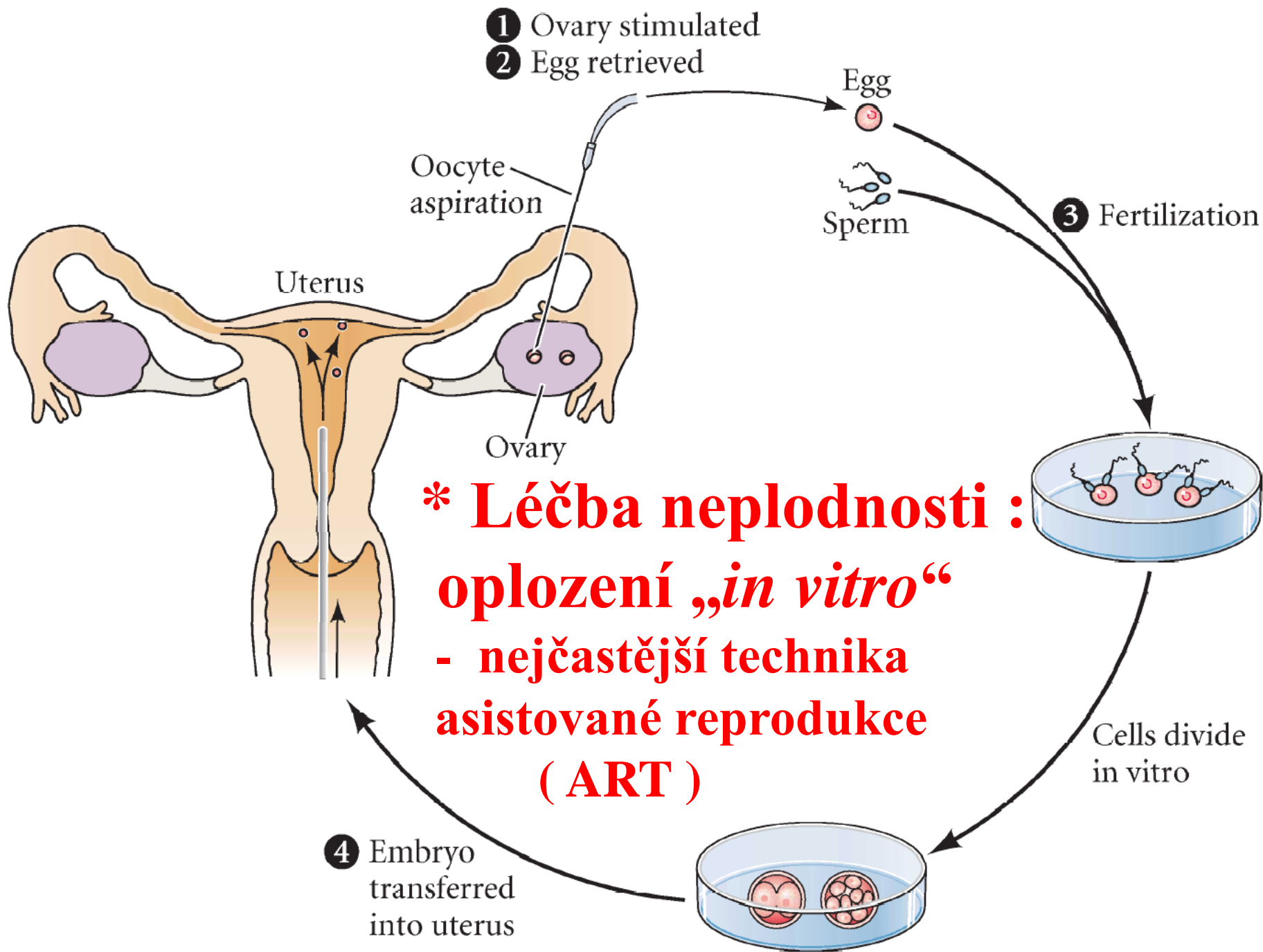


# Některé významné aspekty vývojové biologie v medicíně

- terapie infertility (*in vitro* oplození)
- genetické poruchy vývoje člověka - malformace (Down, Waardenburg, Martin-Bell)
- teratogeneze (alkohol, DES)
- potlačování růstu nádorů
- DNA terapie, klonování



**\* Léčba neplodnosti :  
oplození „in vitro“  
- nejčastější technika  
asistované reprodukce  
( ART )**

# Jiná alternativa ART: intracytoplazmatická injekce spermie do oocytu (při snížené životnosti spermií)



Intracytoplasmic sperm injection. injected into the cytoplasm of the the egg is on the left. The injection right.

## Nobelovu cenu za lékařství získal Robert Edwards

4. října 2010 v 16:07

Týden, na který čeká celý vědecký svět právě začal. Švédská akademie vyhláší laureáty Nobelových cen. Asi nejsledovanější je Nobelova cena za mír, kterou se dozvíme až v pátek. Mezitím 644x376 nás čeká ještě fyzika, chemie a literatura. Dnes akademie oznámila, kdo získal Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

Britský fyziolog Robert Edwards získal letošní Nobelovu cenu díky své práci na umělém oplodnění. V 60. letech navzdory společenskému odporu zkoumal možnosti takzvaného IVF.



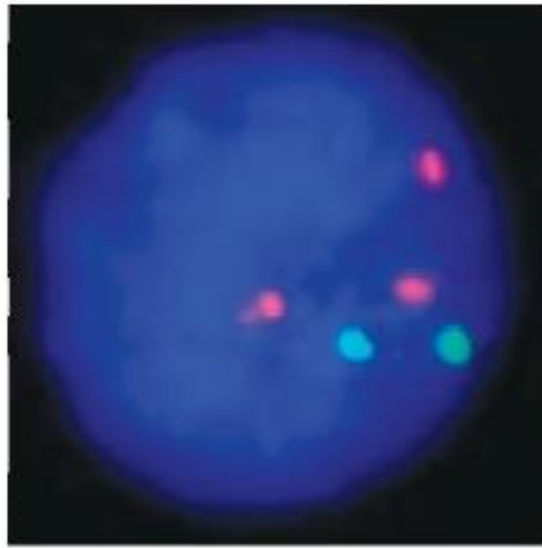
Robert Edwards

# Možné problémy asistované reprodukce :

- rutinní techniky od roku 1978  
(první dítě ze zkumavky Louise Brown)
- úspěšnost těhotenství klesá s věkem matky  
(klesá kvalita jejích oocytů)
- obvykle se přenáší tři embrya současně, tedy riziko vícečetných porodů, malformací a předčasných porodů
- nejsou poruchy plodnosti dědičné?
- řada etických problémů: jen pro bohaté (10.000 USD), právní statut zmrazených embryí, výběr pohlaví

\* **Malformace : vývojové abnormality způsobené genetickou událostí (mutace, aneuploidie, translokace)**

- aniridie (absence duhovky) způsobená mutací genu *PAX6*
- Downův syndrom - trisomie 21, zřejmě nadprodukce regulačních proteinů, komplex malformací nervové soustavy, srdce a svalů, jiné trisomie bývají letální
- většina studovaných malformací spočívá v mutacích genů kódujících enzymy, kolageny, globiny
- drtivá většina malformací zřejmě končí nesledovatelným spontánním abortem



## Downův syndrom (trisomie 21)

Down syndrom critical region (DSCR) - gen exprimován v mozku, srdci a svalech, kóduje regulační protein metabolismu vápníku (identifikace pozičním klonováním = klonování a srovnávání úseků DNA přilehlých k mapovanému genu)



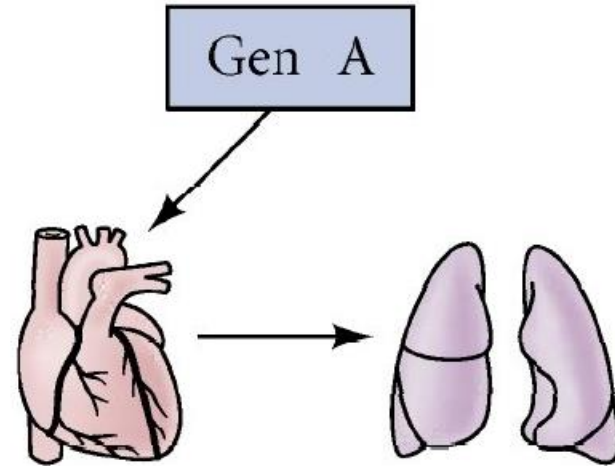
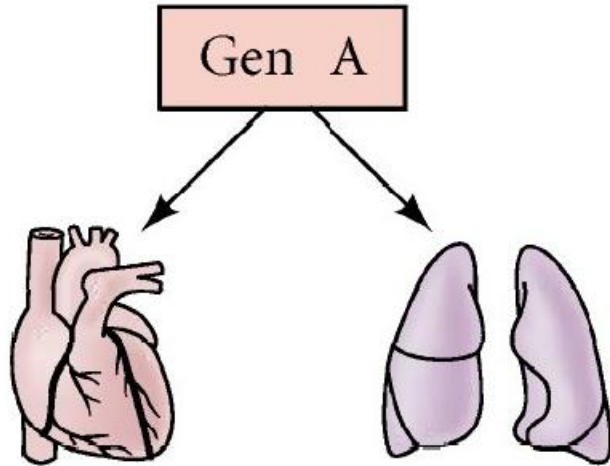
## Microftalmie u myši a člověka

autosomální dominantní Waardenburgův syndrom typu 2:  
malé oko, hluchota, pestrá duhovka, bílá kučera;

odpovídá myšícímu homolognímu genu *Mitf*,  
kóduje DNA-vazebný protein, lidský gen identifikován  
mapováním kandidátního genu

# Pleiotropie : jeden gen má několik různých fenotypových projevů

(a) **Mozaiková pleiotropie**  
jednotlivé orgány jsou ovlivňovány  
abnormální genovou funkcí  
separátně



(b) **Relační pleiotropie**  
mutací je ovlivněno několik typů  
orgánů, i když některé mutovaný  
gen vůbec neexprimují

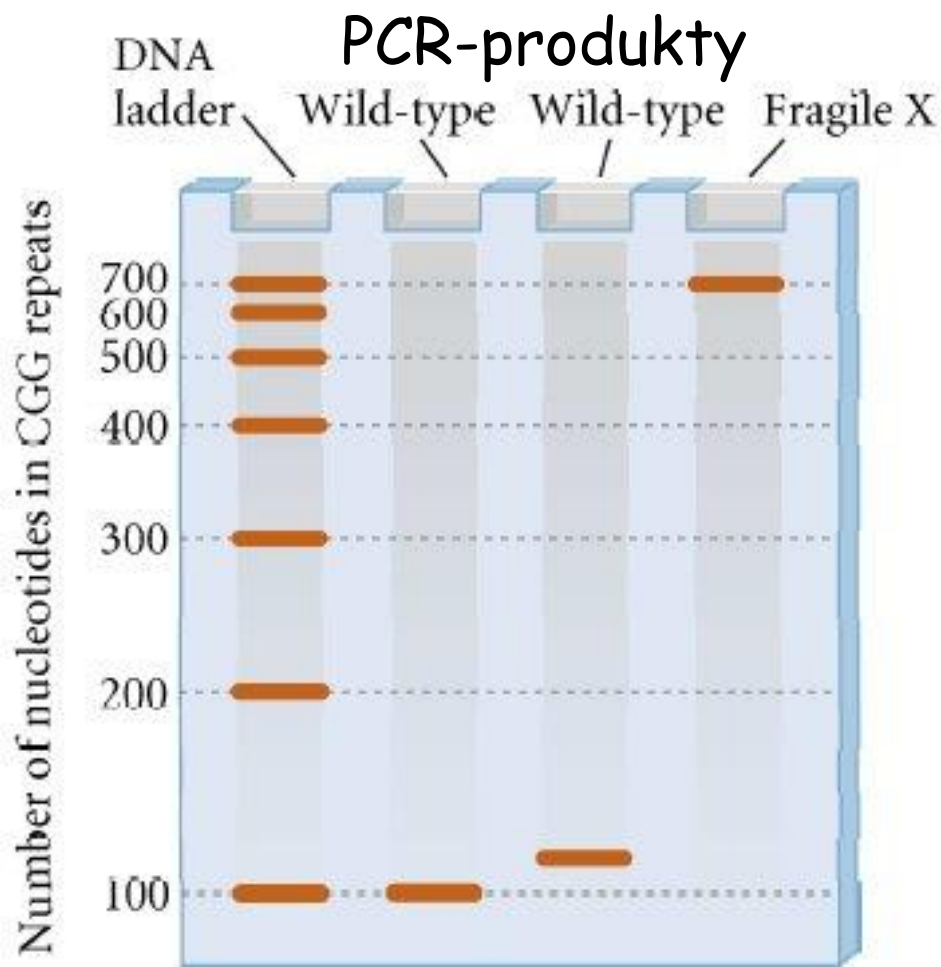
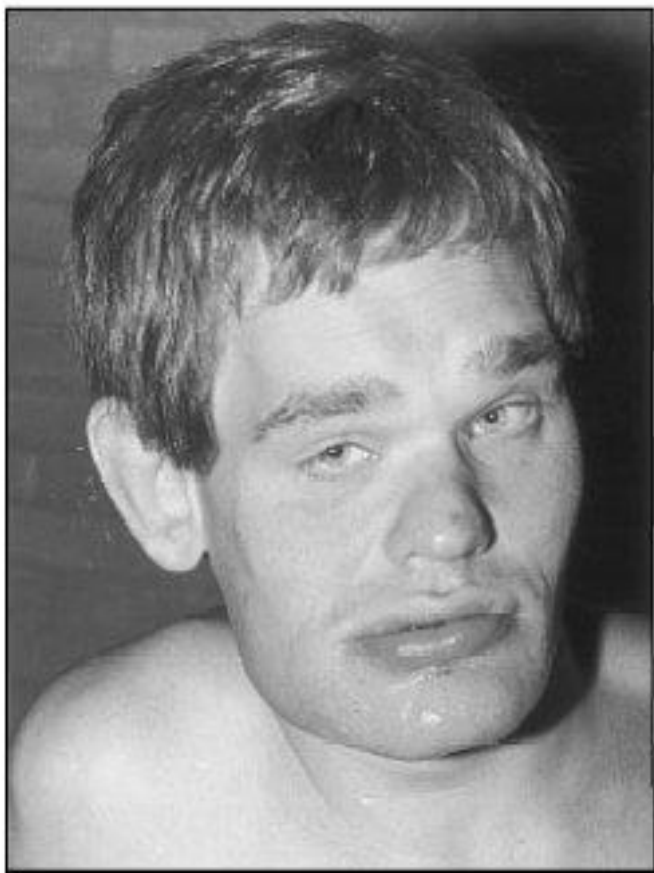


# Změny genové exprese související s lidskými chorobami se mohou vyskytovat na úrovních:

- transkripce (mutace genů kódujících transkripční faktory a komponenty signálních transdukčních kaskád)
- sestřihu RNA - 35% genů může mít alternativní sestřih (př. Down Syndrome Cell Adhesion Molecule má několik izoformem proteinu)
- translace - mutace mohou vytvářet translační terminační kodony
- posttranslačních modifikací

## Some genes encoding human transcription factors and phenotypes resulting from their mutation

Gene	Mutation phenotype
Androgen receptor	Androgen insensitivity syndrome (Ch. 20)
<i>AZF1</i>	Azoospermia
<i>CBFA1</i>	Cleidocranial dysplasia (Ch. 15)
<i>CSX</i>	Heart defects
<i>EMX2</i>	Schizencephaly (Ch. 23)
Estrogen receptor	Growth regulation problems, sterility (Ch. 15)
<i>Forkhead-like 15</i>	Thyroid agenesis, cleft palate
<i>GLI3</i>	Grieg syndrome (Ch. 16)
<i>HOXA-13</i>	Hand-foot-genital syndrome (Ch. 16)
<i>HOXD-13</i>	Polysyndactyly (Ch. 16)
<i>LMX1B</i>	Nail-patella syndrome (Ch. 16)
<i>MITF</i>	Waardenburg syndrome type 2 (Chs. 5, 21)
<i>PAX2</i>	Renal-coloboma syndrome (Ch. 15)
<i>PAX3</i>	Waardenburg syndrome type 1 (Ch. 13)
<i>PAX6</i>	Aniridia (Chs. 5, 21)
<i>PTX2</i>	Reiger syndrome (Ch. 11)
<i>PITX3</i>	Congenital cataracts
<i>POU3F4</i>	Deafness and dystonia
<i>SOX9</i>	Campomelic dysplasia, male sex reversal (Chs. 15, 20)
<i>SRY</i>	Male sex reversal (Ch. 20)
<i>TBX3</i>	Schinzal syndrome (ulna-mammary syndrome)



Syndrom fragilního chromozomu X (Martin-Bell): gen FMR1 kóduje RNA-vazebný protein, který je nezbytný k translaci. Počet repeticí CGG v netranslatované oblasti je kritický k tomu, aby byl gen FMR1 transkribován.

Časná dignostika umožňuje předcházet malformacím



Preimplantation genetics is performed on one or two blastomeres (seen here in the pipette) taken from an early blastocyst. The polymerase chain reaction is then used to determine whether certain genes in these cells are present, absent, or mutant.

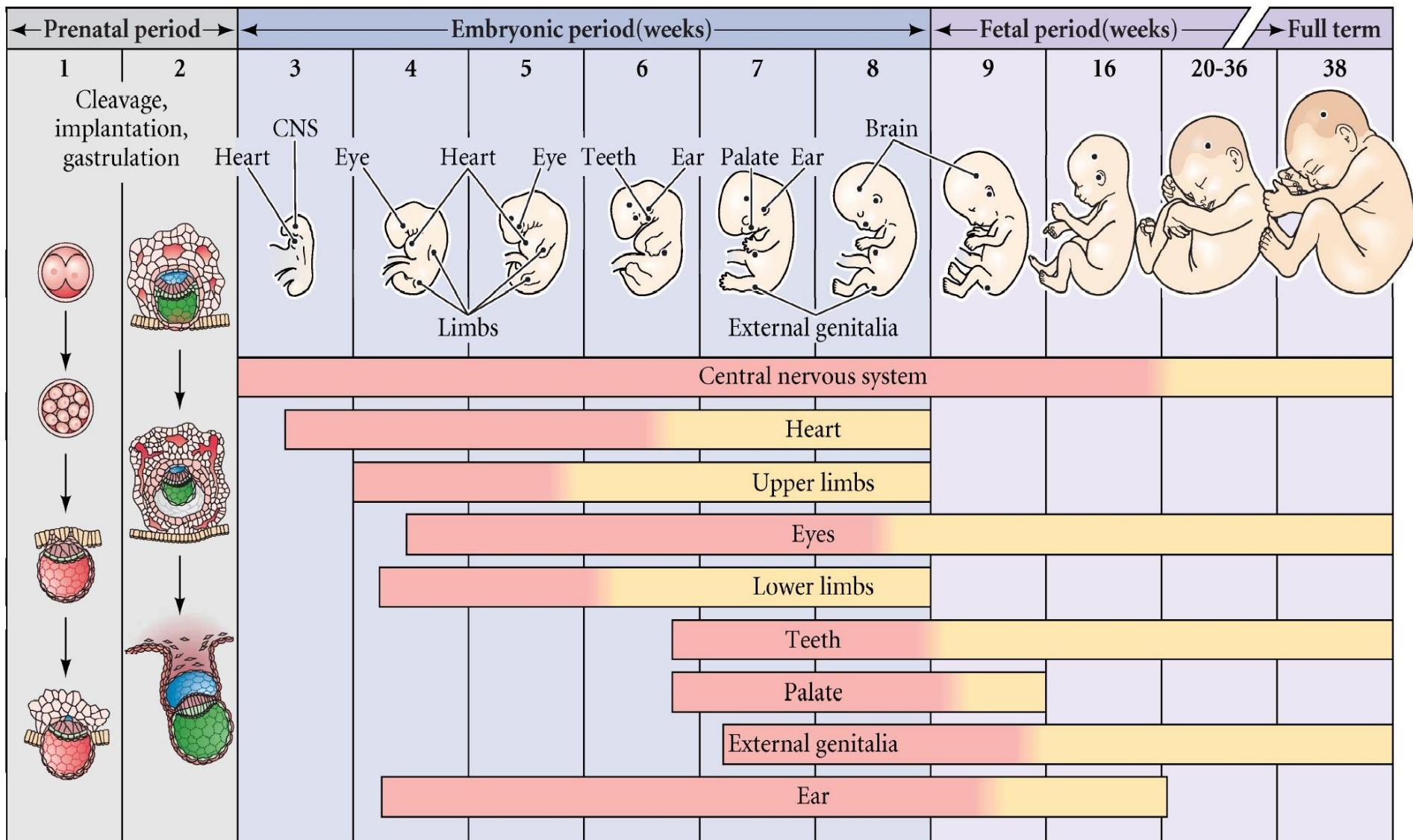
\* **Teratogeneze** : narušení řádného vývoje environmentálními faktory (teratogeny - působí obvykle specificky v různých fázích embryonálního či fetálního vývoje)

1962: Rachel Carson - pesticid DDT ničí ptačí vejce

1962: William Lenz - thalidomid (těhotenské sedativum) způsobuje abnormity končetin a ucha plodu

1964: virové onemocnění zarděnky u těhotných způsobilo u 20 tisíc plodů slepotu či hluchotu

# TERATOGENEZE: citlivost embryonálnich orgánů k teratogenům



Malformation results in death

• Common site of teratogen action

■ Major congenital anomalies

■ Functional defects and minor anomalies

## Some agents thought to cause disruptions in human fetal development

### DRUGS AND CHEMICALS

Alcohol

Aminoglycosides  
(Gentamycin)

Aminopterin

Antithyroid agents (PTU)

Bromine

Cortisone

Diethylstilbesterol (DES)

Diphenylhydantoin

Heroin

Lead

Methylmercury

Penicillamine

Retinoic acid  
(Isotretinoin, Accutane)

Streptomycin

Tetracycline

Thalidomide

Trimethadione

Valproic acid

Warfarin

IONIZING RADIATION (X-RAYS)

HYPERTHERMIA

INFECTIOUS MICROORGANISMS

Coxsackie virus

Cytomegalovirus

Herpes simplex

Parvovirus

Rubella (German measles)

*Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis)

*Treponema pallidum* (syphilis)

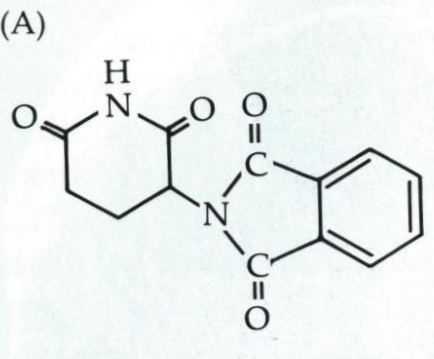
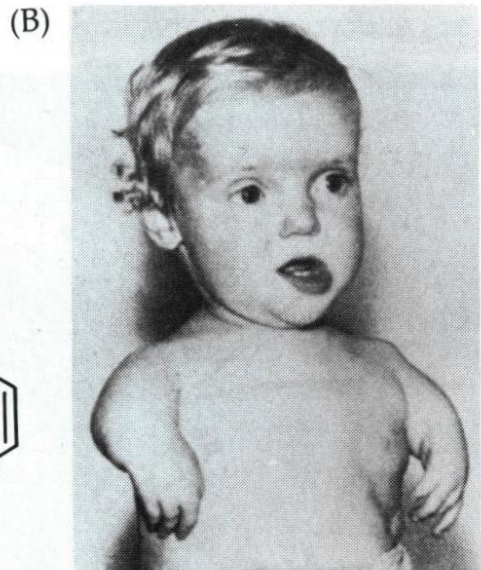
METABOLIC CONDITIONS IN THE MOTHER

Autoimmune disease (including Rh  
incompatibility)

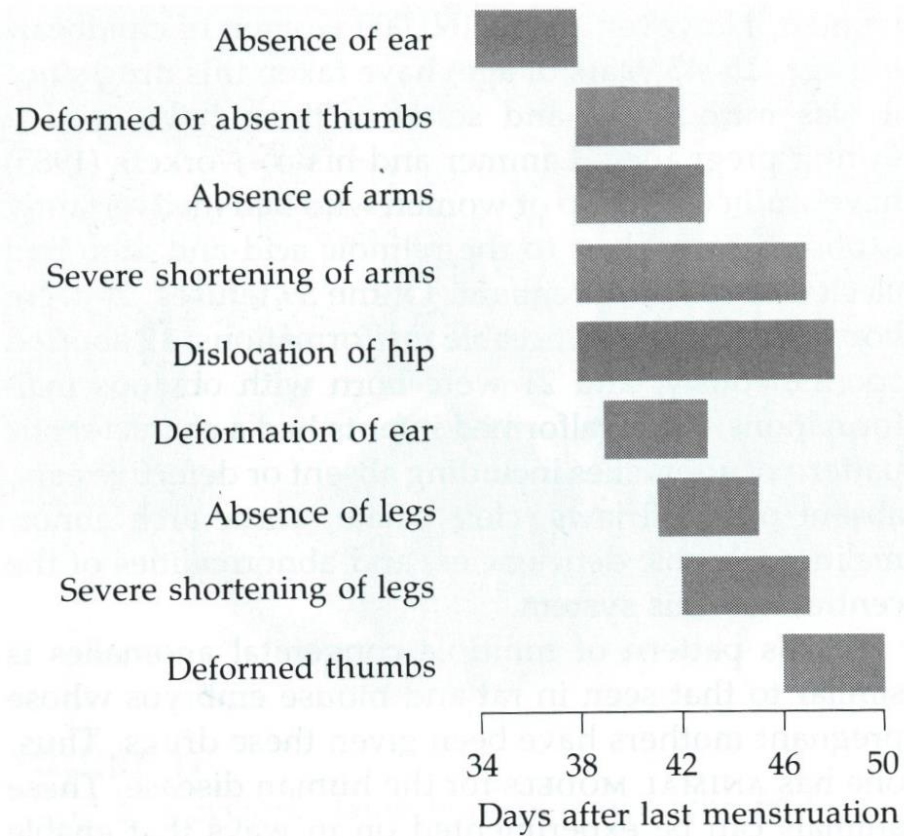
Diabetes

Dietary deficiencies, malnutrition

Phenylketonuria



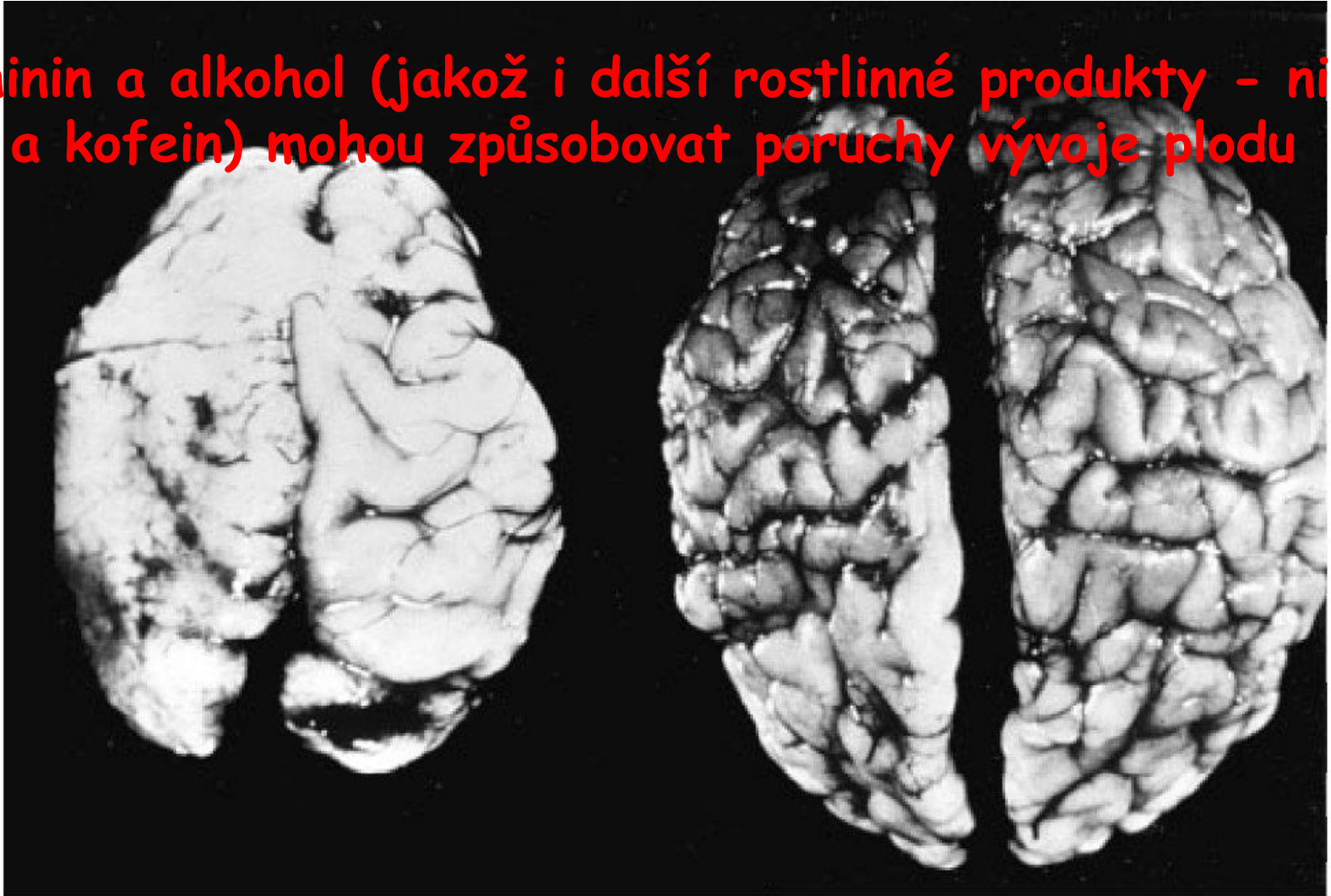
Thalidomide structure and effect. (A) Chemical structure of thalidomide. (B) Phocomelia in newborn whose mother had taken thalidomide during the first two months of pregnancy.



Timing of susceptibility to the teratogenic effects of thalidomide.



Chinin a alkohol (jakož i další rostlinné produkty - nikotin a kofein) mohou způsobovat poruchy vývoje plodu



Comparison of a brain from an infant with fetal alcohol syndrome (FAS, left) with a brain from a normal infant of the same age (right). The brain from the infant with FAS is smaller, and the pattern of convolutions is obscured by glial cells that have migrated over the top of the brain.



V Rocky Mountains jsou porosty liliovité rostliny *Veratrum californicum* (kýchavice), která vytváří nebezpečné alkaloidy ...

Kýchavice

*Veratrum californicum*

vytváří teratogenní  
alkaloidy jervin a cyclopamin,  
inhibují syntézu cholesterolu  
v plodu a blokují tak  
funkci genu Sonic Hedgehog

.....

*Veratrum* je oblíbenou  
pastvou ovcí. Březí ovce pak  
rodí jehňata  
s neurologickým poškozením

... **cyclopia**





# DES

(diethylstilbestrol)

environmentální

estrogen,

používaný jako

lék v těhotenství,

.....

dcery takto

léčených žen

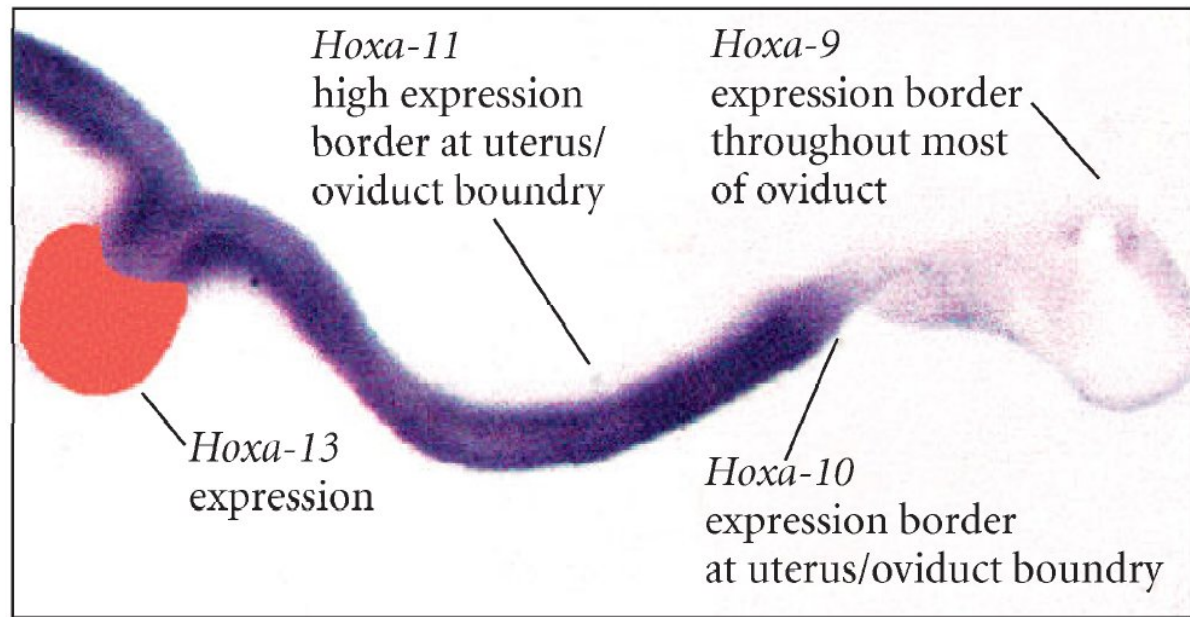
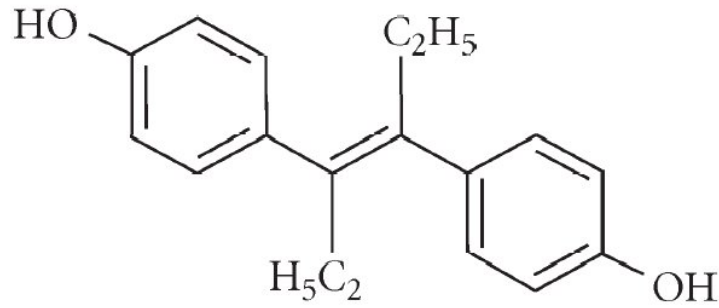
vykazují poruchy

urogenitálního

traktu,

ovlivňuje expresi

homeotických genů



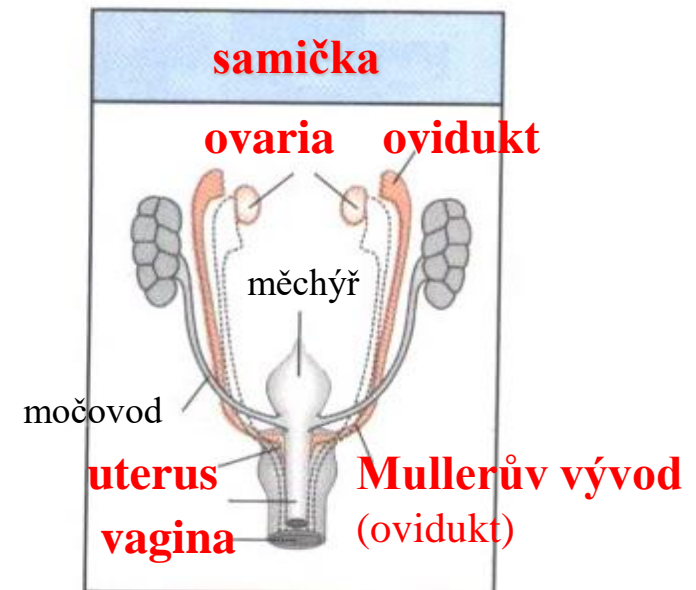
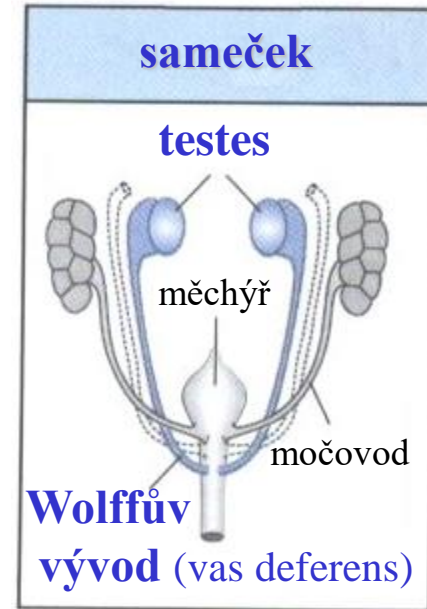
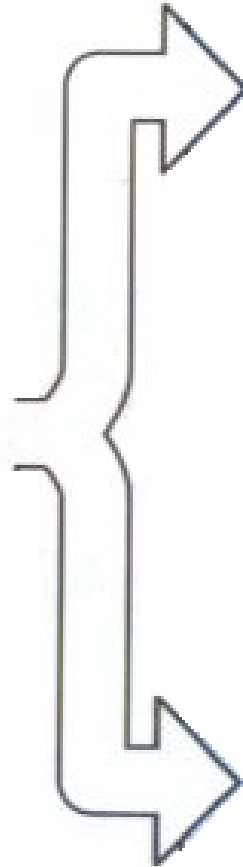
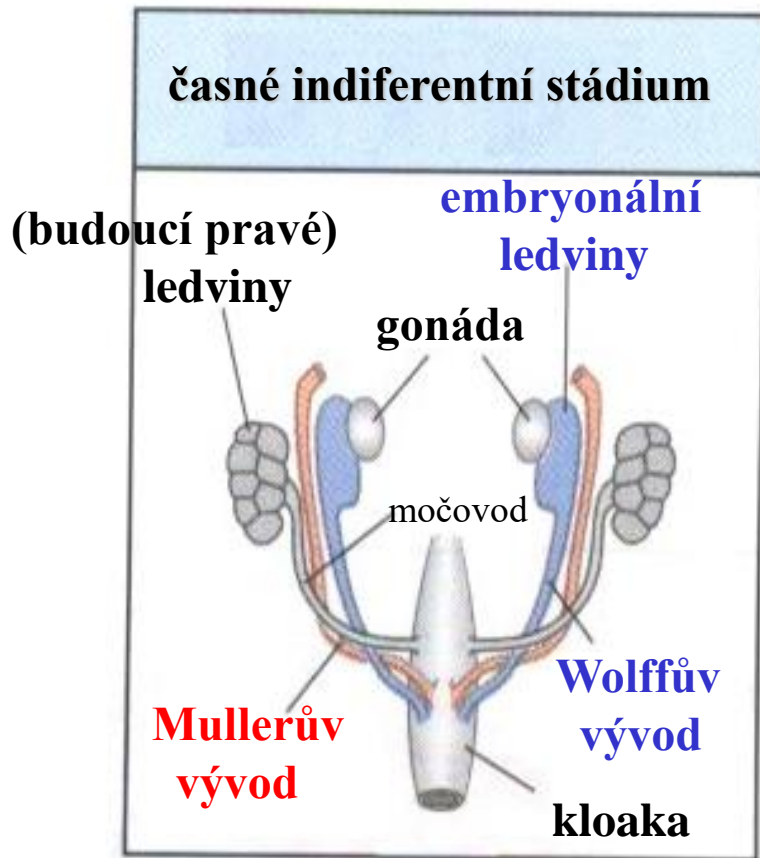
*Hoxa-13*

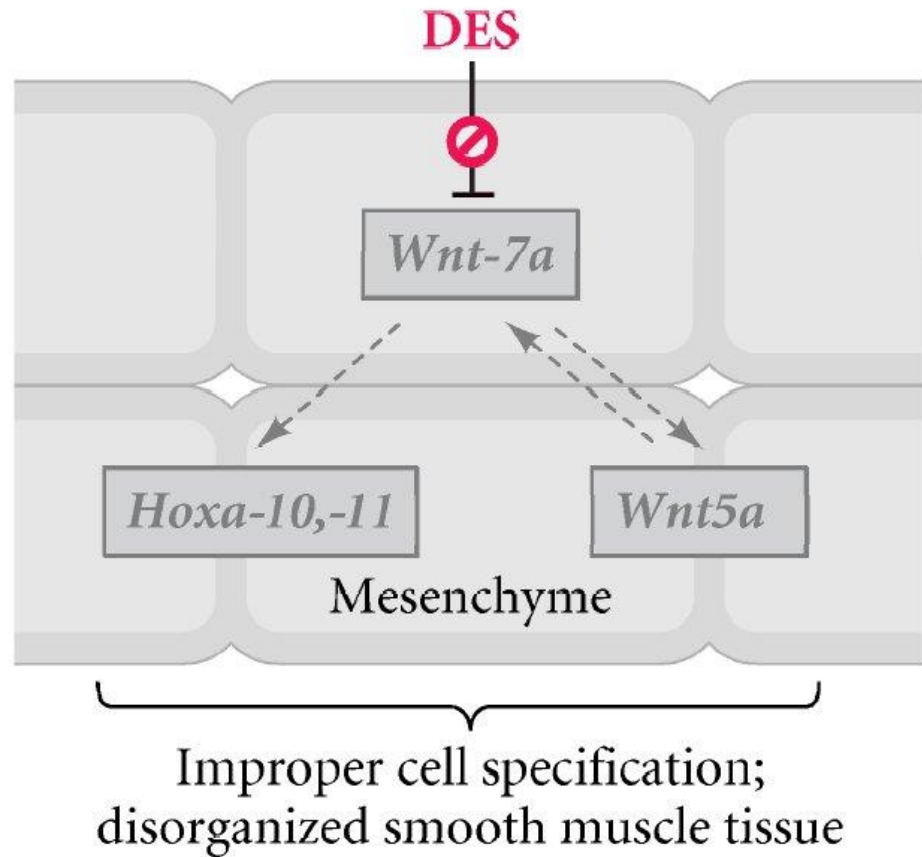
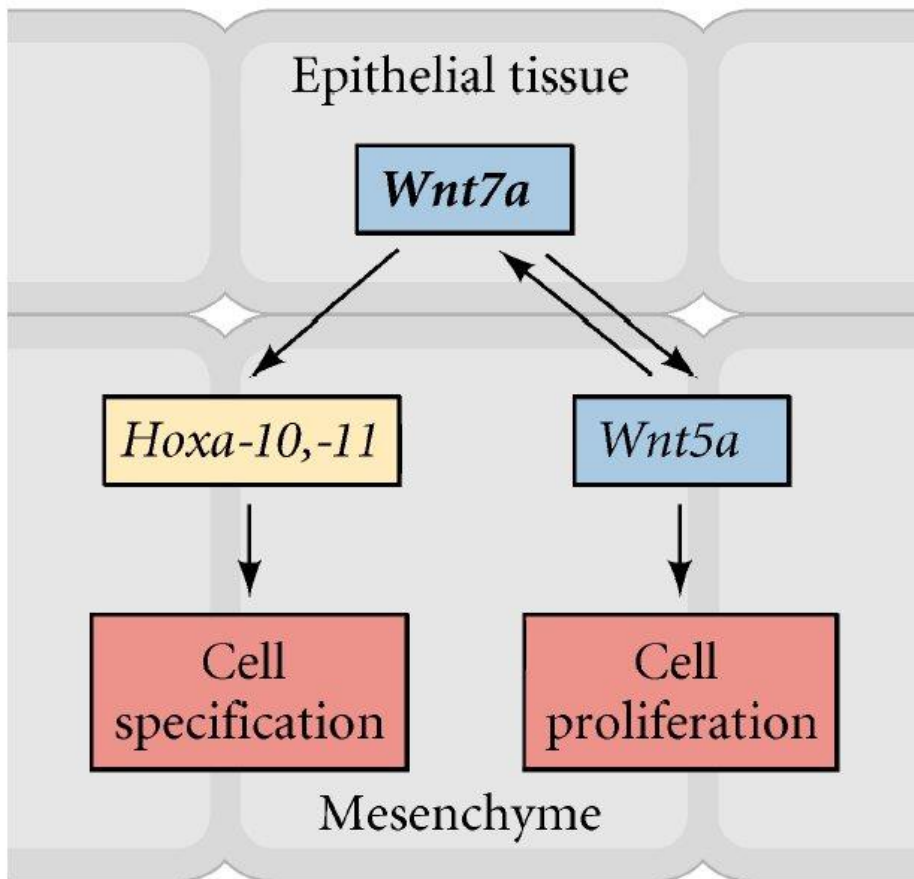
*Hoxa-11*

*Hoxa-10*

*Hoxa-9*

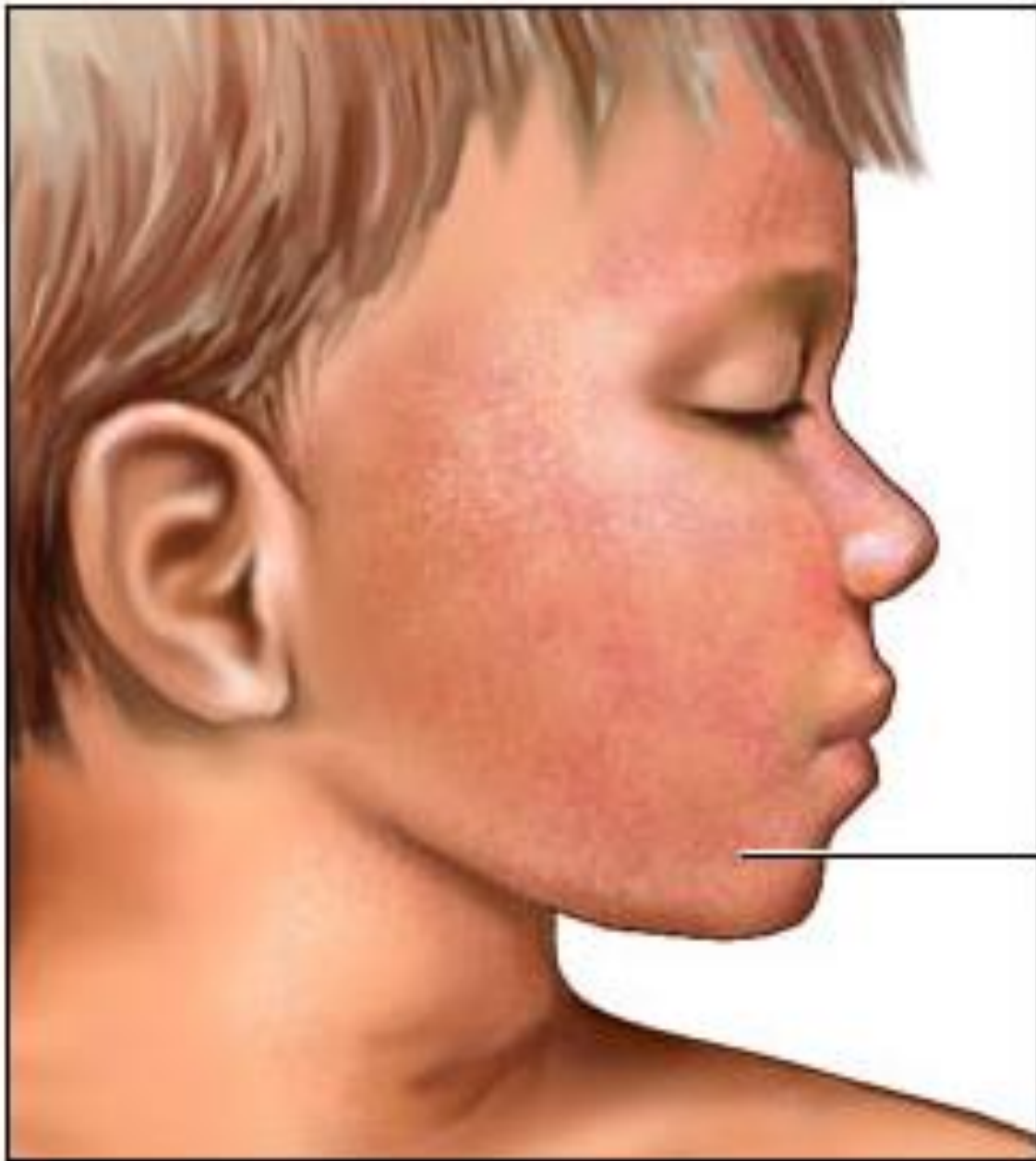
# Vývin gonád a příbuzných struktur u savců





Normální morfogeneze: růstový faktor Winty7a v epitelu indukuje Hox a Wnt5 v mezenchymu, což vede k morfogenezi uteru

Diethylstilbestrol, rozpoznávaný receptorem estrogenu, blokuje expresi Winty7a, faktory v mezenchymu chybějí, což vede ke změně morfolgie uteru



Rubella  
(German measles)

Patogeny jako teratogenní agens - zarděnky





# DEAFBLINDNESS

## MATERNAL RUBELLA

The virus is airborne, it spreads through coughs etc, and is infectious for a period of approximately 2 weeks. After 1940 the childhood disease was first associated with a condition appearing in a number of newborn babies. The effects of the Rubella virus are most severe during the first three months of pregnancy.

During the first four months the foetal immune system is unable to fight infections effectively. During this same period the foetus undergoes major changes as most organs and physiological systems are developed. Age

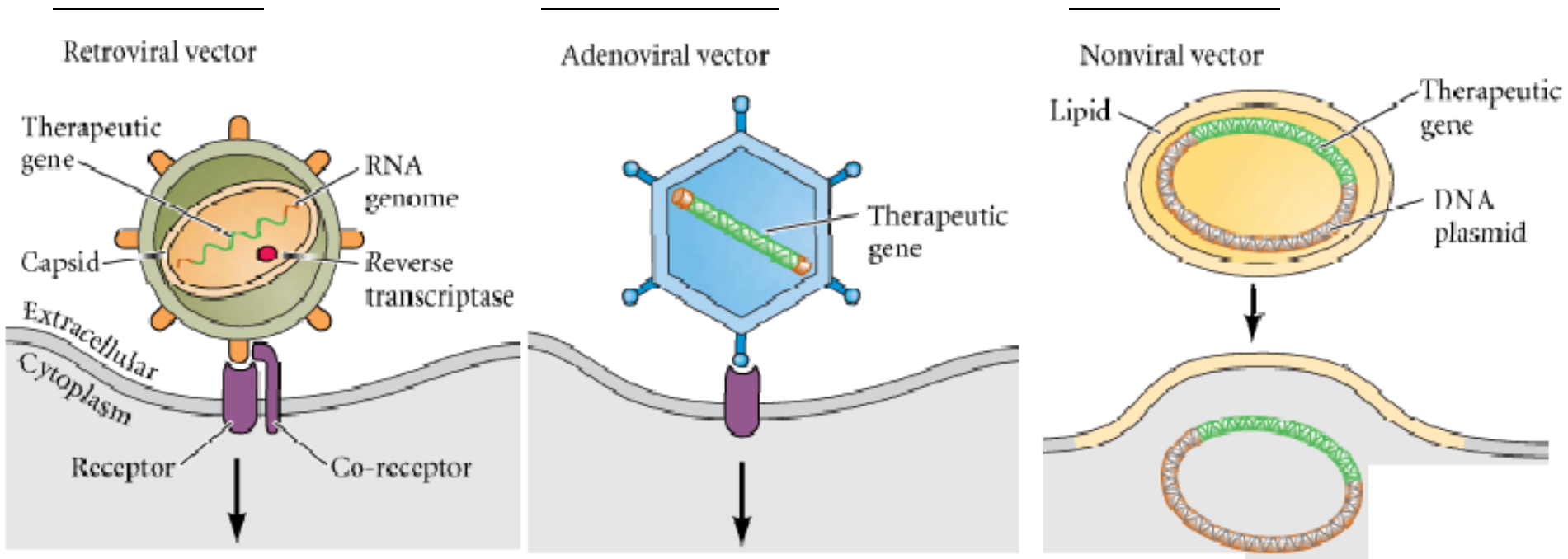
3 - 7 Weeks: formation of the eye and lens,

3 - 8 weeks: formation of the heart,

8 - 18 weeks: formation of the functions of ears.

12 weeks onwards: progressive development of central nervous system.

Infection of the mother through the Rubella virus in the first few weeks of pregnancy usually leads to miscarriage. Later infection during the first 3 - 4 months may lead to many complications.



## \* Genové terapie

vedou ke genetickým modifikacím buněk lidského těla. Kultivace specifických kmenových buněk s novým genem a jejich reinzerce do těla prezentuje somatickou genovou terapii. Modifikace buněk zárodečné linie vede k dědičným změnám (transgenní organizmy).

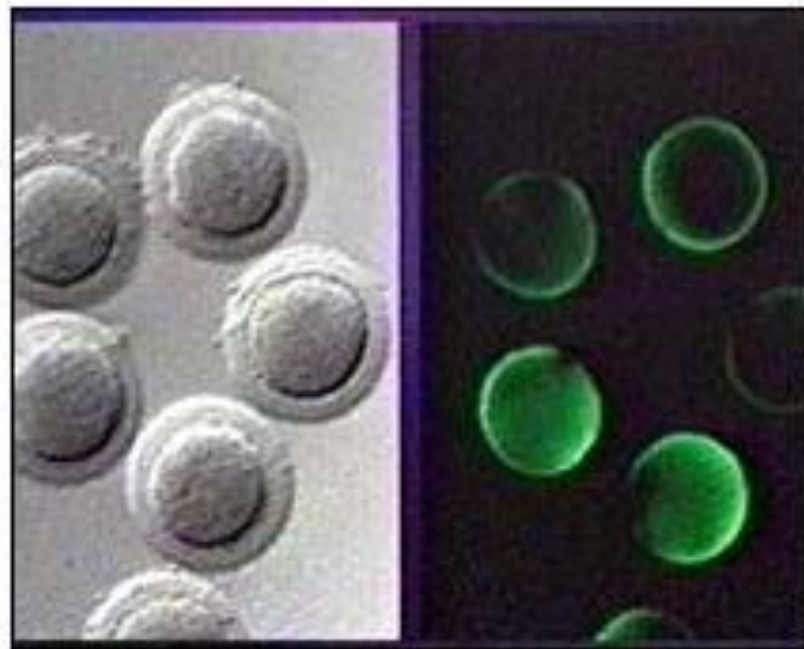


AND1 (backwards for "inserted DNA"), a transgenic rhesus monkey. The gene for green fluorescent protein is present in each of his nuclei.

## Next step -- humans?

So now that scientists have put a jellyfish gene into a monkey, do they now want to insert a gene from a non-human animal into a human being?

No, said Schatten. "We don't support any extension or extrapolation of this work from laboratory animals to humans."



Unfertilized monkey eggs with the fluorescent gene in them, under a microscope and ultraviolet light

The jellyfish gene was used, Schatten said, because it is known to be harmless and because it is easily detectable.

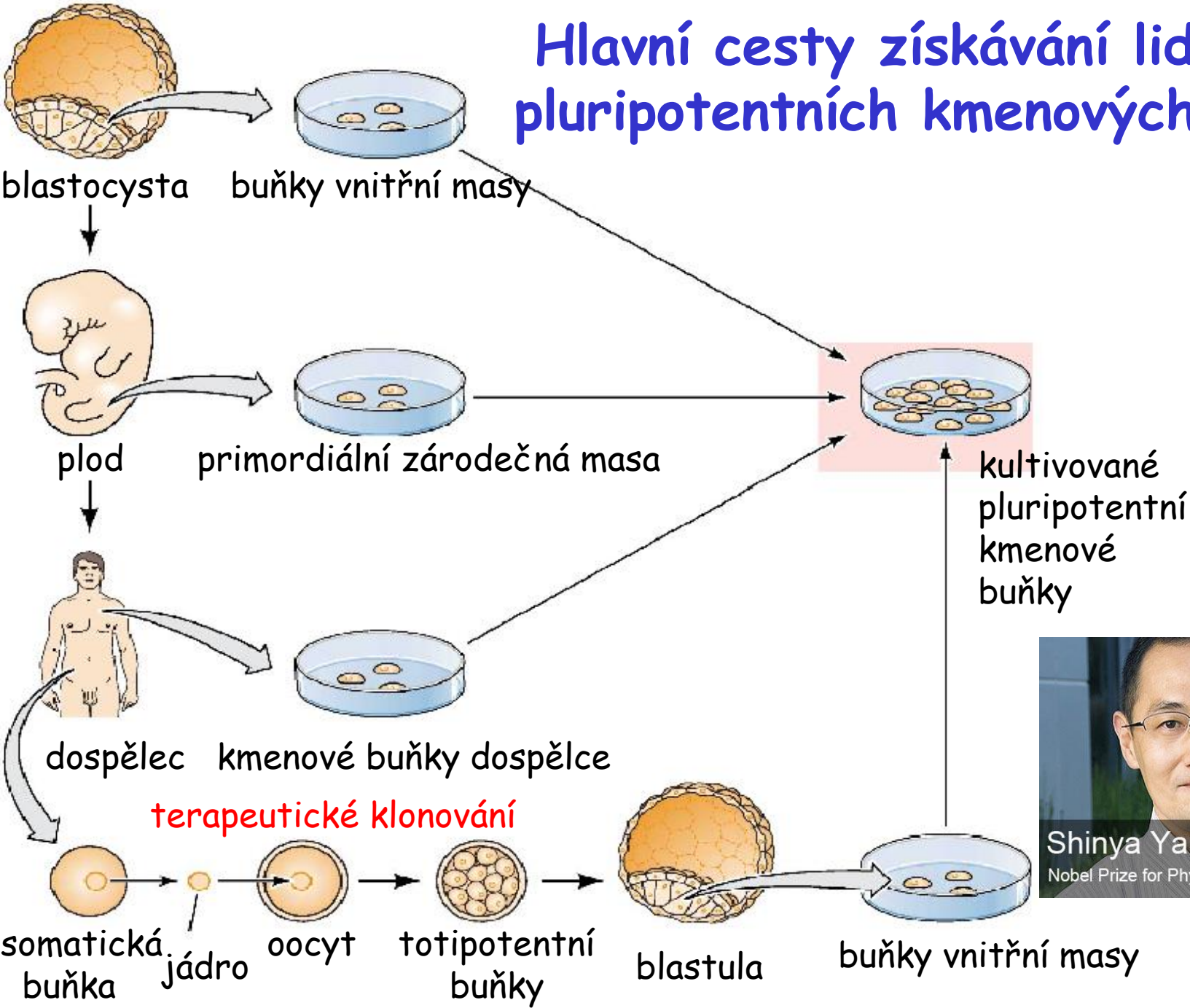


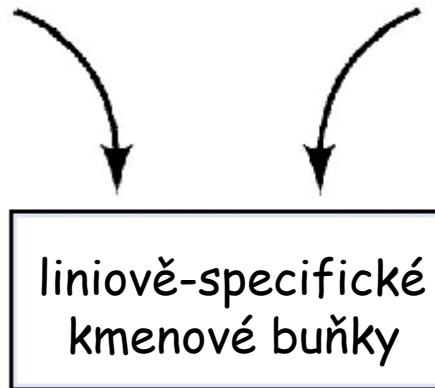
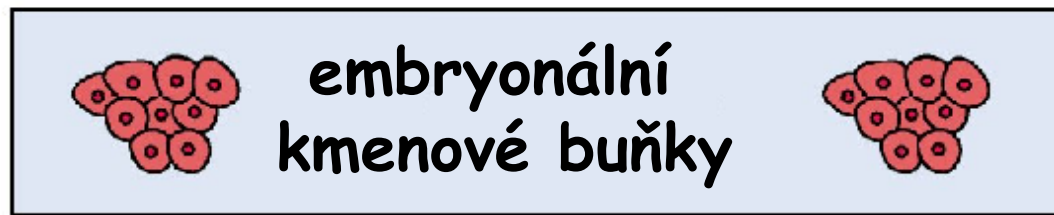
The fingernails (top) and hair follicles of two other monkeys with the fluorescent gene glow under ultraviolet light

ANDi appears normal so far - he does not glow the way a jellyfish does. But the two other monkeys who got the gene did exhibit fluorescence. Their hair and fingernails glowed green when exposed to ultraviolet light under a microscope.

Eventually, Schatten said, scientists hope to insert other types of harmless genetic markers that can be tracked with magnetic resonance or PET scans. If successful, doctors might be able to monitor the developmental events that lead to many diseases, he added.

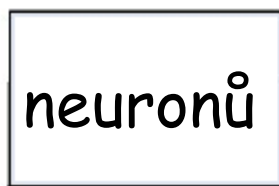
# Hlavní cesty získávání lidských pluripotentních kmenových buněk





odlišné kultivační  
podmínky

prekurzory  
buněk :



Terapie s pomocí  
embryonálních  
kmenových buněk







# Localized, direct plasmid gene delivery *in vivo*: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration

JEFFREY BONADIO<sup>1</sup>, ELIZABETH SMILEY<sup>1</sup>, PRAVIN PATIL<sup>2</sup> & STEVEN GOLDSTEIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109-0417, USA*

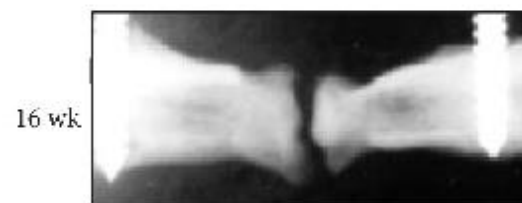
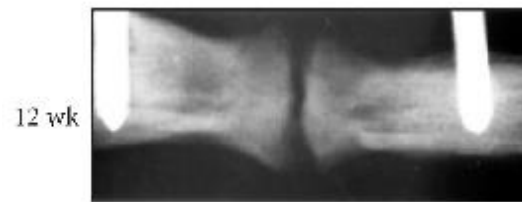
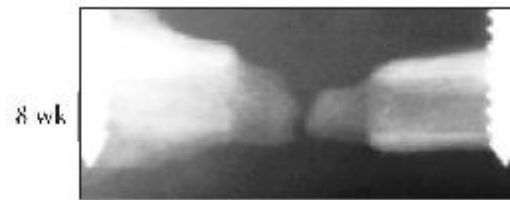
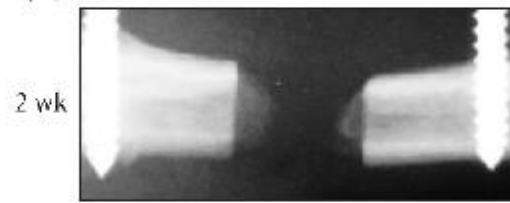
<sup>2</sup>*Orthopaedic Research Laboratories, University of Michigan Medical School,  
Ann Arbor, Michigan 48109-0486, USA*

*J.B. present address: Selective Genetics, 11035 Roselle Street, San Diego, California 92121, USA*

*Correspondence should be addressed to J.B.; email: jbonadio@selectivegenetics.com*

The inability to deliver growth factors locally in a transient but sustained manner is a substantial barrier to tissue regeneration. Systems capable of localized plasmid gene delivery for prolonged times may offer lower toxicity and should be well-suited for growth factor therapeutics. We investigated the potency of plasmid gene delivery from genes physically entrapped in a polymer matrix (gene activated matrix) using bone regeneration as the endpoint *in vivo*. Implantation of gene activated matrices at sites of bone injury was associated with retention and expression of plasmid DNA for at least 6 weeks, and with the induction of centimeters of normal new bone in a stable, reproducible, dose- and time-dependent manner.

(A) Treated fracture

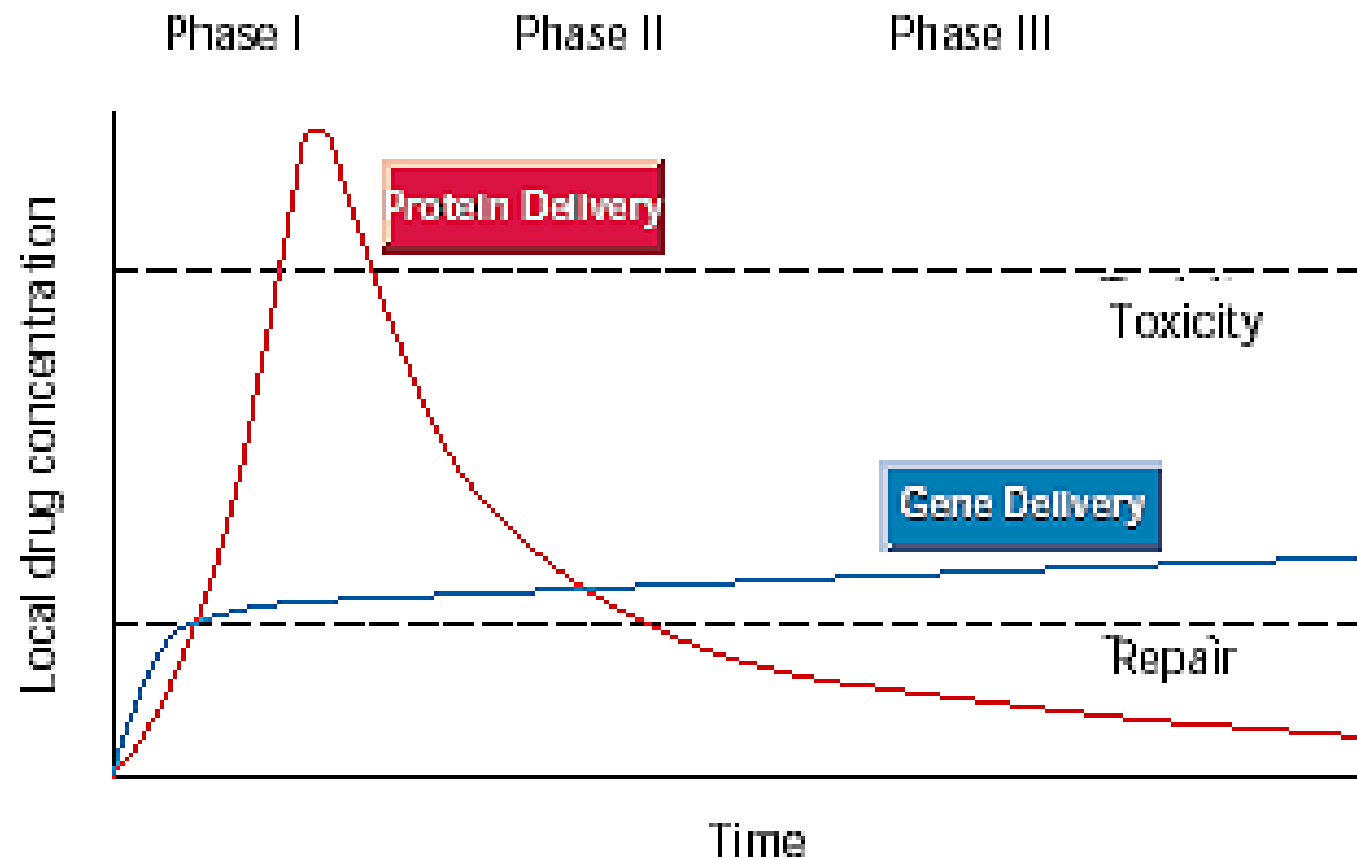


(B) Untreated fracture  
24 wk



(C) Whole bone  
53 wk





Local recombinant protein and plasmid gene delivery in tissue repair and regeneration. Wound healing is divided into phases I–III. Phase I is characterized by a series of concerted responses mounted to the destruction and hemorrhage associated with tissue injury. Phase II is a repair period that begins with the formation of granulation tissue. Phase III is a resolution period that eventually ends with either scar formation or tissue regeneration.



Haf, haf !  
Nejradši mám  
plazmidy !