sledujte odkazy ze stránek NCBI (National Center for Biotechnology Information) na stránku Flybase a zvolte Image-Browse. Potom zvolte ikonku Embryo a prohlédněte si obrázky. Kdy syncytiální jádra migrují v časném embryu k buněčné membráně? Kdy jsou tato jádra od sebe oddělena tvorbou membrán mezi nimi?

2. Webová stránka Flybase také obsahuje film o vývoji drozofily. Zvolte ikonku Movie a studujte embryogenezi sledováním filmu, který ukazuje migraci buněk při procesu gastrulace z boční perspektivy. Potom se podívejte na film, který prezentuje gastrulaci embrya, jež je homozygotní pro mutaci genu párového pravidla *fushi tarazu (ftz)*. Popište, co je na tomto embryu *ftz* abnormální.

3. V databázi zvané Wombatlas bylo shromážděno obrovské množství informací o anatomii a vývoji modelového organismu *C. elegans*. Sledujte odkazy ze stránek NCBI na Wombatlas. Podívejte se na video živé hlístice. Potom zvolte ikonku Lineage Tree a získáte diagram ukazující, kdy se tvoří každá z buněk dospělé hlístice. Zaměřte se na embryonální linii a naleznete, kdy přišly na svět buňky E a C. Symbol X v liniích značí buňky, které se podrobují apoptóze. Ve které z těchto sublinií – E či C – se apoptóza odehrává?

4. Z webu NCBI se dostanete na ZFIN, webové stránky pro vědce, kteří studují rybu zebříčku. Zvolte Anatomy and Resources a dostanete se na stránku s přístupem k obrázkům a filmům o vývoji zebříčky. Proč je v časném stadiu embryogeneze omezeno buněčné dělení jen na dorzální část každého obrázku?