

Přehled vývojové biologie a genetiky

Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.

Biofyzikální ústav AV ČR

Královopolská 135, 612 65 Brno

Vydal Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze, 1999
ISBN 80-902588-1-6

Obsah:

- 1 Obecné zákonitosti vývoje organizmů ... 3
 - 1.1 Historie vývojové biologie ... 4
 - 1.2 Základní procesy vývoje ... 9
 - 1.3 Epigenetická tvorba tvarů ... 14
 - 1.4 Modely tvorby biologických tvarů ... 17
 - 1.5 Vznik uspořádání ... 20
 - 1.6 Homeóza a homeotické geny ... 22
 - 1.7 Modelové organizmy vývojové biologie a genetiky ... 27

- 2 Vývojové procesy u modelových živočichů ... 32
 - 2.1 Hlenka, *Dictyostelium discoideum* ... 32
 - 2.2 Nezmar, *Hydra* ... 36
 - 2.3 Hlístice, *Caenorhabditis elegans* ... 42
 - 2.4 Octomilka, *Drosophila melanogaster* ... 50
 - 2.5 Ježovka, *Lytechinus variegatus* ... 70
 - 2.6 Obojživelníci, *Amphibia* ... 74
 - 2.7 Savci, *Mammalia* ... 84

- 3 Vývojová genetik a rostlin ... 95
 - 3.1 Nižší rostliny ... 96
 - 3.2 Krytosemenné rostliny, *Angiospermophyta* ... 102
 - 3.2.1 Gametofyt a gametofytické mutace ... 103
 - 3.2.2 Oplození, embryogeneze a tvorba semene ... 116
 - 3.2.3 Geny řídící růst meristému a morfologii stonku a listů ... 135
 - 3.2.4 Genetické řízení procesů kvetení ... 143
 - 3.2.5 Modulace rostlinného vývoje transgenozí ... 153

- 4 Determinace a vývoj pohlavnosti ... 160
 - 4.1 Zárodečná dráha a tvorba pohlavních buněk ... 161
 - 4.2 Mechanizmy determinace pohlaví ... 162
 - 4.3 Kompenzace dávky genů ... 175
 - 4.4 Úloha pohlavnosti ... 179

- 5 Epigenetické procesy ... 183
 - 5.1 Úloha metylací DNA ... 186
 - 5.2 Struktura chromatinu a acetylace histonů ... 195
 - 5.3 Genomový imprinting ... 206
 - 5.4 Jiné epigenetické jevy ... 223

- 6 Použitá a doporučená literatura ... 235

1 Obecné zákonitosti vývoje organizmů

Eukaryotické organizmy se vyskytují v rozmanitých formách se základním společným rysem - střídání procesů vývoje a reprodukce. U většiny druhů dochází k morfogenezi pouze ze zygoty (diploidní fáze), u řady organizmů (zejména nižších rostlin) však nastává rodozměna: gamety se vyvíjejí v haploidní několika- až mnohobuněčné struktury, které nemusejí být podobné diploidní morfogenezi. Všechny organizmy vytvářejí své struktury na základě zděděné informace a základním principem vývoje je **samouspořádání** (*self-construction* a *self-organization*). Vývoj obvykle začíná z jediné nestrukturované buňky - oplozeného vajíčka, u rostlin i některých nižších živočichů též z málo diferencovaných buněk - pupene (asexuální reprodukce). Diferencované somatické buňky již nemají autonomii (jako jednobuněčné organizmy), jsou životaschopné pouze v komunitě buněčné asociace. Diferencují se morfologicky i funkčně a společně vytvářejí mnohobuněčné struktury, tkáně a orgány. Schopnost reprodukce organizmů je dána genetickou informací (DNA v jádrech a organelách) a prostřednictvím další informace z vaječné buňky (maternální informace, cytoplazmatické determinanty). Obecně však platí, že výsledný fenotyp organismu není přímo kódován DNA. Informační kapacita DNA je totiž příliš malá na to, aby skladovala vysoce komplexní konečnou strukturu organismu. DNA však obsahuje informaci, jak vytvářet různé proteiny, rRNA a tRNA a jak replikovat samotnou DNA. Genom též obsahuje hierarchicky nadřazené regulační (řídící) geny, které dominují a prostřednictvím svých produktů ovládají celé sady podřízených genů.

Dosud není v detailech jasné, jak se vyvíjející organizmus vytváří na základě minimální organizace oplozené vaječné buňky nebo jak jsou organizmy schopny regenerovat své ztracené struktury. I když množství DNA v jádře není dostatečné k determinaci mnoha specifických struktur a funkcí, dochází vždy (a) k aktivaci funkce genů v různých buněčných typech a orgánech v přesném prostoru a čase, (b) ke kombinování genových aktivit.

Ať již organizmus obsahuje 5 000 genů (jako například hlístice *Caenorhabditis*) nebo 100 000 genů (člověk), počet kombinací genových aktivit je prakticky neomezený. Jednotlivé buňky spolu interagují, jsou součástí společnosti, ve které se její členové vzájemně ovlivňují. Jejich „chování“ není určováno pouze vnitřními determinantami (jako jsou geny), ale též tokem energie a informace přicházejících ze sousedních buněk a, zejména v pozdějších fázích vývoje, i z vnějšího životního prostředí.

1.1 Historie vývojové biologie

První experimenty provázené písemnými záznamy o vývojových stádiích u živých organismů pocházejí od Aristotela (4. st. př. n. l.). Inkuboval a preparoval kuřecí vejce v různých fázích vývoje a popsal postupné formování tvaru z bezstrukturní hmoty, morfogenezu. Embryologie se začala rozvíjet v 16. století. William Harvey (1578-1657), poprvé vyjádřil názor, že vývoj není dán jen transformací (metamorfózou), ale - zejména u vyšších živočichů - epigenezí, tj. kreativní syntézou nových tvarů (*omne vivum ex ovo*, obr. 1).

Obr. 1. Výřez z titulní strany knihy Williama Harveye „O vzniku živočichů“ (*De Generatione Animalium*, 1651). Obrázek představuje, jak bůh Zeus vypouští jednotlivé druhy živočichů (snad i rostlin?) z vajíčka. Nápis na vajíčku říká, že všechny živé bytosti pocházejí z vajíčka.



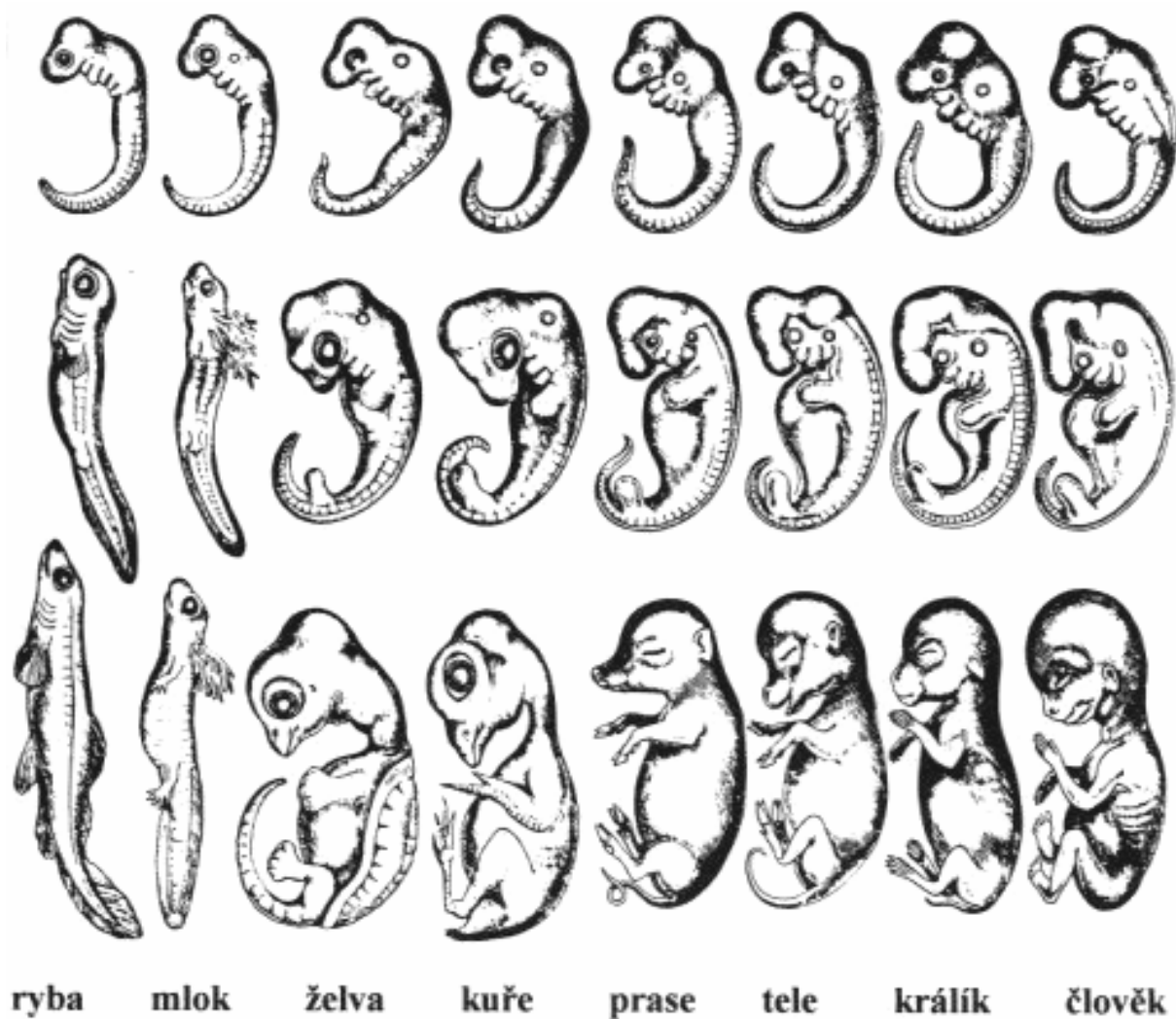
Teorie preformace a mechanicizmu (jako protiklad epigenezi) byla prosazována zejména Antoni van Leeuwenhoekem (1632-1723), zakladatelem mikroskopické anatomie. Leeuwenhoek údajně pozoroval všechny části člověka v embryu a dokonce i spermích (*homunculi*). Podobně v semenu rostlin měly být podle něj v miniatuře preformovány listy a květy. Doktrína preformizmu vedla k dalším nesmyslným závěrům: Jestliže je ontogeneze pouze mechanickým rozbalováním předtvořených forem, musí být takto „předtvořeny“ všechny generace od počátku existence světa? Teorie „enkapsulace“: jedna generace je uložena v druhé jako „ruské panenky“. Primordiální matka Eva by tak obsahovala přinejmenším 200 miliónů lidí zabalených jeden v druhém.

Caspar Friedrich Wolff (1738-1794), který studoval bezstrukturní kuřecí vejce a pak embryo, vyslovuje (podobně jako Aristoteles) teorii nemateriálních sil „*vis vitalis*“ odpovědných za vznik tvarů. Vynikající embryolog Carl Ernst von Baer (1792-1876) srovnával jednotlivé fáze embryogeneze u obratlovců a vyslovil svůj, dodnes platný ontogenetický zákon (obr. 2). Ernst Haeckel (1834-1919) formuluje „biogenetický“ zákon: ontogeneze je zkrácenou rekapitulací fylogeneze. Haeckel vyslovil spekulativní závěr, že individuální vývoj organismu od vajíčka k dospělci je zkrácenou verzí evoluce vzniku druhu. Tento zákon je však velmi diskutabilní, neboť Haeckel v něm srovnával embryonální stádia současných živočišných druhů se stádii dospělců prehistorických organismů. Za zakladatele vývojové genetiky je považován August Weismann (1834-1914), který popsal hypotetické, autoreprodukující se determinanty (jeho současníky popsané chromozómy), které měly být odlišně distribuovány mezi buňkami embrya a mít tak za následek buněčnou diferenciaci. Dnes víme, že k tomuto jevu dochází jen zcela výjimečně (např. v průběhu vývoje některých červů a hmyzu), avšak jeho teorie zárodečné plazmy (*Keimplasma Theorie*, 1892) představuje v podstatě princip uchovávání a přenosu genetické informace. Bratři Oscar (1849-1922) a Richard (1850-1937) Hertwigové objevili význam buněčného jádra a úlohy fertilizace (fúze samčích a samičích gamet), uvedli do embryologie experimentální model mořské ježovky.

Drozofilu jako model vývojové genetiky zavedl Thomas Hunt Morgan (1866-1945), který jako první biolog v historii obdržel Nobelovu cenu (1933). Hans Driesch (1876-1941) vyvrátil mechanistickou teorii vývoje: separací dvou dceřinných buněk (blastomer) vzniklých z fertilizovaného vajíčka ježovky vznikly celé larvy („rozdělené stroje přece nemohou opravovat samy sebe“). Driesch také předvídal myšlenku „poziční informace“, tj. budoucí osud buňky je

Obr. 2. Demonstrace zákona Carla Ernsta von Baera (1828) na srovnání vývojových stádií některých obratlovců (časná stádia embryogeneze v horní horizontální řadě = fylotypické stádium), podle Gilberta (1988). Hlavní pravidla Baerova zákona:

- (1) Obecné znaky velké skupiny živočichů se v embryu vyskytují dříve než znaky specializované.
- (2) Méně obecné znaky se vyvíjejí ze znaků obecnějších, teprve ke konci embryogeneze se tvoří znaky velmi speciální.
- (3) Embrya odlišných druhů se od sebe v průběhu vývoje stále více a více odlišují.
- (4) Časná embrya vyššího živočišného druhu není podobné dospělci nižšího živočicha, nýbrž jeho časnému embryu.



funkcí její pozice v celku. Z pozdějších badatelů v oblasti vývojové biologie a genetiky je nutné připomenout alespoň osobnosti, které byly za své objevy odměněny Nobelovou cenou: Hans Spemann (1934, za objev embryonální indukce u čolka) a Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard a Eric Wieschaus (1995, za objevy genů řídících diferenciaci u drozofily). Historie vývojové biologie a genetiky je shrnuta v boxu 1, k hlubšímu studiu lze doporučit speciální monografie (např. Komárek, 1997).

Box 1. Stručný přehled historie vývojové biologie.

- **Aristoteles** (384-22 př. n. l.), napsal první učebnici reprodukční biologie. Organismy podle něj vznikají: (i) z tlejícího substrátu, (ii) pučením, (iii) hermafroditizmem, nebo (iv) bisexuální reprodukci - druhy oviparní a viviparní. Popsal vývin kuřecího vejce, pozoroval morfogenezi, otec pozdějších teorií **vitalizmu** a **epigeneze**.
- **Volter Coiter** (1514-76), analyzoval kuřecí embrya, je považován za zakladatele **embryologie**
- **William Harvey** (1578-1657), objevitel krevního oběhu; vývoj není dán jen transformací existujících forem (metamorfózou), ale i epigenezí, tj. kreativní syntézou nových tvarů (*vše živé pochází z vajíčka*)
- **Antoni van Leeuwenhoek** (1632-1723), zakladatel mikroskopické anatomie, pozoroval mystické homunkuly ve spermiích (**animalculismus**), prosazoval teorii **preformizmu** (*lidský zárodek je již vybaven všemi orgány*) a **mechanicismu**
- **Marcello Malpighi** (1628-94), anatom, pozoroval homunkuly ve vajíčkách (**ovizmus**)
- **Lazarro Spallanzani** (1729-99), provedl **umělou inseminaci**, prokázal význam vajíčka a spermie obratlovců
- **Caspar Friedrich Wolff** (1738-94), studoval kuřecí vejce a embryo, vyslovuje (podobně jako Aristoteles) teorii nemateriálních sil *vis vitalis* odpovědných za vznik tvarů, **vitalismus**
- **Carl Ernst von Baer** (1792-1876), srovnával embryologii savců, formuloval zákon: *obecnější struktury, které jsou společné všem skupinám živočichů, se v embryu vyvíjejí dříve než struktury speciální, kterými se různé členové skupiny odlišují* (společné časné stádium embryogeneze, **fylotypické stádium**)

- **Ernst Haeckel** (1834-1919), vyslovil kontroverzní biogenetický zákon: *ontogeneze je zkrácenou rekapitulací fylogeneze*
- **Rudolf Virchow** (1821-1902), autor **buněčná teorie**: *každá buňka pochází z buňky*
(1) živé organizmy jsou složeny z buněk s jádry, (2) buňky jsou funkčními jednotkami života, (3) buňky vznikají z preexistujících buněk procesem dělení
- **August Weismann** (1834-1914), autor teorie **zárodečné plazmy** : hypotetické, autoreprodukcující se determinanty (chromozómy?) jsou odlišně distribuovány do buněk embrya s následkem buněčné diferenciaci, je považován za zakladatele **vývojové genetiky**
- **Oscar** (1849-1922) a **Richard** (1850-1937) **Hertwigové** objevili význam buněčného jádra a fertilizace, uvedli do vývojové biologie model mořské ježovky
- **Theodor Boveri** (1862-1915), **chromozómová teorie**: chromozómy jsou komplexní jaderné komponenty schopné kvalitativně odlišných efektů v různých buňkách. Vyslovil též hypotézu **koncentračních gradientů** (morfogenů).
- **Edmund Beecher Wilson** (1856-1939), objev úlohy cytoplazmatických determinant ve vajíčku
- **Thomas Hunt Morgan** (1866-1945), drozofila jako model vývojové genetiky (Nobelova cena, 1933)
- **Hans Driesch** (1876-1941) vyvrátil mechanistickou teorii vývoje: po separaci blastomer ježovky vznikly celé larvy (*rozdělené stroje přece nemohou opravovat samy sebe*). Předvídal i myšlenku **poziční informace**, tj. budoucí osud buňky je funkcí její pozice v celku (později rozpracoval **Lewis Wolpert**).
- **Hans Spemann** (1869-1941), objev embryonální indukce a genetické specifity poziční informace u obojživelníků (Nobelova cena, 1935)
- **Sydney Brenner**, uvedl hlístici *Caenorhabditis* jako model vývojové genetiky
- **Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard a Eric Wieschaus**: objevy genů řídících diferenciaci vajíček u drozofily (Nobelova cena, 1995)
- **Conrad Waddington, John Maynard Smith, Robin Holliday**: teorie **epigenetické informace**

1.2 Základní procesy vývoje

S výjimkou přírodního klonování (vegetativní reprodukce) začíná vývoj vždy fúzí dvou generativních, haploidních buněk, vznikem **zygoty**. Po fertilizaci následuje počátek embryogeneze jako série mitotických dělení zygoty uvnitř ochranného obalu (u viviparních živočichů a krytosemenných rostlin uvnitř těla matky). U většiny živočichů dává embryogeneze vznik prvnímu fenotypu, larvě. Larva se podrobuje dalšímu vývoji, který je následován dramatickou metamorfózou dávající vznik novému fenotypu, imagu neboli dospělci. Juvenilní fáze imaga kulminuje, když jedinec dosáhne sexuální zralosti. Senescence pak zakončuje fázi sexuální produkce a smrt končí život somatických buněk individua. Před smrtí však mohou přecházet generativní buňky do nové generace.

I když **vaječná buňka** je obvykle sférická, její vnitřní struktura je anizotropní (asymetrická), tj. má polární strukturu danou i umístěním jádra. Dokonce v oocytu (diploidní prekurzorová buňka) je jádro umístěno na periférii u povrchu buňky. V průběhu meiotických dělení u živočichů, která dávají vznik vaječné buňce, jsou v tomto místě tvořena polární tělíska (miniaturní sesterské buňky vaječné). Místo, kde se odštěpí polární tělíska od buňky vaječné, se nazývá animální pól („severní pól“), naproti němu leží vegetativní pól („jižní pól“). Část vaječné buňky u animálního pólu dává později vznik významným živočišným orgánům (například nervové soustavě), vegetativní část pak vytváří zejména trávicí soustavu. Osa mezi severním a jižním pólem prochází středem buňky vaječné a nazývá se animálně-vegetativní osa vajíčka. Vaječné buňky bývají chráněny nejrůznějšími stabilizačními nebuněčnými obaly (u savců je to *zona pellucida*).

Fertilizace a aktivace dosud jednojaderné vaječné buňky jsou následovány **rýhováním** (box 2): jeho úkolem je dát vznik mnohobuněčnému organizmu složenému z milionů buněk. Zygota se dělí velmi rychle, bez vzrůstu objemu a hmoty, buňky jsou tedy menší a menší. Toto stádium se nazývá rýhování a může probíhat ve dvou formách: holoblastické (totální), kdy je vaječná buňka zcela rozdělena do jednotlivých buněk, nebo meroblastické (parciální), kdy vaječná buňka není zpočátku rozdělena, dělí se jen jádra. Když probíhá holoblastické rýhování (například ježovka a žáby), první (dosud velké) dceřinné buňky se nazývají blastomerami. V závislosti na tom, zda první dceřinné buňky jsou velikostí stejné či nikoli, nazýváme rýhování ekvální nebo neekvální (zde hovoříme o makromeře a mikromeře).

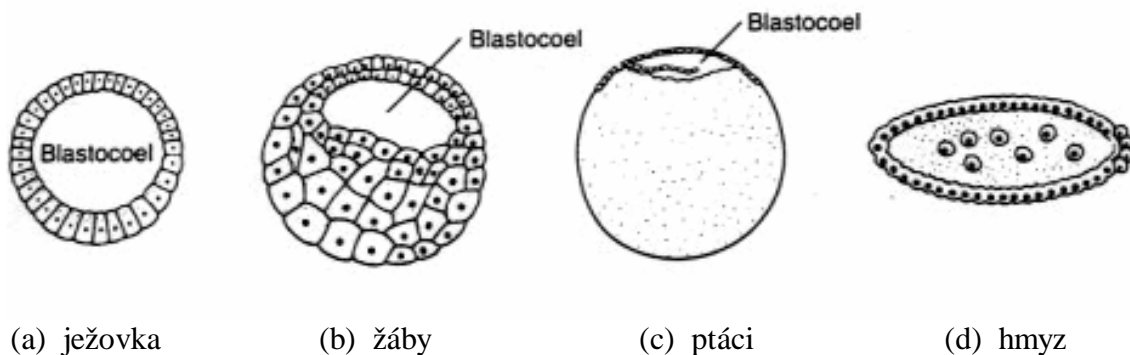
Box. 2. Hlavní typy rýhování vajíček a distribuce žloutku u různých živočišných druhů.

(a) vajíčko **izolecitální** (žloutku málo, rovnoměrně distribuován) - rýhování holoblastické (celé vajíčko se podrobuje cytokinezi), blastulu tvoří sférická vrstva blastomer a centrální blastocoel, vyskytuje se například u savců, ostnokožců a měkkýšů

(b) vajíčko **mírně telelecitální** (střední množství žloutku, mírně excentrický) - rýhování holoblastické, blastula tvořena mnoha buněčnými vrstvami uzavírajícími excentrický blastocoel, př. obojživelníci

(c) vajíčko **extrémně telelecitální** (veliké množství žloutku, mimo animální pól) - rýhování meroblastické (cytokineze jen u některých buněk), blastula je diskovitá (žloutek zůstává vně), př. ptáci, plazi

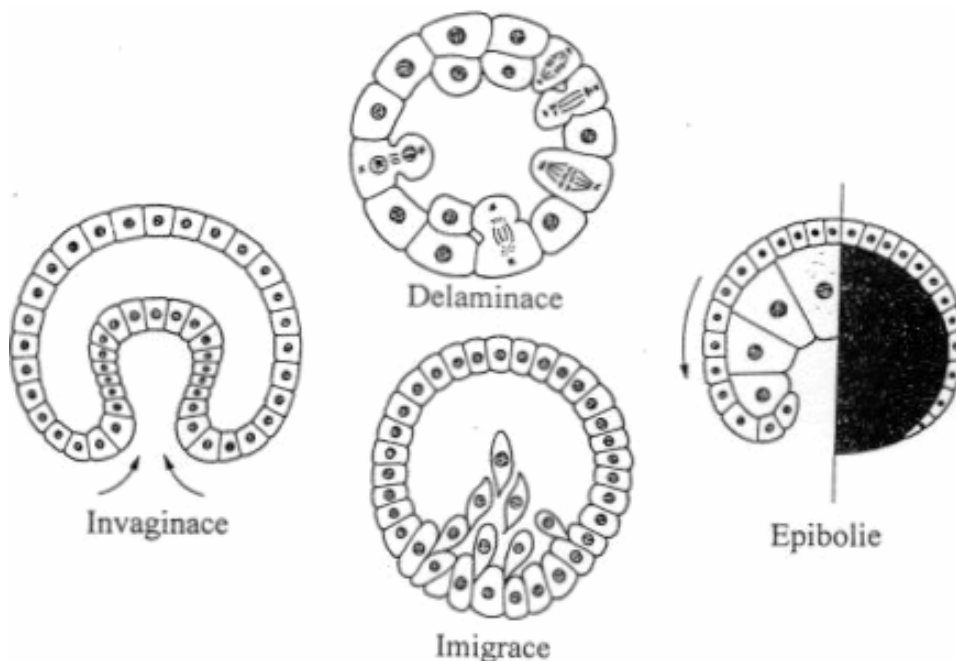
(d) vajíčko **centrolecitální** (žloutek koncentrován uprostřed) - rýhování meroblastické (superficiální, blastomery jen na povrchu), blastulu tvoří jednovrstevný blastoderm okolo centrálního žloutku, př. hmyz



Příklady meroblastického rýhování jsou superficiální (povrchové) rýhování u hmyzu a diskovité rýhování u ryb, plazů a ptáků. První dvě roviny dělení (rýhování) štěpí vaječnou buňku podél animálně-vegetativní osy, druhá rovina je kolmá k první, „poledníková štěpení“, vzniká čtyřbuněčné stádium. Třetí štěpení dávající vznik osmibuněčnému stádiu probíhá v ekvatoriální (rovníkové) rovině. Další vývoj je již u různých druhů odlišný, hlavními typy jsou radiální (př. ježovka), spirální (kroužkovci, měkkýši), bilaterální (pláštěnci) a rotační (savci). Rýhování je ukončené, když je dosaženo stádia blastuly: duté koule buněk, jejíž vnitřek je vyplněn tekutinou nebo tekutým žloutkem. Buněčná, epitelová stěna duté koule se nazývá blastoderm a vnitřní prostor je blastocoel.

Gastrulace (obr. 3) je v podstatě přemístěním buněk do vnitřku dutiny blastuly. Embryo podrobující se gastrulaci se nazývá gastrula. Slovo gastrulace je odvozeno od *gaster* (žaludek) a předpovídá tak osud přemístěných buněk: dávají vznik primordiálnímu střevu (archenteron, endoderm) - později tvoří vnitřní část trávicího traktu a připojené orgány (např. játra u obratlovců). Gastrulace je dramatický proces: rychlá transkripce RNA dává vznik velkým množstvím genetické informace, která poskytuje individualitu na molekulární úrovni. Gastrulace je ireverzibilním procesem pro embryogenní determinaci.

Obr. 3. Základní typy gastrulace - procesu, při kterém dochází k přemístování buněk do dutiny blastuly a ke vzniku prvostřeva (archenteronu) a dalších vnitřních částí embrya živočicha (podle Müllera, 1997). Při delaminaci jsou buňky přemístěny do vnitřku přímo orientací mitotického vřeténka při dělení. Při imigraci se buňky pohybují aktivně améboidním pohybem. Při invaginaci se vrstva buněk vchlipuje dovnitř procesem ohýbání. Při epibolii expanduje epitelová vnější vrstva přes jiné buňky vytvářejíce nový obal. U většiny živočišných druhů probíhá proces gastrulace kombinací těchto základních typů.



Způsoby přemístování buněk do vnitřku jsou u různých druhů odlišné, je možno rozlišit pět základních způsobů aktivního pohybu nebo pasivního přemístění (u většiny druhů gastrulace

probíhá jako kombinace těchto základních typů): invaginace - zabalení, vchlípení stěny do vnitřku gastruly, epibolie - expanze vrstvy buněk přes jiné buňky, které se tak stanou vnitřními, delaminace - přemístění buněk do vnitřku dané orientací mitotického vřeténka, imigrace (ingrese) - aktivní améboidní pohyb buněk a polární proliferace - buněčná dělení probíhají jen u jednoho z pólů, dceřinné buňky jsou tak uvolňovány do dutiny embrya.

Gastrulace je tvorbou **zárodečných listů** (vrstev), kdy embryo získává dva nebo více zárodečných listů, a tak se stává diploblastickým nebo triploblastickým. Diploblastické gastruly (a z nich odvození diploblastičtí živočichové - např. houby, láčkovci) mají dva listy: **ektoderm** (tvořící vnější stěnu) a **endoderm** (vnitřní stěna). Všechny organizmy vyšší než láčkovci tvoří při gastrulaci třetí list - **mezoderm** - který je vmezeřen mezi zárodek střeva (endoderm) a vnější stěnu gastruly (ektoderm). Mezoderm bývá velmi rozmanitý, tvoří svaly, pojiva, krevní systém, vnitřní epitely, vylučovací soustavu a skeletové prvky. Ektoderm dává později vznik epidermis (vnější vrstvě kůže), může však tvořit i některé smyslové orgány a části nervového systému. Gastrulací počíná vývoj orgánů (organogeneze). U obratlovců je první fází organogeneze, která nakonec vede ke vzniku centrální nervové soustavy, **neurulace**. Další stádia nemohou být zobecňována, neboť jsou druhově specifická. Embryonální vývoj obvykle ústí v první verzi živočicha, larvu, která je později metamorfózou remodelována v druhou verzi, **imago** (dospělec). Embryonální vývoj je ukončen uvolněním larvy z vaječného obalu. **Larva** je nejen odlišná od dospělce (se specifickými strukturními a fyziologickými rysy), ale umožňuje jedinci usadit se v jiné ekologické nise. Vývoj, který zahrnuje larvální stádium, se nazývá nepřímý. Někteří vyšší živočichové (včetně suchozemských obratlovců) larvální stádium nemají: v průběhu přímého vývoje vzniká dospělec z embrya postupně (box 3).

Box 3. Základní fáze životního cyklu živočišných druhů.

[1] **embryogeneze** zahrnuje stádia :

- **oplození** (tvorba zygoty),
- **rýhování** (dělením zygoty vznikají blastomery: ř. *blastos* = zárodečný, *meros* = část, končí tvorbou blastuly, obvykle duté koule),
- **gastrulace** (zahrnuje morfogenní pohyby: ř. *morphe* = tvar, *genesis* = tvorba, z blastuly vzniká gastrula, na konci gastrulace má embryo koncentrické vrstvy buněk, dva až tři zárodečné listy),

- **organogeneze** (př. **neurulace**, tvorba rudimentů orgánů prostřednictvím morfogenních pohybů a interakcí buněk, vznik základního tělního plánu)

- **histogeneze** (ř. *histos* = tkáň, buňky již mají své místo konečného určení a získávají funkční specializaci)

[2] postembryonální období

trvá od konce embryogeneze po počátek dospělosti, u některých živočichů již juvenilní organizmus vypadá jako miniaturní dospělec (**vývoj přímý**), u jiných je **vývoj nepřímý** - tvoří **larvu** (začíná vylíhnutím z vaječných obalů), posledním stádiem je pak **metamorfóza** (**nedokonalá** nebo **dokonalá** - přes stádium **kukly**)

[3] období dospělosti

nastává **pohlavní zralost**, zárodečná dráha dává vznik pohlavním buňkám, pohlavní **rozmnožování**, finálními stádii jsou **senescence** a **smrt**

Obecně zahrnuje vývoj mnohobuněčných organizmů zejména následující události:

(1) **Buněčná proliferace**, tj. opakovaná buněčná dělení. Buněčná dělení musí být přísně řízena dle požadavků jednotlivých typů buněk, jsou těsně spjata s řízením diferenciaci.

(2) **Buněčná diferenciaci** se musí vyskytovat v definovaném prostorovém pořádku. Buněčná diferenciaci má dva významy: (a) buňky se stávají odlišnými jedna od druhé, divergence vývojových drah je způsobena různými buněčnými typy. (b) buňky se stávají odlišnými v čase: každá buňka se podrobuje buněčně specifické dráze, dokud nedosáhne dospělosti a nestane se terminálně diferencovanou. Vývoj každé buňky začíná pluripotentní základní buňkou (obvykle oplozeným vajíčkem), která je schopna dělení a dává vznik různým buněčným typům. Akt rozhodnutí (*decision*), determinace, řídí vývojovou dráhu následných buněk k různým úlohám (cílům). Buňka, která se stává determinovanou (naprogramovanou) ke sledování určité dráhy, bývá ukončena přídomkem *-blast* (př. neuroblast, erytroblast) a může si udržet schopnost buněčného dělení (pak se jedná o základní buňku, *founder cell*, buněčného klonu, jehož členové jsou předurčeni tvořit buňky stejného typu). Po sérii buněčných dělení se

deriváty této *founder cell* podrobují terminální diferenciaci. Získávají specifickou molekulární výbavu, formu a funkci, ztrácejí však schopnost dělení a označují se přídomkem *-cety*.

(3) Buněčná diferenciacie probíhá souběžně s **tvorbou tvarů a uspořádání** (*pattern formation*), což znamená, že různé buněčné typy nejsou chaoticky seskupeny, ale vyskytují se v prostorových útvarech. Tvar je řízená prostorová konfigurace, ve které se vyskytují různé buněčné typy a supracelulární struktury (tkáň, orgány). Tvorba tvaru v asociacích buněk je často založena na pozičně-závislém pověření specifickými úkoly, tj. na pozičně-dependentní determinaci.

(4) buněčné pohyby a buněčné migrace (u rostlin se prakticky nevyskytují),

(5) programovaná buněčná smrt (apoptóza).

Buněčná diferenciacie je založena na diferenciální genové expresi. Diferenciacie je tedy druhem programování, které rozhoduje o tom, jaká genetická informace bude v budoucnu aktivována a které sady genů budou blokovány. Takové programování může vznikat v časném vývoji z cytoplazmatických determinant, které jsou uloženy ve vaječné buňce v definovaném prostorovém uspořádání. **Maternální geny** poskytují maternální informaci, která se v průběhu oogeneze (vývin vajíčka ve vaječniku) ukládá ve vaječné buňce jako cytoplazmatické determinanty (mRNA, proteiny). Embryonální vývoj, který je velmi závislý na uložených molekulárních determinantách, je nazýván autonomním vývojem neboli vývojem mozaikového typu, protože mozaikové uspořádání determinant vede k časnému rozdělení úkolů a umožňuje buňkám se vyvíjet nezávislými cestami. Programování buněk může být též založeno na vzájemné „dohodě“ (*mutual consensus*). Buňky spolu komunikují prostřednictvím signálů a „dělají dohody“ o svých budoucích funkcích. Takové interakce způsobují, že vývoj různých buněčných typů je závislý na svém buněčném okolí, ale též umožňují korekční regulaci v případě narušení.

1.3 Epigenetická tvorba tvarů

Buňky embrya se musejí „chovat“ ve shodě se svou lokací v embryu. Jak jejich geny získávají tuto poziční informaci? Musejí ji získávat zvnějšku, tedy signály majícími svůj původ mimo jádro příslušné buňky. Jak buňky získávají informaci o své pozici lze vysvětlit následujícími hypotézami:

(1) **Vnější pokyny, vlivy** (*external cues*): informace přichází z vnějšího prostředí (např. gravitace nebo světlo mohou poskytovat orientaci).

(2) **Pozice maternálních determinant** uložených ve vaječné buňce. Tyto determinanty (mRNA a proteiny) jsou distribuovány do dceřinných buněk odlišně. Fungují jako letenky, které specifikují další cestu a místo určení. Byly formulovány a prokázány dva mechanismy pro tvorbu prostorového pořádku: (a) Cytoplazmatické determinanty, ať již syntetizovány v oocytu samotném nebo poskytovány okolními výživovými buňkami, jsou ve vaječné buňce v průběhu oogeneze deponovány v odlišných místech. (b) Proces třídění a vnitřní strukturalizace, zvaný ooplazmatická segregace, se může odehrávat ve vajíčku až po oplození (obr. 4).

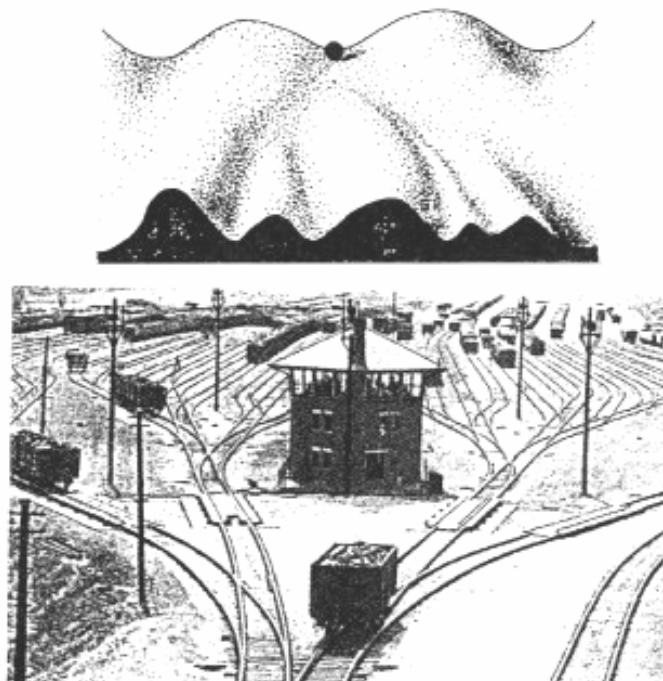
Obr. 4. Schéma hypotetických kroků determinace následujících nehomogenní distribuci cytoplazmatických determinant ve vaječné buňce (podle Müllera, 1997). U většiny vaječných buněk nacházíme nerovnoměrné rozmístění cytoplazmatických determinant, mRNA a proteinů (více nebo méně polarizované vajíčko, obrázek nahoře). V průběhu zrání vaječné buňky a zejména po oplození dochází k ooplazmatické segregaci - cytoplazmatické determinanty vytvářejí prostorově uspořádané gradienty. Při tvorbě dceřinných zygotických buněk jsou determinanty odlišně alokovány do různých blastomer. Další diferenciace (*pattern formation*) v průběhu vývoje je dosaženo výměnou signálů mezi odlišnými buňkami.



(3) **Buněčné interakce** (*concerted behavior*): buňky mohou komunikovat s okolními buňkami a vytvářet koordinované tvary a struktury.

Tvorba tvarů (*pattern formation*) je epigenetickým procesem. Epigenetické procesy jsou takové, které jsou determinovány událostmi „nad“ úrovní genetické informace. Procesy rozhodující pro tvorbu tvarů jsou vzájemné buněčné interakce a vliv extracelulárních látek. Genetická informace je ke tvorbě molekul, které zprostředkovávají buněčné interakce, samozřejmě nezbytná. Tyto interakce jsou však determinovány negenetickými principy, zejména fyzikálními zákony difúze nebo adheze (obr. 5).

Obr. 5. Model epigenetické krajiny podle Conrada Waddingtona (1940) znázorněný pohybem kuličky v členitém terénu (podobnost s minigolfem, nahoře). Model představuje osud buňky (možné stavy rozrůznění, diferenciaci) v průběhu ontogeneze. Buňka prochází různými dráhami (typy genových aktivit) a mimobuněčné signály (původem z organismu nebo též environmentální) v místech větvení drah usměřují buňku do určitých dalších drah, přičemž jsou zapínány a vypínány odlišné geny. Model též znázorňuje divergující a ireverzibilní charakter buněčné diferenciaci. Na spodním obrázku je podobná představa divergence vývojových drah znázorněna pohybem vagónů po větvicích se kolejích nádražního seřadiště (Gilbert, 1988).



Většina živočichů je bilaterálně souměrných. Kolmá k antero-posteriorní ose je osa dorzo-ventrální. Ve vývojové biologii jsou tyto osy asymetrie (anizotropie) nazývány osami polarity. Vaječné buňky jsou vždy organizovány polárně. Oocyt je vyživován převážně z jedné strany, což naznačuje zdroj pokynů pro asymetrickou organizaci.

Při indukci signál-emitujícími buňkami (indukujícími) dochází k instrukci signál-přijímajících buněk k jejich specifické vývojové dráze. Tento jev se nazývá **embryonální indukce**. Struktura, která je arteficiálně indukována v nesprávné pozici, se nazývá ektopická. Při embryonální indukci musí být buňky přijímající signál kompetentní (= schopnost buněk přijímat signál, mít receptory pro indukující signál). Embryonální vývin je zřejmě řízen kaskádami indukčních procesů. Induktory mohou být i morfogeny. **Morfogen** je definován jako látka, která působí lokálně v organizaci prostorového uspořádání buněčné diferenciace prostorovými rozdíly v koncentraci. Vysoká koncentrace morfogenu v pozici 1 specifikuje buněčný typ nebo strukturu A, nižší koncentrace morfogenu v pozici 2 specifikuje buněčný typ nebo strukturu B. Morfogenní pole je oblast, jejíž buňky mohou kooperativně dávat vznik odlišné struktury nebo sadě struktur.

1.4 Modely tvorby biologických tvarů

Tvorba tvarů je centrálním tématem vývojové biologie. Znamená prostorově uspořádanou (nenáhodnou) buněčnou diferenciaci, která má za následek uspořádání struktur. Komplexní struktury (tvary) jsou synergickým výsledkem mnoha interagujících molekul a buněk. Následující příklady jsou zjednodušenými modely, jak mohou vznikat složité struktury:

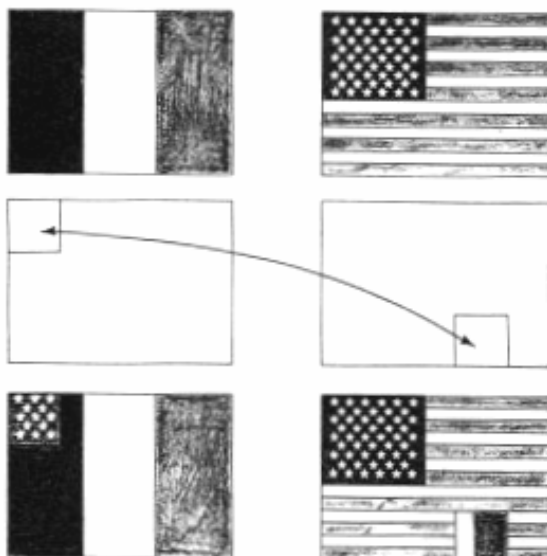
(a) **Teorie poziční informace** podle Wolperta (obr. 6). Vysílající buňka (*emitter*) uvolňuje signál ve formě rozpustné látky, hypotetického **morfogenu S**. Koncentrace této látky se snižuje se vzrůstající vzdáleností od zdroje. Je tedy ustaven gradient od zdroje (nejvyšší hladina) až k nule (*sink*, kde se morfogen rozkládá). Zdroj morfogenu S může být lokalizován na jednom konci „řetízku“ buněk a *sink*, který rozkládá morfogen na opačném konci. V této konfiguraci koncentrace morfogenu klesá lineárně podél „řetízku“. Výsledný gradient morfogenu S tak poskytuje poziční informaci. Buňky jsou schopné „měřit“ jeho lokální koncentraci a měnit svou pozici podél gradientu. Gradient morfogenu S hraje hlavní roli a je použit k úpravě druhého

gradientu **poziční hodnoty P**. Poziční hodnota je relativně stabilní vlastností tkáně, která slouží jako poziční paměť v případě potřeby, např. regenerace. Koncentrační profil morfogenu S určuje

Obr.6. Nahoře: Wolpertův jednorozměrný model gradientu poziční informace znázorněný francouzskou vlajkou (podle Gilberta, 1988). Poziční informace buňky je dána gradientem difúzibilního morfogenu od jeho zdroje až po konečné místo zániku (*sink*). Hodnoty gradientu na vertikální ose naznačují prahové koncentrace morfogenu, podle kterých se řídí fenotyp buňky. Podle tohoto modelu se tedy při vysoké koncentraci morfogenu stávají buňky modrými, při nižší koncentraci bílými, a po dosažení určité prahové hodnoty červenými. Výsledkem je uspořádání (*pattern*) tří barev jako na francouzské vlajce.

Dole: Wolpertův model osudu transplantovaných tkání znázorněný pomocí přenosů částí francouzské a americké vlajky (podle Gilberta, 1988). Tento model vyjadřuje, že transplantované tkáně si zachovávají svou identitu, ale posléze se diferencují podle nových pozičních instrukcí.

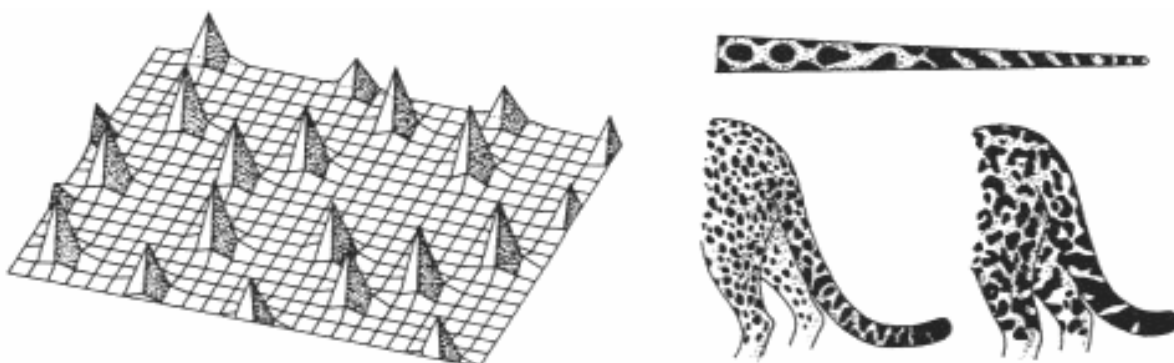
Experimentálně byl prokázán na mezidruhových transplantacích tkání čolka a žáby (vznik žabích úst na čolkovi a čolčích úst na žábě, pokusy Hanse Spemanna).



tvář gradientu P: lokální hodnota S působí jako inhibitor určující horní limit lokální hodnoty P. Tato teorie však nevysvětluje, jak je primárně gradient ustaven.

(b) **Reaktivně-difúzní modely** (obr. 7). Cílem těchto modelů je navrhnout mechanismy, kterými by mohly vzniknout tvary z původně chaotických (homogenních) podmínek. Matematici (Turing, Murray) a fyzici (Prigogine, Meinhardt) navrhli modely, jak mohou vzniknout odlišné typy buněk v původně uniformní populaci geneticky identických buněk. Základním konceptem reakčně-difúzních modelů je **morfogenní pole**, ve kterém některé biochemické reakce vytvářejí „předtvary“ v distribuci chemických látek, obecně nazývaných morfogeny. Buněčná determinace a diferenciace pak sledují tyto chemické „předtvary“. Podle nejjednodušší verze reakčně-difúzních modelů se tvoří stabilní, neuniformní koncentrační „tvary“ kombinováním tvorby alespoň dvou interagujících látek, které zpětnovazebně působí na svou vlastní produkci stejně jako na produkci druhé látky. Takovéto chemické reakce dosud nebyly experimentálně nalezeny.

Obr. 7. Reaktivně difúzní dvourozměrný model samouspořádání (podle Wolperta, 1998). Model předpokládá existenci dvou typů látek: jedna z nich (S) inhibuje tvorbu druhé (P), přičemž látka P podporuje tvorbu látky S i sebe samé. Jestliže látka S difunduje tkání výrazně snadněji než P, mohou vznikat ostré vlny koncentračních rozdílů látky P. Takto by bylo možné například vysvětlit vznik výrazných skvrn a pruhů v srsti mnoha savců.



Anglický matematik Alan Turing publikoval v roce 1952 matematický model vzniku uspořádání. Ukázal, že je možné z počáteční uniformní koncentrace vzájemně spolu reagujících chemických látek vytvořit systém koncentračních rozdílů těchto látek, které nazval morfogeny, a to takový, že vzniknou chemické vlny s maximy a minimy koncentrace morfogenů. Systém se organizuje sám a uspořádanost vznikne spontánně. Byl ověřen na řadě chemických systémů, které spočívají na difúzně se šířících látkách, které spolu navzájem reagují - odtud jejich název reaktivně difúzní modely. Systém užívá např. rychle se šířící inhibitor a pomalu se šířící aktivátor. Inhibitor brání produkci aktivátoru, ale jeho vlastní produkce je na aktivátoru závislá, aktivátor stimuluje svou vlastní syntézu.

(c) **Rozšířené a alternativní modely.** Tvorba tvarů může být výsledkem znásobení fyzikálních sil a chemických procesů nebo výsledkem pohybu buněk. Obsahují proces autokatalýzy (pozitivní zpětné vazby) a proces, který nastavuje hranice této autokatalýzy. Tyto hranice mohou být dosaženy tvorbou inhibitoru, vyčerpáním substrátu nebo buněčného typu nebo saturací.

1.5 Vznik uspořádání

Příbuzné organizmy mají odlišné tvary, ale stejné buněčné a tkáňové typy: liší se tedy v prostorovém uspořádání buněk. Je možné, že v průběhu rýhování, kdy se vajíčko dělí, každá ze vznikajících buněk dostává odlišné, asi cytoplazmatické determinanty. To odpovídá principům **preformizmu** (zakladatel August Weismann, 1890). Není to však zcela pravda, neboť embryo má schopnost vyvíjet se normálně, i když jeho části jsou odstraněny nebo přeskupeny. Buňky se vždy vyvíjejí podle své relativní polohy v embryu. Z toho vyplývající význam polohy je důkazem existence samouspořádávajícího se systému koordinát, který sděluje buňkám jejich polohu, takže pak „vědí“, co mají dělat (**vitalismus**). Například vajíčko mořské ježovky má výraznou polaritu, v jeho cytoplazmě jsou významné rozdíly. Místo, kterým je přichyceno k vaječníku se nazývá animální pól, protilehlé místo je vegetativní pól. Tyto póly určují hlavní osu embrya a první dvě rýhování probíhají v jejím směru, kdežto třetí rýha je na ni kolmá. U savců však polarita rýhování zjištělná není. Embryo myši do stádia 16 buněk má všechny buňky rovnocenné, jejich osud není určen. U lidských embryí ani při několika stech buňkách není ještě osud buněk určen a při rozdělení ve dvě části se vyvíjejí dvě normální embrya (jednovaječná dvojčata).

Buňky musí splnit dvě obtížné úlohy: (a) poznat, kde jsou, tj. získat informaci o své poloze a (b) musí tuto informaci správně využít. Mají-li buňky mít svou polohu specifikovanou systémem koordinát, pak je nutné mít hraniční oblast nebo počátek, od kterého je poloha měřena (je tedy nutné mít způsob měření vzdálenosti). Jednou z možností by byla chemická látka s charakteristickou koncentrací na jednom konci řady a klesající po délce řady (gradient koncentrace). Je možné, že polohu specifikují i interakce mezi buňkami (asi chemickou difúzí nějaké nízkomolekulární látky). Vývojový osud buněk živočicha je dán v průběhu gastrulace, kdy vzniká základní plán těla. Obecně platí, že když jsou buňky časného embrya obratlovců experimentálně přemístěny z původního místa na jiné, vyvíjejí se ve shodě s tímto novým místem, a nikoli ve shodě s místem svého původu. Tato pružnost vývojového osudu netrvá dlouho, časem jsou možnosti buněk stále omezenější, až je nakonec jejich osud nezvratně určen (po gastrulaci vznikne z buňky oka po přenesení zase oko, třeba i na břicho embrya). Buňky tedy časem získávají autonomní vývojový program a neodpovídají již na požadavky nové polohy. Tento proces, kterým buňky získávají konečné určení svého osudu, se nazývá **determinace**. Obecným znakem determinace je, že zahrnuje malé chemické změny, které zapínají nebo vypínají určité geny, jejichž výsledek ještě po určitou dobu není viditelný. V roce 1935 získal Hans Spemann Nobelovu cenu za objev organizátoru (indukce, indukčního signálu): transplantát u čolků může indukovat v přilehlých tkáních hostitele úplnou změnu jejich vývojového osudu, vytvořit sekundární embryo.

Vývoj je hierarchicky organizovaným procesem. Nejdříve jsou založena základní, globální prostorová uspořádání a posléze jsou tvořeny detailnější struktury v zákonité souslednosti. Základní uspořádání podél předo-zadní (antero-posteriorní) osy je alespoň u některých organismů dáno proteinovými produkty maternálních genů, které jako první vykazují stabilní distribuci v raném embryu. Podle principu buněčné kontinuity (Virchow) jsou všechny buňky dnes žijících organismů dočasnými konci nepřerušovaných buněčných linií sahajících zpět přes zárodečné linie jejich předků až k primordiálním buňkám existujícím před miliardami let. Přes tyto linie jsou předávány dva typy informace: genetická (kódovaná RNA nebo DNA) a paralelně paragenetická: nepřerušovaný řetězec strukturní organizace, který je předáván přímo, bez genetického kódování, z buňky do buňky.

1.6 Homeóza a homeotické geny

Termín **homeóza** zavedl do biologie koncem minulého století William Bateson. Ve své knize *Materials for the Study of Variation, Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species* (1894) homeózu široce definoval jako typ variability, u které „bylo něco změněno k podobnosti něčeho jiného“. Tvorbu struktur na nesprávném místě organismu však dávno před ním popsali i jeho předchůdci, u rostlin i živočichů, zejména Johann Wolfgang von Goethe (*Die Metamorphose der Pflanzen*, 1790). První homeotická mutace jako genetická změna

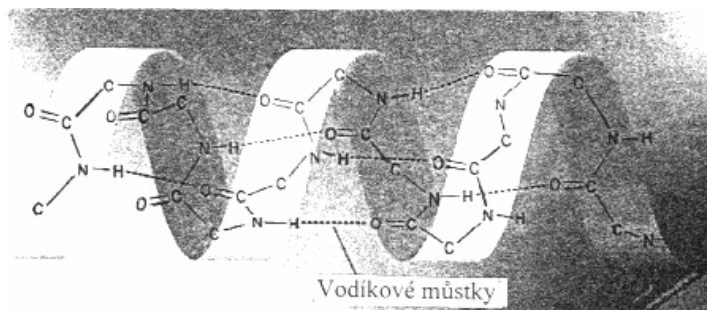
Box 4. Hlavní rysy homeotických genů a jejich produktů.

- n** kódují regionálně a temporálně specificky exprimované transkripční faktory
- n** řídí morfologický vývin orgánů prostřednictvím exprese baterií realizátorových genů
- n** u všech mutantů této skupiny genů jsou určité orgány nahrazeny jinými orgány, které jsou normálně tvořeny na jiných místech
- n** vyskytují se u všech živočišných a rostlinných druhů
- n** homeotické mutace jsou recesivní, fenotyp se projeví až v homozygotním stavu
- n** u rostlin jsou nejvíce prozkoumány homeotické květní geny, které vždy ovlivňují vývin dvou sousedních květních kruhů, mají charakteristickou DNA-vazebnou oblast (MADS-doménu), odlišnou od homeodomény
- n** u živočichů jsou shlukovány na chromozómech v pořadí, jako je jejich antero-posteriorní exprese (pravidlo kolinarity)
- n** u živočichů vždy obsahují homeoboxy o velikosti 180 bazí u 3' konců všech homeotických genů (proteinové homeodomény)
- n** všechny homeoboxové komplexy přítomné u dnešních živočišných druhů pocházejí z jednoho primordiálního homeoboxového genu
- n** inaktivace homeodoménového proteinu způsobuje změnu směrem k „více anteriornímu“ fenotypu
- n** nadprodukce homeodoménového proteinu může navodit transformaci směrem k „více posteriornímu“ fenotypu

však byla uveřejněna až v roce 1923, kdy Bridges a Morgan popsali mutaci *bithorax* u drozofily. Mutace se projevila konverzí třetího hrudního článku v druhý: mouchy tvořily na třetím hrudním článku malý, druhý pár křídel namísto kyvadélek. Největší zásluhu na studiu genů, jež podmiňují homeotické změny, má Edward B. Lewis, který popsal jejich úlohy a zmapoval jejich pozice na chromozómech drozofily.

Homeotické geny (box 4) kódují proteinové transkripční faktory, které se specificky vážou na DNA (do oblastí promotorů genů) a tím ovlivňují její transkripci (obvykle pozitivně). Byly dosud nalezeny u všech studovaných eukaryotických organismů, i když primární struktura homeotických genů se někdy významně liší. Primární úlohou produktů homeotických genů je specifikace (rozdílení) jednotlivých částí těla živočichů a rostlin. Homeotické geny jsou definovány svou funkcí: mutace homeotického genu může vést k homeóze, tj. vzniku orgánu na nesprávném místě těla (popř. v nesprávném čase). Vlastními realizátory diferenciací jsou geny podřízené, jejichž transkripce je pod kontrolou homeotických genů. Po zjištění primární sekvence aminokyselin v produktech homeotických genů některých živočišných druhů byla zjištěna jejich shodná charakteristická oblast (DNA-vazebná doména), která byla nazvána homeodoménou (příslušná kódující oblast DNA se označuje jako homeobox): jejím charakteristickým rysem je přítomnost jedné nebo více α -šroubovic (obr. 8).

Obr. 8. Základní motiv sekundární struktury proteinů, které fungují jako transkripční faktory - α -šroubovice (podle Kalthoffa, 1996). Rezidua aminokyselin (nejsou vyznačena) jsou rozmístěna bočně od šroubovice. Každá skupina C=O tvoří vodíkovou vazbu (znázorněno tečkami) s N-H skupinou. V jedné molekule regulačního proteinu se může vyskytovat i několik α -šroubovicových motivů.



Později však bylo zjištěno, že ne všechny proteinové produkty homeotických genů mají homeodoménu (zejména u rostlin) a naopak, že homeodoménu obsahují i geny, jejichž mutace se neprojevují jako homeóza (box 5).

Box 5. Některé domény (sekundární struktury) v transkripčních regulačních (aktivačních resp. represních) proteinech eukaryotických organismů.

<i>protein (doména)</i>	<i>organismus</i>	<i>funkce</i>	<i>struktura</i>
MADS	rostliny	struktura květů	dva α -helixy
	kvasinky	různé	
	člověk	různé	
homeodoména	všechny eukaryotické druhy	řízení diference	tři α -helixy nebo α -helix-smyčka- α -helix
Bicoid	maternální gen drozofily	anteriorní specifikace těla	α -helix-otáčka- α -helix
Hunchback	<i>gap</i> gen drozofily	vznik para-segmentů, článkování těla	motiv „zinkových prstů“
chromodoména	drozofila	Polycomb	trojvláknový antiparalelní β -skládaný list
	savci	inaktivní X	
	rostliny	<i>medea</i>	

Zvláštní skupinou homeotických mutací jsou mutace genů, které se vyznačují odlišnou primární strukturou a jejichž funkce může být homeotickým genům i nadřazená. První takovou mutací byla *Polycomb*, která způsobuje derepresi mnoha homeotických genů u drozofily.

Box 6. Regulační úlohy proteinů s chromodomény - transkripční represory:

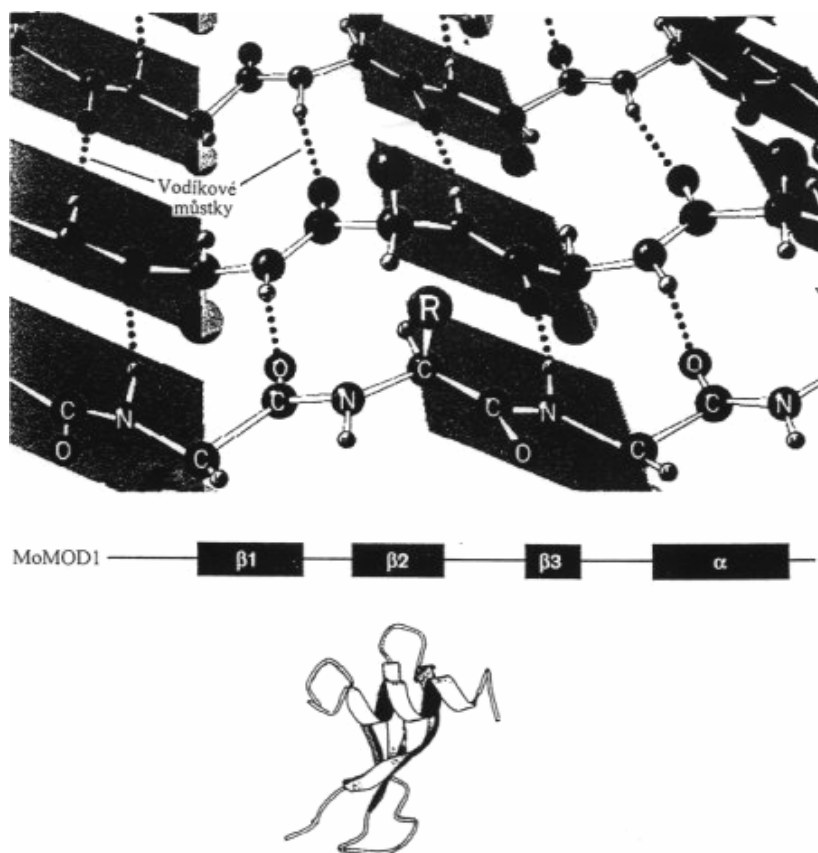
- n** reprezentují alternativní mechanismus selektivní inaktivace genů v průběhu individuálního vývoje
- n** nalezeny v konstitutivním i fakultativním heterochromatinu
- n** obsahují společný motiv, chromodoménu: N-terminální část a trojvláknový antiparalelní β -skládaný list proti C-terminální α -šroubovici
- n** zatím zjištěny u drozofily, savců i rostlin
- n** funkčně odpovědné např. za umlčování savčího X chromozómu, pozičně specifickou expresi homeotických genů (*Polycomb*) a pozičně-variegační efekt u drozofily (PEV)
- n** recentně popsán maternální gen kódující protein typu Polycomb u krytosemenných
- n** rostlin, který je zodpovědný za regulaci časně embryogeneze (parentální konflikt)
- n** výjimečně mohou být asociovány s aktivním chromatinem (hyperaktivní X u samečka drozofily)
- n** některé se vážou na mnoho odlišných sekvencí DNA, jiné (př. PREs, Polycomb Response Elements) jen na sekvence specifické s následkem jejich inaktivace

Charakteristická DNA-vazebná oblast proteinů skupiny Polycomb byla nazvána **chromodoména**, která vždy obsahuje i strukturu β -skládaného listu (obr. 9). Proteiny s chromodomény vytvářejí specifické vyšší struktury, fungují obvykle jako represory a byly již nalezeny u mnoha eukaryotických organismů (drozofila, člověk, rostliny; box 6). Funkce proteinů skupiny Polycomb jsou uvedeny v kapitolách popisujících řízení procesů embryogeneze u drozofily a krytosemenných rostlin.

Obr. 9. Nahoře: Častá sekundární struktura regulačních proteinů, β -skládaný list (podle Kalthoffa, 1996). Struktura na obrázku je tvořena dvěma antiparalelními peptidovými doménami. Každá aminokyselina je vázána k sousední aminokyselině vodíkovou vazbou (tečky). Trojrozměrná povaha kovalentních vazeb způsobuje tvorbu struktury „skládaného listu“ (*pleated sheet*).

Aminokyselinová rezidua se nacházejí nad a pod rovinami. Struktura β -skládaného listu (složeného ze tří antiparalelních peptidových vláken) je součástí chromodomén proteinů, které obvykle působí jako represory.

Dole: Konzervativní struktura chromodomény v regulačním proteinu MoMOD1 u myši (podle Cavalli a Paro, 1998). $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 3$ jsou tři vlákna antiparalelního skládaného listu, α je karboxyterminální šroubovice.



1.7 Modelové organizmy vývojové biologie a genetiky

Studium vývojové biologie a genetiky je prováděno na modelových organizmech. V historické perspektivě to bylo nejdříve kuřecí vejce (pro svou extrémní velikost), později ježovka (model rýhování vajíčka). Ke studiu regeneračních procesů se používali obojživelníci, nezmar a švábi, ke studiu klonálního původu buněk hlístice. Dnes jsou nejpropracovanějšími živočišnými modely drozofila, myš a hlístice, u rostlin je to huseníček (box 7).

Box 7. Modelové organizmy ve vývojové biologii a genetice.

hlavní přednosti

živočišné:

nezmar	<i>jednoduchá anatomie, vegetativní množení, regenerace</i>
hlístice	<i>malý genom, jednoduchá a definovaná struktura těla</i>
octomilka	<i>malý genom, geneticky zmapovaný druh, snadná kultivace</i>
ježovka	<i>průhledné polarizované vajíčko, regenerace</i>
ryba zebřička	<i>ekotoxikologie - testování mutagenity</i>
obojživelníci	<i>velké vajíčko, vnější oplození, regenerace a transplantace</i>
kuře a křepelka	<i>velké vajíčko, vnější vývoj, tvorba vegetativních hybridů</i>
myš	<i>význam pro medicínu, studium imprintingu</i>

rostliny:

<i>Acetabularia</i>	<i>jednobuněčný model, regenerace</i>
<i>Fucus</i>	<i>volná asymetrická zygota</i>
huseníček	<i>nejmenší genom, geneticky zmapovaný druh</i>
kukuřice	<i>geneticky zmapovaný jednodomý druh</i>
knotovka	<i>klasický dvoudomý model s pohlavními chromozómy</i>

Každý z modelů má své výhody a nevýhody, ať už z podstaty samé nebo z ryze technických důvodů (snadnost manipulace, krátký životní cyklus). Drozofila je zajisté geneticky nejprozkoumanějším modelem, avšak její řízení embryogeneze, determinace pohlaví a jiné procesy jsou výrazně odlišné nejen od obratlovců, ale i od jiných skupin hmyzu. Každý model je

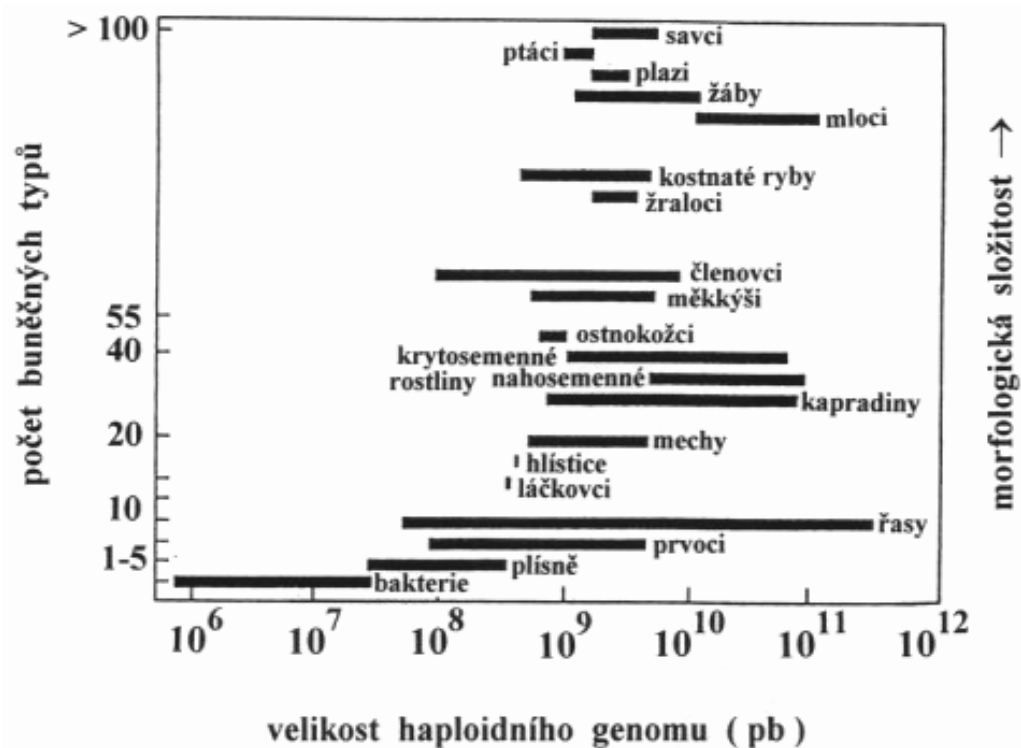
tedy vhodný pouze k určitým účelům a získané výsledky mají vždy jen omezenou platnost. Molekulárně biologická zkoumání vyžadují, aby modelový organizmus měl co nejmenší genom z důvodu obtížnosti izolace genů. To je také jedním z důvodů, proč jsou nejlepšími modely právě drozofila a huseniček. U eukaryot se obecně vyskytuje větší či menší frakce genomu, která se jeví být geneticky nefunkční a nebývá ani transkribována. Určité sekvence se v genomu mnohokrát až stotisíckrát opakují (obecně repetitivní sekvence) a jsou často schopny i mobility (transpozóny). U určitých druhů (zejména rostlinných) tvoří takovéto sekvence až 90 % celého genomu (box 8).

Box 8. Srovnání velikosti genomů u prokaryot (*Escherichia coli*), hub (kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*), nahosemenných rostlin (borovice *Pinus*), krytosemenných dvouděložných (huseniček *Arabidopsis thaliana*, tabák *Nicotiana tabacum*, jmelí *Viscum album*) a krytosemenných jednoděložných rostlin (cibule *Allium*, rýže *Oryza sativa*, pšenice *Triticum aestivum*) a živočichů bezobratlých (octomilka *Drosophila melanogaster*) a obratlovců (savci). Tabulka také uvádí přibližný obsah repetitivních sekvencí a mimojaderných genomů. 10^9 párů bazí odpovídá přibližně 1 pg DNA.

druh (skupina druhů)	množství DNA v haploidním genomu (pb)	obsah repetitivních sekvencí (%)	mimojaderná DNA (pb)
<i>Escherichia coli</i>	4×10^6	0,1	plazmidy ($10^3 - 10^5$) a fágy ($10^4 - 10^5$)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,6 \times 10^7$	1	plazmidy (10^4) a mitochondrie ($10^4 - 10^5$)
<i>Pinus</i> sp.	4×10^{10}	> 90	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7×10^7	10	mitochondrie ($10^5 - 10^6$) a
<i>Nicotiana tabacum</i>	2×10^9	60	plastidy ($1,5 \times 10^5$)
<i>Viscum album</i>	1×10^{11}	> 90	
<i>Allium</i>	2×10^{10}	> 70	
<i>Oryza sativa</i>	3×10^8	60	
<i>Triticum aestivum</i>	5×10^9	> 75	
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,2 \times 10^8$	20	mitochondrie ($1,6 \times 10^4$)
savci	3×10^9	60	

Velikosti jaderných genomů jsou uvnitř jednotlivých skupin eukaryotických organismů velmi odlišné (např. u řas nebo členovců) nebo naopak došlo v průběhu evoluce k ustálení velikosti genomů (zejména u savců). Zatímco počet buněčných typů u daného druhu jasně koreluje s jeho celkovou morfologickou a anatomickou složitostí, není zřejmě žádný vztah mezi těmito charakteristikami na straně jedné a množstvím DNA v jádře na straně druhé. Tento jev je nazýván paradoxem hodnoty C. Tento paradox platí jak mezi jednotlivými skupinami eukaryotických organismů, tak i uvnitř většiny jejich taxonomických skupin. Například krytosemenné rostliny je možno považovat z hlediska struktury a funkce za poměrně jednoduchou skupinu: velikosti genomů u jednotlivých druhů krytosemenných rostlin však kolísají od 10^8 do 10^{11} párů bazí na haploidní genom (obr. 10).

Obr. 10. Vztah mezi velikostí genomů, počty buněčných typů a celkovou morfologickou složitostí organismů (podle Žurovce, 1999). Schéma demonstruje tzv. paradox hodnoty C: neexistuje přímá korelace mezi velikostí (haploidního) genomu a složitostí organismu. Například některé relativně primitivní řasy mají větší obsah DNA v jádře než vyspělí obratlovci. Paradox hodnoty C platí i uvnitř jednotlivých fylogenetických skupin, zejména u krytosemenných rostlin.



Rostliny a živočichové tvoří dvě hlavní skupiny eukaryotických organizmů, které se podrobují rozsáhlé morfogenezi a jejichž vývojové procesy jsou studovány. Snad nejnápadnějším rozdílem je u rostlin morfologicky i anatomicky výrazně jednodušší struktura těla, jehož funkce nejsou řízeny nervovou soustavou, a neschopnost lokomočního pohybu (box 9). Z hlediska procesů reprodukce rostliny postrádají pravou zárodečnou dráhu a diploidní sporofyt se u nich vždy (nepravidelně) střídá s haploidním gametofytem.

Box 9. Některé shody a rozdíly ve vývinu rostlin a živočichů

- n** Rostlinné zygoty jsou velmi malé a vyvíjejí se uvnitř mateřské tkáně (podobně jako je tomu u savců). Parentální imprinting se však u krytosemenných rostlin vyvinul pouze v extraembryonálním pletivu (endosperm), zatímco u savců je přítomen i v embryonální dráze.
- n** Apikální meristémy umožňují kontinuální růst rostlin v průběhu jejich celého života.
- n** U rostlin není založena zárodečná linie v průběhu časného vývinu (na rozdíl od živočichů): květní orgány se vyvíjejí ze stejných meristemických buněk, které také vytvářejí celý prýt.
- n** Mnoho nereprodukčních rostlinných buněk zůstává totipotentních (schopnost vytvoření celé nové rostliny).
- n** Na rozdíl od živočišných embryí se rostlinná embrya nepodrobují větším morfogenním pohybům, ale tvoří menší počet histologicky odlišných buněčných typů.
- n** Sporofyt se u rostlin střídá s gametofytem (rodozměna).
- n** Vývin samčího i samičího gametofytu z haploidních spór vyžaduje genovou expresi a měl by tak eliminovat mnoho mutantních alel ještě před fertilizací.
- n** Malá velikost a maternální výživa rostlinného embrya ho činí méně závislým na maternálně nesené RNA než u většiny živočišných embryí.
- n** U rostlin je v průběhu embryogeneze aktivováno zřejmě více zygotických genů než u živočichů.

Při všech těchto uvedených rozdílech mezi živočichy a rostlinami je však zřejmé, že kromě základních molekulárně genetických procesů jsou u nich do značné míry obdobné i mechanismy řízení vývojových procesů (box 10).

Box 10. Rostliny a živočichové aneb logika vývoje (podle Meyerowitze, 1997).

- n** Rostliny a živočichové jsou složeny z odlišných typů buněk; tyto dvě říše tedy zřejmě divergovaly ze společného eukaryotického předka, který musel být jednobuněčný.
- n** Z toho vyplývá, že každá říše si musela odděleně vyvinout mechanismy buněčné diferenciaci a komunikace.
- n** Základní rysy vývoje rostlin a živočichů jsou však společné: znamená to tedy, že představují jedinou možnou alternativu?
- n** Základní informační databáze (počet genů) je u těchto dvou říší obdobná.
- n** Obecné buněčné funkce rostlin a živočichů jsou často shodné, včetně struktury jádra, chromozómů, histonů, mitózy, meiózy a základní transkripční a translační mašinérie.
- n** Regulační prostorově-časové genové exprese se zdají být podobné, avšak homeotické geny kódující proteiny, které regulují srovnatelné vývojové funkce, jsou odlišné.
- n** Řada buněčných procesů u rostlin a živočichů (př. import proteinů do plastidů, kontrakce svalového vlákna) včetně receptorů vnějších vlivů jsou zásadně odlišné. Platí to i o řadě specifických buněčných typů (př. buňky průduchů, neurony).
- n** Genomové sekvenování odhalilo řadu homologních genů s „housekeeping“ funkcemi.
- n** Některé transkripční faktory mají vysokou AMK-sekvenční homologii (př. homeoboxy, MADS boxy), jejich funkce jsou však poněkud odlišné.
- n** Největší rozdíly mezi rostlinami a živočichy jsou zřejmě v mezibuněčných komunikacích (u rostlin známy jen dvou-komponentní etylénové receptory bakteriálního typu), odlišné jsou i receptory vnějších vlivů (fytochromy versus rodopsiny).

2 Vývojové procesy u modelových živočichů

Základními rysy životních cyklů živočichů jsou mnohobuněčnost a pohlavní reprodukce. Pouze nejjednodušší živočichové jsou jednobuněční Protista (viz hlenka) a rozmnožují se i nepohlavně (také např. nezmar). Většina druhů živočichů se vyvíjí v dospělce se specializovanými orgány, tvořenými velkými počty buněk (*metazoa*). Hlavní předností mnohobuněčných organizmů je diferenciací, která umožňuje dělbu práce mezi odlišnými buňkami a orgány, a schopnost udržovat optimální vnitřní prostředí. Metazoa se rozmnožují především pohlavně prostřednictvím fúze dvou typů gamet. Gamety vznikají ze zárodečných buněk, které představují potenciálně nesmrtelnou buněčnou linii. Celý proces pohlavní reprodukce včetně embryonálního vývoje představuje enormně energeticky i časově náročné období života jedince, které však zajišťuje reprodukci druhu s vyšší adaptivní hodnotou.

2.1 Hlenka, *Dictyostelium discoideum*

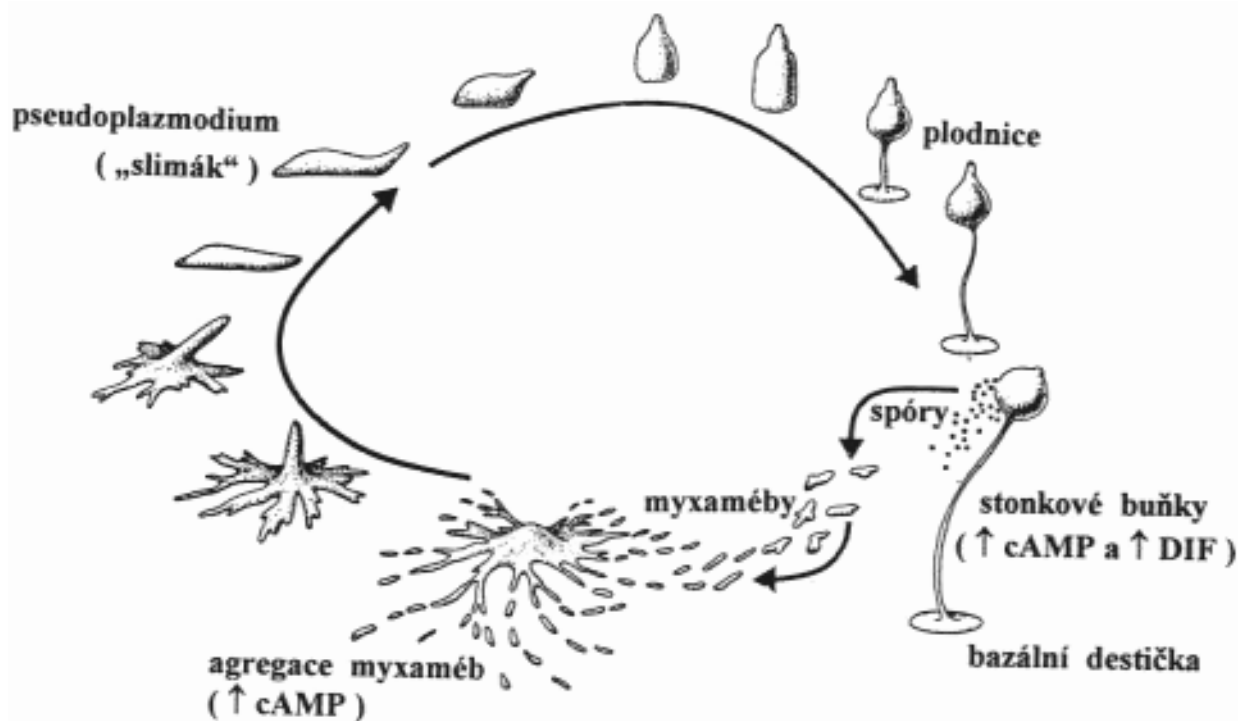
Hlenka je primárně jednobuněčným organismem se vzhledem améby, její fylogenetické zařazení je nejasné (zřejmě Protista, kmen Dictyostelida), někdy řazena do říše živočichů (skupina „sociální améby“, *Acrasiales*). V laboratorních podmínkách se množí jen nepohlavně, haploidními amébami uvolněnými z obalu spor. Pohlavní množení je vzácné a kuriózní: dvě buňky fúzí a zvětšují se v obří buňku kanibalisticky požírající sousední améby. Obří buňka se encystuje a poté podrobuje meiotickým a mitotickým dělením, která dávají vznik novým haploidním amébám.

V průběhu vegetativního životního cyklu nastává neobvyklá přeměna z jednobuněčného na mnohobuněčné stadium: početné individuální améby se uspořádají v sociální komunitu schopnou přežít nepříznivé vnější podmínky. Haploidní buňky se uvolní z obalu spory, žijí jako půdní améby a reprodukují se asexuálně mitotickými buněčnými děleními. Když vyčerpají potravu, améby přítomné v určité oblasti se uskupí v určitém bodě do agregátu. Velikost oblasti (kumulace améb) je určována rozsahem chemotaktických signálů emitovaných buňkami uprostřed agregátu. Agregát získá tvar slimáka (*slug*), pohybuje se na vhodnější místo a vytvoří plodnici (*fruiting body*), která uvolňuje nové buňky-spóry.

Hlenka žije v půdě bohaté na organické látky. Když je zvlhčena, spóry - tvořené plodnicemi - uvolňují haploidní buňky, které vypadají jako živé améby. Žijí ve vrstvičkách vody,

žíví se bakteriemi a množí se binárním štěpením (*binary fission*), vegetativní fáze. Když je v místě spotřebována potrava nebo substrát vysychá, stovky až tisíce améb se uspořádají, migrujíce jednotlivě nebo kolektivně jako karavany směrem k místu srazu. Agregát absorbuje všechny konvergující „proudy“ buněk. Nakonec tvoří agregát mnohobuněčnou asociaci, která poté vytvoří tvar slimáka (obr. 11). Tato asociace je nazývána grex neboli **pseudoplasmodium**.

Obr. 11. Vegetativní životní cyklus hlenky, *Dictyostelium discoideum* (podle Gilberta, 1988). Haploidní spóry dávají vznik myxamébám, které se reprodukují nepohlavně za vzniku dalších myxaméb. Při nedostatku potravy nastává jejich agregace a tvoří se migrující pseudoplasmodium. To se posléze přetvoří ve stacionární plodnici, která uvolňuje spóry.



Pseudoplasmodium je pokryto nebuněčným slizovým obalem a je schopno pohybu jako slimák. Poté se transformuje v plodnici, složenou z bazální destičky a stonku (*stalk*), který nese sférickou akumulaci nových spór pod svou špičkou. Bazální destička a stonky jsou složeny ze **somatických**

buněk. Somatické buňky tvoří celulózové stěny a nakonec umírají. Spóry přežívají: jsou to **generativní buňky**, jejichž tvorba a uvolňování zajišťují funkci asexuální reprodukce. Plodnice má tedy charakter mnohobuněčného organismu. Tímto rysem patří hlenka mezi vyšší eukaryota, neboť zahrnuje agregaci, buněčnou diferenciaci a tvorbu tvarů (prostorové uspořádání, ve kterém se vyskytují různé buněčné typy).

Agregace. Asi 5 hodin po odstranění potravy začnou hladovějící buňky vysílat chemický atraktant sloužící k navádění sousedních hladovějících buněk do centrální lokace. U hlenky je tímto atraktantem **cyklický adenosin monofosfát (cAMP)**. cAMP je emitován hladovějícími buňkami v synchronních pulsech každých 5 až 10 min a šíří se radiální difúzí ve vodním filmu (vrstvičce). Signál je přijímán povrchovým receptorem, proteinem, který má sedm transmembránových domén jako většina receptorových proteinů u živočišných buněk. Šíření signálu je urychlováno kurýrním systémem: sousední améby, které obdržely signál na svých povrchových receptorech reagují uvolňováním svého vlastního cAMP. Tím je zvýšena lokální koncentrace cAMP, signál je amplifikován a difúze je urychlena. K zajištění toho, aby signál byl vysílán z pulzující centrální buňky k periferii agregačního pole (a ne obráceně), každá améba nereaguje na další pulz cAMP další tři minuty. Tato dočasná „hluchota“ zabrání buňkám, aby byly „vyrušovány“ svým vlastním signálem nebo signálem ze sousedních buněk. Každý pulz cAMP indukuje trhavý pohyb améby směrem k centru. Jak vlny přicházejí, améby dělají krok za krokem směrem k centru. Ačkoli každá buňka populace může dosáhnout agregátu jednotlivě, obvykle migrují s karavanou. Buňky se spojují, vytvářejí proudy (*streams*), tyto splývají ve větší proudy, které zcela splynou v centru (složeném až ze 100 tisíc buněk).

Buněčná diferenciaci a tvorba tvaru. V průběhu agregační fáze, která končí tvorbou slimáka (*slug*), geneticky uniformní buněčná populace segreguje v několik subpopulací: předstonkové (*prestalk cells*) buňky, reprezentující asi 20 % populace a umístěné u špičky migrujícího slimáka, předspórické (*prespore cells*) buňky, a buňky budoucí bazální destičky (*basal plate*) - buňky, které se podobají stonkovým buňkám, ale tvoří zadní část slimáka. Byly vysloveny dvě hypotézy vysvětlující dělení améboidní buněčné populace v předstonkové, předspórické a bazálně-destičkové buňky: (1) Hypotéza poziční informace: umístění buňky uvnitř slimáka determinuje její osud. (2) Hypotéza roztržení (*sorting out*): buňky diferencují

před nebo v průběhu agregace a vyhledávají své místo uvnitř slimáka podle své budoucí role. Obě hypotézy musí vysvětlovat, jak je dosaženo charakteristického poměru v počtech těchto tří

buněčných typů. Tento poměr je zachován i po experimentální manipulaci, rozřezání slimáka. Chirurgické odstranění buď anteriorních nebo posteriorních buněk způsobuje, že zbývající buňky revidují své vývojové určení. Kterékoli buňky, které se octnou na anteriorním konci, se stanou buňkami stonkovými. Kterékoli buňky, které se octnou na posteriorním konci, se stanou buňkami spórickými nebo bazální destičky. Numerická regulace je možná, dokud se buněčná diferenciaci nestane ireverzibilní ve vyvíjející se plodnici.

Iniciace agregace vyžaduje kromě hladovění akumulaci sekretovaného proteinu v okolí buněk. Tato koncentrace proteinu může být nepřímým měřítkem buněčné denzity, takže vývoj začne pouze tehdy, pokud je přítomno dostatečné množství buněk ke tvorbě plodnice. Buňky se stanou předurčenými ke tvorbě stonku za vysokých koncentrací **cAMP** a diferenciačního indukčního faktoru (*differentiation inducing factor, DIF*), zatímco nízká koncentrace amonia (NH_3) se nachází u špičky slimáka. Výběr předstonkové a předspórické diferenciaci je kriticky závislý na koncentraci DIF (= chlorovaný aromát, s fenolovým jádrem). Podobně jako cAMP, DIF je uvolňován z hladovějících a agregujících améb. Amoniak je tvořen, když nadbytečný protein je katabolizován, např. v budoucích stonkových buňkách, které syntetizují bezdusíkatou celulózu své rigidní buněčné stěny předtím, než zemřou. Konverze aminokyselin v celulózu uvolňuje amoniak. Způsob buněčné diferenciaci a lokalizace určitých buněčných typů na určitém místě jsou obecně determinovány chemickými a fyzikálními faktory.

Hlenka se stala modelem studia periodické emise signálů, přenosu signálu, chemotaxe, tvorby buněčných kontaktů prostřednictvím *cell-adhesion* molekul, buněčné diferenciaci a uspořádání tvarů (box 11).

Box 11. Charakteristika modelu sociálního prvoka, hlenky *Dictyostelium discoideum*.

n model studia periodické emise signálů, chemotaxe, tvorby buněčných kontaktů, buněčné diferenciaci a uspořádání tvarů

n pohlavní množení vzácné: dvě buňky fúzí a tvoří obří buňku (kanibalismus), poté meióza a mitózy → haploidní améby

n ve vegetativní fázi života nastává přeměna jednobuněčné améby na mnohobuněčné stádium: sociální komunita schopná přežít nepříznivé vnější podmínky (agregace, pseudoplazmodium,

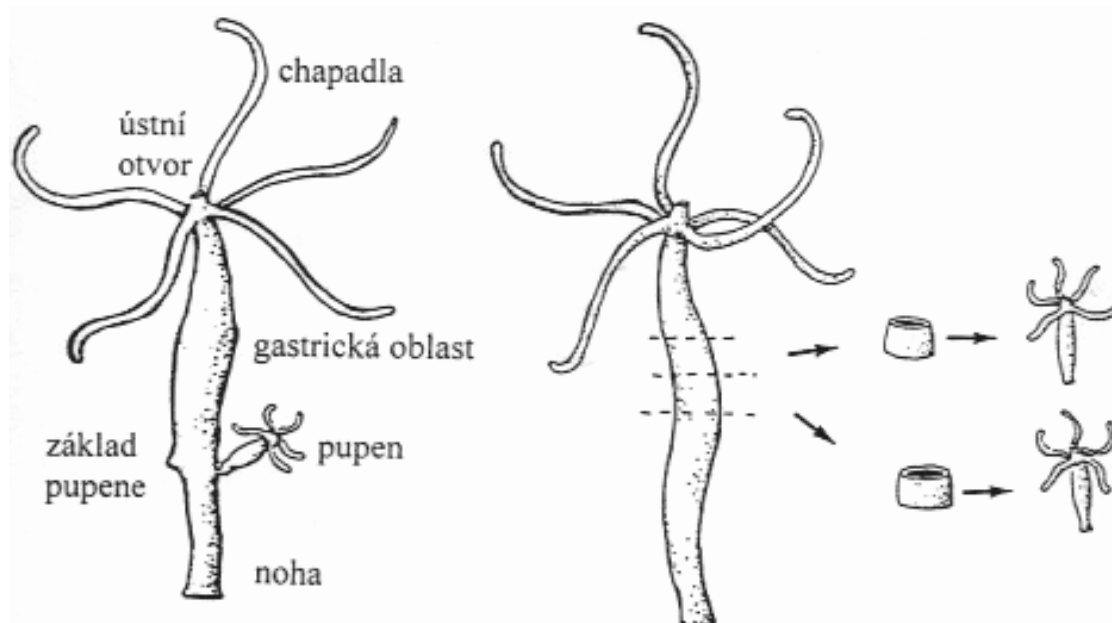
plodnice, spóry)

- n** plodnice složena ze somatických (bazální destička a stonek) a generativních (spóry) buněk
- n** atraktantem améb v agregačním poli je difundující cAMP (kurýrní systém),
časově cyklická recepce signálu
- n** buněčná diferenciace a tvorba tvaru: „předstonkové“ (*prestalk*) buňky u špičky migrujícího slimáka, „předspórické“ (*prespore*) buňky a buňky budoucí bazální destičky (*basal plate*) v zadní části slimáka
- n** diferenciace améboidní buněčné populace: hypotézy poziční informace a / nebo roztřídění buněk
- n** odstranění anteriorních nebo posteriorních buněk slimáka způsobuje, že zbývající buňky revidují své vývojové určení
- n** buňky se stanou předurčenými ke tvorbě stonku za vysokých koncentrací cAMP a diferenciačního indukčního faktoru (*DIF*, chlorovaný aromát)
- n** dalším morfogenem je amoniak (NH_3): nízká koncentrace amoniaku se nachází u špičky slimáka

2.2 Nezmar, *Hadra*

Nezmar náleží do kmene jednoduchých mnohobuněčných živočichů, (žahavci, *Cnidaria*). Struktura těla je velmi jednoduchá, má asi 15 odlišných buněčných typů, 100 tisíc buněk, tělo je v dospělosti organizováno do odlišných struktur (obr. 12). Tělo sestává ze dvou vrstev epitelu - vnější epidermis a vnitřní gastrodermis, které jsou separovány tenkou mimobuněčnou matrix - mezogleou (obr. 13). Rozmnožování je převážně nepohlavní (pučením), v nepříznivých

Obr. 12. Morfologie těla dospělé nezmara s pupeny (vlevo) a regenerace řezů jeho těla (vpravo), která vede ke tvorbě nových jedinců se stejnou polaritou (podle Berkinga, 1997).

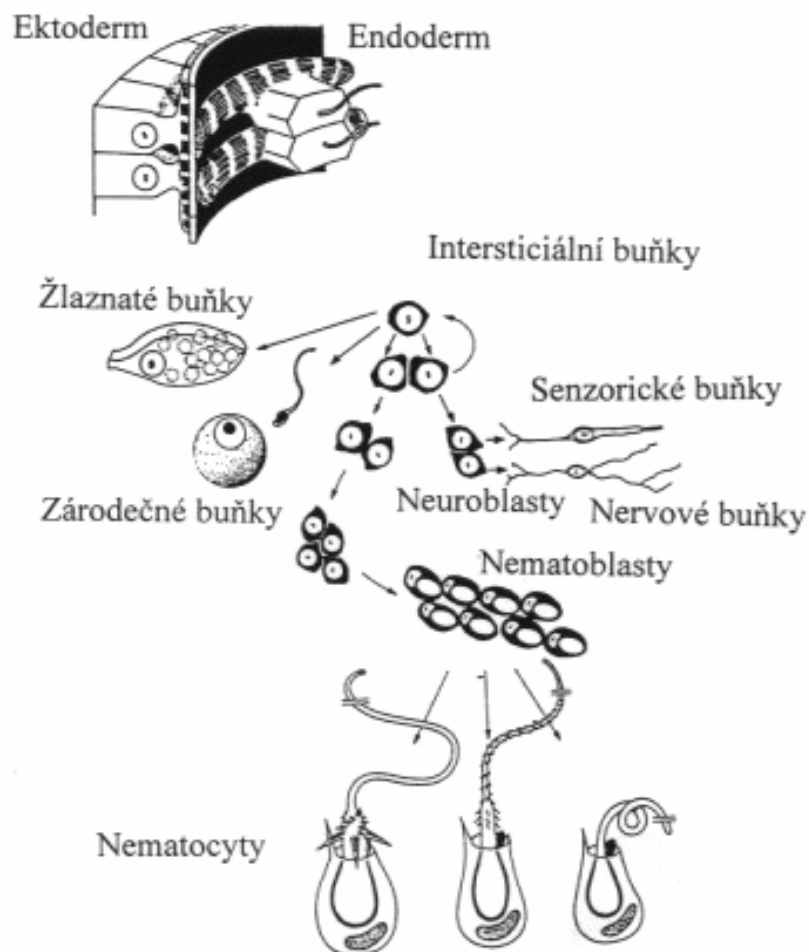


podmínkách i pohlavní. Nezmara však nemá zárodečnou dráhu. Buňky vnější epidermis vytvářejí testes nebo ovaria na témže jedinci, v nich se tvoří haploidní gamety, spermie a vajíčka, po oplození diploidní zygota.

Jakákoli část těla nezmara je schopna úplné **regenerace** (totipotence), přičemž si části těla zachovávají původní polaritu podél apikálně-bazální osy (obr. 12). Součástí růstu a diferenciací je u nezmara přemísťování (pohyb) buněk. Jednotlivé buňky těla jsou v průběhu života nezmara **determinovány** ke tvorbě určitých tělních struktur. Například buňky ze sub-hypostomální oblasti vytvoří hlavu (s chapadly), když jsou transplantovány do mid-gastrické oblasti jiného nezmara, kterému byla hlava odstraněna. Pokud však původní hlava odstraněna

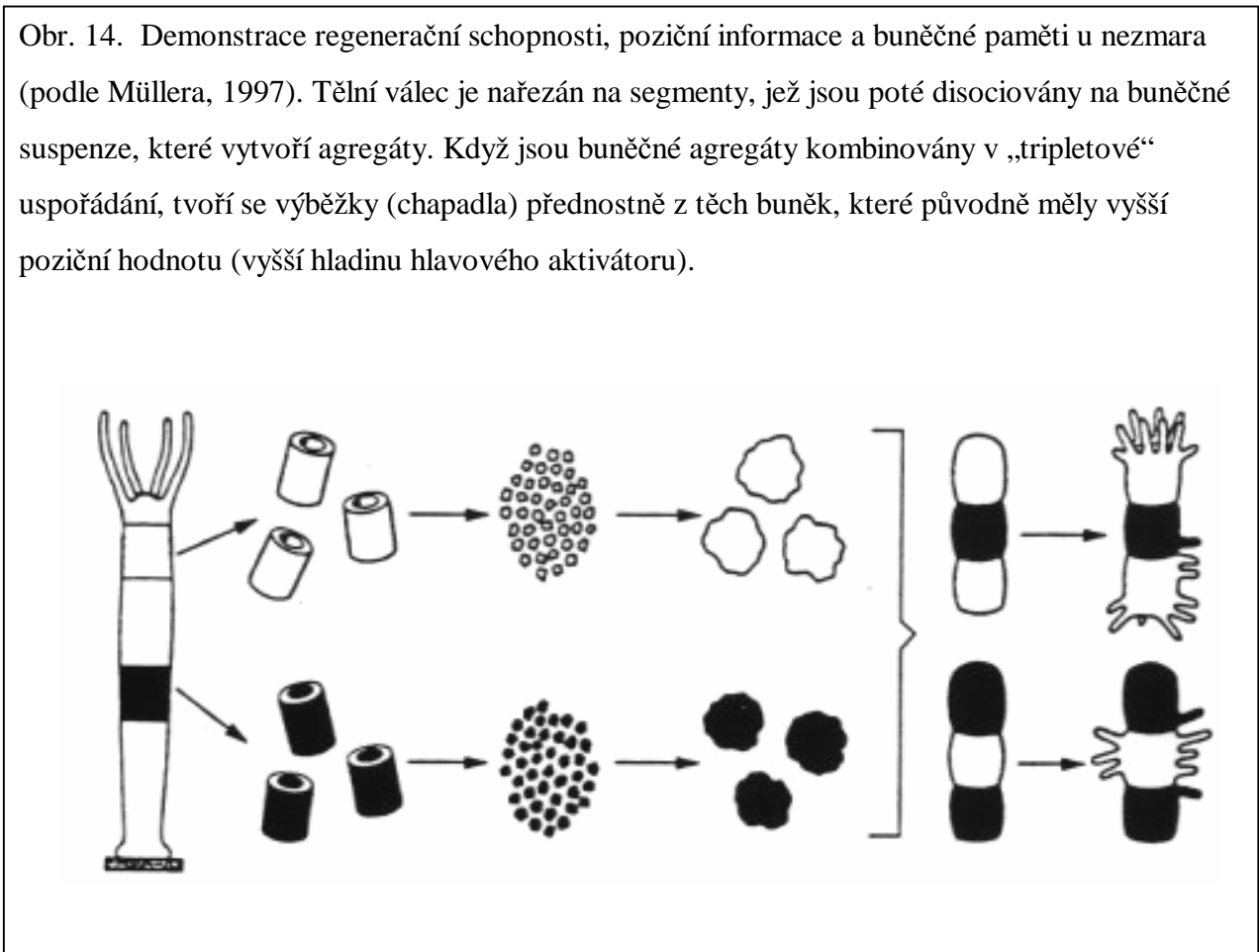
nebyla, nová hlava se z transplantátu obvykle nevytvoří. Tento jev je příkladem biologické **negativní zpětné vazby** (inhibice): původní hlava zřejmě vysílá nějaké signály, které tvorbu další (boční) hlavy blokuje. Dalším řídicím mechanismem biologické regulace je **pozitivní zpětná vazba** (aktivace): nepřítomnost hlavy nezmara má za následek tvorbu látek, které stimulují tvorbu nové hlavy (buď regenerací na místě hlavy původní nebo z transplantátu sub-hyostomální oblasti). Takovými látkami (regulátory) u nezmara hlavové aktivátory (HA) a hlavové inhibitory (HI) jsou obvykle malé peptidy nebo lipidy a jejich koncentrace jsou logicky nejvyšší v hlavě. Tyto látky regulují morfologii organismu, proto patří mezi **morfogeny**.

Obr. 13. Základní typy buněk a tkání nezmara (podle Müllera, 1997). Buňky dvou sousedících vrstev epitelu (ektodermu a endodermu) určují základní tělní architekturu (nahore). Intersticiální buňky nacházející se mezi vrstvami epitelu jsou buňkami kmenovými: dávají vznik několika odlišným typům buněk (zejména žlaznatým, zárodečným, nervovým a žahavým).



Gradient morfogenu HA a HI určuje polaritu těla nezmara: potenciál tvořit hlavu je vždy vyšší u výše lokalizovaných buněk, zatímco potenciál tvorby bazální části je vyšší u níže umístěných buněk. Tuto poziční informaci si buňky zachovávají, i když jsou excizovány z těla, disociovány a reagregovány (obr. 14). Díky své extrémní regenerační schopnosti dávají nově přeskupené agregáty buněk vznik novým chimérickým jedincům, jejichž struktury jsou nestandardně rozmístěny podle experimentálního uskupení buněčných agregátů v závislosti na jejich původní poziční informaci.

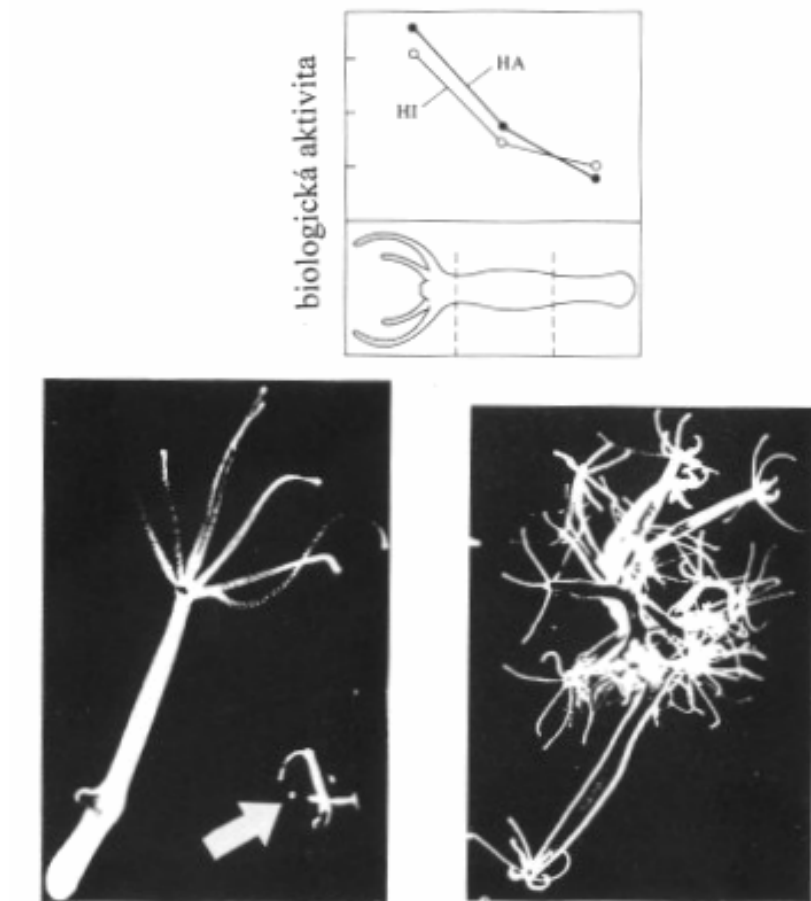
Obr. 14. Demonstrace regenerační schopnosti, poziční informace a buněčné paměti u nezmara (podle Müllera, 1997). Tělní válec je nařezán na segmenty, jež jsou poté disociovány na buněčné suspenze, které vytvoří agregáty. Když jsou buněčné agregáty kombinovány v „tripletové“ uspořádání, tvoří se výběžky (chapatla) přednostně z těch buněk, které původně měly vyšší poziční hodnotu (vyšší hladinu hlavového aktivátoru).



Biochemické analýzy těla nezmara prokázaly, že nejvyšší hladiny HA i HI se nacházejí u jeho hlavy, koncentrace obou látek postupně klesají až k části bazální. HA zřejmě stimuluje intersticiální buňky k dělení a diferenciaci hlavově specifických nervových buněk, zatímco HI je antagonistou této diferenciaci. Byly izolovány i mutanty se sníženou resp. zvýšenou hladinou HA nebo HI (obr. 15). Vysoká hladina HI vede k obřímu fenotypu s dlouhou nohou: vyšší koncentrace HI i v bazální části těla blokuje tvorbu nového pupene, zatímco výrazně nižší

hladina HI umožní vývin bočního pupene už v menším stádiu vývoje, čímž se další růst mateřského jedince zastaví. Mutant se zvýšenou hladinou HA se vyznačuje abnormální morfologií: na místě hlavy je stimulována tvorba více hlav.

Obr. 15. Biotest hlavového aktivátoru (HA) a hlavového inhibitoru (HI) nezmara ze tří odlišných částí těla dospělého (obrázek nahoře, podle Goodwina, 1991). Oba tyto morfogeny vytvářejí gradienty: nejvyšší koncentrace HA (peptid složený z deseti aminokyselin) i HI se nacházejí u hlavového konce. Mutace genů účastnících se syntézy hlavového inhibitoru nebo aktivátoru dramaticky ovlivňují velikost těla nezmara. Zvýšená hladina HI (mutant *maxi*, dole vlevo) vede k obřímú fenotypu, zatímco snížená hladina HI (mutant *mini*, označen šipkou) dává vznik trpasličímu jedinci. Mutace genů s následkem vyšší syntézy hlavového aktivátoru vedou ke tvorbě mnohohlavého těla (mutace *multiheaded*, dole vpravo). Podobný fenotyp lze vyvolat i po aplikaci diacylglycerolu (hraje klíčovou roli v příjmu a předávání signálů buňkami), fenokopie.



Nezmar je historickým modelem (uveden do experimentální biologie v polovině 18. století Abbé Trembleym), který se snad díky své jednoduché anatomii, morfologii, regenerační schopnosti, obvykle nepohlavnímu množení, nepřítomnosti zárodečné dráhy a přisedlým způsobem života v mnohém podobá spíše rostlinám než živočichům (box. 12).

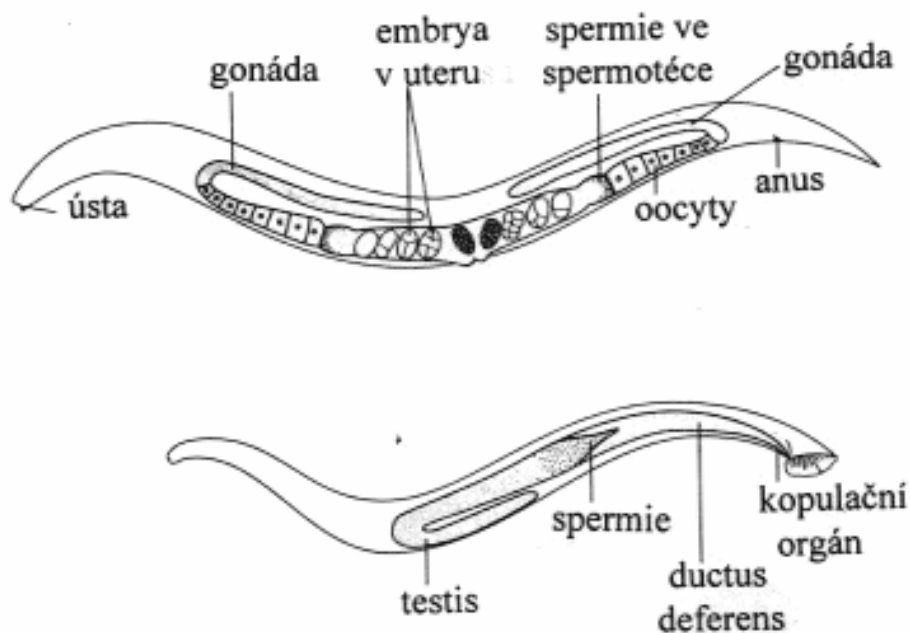
Box 12. Charakteristika modelu nezmaru, *Hydra*.

- n** jednoduchý mnohobuněčný živočich s extrémní regenerační schopností
- n** 15 odlišných buněčných typů, asi 100 tisíc buněk, tělo je organizováno do odlišných struktur
- n** uvnitř enteron s ústy, hypostomem a chapadly, na opačném konci těla je adhezní bazální disk
- n** sestává ze dvou listů - vnější epidermis (intersticiální buňky, nematocyty, nervové a epitelo-muskulární buňky) a vnitřní gastrodermis, separovány nebuněčnou mezogleou
- n** rozmnožování převážně nepohlavní, výjimečně i pohlavní (hermafrodit):
nemá však zárodečnou dráhu jako jiní živočichové
- n** jakákoli část těla je schopna regenerace: části těla si zachovávají původní polaritu
podél apikálně-bazální osy
- n** biologická negativní zpětná vazba (inhibice): hlava vysílá signály blokující tvorbu další hlavy
- n** pozitivní zpětná vazba (aktivace): odstranění hlavy má za následek tvorbu látek,
které stimulují tvorbu nové hlavy
- n** identifikovány morfogeny - hlavové aktivátor (HA) a hlavové inhibitory (HI),
malé peptidy nebo lipidy, jejich koncentrace jsou nejvyšší v hlavě
- n** izolovány mutanty s odlišnými hladinami HA a/nebo HI
- n** diacylglycerol vyvolává „mnohohlavé“ fenokopie:
složka buněčné membrány a signální transdukce
- n** diferenciační potenciál mají intersticiální buňky (kmenové) dávající vznik odlišným typům
- n** součástí růstu a diferenciace je přemísťování (pohyb) buněk
- n** jednotlivé buňky těla jsou v průběhu života determinovány ke tvorbě určitých tělních struktur
- n** většina buněk je ireverzibilně diferencována, např. obranné nematocyty

2.3 Hlístice, *Caenorhabditis elegans*

Půdní hlístice, háďátko (Nematoda, do vývojové biologie uvedená Sydney Brennerem), je po drozofile a myši třetím nejpropracovanějším živočišným modelem (obr. 16). Snadná kultivace a průhledné tělo, ve kterém lze *in vivo* pozorovat buněčná jádra, ho tak činí oblíbeným objektem molekulárních genetiků a embryologů. Nejvýraznějším rysem nematod je však skutečnost, že embryogeneze u nich probíhá přesným, druhově-specifickým způsobem po každou generaci. Pozice každé somatické buňky může být rekonstruována skrze buněčné linie. To je umožněno jeho jednoduchou anatomí a vysokou přesností, s jakou jsou buněčné linie reprodukovány. Buněčné linie lze studovat s pomocí vitálních markerů, jako jsou fluorescenční barviva, protilátky, reportérové geny, nebo laserem odstraněných nebo zničených buněk.

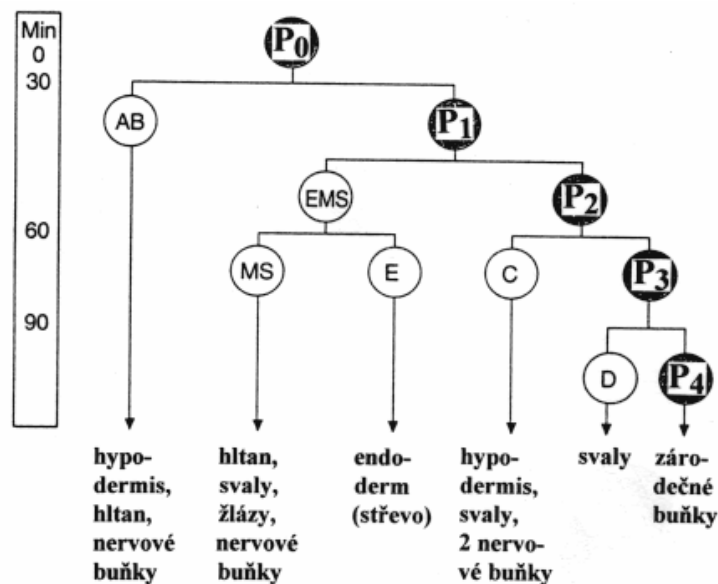
Obr. 16. Morfologie a anatomie dospělé hermafroditní (nahore) a samčí (dole) hlístice, *Caenorhabditis elegans* (podle Kalthoffa, 1996). Gonáda hermafrodita má dvě ramena: každé rameno obsahuje oogonia a spermie, které se shromažďují ve spermatékách. Zralé vaječné buňky jsou oplozeny při průchodu do vulvy vlastními spermii. Hlístice je vivipární: embryogeneze probíhá v koncové části gonadální trubice (uterus). Embryonální vývoj je ukončen uvolněním larvy s definovaným počtem buněk. Larva prochází čtyřmi stádii separovanými svlékáním.



Vývoj každého jedince končí **shodným počtem buněk** (*cell number constancy*). *Caenorhabditis* se kultivuje na vrstvě bakterií kultivovaných na agarových Petriho miskách, životní cyklus trvá 3,5 dne, embryogeneze asi 12 hodin. Haploidní počet autozómů je 5, hermafrodité mají navíc pohlavní chromozómy XX. Příležitostně, nondisjunkcí, vznikají i samečci X0 v nízké frekvenci (0,2 %), embrya XXX jsou pak letální. Vajíčka hermafroditů jsou buď samooplozena vlastními spermii, nebo po kopulaci se samečkem. Z křížení hermafrodita se samečkem vzniká opět 50 % samečeků a 50 % hermafroditů. Pohlaví je tedy determinováno systémem X/A (= 1 u hermafroditů, = 0,5 u samečků).

Antero-posteriorní polarita vajíčka se stává viditelnou ihned po oplození. Časná rýhování jsou asymetrická a asynchronní. Prvním dělením vzniká větší anteriorní blastomera (zvaná AB) a menší posteriorní (P₁). Poté se buňka AB dělí na své buňky dceřinné (anteriorní AB a posteriorní AB) a buňka P₁ na posteriorní P₂ a EMS. Buňka EMS definuje budoucí ventrální část embrya a posteriorní AB budoucí dorzální stranu. Zygota se tedy dělí sérií asymetrických dělení, při každém z nich vzniká anteriorní somatická buňka (AB, EMS, C a D) a posteriorní buňka základová (série P₁ až P₄, obr. 17).

Obr. 17. Buněčná genealogie hlístice (podle Müllera, 1997). V průběhu larválního vývoje se ze somatických základových buněk (*founder cells*: AB, EMS, C a D) vytvářejí různé typy tkání s konstantním počtem buněk. Tkáně jsou však polyklonálního původu. Linie buněk P (P₀ - P₄) je zárodečnou linií: buňka P₄ je progenitorem zárodečných (pohlavních) buněk.

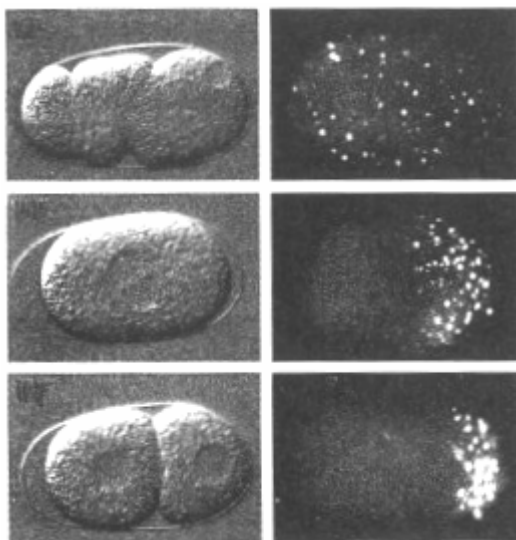


Všechny tyto buňky se dělí specifickou rychlostí, která je proporcionální k pořadovému číslu buněk P a sleduje i pořadí vzniku prvních somatických buněk. Tedy buněčná linie AB se dělí nejrychleji a konečně P₄, primordiální zárodečná buňka, nejpomaleji: jen jedinkrát v průběhu embryogeneze. Definování původu buněčných linií u hlístice by mohlo znamenat, že každá základová buňka dává vznik pouze určitým buněčným typům a že všechny buňky určitého typu jsou odvozeny od jediné základové buňky. Analýza buněčných linií však prokázala, že tomu tak je pouze u střeva (buněčná linie E) a zárodečných buněk (linie P₄), tato hypotéza neplatí například pro neurony a svaly. Znamená to, že buňky podobného typu nemusí být stejného původu a naopak, buňky shodného původu mohou diferencovat ve zcela odlišné buněčné typy. S výjimkou procesů gastrulace nedochází v embryu hlístice k výraznějším buněčným pohybům, neboť buňky se obvykle tvoří v místech svého pozdějšího uplatnění. Na konci embryogeneze změní embryo výrazně svůj tvar ze sférického na protáhlý.

Embryo se vyvíjí v těle matky-hermafrodita. Vylhne se jako larva s 556 somatickými buňkami (samčí embryo má 560 buněk) a dvěma primordiálními zárodečnými buňkami. Prochází čtyřmi larválními stádii, separovanými svlékáním, a prodlouží se z 0,2 mm na 1,2 mm. Celé larvální stádium trvá 3 dny. V případě nepříznivých vnějších podmínek však může přejít do dlouhotrvajícího larválního stádia zvaného *dauer larva*. V průběhu larválního vývoje postupně vznikají adultní struktury ze skupiny buněk zvaných **postembryonální blastové buňky**. Tyto buňky jsou obdobou imaginálních terčků u drozofily a vyvinou se v funkční orgány až je dosaženo stádia dospělého. Dělení těchto blastových buněk jsou přísně časovaná i orientovaná jako při embryonálních buněčných děleních.

Podobně jako u jiných živočichů, hlavními mechanismy buněčné determinace u hlístice jsou (maternální) lokalizace cytoplazmatických determinantů a embryonální indukce (schopnost určitých buněk indukovat ve svém okolí specifický typ vývoje). Jak je popsáno výše, první dělení zygoty dává vznik dvěma odlišným blastomerám, AB a P₁, jejichž další osud je též významně odlišný. Oplozené vajíčko má výraznou antero-posteriorní polaritu, jež může být dvojího původu: buď je preformována již v oocytu (účinek maternálních genů) nebo orientace vzniká podle místa vstupu spermie. Genetická analýza cytoplazmatické lokalizace v embryích prokázala klíčovou roli genů s maternálními účinky (*par-1*⁺ až *par-4*⁺), jejichž mutace způsobují abnormality při prvním dělení zygoty, proudění cytoplazmy a segregaci granulí P (obr. 18). Dalším klonovaným maternálním genem, který hraje autonomní roli v pozdějším embryonálním vývinu hlitanu, je *skn-1*⁺: jeho produktem je transkripční faktor akumulující se v jádru buňky P₁ a

Obr. 18. Segregace granulí P do zárodečných buněk v průběhu prvního dělení vajíčka hlístice (podle Kalthoffa, 1996). Segregace je řízena maternálními geny a začíná již po oplození při vzniku prvních dvou blastomer lokalizací granulí na posteriorním konci (na obrázcích vždy v pravé části). Vlevo jsou snímky z fázového kontrastu, vpravo odpovídající buňky po fluorescenční imunodetekci granulí P. Granule jsou předávány výhradně v linii buněk $P_0 \rightarrow P_4$.

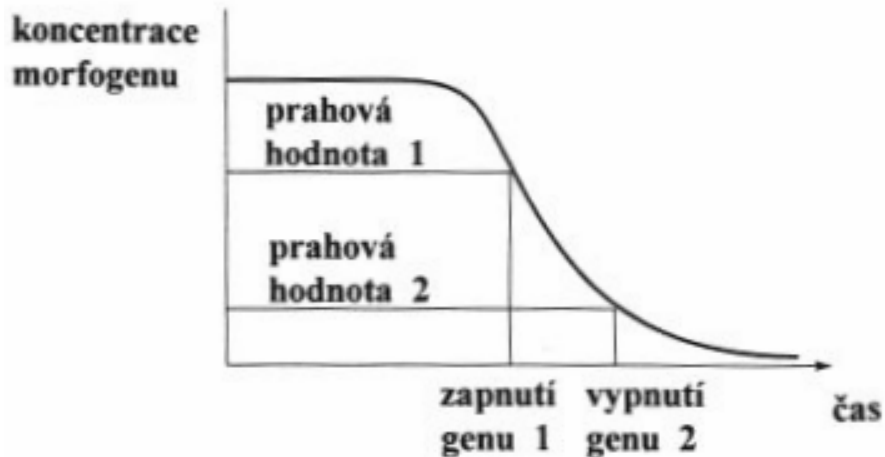


jejích derivátech. Jde o gen se striktně maternálním účinkem, tedy protein musí být translatován z maternálně přenesené mRNA v oocyty nebo vajíčku. Zřejmým antagonistou genu *skn-1*⁺ je další maternální gen *pie-1*⁺. Jeho normální funkce zajišťuje, aby bylo zabráněno tvorbě aktivního proteinu *skn-1* v jiných buněčných liniích než P_1 . Objev účinku maternálních genů a zjištění, že experimentálně separované blastomery se vždy vyvíjejí podle svého původu, vedly k závěru, že embryo hlístice je pouhou mozaikou, kde každá blastomera je determinována lokalizací specifické cytoplazmy. Vývoj jednotlivých blastomer je však též řízen svým okolím: buněčnými interakcemi se sousedními buňkami (induktivní interakce). Pokud jsou některé blastomery ve vyvíjejícím se vajíčku experimentálně odstraněny, může dojít v okolních blastomerách ke změně vývojového programu (obvykle se z nich patřičně tkáň nevyvinou). Na konci larválního vývoje má dospělý červ celkem 959 somatických buněk a asi 2 000 zárodečných buněk u hermafrodita

nebo 1 031 somatických buněk a asi 1 000 zárodečných buněk u samečka. Nervová soustava má 302 nervových buněk, které vznikají ze 407 prekurzorových, z nichž 105 se podrobí apoptóze. **Základové buňky** (*founder cells*) leží v linii buněk P (P_0 - P_4), poslední P_4 je vlastní zárodečnou buňkou, do které se asymetrickými děleními ukládají **cytoplazmatické granule P**. U příbuzného červa *Ascaris* zůstávají sady chromozómů kompletní jen v této zárodečné linii, zatímco somatické buňky vznikají asymetrickými děleními ztrácejíce určitou část chromozomálního materiálu (*chromatin diminution*, objevil Theodor Boveri). Blastomery jsou u hlístice přísně determinovány, nazývají se základové buňky (nikoli buňky kmenové, neboť žádná dceřinná buňka již nemá schopnost sebeobnovování). Jednotlivé buněčné linie dávají vznik více typům buněk embrya. Většina tkání je odvozena z několika základových buněk, které dávají vznik též jiným tkáním. Takové tkáně, které vznikají z více (několika) základových buněk se nazývají tkáně polyklonálního původu. Analýzou mutantů a chirurgickými delecemi základových buněk bylo prokázáno, že každá buňka je determinována nikoliv pouze cytoplazmatickými složkami alokovanými do nich v časně embryogenezi (zejména mRNA), ale též časnými a přesnými interakcemi mezi sousedními buňkami. Celý genom má minimálně 5 000 genů, $8 \cdot 10^7$ párů bazí, je celý sekvenován. Genetické řízení vývoje je u háďátka realizováno asi 1 600 geny, mezi něž patří i geny homeotické. Homeotické geny jsou u hlístice pouze čtyři, umístěny v jediném shluku. Účastní se jako u drozofily antero-posteriorní specifikace a platí u nich pravidlo kolinearity. Transgenní organizmy se připravují mikroinjekcí do gonád dospělých háďátek.

Hlístice je také unikátním modelem ke studiu časování vývojových procesů. Buněčná dělení u ní nastávají v určitých fázích vývoje a každá buněčná linie je charakterizována časováním, orientací a symetrií buněčných dělení. Podobně jako jiné vývojové procesy je geneticky řízena i jejich časová souslednost. Příslušné geny byly identifikovány prostřednictvím jejich mutací, zv. **heterochronních mutací**: způsobují, že buňky se podrobují typům dělení a diferenciaci, které se normálně vyskytují v jiném vývojovém stádiu. Heterochronní mutace jsou analogií mutací homeotických. U homeotických mutací jde o změnu místa specifické diferenciaci (např. tvorby orgánu), zatímco u heterochronních mutací jde o změnu vývojové posloupnosti (stádia vývoje, jeho časování). Gradienty morfogenů mohou existovat v prostoru i v čase. Časový gradient morfogenního signálu může aktivovat nebo reprimovat odlišné geny podle své okamžité koncentrace (obr. 19). Příkladem takového heterochronního genu je *lin-14⁺*, jehož mutace vedou ke změně proteinu a změnám typu dělení buněčné linie, která pochází z postembryonální blastové buňky T a dává vznik hypodermálním, středním a nervovým

Obr. 19. Model účinku heterochronních genů, které svými produkty řídí časování vývojových procesů. Tento model je založen na časově proměnlivé koncentraci určitého morfogenu, který zapíná nebo vypíná heterochronní geny. Na obrázku je znázorněno, že pokud hladina morfogenu klesne pod určitou hodnotu, může dojít k zapnutí resp. vypnutí exprese různých genů.



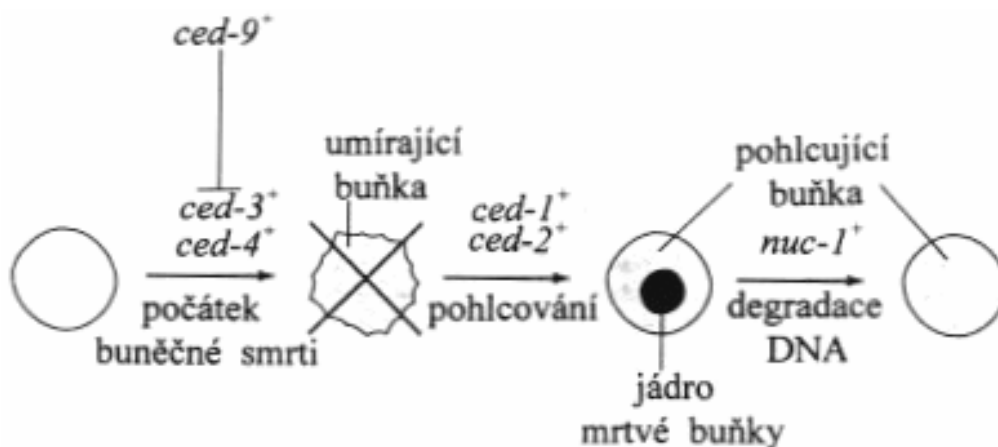
buňkám. U standardního typu je protein *lin-14* syntetizován časně v prvním larválním stádiu a buněčná dělení v linii T začínají v prvním a končí ve druhém larválním stádiu. U mutantů se ztrátou funkce alel *lin-14* je období aktivity proteinu zkráceno: následkem je předčasné zastavení buněčných dělení, ke kterému normálně dochází až v pozdějším stádiu („předčasné stárnutí“). Ektopická exprese genu *lin-14*, která má za výsledek delší aktivitu proteinu, vede k přídatným, opakovaným buněčným dělením: buněčná linie se tak stává „permanentně mladou“. Pozorovaný vztah mezi proteinem *lin-14* a specifickým buněčným dělením naznačuje, že protein vytváří časový gradient s vysokou koncentrací na počátku prvního larválního stádia a poté s postupným poklesem. Protein *lin-14* je lokalizován v buněčných jádrech a reguluje transkripci mnoha podřízených genů. Hladina proteinu *lin-14* může být ovšem regulována i nestandardním posttranskripčním procesem, prostřednictvím protismyslné RNA. U hlístice byly totiž izolovány geny (například *lin-4*⁺), které nekódují protein, ale jen krátké molekuly RNA, které jsou komplementární k úsekům *lin-14* mRNA. Časový gradient proteinu *lin-14* může být tedy tvořen inaktivací jeho transkriptu po hybridizaci s regulačními molekulami RNA *lin-4* (tvorba duplexů).

V průběhu vývoje živočichů i rostlin vzniká mnoho buněk, které se dále nevyvíjejí, nýbrž zákonitě zanikají: tato **programovaná buněčná smrt** (nazývaná apoptóza) často hraje důležitou morfogenní úlohu. Buňky podrobující se apoptóze vykazují charakteristické rysy (svraštění

buňky, kondenzace a fragmentace chromatinu), kterými se odlišují od buněk, které umírají náhodnou smrtí (nekrózou). U drozofily, člověka a hlístice již byly identifikovány geny, které hrají roli v řízení programované smrti. Při vývoji hlístice dochází u hermafrodita k řízené smrti 131 z 1090 somatických buněk, u samečka 148 z 1179 somatických buněk. U každého individua umírají stejné buňky, každá vždy v určitém čase a na určitém místě. Programovaná buněčná smrt je řízena genetickou kaskádou zahrnující minimálně deset genů, převážně označovaných *ced* (*cell death*, obr. 20). Dva klíčové geny *ced-3⁺* a *ced-4⁺* jsou vždy vyžadovány pro programovanou

Obr. 20. Schéma dráhy řízení programované buněčné smrti u hlístice (podle Kalthoffa, 1997).

K iniciaci smrti dochází po produkci cytotoxinů (produkty genů *ced-3⁺* a *ced-4⁺*), které může být zabráněno produktem genu *ced-9⁺*. Mrtvé buňky jsou pohlcovány svými sousedy (vyžadována funkce genů *ced-1⁺* a *ced-2⁺*) a jejich DNA je degradována nukleázou (produkt genu *nuc-1⁺*).



smrt, jak v embryích, tak i v larvách. Odpovídají za produkci cytotoxinů, které zabíjejí buňky, v nichž se tyto substance vytvářejí. Recesivní mutace genů *ced-3* a *ced-4* obvykle nevedou k abnormalitám ve vývoji, extra-přežívající buňky se však již nedělí. Velká skupina genů (včetně *ced-1⁺* a *ced-2⁺*) způsobuje, že mrtvé buňky jsou pohlceny a degradovány sousedními buňkami. Recesivní mutace těchto genů vedou k tomu, že mrtvé buňky zůstávají přítomny. Významnou roli hraje dále gen *nuc-1⁺* (*nuclease deficient*), který je nezbytný k rozštípání DNA z jader pohlcených buněk. Všechny uvedené geny (včetně několika dalších) tak určují dráhu buněčné smrti a způsob odstraňování mrtvých buněk. Rozhodování, které buňky budou usmrceny a které mohou přežít, je pod kontrolou jiných genů, zejména *ced-9⁺*. Funkcí tohoto genu je tedy v podstatě ochrana všech buněk, které nemají být usmrceny, před programovanou smrtí: produkt genu *ced-9⁺* inhibuje

aktivity genů *ced-3⁺* a *ced-4⁺*. Detailní analýzy prokázaly, že buněčná smrt je iniciována aktivitou genů *ced-3⁺* a *ced-4⁺* v buňkách samotných a nikoli v buňkách sousedních.

Výševedené příklady dokazují, že *Caenorhabditis elegans* je unikátním modelovým organizmem, na kterém byly na detailní buněčné a molekulární úrovni analyzovány zejména procesy vývoje buněčných linií, lokalizace cytoplazmatických determinant, funkce heterochronních genů a programované buněčné smrti (box 13).

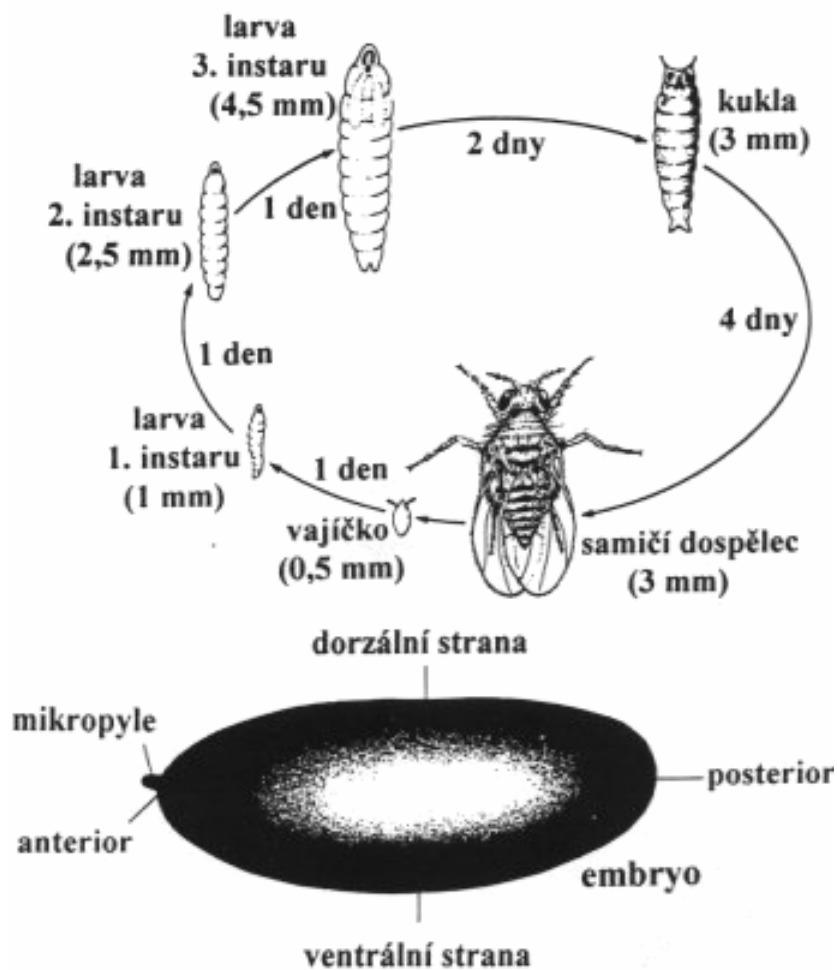
Box 13. Charakteristika modelu hlístice, *Caenorhabditis elegans*.

- n** malý genom, asi > 5 000 genů, 8×10^7 pb, byl již celý osekvenován
- n** jednoduchá anatomie, průhlednost těla, snadná kultivace, krátký životní cyklus (3,5 dne, z toho embryogeneze 12 h)
- n** definované buněčné linie, konstantní počet buněk
- n** pohlavní determinace $X/A = 1 \rightarrow$ hermafrodit, $X/A = 0,5 \rightarrow$ sameček
- n** hermafrodit ($2n = 10, XX$) má 959 somatických buněk a asi 2 000 zárodečných buněk
- n** sameček vzniká vzácně (0,2 %) nondisjunkcí X ($2n = 9, X0$), má 1 031 somatických buněk a asi 1 000 zárodečných buněk
- n** embryo se vyvíjí v těle matky - hermafrodita, uvolněná larva má 556 somatických buněk a 2 primordiální buňky zárodečné
- n** základové buňky leží v linii buněk P ($P_0 - P_4$), poslední P_4 je zárodečnou buňkou, do které se ukládají cytoplazmatické granule P
- n** tkáně jsou polyklonálního původu (vznikají vždy z více základních buněk, *founder cells*)
- n** buňky jsou determinovány cytoplazmatickými složkami, alokovanými do nich v časně embryogenezi, a buněčnými interakcemi
- n** model studia apoptózy, asymetrického dělení, heterochronních genů, determinace pohlaví a kompenzace dávky genů vázaných na chromozóm X
- n** vývoj je řízen asi 1 600 geny, včetně homeotických (4, umístěny ve shluku, platí pravidlo kolinearit, účastní se antero-posteriorní specifikace embrya)

2.4 Octomilka, *Drosophila melanogaster*

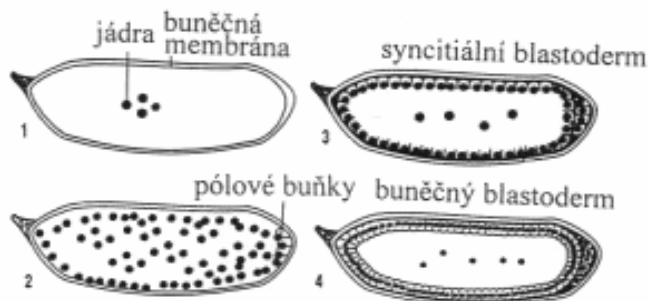
Vývoj drozofily je velmi specifický, ale přesto se stala jedinečným modelem vývojové genetiky díky širokému zázemí genetických poznatků, krátkému životnímu cyklu a snadné manipulaci. Drozofila má 4 páry chromozómů, k rekombinaci dochází jen při vzniku samičích zárodečných buněk, nikoli u samčích. Haploidní genom má $1,65 \times 10^8$ pb (asi dvacetina lidského genomu). K oplození dochází v oviduktu, vajíčko je tedy kladeno jako diploidní (obr. 21).

Obr. 21. Životní cyklus mouchy drozofily. Oplození se odehrává v oviduktu a samička klade oplozená vajíčka, která se vyvíjejí přes larvu (se třemi instary) a kuklu v dospělé jedince. Časné embryo (dole) má syncytiální charakter a díky projevu genů s maternálními účinky má již rozlišené základní osy budoucího těla (podle Goodwina, 1991).

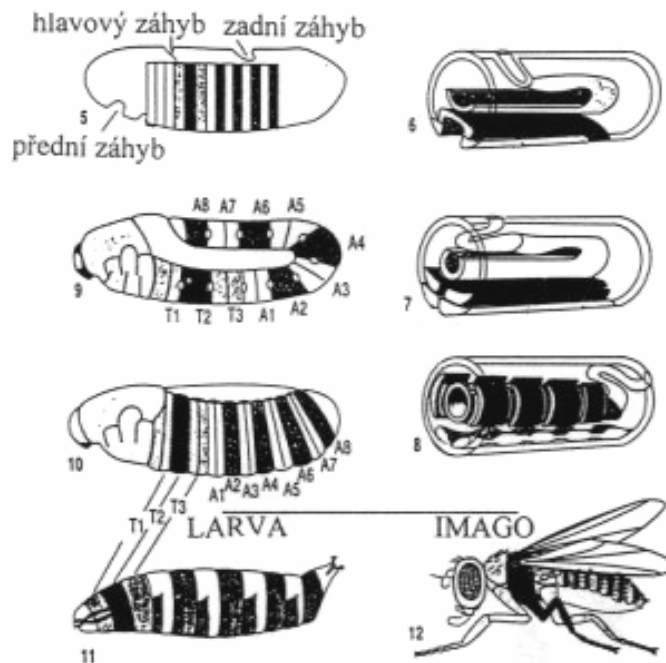


Obr. 22. Embryonální vývoj drozofily zahrnuje rýhování vajíčka (fáze 1-4), gastrulaci a segmentaci (5-10), vylíhnutí larvy (11) a tvorbu dospělého (12), podle Müllera (1997). Počáteční rýhování vajíčka je jen superficiální, prvními oddělenými buňkami jsou buňky pólové, které tvoří zárodečnou linii. V průběhu gastrulace vzniká podélný zárodečný proužek, který se prodlužuje, takže posteriorní konec embrya se nachází poblíž hlavy. Gastrulace nastává procesem invaginace na třech místech (*head fold*, *invagination anterior* a *invagination posterior*). Na ventrální straně vzniká „primitivní záhyb“, do kterého se vchlípí buňky mezodermu a nervová trubice.

RÝHOVÁNÍ

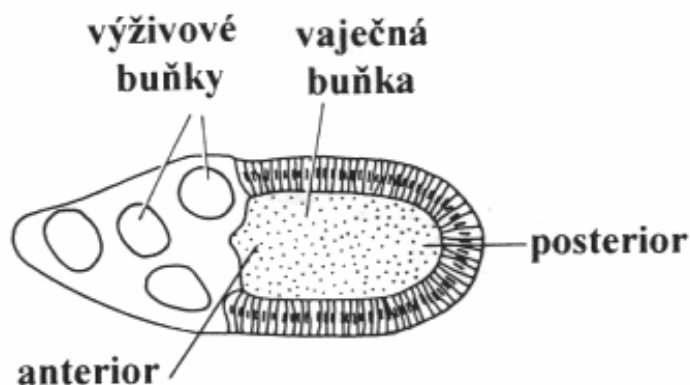


GASTRULACE A SEGMENTACE



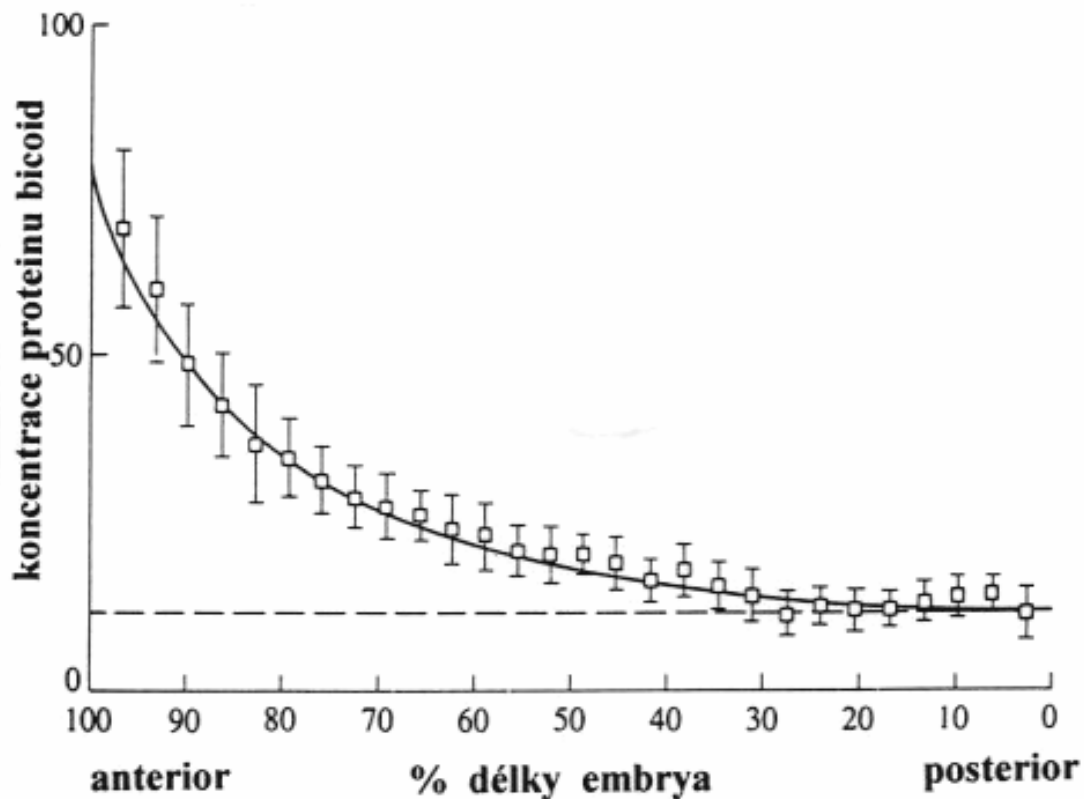
Rýhování vajíčka drozofily je bez buněčného dělení (časné embryo je tedy mnohjaderné, zpočátku pravidelně rozmístěné syncytium, obr. 22). V průběhu 9. mitotického cyklu (každá mitóza trvá jen 9 minut) jádra migrují k povrchu vajíčka (zvanému periplazma) a tvoří se tak **syncytiální blastoderm**. Na posteriorním pólu embrya se některá jádra obalí plazmatickou membránou a tvoří první odlišené buňky (pólové): jsou to **buňky zárodečné**, později se vyvinou v oocyty nebo spermatozoa uvnitř pohlavních orgánů. Po 14. dělení jader se vytvoří kolem jader v syncytiálním blastodermu buněčné membrány, **buněčný blastoderm**. Vnitřek embrya je vyplněn výživovým žloutkem s několika jádry. Embryo se poté promění v mnohvrstevnou strukturu procesy ohýbání, expanze a kontrakce odlišných oblastí buněčné vrstvy (první je výrazný záhyb oddělující budoucí hlavu). Výsledkem těchto procesů je **segmentované stádium zárodečným proužků** (8 hodin staré embryo): také se vytvářejí vnitřní struktury jako střevo, nervový systém a svalovina. Základní plán těla je již viditelný: anterorně-posteriorní osa, dorzálně-ventrální osa a článkovaná struktura. Po dalších 14ti hodinách vývoje se vylíhne **larva** prvního instaru (instar je stádium larválního vývoje hmyzu mezi dvěma svlékáními), složená z výrazných článků (oddělených přepážkami). Tyto články se od sebe liší, štíhlé hrudní (*thoracic segments*, T1 až T3) až široké zadečkové (*abdominal segments*, A1 až A8). Na přední těla je část hlavová (H), na konci kaudální (C). Larva roste, pak se zakuklí, podrobí metamorfóze, která ústí v dospělou formu.

Obr. 23. Vývin vaječné buňky v mateřském folikulu drozofily (podle Goodwina, 1991). Vzhledem k asymetrické pozici výživových buněk u anteriorního pólu dochází k nerovnoměrné distribuci produktů (mRNA) genů s maternálními účinky ve vaječné buňce. Po oplození dochází k translaci těchto mRNA a ke vzniku antero-posteriorní a dorzo-ventrální osy embrya.



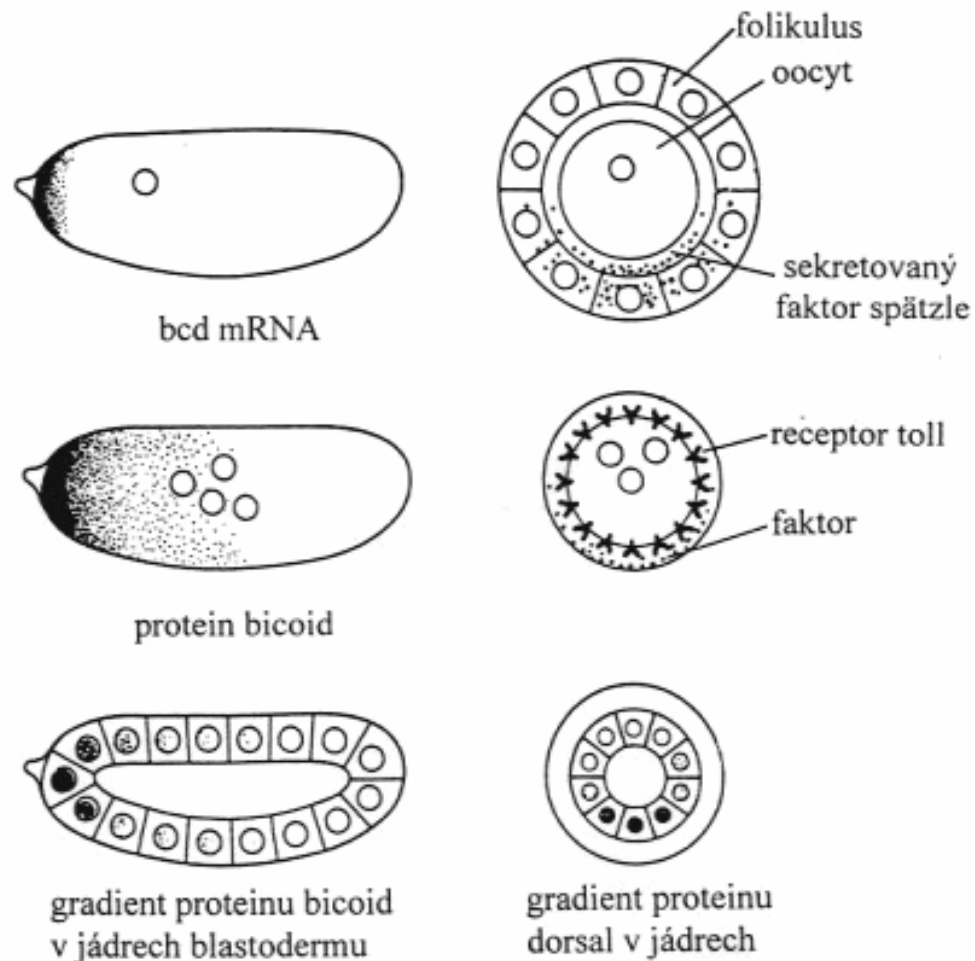
Genetické řízení embryogeneze drozofily bylo již z velké části objasněno. V časové posloupnosti se prvně uplatňují maternální geny určující základní tělní osy a poté geny zygotické s úlohou rozčlenění těla na segmenty a jejich specifikaci. **Geny maternálního účinku** jsou transkribované ve vaječniku matky, pak transportované jako ribonukleoproteinové částice do oocyty a translatované v proteiny poté, co je oocyt fertilizován a nakladeno vajíčko (obr. 23, 24).

Obr. 24. Gradient proteinu bicoid v časném embryu drozofily (podle Goodwina, 1991). Příslušná mRNA je přítomna v anteriorní oblasti oocyty již před oplozením. K její translaci však dochází až po fertilizaci. Protein se akumuluje v anteriorní části raného embrya a poté difunduje směrem k posteriorní části, takže vzniká gradient, ve kterém koncentrace proteinu bicoid exponenciálně klesá. Asi ve dvou třetinách délky těla směrem od anteriorního konce již dosahuje hodnot podprahového nefunkčního pozadí (horizontální přerušovaná čára).



Maternálních genů je známo alespoň 30, vytvářejí gradienty morfogenů, čímž určují základní architekturu embrya: patří sem geny řídící anterorně-posteriorní polaritu (anteriorní skupina s genem *bicoid*, posteriorní skupina s geny *nanos* a *oskar* a terminální skupina s geny *torso* a *caudal*) a geny řídící dorzo-ventrální polaritu (např. *dorsal* a *toll*, obr. 25).

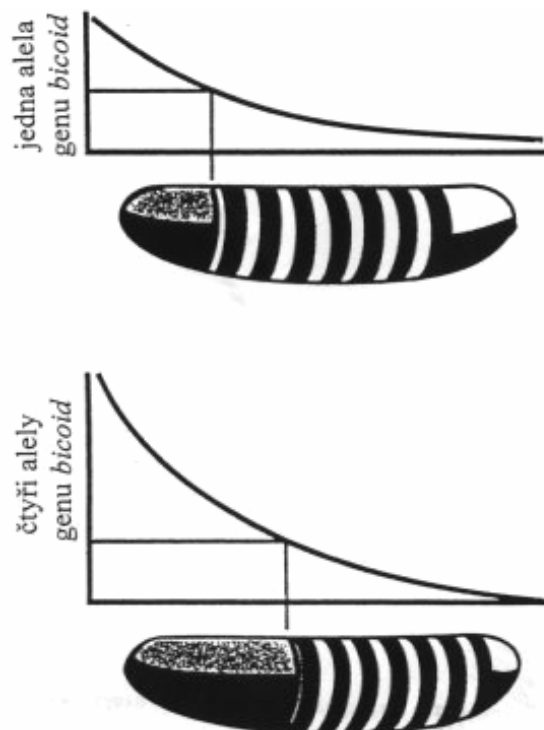
Obr. 25. Dynamika projevu maternálních genů v založení antero-posteriorní a dorzo-ventrální polarity v syncytiálním a buněčném blastodermu drozofily (podle Müllera, 1997). Gradient produktu maternálního genu *bicoid* (*bcd*) určuje anteriorní pól: nejvyšší hladina proteinu determinuje budoucí hlavu a hrud' (vlevo). Produkt genu *spätzle* je sekretován na ventrální straně mateřského folikulu, přijímán receptorem (produkt genu *toll*), který fosforyluje produkt genu *dorsal*, což vede k redistribuci proteinu dorsal na ventrální straně (příčné řezy, vpravo).



Protein bicoid je transkripčním faktorem a má α -helix-otáčka- α -helix doménu odvozenou z homeoboxu genu *bicoid*. Touto doménou se váže na promotory jiných genů, tj. aktivace podřízených genů embrya - genů zygotických. Gradient proteinu bicoid tak poskytuje poziční informaci. Když je genetickou manipulací zvýšena hladina proteinu bicoid, anteriorní část těla je větší, tj. rozhraní mezi hlavou a hrudí je posunuto směrem dozadu (obr. 26). Posteriorní oblast těla je determinována produkty genů *nanos* a *oskar*. Ne všechny tyto geny však kódují transkripční faktory (např. protein *nanos* se na DNA neváže, nýbrž suprimuje translaci některých mRNA na ribozómech nebo *torso* je transmembránový protein sloužící jako receptor pro extracelulární signální molekuly).

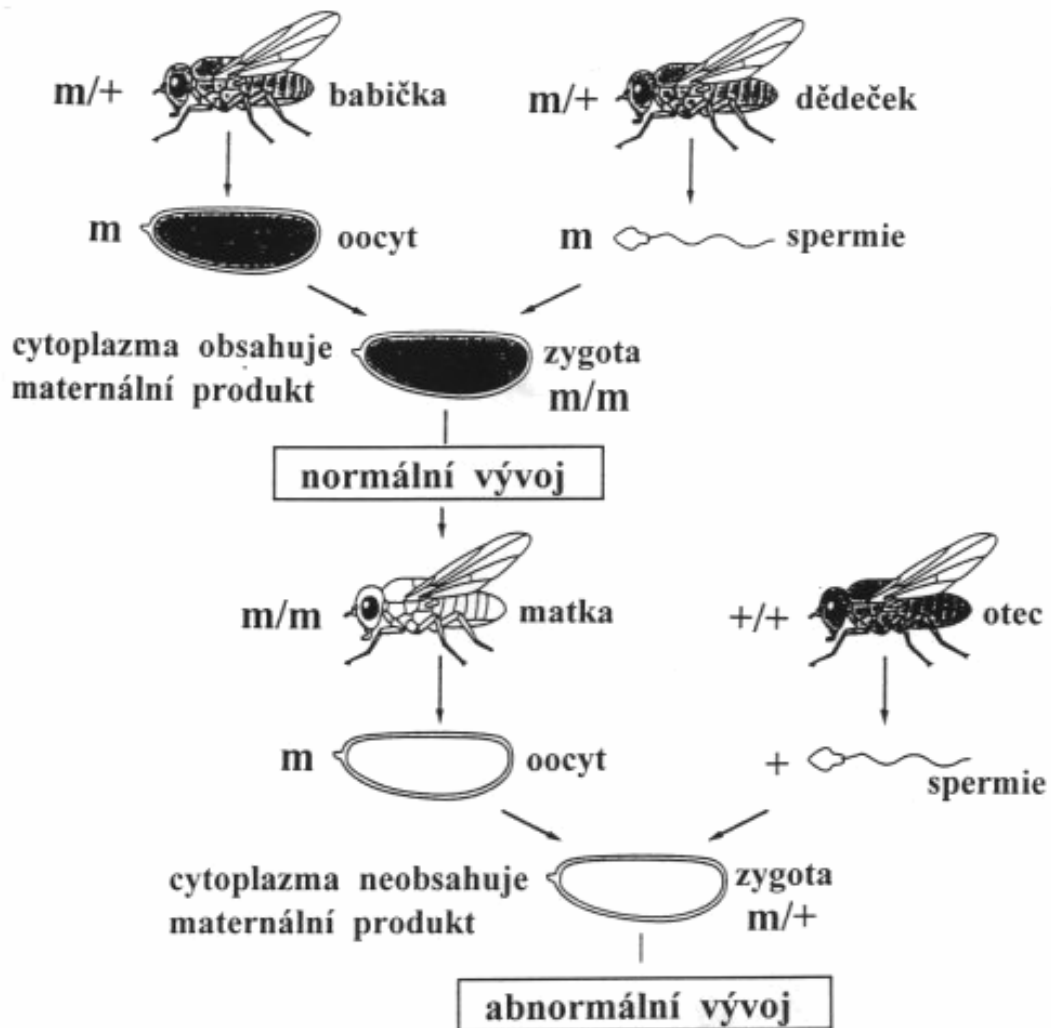
Obr. 26. Gradient distribuce proteinu bicoid v embryu drozofily (podle Müllera, 1997).

Koncentrace proteinu bicoid specifikuje pozici a rozměry hlavové a hrudní oblasti. Jestliže je genetickou manipulací snížen (viz jediná funkční alela) nebo naopak zvýšen (viz čtyři funkční alely) počet aktivních alel genu *bicoid* v mateřském jedinci (folikulu), dochází ke zvýšení hladiny proteinu a tím i ke zkrácení resp. prodloužení hlavové a hrudní oblasti.



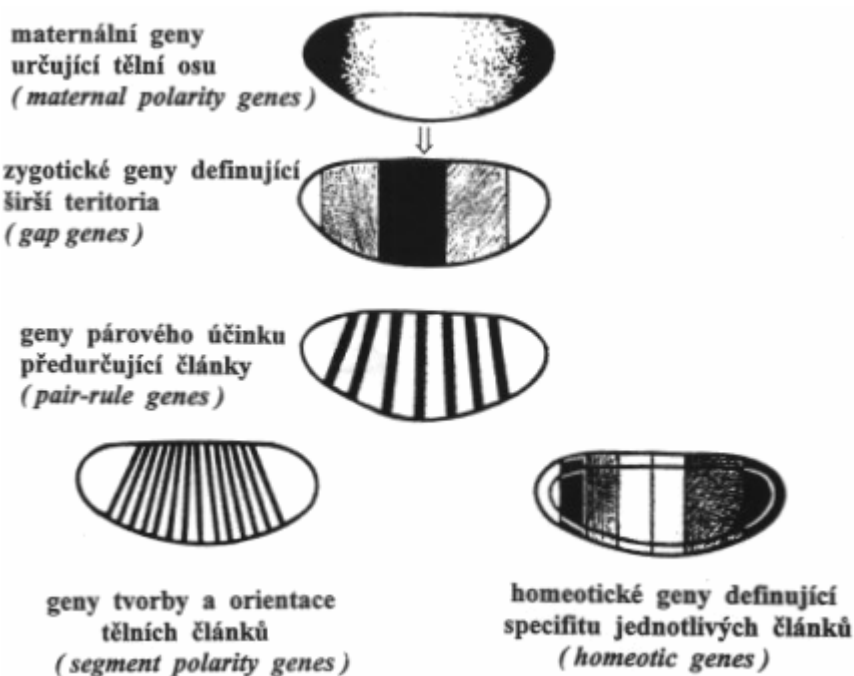
Geny s maternálním účinkem hrají roli při rané diferenciaci embrya u většiny živočišných druhů (např. hlístice, drozofily nebo ježovky), recentně byly identifikovány i u rostlin. Ověření, zda jde vskutku o gen s maternálním účinkem, lze provést na základě křížení mezi recesivními mutanty. Jedinci - homozygotní mutanty - se vyvíjejí zcela normálně, avšak jejich samičky (bez ohledu na genotyp samečka) dávají vznik abnormálním embryím (příslušná mRNA není ve folikulu tvořena a tudíž ani transportována do vyvíjejících se oocytů, obr. 27).

Obr. 27. Obecné schéma projevu dědičnosti recesivní mutace genu s maternálním účinkem u drozofily (podle Albertse et al., 1994). Mutace se projeví na abnormálním vývoji embrya pouze tehdy, když jeho matka je homozygotním recesivním mutantem (m/m).



Produkty maternálních genů spouštějí funkce genů zygotických, které kaskádovým, hierarchickým způsobem řídí další diferenciaci embrya (obr. 28).

Obr. 28. Časová souslednost exprese genů, které hrají klíčovou roli při tvorbě základního tělního plánu drozofily (podle Müllera, 1997). Plán je založen produkty genů s maternálním účinkem, které determinují hlavní tělní osy a indukují expresi zygotických genů velkých mezer. Tyto geny definují širší teritoria a zapínají geny párového účinku, které jsou exprimovány v alternujících prouzcích, které zhruba určují budoucí tělní články. Na tyto geny navazují geny řídící orientaci článků a konečně geny homeotické, které definují specifitu a identitu jednotlivých článků.



A. Geny maternálního účinku:

- geny řídící anterorně-posteriorní polaritu - anteriorní (*bicoid*), posteriorní (*nanos* a *oskar*) a terminální skupina (*torso* a *caudal*)
- geny řídící dorzo-ventrální polaritu (*dorsal* a *toll*)

B. Geny řídící článkování těla:

- geny velkých mezer (*hunchback*, *Krüppel*, *Knirps*)
- geny párového pravidla (*even skipped*, *fushi tarazu*)
- geny polarity článků (*engrailed*)

C. Geny odpovědné za identitu článků - homeotické geny:

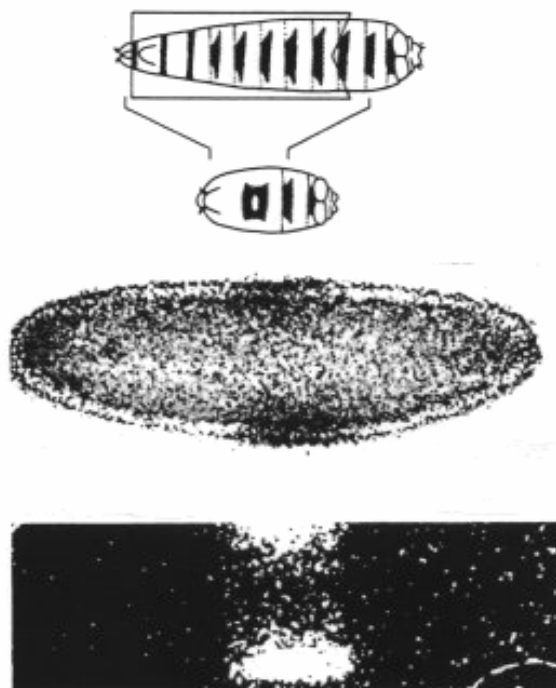
- Antennapedia complex*, články hlavy a hrudi
- Bithorax complex*, články hrudi a zadečku

D. Geny řídící tvorbu kompletních orgánů: *eyeless*, tvorba složeného oka

Geny řídící článkování těla. Při embryogenezi vznikají nejdříve tzv. parasegmenty, které přesně neodpovídají budoucím článkům: jeden parasegment vždy zahrnuje posteriorní část budoucího segmentu a anteriorní část následujícího-posteriorního segmentu. Segmentace probíhá postupně, mnoho proteinů se v ní účastnících jsou transkripční faktory, které nejsou exprimovány podél osy těla rovnoměrně, ale v prostorově omezených expresních zónách. Tyto zóny jsou nejdříve široké, pak se zužují v menší, zato však početnější pruhy (*bands*). Celkem je známo asi 25 genů, které se podílejí na tvorbě budoucích segmentů, dělí se do následujících skupin:

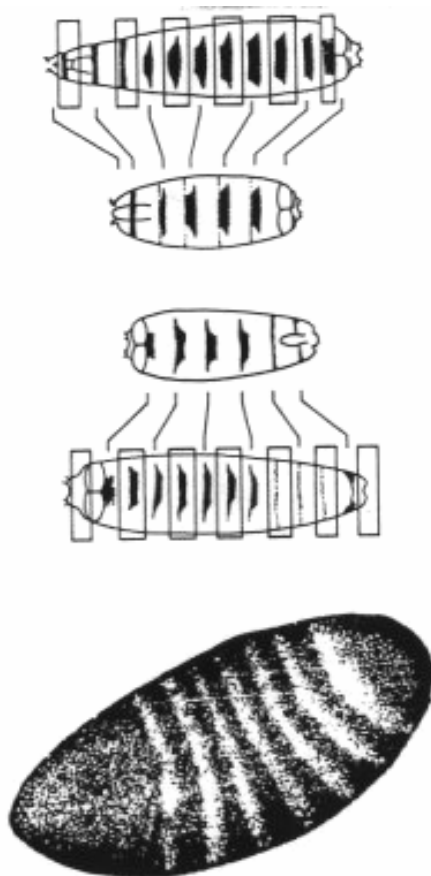
1. Geny velkých mezer - působí v širokých, překrývajících se zónách (př. *hunchback*, *hb* - „zadní hrbol“, *Krüppel*, *kr* - „mrzák“, *Knirps*, *kni* - „panenka“), jejich mutace způsobují chybění několika po sobě následujících skupin parasegmentů (obr. 29). Exprese genů *gap* je následována expresí párových genů.

Obr. 29. Úloha segmentačních genů velkých mezer (*gap genes*) ve vývinu embrya drozofily (podle Goodwina, 1991). Mutantní alely genů velkých mezer mohou způsobovat chybění rozsáhlých částí larválního fenotypu. Znázorněná mutace *Krüppel* vede k delecí celé střední části (několika článků) embrya (nahore). Metodou RNA/RNA hybridizace *in situ* bylo prokázáno, že transkripty genu *Krüppel* se v normálním embryu vyskytují právě v této části těla (dole).



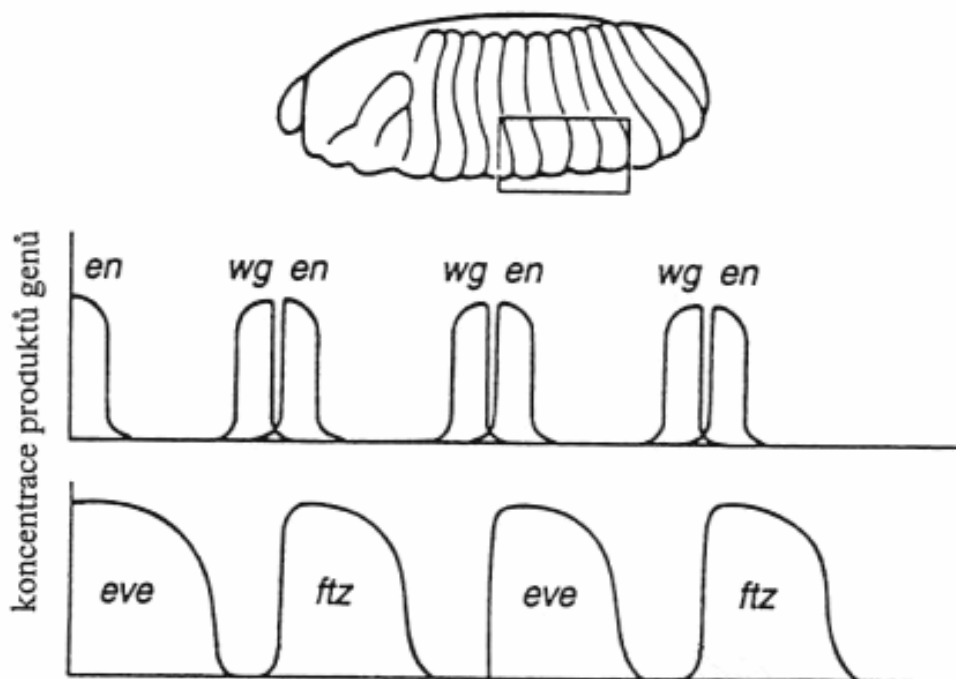
2. Geny párového pravidla - embryo ještě není celularizováno, avšak budoucí segmentace je již přítomna jako opakující se proužky genové exprese v embryonálních jádrech. Párové geny jsou exprimovány v uspořádání sedmi proužků s alternujícími segmenty: vždy jeden vertikální proužek jader gen exprimuje, za ním následující proužek nikoli. Například gen *fushi tarazu* je exprimován v sedmi lichých parasegmentech, zatímco *even skipped* je exprimován v sedmi sudých parasegmentech: embryo bude tedy tvořit celkem 14 článků (obr. 30).

Obr. 30. Úloha segmentačních genů párového účinku (*pair-rule genes*) ve vývinu embrya drozofily (podle Goodwina, 1991). Tyto zygotické geny navazují na projev genů velkých mezer a jejich mutace mohou vést k delecím tělních článků pravidelně rozmístěných vždy v párech. Například mutace genu *even-skipped* („sudě skákající“, nahoře) vede k absenci sudých tělních článků, zatímco mutace genu *fushi tarazu* („liše skákající“, uprostřed) má za následek chybění lichých článků. Detekce transkriptů (RNA/RNA hybridizace *in situ*) genu párového účinku ukazuje typické příčné pruhování embrya, odpovídající expresi v každém druhém článku (dole).



3. Geny polarity segmentů - působí až po ustavení stádia buněčného blastodermu, rozdělují různé segmenty na menší proužky, hrají úlohu ve tvorbě viditelných rozhraní mezi jednotlivými segmenty (obr. 31). Například protein *engrailed*, „zúžený, s dekorovanými okraji“ - se vyskytuje ve 14 úzkých proužcích pouze o několika buňkách, jeho nepřítomnost vede k tomu, že posteriorní část každého segmentu je nahrazena duplikovanou a obráceně orientovanou anteriorní částí segmentu (zrcadlově).

Obr. 31. Časová souslednost exprese segmentačních genů v larvě drozofily (podle Müllera, 1997). Ve výřezu čtyř za sebou jdoucích článků těla (nahore) jsou v grafech vyjádřeny hladiny proteinů kódovaných geny polarity segmentů *en* (*engrailed*, „dekorované okraje“) a *wg* (*wingless*, „bezkrídly“) a geny párového pravidla *eve* (*even-skipped*, „sudě skákající“) a *ftz* (*fushi tarazu*, „liše skákající“). Hranice mezi produkty genů *wg* a *en* určují hranice mezi parasegmenty. Ze schématu vyplývají vzájemné interakce produktů segmentačních genů. Gen *engrailed* je exprimován, jen když buňky obsahují vysoké hladiny proteinů párového pravidla (*even-skipped* nebo *fushi tarazu*). Gen *wingless* je naproti tomu exprimován, když buňky neobsahují žádný produkt genů párového pravidla.



4. Homeotické geny. Tvorba článků těla je řízena produkty segmentačních genů, které mají duální funkci v průběhu embryonálního vývinu. Za prvé, řídí počáteční dělení embrya na parasegmenty. Za druhé, hrají klíčovou roli v organizaci nervového systému v průběhu dalšího vývinu. U hmyzu se však většina tělních článků (segmentů) liší ve velikosti, pigmentaci atd. Tyto segment-specifické znaky jsou specifikovány homeotickými geny. Podobně jako segmentační geny mají homeotické geny dvě hlavní funkce. Od stádia blastodermu se podílejí na specifikaci celkové stavby těla. Později také hrají určitou roli v organizaci nervového systému. Homeotické

Obr. 32. Homeotické transformace jako fenotypové projevy mutací homeotických genů u drozofily (podle Müllera, 1997). Gen *Antennapedia* (z komplexu *ANTP-C*) specifikuje článek mesothoraxu, který nese jediný pár křídel. U dominantního mutanta *Antennapedia* je gen exprimován také v hlavě, což vede k tomu, že části hlavy jsou transformovány ve články hrudi: na hlavě se vytvoří namísto tykadel další pár nohou (obrázek nahoře); články hrudi přitom zůstávají, tj. nesou nohy. Naproti tomu u homozygotní recesivní mutace *Antennapedia* není v hrudi přítomen příslušný protein a namísto nohou se vyvíjejí tykadla. Mutace genů z komplexu *bithorax* mohou vést ke tvorbě druhého páru křídel na třetím článku hrudi, kde se normálně vyvíjejí kyvadélka (obrázek dole); dochází tak k obnovení evolučně původního stavu dvou párů křídel u hmyzu (atavismus).



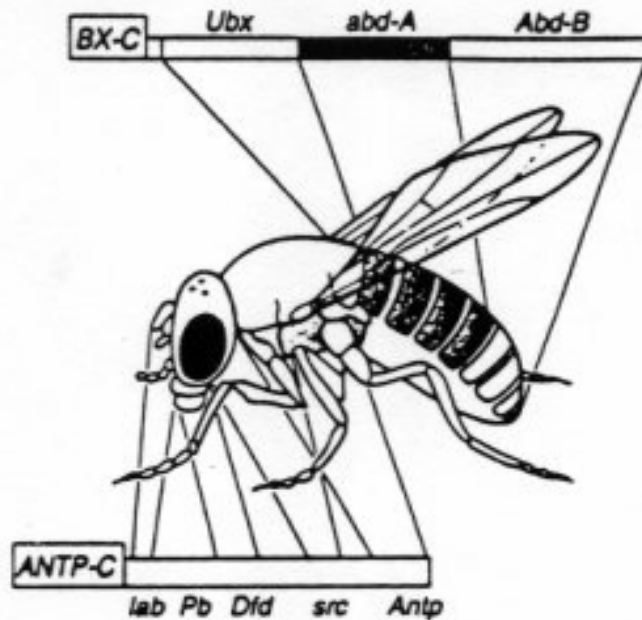
geny (*homeotic selector genes or homeotic master genes*) determinují, jaké speciální články těla se vytvoří. U drozofily jsou dvě skupiny homeotických genů. První se nazývá *Antennapedia complex (Antp-C)*, druhá je *bithorax complex (BX-C)*, oba dohromady tvoří *HOM complex*. Pět genů *Antp-C* je exprimováno v člancích určených ke tvorbě hlavy a hrudi, tři geny *BX-C* jsou exprimovány ve hrudi a zadečku. Defekty v těchto genech mohou vést k **homeotickým transformacím** (obr. 32): morfologicky správná struktura je tvořena na nepravém místě.

Geny *Antp-C* a *BX-C* jsou uspořádány na třetím chromozómu, jeden za druhým. Jejich pořadí na chromozómu zhruba odpovídá pořadí jejich časové a prostorové exprese (obr. 33). Toto **pravidlo kolinearity** (Edward Lewis, 1963) má nejasný význam, ale bylo popsáno i u dalších živočišných kmenů včetně savců. Lewis se domnívá, že všechny homeotické geny vznikly z jednoho ancestrálního genu procesem duplikace a modifikace (důkazem může být přítomnost vysoce konzervativní sekvence DNA - homeoboxu). Homeotické geny jsou exprimovány regionálně a specifikují znaky článků těla. Jejich exprese je řízena *Gap* geny, *Pair-rule* geny, *Polycomb* geny a interakcemi (produkty homeotických genů) mezi sebou.

Při sledování těla drozofily od hlavy dozadu lze prvně najít proteiny *Antp-C*. První proteiny *BX-C* se detekují v zadní části hrudi. V koncové části zadečku je přítomno několik proteinů *HOM* komplexu, nejabundantnější je poslední v pořadí z *BX-C* genů. Zvýšená hladina *BX-C* transkriptů v posteriorní části těla je považována za důsledek klesající koncentrace suprimujících genových produktů, genů *polycomb (Pc)* a *extra sex comb (esc)*. Tyto proteiny jsou abundantnější ve hrudi než v posteriorním abdomenu. *Polycomb* patří mezi „umlčující“ proteiny, tzv. *chromatin-organizing modifier or chromo-domain*. Tyto proteiny se vážou na DNA a způsobují její vyšší kondenzaci (kompresi), mají umlčující účinek. *Polycomb* je drozofilou užíván k umlčování genů v průběhu vývoje, např. suprimuje expresi abdomen-specifických homeotických genů v anteriorní části těla. Defekty v *polycomb* genu mohou mít za následek transformaci segmentů hrudi v segmenty abdominální. Proteiny typu *polycomb* (s chromo-doménou a umlčující funkcí) byly nalezeny i u savců (např. součást fakultativního heterochromatinu chromozómu X) nebo umlčování homeotických genů u rostlin.

Podobně jako *bicoid* protein, většina proteinů kódovaných segmentačními a homeotickými selektorovými geny obsahuje DNA-vazebnou doménu, např. doménu zinkových prstů (*zinc finger domain*, př. *hunchback*) nebo homeodoménu (*helix-loop-helix*) z homeoboxu příslušného genu). Díky těmto doménám tyto proteiny fungují jako transkripční faktory řídící své podřízené geny. V časně embryogenezi je spuštěna hierarchická kaskáda genové aktivace, kterou

Obr. 33. Schematické uspořádání a expresní domény homeotických genů drozofily demonstrující Lewisovo pravidlo kolinearit (podle Müllera, 1997). Homeotické geny (*homeotic selector genes*) jsou lokalizovány na třetím páru chromozómů ve dvou shlucích. Komplex *Antennapedia* (*ANTP-C*) obsahuje pět genů exprimovaných ve člancích hlavy a hrudi, zatímco tři geny komplexu *bithorax* (*BX-C*) jsou exprimovány v hrudi a zadečku. Pořadí genů podél chromozómu odpovídá pořadí oblastí jejich exprese podél antero-posteriorní osy.



časně exprimované geny zapínají nebo vypínají baterie podřízených genů, které mají být exprimovány později.

Molekulární analýza genů podílejících se na struktuře těla u drozofily ukázala, že mnoho z nich sdílí konsensus-sekvenci 180 nukleotidů, která byla nazvána **homeoboxem** (protože byla prvně nalezena u homeotických genů). Nyní byly homeoboxy nalezeny ve všech homeotických genech drozofily a také u mnoha jiných genů podílejících se na tvorbě tělní struktury. Homeobox je umístěn blízko 3' konce genu, který kóduje karboxylový konec proteinového produktu. Proteinová doména kódovaná homeoboxem se nazývá **homeodoména**. Sekvenční srovnávání odhalila dva významné rysy proteinů obsahujících homeodoménu: (1) Tyto proteiny se vyskytují ve všech eukaryotech - kvasinkách, rostlinách a všech kmenech živočichů. (2) Každý druh tvoří několik homeodomén-obsahujících proteinů, které vždy fungují jako transkripční faktory.

Podobnost homeodomén u odlišných druhů a u odlišných proteinů téhož druhu je zarážející. Konzervativnost homeodomény a její funkce jako transkripčního faktoru naznačuje, že hlavní vlastností tohoto proteinu je vazba na specifické sekvence DNA. Homeodoména je charakterizována třemi α -šroubovicemi, I, II a III.

Geny řídící tvorbu kompletních orgánů. U drozofily byl detekován „bezočný“ mutant a klonován příslušný gen, *eyeless* („*the master gene*“). Když byla funkční alela tohoto genu exprimována v imaginálních terčcích, které měly dát vznik tykadlům, nohám nebo křídům, vznikly mouchy s extra očima na tykadlech, nohou nebo křídlech. Je to zřejmě v historii poprvé, kdy se podařilo dosáhnout umělé indukce orgánové tvorby, nikoli transplantací tkáně, ale řízenou ektopickou expresí genu (obr. 34).

Obr. 34. Ektopická exprese intaktního genu *eyeless* v imaginálních terčcích křídél, nohou a tykadél vede ke tvorbě malých přídatných složených očí (podle Müllera, 1997). Byl zkonstruován a vnesen do vajíček chimérický gen *eyeless* tak, aby byl exprimován při metamorfóze v imaginálních terčcích. Terček s tímto konstruktem determinovaný například ke tvorbě nohy ektopicky exprimuje gen *eyeless*, což vede ke tvorbě nohy s přídatným okem. Takto byli vytvořeni i jedinci se 7 páry nadpočetných očí. Tyto oči však nejsou funkční, neboť jejich tvorba není provázána příslušnými nervovými spoji.

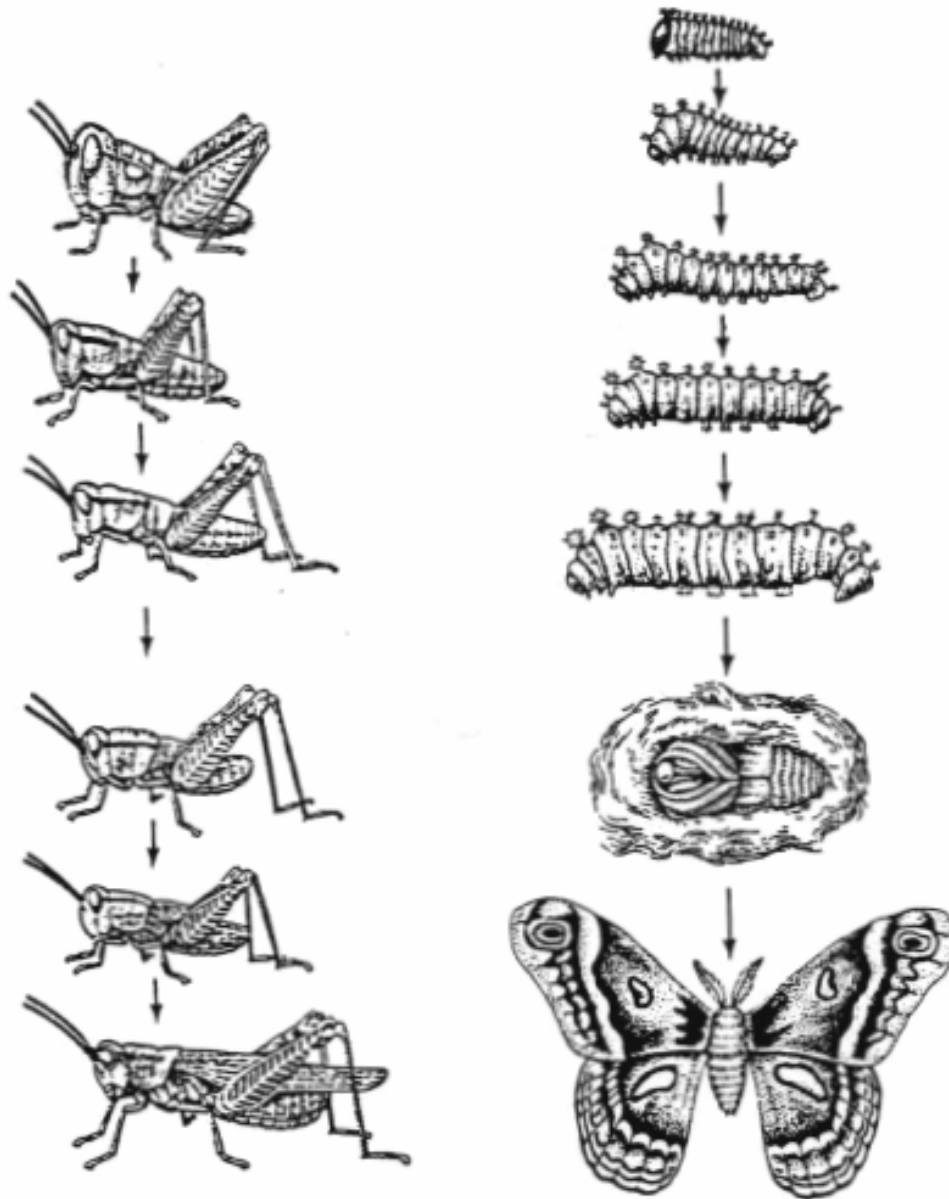


Na příkladu drozofily je demonstrováno, že vývoj je hierarchicky organizovaným procesem. Nejdříve jsou založena základní, globální prostorová uspořádání (*patterns*) a detailnější struktury jsou tvořeny posléze v zákonité souslednosti. Základní uspořádání podél antero-posteriorní osy je dáno proteinovými produkty maternálních genů, které jako první vykazují stabilní distribuci v raném embryu. Potom následuje role produktů genů *gap*, které vykazují účinky jen ve vymezených oblastech. Po nich produkty genů *pair-rule* a *segment polarity* následovně působí ve vymezených oblastech podél anterorně-posteriorní osy, finální roli ve specifikaci článků hrají geny homeotické, popř. i geny spouštějící tvorbu celých orgánů.

U většiny živočišných druhů se z vylíhnutého vajíčka nevylíhne přímo jedinec podobný dospělci, nýbrž juvenilní stádium se postupně - **metamorfózou** - remodeluje. Metamorfóza se představuje zásadní restrukturalizací těla (někdy nazývaná „druhá embryogeneze“) z juvenilního stádia v adultní, často spojené i se změnou způsobu života. Z oplozeného vajíčka se po ukončení embryogeneze vylíhne larva (juvenilní jedinec), která se postupně přetváří v dospělé. Proces metamorfózy obvykle zahrnuje (a) destrukci specifických larválních struktur, (b) adaptaci tkání perzistujících do dospělosti (např. nervový systém) a (c) vývoj nových adultních struktur (např. křídel u hmyzu nebo plic u obojživelníků). U hmyzu rozeznáváme dva základní typy metamorfózy larvy (obr. 35): vývoj **hemimetabolický** (larva, zvaná nymfa, je již podobná dospělci) a vývoj **holometabolický** (larva, zvaná housenka, obvykle dospělci nepodobná, prodělává několik stádií se svlékáním a jejím posledním stádiem je kukla, kde dochází ke dramatické proměně těla; sem patří i octomilka).

Struktury těla dospělé nepocházejí z celého článku, kterému odpovídají, ale ze speciálních skupin buněk, které jsou přítomny už v larvě a které tvoří struktury zvané **imaginální terčky** (*imaginal discs*, obr. 36). Všechny epidermální deriváty dospělé (př. křídla, nohy, hlava, oči, genitálie) jsou odvozeny ze speciálních imaginálních terček (např. jsou tři páry „nožních“ terček, vždy po jednom v každém ze segmentů hrudi, které dají vznik šesti nohám dospělé mouchy). Terčky jsou relativně jednoduchými strukturami: buňky, které je vytvářejí, se stávají předurčenými (*committed*) k tomuto procesu brzy po tvorbě buněčného blastodermu. Na začátku larválního vývoje každý terček představuje skupinu (*nest*, „hnízd“o“) asi 20 buněk, na počátku metamorfózy (v kukle) jich jsou už desetitisíce. Podobně jako segmentační procesy, vývoj např. končetiny z terčku probíhá hierarchicky. Nejdříve nastane v terčku obecná specifikace v terček nohy, pak nastává progresivní vývoj částí nohy a tvorba jejich detailní struktury. Skutečný tvar končetiny však vzniká až při metamorfóze.

Obr. 35. Dva hlavní typy individuálního vývoje u hmyzu: hemimetabolický (druhy s proměnou nedokonalou) a holometabolický (druhy s proměnou dokonalou), podle Gilberta (1988).

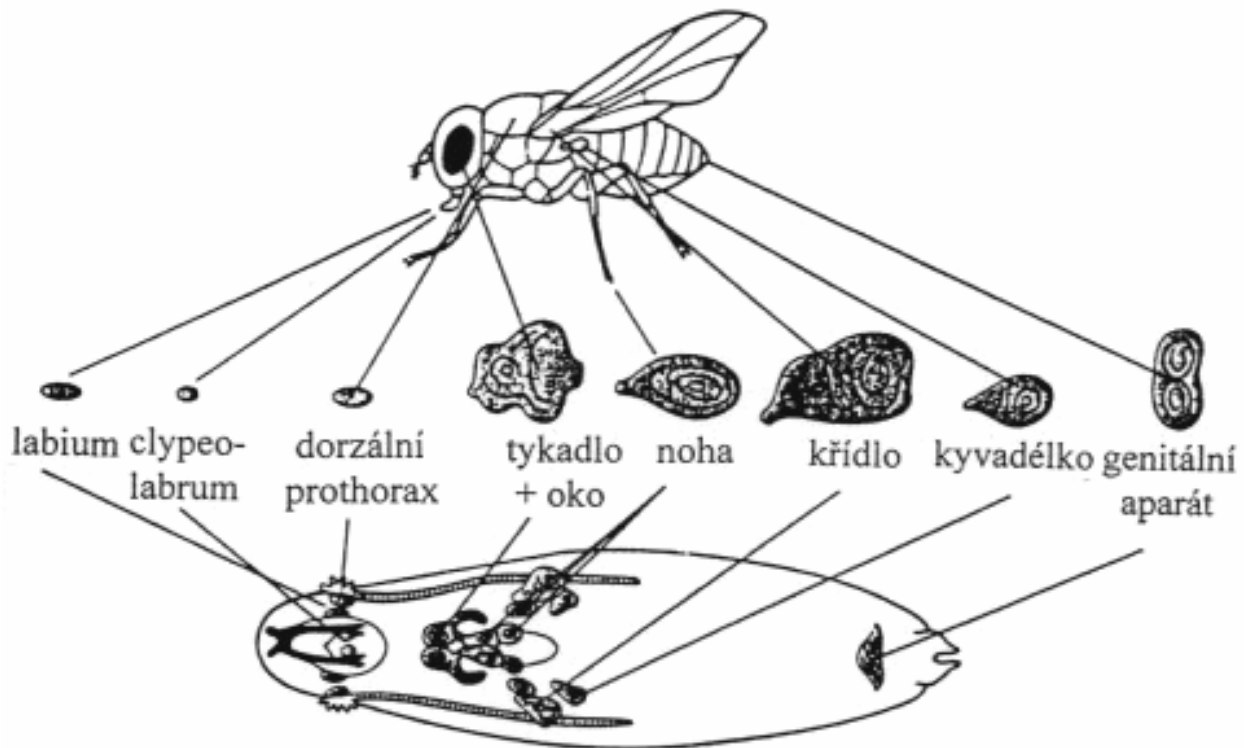


hemimetabolický vývoj
(kobylka)
larva = nymfa

holometabolický vývoj
(motýl)
larva s instary = housenka,
stádium kukly

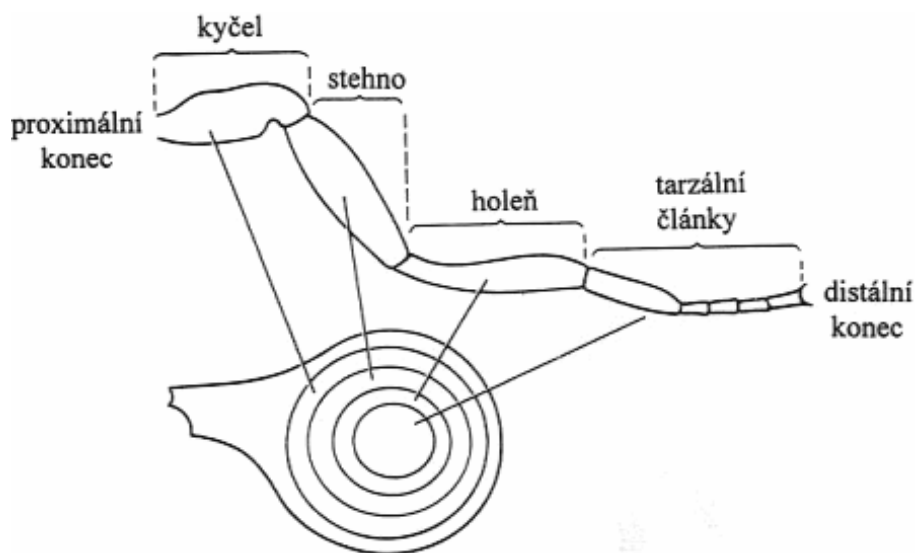
Imaginální terčky je možné transplantovat z jednoho místa larvy do jiného. Je možné též transplantovat fragmenty terček a na základě tvořených struktur konstruovat **mapy osudu oblastí terčku** (*fate maps*, obr. 37). Např. střední část terčku dává vznik distální části končetiny (*tarsal segments*, nárt) a postupně k povrchu terčku (*tibia*, holeň, a *femur*, stehno) až vnější vrstva dá vznik proximální *coxa* (kyčel), první článek končetiny v hrudi. Po metamorfóze larvy nastávají dva možné výsledky: jeden fragment zcela regeneruje, dává vznik úplnému terčku, který tvoří všechny struktury dospělého. Naproti tomu druhý fragment tvoří pouze zrcadlový obraz sebe samého, duplikace. Pokud jsou terčky přenášeny ze staršího embrya do mladšího, a to několikrát

Obr. 36. Imaginální terčky drozofily (podle Müllera, 1997). Uvnitř larvy vznikají terčky (skupiny buněk ve váčcích epitelu) jako základy budoucích orgánů. Tělo imaga je mozaikou expandovaných imaginálních terček. Jednotlivé terčky jsou determinovány ke vzniku odlišných orgánů.



za sebou, a poté se podrobí metamorfóze v kukle, může v některých případech nastat **homeotická transdeterminace** (zřejmě v ní hrají roli homeotické selektorové geny): přechod z jednoho determinovaného stavu na jiný (např. terček křídla dá vznik oku nebo noze). Obvykle si však touto cestou klonované terčky svou determinaci zachovávají: stav determinace je děděn a udržován po mnoho buněčných generací (= **buněčná dědičnost, paměť**). Bylo zjištěno, že části terčku mají po disekci gradient vývojové schopnosti s maximem v oblasti A (tj. přibližně uprostřed terčku), odtud ve všech směrech k periférii terčku klesá. Oblasti terčku s vyššími hodnotami vývojové kapacity mohou regenerovat oblasti s nižšími hodnotami, nikoli však naopak.

Obr. 37. Schematická mapa osudu buněk imaginálního terčku první nohy drozofily zkonstruovaná na základě transplantačních studií (*fate map*; podle Goodwina, 1991). Vnitřní vrstvy buněk terčku jsou determinovány ke tvorbě distálních částí nohy, zatímco vnější vrstvy buněk dávají vznik částem proximálním. Po experimentálním odstranění části terčku dochází buď k jeho úplné regeneraci (a posléze i ke tvorbě kompletního orgánu) nebo k ektopické regeneraci, kdy fragment terčku vytvoří jen svůj zrcadlový duplikát. Sériové přenášení imaginálních terčků do mladších embryí může vést k metamorfóze terčku z jednoho stavu determinace do jiného stavu podle své nové polohy (např. místo nohy se vytvoří křídlo). Tento jev se nazývá transdeterminace a souvisí se změnou exprese homeotických genů.



Drozofila se stala objektem biologických studií již před sto lety (Thomas Hunt Morgan) a dnes je základním modelem molekulární i vývojové genetiky (box 14).

Box 14. Charakteristika modelu octomilky, *Drosophila melanogaster*.

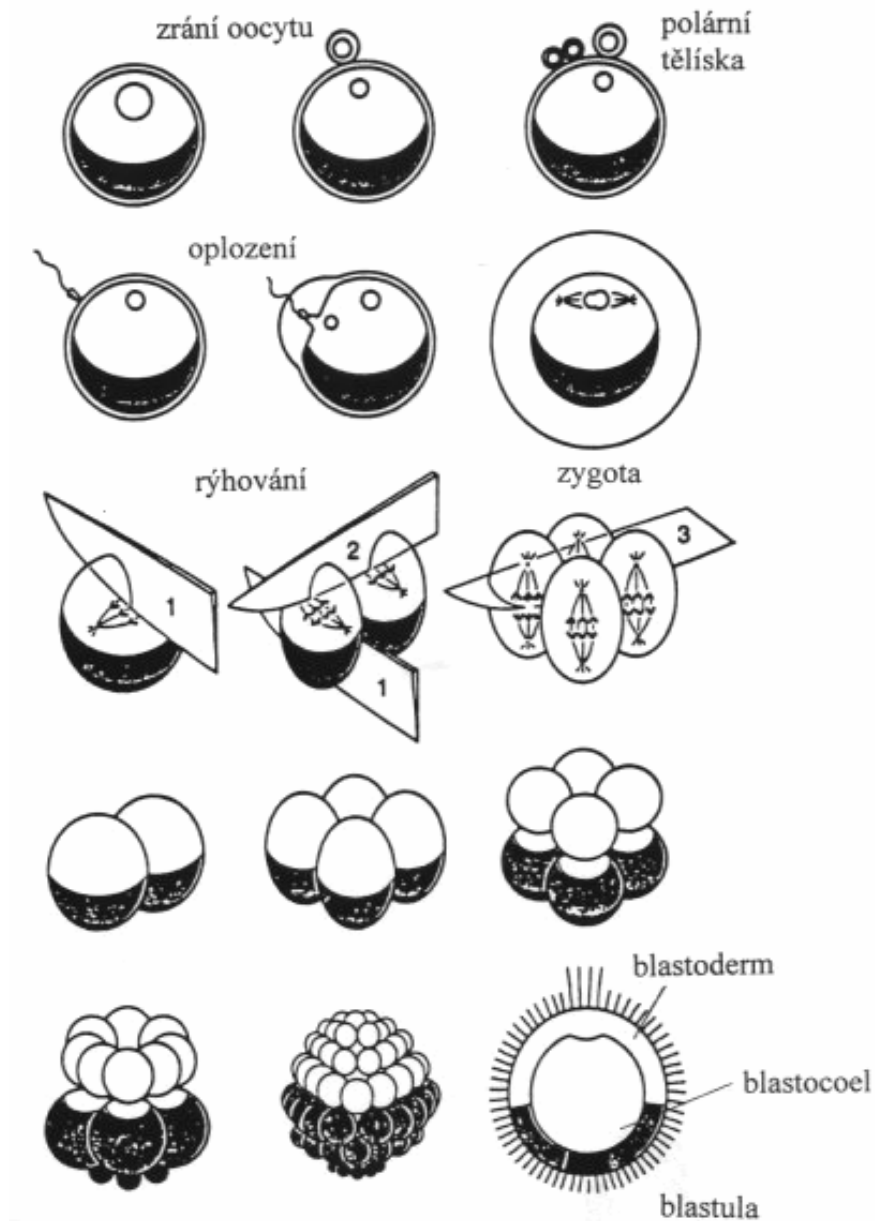
- n** základní model genetiky eukaryot, embryogeneze, studia maternálních a homeotických genů, polytenních chromozómů, determinace pohlaví (X/A), pozitivní kompenzace dávky genů nesených chromozómem X a pozičně-variegačního efektu (PEV)
- n** má 4 páry chromozómů (samičky $2n = 8$, XX, samečci $2n = 8$, XY), rekombinace probíhá jen u samiček, relativně malý genom ($C = 1,65 \times 10^8$ pb)
- n** vývoj je velmi specifický, stala se modelem díky širokému zázemí mutační genetiky, krátkému životnímu cyklu a snadné manipulaci
- n** k oplození dochází v oviduktu, vajíčko je kladeno jako diploidní, rýhování je superficiální (mnohojaderné syncytium, později syncytiální a buněčný blastoderm)
- n** vajíčko je vlivem genů s maternálními účinky polární, raná embryogeneze je řízena maternálními produkty (mRNA), pak se hierarchicky uplatňují geny zygotické
- n** na posteriorním pólu tvoří jádra záhy první odlišené buňky (pólové, zárodečné), které se vyvinou v oocyty nebo spermatozoa
- n** embryo se proměňuje v mnohovrstevnou strukturu procesy ohýbání, expanze a kontrakce: segmentované stádium zárodečným proužků, vzniká základní plán těla: anterorně-posteriorní osa, dorzálně-ventrální osa a článkovaná struktura
- n** na přídi těla vzniká část hlavová (H), pak odlišné články hrudní (T1 až T3) a zadečkové (A1 až A8), na konci kaudální (C)
- n** vývoj vajíčka přes larvu se čtyřmi instary a kuklu (metamorfóza), základy orgánů vznikají v imaginálních terčcích

2.5 Ježovka, *Lytechinus variegatus*

Mořská ježovka (Echinodermata) je historickým modelem vývojové biologie: již koncem minulého století na ní byla prováděna první fertilizace vajíček spermii. Ježovka je dodnes využívána ke studiu procesů oplození a rýhování (včetně mikrochirurgických zásahů), nikoli však ke studiím genetickým (dlouhá generační doba, obtížná kultivace larev). Vajíčka jsou malá a průhledná a protože oplození je vnější, je možné (vysoce synchronizovaný) vývoj vajíček pozorovat přímo pod mikroskopem. Vývoj trvá 1 až 2 dny, kdy se z vajíčka vylíhne larva. Vnitřní struktura vaječné buňky je polarizovaná podél animálně-vegetální osy. Animální pól je přitom ten konec vajíčka, kudy z něj po meióze vycházejí polární buňky (sesterské buňky vajíčka), které posléze zanikají. K tomu dochází (na rozdíl od savců) již v mateřském vaječníku. Haploidní jádro vaječné buňky se nachází vždy poblíž animálního pólu. Vaječná buňka se aktivuje vstupem spermií. Začínají první buněčná dělení (rýhování), kdy z vajíčka postupně vznikají menší buňky, aniž by došlo k větším změnám celkového objemu. Vajíčko se podrobuje synchronnímu, radiálnímu, holoblastickému rýhování až do stádia blastuly. Buňky se dělí každých 20 až 30 minut a embryo tak prochází stádii s 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 buňkami (obr. 38). Rýhování u ježovky dávají obecně vznik nestejným dceřiným buňkám (neekvální rýhování): větším makromerám a menším mikromerám. Poté se buňky přeskupí a vytvoří vnější epitelovou vrstvu (blastoderm) uzavírající centrální dutinu (blastocoel): vzniká obrvená blastula.

Gastrulace probíhá v několika fázích. Začíná imigrací původních mikromer od vegetálního pólu do centrální dutiny amébovitým pohybem. Imigrující buňky vytvářejí primární mezenchym: většina z nich splývá v syncytia a tvoří larvální skelet (sekretují krystaly uhličitanu vápenatého). Mikromery jsou emitory indukčních signálů. Když jsou transplantovány do jiného místa blastodermu, indukují sousední buňky k invaginaci. Invaginace představuje druhou fázi gastrulace, při které se vytváří prvostřevo (archenteron). Invaginace je radiálně symetrická okolo animálně-vegetální osy. Buňky archenteronu se rozšiřují podél blastocoelu a na svém vrcholu jsou transformovány ve filamentózní buňky (filopody), až se dostanou skrze blastoderm, kde vytvářejí definitivní ústa. Prvoústa (blastopor), odkud začala invaginace, se stanou řitním otvorem (anus). Ježovka (podobně jako obratlovci) tak náleží ke skupině živočichů druhoústých (Deuterostomia). Embryogeneze je ukončena vylíhnutím průhledné, bilaterálně symetrické larvy

Obr. 38. Časný embryonální vývoj mořské ježovky od oplození vaječné buňky až ke tvorbě blastuly (podle Müllera, 1997). První dvě roviny rýhování procházejí animálně-vegetální osou, proto se nazývají poledníkovým štěpením. Rovina třetího dělení je k nim kolmá, toto rýhování je tedy ekvatoriální. Další dělení jsou asynchronní a dávají vznik nestejným buňkám (mikromery, makromery a mezomery). Nakonec buňky k sobě silně přilnou a vytvoří vrstvu epitelu (blastoderm) s centrální dutinou (blastocoel).



(zv. *pluteus*). Transformace larvy v pentamerně symetrickou ježovku představuje celkovou rekonstrukci těla. Tato rekonstrukce je podobná holometabolické metamorfóze u hmyzu a při tvorbě orgánů se uplatňují imaginální terčky.

Na blastomerách ježovky provedl Hans Driesch historicky významné experimenty. Když separoval první dvě blastomery ve dvojbuněčném stádiu, každá blastomera dala vznik úplné (i když poněkud menší) larvě. Vznikla tedy monozygotická dvojčata. Podobně byly separovány blastomery ve čtyřbuněčném stádiu a vznikla identická čtyřčata. Tato bisekce je možná až do stádia blastuly (pokud je řez proveden podél animálně-vegetální osy). Svými mikrochirurgickými pokusy na raných embryích ježovky Hans Driesch prvně prokázal, že blastomery mají schopnost regulace. Tím vyvrátil vývojové teorie mechanicizmu, *embrya nejsou stroje a jsou schopna regulace*. V 8-buněčném stádiu blastulace je možné rozdělit embryo v rovníkové rovině kolmé k animálně-vegetální ose. Části embrya dávají vznik odlišným strukturám. Animální polovina se vyvine v dutou kouli podobnou blastule (*dauerblastula*), avšak tato není schopna vytvořit archenteron (obr. 39). Vegetální polovina archenteron tvoří, avšak *pluteus* není zcela normální (nemá ústa a jeho ramena jsou kratší). Poledníkové řezy procházející animálně-vegetální osou dávají vznik shodným, dokonalým larvám. Na základě těchto pokusů a dále přemísťováním cytoplazmy tak bylo zjištěno, že za odlišné vývojové potenciály buněk jsou odpovědné cytoplazmatické komponenty. Různé oblasti vaječné buňky a časné blastuly ježovky tedy zřejmě obsahují odlišné sady maternálních genových produktů: odlišné oblasti blastuly dávají vznik různým částem larvy, *pluteus*. Tento závěr je interpretován teorií **sekvenční indukce**: při gastrulaci jsou vegetální blastomery determinovány ke tvorbě mezodermu původní lokalizací determinant ve vajíčku.

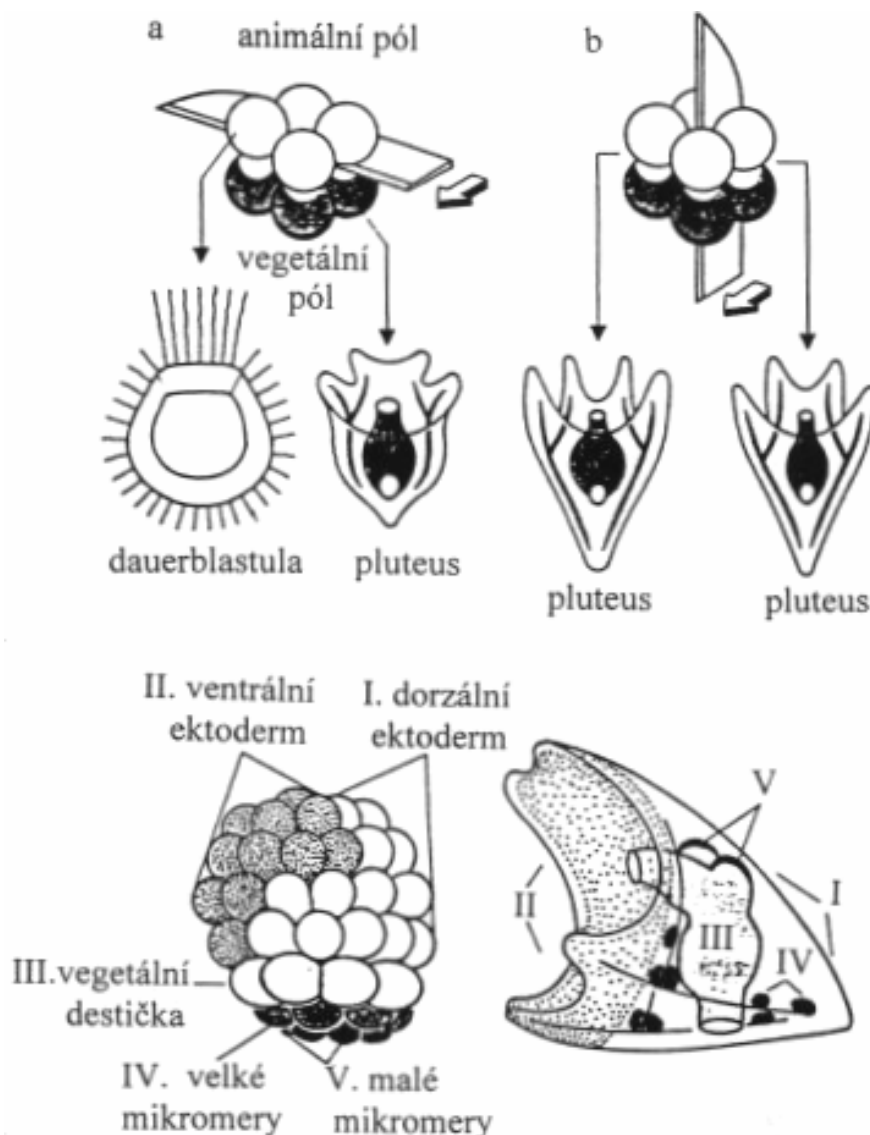
Sven Hörstadius studoval vývojové potenciály buněk embrya ježovky podél její animálně-vegetální osy: separoval vrstvy buněk transverzálními řezy, zaměřoval jejich pozice a sledoval interakce skupin buněk. Výsledky těchto pokusů vedly k vyslovení teorie **antagonistických gradientů**: jednotlivé blastomery se vyvíjejí podle lokálního poměru animálních a vegetálních morfogenů. Podle této teorie se podél animálně-vegetální osy vytvářejí dvě fyziologické aktivity jako zrcadlové gradienty. Chemická povaha těchto látek (morfogenů) u ježovky nebyla dosud objasněna. Morfogen animálního pólu způsobuje „animalizaci“: determinaci buněk ke tvorbě rysů animálního pólu, zatímco morfogen vegetálního pólu má tendenci „vegetalizovat“ blastomery.

Obr. 39. Osudy experimentálně rozdělené časné blastuly ježovky (podle Müllera, 1997). Těmito pokusy (obrázek nahoře) demonstroval Hans Driesch vyvrácení vývojové teorie mechanicizmu: „embrya nejsou stroje a jsou schopna regulace (tj. regenerace částí raného embrya)“.

(a) Ekvatoriální řez kolmý k animálně-vegetální ose vede ke vzniku dvou nestejných embryí (u *dauerblastuly* vede absence buněk vegetálního pólu k neschopnosti tvorby archenteronu).

(b) Poledníkový řez procházející animálně-vegetální osou vede ke vzniku dvou shodných, dokonalých embryí (zvaných *pluteus*).

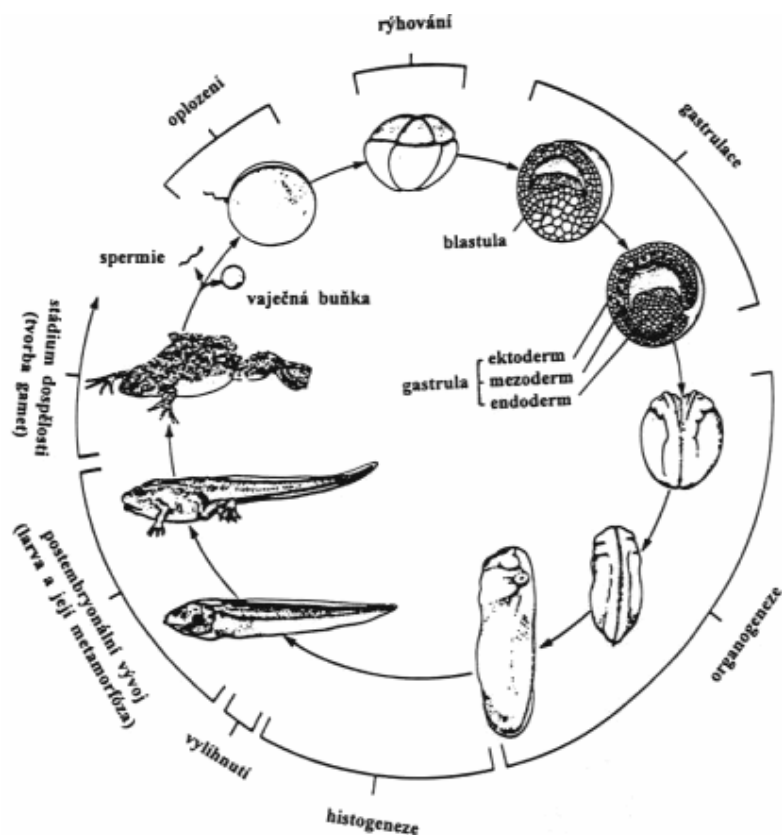
Různé oblasti vaječné buňky a časné blastuly ježovky obsahují odlišné sady maternálních genových produktů (obrázek dole): odlišné oblasti blastuly (vlevo, I. až V.) dávají vznik různým částem larvy (vpravo).



2.6 Obojživelníci, *Amphibia*

Obojživelníci představují archetyp vývoje obratlovců. Jsou často jejich vývojovým modelem, protože mají velká a snadno přístupná vajíčka s bohatým žloutkem, dobře studovatelná embrya a larvy a relativně vysokou regenerační schopnost (obr. 40).

Obr. 40. Životní cyklus obojživelníků na příkladu žáby (podle Kalthoffa, 1996). Základními obdobími života jsou (vnější) oplození, embryogeneze (rýhování, gastrulace, organogeneze a histogeneze), vylíhnutí larvy (pulce) a její postupná proměna v dospěléce. U žab dochází v průběhu života ke změně ekologické niky a způsobu dýchání: pulci žijí ve vodě a dýchají žábrami, dospělci jsou suchozemští a dýchají plicemi, které se tvoří v průběhu metamorfózy.

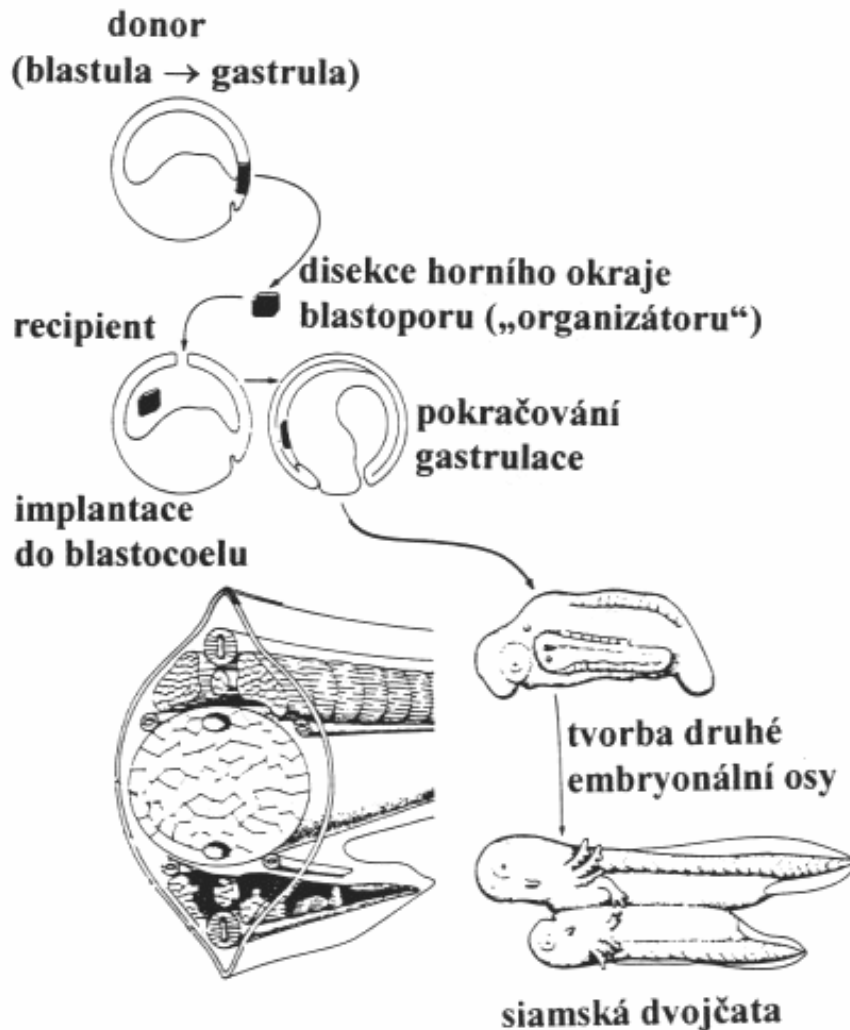


Dříve se k mikrochirurgickým zásahům používala obvykle vajíčka čolků, dnes převažuje laboratorně kultivovaná africká žába drápatka (*Xenopus laevis*). U obojživelníků začíná meióza ve vaječniku mladé samičky a trvá několik měsíců, je však v profázi na dlouhou dobu přerušena a během toho se oocyt podrobuje extenzivnímu růstu. V jádrech oocytů je vysoká transkripční aktivita, rDNA se podrobuje amplifikaci a vznikají četná jadérka. Na rozdíl od drozofily, kde je polarita založena účinkem maternálních genů, u vajíčka drápatky jsou patrné jen dvě odlišně zbarvené hemisféry: černá animální a bílá vegetální. Spermie může vstoupit pouze do animální hemisféry, přesné místo je však náhodné. Po indukci spermií a ovlivněním gravitací dochází v oplozeném vajíčku k aktivním pohybům, které vedou k asymetrickému uspořádání cytoplazmatických komponent (včetně maternálně uložených mRNA). Oplozené vajíčko se vyvíjí mimo těla matky, dává dělením vznik malé kulovité struktury, blastule (holoblastické rýhování vede k separovaným buňkám, blastomerám). Invaginací přechází postupně blastula v gastrulu (místo vchlípení se nazývá blastopor) se třemi zárodečnými listy (**ektoderm, mezoderm a endoderm**). První známkou podélné osy (**bilaterální symetrie**) vyvíjejícího se embrya je záhyb, který se vyvine v neurální záhyb dávající postupně vznik nervovému systému (stádium **neuruly**).

Pokud se experimentálně provede úplné oddělení blastomer, mohou vzniknout dvě nová embrya. Schopnost částí embryí tvořit celé organizmy se nazývá **regulace** (je možná i u jiných druhů, např. ježovky nebo savců). Je dalším důkazem existence **morfogenních polí** (analogie například s magnetickým polem). Když se provede transplantace tkáně z jednoho místa na jiné (nebo na jiného jedince), tkáň v novém prostředí obvykle zcela asimiluje podle místa implantace. Pokud se však provede přenos tkáně okraje blastoporu na jiné místo (vzdálené od původního blastoporu), vznikne na tomto místě nová, druhá embryonální osa: přenesený blastopor indukoval přeměnu hostitelské tkáně v druhé, „siamské“ embryo (objev **embryonální indukce**, Mangoldová a Spemann 1924; obr. 41). Tkáň blastoporu (obecně organizátoru nebo induktoru) je tedy determinována, podobně jako sub-hypostomální oblast u nezmaru. Naopak buňky v oblasti hostitelské musí být schopny indukci se podrobit, tj. musí být k tomu kompetentní.

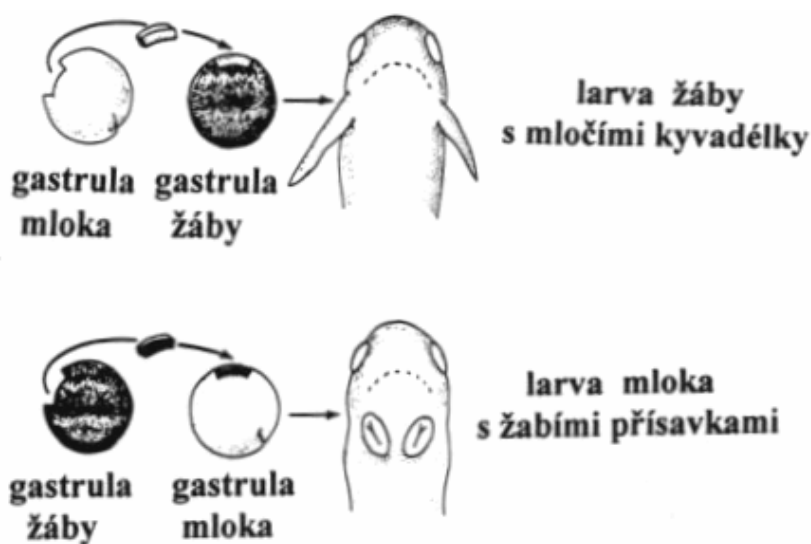
Odlišným příkladem embryonální indukce je transplantace části blastuly nebo neuruly z jednoho druhu obojživelníka na jiný druh (pulci čolků versus žab). Fragment budoucí epidermis neuruly čolka je transplantován do budoucí oblasti úst žáby. Další vývoj tohoto transplantátu je determinován novou pozicí podle recipienta: dojde k vývinu úst. Tato ústa však budou typu donora (čolčí typ úst), neboť jde o buňky s genotypem čolka. Analogický výsledek

Obr. 41. Experimentální indukce sekundárního embrya transplantací horního okraje prvoúst u čolka (podle Müllera, 1997). Okraj prvoúst přenesený z pozdní blastuly tmavě pigmentovaného druhu čolka (*Triturus taeniatus*) do blastocoelu bílého čolka (*T. cristatus*) nevedl k adaptaci tkáně donora podle nového prostředí recipienta, nýbrž k její invaginaci a tvorbě nové osy (vznik siamských dvojčat). Sekundární embryo je přitom bílé pigmentované, neboť je tvořeno především tkání hostitele. Transplantovaná tkáň donora se chovala jako organizátor: indukovala buňky recipienta, aby změnily svůj vývojový program (objev embryonální indukce: Hilde Mangoldová a Hans Spemann, 1924).



má i reciproký experiment: transplantát epidermis žáby se podrobí vlivům místa implantace u čolka a vznikne chiméra: čolek s žabím typem úst (obr. 42). Tyto experimenty potvrzují význam **poziční informace** (*development according to location*). Druhově specifické struktury tedy nevznikají přesně na základě indukujícího stimulu, ale na základě ektodermální reakce (odpovědi). Induktor je tedy asi relativně nespecifický stimul u obou druhů a vyvolává reakci v ektodermu, která je pro daný druh charakteristická. Tento jev se nazývá **evokace**: organizace procesů, které dávají vznik zvláštním prostorovým strukturám, ve kterých jsou zahrnuty genové aktivity specifické pro daný druh (= permisivní indukce).

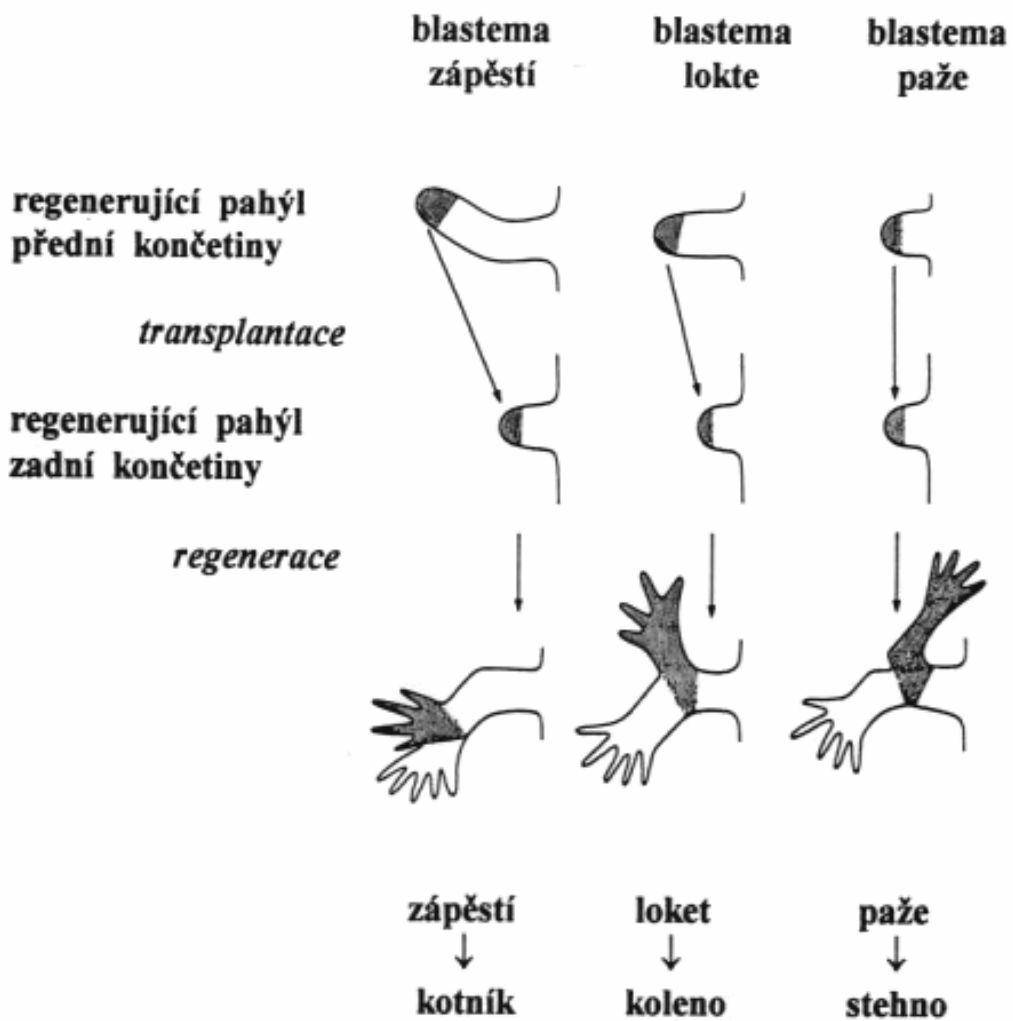
Obr. 42. Transplantační experimenty mezi obojživelníky demonstrující význam poziční informace a genetickou specifitu indukce (podle Gilberta, 1988, a Goodwina, 1991). Larva žáby (pulec) tvoří normálně malá bezzubá ústa s přísavkami, zatímco larva mloka má široká ústa se zuby a kyvadélky. Pokud je extirpována část ektodermu neuruly žáby a transplantována do oblasti neuruly mloka, která dává vznik ústům, dojde u larvy mloka ke vzniku typických žabích úst s přísavkami. Reciproká transplantace má za následek vývin žabího pulce s mločími ústy. Tyto experimenty dokazují, že mlok může indukovat tvorbu žabích úst v žabím ektodermu a *vice versa*. Druhově specifické struktury tedy nevznikají následkem druhově specifického stimulu, nýbrž na základě reakce ektodermálních buněk (genetická specifita indukce).



Pokud je embryo obojživelníka inkubováno v alkalickém roztoku soli (pH 10), dojde k jeho disociaci, při nižší alkalitě (pH 8) dochází k opětné agregaci buněk. Na počátku je agregace náhodná, ale následnými buněčnými pohyby dochází k roztřídění jednotlivých typů buněk podle jejich původní pozice. Když jsou například smíchány disociované buňky ektodermu a mezodermu, po jejich agregaci *in vitro* se postupně vytvoří centrum mezodermálních buněk a kolem něho vrstva buněk ektodermálních. Tento jev **roztřídění buněk** (*sorting out*) je vysvětlován rozdílnou adhezivitou jednotlivých buněčných typů. Hypotéza úlohy diferenciální buněčné adheze v morfogenních procesech *in vivo* byla experimentálně ověřena pokusy s regenerací a transplantací končetin mloka. Jestliže je amputována končetina mloka, pahýl vytváří masu nediferencovaných buněk (regenerační blastema), která posléze diferencuje v chybějící část končetiny. Ať je amputace provedena na jakékoli části končetiny, vždy vzniká z blastemy pahýlu právě jen odstraněná část. Blastema v každém takovém místě tedy musí znát svou pozici v končetině. Jestliže jsou izolované buňky odlišných blastem kultivovány společně *in vitro*, vytvářejí jednotnou buněčnou masu, ve které však jednotlivé typy buněk zůstávají prostorově separovány: buňky z blastemy proximální části končetiny obklopí buňky blastemy odvozené z distálnější části. Toto uspořádání naznačuje, že existuje klesající gradient buněčné adhezivity od distální k proximální části končetiny. Když je přenesena blastema ze zápěstí, lokte nebo paže přední končetiny do spoje mezi pahýl a blastemu regenerujícího stehna zadní končetiny, buňky blastemy transplantátu se posouvají v průběhu regeneračního procesu, až dosáhnou pozice v recipientní končetině, která odpovídá místu původu v přední končetině, a regenerací vytvoří původní chybějící část (obr. 43). Buňky blastemy transplantované z přední končetiny tedy migrují do oblasti zadní končetiny, kde mají buňky podobnou adhezivitu. Za odlišné buněčné adhezivity jsou zřejmě odpovědné molekuly specifických látek na buněčném povrchu (*cell adhesion molecules*).

V roce 1958 byla v Oxfordu izolována mutantní drápatka, v jejíchž buňkách se tvoří pouze jediné jadérko (namísto dvou u divokého typu). Tento mutant je životaschopný, protože jediná sada rDNA genů (lokalizovaná v oblasti organizátoru jadérka na jednom chromozómu) je dostatečná ke tvorbě ribozómů. Křížením mezi mutantními jedinci s jedním jadérkem segreguje potomstvo v poměru 1 : 2 : 1 (dvoujadérová : jednojadérová : bezjadérová individua). Bezjadéroví jedinci kupodivu přežívají bez rDNA genů až do stádia pulců (kdy zahynou). Je to způsobeno tím, že oocyty získávají velkou zásobu rRNA ještě před meiózou. Tento závěr platí i pro další genové produkty: oocyty obojživelníků získávají z mateřského těla všechny mRNA,

Obr. 43. Transplantační experimenty regenerujících částí končetin mloka demonstrující hypotézu rozřídění buněk (*sorting out*) na základě gradientu jejich vzájemné adhezivity (podle Goodwina, 1991). Po amputaci končetiny vzniká v místě řezu masa nediferencovaných buněk (*regeneration blastema*), jejichž dělením a diferenciací vzniká právě jen chybějící část končetiny. Po přenosu buněk regenerační blastemy ze zápěstí, lokte nebo paže přední končetiny do regenerujícího pahýlu zadní končetiny vzniká z transplantátu vždy odlišný sektor nohy v závislosti na místě původní extirpace přední nohy. Buňky blastemy tedy znají svou původní polohu a tuto si „pamatují“ i po přenosu na jiné místo těla (původní experimenty Davida Stocuma, 1988).

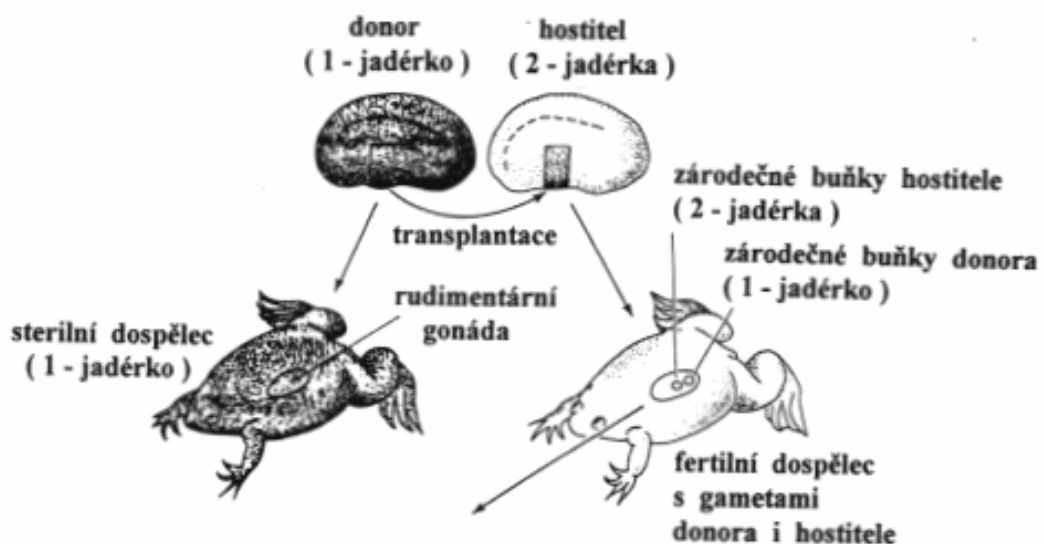


kteřé jsou třeba k embryogenezi, aniž by byl využíván vlastní genom embrya. Transkripce začíná až před počátkem tvorby gastruly. Mutantní jednojadéřková drápatka byla také využita k demonstraci a lokalizaci **primordiálních zárodečných buněk** v endodermu embrya (mutace zde byla využita jako genetický marker). Byla odstraněna část ventrálního endodermu (oblast obsahující budoucí zárodečné buňky) z neuruly jednojadéřkové žáby a transplantována do endodermu neuruly žáby divokého typu (dvoujadéřkové, obr. 44). Po operaci byly donorové žáby normálního fenotypu, avšak sterilní, protože ve stádiu neuruly již embryo nemůže produkovat nové primordiální zárodečné buňky jako náhradu za buňky odstraněné. Hostitelské žáby s implantátem byly plně fertiľní a tvořily meiózou gamety jak původem z vlastních primordiálních buněk (jednojadéřkové), tak i z transplantátu (jednojadéřkové a bezjadéřkové). Když byly tyto žáby kříženy s divokým typem, objevily se v potomstvu jedinci se dvěma jádřky (z gamet odvozených z primordiálních buněk recipienta nebo donora) nebo s jedním jádřkem (původem z donorové tkáně).

Buňky dospělých obojživelníků (s výjimkou některých buněčných linií, zejména buněk kmenových) již nejsou schopny dělení ani diferenciace. Jejich jádra si však pluripotenci obvykle zachovávají. Prokázal to John Gurdon svými experimenty s **přenosem jader** u drápatky. Provedl destrukci jádra recipientní vaječné buňky UV-ozářením a mikroinjekcí do něj vpravil jádro z buňky střevního epitelu pulce, mutanta markerovaného jediným jádřkem (obr. 45). V některých případech vskutku došlo k aktivaci vaječné buňky, jejímu normálnímu rýhování a posléze i ke tvorbě pulce a fertiľní žáby s jediným jádřkem (tedy s genotypem donora). Vajíčka, u kterých docházelo pouze k parciálnímu rýhování byla použita pro opětovný přenos jader. Jádra jejich dělících se buněk byla využita jako donory ke transferu do nových, čerstvě enukleovaných buněk. Touto cestou bylo dosaženo podstatného zvýšení úspěšnosti izolace úplných jedinců po transplantaci jader. Při nejmenším některá somatická jádra tak zůstávala pluripotentní nebo totipotentní. Gurdon i jiní badatelé však pozorovali, že vývojová schopnost buněčných jader klesá s věkem donora. Znamená to, že genetický materiál buněčného jádra by se mohl postupně podrobovat ireverzibilním změnám (např. ztrátám určitých částí jader nebo chromozómů).

Pionýřské experimenty s buněčným klonováním u obratlovců byly tedy prvně realizovány na žabích vajíčkách, neboť jsou velká a snadno manipulovatelná, oplození je vnější, regenerační schopnost vysoká a laboratorní kultivace žab je snadná (box 15). Dodnes jsou vajíčka *Xenopus* a její buněčná jádra hojně využívána ke studiu struktury a funkce chromatinu.

Obr. 44. Demonstrace primordiálních zárodečných buněk v časném endodermu embrya žáby (podle Gilberta, 1988). Část ventrální tkáně neuruly, kde jsou přítomny prekursori zárodečných buněk, mutantního donora (tvořícího ve svých jádrech pouze jediné jadérko) byla přenesena do recipienta divokého typu (se dvěma jadérky). Po operaci byly žáby donora sterilní, neboť zárodečné buňky byly odstraněny a neurula již není schopna si vytvořit nové. Hostitelská žába však byla fertilní a vytvářela meiózou gamety buď s žádným nebo jedním jadérkem (typ donora), nebo s jedním jadérkem (typ hostitele, tj. vlastní). Křížením této chimérické žáby s divokým typem vzniká potomstvo s jedním nebo dvěma jadérky (původní experimenty, Blackler 1966).



chimérická žába -	tkáň donora :	tkáň hostitele :
	meióza ↓	↓
	1 - jadérko	0 - jadérko
		1 - jadérko

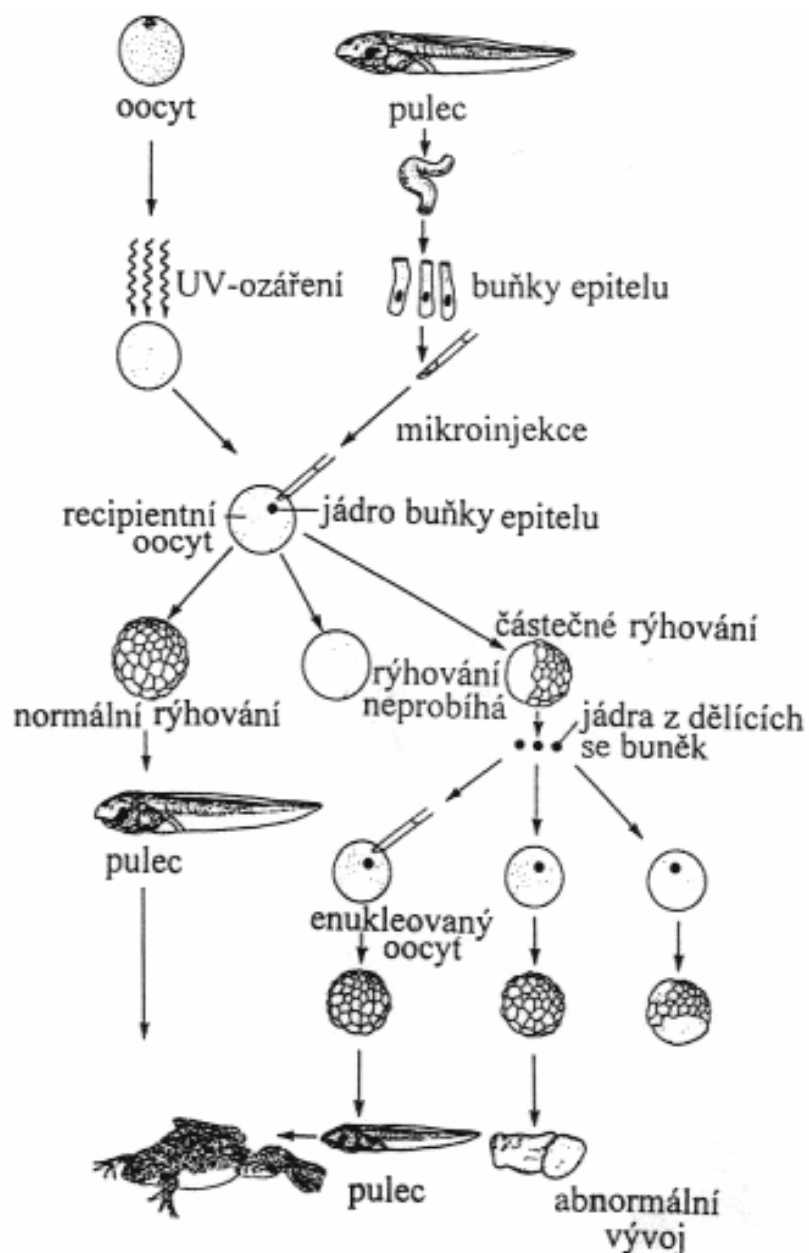
potomstvo:

wild-type

partner ®	1 - jadérko :	<u>2 - jadérka</u>	<u>1 - jadérko</u>	<u>2 - jadérka</u>
	gamety			

Obr. 45. Experimentální přenosy jader u drápatky, *Xenopus laevis* (podle Kalthoffa, 1996).

Recipientem byla neoplozená vaječná buňka (vlevo nahoře), u které bylo UV-zářením destruováno jádro. Donorem somatického jádra byla buňka střevního epitelu mutantního pulce, markerovaného jediným jadérkem (namísto dvou u divokého typu). Hostitelská vajíčka se v některých případech rýhovala normálně (za vzniku normálního dospělého), jindy abortovala nebo se rýhovala jen částečně. Z parciálně se rýhujících vajíček byla jádra opět přenášena do enukleovaných vaječných buněk a někdy docházelo k jejich normálnímu vývinu. Ve všech případech však vzniklé žáby měly genotyp donorové somatické buňky: ve svých jádrech vytvářely jen jediné jadérko. Původní experimenty prováděl v roce 1962 John B. Gurdon.



Box 15. Charakteristika modelů obojživelníků: žáby (*Xenopus*) a ocasatí (čolci a mloci).

- ◆ velká a snadno přístupná vajíčka s obrovskou zásobou maternálních rRNA a mRNA (v oocytech jsou lampbrush chromozómy, rDNA amplifikace a četná jadérka)
- ◆ dobře studovatelná embrya a larvy, vysoká regenerační schopnost (zvláště u ocasatých), klasický model embryogeneze obratlovců
- ◆ asymetrie vajíčka (redistribuce maternálních determinant) je indukována až fertilizací a je ovlivněna gravitací
- ◆ holoblastickým rýhováním vzniká blastula, která se invaginací mění v gastrulu (místo vchlípení jsou prvoústá - blastopor) se třemi zárodečnými listy
- ◆ první známkou podélné osy (bilaterální symetrie) embrya je dorzální zářez, který se vyvine v neurální záhyb (neurulace)
- ◆ dělením časných embryí získána monozygotická (popř. siamská) dvojčata, z embryí dvou druhů čolků připravena mechanickou fúzí chiméra (1920)
- ◆ transplantací jader bylo prokázáno, že somatická jádra obvykle zůstávají totipotentní (klonování žab, 1962)
- ◆ transplantace determinované tkáně vede k přeměně hostitelské tkáně (embryonální indukce, úloha organizátoru; 1924)
- ◆ charakterizována již řada transkripčních faktorů s homeodoménou, které mohou hrát úlohu organizátoru (např. kódované homeotickými geny *Xhox* u *Xenopus*)
- ◆ buněčná jádra *Xenopus* jsou využívána ke studiu struktury a funkce chromatinu: transplantací jader prokázáno, že genové aktivity jsou řízeny cytoplazmatickým prostředím
- ◆ transplantace nedeterminované tkáně do místa základu orgánu vede ke tvorbě tohoto orgánu (*development according to location*), avšak geneticky donor-specifického, vlivem nespecifického induktoru (evokace)

2.7 Savci, *Mammalia*

Individuální vývoj savců je značně odlišný ve srovnání s ostatními obratlovci, protože embryogeneze probíhá v těle matky a savci jsou viviparní. U řady živočišných druhů lze nalézt určité asymetrie již ve složení cytoplazmy vajíčka. U některých vajíček - ježovka nebo drozofila - je již od počátku zřejmá jejich polarita, která představuje osu, ke které bude vztažena antero-posteriorní a dorzoventrální osa. U vajíčka myši nebo člověka však osa polaritě vzniká až později v průběhu vývoje embrya. Savčí embryo se vyvíjí v děloze a získává živiny od matky. Vaječný žloutek je silně redukován a embryo je uloženo v těsném kontaktu s mateřskými tkáněmi. Tato skutečnost je velkou překážkou v embryologických studiích. Experimentálně lze manipulovat pouze s ranými embryi vyňatými z oviduktu, po implantaci do děložní stěny to již není možné. Savci jsou zjevně nejsložitějšími organizmy na Zemi: tvoří více než 200 typů buněk. Modelem ke studiu savců je myš, zejména kvůli své genetické blízkosti ke člověku (význam pro lékařství), krátkému životnímu cyklu a snadné laboratorní kultivaci. Byla zjištěna značná homologie vazebných skupin genů jako u člověka: s 90 % pravděpodobností lze předpovídat chromozomální umístění genů. Velikost haploidního genomu myši je přibližně stejná jako u člověka (3×10^9 pb), má však $2n = 40$ chromozómů (zatímco člověk má 46 chromozómů).

Modelem ke studiu embryogeneze člověka (zejména oogeneze a preimplantačních stádií) je myš. Rýhování oplozeného vajíčka je u savců obecně dlouhé, je provázeno časnou transkripcí zygotických genů. Blastomery jsou totipotentní až po 8-buněčné stádium: pokud jsou separovány, mohou dát vznik až osmi shodným myším. Pokud jsou buňky čtyř- nebo osmibuněčného stádia přeskupeny, dojde vždy k normálnímu vývoji. Uspořádání je výsledkem odlišné polohy buněk, tedy jejich různého prostředí. Ve stádiu 16-buněk dochází ke kompaktaci blastomer, embryo se stává morulou (obr. 46). Poté vzniká uvnitř moruly dutina, embryo se nazývá blastocystou. Ve stádiu blastocysty nastává první ireverzibilní diferenciací: buňky vnější epitelové vrstvy, zvané trofektoderm, se podrobují endoreduplikaci, stávají se polyploidními. Trofektodermální vrstva obklopuje dutinu, blastocoel. Uvnitř blastocysty je umístěna vnitřní buněčná masa (tyto buňky zůstávají diploidní). Blastocysta se pak uvolní ze svého obalu, *zona pellucida*, tím je připravena k implantaci do stěny dělohy. Po implantaci tvoří trofektoderm obří buňky, nyní se nazývá trofoblastem a dává nakonec vznik placentě. Tak v časném vývoji savců je většina buněk určena k vytváření mimozárodečných struktur a jen menší část ke tvorbě embrya (obr. 47).

Obr. 46. Časná embryogeneze u myši (podle Müllera, 1997).

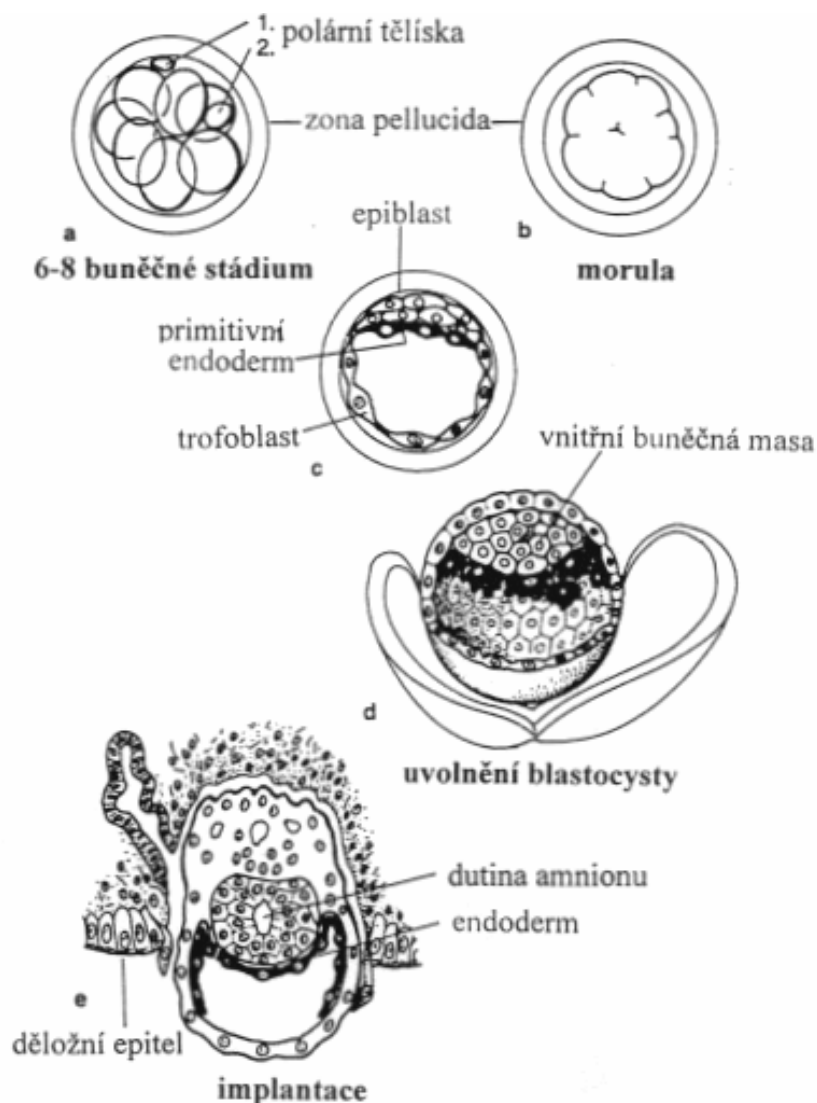
(a) Rýhování dává do stádia 8 buněk vznik zcela shodným blastomerám, polární buňky (zbývající produkty meiózy) zanikají.

(b) Dalším rýhováním a kompaktací vzniká „vyhlazená“ morula.

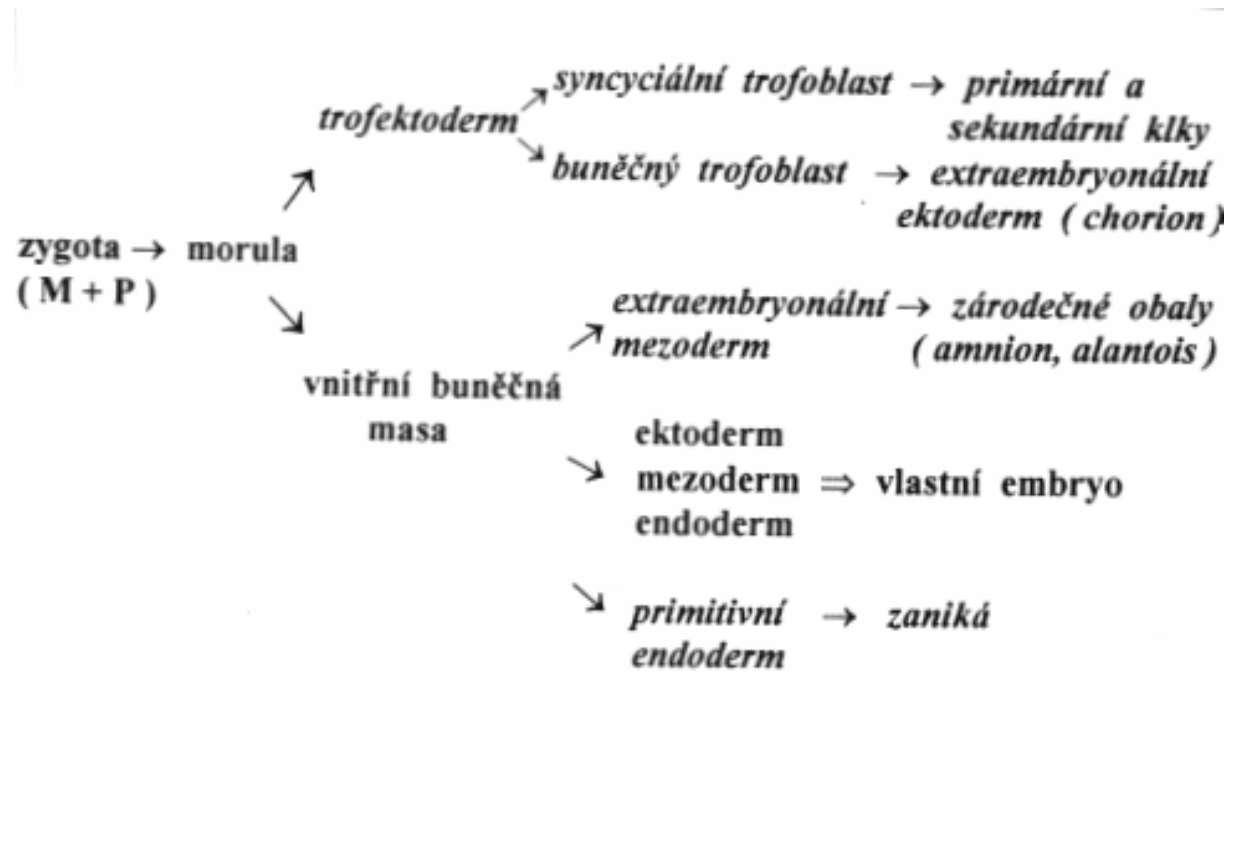
(c) Ve stádiu blastocysty nastává první ireverzibilní diferenciacie: vzniká vnější trofoblast (tkáň zajišťující přísun živin z těla matky) a vnitřní buněčná masa (budoucí embryo)

(d) Blastocysta se uvolní ze zóny pellucidy (analogie vylíhnutí vajíčka u jiných živočišných druhů).

(e) Blastocysta se invazívně implantuje do děložní stěny.



Obr. 47. Původ hlavních buněčných linií v zárodečném vývoji vyšších savců (podle Gilberta, 1988). Zygota, vznikající kombinací jednoho maternálního (M) a jednoho paternálního (P) genomu, dává vznik blastocystě, kdy prvně dochází k ireverzibilní diferenciaci na trofoblast a vnitřní buněčnou masu. Obecně platí, že většina tkání vznikajících v průběhu embryogeneze savců má pouze funkci podpůrnou, zejména výživovou (značeny kurzívou), a není součástí nově narozeného jedince.

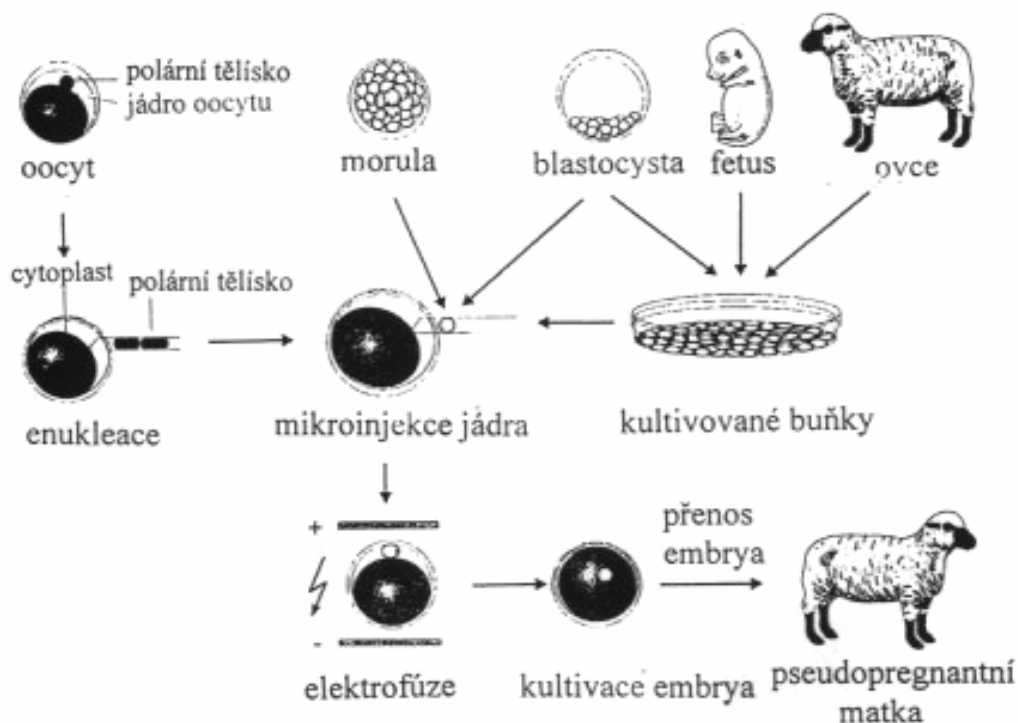


U myši může zcela výjimečně docházet i k vývoji neoplozeného vajíčka (partenogeneze). Vyvíjí se však zcela abnormálně (teratokarcinoma) a ještě ve stádiu embrya umírá. Podobně je tomu i s experimentálně odvozenými paternálními embryi. U myši se též prováděly klíčové experimenty, které potvrdily význam obou genomů (maternálního a paternálního) pro zdárný vývoj embrya a dospělého. Z časné zygoty byl mikromanipulací vyjmut pronukleus samčí (původní jádro spermie) nebo samičí (jádro oocyty): taková haploidní zygota není schopna řádného vývinu. Pokud však bylo vzápětí vpraveno jádro gamety stejného pohlaví, které bylo předtím experimentálně odstraněno, bylo možné ze zygoty (nyní obsahující jádra gamet obou pohlaví) dopěstovat v těle matky normální embryo a posléze i myš. Když byly v zygote

mikroinjekcí kombinovány dva haploidní genomy stejného pohlaví (dvě jádra spermií nebo dvě jádra oocytů), buňka sice byla diploidní, ale vývoj embrya byl aberantní a končil abortem. Z těchto výsledků vyplývá, že k normálnímu vývoji savců je třeba kombinace jednoho (kompletního) maternálního a jednoho (kompletního) paternálního genomu. Jinými slovy, savci potřebují matku i otce. K zajištění této rovnováhy genomů se evolučně vyvinul genomový (též nazývaný parentální nebo gametický) imprinting. Genomy gamet matky a otce nejsou funkčně ekvivalentní. V průběhu gametogeneze získávají oocyty a spermie pohlavně specifický záznam (imprint) o tom, které alely budou exprimovány a které inaktivovány. **Genomový imprinting** se vyvinul zejména u organismů, kde embryonální vývoj probíhá v těle matky (savci a krytosemenné rostliny). Je definován jako specifická exprese alel v závislosti na pohlaví rodiče, od kterého byla alela zděděna. Molekulární analýzy prokazují, že genomový imprinting je zřejmě zprostředkováván specifickou metylací DNA.

U myší je možné **klonování** z časných blastomer, tvorba chimér kombinací buněk blastomer, konstrukce transgenních organismů mikroinjekcí DNA do embryonálních kmenových

Obr. 48. Schéma technik přenosu jader (klonování buněk) u savců (podle Wolfa et al., 1998). Použitým donorem jader (karyoplastu) jsou přímo extirpované buňky moruly nebo blastocysty, nebo kultivované buňky původem z blastocysty, plodu nebo dospělého. Příjemcem je enukleovaný aktivovaný oocyt nebo enukleovaná zygota (cytoplast).

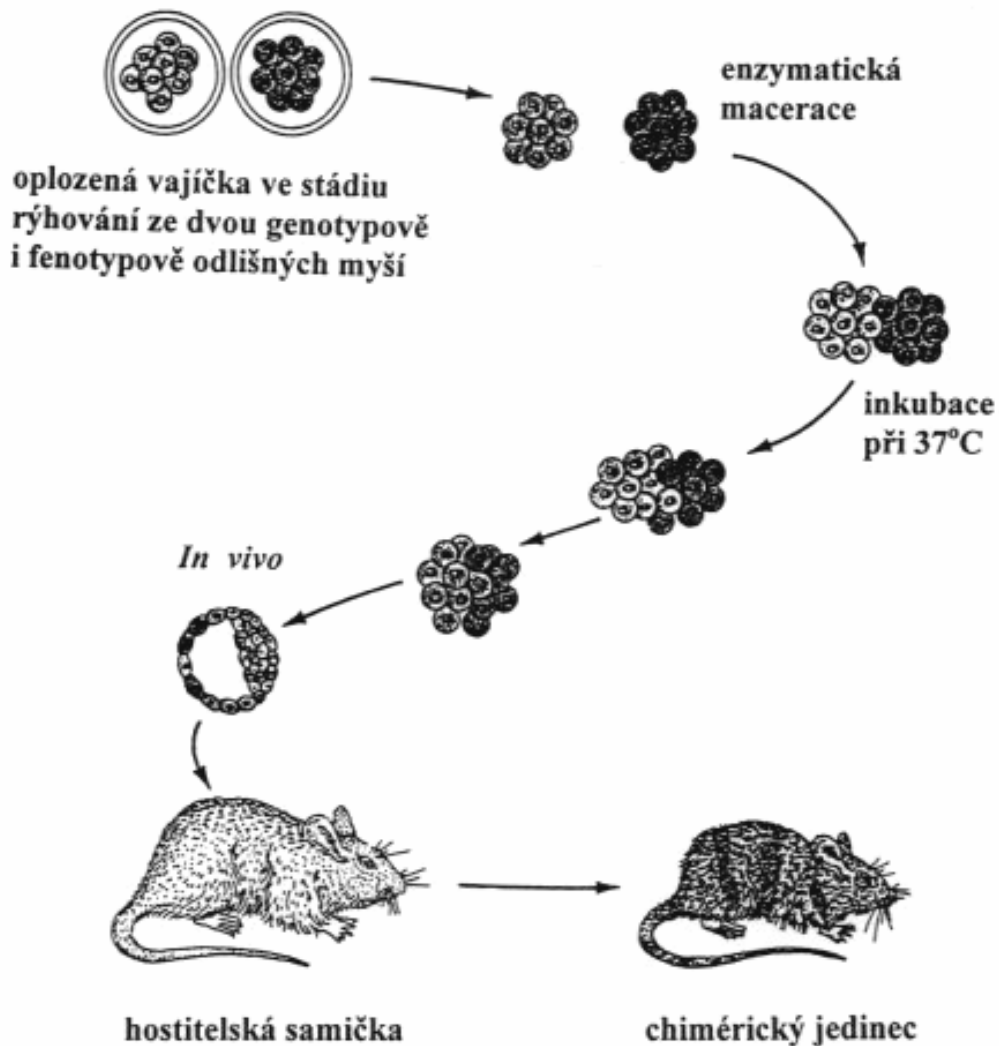


buněk poté umístěných do hostitelské blastocysty. Klonování myši cestou substituce zygotického jádra jádrem adultní somatické buňky dosud nebylo reprodukovatelně dosaženo. U řady jiných savčích druhů však tyto experimenty již byly úspěšně provedeny (obr. 48). Slavná, ale etiky zavrhaná práce byla realizována na klonování ovce cestou přenosu jádra somatické buňky do enukleovaného oocyty (Wilmut et al., 1997). Donorem buněčného jádra byly buňky z mléčné žlázy ovce *Finn Dorset*, recipientem bylo enukleované oplozené vajíčko ovce *Scottish Blackface*. Výsledkem byla ovečka *Dolly* (vzniklá kombinací buněčného jádra *Finn Dorset* a cytoplazmy oocyty *Scottish Blackface*): genotypově shodná a fenotypově podobná typu *Finn Dorset*. Z těchto experimentů vyplývá, že procesy diferenciací v somatických buňkách nezahrnují ireverzibilní modifikace genetického materiálu. Diferenciací je docíleno systematickými, postupnými změnami genové exprese, které jsou výsledkem interakcí mezi jádrem a měnícím se prostředím cytoplazmy.

Jako chiméra je označován mozaikový organizmus složený z buněk odlišného rodičovského původu a tedy i odlišné genetické konstituce. První chiméry připravené mechanickou fúzí (stlačením) časných embryí zkonstruoval u obojživelníků Hans Spemann. Podobné experimenty byly realizovány i u myši: blastocysty černé a bílé a myši byly vyjmuty ze zony pellucidy a fúzovány. Produkt fúze byl poté vložen do dělohy pseudopregnantní myši a vzniklá mláďata (tetraparentálního typu) se vyznačovala černo-bíle pruhovanou srstí (obr. 49). Podobné chiméry (v podstatě mozaiky buněčných linií) lze v některých případech připravit i mezi blízkými druhy savců. Jejich genomy však zůstávají separovány a gamety jsou typu jednoho nebo druhého rodiče.

Myší embryonální kmenové buňky (*embryonic stem cells*, ESC) mají schopnost se vyvíjet, pokud jsou experimentálně přemístěny do blastocysty. Toho je využíváno ke konstrukcím transgenních organizmů. Pomocí retrovirových vektorů nebo mikroinjekce jsou klonované geny vnášeny do genomu ESC a tyto pak introdukovány do blastocysty. Vzniklí jedinci jsou genetickou chimérou složenou z původních buněk blastocysty a buněčných linií původem z vnesených transgenních buněk kmenových. Pokud se transgenní buňky dostanou do zárodečné linie a vznikají z nich viabilní vajíčka nebo spermie, je možné v dalších generacích připravit křížením i transgenní homozygoty. U myši je možné touto cestou provádět i cílenou mutagenezu náhradou endogenního genu jeho upraveným nefunkčním konstruktem (strategie *knock-out*). Takové experimenty jsou především zaměřeny k identifikaci funkce genů a jejich úlohy v geneticky podmíněných chorobách člověka.

Obr. 49. Konstrukce chimérické myši kombinací blastomer z odlišných jedinců (podle Müllera, 1997). Tento experiment vychází ze schopnosti regulace, tj. schopnosti části blastuly regenerovat po excizi zbývající části, a relativně pozdní diferenciaci buněčných linií u savců. Blastocysty dvou odlišných myších linií byly zbaveny zony pellucidy, fúzovány a produkt byl vnesen do dělohy pseudopregnanční samičky. Výsledný jedinec je genetickou mozaikou buněk obou výchozích linií.



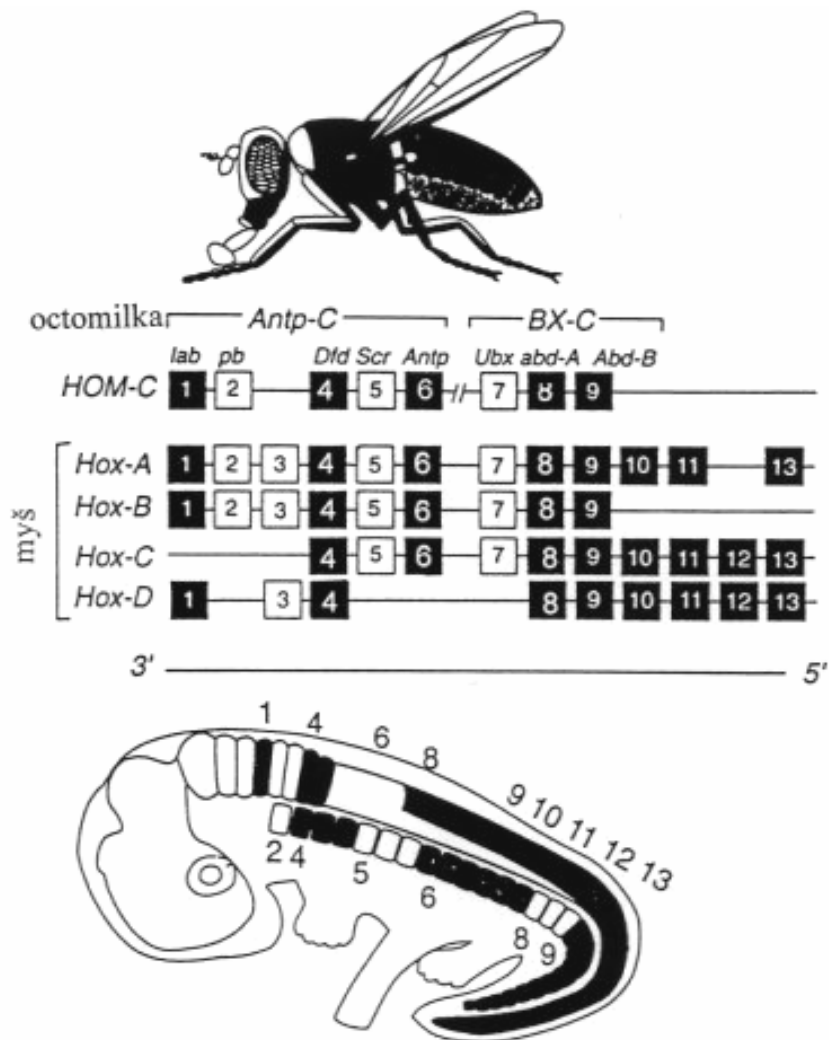
Savci, včetně myši a člověka, mají čtyři shluky (*clusters*) homeoboxových genů. U myši byly nazvány **Hox komplexy** (*Hox A, B, C, D*). Každý *Hox* komplex je umístěn na jiném chromozómu a obsahuje asi deset homeoboxových genů zvaných *Hox* geny (obr. 50).

Obr. 50. Evoluční konzervativnost organizace homeotických genů a jejich spacio-temporální exprese u drozofily a myši (podle Müllera, 1997).

U drozofily jsou dva *HOM-C* komplexy (*Antp* a *BX*) lokalizovány na jediném páru chromozómů, zatímco u myši jsou čtyři *Hox* komplexy na různých chromozómech.

Homeotické geny jsou transkribovány vždy od 5'-konce.

Geny exprimované na anteriorním konci jsou transkribovány dříve než geny exprimované na zádi těla. Některé expresní domény homeotických genů se však překrývají: anteriorní hranice exprese bývá striktní, zatímco posteriorní hranice pozvolna vyznívá.



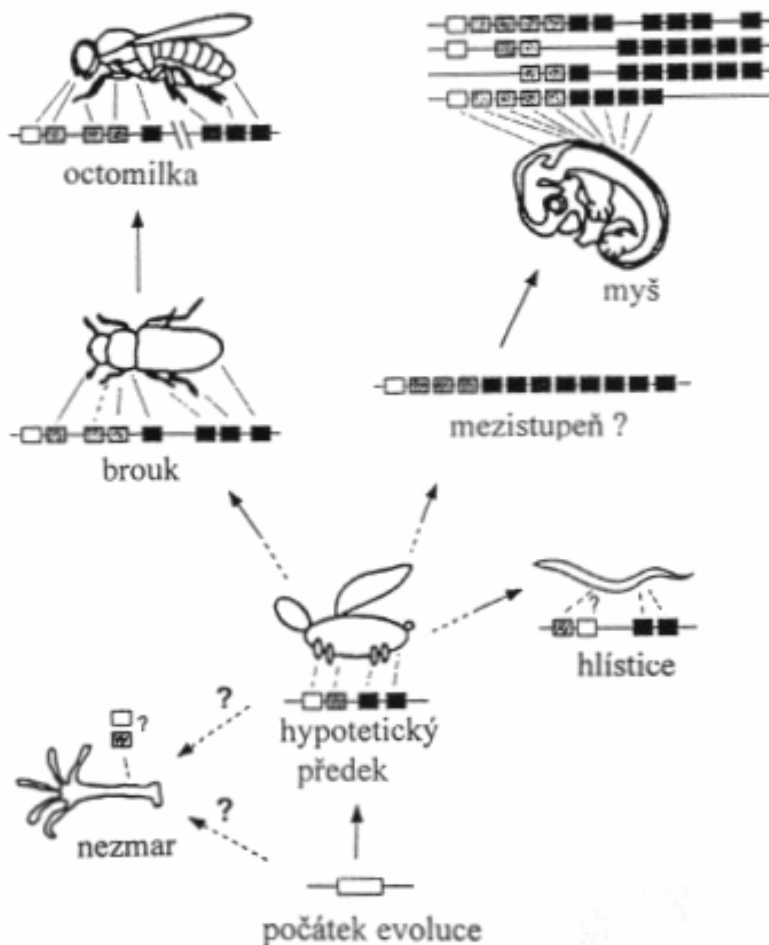
Srovnání sekvencí příslušných homeodomén vedlo k závěru, že všechny homeoboxové komplexy přítomné u dnešních živočišných druhů pocházejí z jednoho primordiálního homeoboxového genu po jeho amplifikaci a diverzifikaci (box 16).

Box 16. Srovnání aminokyselinových sekvencí homeodomén kódovaných některými homeotickými geny u drozofily a myši (podle Kalthoffa, 1996). *Antp* = *Antennapedia*⁺, homeotický gen izolovaný z drozofily, známá mutace tohoto genu vede ke tvorbě dalšího páru nohou na místě tykadel; *Hoxb7* a *Hoxa7*, *Hoxb3* a *Hoxa3* = dvě podrodiny myších homeotických genů. Jednotlivá písmena představují aminokyseliny, pomlčky reprezentují shodnou AMK v myších homeodoménách s proteinem kódovaným genem *Antennapedia*⁺, jiná písmena představují odlišnou aminokyselinu. Zlomky ukazují podíl shodných AMK, tj. vzájemnou homologii myších homeodomén s drozofilím *Antennapedia*⁺ proteinem.

	1		11	
<i>Antp</i> :	R K R G R Q T Y T R		Y Q T L E L E K E F	
<i>Hoxb7</i> :	- - - - -		- - - - -	
<i>Hoxa7</i> :	- - - - -		- - - - -	
<i>Hoxb3</i> :	S - - A - T A - - -		A - L V - - - - -	
<i>Hoxa3</i> :	S - - - - T A - - -		P - L V - - - - -	
	21		31	
<i>Antp</i> :	H F N R Y L T R R R		R I E I A H A L C L	
<i>Hoxb7</i> :	- Y - - - - -		- - - - - T - - -	
<i>Hoxa7</i> :	- - - - -		- - - - -	
<i>Hoxb3</i> :	- - - - - C - P -		- V - M - N L - N -	
<i>Hoxa3</i> :	- - - - - M - P -		- V - M - N L - N -	
	41		51	61
<i>Antp</i> :	T E R Q I K I W F Q		N R R M K W K K E N	K
<i>Hoxb7</i> :	- - - - -		- - - - -	- 59/61
<i>Hoxa7</i> :	- - - - -		- - - - - H	- 60/61
<i>Hoxb3</i> :	S - - - - -		- - - - - Y - - D Q	- 43/61
<i>Hoxa3</i> :	- - - - -		- - - - - Y - - D Q	- 45/61

Geny s homeoboxem byly nalezeny u všech eukaryotických organizmů: jejich počet je však u jednotlivých skupin organizmů (druhů) dosti odlišný (obr. 51). Jonathan Slack (1993) považuje *Hox* komplex (organizovaný v jedné až čtyřech vazebných skupinách) a jeho expresní typ v embryu (kolinearita pořadí genů na chromozómu s antero-posteriorní a časovou expresí) za definující charakter živočišné říše a navrhl pro něj termín *zootyp*. Myší *Hox* geny mají stejnou kolinearitu jako drozofila: fyzikální pořadí *Hox* genů je vztaženo k pořadí jejich expresních domén podél předozadní osy embrya. Žádné spontánní mutace *Hox* genů nebyly u obratlovců

Obr. 51. Evoluce uspořádání homeotických genů u živočichů (podle Howella, 1998). Homeotické geny se v průběhu fylogeneze stávají u vyšších živočichů (zejména u savců) většími a početnějšími (zřejmě amplifikace a diverzifikace genů): výsledkem je několik shluků vyššího počtu homeotických genů. Kolinearita (antero-posteriorní a časování exprese) uvnitř genového shluku však zůstává zachována.



nalezeny, proto byly k identifikaci funkce genů připraveny pomocí reverzní genetiky. Eliminace homeodoménového proteinu se provádí například inaktivací produktu genu injekcí protilátky k proteinu kódovaného homeotickým genem, eliminace funkce *Hox* genů je realizována transgenozí (*gene targeting/knock out*, nahrazení genu). Transgenozí (vnášením chimérických genů) lze dosáhnout i ektopické exprese homeotických genů.

Z etických důvodů nelze většinu experimentů prováděných na myši realizovat na **člověku**. Studium vývojových procesů u člověka je tedy prováděno především technikami biochemickými, histochemickými a molekulárně genetickými, analyzovány mohou být abortovaná embrya a kultivovány nádorové buňky. Člověk má 46 chromozómů, velikost haploidního genomu je podobná jako u myši. Oogeneze a preimplantační stádia embryogeneze u člověka jsou v principu shodná s analogickými stádii u myši. Odhadovaný počet genů 50 až 100 tisíc, největší známé geny mají velikost i přes 10^6 pb. Člověk má asi 350 typů buněk, což je řádově více než nižší živočichové: například nezmar má asi jen 20 odlišných typů buněk.

Na příkladu savců (box 17) je možné obecně shrnout, že vývoj živočichů má **hierarchickou povahu**: ve stádiu gastruly je tvořen třemi zárodečnými listy, které postupně dávají vznik jednotlivým orgánům, tkáním a typům buněk. Například ektoderm vytváří nervovou soustavu a epidermis, mezoderm dává vznik svalům, ledvinám, a cévní soustavě, a endoderm např. hrtanu, plicím, žaludku, játrům a tenkému střevu. To potvrzuje vývojovou teorii epigeneze: schopnost vyvíjejícího se organismu generovat rostoucí komplexitu spontánně, bez pre-existujícího plánu. Komplexita výsledných orgánů vzniká postupně uvnitř prostorových domén dříve založených. Každé „rozhodnutí“ (*decision*) tkáně zvolit si určitý typ diferenciací je ireverzibilním aktem v daném stádiu vývoje. Tkáň se stává zcela determinovanou a žádné okolní vlivy (sousedních buněk nebo životního prostředí) nemohou tento vývojový program změnit. Embryonální tkáň tak postupně ztrácí části svého multipotentního programu a jejich jednotlivé části se stávají progenitory adultních struktur a jejich odlišných buněčných typů. Embryo je možné považovat za mozaiku specifických částí, které jsou determinovány ke tvorbě odlišně diferencovaných struktur. Embrya různých živočišných druhů dosahují tohoto „mozaikového stavu“ v odlišných stádiích vývoje.

Box 17. Charakteristika savčích modelů.

- n** mají více než 300 typů buněk, člověk má v těle více než 10^{13} buněk, počet chromozómů u myši $2n = 40$, u člověka $2n = 46$
- n** velikost genomu u všech druhů savců téměř shodná ($C = 3 \times 10^9$ pb), počet genů 50 až 100 tisíc
- n** determinace pohlaví X/Y (s dominantní úlohou Y), negativní kompenzace dávky X-vázaných genů u samic (lyonizace)
- n** čtyři shluky homeoboxových genů - *Hox* komplexy (*HoxA - D*), každý na jiném chromozómu, obsahují vždy asi deset genů uspořádaných kolineárně s osou embrya
- n** spontánní mutace *Hox* genů nebyly u savců nalezeny, je možné však provádět experimentální modifikaci *Hox* genů nebo proteinů (inhibice nebo nadprodukce)
- n** značná homologie vazebných skupin genů mezi myší a člověkem
- n** vajíčko je malé (nízký obsah žloutku), nepolární, rýhování je holoblastické, dlouhé, časná transkripce zygotických genů
- n** blastomery myši jsou totipotentní až po 8-buněčné stádium, pak tvorba moruly, blastocysty (ireverzibilní diferenciaci: trofektoderm, blastocoel a vnitřní buněčná masa), která se uvolní ze zony pellucidy, implantace do dělohy
- n** k vytvoření antero-posteriorní osy a determinaci buněčných drah (i zárodečné) dochází až po implantaci embrya do stěny dělohy
- n** savci jsou viviparní organizmy s maternální výživou embrya - evolučně se vyvinul genomový imprinting (teorie parentálního konfliktu)
- n** možné klonování z časných blastomer, tvorba chimér kombinací blastomer, konstrukce transgenních organizmů mikroinjekcí DNA do embryonálních kmenových buněk

3 Vývojová genetika rostlin

Rostliny a živočichové mají mnoho společných strukturních i funkčních vlastností, jejich tělní organizace a vývoj se však v mnohém odlišují. Rostliny jsou charakterizovány, ve srovnání s živočichy, absencí jasně definované morfologie a kontinuálním růstem po celý život. Kritickým stádiem diferenciacie je u živočichů gastrulace, kdy se tvoří i primordiální zárodečné buňky, které později migrují do gonád. Tato zárodečná linie představuje jediné buňky, jejichž genom je přenášen do pohlavního potomstva živočichů. U rostlin se pravá zárodečná linie nevytváří. Na rozdíl od živočichů se u rostlin formuje v embryu pouze rudimentální tělní plán. Některé buněčné linie, meristémy, si zachovávají schopnost dělení a diferenciacie (podobně jako kmenové buňky živočichů), a umožňují tak růst vegetativních částí rostliny (kořenů, stonků, větví, listů) a později i reprodukčních orgánů (květů). Znamená to, že jakákoliv změna v jaderného genomu meristemických buněk, ke které během života rostliny dojde, může být přenesena do pohlavního potomstva. Rostliny se také vyznačují vysokou regenerační schopností zvanou totipotence. V podstatě každá buňka rostlinného těla, somatická či pohlavní, může dát opět vznik celé nové rostlině. Z toho vyplývá, že změny, ke kterým dochází během rostlinného vývoje směrem k vysokému stupni diferenciacie, musí být reverzibilní. Rostliny, zřejmě vzhledem ke své neschopnosti lokomočního pohybu, mají vysokou toleranci ke změnám životního prostředí i ke změnám genetickým a epigenetickým. Pro život rostlin je charakteristické střídání generací, diploidního sporofytu a haploidního gametofytu. Sporofyt vytváří meiózou spóry, které se vyvinou v gametofyt. Diferencované gametofyty pak produkují buď spermatické nebo vaječné buňky.

Říše rostlin je obvykle dělena na rostliny nižší a vyšší podle základního anatomického kritéria: nižší rostliny ve svém těle nevytvářejí k rozvádění vody a živin pravé cévy, zatímco rostliny vyšší, cévnaté, vytvářejí složené cévnaté struktury (floem a xylem). Jiným kritériem k rozdělení rostlin je tvorba speciálních struktur k ochraně a uchovávání embryí, semen (nižší rostliny včetně kaprad'orostů semena nevytvářejí). Fylogeneticky nejvyvinutější skupinou rostlin jsou krytosemenné, které (i) vytvářejí speciální struktury nesoucí pohlavní orgány (květy: odtud běžný anglický termín pro krytosemenné rostliny, *flowering plants*), kde se vytvářejí spóry, (ii) se podrobují procesu dvojího oplození, a (iii) k vývinu embrya a semene dochází uvnitř mateřského těla (květu, později plodu). U všech druhů rostlin nastává na rozdíl od živočichů rodozměna: produktem meiózy nejsou gamety, nýbrž spóry, které se podrobují několika až mnoha dělením za

vytvoření gametofytu, který produkuje gamety. Čím je organizmus vývojově dokonalejší, tím je gametofyt méně vyvinut.

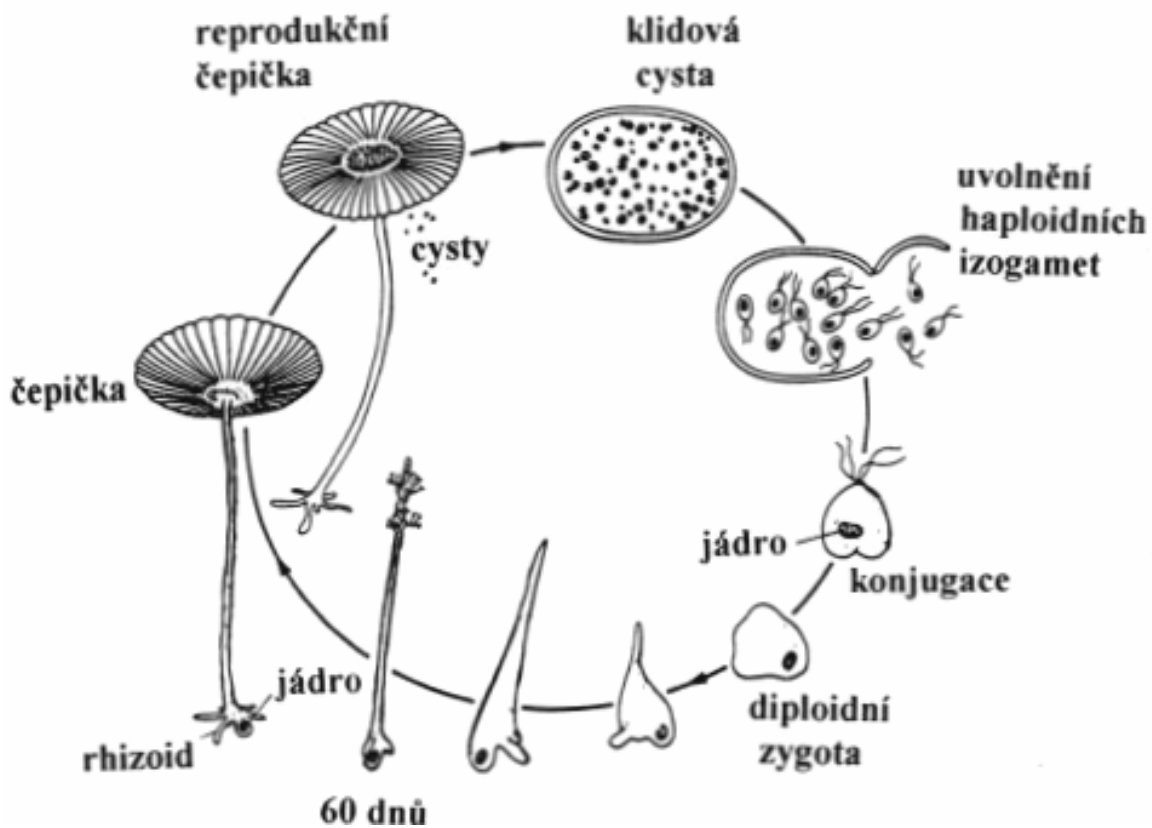
Rostlinné zygoty jsou obecně velmi malé a vyvíjejí se obvykle uvnitř mateřské tkáně, podobně jako u savců a některých jiných živočišných skupin. Apikální meristémy umožňují kontinuální růst rostlin v průběhu jejich života. Květní orgány, které dávají vznik megasporám a mikrosporám, se vyvíjejí ze stejných meristemických buněk, které také vytvářejí celý prýt. Na rozdíl od živočišných embryí se rostlinná embrya nepodrobují větším morfogenním pohybům (přesunům), ale tvoří menší počet histologicky odlišných buněčných typů. Některé rozdíly mezi vývinem rostlin a živočichů jsou důležité z genetického hlediska. Vývin gametofytu z haploidní mikrospóry vyžaduje genovou expresi a měl by tak eliminovat mnoho mutantních alel ještě před fertilizací. Malá velikost a maternální výživa rostlinného embrya ho činí méně závislým na maternálně nesené RNA než u většiny živočišných embryí. Dosavadní studie naznačují, že u rostlin je aktivováno více zygotických genů v průběhu embryogeneze než u živočichů.

3. 1 Nižší rostliny

Nejnámějším modelem vývojové biologie nižších rostlin je zelená jednobuněčná „obří“ mořská řasa *Acetabularia* ze skupiny *Chlorophyceae*. V dospělosti dosahuje velikosti až 5 cm. Diploidní jednobuněčné tělo je složeno z rhizoidu (s jádrem), stonku a čepičky. Životní cyklus zahrnuje růst a morfogenezu zygoty, která je produktem fúze dvou haploidních izogamet. Cyklus je ukončen opět tvorbou haploidních izogamet v čepičce, které jsou uvolněny a fúzují v párech ke tvorbě nových zygot (obr. 52). *Acetabularia* má velkou **regenerační schopnost**. Část buňky s jádrem (v rhizoidu) regeneruje v kompletní funkční řasu, část bez jádra má kupodivu též relativně vysokou regenerační schopnost: může dát vznik i celému jedinci, který je však sterilní (nemá jádro). Regenerace bez přítomnosti jádra jednoznačně ukazuje, že diferenciace u této řasy je řízena především na úrovni **translace**: stávající mRNA ve fragmentu bez jádra byly templátem k syntéze specifických proteinů i tvorbě nových struktur (čepičky). V průběhu regenerace byly zjištěny v těle elektrické proudy, zejména tok chloridových iontů, jako nezbytné komponenty růstu a morfogeneze (prokázáno též v průběhu regenerace u jiných druhů). Důležitou roli v morfogenezi také hraje vápník, má vliv zejména na cytoskelet. Ionty chlóru a vápníku jsou klíčovými morfogeny u této řasy. Polarita těla od báze rhizoidu k čepičce koreluje s gradienty

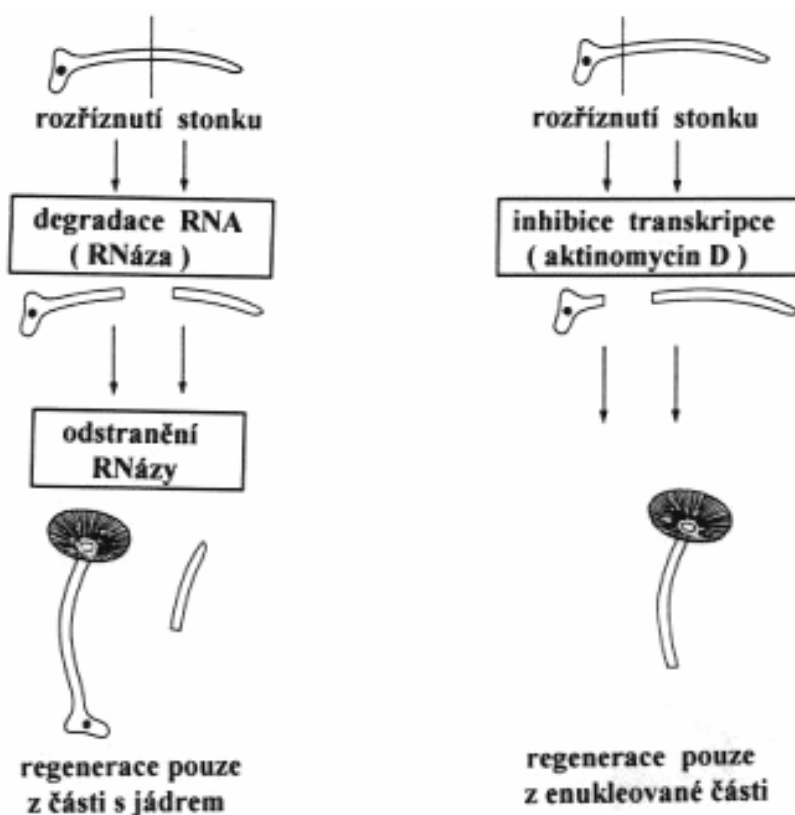
iontů vápníku (Ca^{2+}) a chlóru (Cl^-), u rhizoidu vždy nejvyšší, v čepičce nejnižší. Tyto gradienty iontů jsou příkladem tzv. morfogenních polí (u jiných organismů se obvykle jedná o morfogenní pole jiných látek), které hrají roli v diferenciaci a morfogenezi.

Obr. 52. Životní cyklus jednobuněčné zelené řasy *Acetabularia* (podle Goodwina, 1991). Zygota, vzniklá fúzí dvou haploidních izogamet, má asi 50 μm v průměru a dá asi po 2-3 měsících vznik dospělé jednobuněčné rostlině o výšce stonku 3-5 cm a šířce čepičky asi 0,5 cm. Jediné jádro zůstává v bazální části (rhizoidu). Produkty jádra (mRNA a proteiny) jsou v rostlině distribuovány prouděním cytoplazmy. Polarita těla je určována vzrůstajícím gradientem jednoduchých morfogenů - iontů Ca^{2+} a Cl^- - od rhizoidu k čepičce. V dospělosti vznikají z diploidního jádra meiózou izogamety, které uzrávají v cystách tvořených v čepičce.



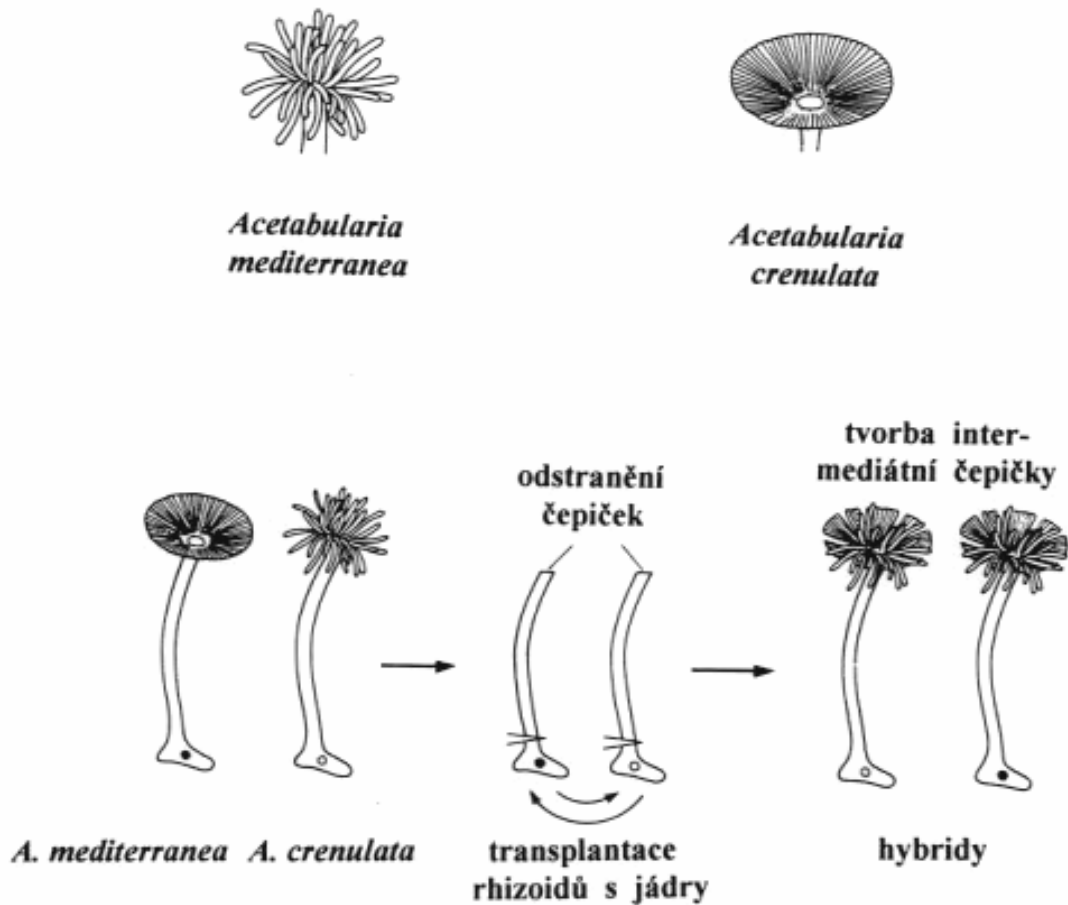
Exprese genů (transkripce) je pro vývoj řasy samozřejmě nezbytná. Bylo to prokázáno dnes již klasickými regeneračními experimenty s degradací RNA nebo inhibicí transkripce (obr. 53). Aplikace RNázy reverzibilně blokuje regeneraci buněčného fragmentu s jádrem: po odstranění RNázy se v jádře vytvářejí nové molekuly RNA a vývoj pokračuje. Buněčný fragment bez jádra však po degradaci RNA už neregeneruje, neboť není přítomen DNA templát ke tvorbě nových molekul RNA. Buněčná diferenciace (tvorba stonku a čepičky) je ovšem řízena především na úrovni translace mRNA. Pokud je k dekapitovanému rhizoidu kontinuálně aplikován inhibitor transkripce, je regenerace řasy zastavena. Naproti tomu apikální bezjaderná část (stonek, kde se už nahromadily potřebné mRNA a proteiny) regeneruje v čepičku.

Obr. 53. Schéma klasických experimentů demonstrujících úlohu RNA v regeneračních procesech u *Acetabularia* (podle Goodwina, 1991). Řasa má extrémní regenerační schopnost: po jejím rozříznutí na část s jádrem a bez jádra obě regenerují v nová těla (regenerant z části bez jádra je samozřejmě sterilní). Aplikace RNázy však vede k ireverzibilní ztrátě regenerační schopnosti fragmentu bez jádra, protože příslušné nové mRNA se již nemají z čeho vytvořit (vlevo). Pokud je však při regeneraci aplikován inhibitor transkripce, dochází k regeneraci pouze fragmentu bez jádra, a to na bázi již přítomných mRNA (vpravo).



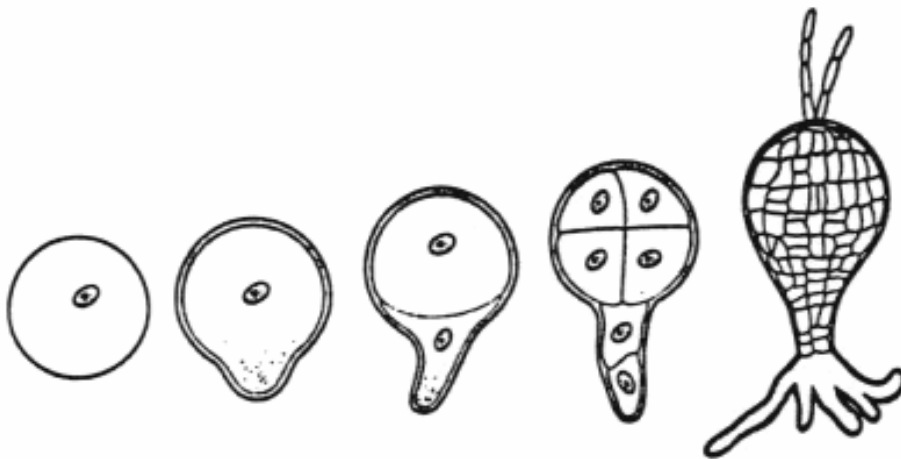
Morfologické rozdíly mezi jednotlivými druhy *Acetabularia* (zejména tvar čepičky) jsou svázány s genetickými rozdíly, které mohou být objasněny jadernými transplantačními (roubovacími) pokusy (obr. 54). Tyto experimenty ukázaly na význam cytoplazmy, ve které se jádro nachází. Přenos fragmentu rhizoidu s jádrem a současné odstranění čepičky vedlo k hybridním fenotypům regenerující čepičky.

Obr. 54. Vliv cytoplazmy a syntézy nových mRNA na morfologii regenerované čepičky u vegetativních mezidruhových hybridů rodu *Acetabularia* (podle Goodwina, 1991). Vzájemné přenosy jader (se současným odstraněním čepičky) vedou k regeneraci hybridních (obvykle intermediálních) tvarů čepičky. Na morfogenezi se tedy podílejí jak původní cytoplazma (stávající mRNA a proteiny), tak i transkripční produkty nově transplantovaného jádra.



Modelem ke studiu buněčné polarity rostlin je mnohobuněčná hnědá řasa *Fucus*. Fúzí gamet vznikají diploidní, relativně velké zygoty (asi 100 μm v průměru). Zygoty jsou zpočátku zcela apolární a základní osa polarity vzniká až několik hodin po oplození (obr. 55). Fyziologické a biochemické studie naznačují, že významnou roli pro iniciaci buněčné polarity hraje buněčná stěna: určité typy polysacharidů a povrchových glykoproteinů byly zjištěny výlučně v částech stěny, která dává vznik rhizoidnímu pólu.

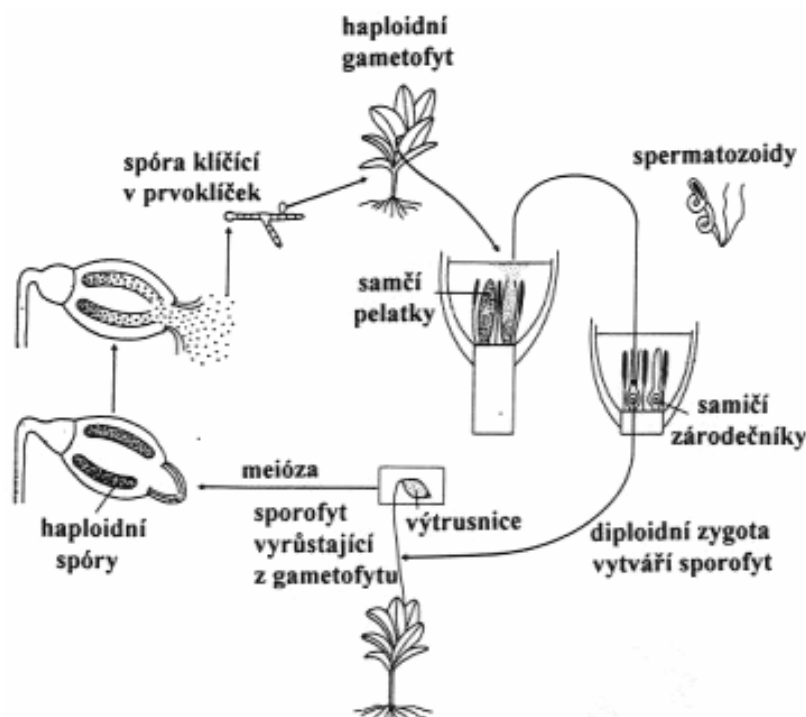
Obr. 55. Environmenální indukce buněčné polarity u modelové hnědé řasy *Fucus* (podle Westhoffa et al., 1998). Vaječná buňka i oplozené vajíčko jsou izotropní, bez známek polarity. V průběhu několika hodin však vlivem světla a gravitace získává zygota osu symetrie a polární růst začíná tvorbou špičky rhizoidu. Po dalších 12 hodinách začíná první buněčné dělení, které tvoří přehrádku kolmou k ose. Asymetrická mitóza dává vznik dvěma odlišným dceřiným buňkám: větší apikální (*thallus cell*) a menší bazální buňce (*rhizoid cell*). Obě buňky se opět dělí paralelně s rovinou prvního dělení. Další dělení, kolmá a podélná, vedou ke vzniku mnohobuněčného thallusu s četnými rhizoidy.



Relativně nejsložitějšími nižšími rostlinami jsou mechorosty (*Bryophyta*). Nevytvářejí ale pravé cévy (které jsou charakterizujícím prvkem rostlin vyšších - kaprad'orostů, nahosemenných a krytosemenných rostlin), což jim nedovoluje dosáhnout většího vzrůstu těla. Mechorosty jsou již na rozdíl od většiny nižších rostlin obvykle suchozemské, jejich pohlavní rozmnožování je

však vázano na vodní prostředí. V průběhu jejich životního cyklu nastává výrazná rodozměna (obr. 56), kdy gametofyt převládá nad sporofytem, zatímco u vyšších rostlin je tomu naopak. Haploidní gametofyt je přetrvávající autotrofní rostlinkou, diferencovanou na lodyžku (kauloid), asimilační lístky (fyloidy) a přichytná vlákna (rhizoidy). U jednodomých druhů vytváří gametofyt oba typy pohlavních orgánů, u druhů dvoudomých (gonochoristů) se tvoří na samčích rostlinách pelatky (antheridia) a na samičích zárodečnících (archegonia). Spermatozoidy jsou obrvené a ve vodním (mikro)prostředí oplozují buňku vaječnou. Zygota se vyvíjí uvnitř mateřské rostlinky a vytváří sporofyt: diploidní štět s tobolkou a výtrusy. Při tvorbě výtrusů dochází k meióze, jsou tedy haploidní a z nich, přes jednoduchý vývojový mezistupeň (prvoklíček, protonema), vzniká opět dvoudomý nebo jednodomý gametofyt.

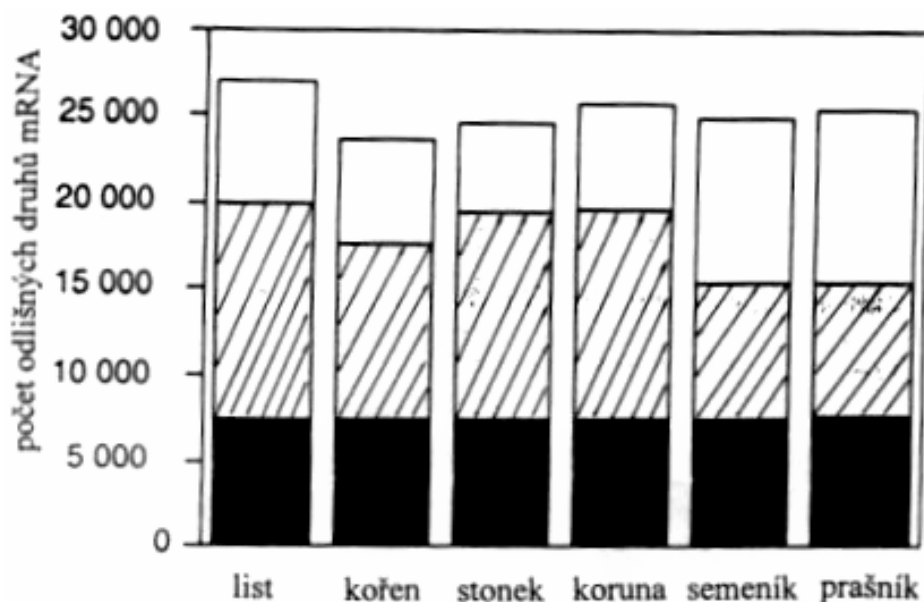
Obr. 56. Schéma životního cyklu mechorostů. U mechorostů dochází k výrazné rodozměně, přičemž haploidní gametofyt má na rozdíl od fylogeneticky vyspělejších rostlin převládající roli a zabezpečuje diploidní sporofyt i výživou. Produkty meiózy jsou haploidní spóry, které bez oplození vyklíčí v mechovou rostlinku, která později ve svých pohlavních orgánech vytváří mitózou samčí a/nebo samičí pohlavní buňky (mechy jsou dvoudomé nebo jednodomé). Sporofyt vyrůstá ze zygoty přímo ze samičích zárodečníků, tedy na gametofytu, a je tvořen pouze štětem s tobolkou a výtrusy.



3.2 Krytosemenné rostliny, *Angiospermophyta*

Genetická informace je u rostlin lokalizována v chromatinu buněčného jádra, v mitochondriích a v plastidech. Jaderný genom vyšších rostlin obsahuje asi 10^4 až 10^5 strukturálních genů, z toho v dospělé rostlině je jich exprimováno jen 5-10 %. V různých rostlinných pletivech a buňkách bylo detekováno asi 8 000 shodných typů mRNA, které představují geny odpovědné za základní metabolické funkce a tudíž konstitutivně exprimované ve všech buňkách (*housekeeping genes*, obr. 57). Exprese rostlinných genů je podobně jako u živočichů řízena na různých úrovních, mj. spouštěním a rychlostí transkripce, sestřihem a stabilitou primárního transkriptu, rychlostí translace, stabilitou translačního produktu a jeho transportem.

Obr. 57. Odhad počtu exprimovaných genů v různých orgánech rostliny tabáku (podle Goldberga, 1988). Měření byla založena na hybridizačních analýzách RNA/DNA s využitím RNA izolovaných z listu, kořene, stonku, korunních plátků, semeníku a prašníku. Geny exprimované konstitutivně ve všech orgánech jsou vybarveny tmavě (asi 8 000, *housekeeping genes*), geny specifické pro dva nebo více orgánů jsou vyznačeny šrafovaně a geny orgánově specifické jsou prázdné symboly (*organ specific genes*): jejich počty jsou relativně nejvyšší ve strukturně složitých pohlavních orgánech.



Současné studie dokazují, že rostlinné genomy jsou ve stavu dynamické proměnlivosti a

podléhají četným přestavbám, často v závislosti na měnícím se vnějším prostředí. Genomová (a

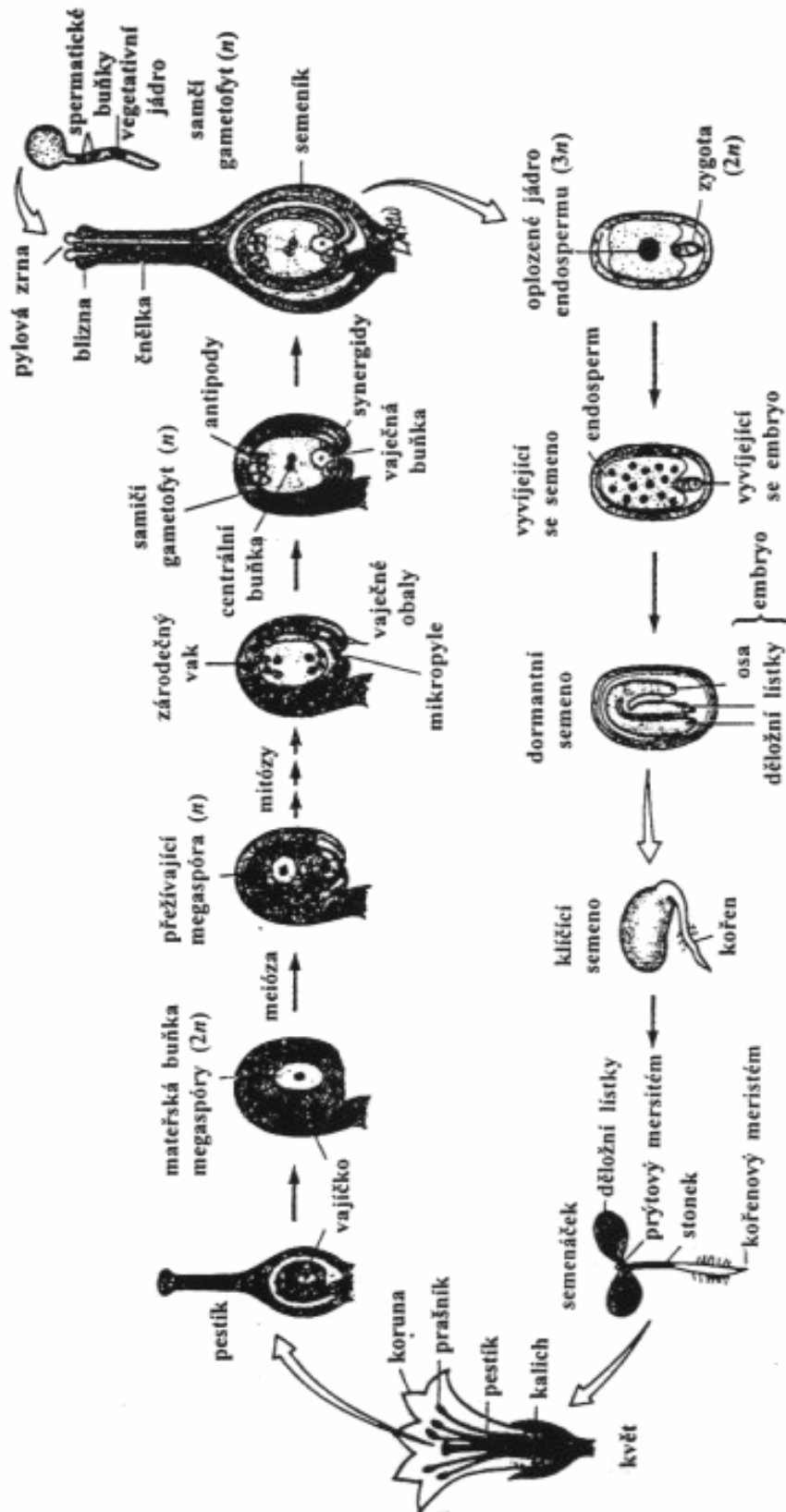
samozejmě i fenotypová) flexibilita rostlin je odrazem jejich mimořádné adaptivní schopnosti na měnící se životní prostředí. Příkladem této flexibility jsou polyploidie, přestavby chromozomů, změny v chromozomálním imprintingu, genové amplifikace a redukce i aktivita transponovatelných elementů. Snad největším rozdílem mezi rostlinami a živočichy je neschopnost lokomočního pohybu u rostlin. Zvířata se mohou přizpůsobovat na měnící se životní prostředí svým chováním, zatímco rostliny tak mohou činit pouze krátkodobými fyziologickými regulacemi nebo dlouhodobě změnami svého vývoje.

Specifickým komplexem pohlavních orgánů je květ (součást sporofytu), který vzniká konverzí vegetativního meristému v meristém květenství. Květy vytvářejí buď oba typy pohlavních orgánů (květy oboupohlavné) nebo jen typ jediný - samčí tyčinky nebo samičí pestíky. Jednoplavné květy se mohou vyskytovat na jedné rostlině (druhy jednodomé, monoecické) nebo na jedincích odlišných (druhy dvoudomé, dioecické). V pohlavních orgánech se meiózou vytvářejí haploidní, samčí a samičí spóry (obr. 58). Spóry dávají několika mitózami vznik samčímu resp. samičímu gametofytu, které finálně vytvářejí gamety. Oplození je dvojí a vývoj embrya probíhá uvnitř těla matky. Embryogeneze je ukončena specifickým stádiem desikace (tvorba semene), které se evolučně vyvinulo k překonávání nepříznivého životního období (dormance) a k rozšiřování areálu příslušného druhu.

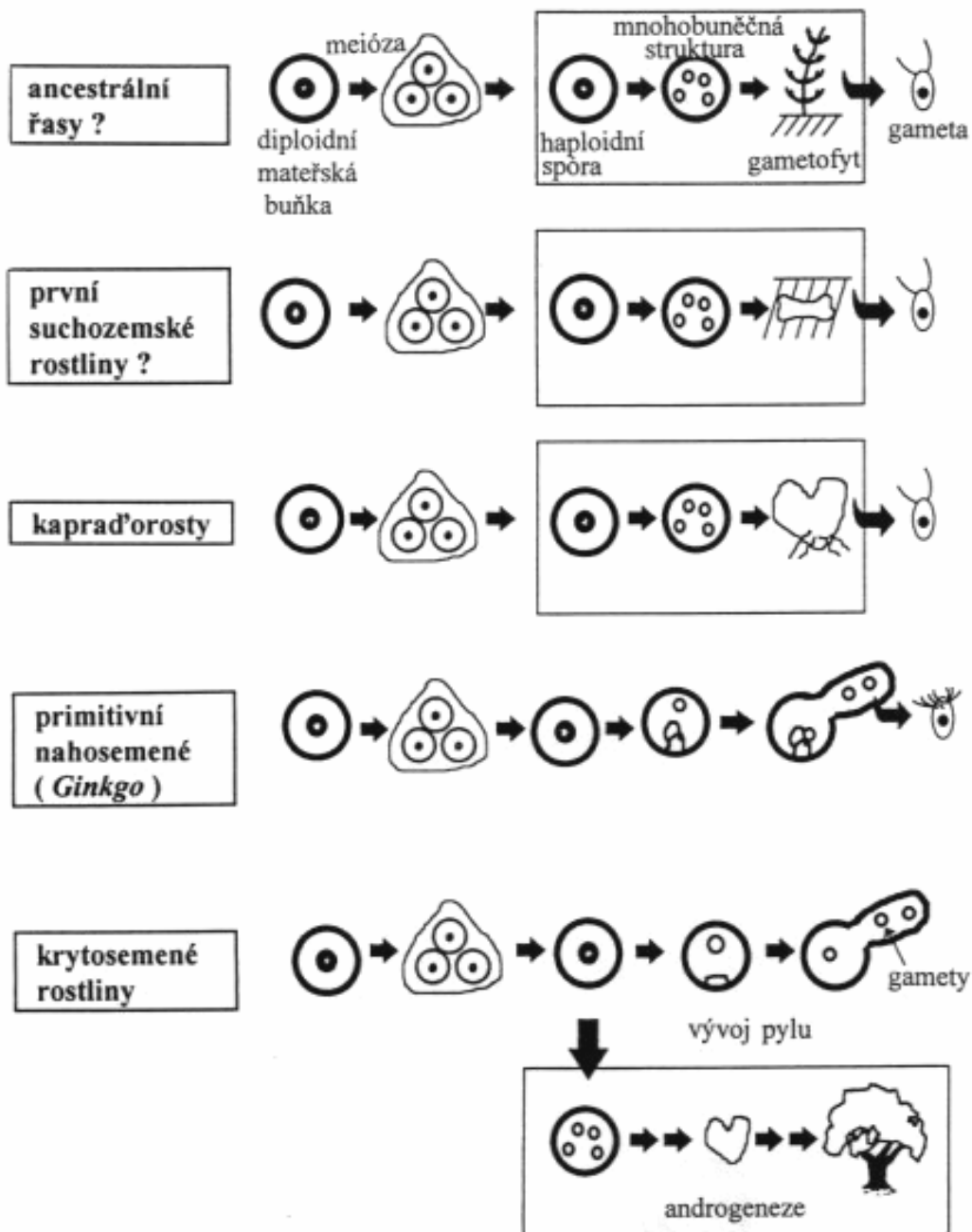
3.2.1 Gametofyt a gametofytické mutace

U krytosemenných rostlin nevznikají redukčním dělením gamety (jako u živočichů), nýbrž spóry, které procesem několika buněčných dělení dávají vznik strukturně jednoduchému samčímu nebo samičímu gametofytu, které pak finálně vytvářejí gamety. Zatímco u nižších rostlin tvoří gametofyt hlavní část životního cyklu, u vyšších rostlin je postupně silně redukován (obr. 59). U krytosemenných je zralý gametofyt tvořen jen pylovou láčkou, která dopravuje k vajíčce dvě spermie. Určitou reminiscencí, která naznačuje přetrvávající morfogenní potenciál gametofytu, je indukovaná androgeneze *in vitro*: kultivací nezralého pylu může vznikat haploidní sporofyt. Téměř se neliší od normálního diploidního sporofytu, je však sterilní (nepřavidelnou meiózou vznikají neživotaschopné spóry).

Obr. 58. Schéma rozmnožovacího cyklu krytosemenné rostliny (podle Goldberga et al., 1994).

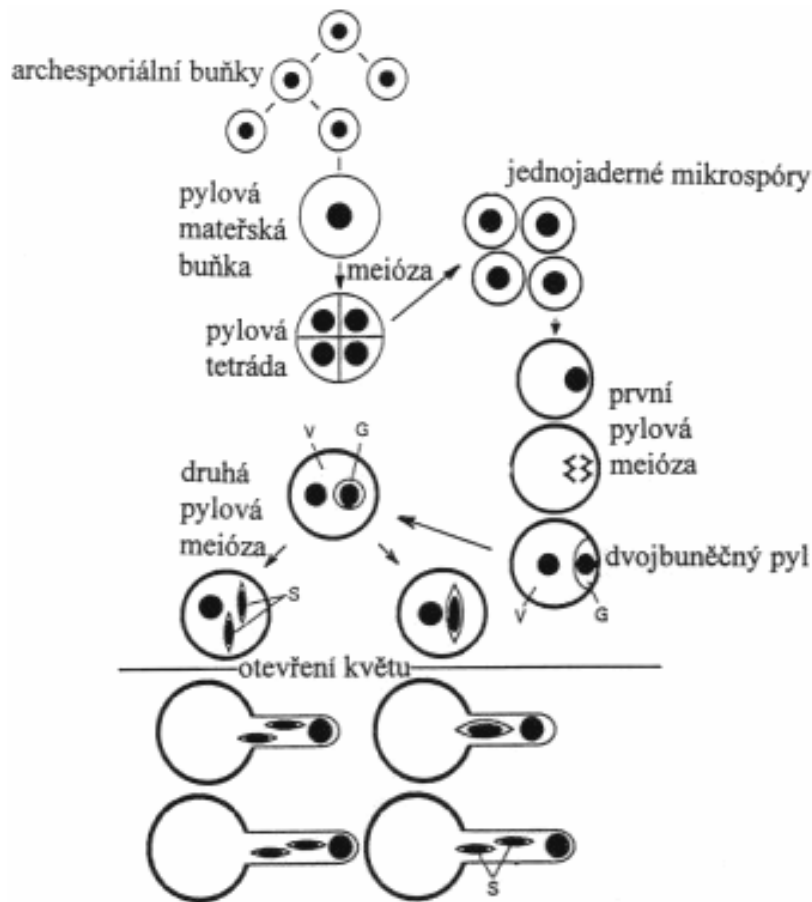


Obr. 59. Evoluce samčího gametofytu od ancestrálních řas až po dnešní krytosemenné rostliny (podle Boneta et al., 1998). Diploidní pylové mateřské buňky se ve všech případech podrobují meióze za vzniku haploidních spór. Tyto jsou prekurzorem gametofytu, který se u primitivních rostlin podrobuje morfogenezi, zatímco u semenných rostlin prodělává jen několik mitotických dělení za vzniku gamet. Kultivací nezralého pylu krytosemenných rostlin je však možné vyvolat obnovení morfogeneze a celého vývojového programu (androgeneze *in vitro*).



Uvnitř pletiva prašníku vznikají v průběhu vývinu květu z archesporiálních buněk progenitory samčích spór, pylové mateřské buňky (*pollen mother cells*, PMC). Každá se podrobí redukčnímu dělení za vzniku pylových tetrad, které se posléze rozvolní ve čtyři jednojaderné mikrospóry. První pylová mitóza je výrazně asymetrická a dává vznik menší buňce generativní (G), která zůstává umístěna uvnitř větší buňky vegetativní (V). Druhé pylové mitóze se podrobuje jen buňka generativní za vzniku dvou buněk spermatických (S). K druhému dělení pylu dochází buď ještě před otevřením prašníku a uzráním pylu (trojbuněčný typ, dole vlevo) nebo až při prorůstání pylové láčky bliznou (dvojibuněčný typ, dole vpravo). Oplození se účastní obě buňky spermatické, zatímco vegetativní buňka zaniká.

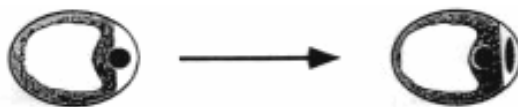
Obr. 60. Proces mikrosporogeneze a mikrogametogeneze u krytosemenných rostlin (podle Tanaky, 1993). Archesporiální buňky prašníku diferencují v pylové mateřské buňky (mikrosporocyty), které se podrobují meióze za vzniku tetrad haploidních buněk: každá tetráda posléze uvolňuje čtyři jednojaderné mikrospóry. První pylová mitóza je výrazně asymetrická a dává vznik menší buňce generativní (G), která zůstává umístěna uvnitř větší buňky vegetativní (V). Druhé pylové mitóze se podrobuje jen buňka generativní za vzniku dvou buněk spermatických (S). K druhému dělení pylu dochází buď ještě před otevřením prašníku a uzráním pylu (trojbuněčný typ, dole vlevo) nebo až při prorůstání pylové láčky bliznou (dvojibuněčný typ, dole vpravo). Oplození se účastní obě buňky spermatické, zatímco vegetativní buňka zaniká.



Podobně jako u živočichů, všechny čtyři produkty samčí meiózy jsou normálně životaschopné. Jádro mikrospóry se poté rozdělí výrazně asymetrickou mitózou na dvě zcela odlišné buňky. Velká buňka vegetativní má jádro s rozvolněným chromatinem, zatímco menší buňka generativní (která se nachází uvnitř buňky vegetativní, *the cell within the cell*) má jádro velmi kondenzované. Biochemické srovnávací analýzy těchto jader prokázaly, že generativní jádro (jakož i pozdější jádra spermatická) obsahuje některé specifické typy vysoce bazických histonů, které se nevyskytují ani ve vegetativním, ani v somatických jádrech (analogie s živočišnými protaminy). Při otevření květu jsou vytvořena značně dehydratovaná pylová zrna zabalená v pevném obalu (exině), která obsahují buňku vegetativní a generativní: u některých druhů rostlin dojde ještě v prašníku ke druhé pylové mitóze, která je symetrická a dá vznik dvěma shodným buňkám spermatickým (u zbývajících druhů tento proces nastává až v pylové láčce). Jakmile se pyl dostane na vlhkou bliznu, vyklíčí z něj pylová láčka, která prorůstá až do semeníku, kde se obě buňky spermatické účastní procesů oplození, zatímco jádro vegetativní buňky zaniká apoptózou.

Obr. 61. Modely pylové diferenciaci při první pylové mitóze (podle Eadyho et al., 1995). V obou modelech hraje klíčovou úlohu gametofytický faktor (oblasti jeho výskytu jsou vyznačeny tmavě), který specificky aktivuje geny vegetativní buňky a indukuje zde i celkové rozvolnění chromatinu. Přítomnost specifického represoru vegetativní buňky je označena šrafovaně, ve dvoubuněčném pylu je vegetativní buňka vždy vlevo a generativní buňka vpravo.

(I) **pasivní represe** : gametofytický faktor (*gametophytic factor, GF*) je lokalizován v mikrospóře polárně → jeho absence brání rozvolnění a aktivitě chromatinu generativní buňky



(II) **aktivní represe** : represor (*generative cell-specific repressor, GCR*) je v mikrospóře lokalizován polárně → blokáda účinku *GF* a udržování kondenzace chromatinu



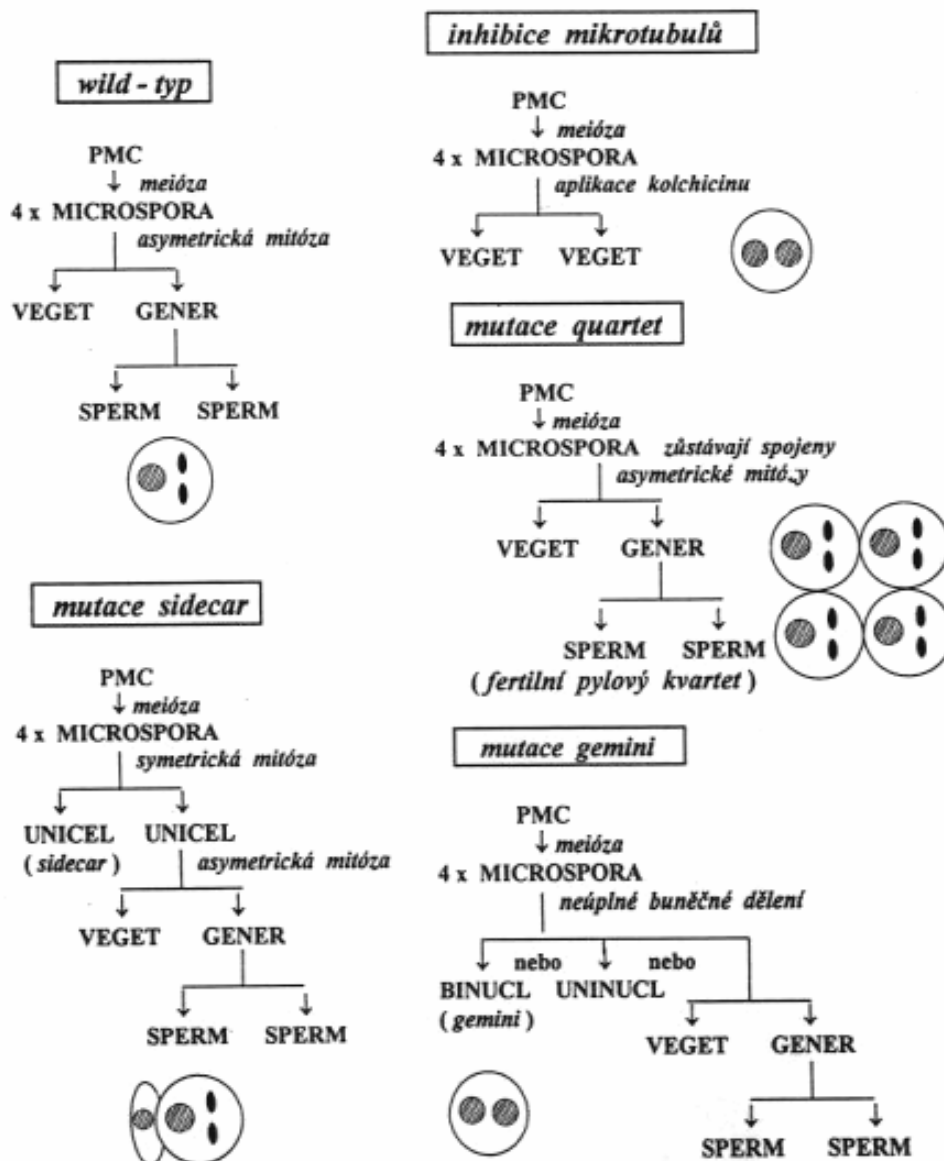
První pylová mitóza u krytosemenných rostlin je modelem ke studiu asymetrického buněčného dělení, kdy dochází k náhlé a výrazné změně stavu diferenciacce dceřinných buněk: její produkty se liší tvarem, velikostí, funkcí i chemickým složením chromatinu. Maturační studiu pylu *in vitro* prokázaly význam úlohy mikrotubulů a orientace mitotického vřeténka: inhibice mikrotubulů aplikací kolchicinu indukovala symetrickou mitózu a dvou buněk vegetativního typu. Asymetrická mitóza je tedy předpokladem diferenciacce na generativní a vegetativní buňku. Na základě těchto pokusů byly formulovány dvě hypotézy pylové diferenciacce: gradient putativního gametofytického faktoru popř. i aktivního represoru řídí sktrukturu chromatinu a následně i genové aktivity obou typů jader (obr. 61).

U modelové rostliny *Arabidopsis* byla izolována řada mutací, u kterých dochází v různých fázích vývoje samčího gametofytu k narušení první popř. druhé pylové mitózy. Takto byl například identifikován gen *TETRASPORE (TES)* nezbytný pro cytokinezi mikrospóry. U mutantů *tes* zůstávají všechna čtyři mikrosporová jádra ve stejné cytoplazmě a jen některá se vyvinou ve funkční pylová jádra. Dochází však k řadě abnormalit, včetně fúze jader nebo tvorbě ektopických buněčných stěn. Vajíčka opylená pylem *tes* často abortují, což je asi způsobeno excesem paternálních genomů v endospermu. Mutanty *tes* tedy odhalují gen specifický pro samčí meiózu. K identifikaci genů zahrnutých v procesu polarizace pylu byly izolovány čtyři mutanty zv. *gemini pollen*, které tvoří ne zcela rozdělené buňky (*twin-celled pollen*). Mutant *gemini pollen 1* byl dále charakterizován a ukázalo se, že působí gametofyticky s výsledkem redukované transmise přes obě pohlaví. Gen *gemini pollen 1* vykázal neúplně penetrantní fenotyp s výsledkem v ekválních, neekválních a částečných děleních při první pylové mitóze. Výsledky svědčí o změně symetrii buněčného dělení, funkce *GEMINI POLLEN 1* je zřejmě vyžadována k lokalizaci aktivity fragmoplastu. Při ekválních i neekválních děleních se ukázalo, že obě výsledná jádra jsou spíše typu vegetativního.

První, asymetrická mitóza dává standardně vznik větší buňce vegetativní a menší generativní. Byl identifikován gen *SIDECAR POLLEN (SCP)*, který je k tomuto typu dělení pylu vyžadován. Mutace vykazuje odlišnou gametofytickou penetranci a různou expresivitu v různých genotypech *Arabidopsis*, často vede k pylové sterilitě (obr. 62). Některý mutantní pyl tvoří extra-buňku u pylového zrna (proto název *sidecar*), která má charakter buňky vegetativní. Mutace ovlivňuje jak počet buněčných dělení v pylu, tak i pylovou viabilitu, jde o mutaci gametofytickou (důkaz pomocí tetradové analýzy). Vývojová dráha vedoucí k extra-vegetativní buňce je následující: první pylová mitóza je nestandardní a dává z uninukleární mikrospóry ekválním

Obr. 62. Vývoj samčího gametofytu u krytosemenných rostlin a některé jeho anomálie.

Standardně vznikají z pylové mateřské buňky (PMC) meiózou čtyři mikrospóry, z nichž každá se dělí nejprve asymetrickou mitózou na buňku vegetativní (šrafovaná jádra) a generativní: generativní buňka se poté dělí symetricky na dvě buňky spermatické (tmavé ovály). Když je první pylová mitóza experimentálně narušena (inhibice mikrotubulů kolchicinem), vznikají dvě shodná vegetativní jádra. U mutací *sidecar*, *quartet* a *gemi* dochází v různých fázích vývoje pylu k defektům, které mohou mít za následek i samčí sterilitu rostliny.

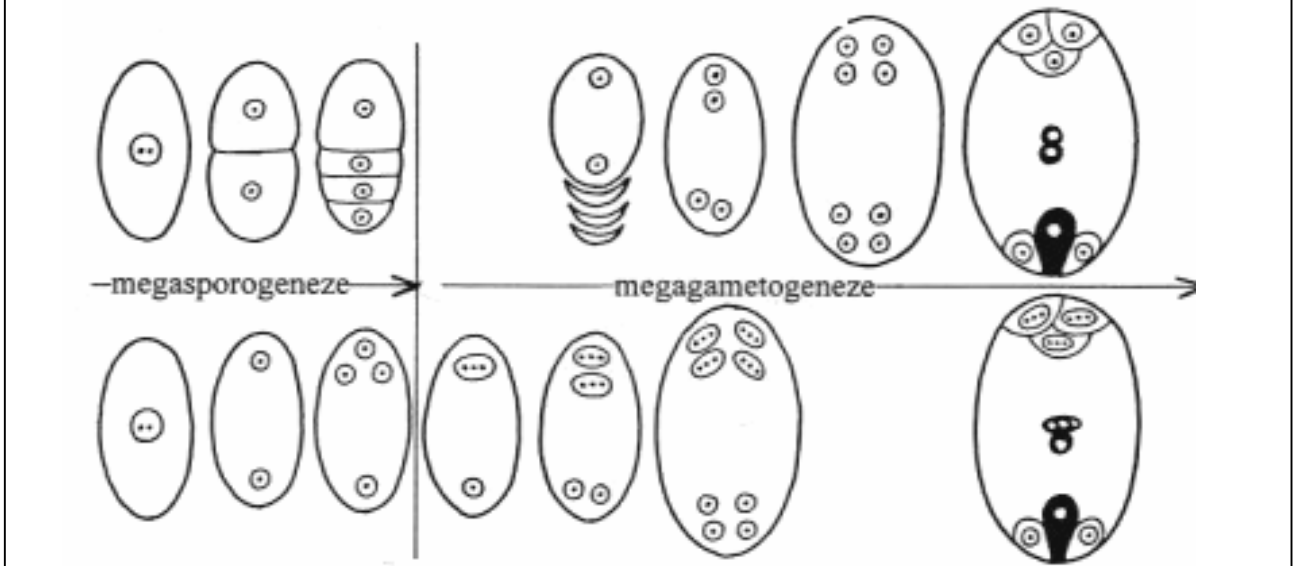


dělením vznik dvěma (stejným, nedeterminovaným) buňkám, z nichž jedna se stane (vegetativním) sidecarem (svrašťelé, sterilní pylové zrno) a druhá se rozdělí asymetrickou mitózou na buňku vegetativní a buňku generativní.

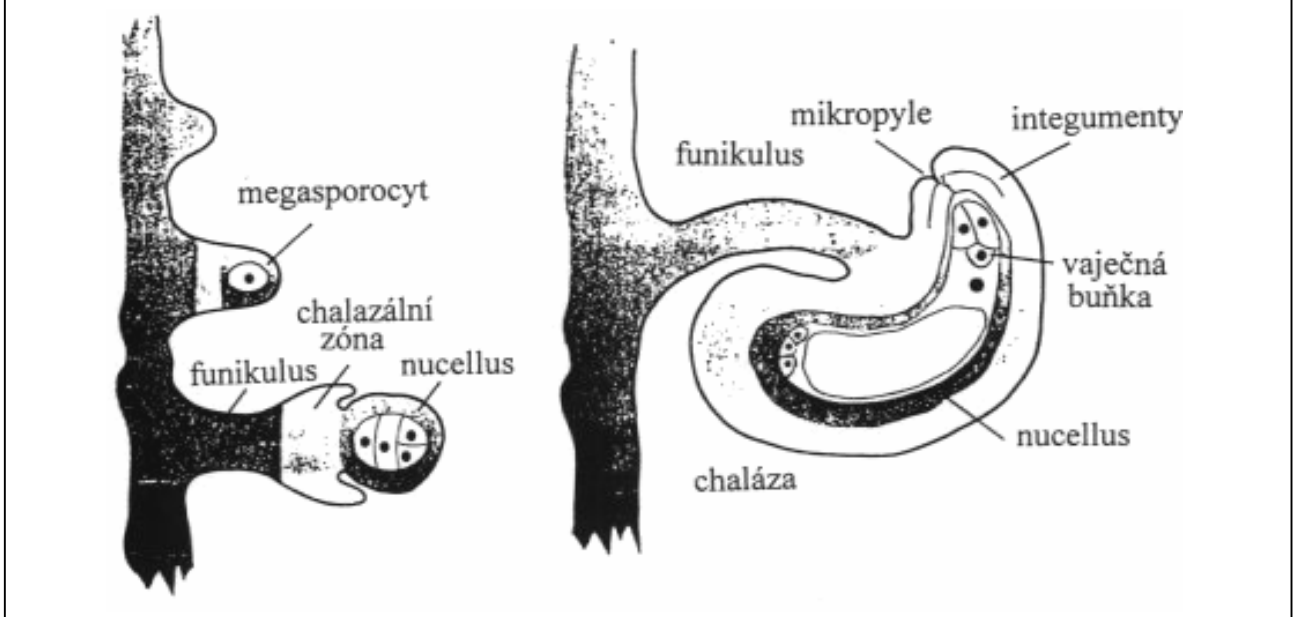
Dva geny nazvané *QUARTET* (*QRT*) jsou u *Arabidopsis* vyžadovány k separaci pylových zrn v průběhu normálního vývoje. U mutantů *qrt* jsou vnější stěny čtyř meiotických produktů pylové mateřské buňky fúzovány a pylová zrna se uvolňují v úplných tetradách. Pyl je viabilní a fertilitní a cytoplazmy uvnitř tetrad jsou diskrétní, oddělené. Opylení jednou tetradou dává vznik čtyřem semenům a genetická analýza prokázala, že markerové lokusy segregují v poměru 2:2. Tyto mutace tedy umožňují provádět tetradovou analýzu u *Arabidopsis* a definují stádia tvorby pylové stěny.

V samičím květním pohlavním orgánu, pestíku, dochází ve specializovaných buňkách (megasporocytech) k meióze, při níž vznikají čtyři haploidní spóry (megaspóry). V průběhu evoluce krytosemenných rostlin došlo ke značnému rozrůznění jejich dalšího vývojového osudu. U nejhojnějšího typu (zv. *Polygonum*, asi 80 % druhů) tři produkty meiózy programově zanikají a dalšímu vývoji se podrobuje jen jediná megaspóra (tzv. typ monosporický, obr. 63). Vývoj je tu tedy formálně analogický s živočichy, kde též přežívá jediný meiotický produkt a ostatní zanikají (polární tělíška). Z přežívající megaspóry se sérií tří mitotických dělení vyvine osmibuněčný megagametofyt (zárodečný vak) se dvěma cíli oplození: haploidní vaječnou buňkou (→ zygota) a diploidním centrálním jádrem (→ endosperm), ostatní buňky jsou jen podpůrné. U jiných druhů rostlin mohou přežít dvě nebo i všechny čtyři megaspóry. Samičí zárodečný vak se tvoří ve vajíčku, což je specializovaná struktura, odvozená z lůžka stěny semeníku (obr. 64). Zralý zárodečný vak některých druhů rostlin může mít nejednotnou úroveň genetické heterogenity, která závisí na tom, zda se jedno, dvě nebo všechny čtyři jádra megaspor podílejí na jeho utváření. Rozložení protoplazmy ve vaječné buňce je vysoce polarizované, což je způsobeno přítomností velkých vakuol na mikropylárním konci, které oddělují jádro a většinu cytoplazmy od konce chalazálního. Centrální buňka zárodečného vaku obsahuje dvě jádra, velkou vakuolu a množství cytoplazmatických organel. Je oplozena jedním spermatickým jádrem a vytváří se tak (obvykle) triploidní jádro primárního endospermu. Cytochemické analýzy ukázaly, že synergidy, centrální buňky a antipody mají velký počet ribozómů a mitochondrií, zatímco vaječné buňky mají ribozómů, plastidů a dalších organel méně a zdají se být relativně metabolicky klidové.

Obr. 63. Schéma dvou základních typů vývoje zárodečného vaku u krytosemenných rostlin (podle Černohorského, 1964). U typu monosporického (zv. *Polygonum*, horní řada) tři ze čtyř produktů meiózy zanikají a na tvorbě zárodečného vaku se podílí pouze jediná megaspóra. U typu tetrasporického (zv. *Fritillaria*, dolní řada) všechny čtyři megaspóry přežívají a společně dávají vznik geneticky heterogennímu zárodečnému vaku.



Obr. 64. Vývoj vajíčka krytosemenné rostliny probíhá diferenciací pletiva semeníku podél proximálně-distální osy (podle Howella, 1998). Primordium vajíčka dává postupně (na obrázku vlevo, shora dolů) vznik vajíčku, které má tři hlavní části: distální (nucellus), střední (chaláza) a bazální (funiculus). Zralé neoplozené vajíčko (vpravo) obsahuje především zárodečný vak, který je obklopen sporofytickými pletivy, zejména vaječnými obaly (integumenty).



Mutagenézou byla u *Arabidopsis* izolována samičí gametofytická mutace *fertilization-independent endosperm (fie)*. Mutace specificky ovlivňuje centrální buňku zárodečného vaku, umožňující replikaci centrálního jádra a vývin endospermu bez fertilizace. Mutace neovlivňuje vaječnou buňku, což naznačuje, že procesy, které řídí iniciaci embryogeneze a vývinu endospermu, jsou odlišné. U heterozygotů *FIE/fie* se obal semene a plodu podrobují na fertilizaci nezávislé diferenciaci, což ukazuje, že samičí gametofyt *fie* je zdrojem signálů, které aktivují sporofytický vývin obalů semene a plodu. Mutantní alela *fie* není přenášena přes samičí gametofyt: křížení heterozygotní samice *FIE/fie* s *wt*-samcem vede ke tvorbě šešulí s normálními semeny a neviabilními semeny, 1:1. Naproti tomu křížení *wt*-samic s heterozygotními samci *FIE/fie* s vedlo ke vzniku normálních semen, které daly vznik homozygotním *FIE/FIE* a heterozygotním rostlinám *FIE/fie*, 1:1. Samoopylení těchto heterozygotů dalo abortovaná a normální semena, 1:1. Tato normální semena však opět představují heterozygoty, opět segregují *FIE* a *fie* alely. Dědičnost této alely přes samičí gametofyt má tedy za následek aborci embrya, i když pyl nese *wt*-typ alely *FIE*. *FIE* tak představuje novou nezbytnou funkci pro samičí reprodukční vývin (obr. 65).

Byly také izolovány tři mutanty nazvané *fertilization-independent seed (fis)*, ve kterých nejsou určité procesy vývinu semene svázány s dvojím oplozením, které se odehrává po opylení. Tyto tři mutanty jsou mapovány na odlišné chromozómy. U semen *fis1* a *fis2* jsou autonomní jádra endospermu diploidní a endosperm se vyvíjí do stádia celularizace: částečně vyvinutá semena pak atrofují. Proembrya jsou tvořena jen v některých semenech a nevyvinou se dále než do globulárního stádia. Když jsou *FIS/fis* rostliny opyleny *FIS/FIS* pylem, 50 % výsledných semen se vyvine normálně (*FIS/FIS*), zbytek semen svraská a neklíčí - obsahují embryo zastavené ve stádiu torpéda (*FIS/fis*). V normální sexuální reprodukci produkty genů *FIS* hrají důležité regulační role ve vývinu semene po oplození (obr. 66).

K samičím gametofytickým mutacím patří zřejmě i maternální mutace *medea* u *Arabidopsis*: vykazuje aberantní růstovou regulaci v průběhu embryogeneze. Embrya odvozená z *medea* vajíček rostou extenzívně a odumírají v průběhu desikace. Letalita embryí není závislá na paternálním genomu ani genové dávce. Fenotyp *mea* odpovídá teorii parentálního konfliktu (tato mutace bude popsána v kapitole 3.2.2). Shrnutí některých známých gametofytických genů a mutantů je uvedeno v boxu 18.

Obr. 65. Dědičnost maternální gametofytické mutace *fertilization-independent endosperm (fie)* v reciprokých kříženích u *Arabidopsis thaliana* (podle Ohada et al., 1996). Mutace *fie* specificky ovlivňuje centrální buňku zárodečného vaku a umožňuje vývin endospermu bez oplození, nemá však vliv na vývin vaječné buňky. Funkcí wt-alely *FIE* je tedy zřejmě blokáda předčasného vývinu endospermu. Jak vyplývá ze schémat křížení, zárodečný vak vytvořený mateřskou rostlinou *FIE/fie*, který při meióze zdědí mutantní alelu *fie*, abortuje a mutace se tedy nepřenáší do potomstva. Naproti tomu v reciprokém křížení, kdy nositelem mutace je heterozygotní pylový donor *FIE/fie* veškeré potomstvo přežívá, avšak mutace se však přenáší do potomstva.

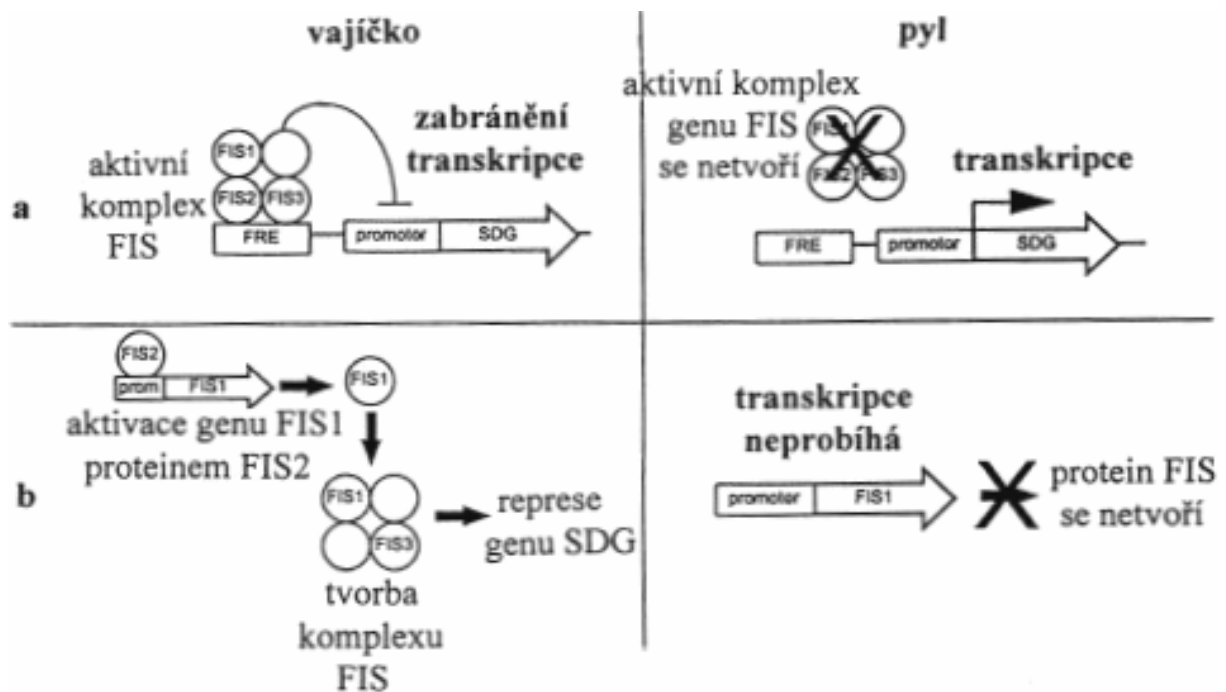
<i>FIE / fie</i>	x	<i>FIE / FIE</i>	
mateřská rostlina		pylový dárce	
	-		
		50 % <i>FIE / FIE</i>	(+ 50 % <i>fie / FIE</i> , abortující semena)
		normální semena	

<i>FIE / FIE</i>	x	<i>FIE / fie</i>	
mateřská rostlina		pylový dárce	
	-		
50 % <i>FIE / FIE</i>	+	50 % <i>FIE / fie</i>	
		pouze normální semena	
		-	
		-	samoopylení
		<i>FIE / FIE</i> + <i>FIE / fie</i>	
		normální semena	
			(+ <i>fie / FIE</i> , <i>fie / fie</i> , abortující semena)

Obr. 66. Modely účinku maternálních genů *Fertilization-Independent Seed (FIS)* na vývin semene *Arabidopsis thaliana* (podle Luo et al., 1999).

(a) Původní model aktivního komplexu FIS, podle kterého produkty genů *FIS* (proteiny FIS1-FIS3) se vážou na specifický regulační element (*FRE, Fis Response Element*), čímž dochází k potlačení transkripce genu spouštějícího vývin semene *SDG (Seed Development Gene)* ve vajíčku. V pylu nejsou geny *FIS* exprimovány, takže se represorový komplex nevytváří. Proces vývinu semene je tedy zahájen až po oplození.

(b) Model sekvenční regulace vychází z nejnovějších poznatků o charakteru regulačních proteinů kódovaných geny *FIS*. Produkt genu *FIS2* (transkripční faktor s motivem zinkových prstů) aktivuje gen *FIS1*, jehož produktem je represor s chromo-doménou (typu Polycomb, známého u drozofily a savců), který blokuje předčasnou expresi genu *SDG*. Tento model opět vychází z předpokladu geny *FIS* jsou exprimovány jen v samčím gametofytu a jejich úlohou je bránit předčasnému vývinu semene před oplozením.



Box 18. Přehled nejvýznamnějších genů, které hrají roli ve vývinu gametofytů u krytosemenných rostlin.

(a) samčí mikrogametofyt

- n** *TETRASPORE (TES)* → gen je vyžadován ke tvorbě přepážek mezi produkty meiózy. U mutanta všechna čtyři jádra mikrospóry zůstávají ve stejné cytoplazmě, vznikají polyploidní spermie, následkem je vysoká sterilita.
- n** *GEMINI POLLEN 1 (GEM1)* → gen je vyžadován k orientaci mitotického vřetenka. Mutant tvoří dvě symetrická jádra typu vegetativního, někdy spolu zůstanou v jediné buňce (*gemi*), sterilita.
- n** *SIDECAR POLLEN (SCP)* → gen je vyžadován k dělení pylu. První symetrická pylová mitóza mutanta dává dvě stejné buňky: jedna extra-vegetativní (sterilní *sidecar*) a druhá → vegetativní a generativní, mutace tedy nevede ke sterilitě.
- n** *QUARTET (QRT)* → gen je vyžadován k separaci pylových zrn. U mutantů jsou stěny meiotických produktů pylové mateřské buňky fúzovány a zrna se uvolňují v tetrádách (možná tetrádová analýza).

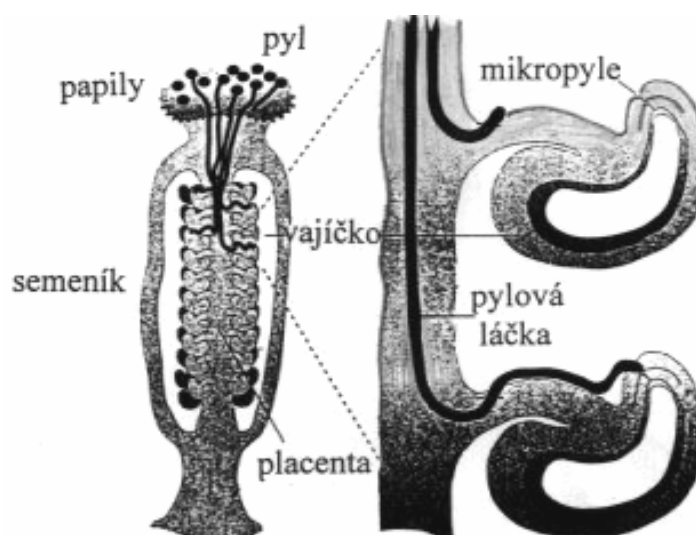
(b) samičí makrogametofyt

- n** *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED (FIS)* a *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* → geny hrají regulační role ve vývinu semene po oplození. U mutantů se diploidní jádra endospermu vyvíjejí bez oplození, pak atrofují. Mutace neovlivňují vaječnou buňku → procesy embryogeneze a vývinu endospermu jsou tedy zřejmě odlišné.
- n** *MEDEA (MEA)* → mutace genu způsobuje hypertrofii a zánik embrya. Není dosud jasné, na jaké úrovni se gen projevuje: zárodečný vak, endosperm nebo maternálně imprintovaný embryonální gen?

3.2.2 Oplození, embryogeneze a tvorba semene

Prvním krokem k procesu oplození je opylení, které současně představuje model ke studiu mezibuněčných komunikací, polárního růstu pylové láčky i interakcí s častým vektorem přenosu pylu na samičí bliznu - hmyzem. Pokud se pylová zrna dostanou na bliznu, nastává jejich hydratace a pyl klíčí v pylové láčce. Ty nejdříve penetrují skrze buněčnou stěnu papil blizny a poté rostou bazipetálně skrze průchodný trakt čnělky až se vynoří z placenty v blízkosti funikulu vajíčka a vniká do něj mikropylárním otvorem (obr. 67). Růst pylové láčky je typem jednosměrného růstu, jako je tomu u vláken hub. Její špička obsahuje velký počet sekrečních váčků, které jsou tam dopravovány prouděním cytoplazmy. Vnitřní kostra rostoucí špičky láčky je tvořena vlákny aktinu: aplikace inhibitoru polymerizace aktinu zastavuje její růst. Procesy diferenciací a založení buněčné polarity související s funkcí aktinu jsou kódovány geny z GTPázové rodiny (prokázána klíčová funkce specificky exprimovaného genu *Rop 1*).

Obr. 67. Schéma procesu opylení u *Arabidopsis* (podle Howella, 1998). Pyl klíčí na papilách blizny a pylové láčky prorůstají skrze pletivo krátké čnělky do semeníku (vlevo). Pylové láčky poté vyrůstají z placenty a mikropylárním otvorem pronikají do zárodečného vaku vajíčka (vpravo, obvykle skrze jednu ze synergid). Zatímco vegetativní jádro pylu zaniká, obě spermatická jádra se účastní oplození: jedno oplodí buňku vaječnou (\rightarrow zygota \rightarrow embryo), druhé splývá s centrálním jádrem zárodečného vaku (\rightarrow triploidní endosperm).



Počáteční dělení zygoty jsou analogická rýhování živočišných vajíček, ve kterých dceřinné buňky si nezanechávají svůj původní objem před dalším dělením. První dělení zygoty je **asymetrické**, dává vznik malé apikální buňce a velké bazální buňce. Apikální buňka dává vznik vlastnímu **embryu** (vyjma části kořene, která se odvodí z bazální buňky). Bazální buňka také tvoří extraembryonální suspenzor, který „tlačí“ rostoucí embryo do endospermu. V 16-buněčném stádiu má vlastní embryo 8 vnějších buněk, které dají vznik epidermis, a 8 vnitřních buněk. Toto stádium je počátkem **globulárního stádia**, v průběhu kterého je vlastní embryo sférické. S přechodem do stádia **srdce** získává embryo bilaterální symetrii, která souvisí s počátkem tvorby děloh. Když má embryo asi 100 buněk, jsou již patrná primordia kořene, prýtu a vodivých pletiv: základní stavba, struktura (*pattern*) rostliny je tedy založena ve stádiu srdce (obr. 68).

Obr. 68. Schéma embryogeneze a vývinu semene u dvouděložné krytosemenné rostliny (podle Goldberga et al., 1994). Po fertilizaci dochází k první výrazně asymetrické mitóze, při které vzniká menší buňka apikální (A, která posléze vytvoří téměř celé embryo) a větší buňka bazální (B, dávající vznik části kořene a především výživovému extraembryonálnímu suspenzoru, S). Embryo (EP, *embryo proper*) se začíná diferencovat z apikální buňky při přechodu globulárního stádia - srdce. Základní plán těla je vytvořen ve stádiu srdce (patrná osa, O, a děložní lístky, C), kdy embryo získává bilaterální symetrii. Poté se diferencují základy apikálního (SM, *shoot meristem*) a kořenového meristému (RM, *root meristem*) a kolem embrya endosperm (En).

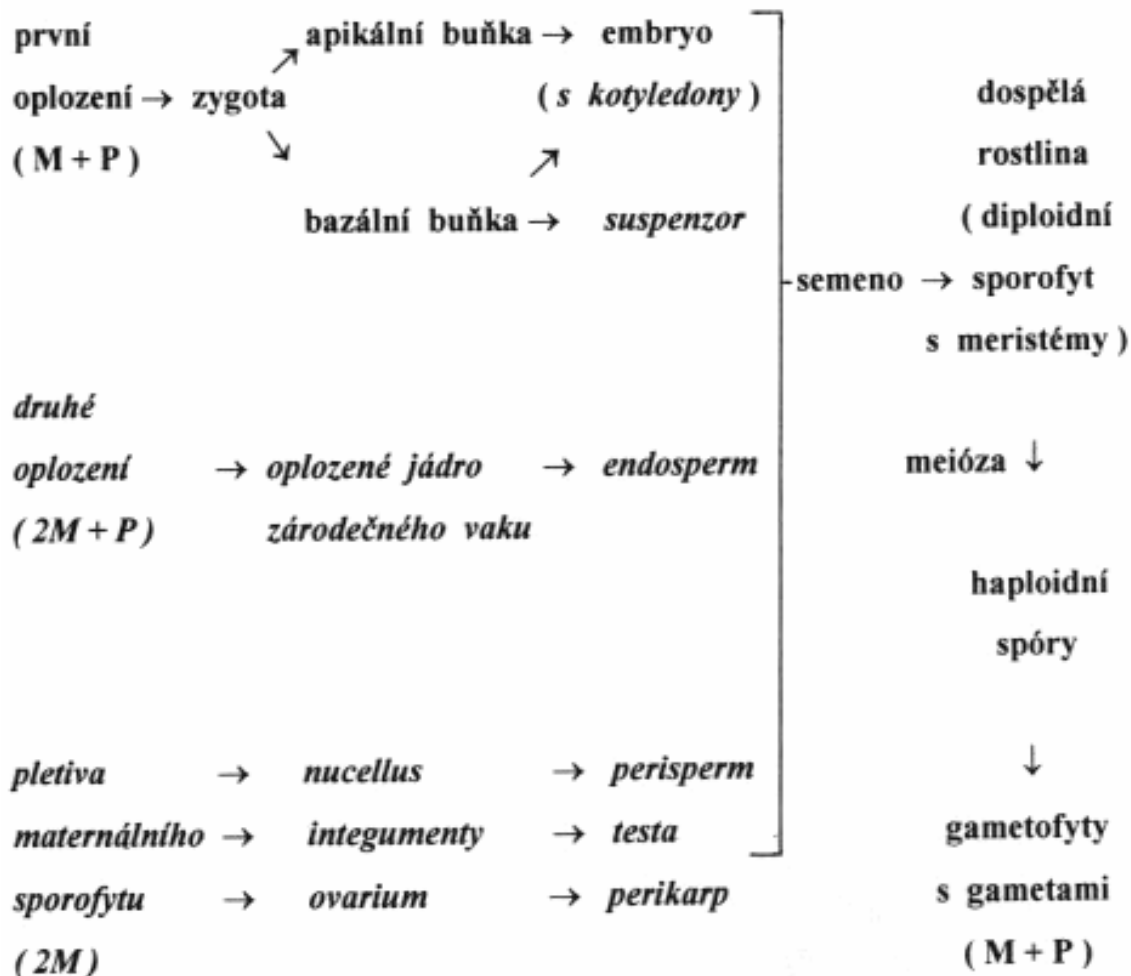


Tvorba embrya. Sporofytická generace začíná dvojitým oplozením a následným vytvořením zygoty a základní buňky endospermu. Embryogeneze zahrnuje následné období vývoje, během kterého zygota prochází složitou sérií morfologických a buněčných změn vyúsťujících ve vytvoření zralého zárodku, jehož další vývoj se dočasně pozastavuje v klidovém semenu. Děje odehrávající se během zárodečného vývoje vytvoří základní organizaci rostlinného těla a připraví zárodek k dormanci i ke klíčení. Jednobuněčná zygota se dělí asymetricky a dává tak vznik dvěma odlišným buňkám. Příčinou, proč dvě dceřinné buňky zygoty získávají rozdílné charakteristiky v závislosti na své poloze, může být fakt, že bazální buňka na rozdíl od buňky apikální je přichycena k okolnímu mateřskému pletivu (má tedy jinou poziční informaci). Rostlinnou embryogenezi lze rozdělit do tří hlavních fází, ve kterých se odehrávají významné vývojové a fyziologické děje: (i) postfertilizace až proembryo, (ii) přechod od globulárního stádia k fázi srdce, (iii) zvětšování základů orgánů a zralost embrya. Embryonální orgány a odlišná pletiva se diferencují během přechodu globulární stádium → srdce. Zralé embryo je složeno ze dvou základních orgánových soustav, osy (oblast hypokotyl - kořínek) a děloh, a dále některých mimozárodečných pletiv, která jsou přítomna v semenu, ale později jsou eliminována (endosperm, perisperm a testa). Embryo je v pozdějších fázích embryogeneze opět přestavěno. Apikálně-bazální osa semenáčku se dělí na pět základních částí: vrcholový meristém, dělohy, hypokotyl, kořen a kořenový meristém.

U krytosemenných rostlin, podobně jako u placentálních savců, dochází k vývinu embrya uvnitř těla matky. S tím souvisí i jejich malé vaječné buňky s minimální zásobou nutričních látek. Dosavadní výsledky také naznačují, že geny s maternálními účinky zřejmě hrají jen vedlejší úlohu v časném vývinu embrya. U rostlin i savců došlo v průběhu evoluce k vývoji specifických struktur, jejichž úlohou není jen poskytovat embryu výživu, ale také vytvořit mu i vhodné okolní prostředí. Tak se vyvinuly systémy zárodečných výživných pletiv a obalů. Dokonce většina buněk, časných derivátů zygoty, se nestane součástí embrya nebo mladého jedince: u rostlin vytváří suspensor nebo děložní lístky. U krytosemenných rostlin se unikátně vyvinulo druhé oplození: výsledkem je obvykle polyploidní buňka, která dá vznik výživovému pletivu, ve kterém se hromadí zásobní látky, které podporují vývin embrya a popřípadě i klíčení semene. Evoluční původ endospermu je dosud nejasný. Dosavadní výsledky naznačují, že obě spermatické buňky, které pronikají do zárodečného vaku, jsou ekvivalentní: preferenční fertilizace (tj. jedna spermie determinovaná k oplození buňky vaječné a tvorbě zygoty a druhá k fúzi s centrálním jádrem zárodečného vaku a tvorbě endospermu) je jevem jen zcela

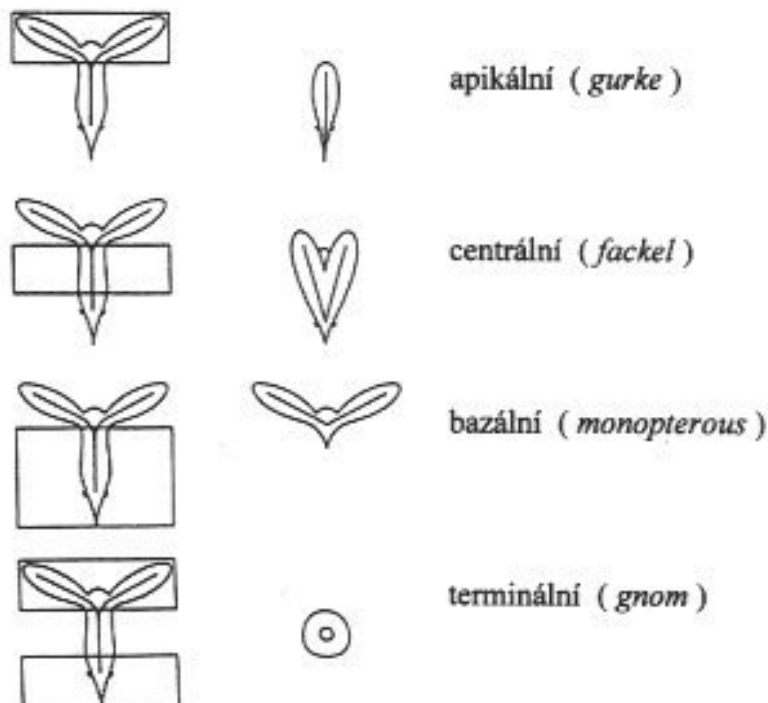
výjimečným. Úloha endospermu je kriticky důležitá: mutace postihující endosperm vedou obvykle k letalitě embrya. Příomou součástí zralého semene (nikoli však embrya) jsou i pletiva maternální (obr. 69).

Obr. 69. Hlavní buněčné linie krytosemenných rostlin. Podobně jako u savců (kde se též embryo vyvíjí uvnitř těla matky), se některé linie buněk odvozených ze zygoty stávají u rostlin extraembryonálními (zejména suspensor). Unikátní embryonální strukturou jsou děložní lístky s výživovou funkcí. Jsou derivátem apikální buňky a regulerní součástí embrya, záhy po klíčení však zanikají. U krytosemenných rostlin se ovšem evolučně vyvinulo dvojí oplození: „druhou zygotou“ je (obvykle triploidní až pentaploidní) endosperm, opět výživové, extraembryonální pletivo. Součástí zralého embrya (semene) jsou také pletiva maternálního sporofytu (zejména výživový perisperm a osemení). (M) značí maternální a (P) paternální genomy. Kurzívou jsou vyznačena pletiva, která již nejsou součástí dospělého sporofytu.



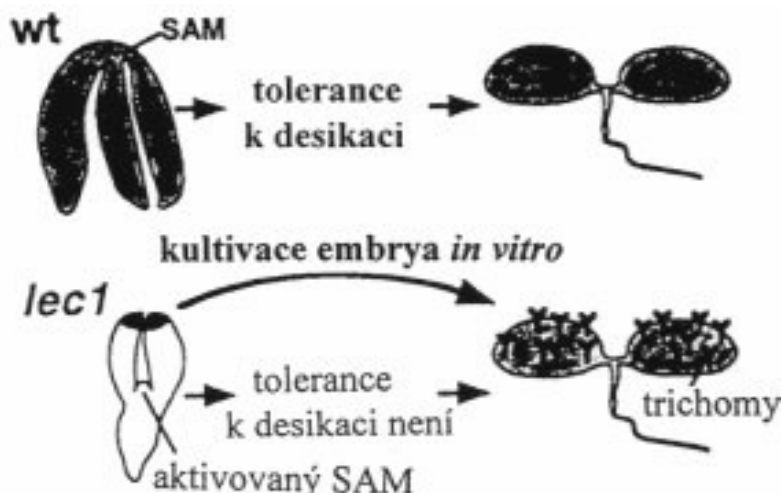
Většina druhů rostlin má velký genom a dlouhou generační dobu, což je nevýhodné jak pro klasickou genetickou analýzu, tak molekulární genetiku. Výjimkou je *Arabidopsis*: generační doba je asi 2 měsíce, tvoří mnoho semen, je autofertilní (což je výhodné k detekci homozygotních mutantů) a má malý genom (7×10^7 bp) srovnatelný s hlísticí a drozofilou. K izolaci mutantů a genů je využívána radiační a chemická mutagenese, mobilní genetické elementy a transgenese, podobně jako u drozofily. Pomocí saturační mutagenese bylo u *Arabidopsis* prokázáno, že tvorba struktury (*pattern formation*) v rostlinných embryích zahrnuje 25 až 50 specifických genových funkcí. Základní skupinou mutantních fenotypů jsou mutace, které ovlivňují tři aspekty organizace embrya (obr. 70): **apikálně-bazální strukturu** (vedou k delecím různých částí rostliny podle příslušných fenotypů - apikální, centrální, bazální nebo terminální), **radiální souměrnost** (není např. možné morfologicky odlišit vnější epidermální buněčnou vrstvu od vrstev vnitřních) a konečně **tvar** embrya (celkové abnormální tvary rostlin).

Obr. 70. Čtyři základní typy mutantů *Arabidopsis*, které ovlivňují strukturu embrya podél apikálně-bazální osy (podle Kalthoffa, 1996). Tyto mutace vedou k delecí celých rozsáhlých částí embrya a obvykle i k aborci. Svým projevem připomínají mutace genů velkých mezer (*gap genes*) u octomilky. Na obrázcích vlevo je obdélníkem znázorněno, která část normálního semenáčku u příslušného mutantu chybí. Mutantní fenotypy jsou zobrazeny vždy vpravo. Apikální a bazální respektive centrální a terminální mutanty jsou vzájemně komplementární.



Jednou z klíčových skupin genů řídících procesy embryogeneze jsou geny *LEAFY* *COTYLEDON*. Mutace *leafy cotyledon 1 (lec1)* byla původně popsána u *Arabidopsis* jako defekt ve zrání embrya a desikaci, která měla za následek vznik embrya s promíchanými znaky embrya a semenáčku (obr. 71). Jeho kotyledony měly trichomy, znak pravých listů. Lotan et al. (1998) zjistili, že defekty se již vyskytují v globulárním stádiu, v suspensoru. *LEC1* gen se jeví být obecným regulátorem několika embryo-specifických procesů. Gen byl identifikován T-DNA inzercí a bylo zjištěno, že vykazuje signifikantní homologii k podjednotce CCAAT-box-vazebnému transkripčnímu faktorů. Je exprimován v oktantním stádiu embrya včetně suspensoru a endospermu. Exprese nebyla zjištěna v žádném pletivu po stádiu pozdního torpéda. Introdukce ektopického konstruktů 35S::*LEC1* (strukturní oblast genu *LEC1* naklonovaná pod silným konstitutivním promotorem) do *lec1* mutantních rostlin komplementovala mutantní fenotyp, ale bylo získáno jen málo viabilních desikovaných semen. Semenáčky měly řadu abnormalit, včetně několika pseudokotyledonových orgánů a kalusujících listů. Několik embryo-specifických genů bylo exprimováno v semenáčcích, embryonálně-specifické programy tedy fungovaly ektopicky. Dvě rostliny v potomstvu tvořily spontánně embryonální struktury na listech, což bylo zřejmě způsobeno expresí určitých embryonálních genů.

Obr. 71. Fenotypový projev mutace *leafy cotyledon 1 (lec1)* na vývin embrya *Arabidopsis thaliana* (podle Lotana et al., 1998). Funkce standardní alely genu *LEC1* je vyžadována ke specifikaci tvorby děložních lístků a zrání embrya. Jeho mutace má pleiotropní účinky, které se projeví letalitou embrya, pokud není dopěstováno v kultuře *in vitro*. Nahoře je znázorněno standardní embryo, které prochází přes klidové stádium (desikace) ke tvorbě semenáčku. Mutantní embryo (dole) je intolerantní vůči vysychání a tvoří jen krátkou osu s aktivovaným meristémem (SAM) a nezakřivenými dělohami, na kterých se tvoří trichomy (znak pravých listů).



Rostlinné buňky jsou totipotentní, mohou dávat vznik rostlinám bez fertilizace, somatická embryogeneze je jednou z forem nezygotického embryonálního vývoje (jinými jsou např. androgenese nebo apomixis). Co indukuje embryonální tvorbu za nepřítomnosti fertilizace? Experimentálně lze navodit somatickou embryogenezi aplikací a pak odstraněním auxinu, mechanismus je však neznámý. Tvorba embryí na listech ektopicky exprimujících *LEC1* je odlišná: nevyžaduje auxin ani prostředí tkáňových kultur. Regulační gen *LEC1* je tedy vyžadován k indukci buněčného prostředí, které aktivuje embryonální dráhu (obr. 72). Další z několika známých mutací ovlivňujících embryonální program je *pickle (pkl)*, u které si primární kořenový meristém zachovává charakter embryonálního pletiva. Mutace také vede k prolongovanému embryonálnímu stavu a způsobuje spontánní somatickou embryogenezi *in vitro*. Expres této aberantní diference je suprimována gibberelinem. Kdykoli je tedy zachován embryonální program, obecnou odpovědí je tvorba somatických embryí.

Obr. 72. Model řízení pozdní embryogeneze u *Arabidopsis* (podle Westhoffa et al., 1998).

Produkt genu *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC 1)* spouští expresi genů *LEC 2* a *FUSCA 3*, které jsou odpovědné za dokončení procesů embryogeneze a potlačení předčasného klíčení semene.

Produkt genu *ABI 3 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3)* je nezbytný k rezistenci semen vůči vysychání, jeho mutace vedou k viviparii.

embryo ve stádiu torpéda

β

Ⓡ dokončení normální embryogeneze

Ⓡ *LEC 2* - Ⓡ

LEC 1

ý potlačení listového fenotypu v kotyledonech

Ⓡ

Ⓡ *FUS 3* - Ⓡ potlačení předčasného klíčení → - *ABI 3*

Ⓡ aktivace programu
pozdní embryogeneze →

β

zralé embryo

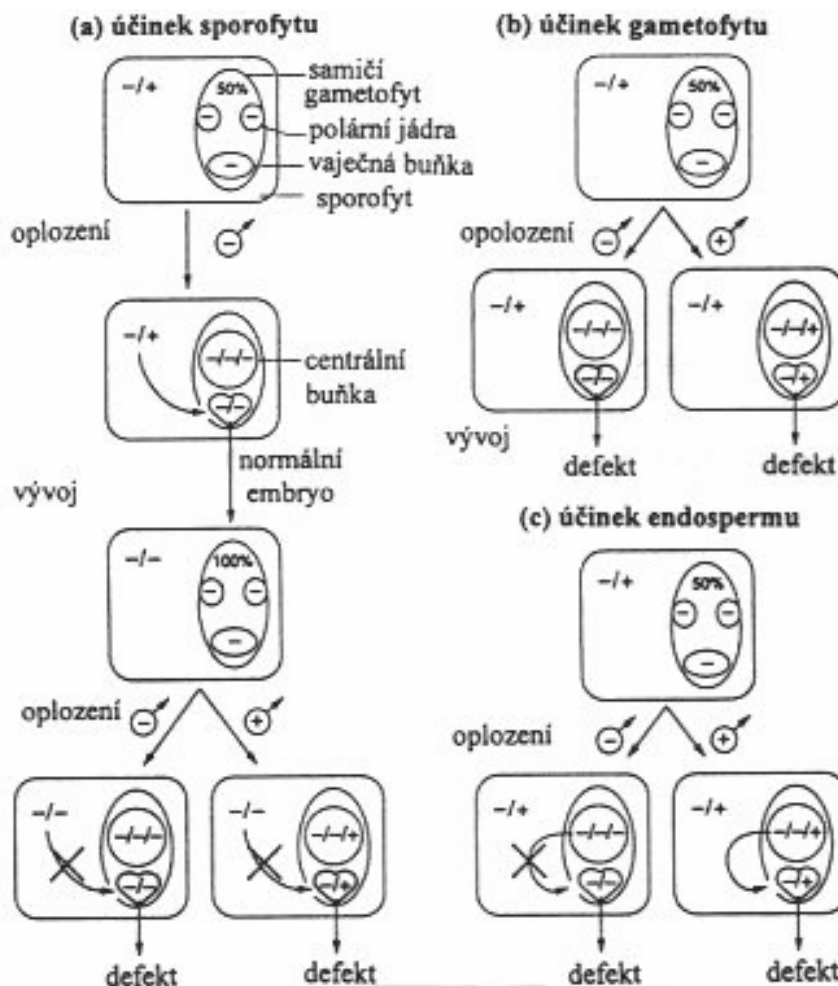
Mnohé údaje ukazují, že metylace DNA hraje podobnou regulační úlohu jak ve vývoji rostlin, tak i savců. Bylo například zjištěno, že množství 5-metylcytosinu v jaderné DNA se od stádia semen do stádia klíčících rostlinek významně snížilo. Změny metylace DNA zjevně souvisejí s regulací genové aktivity v diferencujících se rostlinných buňkách v různém stádiu ontogeneze. Dosavadní výsledky naznačují, že po fertilizaci a během vývoje a maturace může být DNA embrya podrobena *de novo* metylacím i demethylacím: klíčení a následná buněčná dělení a růst způsobují dramatický pokles v celkové genomové metylaci.

Endosperm a genomový imprinting. Původ endospermu je spojen s druhým oplozením, kdy spermatické jádro splývá se dvěma jádry pólovými za vytvoření obvykle triploidního endospermu. Tento unikátní proces může být důležitý pro zachování epigenetických rozdílů, které řídí vývoj endospermu a zárodku. Kermicle a Alleman (1990) předpokládají, že genomový imprinting, uskutečňovaný v souvislosti s nestejným příspěvkem genů od rodičů, by mohl vést k odlišným hladinám genové exprese. Nepřítomnost endospermu ve zralých semenech četných druhů rostlin naznačuje, že endosperm je vstřebáván rostoucím zárodkem. Některé mechanismy, účastníci se procesu degradace endospermu během embryogeneze, byly recentně popsány: metodou *TUNEL* (tj. *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling*) byla během klíčení zrn ječmene pozorována fragmentace DNA v aleuronu. Fragmentace jader (naznačující apoptózu) začala v blízkosti embrya a rozšiřovala se do buněk aleuronu dále od zárodku v závislosti na čase: stejná kinetika byla zjištěna u hydrolytických enzymů. Dramatický nárůst obsahu jaderné DNA je běžným jevem v průběhu vývoje endospermu, úroveň ploidie dosahuje hodnot až 300C. Podobný nárůst obsahu jaderné DNA se odehrává i ve vyvíjejících se buňkách děloh luštěnin. Je možné, že tyto procesy odrážejí amplifikaci genů kódujících enzymy účastníci se syntézy zásobních proteinů a karbohydrátů.

Geny s maternálním účinkem jsou známy u živočichů, ale u rostlin jsou jen výjimečné. Jednou z možných interpretací funkce takových genů je, že gen je imprintován, takže alela zděděná ze samičího gametofytu je aktivní, zatímco alela ze samčího gametofytu se podrobuje epigenetickému umlčování. U vývojově méně pokročilých rostlin je gametofyt volně žijící, zatímco u nahosemenných a krytosemenných rostlin je vázán na sporofyt. U těchto vyšších rostlin není navíc jasné, do jaké míry je vývoj embrya závislý na extrazygotických vlivech (endosperm a sporofyt). Možnost, že extrazygotické buňky přímo řídí expresi určitých genů v embryu, není jasná. Existují přinejmenším tři takové možné extrazygotické vlivy na embryo: sporofytický maternální efekt, gametofytický maternální efekt a efekt endospermu:

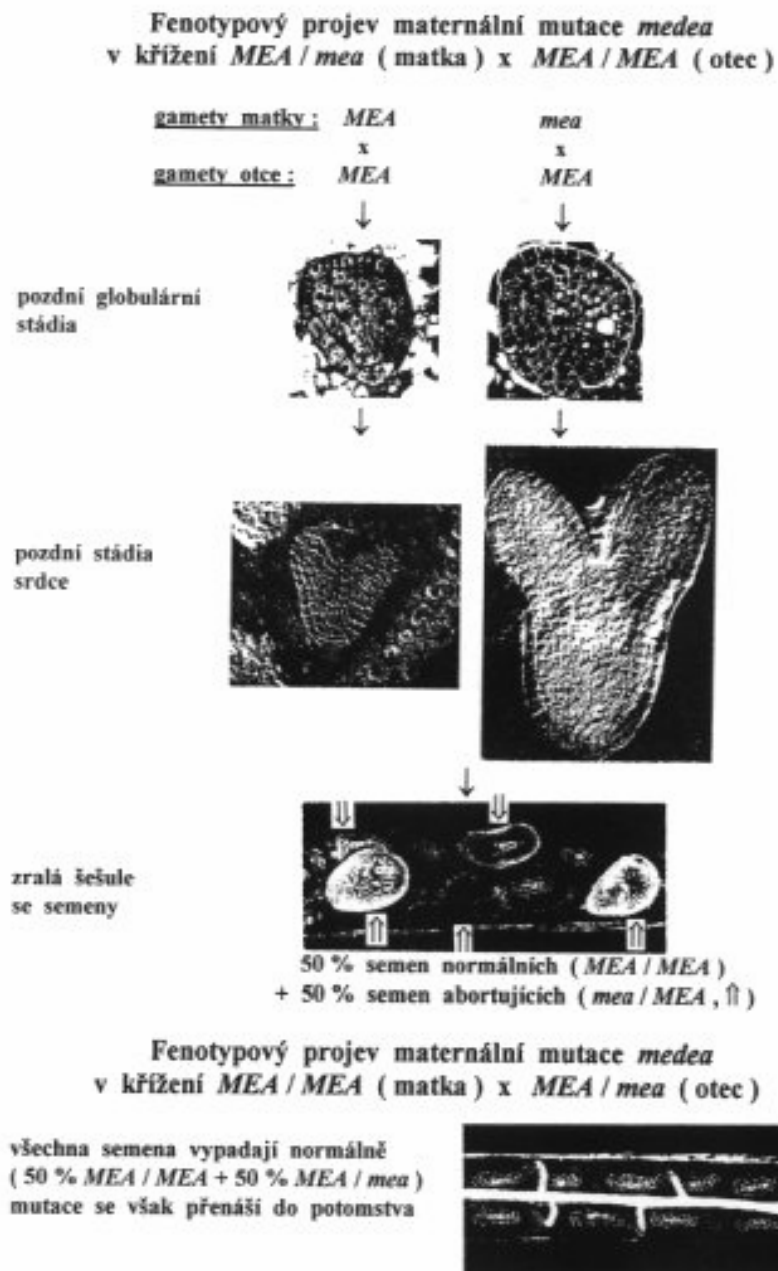
(a) **sporofytický maternální efekt** je manifestován geny, které jsou exprimovány v diploidním sporofytu, ale jejichž produkty jsou vyžadovány v embryu nebo endospermu. (b) **gametofytický maternální efekt** - geny jsou exprimovány v samičím gametofytu - a jejich efekt nemůže být nahrazen genovou expresí v embryu nebo endospermu. (c) **endospermový efekt** - výsledek genů, které jsou funkční jen v endospermu, ale ovlivňují nepřímo i embryogenezi (obr. 73).

Obr. 73. Extrazygotické účinky genů na embryogenezi (podle Raye, 1998). (a) Sporofytický maternální efekt (jak je znám u řady živočišných druhů) je zprostředkován produkty diploidního sporofytického pletiva. Homozygotně recesivní mateřský organizmus pak není schopen dát vznik žádným standardním embryím. (b) Gametofytický maternální efekt je způsoben geny specificky exprimovanými v samičím gametofytu (haploidním zárodečném vaku) a jejich mutace nemůže být reparována expresí v embryu nebo endospermu. (c) Expresí genů v endospermu významně ovlivňuje vývin embrya. Geny v endospermu mohou být navíc sex-specificky imprintovány. Velké boxy představují sporofytické pletivo vajíčka, které zahrnuje samičí gametofyt (ovály) nebo později embryo (symbol srdce) a endosperm (velké kruhy).



Recentně byl u *Arabidopsis* izolován gen *MEDEA*, který odpovídá za maternální účinky na růst embrya a endospermu. Jeho mutace se projevuje gigantickým vývinem embrya a jeho následnou aborcí (obr. 74).

Obr. 74. Fenotypový projev a dědičnost maternálního genu *MEDEA* (podle Grossniklause et al., 1998). Opylení heterozygotní rostliny *MEA/mea* wt-pylem vede k aborcí gigantických embryí s mutantní maternální alelou. Po opylení wt-rostliny pylem mutanta *MEA/mea* abortivní embrya nevznikají, mutantní alela se však přenáší do potomstva.



Když jsou *mea/+* rostliny samoopyleny, 50 % semen abortuje v pozdním vývoji. Tato segregace 1:1 je charakteristická pro mutaci, která disruptuje gen vyžadovaný v samičím gametofytu, protože polovina haploidních gametofytů nese mutantní alelu. Požadavek produktu *MEA* v samčím gametofytu však nemusí být zjevný, protože množství pylu přicházející na bliznu obvykle vysoce přesahuje počet pylových zrn k fertilizaci. Reciproké křížení však efekt genu *mea* v samčím gametofytu vyloučilo: když *mea/+* rostliny byly použity jako samečci k oplození WT samiček, tvorba semen byla normální a 50 % potomstva neslo mutaci *mea*. Transmise mutace přes pyl tedy nebyla ovlivněna, zatímco *mea/+* samičky opylené WT samečkem nepřenášely mutaci do potomstva. U mutace *mea* (na rozdíl od jiných známých mutací samičího gametofytu) se gametofyt vyvíjí normálně a je normálně oplozen, avšak 50 % semen kolabuje v pozdním vývoji jako následek defektů v embryu a endospermu. Letalita embryí způsobovaná mutací *mea* je proto gametofyticky řízeným maternálním efektem. Mutantní embrya se vyvíjejí normálně, ale od pozdního globulárního stádia jsou větší než wt-embrya (až 10krát), jejich morfogeneze je však výrazně pomalejší a posléze degenerují v průběhu desikace semen. Apikálně-bazální osa a radiální uspořádání postiženy nejsou. Časný endosperm je normální, ale v době, kdy dochází k první manifestaci defektů embrya, je zpožděna celularizace endospermu a redukují se buněčná dělení.

Jestliže *MEA* působí primárně v endospermu, potom maternální letalita *mea* mutací by mohla mít za následek senzitivitu k zygotické dávce genů v triploidním endospermu: *mea/mea/+* endosperm, tvořený když *mea* samičí gametofyty jsou fertilizovány WT pylem, je mutantní, zatímco *+/+/mea* endosperm z reciprokého křížení je normální (obr. 75). K otestování této hypotézy Grossniklaus et al. provedli manipulaci s dávkou genů křížením *mea/+* samiček s tetraploidním samečkem, který tvořil diploidní pyl se dvěma *MEA* kopiemi. Semena z tohoto křížení měla 50 % aborcí, což naznačuje, že dávka genů *MEA* v endospermu nevysvětluje maternální efekty *mea* mutace. WT *MEA* alela je tedy nezbytná pro samičí gametofyt. Protože tento gametofyt je haploidní, nebylo jasné, zda *mea* mutace je dominantní či recesivní. Proto byla mutace introdukována do tetraploidní rostliny, aby samičí gametofyt byl diploidní. Výsledky křížení pak ukázaly, že *mea/+* gametofyty jsou WT typu a tedy *mea* je mutací recesivní (*a recessive loss-of-function mutation*). Z toho vyplývá, že alela *MEA* způsobuje buď restrikci buněčné proliferace v embryu nebo podporuje jaderné dělení v endospermu.

MEA lokus byl izolován technikou *transposon-tagging* a sekvenován: analýza ukázala, že *MEA* kóduje protein podobný drozofilímu proteinu ze skupiny Polycomb (Enhancer of Zeste),

což jsou strukturně zvláštní proteiny identifikované na bázi obecné funkce v blokování transkripce homeotických genů, které specifikují identitu tělních článků u drozofily. Proteiny Polycomb jsou vyžadovány nikoli k vypnutí jejich cílových míst v průběhu časně embryogeneze, ale spíše k zajištění toho, aby vypnutý stav byl udržován (zapamatován), jak se buňky postupně dělí v průběhu embryonálního i pozdějšího vývoje. Tyto proteiny také regulují buněčnou proliferaci: např. mutanty *e(z)* mají dekondenzované chromozómy, které fragmentují v průběhu mitózy. Je to nepřímým důkazem, že tyto proteiny mohou být přímo vyžadovány jako strukturní komponenty zahrnuté v kondenzaci chromozómů.

Obr. 75. Účinky ploidie, rodičovského původu a genetické konstituce embrya a endospermu genu *MEDEA* na vývin embrya *Arabidopsis* (podle Raye, 1998). Jsou znázorněna reciproká křížení diploidních rostlin (první dva řádky) a diploidních rostlin s tetraploidními (dolní tři řádky) nesoucími wt-alelu *MEDEA* (+) nebo alelu mutantní (-). Ve sloupcích jsou uvedeny příslušné genotypy haploidních gamet, diploidního embrya a triploidního endospermu a fenotypy embryí. Z výsledků křížení vyplývá: (1) mutace se u embrya projeví jen tehdy, pokud je mutantní alela maternálního původu, a (2) mutace je recesivní. Pokud je gen *MEDEA* imprintován, mělo by jít o specifickou maternální expresi v endospermu. Ze srovnání genotypů endospermu a fenotypů embrya vyplývá, že mutace se projeví jen tehdy, pokud v endospermu není žádná maternální, potenciálně funkční alela *MEDEA*. Lze uvažovat i o vlivu počtu wt-alel *MEDEA*: mutace se projeví jen nízkém poměru alel *MEDEA* k počtu genomů endospermu ($\leq 1 : 2$).

<u>genotyp <i>MEDEA</i></u>				fenotyp embrya	poměr počtu wt-kopíí genu <i>MEDEA</i> k ploidii endospermu
vajíčko	pyl	embryo	endosperm		
-	-	-	-	-	
+	-	+/-	+ +/-	normální	2 : 3
-	+	-/+	- -/+	<u>abnormální</u>	1 : 3
-	++	-/+ +	- -/+ +	<u>abnormální</u>	2 : 4
--	+	- -/+	- - - -/+	<u>abnormální</u>	1 : 5
- +	+	- +/+	- - + +/+	normální	3 : 5

Možných vysvětlení účinku mutace *mea* na zygotický vývoj je celá řada. RNA nebo protein *MEA* mohou být exprimovány gametofyticky a deponovány ve vaječné nebo centrální buňce a později regulují buněčná dělení zygoty. Protože mutantní embrya jsou normální až do středního globulárního stádia, *MEA* nemusí být vyžadována až do tohoto stádia, což naznačuje, že jeho produkty jsou relativně stálé. Pozdní efekty mutace *mea* však mohou být vysvětleny tak, že *mea/+* pletiva, která obklopují mutantní gametofyty poskytují *MEA* produkt. Neschopnost paternálního *MEA* zachránit zygoty *mea* naznačuje, že *MEA* buď není zygoticky exprimován nebo je exprimován příliš pozdě. Také u drozofily a nematod jsou mRNA a proteiny Polycomb exprimovány maternálně a přemístěny do vaječné buňky a jejich nepřítomnost ve vajíčkách odpovídá za letalitu embryí, která nemůže být zachráněna paternální alelou *Polycomb*.

Druhé vysvětlení maternální dědičnosti *MEA* je prostřednictvím genomového imprintingu. Protože se u rostlin imprinting obvykle vyskytuje v endospermu (spíše než v embryu), vyžadovalo by to, že *MEA* působí zygoticky v endospermu nebo maternálně v centrální buňce gametofytu. Například, jestliže je gen *MEA* imprintován tak, že pouze maternálně děděná alela je exprimována, potom paternální alely *MEA* jsou mlčící a tedy neschopné zachránit defektní alely *mea*. Alternativně, *MEA* může být vyžadována k imprintování jednoho nebo více cílových genů v samičích gametofytech, takže exprese maternálně a paternálně získaných alel se v zygotách liší. Jestliže *MEA* umlčuje maternální alely, potom zygoty *mea* by mohly abortovat, protože by jak maternální tak paternální alely byly aktivní. Tato možnost je však vyloučena, protože zygoty se dvěma paternálními genomy jsou životaschopné. Obráceně, *MEA* by mohla zajišťovat, aby cílové geny byly specificky exprimovány z maternální alely. Ztráta maternálního imprintingu by nemohla být překonána aktivitou *MEA* v embryu nebo endospermu, protože imprinting je pravděpodobně nastaven v průběhu tvorby gamet. Recentní výsledky u savců a drozofily také naznačují roli Polycomb proteinů v založení imprintovaného stavu. V každém případě patří objev genu *MEDEA* - jeho funkce v embryogenezi, maternální expresi i struktury jím kódovaného proteinu typu Polycomb - k nejzajímavějším pokrokům molekulární genetiky rostlin (box 19).

Rostliny se vyznačují vysokou regenerační schopností, vedle rozmnožování pohlavního se běžně množí i vegetativně (buňky jsou totipotentní). Kultivací kterékoli buňky rostlinného těla na plně definovaných, syntetických médiích *in vitro* je možné zpětně izolovat celé rostliny. Na modelu kukuřice bylo v nedávné době demonstrováno, že izolované gamety

Box 19. Shrnutí charakteristiky maternálního genu *MEDEA* (podle Grossniklause et al., 1998).

n název genu byl inspirován antickou tragédií:

Medea zabije své děti jako pomstu za Jasonovu nevěru (Euripides, 431 B. C., *Medea*)

n u *Arabidopsis* nalezen pomocí techniky gene-tagging *Ds* elementem gen *MEDEA*, jehož recesivní maternální mutace vykazuje aberantní regulaci embryogeneze

n embrya odvozená z mutantních vajíček *medea* rostou extenzivně a odumírají v průběhu desikace: heterozygotní matka segreguje v potomstvu 50 % normálních a 50 % letálních semen

n letalita embryí není závislá na paternálním genomu ani genové dávce, mutace *medea* se přenáší přes samčí dráhu do potomstva

n poměry alel *MEDEA/medea* v endospermu v podstatě nevysvětlují efekt mutace

n *MEDEA* kóduje protein podobný skupině *Polycomb* (u živočichů zajišťují stabilní expresi genů při buněčných děleních, obvykle represory)

n fenotyp *medea* odpovídá teorii parentálního konfliktu a mohl by být zprostředkován imprintingem (analogie s chybným imprintingem u člověka, který způsobuje gigantický fetální růst, Beckwith-Wiedemannův syndrom)

n možná vysvětlení účinku mutace *medea* na zygotický vývoj:

(a) *sporofytický maternální efekt* - gen je exprimován v diploidním sporofytu, jeho produkt je transportován do embrya nebo endospermu

(b) *gametofytický maternální efekt* - gen je exprimován v samičím haploidním gametofytu, jeho defekt nemůže být nahrazen genovou expresí v embryu nebo endospermu

(c) *endospermový efekt* - gen je funkční jen v endospermu (maternální imprinting), ale nepřímo ovlivňuje i embryogenezu

(vaječná buňka a spermie) lze fúzovat a ze zygoty dopěstovat viabilní embrya (obr. 76). Kultivací nezralého pylu některých druhů rostlin je možné indukovat androgenezu, tvorbu haploidních sporofytů, které mají velký význam pro genetickou analýzu i šlechtění rostlin. Androgeneze a

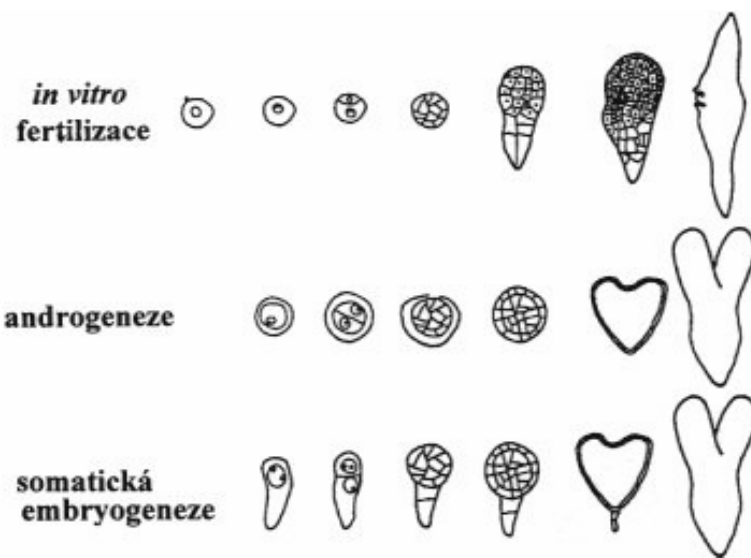
partenogeneze u rostlin (tedy vývoj jedince bez matky resp. otce) hovoří o absenci genomového imprintingu v embryonální linii. Somatická embryogeneze je jev, kdy embrya (nebo jim podobné morfogenní struktury) vznikají nikoli ze zygoty, avšak ze somatických buněk kultivovaných *in vitro*. Dochází k ní spontánně u některých mutantů (např. *leafy cotyledon*) nebo indukovaně, obvykle po exogenní aplikaci vyšší koncentrace rostlinného hormonu auxinu. Ve většině uvedených experimentálních systémů dochází ke vzniku embryí, která procházejí stejnými stádii a jsou velmi podobná embryím zygotickým. Proto je somatická embryogeneze (masová kultivace synchronizovaných embryí u mrkve) využívána jako experimentální model ke studiu buněčných i molekulárních procesů embryogeneze rostlin. Tvorba embryí *in vitro* obecně naznačuje, že embryogeneze není zcela závislá na sporofytických či gametofytických maternálních produktech.

Obr. 76. Srovnání hlavních typů embryogeneze *in vitro* (podle Mordhorsta et al., 1997).

(a) Fertilizace *in vitro* fúzí izolovaných gametických protoplastů u kukuřice. Po splynutí vaječné a spermatické buňky dochází k asymetrickému dělení a následné tvorbě embrya, které je velmi podobné standardnímu jednoděložnému embryu původem ze zygoty.

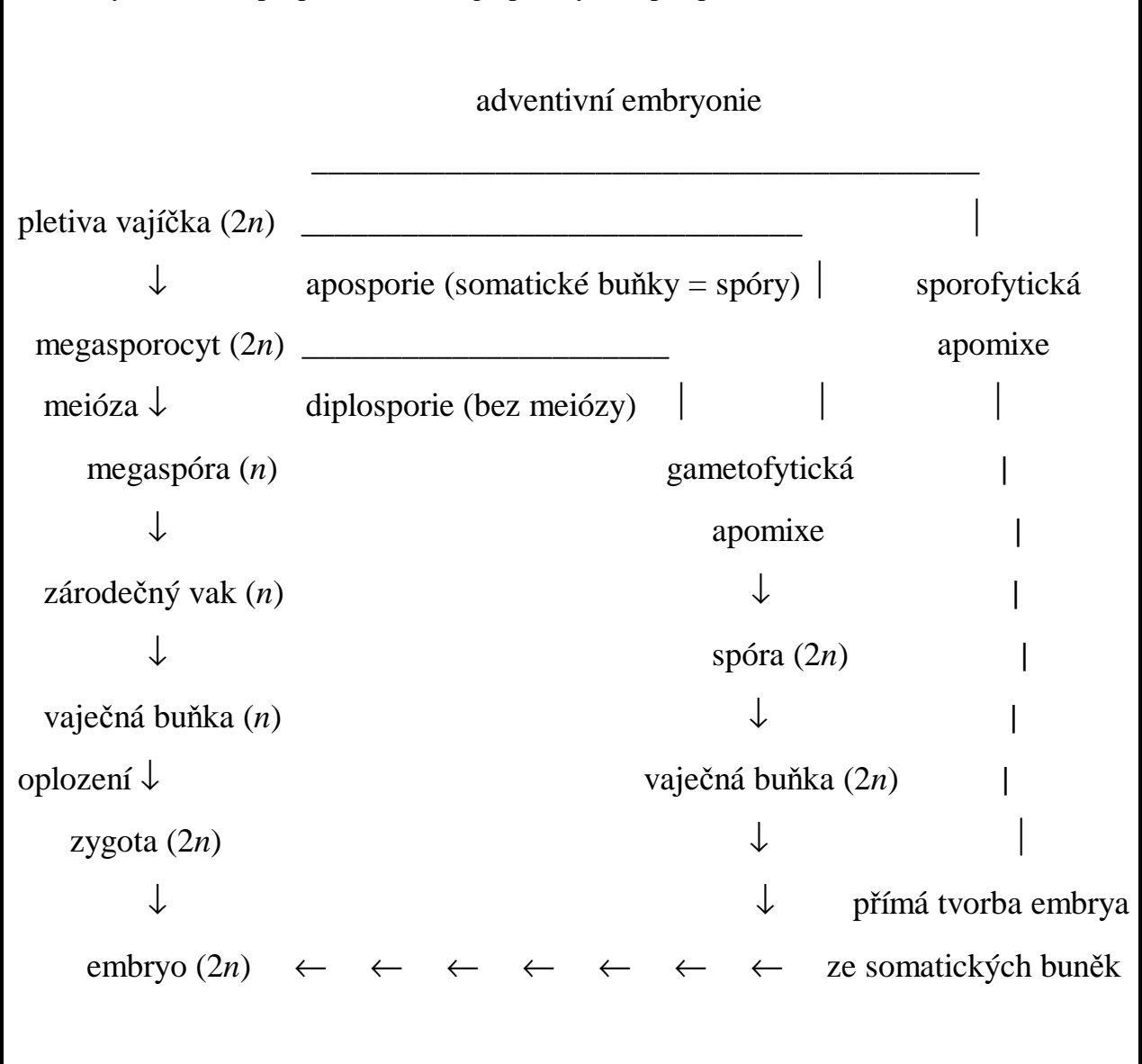
(b) Androgeneze je cestou tvorby haploidního sporofytu původem z pylového zrna (modelem je tabák). Kultivované jednojaderné mikrospóry se dělí symetricky za vzniku buněčné kolonie, která se posléze vyvine v embryo.

(c) Při somatické embryogenezi jsou buňky suspenzní kultury (na modelu mrkve) podrobeny podmínkám, při kterých dochází k diferenciaci a tvorbě embryí, často se zcela analogickými strukturami, jaké můžeme pozorovat u embryí zygotických.



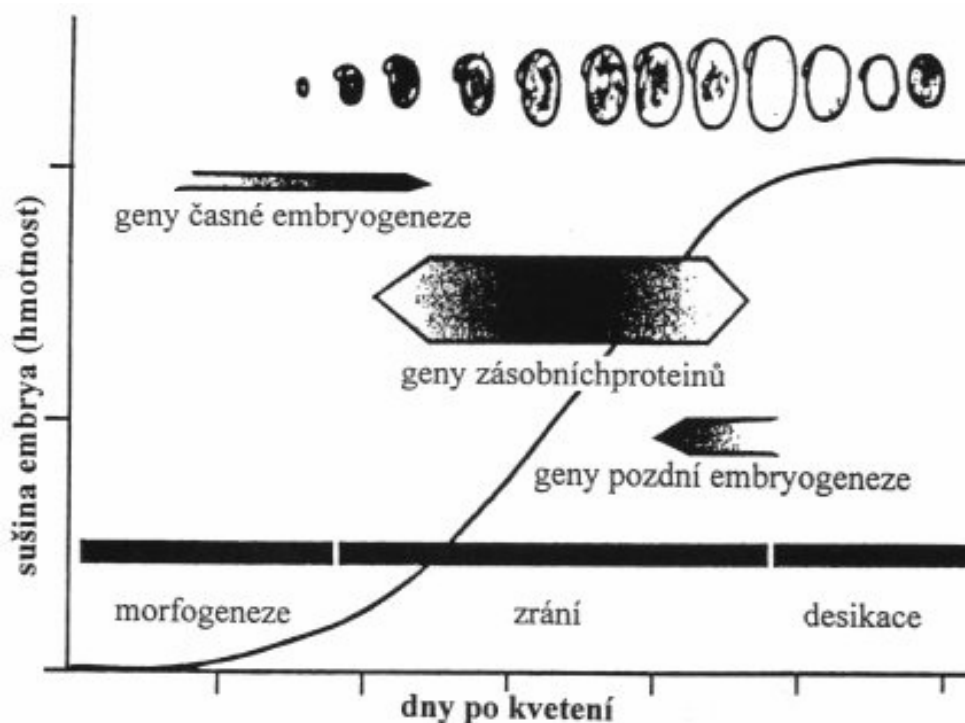
Řada druhů rostlin se běžně rozmnožuje asexuálně tvorbou semen, která obsahují embrya, avšak nevyvinula se ze zygoty. Původ těchto apomiktických embryí je různý: od neoplozených vaječných buněk (partenogeneze) až po maternální pletiva obklopující vajíčko (obr. 77). Apomiktické potomstvo bývá diploidní, stejné genetické konstituce jako mateřská rostlina.

Obr. 77. Schéma přirozené pohlavní a nepohlavní reprodukce z vajíčka krytosemenných rostlin (podle Howella, 1998). Ve všech uvedených případech vznikají diploidní embrya v klíčivých semenech. Pouze při pohlavní reprodukci však dochází k oplození vaječné buňky spermatickou buňkou (dráha vlevo). Při nepohlavní reprodukci vzniká embryo přímo ze somatického pletiva vajíčka (sporofytická apomixe) nebo ze spór (gametofytická apomixe): spóry přitom pocházejí ze somatických buněk (aposporie) nebo megasporocytu (diplosporie).



Specifickým, finálním stádiem procesů embryogeneze u krytosemenných (a nahosemenných) rostlin je **semeno**. Jak se dál embryo vyvíjí, vajíčko (uvnitř kterého spočívá embryo) se transformuje v semeno. Dělohy a hypokotyl (osa pod dělohami) rostou využívající živin z endospermu a suspensoru. Současně embryonální buňky pokračují v diferenciaci na epidermální, vodivé a zásobní buňky. Primordium prýtu (mezi dělohami) a kořene (v bazální špičce hypokotyly) zůstávají malé a klidové, až po dobu klíčení. Rostliny jednoděložné se vyvíjejí podobně, avšak embryo si ponechává většinu endospermu a vlastní embryo je relativně malé. Obecně, semeno je klidovým embryonálním stádiem adaptovaným na disperzi a přežívání mimo těla matky (obr. 78).

Obr. 78. Časový průběh vývinu semene zahrnuje tři hlavní stádia (podle Goldberga et al., 1989). Při morfogenezi je tvořeno embryo a extraembryonální pletiva. Druhým stádiem je zrání (maturace), ve kterém se akumulují zásobní látky a dochází ke zvětšování semene. Při desikaci se semeno vysušuje, odděluje se od maternálních pletiv a dostává se do klidového stádia (dormance). Je vyznačena i kinetika exprese tří hlavních skupin genů: geny časně embryogeneze (*early embryonic genes*), geny kódující zásobní proteiny (*storage protein genes*) a geny kódující proteiny pozdní embryogeneze (*late embryonic abundant protein genes*).

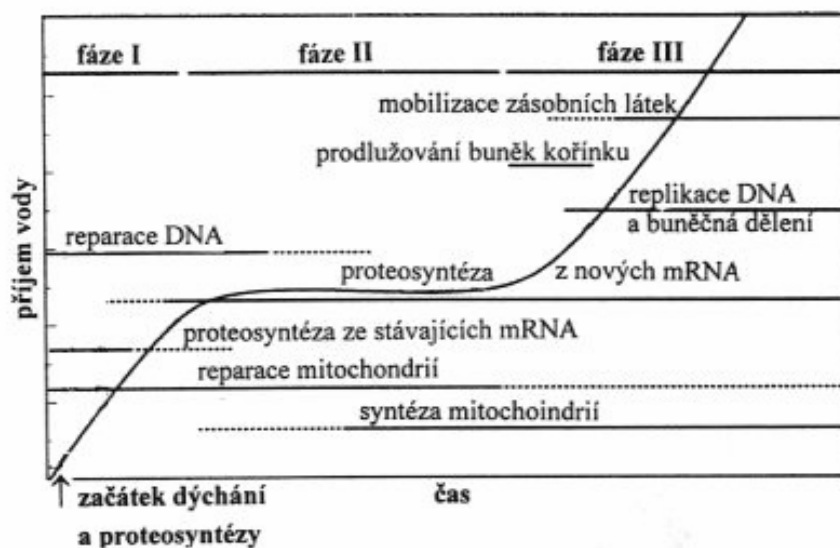


Embryo a okolní pletiva, jako jsou endosperm a perisperm, během vývoje semena rychle zvyšují zásobu RNA, proteinů, karbohydrátů, lipidů nebo dalších látek, které jsou ukládány pro pozdější použití. Důležitým jevem během zrání embrya je postupné vysychání a ztráta vody z buněk. Suchý zárodek obsahuje všechny potřebné enzymy, koenzymy a substráty, které se ale neúčastní metabolických reakcí. Biochemický stav klidového zárodku může být tedy charakterizován jako příprava na budoucí aktivaci. Je známo, že DNA je schopna zaujmout různé konformační struktury v závislosti na přítomnosti vody, sekvenci nukleotidů a přítomnosti specifických vazebných proteinů. Osbornová a Boubriak (1994) prokázali, že DNA v zárodcích semen a ve zralém pylu se liší od DNA normálních somatických jádrech. Se snižující se aktivitou vody mohou nastávat složité konformační změny v DNA, až ke změnám z normální formy B (pravotočivé) na formu A (pravotočivou). Brzy po začátku vysychání ustává v semenech replikace DNA a následně i syntéza RNA a proteinů. Během pozdní embryogeneze zabraňuje kyselina abscisová (ABA) před vyschnutím předčasnému klíčení a podporuje zrání embrya.

Semeno představuje disperzní jednotku, obsahuje zásobní látky k udržení růstu až po dobu, kdy se stane autotrofním organizmem. Dormance představuje zástavu klíčení až do doby/podmínek vhodných ke klíčení. **Klíčení semene** zahrnuje události, které začínají pohlcováním vody klidovým suchým semenem (bobtnání) a končí elongací embryonální osy. Viditelným znakem, že klíčení je ukončeno, je obvykle penetrace radikuly (výsledek je nazývaný viditelné klíčení). Následující události, včetně mobilizace zásobních látek, jsou svázány s růstem semenáčku (obr. 79). Příjem vody semenem je proces třífázový, s rychlým počátečním pohlcováním (fáze I), následovaným fází *plateau* (fáze II). Další vzrůst příjmu vody nastává, až ke klíčení ukončeno, když se prodlužuje embryonální osa (toto v dormantních semenech nenastane). Hlavním efektem při bobtnání je tranzice membránových fosfolipidových komponent z gelové fáze (dosažené při maturaci semena a vysychání) do hydratovaného stavu tekutého krystalu. Ve vyvíjejících se semenech se akumuluje kyselina abscisová, ABA (brání klíčení), nejvíce ve střední části vývinu, kdy jsou syntetizovány zásobní látky. U nedormantních semen tato zábrana mizí po dozrání semene a jeho uvolnění z mateřské rostliny. Mutace v syntéze ABA vede k viviparním nebo předčasně klíčícím semenům u rajčete, *Arabidopsis* a kukuřice. Extenze osy (radikuly) může být inhibována inkubací zralých semen v roztoku ABA. Gibereliny nejsou zahrnuty v řízení dormance, působí až po expiraci účinků ABA a jsou důležité v podpoře a udržování klíčení. Klíčení semene představuje ukončení klidového nebo dormantního stavu a jeho nahrazení další fází, během níž dochází k aktivaci vývojových procesů. Po nabobtnání získává suché klidové semeno rychle metabolickou aktivitu. Předpokládá se, že struktury a enzymy potřebné pro

zahájení metabolické aktivity jsou již přítomny v suchém semenu. Jednou z prvních změn po nabobtnání je prudký nárůst respirační aktivity, kterou lze zaznamenat v několika minutách. V suchém zárodku jsou přítomny již dříve vytvořené mRNA, avšak v průběhu raného klíčení jsou transkribovány i nové mRNA. Růst kořínku skrze struktury obklopující zárodek je stádium, které ukončuje klíčení a zahajuje růst semenáčku. Syntéza DNA probíhá v buňkách kořínku po nabobtnání ve dvou fázích. K první z nich dochází krátce po nabobtnání a představuje reparace DNA, poškozené v průběhu vysychání a rehydratace. V druhé fázi probíhá syntéza DNA spojená s dělením buněk v období po ukončení klíčení. Klíčení a následný vývoj klíčící rostlinky jsou rozhodujícím momentem ve sporofytickém životním cyklu. Během tohoto období je podle základů vytvořených v průběhu embryogeneze ustanovena budoucí architektura dospělé rostliny a dochází při něm k dramatickým fyziologickým změnám. Mladý semenáček má stejnou strukturu, jak byla patrná již ve stádiu srdce: prýtové primordium (nyní nazývané epikotyl), kotyledony, hypokotyl a kořenové primordium. Tyto elementy tvoří apikálně-bazální stavbu semenáčku. Semenáček má také radiální stavbu, která zahrnuje tři hlavní typy pletiv: vnější epidermis, vnitřní základní pletiva a centrální vodivá pletiva.

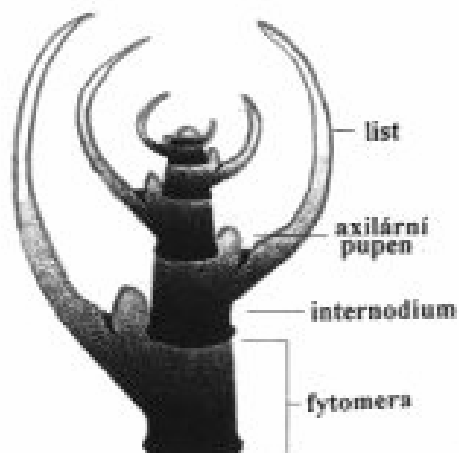
Obr. 79. Kinetika procesů spojených s klíčením semen (podle Bewley, 1997). Na ose X je časový horizont, na ose Y je dynamika příjmu vody: křivka znázorňuje kinetiku příjmu vody. Vlastní proces klíčení má dvě fáze (I - II), po nich následuje proces postgerminální (fáze III).



3.2.3 Geny řídící růst meristému a morfologii stonku a listů

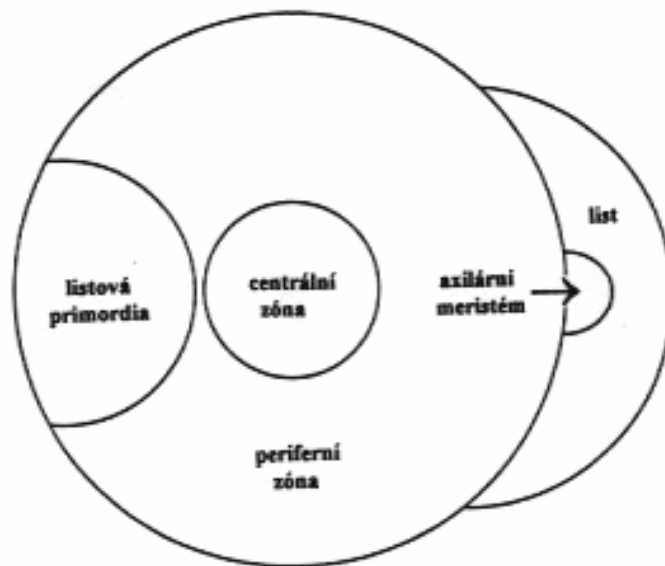
Zatímco většina buněk semenáčku směřuje k diferenciaci na funkce ve fotosyntéze, transportu a ukládání zásobních látek, určité skupiny buněk zůstávají navždy embryonálními a aktivními v buněčném dělení: **meristémy**. Rostlinné meristemické buňky jsou jako živočišné kmenové buňky: když se dělí, tvoří různé progenitorové buňky jiných tkání a regenerují nové meristemické buňky. Celý postembryonální rostlinný vývoj závisí především na meristémeh. Meristémy prýtu a kořene pokračují ve tvorbě nových sektorů kořene a stonku, a tak na rozdíl od většiny živočichů mohou rostliny růst v průběhu celého života. Meristémy v pravidelných intervalech tvoří zduřeniny (uzliny, nody), které se vyvinou v listy, větve nebo květy. Internodia jsou blízko meristému krátká a dál se prodlužují. Meristém je tak zakryt listovými primordii - výsledná struktura se nazývá pupen. U *Arabidopsis* a mnoha jiných druhů rostlin dává prýtový meristém vznik listovým primordiím ve spirálním uspořádání s krátkými internodii (rozeta, růžice) a následně se typ buněčného dělení v apikálním meristému mění - je tvořeno několik malých listů separovaných dlouhými internodii. Po této dočasné fázi tvoří apikální meristém květní primordia, z nich pak květy a plody. V průběhu vegetativního růstu vytváří apikální prýtový meristém opakující se jednotky, zvané fytomery (obr. 80). Fytomery jsou obvykle vytvářeny reiterací procesu, při kterém se z apikálního meristému vynořují listová primordia.

Obr. 80. Schéma základní jednotky vegetativního prýtu s apexem - fytomery (podle Howela, 1998). Fytomera je složena z listu, úžlabního pupene a internodia. Rostliny mají v podstatě článkované tělo: fytomery jsou opakujícími se strukturami, které se však mohou lišit velikostí, délkou internodia a typy orgánů vznikajících z úžlabních pupenů v závislosti na jejím umístění v těle, stádiu vývoje rostliny a vnějším prostředí.



V poslední době byla klonována řada genů, které ovlivňují architekturu rostlin. Jsou to zejména *CLAVATA1* (*CLV1*, řídící rovnováhu mezi udržováním meristému a jeho organogenezí), *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC2*, separující orgánová primordia v meristému) a *teosinte branched 1* (*tb1*) a *cycloidea* (*cyc*), které využívají růstové suprese k indukci morfologických změn. Všechny nadzemní části rostliny (listy, větve, stonek a květy) jsou produktem prýtového apikálního meristému (*shoot apical meristem*, SAM), proto pochopení rostlinného vývoje a architektury vyžaduje studium událostí odehrávajících se v meristému. Funkce SAM zahrnují samoudržování meristému, tvorbu listových a axilárních meristémových primordií a potlačování růstu mezi primordií (obr. 81).

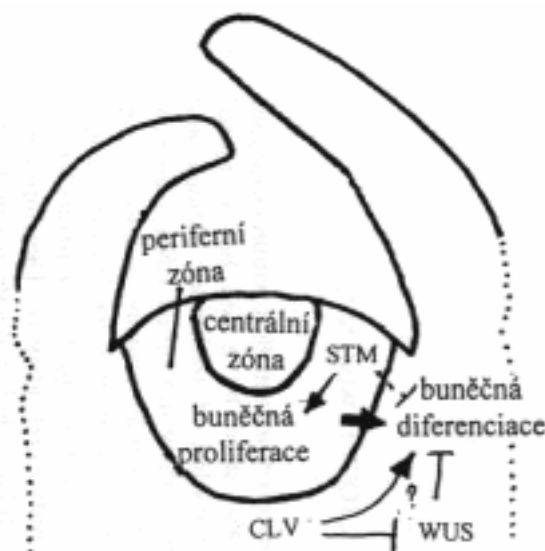
Obr. 81. Příčné schéma struktury prýtového apikálního meristému krytosemenné rostliny (podle McSteen a Hake, 1998). Základními funkcemi apikálního meristému jsou sebeudržování, tvorba základů listů a primordií axilárních meristémů a separace primordií. Sebeudržování probíhá v centrální zóně a organogeneze v periferní zóně. Listová primordia vznikají v periferní zóně, zatímco axilární pupeny vznikají v úžlabí listů. Periferní zóna také obsahuje buňky, jejichž úlohou je separace jednotlivých primordií.



Udržování meristému. Recentně byl klonován gen *CLAVATA1* (*CLV1*) z *Arabidopsis*, jehož produktem je zřejmě receptorem kinázy. Tento gen řídí velikost prýtového a květního meristému, rovnováhu mezi udržováním meristému a jeho organogenezí. Mutanty *clv1* iniciují

květy se zvýšeným počtem orgánů, obzvláště ve vnitřním kruhu karpelů, a mají větší prýtové a květní meristémy. Zřejmě opačnou roli než *CLV1* má gen *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*, z *Arabidopsis*), též reguluje rovnováhu mezi udržováním meristému a jeho organogenezí (obr. 82). *STM* kóduje homeoboxový transkripční faktor, který je exprimován v meristému a potlačován v oblastech periferní zóny, kde se iniciují orgánová primordia. Recesivní nebo nulová mutace *stm* zastavuje vývoj po tvorbě kotyledonů. Funkce *STM* je tedy vyžadována k udržování nediferencovaných buněk uvnitř meristému. Antagonistické role *CLV1* a *STM* vyplývají i ze studia dvojitého recesivního mutantu, ve kterém jsou oba defekty kompenzovány. Kukuřičný homolog *STM*, *knotted1* (*kn1*) také hraje roli v udržování meristému. *Kn1* podporuje nediferencovaný růst, ztráta funkce alely vede ke tvorbě méně početných větví květenství.

Obr. 82. Model interakce genů *CLAVATA* (*CLV*) a *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) v udržování rovnováhy mezi proliferačními a diferencujícími buněčnými populacemi v prýtovém apikálním meristému *Arabidopsis* (podle Clarka, 1996). Dynamická rovnováha mezi buněčnou proliferací a diferenciací vede k udržování meristému i tvorbě nových laterálních orgánů. Gen *STM* je exprimován v celém meristému mimo míst tvorby primordií. Produkt genu *STM* je vyžadován k udržování proliferace meristému, jeho mutace vedou ke ztrátě schopnosti jeho udržování. Gen *CLV* působí jako antagonist a zajišťuje diferenciaci: jeho mutanty akumulují nediferencované buňky. Dalším genem, který se spoluúčastní vývinu meristému, je *WUSCHEL* (*WUS*), jehož funkce spočívá ve zpomalování diferenciaci: mutace *wus* vede k rychlé diferenciaci a úbytku meristému.



V prýtovém meristému dochází k základním procesům **organogeneze** (box 20). Jedním z prvních důležitých prvků v organizaci meristému je separace vznikajících primordií. Studie ukázaly, že je třeba separace primordií v periferní zóně vrcholu a ukázaly také vztah mezi tvorbou diskrétních primordií a udržování meristému. Byly popsány dvojité mutanty *Arabidopsis*, *cup-shaped cotyledon* (*cuc1* a *2*), které tvoří semenáčky s fúzovanými dělohami a bez apikálního meristému. Když jsou v kultuře indukovány prýty, jsou tvořeny květy s fúzovanými sepalami a tyčinkami. Geny *CUC1* a *2* jsou tedy vyžadovány k separaci orgánových primordií v prýtových i květních meristémech. Jejich homologem je u petunie gen *no apical meristem* (*nam*) a analogický gen byl identifikován i u hledíku: gen *fimbriata* (*fim*) hraje roli v definování hranic mezi orgánovými primordiemi v květním meristému.

Listová primordia vznikají jako dorzoventrální struktury v periferní zóně prýtového apikálního meristému. U kukuřice a *Arabidopsis* byly popsány mutace *angustifolia* a *rotundifolia*, které způsobují, že listy jsou užší resp. kratší díky odlišnostem v expanzi buněk. Kukuřičný mutant *narrow sheat* zase způsobuje delece marginálních domén listu v meristému. Exprese meristémových genů v listech také ovlivňuje tvar listu. Zvýšená exprese genu *KNAT1* (z genové rodiny *knotted*) způsobuje u *Arabidopsis*, že listy jsou výrazně laločnaté. Geny typu *kn1* jsou jinak normálně exprimovány v listových primordiích rostlin se složenými listy, nikoliv u listů jednoduchých. U hrachu byla izolována série mutantů, které ovlivňují jednotlivé části jeho složitých listů: jeden z nich je *unifoliata* (*uni*). Jeho funkcí je tvorba komplexních listů (mutace způsobuje tvorbu listů jen jednoduchých) a dále determinace květních meristémů (mutace způsobuje nadpočetné větvení).

Axilární pupeny jsou iniciovány v úžlabích listových primordií (základů). Axilární pupeny jsou obvykle potlačovány, dokud není odstraněn apikální meristém (apikální dominance). Významnou determinantou celkové rostlinné formy je, kde a kdy vyrazí k růstu axilární pupeny. Růstová suprese je tedy důležitá pro tvorbu formy rostliny. U kukuřice axilární pupeny na bázi rostliny nevyrážejí k růstu, avšak u mutantu *teosinte branched 1* (*tb1*) jsou tyto pupeny uvolněny z represe. Funkcí genu je tedy potlačování vývinu axilárních pupenů. Tento gen je homologem genu *cycloidea* (*cyc*) u hledíku, který též potlačuje růst axilárních meristémů, v tomto případě květních: způsobuje též tvorbu asymetrických květů. Geny *tb1* a *cyc* ukazují význam růstové suprese v evoluci: zvýšená apikální dominance je významnou determinantou v domestikaci plodin a evoluce asymetrických květů byla významná v adaptaci rostlin na opylování hmyzem.

Box 20. Přehled funkce některých genů, které hrají klíčovou roli ve tvorbě rostlinných tvarů (podle McSteen a Hake, 1998).

® UDRŽOVÁNÍ MERISTÉMU

- ◆ *CLAVATA1 (CLV1, Arabidopsis)*, řídí velikost prýtového a květního meristému
- ◆ *SHOOT MERISTEMLESS (STM, Arabidopsis)*, antagonist *CLV1*, vyžadován k udržování nediferencovaných buněk uvnitř meristému
- ◆ *knotted1 (kn1, Zea)*, homolog genu *STM*
- ◆ *AGAMOUS (AG, Arabidopsis)*, odpovědný za determinaci květního meristému
- ◆ *zag1 (Zea)*, homolog genu *AG*
- ◆ *CURLY LEAF (CLF, Arabidopsis)*, negativní regulátor genu *AG* v listech a stonku
- ◆ *centroradialis (cen, Antirrhinum)*, determinuje udržování meristému květenství
- ◆ *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1, Arabidopsis)*, homolog genu *cen*

® ORGANOGENEZE

a) separace primordií

- ◆ *CUP-SHAPED COTYLEDON (Cuc1 a 2, Arabidopsis)* vyžadovány k separaci orgánových primordií v prýtových i květních meristémeh
- ◆ *no apical meristem (nam, Petunia)*, homolog genu *cuc*
- ◆ *fimbriata (fim, Antirrhinum)*, definuje hranice mezi orgánovými primordii v květním meristému

b) tvar listu

- ◆ *angustifolia* a *rotundifolia (Arabidopsis, Zea)*, mutace způsobují, že listy jsou užší resp. kratší díky odlišnostem v expanzi buněk
- ◆ *narrow sheat (Zea)*, mutace je delecí marginálních domén listu v meristému
- ◆ *KNATI (Arabidopsis)*, ektopická exprese způsobuje laločnaté listy
- ◆ *unifoliata (uni, Pisum)*, odpovídá za tvorbu složených listů

c) axilární meristémy a jejich růstová suprese

- ◆ *teosinte branched 1 (tb1, Zea)*, potlačuje vývin axilárních pupenů
- ◆ *cycloidea (cyc, Antirrhinum)*, homolog genu *tb1*, též způsobuje tvorbu asymetrických květů
- ◆ *CAULIFLOWER (CAL, Arabidopsis)*, mutace blokuje květenství v časném vývinu

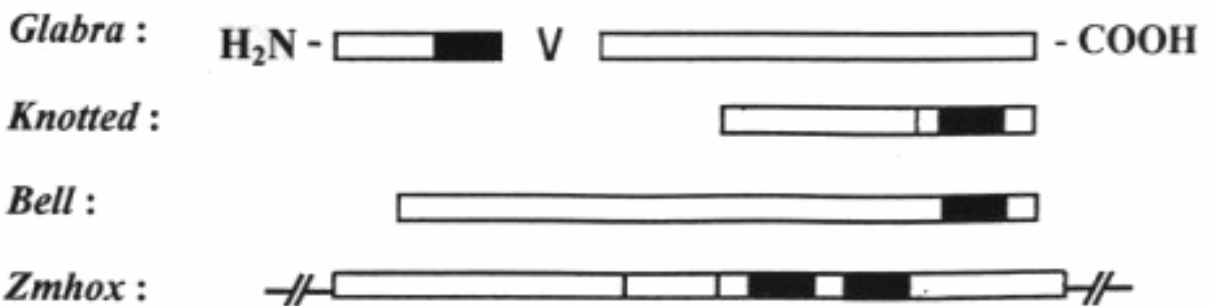
Jak je demonstrováno na dvou výše uvedených příkladech, růstová suprese je jedinečným evolučním mechanismem ke tvorbě odlišných rostlinných forem.

Protože tvar rostliny se odvíjí od meristému, geny fungující v meristému mají dramatické účinky na morfologii rostlin (i evoluci rostlinných tvarů), pokud jsou mutovány nebo nepatřičně exprimovány. Například, *kn1* a *uni* hrají roli v evoluci složených listů, *cyc* v evoluci asymetrických květů a *cen* v evoluci indeterminantních květenství. Jiné geny byly selektovány v průběhu domestikace plodin: *tb1* způsobil vzrůst apikální dominance u kukuřice, mutace genu *CAL* způsobuje specifický tvar květenství kvěťáku a dominantní mutace *Hooded* v homeoboxovém genu u ječmene vedla ke kultivaru lépe adaptovanému ke krmení zvířat.

Molekulární a genetické analýzy odhalily podrodinu genů obsahujících **homeobox**, které hrají roli ve funkci meristémů rostlin (box 21). První byl kukuřičný lokus *Knotted1* (*Kn1*) definovaný dominantními alelami, které způsobují tvorbu „kolínka“, pupene (*knot*) podél listových laterálních žilek. U rostlin standardního typu je *Kn1* exprimován v subepidermálních buňkách apikálního a květního meristému, ale není exprimován při iniciaci listových základů. Dominantní fenotyp *Kn1* je výsledkem ektopické exprese *Kn1* v listech, ztráta funkce alel vede k defektu v udržování meristému: gen *Kn1* tedy asi podporuje a udržuje buňky v nediferencovaném stavu nebo podporuje buněčné dělení v nediferencovaných buňkách nebo obě tyto funkce. Podobně mutantní fenotyp *rough sheath 1* u kukuřice je výsledkem ektopické exprese jiného homeotického genu *RS1* v listech: normálně je exprimován v prýťovém meristému. Tyto výsledky ilustrují, že rostlinný genom obsahuje několik homeoboxových genů, které fungují při vývinu meristému. U ječmene byl identifikován gen *Hooded*: jeho dominantní mutace vede k deformovaným osinám, malým listům, někdy s ektopickými květy. Podobně jako *Kn1*, fenotyp *Hooded* je způsoben nesprávnou expresí homeoboxového genu *HvKNOX3* v osině. Na základě sekvenční podobnosti mezi proteiny *Kn1* a *HvKNOX3* a skutečností, že geny *Kn1* a *HvKNOX3* jsou těsně vázány k alkohol-dehydrogenázovému genu v příslušných genomech, *HvKNOX3* se jeví být fylogenetickým homologem genu *Kn1*. Také výše uvedený gen *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) kóduje homeodoménový protein s expresním typem podobným genu *Kn1*. Výsledky naznačují, že *STM* je huseníčkovým (dvouděložná rostlina) ortologem kukuřičného (jednoděložná rostlina) genu *Kn1*: role některých homeoboxových genů tedy mohou být konzervovány po více než 100 milionů let evoluce. Na bázi sekvenčních rozdílů uvnitř homeoboxu mohou být *KNOX* geny (*Kn1-like homeobox genes*) uspořádány do dvou tříd: (1) Mnoho genů této skupiny, př. *Kn1* a *STM*, je preferenčně exprimováno v prýťových a

Box 21. Charakteristika homeoboxových genů a jejich produktů u rostlin (podle Chan et al., 1998).

- n** vysoce konzervativní geny identifikované u všech skupin eukaryot vyznačující se specifickou konsensus sekvencí o 180 pb
- n** kódují DNA-vazebné transkripční faktory regulující vývojové procesy, obvykle obsaženy v homeotických genech
- n** u rostlin identifikováno několik rodin odlišných homeoboxových genů, které zřejmě divergovaly již předtím, než došlo k separaci eukaryot na živočichy, rostliny a houby
- n** členy jednotlivých rodin homeoboxových genů vykazují charakteristické strukturní a funkční vlastnosti
- n** příklady rostlinných proteinů s homeodoménou, která je vyznačena tmavě:



- n** funkce homeoboxových genových rodin:

Glabra: vývoj trichomů na listech a stonku

Knotted: udržování nediferencovaných buněk meristému

Bell: vývoj vajíčka a vaječných obalů

Zmhox: vegetativní a reprodukční vývoj, reakce na auxin

květních meristémeh. (2) Skupina genů - např. gen *KNAT3* z *Arabidopsis* - mají širší expresní domény než geny 1. skupiny, což naznačuje jejich funkce mimo vývin meristému a řízení jiných aspektů rostlinné morfogeneze. Je zřejmé, že geny *KNOX* kódují transkripční faktory, které se různě vážou na DNA v různých pletivech, např. chromatinová struktura v odlišných buňkách může způsobovat odlišnou přístupnost *KNOX*-vazebných míst nebo odlišné buňky obsahují odlišné kofaktory, které moduluji vazbu DNA nebo aktivitu určitého genového produktu *KNOX*.

Ektopická exprese homeoboxových genů může mít za následek výrazně změněnou morfologii rostliny. Tak byla strukturní oblast kukuřičného genu *knotted 1* naklonována pod silný konstitutivní promotor a s pomocí agrobakteriálního vektoru vnesena do rostliny rajčete. Ektopická exprese tohoto genu má za následek výrazně vyšší stupeň členění listů: stimuluje meristemickou aktivitu a narušuje tak prostorové řízení morfogeneze (obr. 83). Tento efekt však nastává jen tehdy, pokud rostlina již tvoří členěné (složené) listy: u mutanta rajčete, který se vyznačuje jednoduchými listy, ke zvýšení členitosti listů nedochází.

Obr. 83. Genetická determinace tvorby složených listů (podle Howella, 1998). Konstitutivní exprese homeoboxového genu *knotted 1* v transgenních rostlinách rajčete vede k vyššímu stupni členění složených listů: ektopická exprese genu *knotted 1* stimuluje meristemickou aktivitu listového primordia na úkor expanze čepele. Fenotyp transgenní rostliny je shodný s dříve izolovanou mutací nazvanou *Petroselinum*.



standardní typ



transgenní rostlina

3.2.4 Genetické řízení procesů kvetení

Květní orgány jsou tvořeny ve čtyřech kruzích - květní obaly (sepaly a petaly) a vlastní pohlavní orgány (tyčinky a pestíky), vše jsou modifikované listy. Proces vývinu květů může být rozdělen do čtyř kroků: každý z nich je ovlivněn určitými geny (obr. 84).

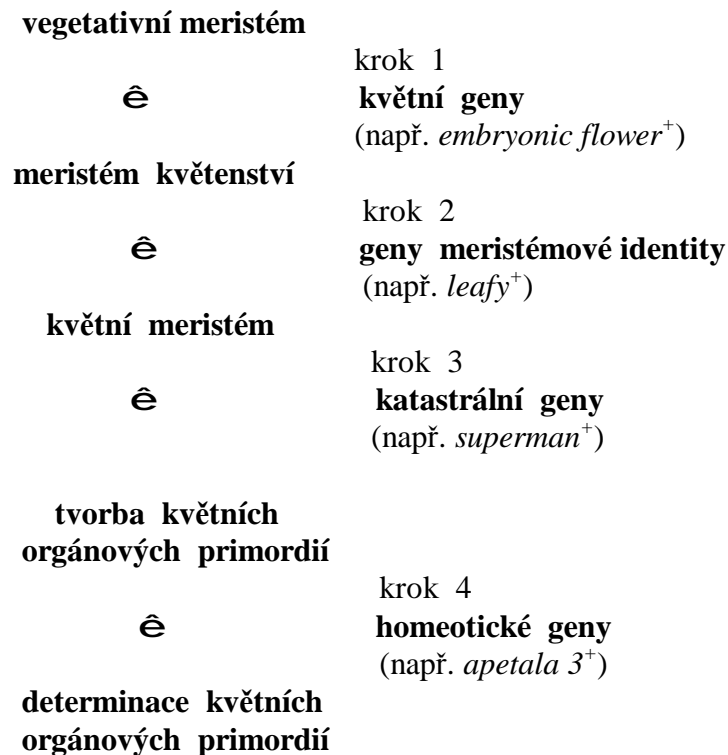
Prvním krokem je **květní indukce**, která je spouštěna kombinací vnějších a vnitřních signálů včetně délky dne, teploty, stáří rostliny a výživou. Květní indukce má za následek reorganizaci apikálního prýtového meristému z vegetativního meristému produkujícího listy na květní meristém dávající vznik květním primordiím. Květní indukce je ovlivněna alespoň deseti geny, jejichž mutace urychlují nebo zpožďují kvetení. Například gen *embryonic flower* je třeba k vegetativnímu růstu prýtového meristému a potlačuje tak předčasné kvetení. Jeho mutanty nebo delece vedou ke tvorbě jediného květu ihned po klíčení rostliny.

Druhým krokem v květním vývinu je skutečná **tvorba primordií květenství**, která nastává prostřednictvím odlišných typů buněčného dělení v květním meristému. U *Arabidopsis* například vznikají primordia květenství ve spirálním uspořádání. Geny, které řídí tvorbu květních meristémů z meristémů květenství, se nazývají geny identity meristémů (*meristem identity genes*). Příkladem je gen *leafy* u *Arabidopsis*, jehož mutace způsobují transformaci květů v sekundární prýty květenství. Tedy normální funkce genu *leafy* podmiňuje přeměnu meristému květenství ve květní meristém.

Třetím krokem ve květním vývinu je **tvorba květních orgánových primordií** (ve čtyřech kruzích) z květního meristému. Geny, které mají vztah ke tvorbě květních orgánových primordií, se nazývají katastrální geny (*cadastal genes*). Například mutace jednoho katastrálního genu, *clavata1*, ovlivňuje počet pestíků a jiných květních orgánů bez jejich morfologické změny. Jiné katastrální geny potlačují expresi určitých genů v určitých oblastech květu (např. gen *superman*).

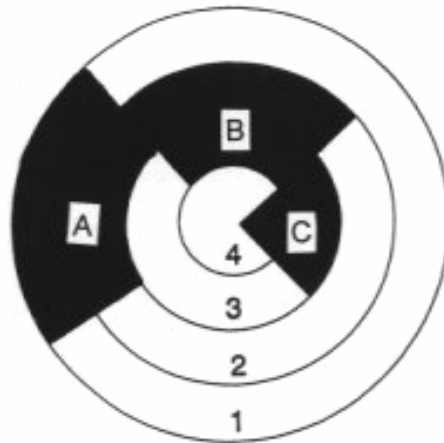
Posledním krokem v květním vývinu je **determinace orgánového primordia** a jeho následná diferenciacie v orgány v patřičných pozicích. Tato determinace je řízena **homeotickými geny**. U mutantů homeotických genů jsou první tři kroky květního vývinu ukončeny normálně. Následné determinační a diferenciacní kroky jsou však abnormální. U všech mutantů této skupiny jsou určité orgány nahrazeny jinými orgány, které jsou normálně tvořeny jinde. Toto je hlavním rysem všech homeotických mutantů. Všechny známé homeotické mutace u *Arabidopsis*

Obr. 84. Proces květního vývinu zahrnuje čtyři základní kroky, každý z nich je řízen určitými geny (podle Kalthoffa, 1996).



ovlivňují vždy dva sousední květní kruhy: 1. a 2. (normálně sepaly a petaly, např. mutace *apetala2*), 2. a 3. (normálně petaly a tyčinky, př. mutace *pistillata*) nebo 3. a 4. (normálně tyčinky a pestíky, např. mutace *agamous*). Homeotické mutace jsou recesivní, abnormální fenotyp se tedy projeví až v homozygotním stavu. Homeotické fenotypy byly vysvětleny genetickým modelem (obr. 85). Homeotické geny ovlivňující tvorbu květu spadají do tří skupin a jsou aktivní ve třech překrývajících se kruzích, A, B a C. Kritickým postulátem tohoto modelu je, že aktivita těchto homeotických genů určuje (determinuje) charakter tvořených květních orgánů, bez ohledu na to, kde jsou tyto geny exprimovány (obr. 86). Rostlinné homeotické geny, podobně jako živočišné, řídí morfologický vývin květních orgánů řízením baterie realizátorových genů. Homeotické geny by tedy měly být aktivní před orgánovou diferenciací a jejich produkty by měly vykazovat molekulární charakteristiky genově-regulačních proteinů, jako u živočichů. Homeotické geny řídí baterie realizátorových genů, musí však být také samy řízeny. Některé jsou regulovány navzájem, například dva homeotické geny (*apetala2* a *agamous*) se vzájemně

Obr. 85. Schematická ilustrace čtyř květních kruhů (1. lístky kališní, sepaly; 2. plátky korunní, petaly; 3. tyčinky, 4. pestíky, karpely), které mohou být na základě studia funkce homeotických genů u *Arabidopsis* a *Antirrhinum* rozděleny do tří překrývajících se funkčních oblastí, kde každá zahrnuje dva sousední kruhy: A (kruhy 1. a 2.), B (kruhy 2. a 3.) a C (kruhy 3. a 4.). Produkty homeotických genů skupiny A a C jsou vzájemně komplementární: když je mutován gen skupiny A, zaujme jeho místo produkt genu skupiny C, čímž ovšem dojde ke vzniku příslušného homeotického fenotypu (záměna kalicha a koruny za další kruh pestíků a tyčinek, „hypersexuální“ květ). Pokud chybí produkty genů skupiny C, jejich funkci převzou faktory kódované geny ze skupiny A a dochází na místě kruhů tyčinek a pestíků ke tvorbě dalších kruhů kališních a korunních lístků („asexuální“ květ). Produkty genů skupiny B jsou nezastupitelné: jejich nepřítomnost vede ke ztrátě schopnosti květu tvořit orgány 2. a 3. kruhu (tj. korunní plátky a tyčinky) a na jejich místě se objeví kališní lístky (jako následek funkčních genů A) resp. pestíky (řízené geny ze skupiny C). Výsledkem inaktivity genů skupiny B je fenotyp „supersamičích“ květů. Tvorba samčích pohlavních orgánů, tyčinek, je tedy závislá na přítomnosti produktů genů B a C, zatímco samičí pohlavní orgány, pestíky, jsou podmíněny pouze funkčními produkty genů



C (podle Coena, 1991).

inhibují. Regulátory homeotických genů jsou pravděpodobně ty geny, které řídí časnější kroky ve květním vývinu, včetně genů katastrálních a meristémové identity a genů, kódujících represorové proteiny analogické drozofilím proteinům ze skupiny Polycomb.

Prvním klonovaným homeotickým genem u *Arabidopsis* (pomocí strategie *T-DNA* tagging) byl *agamous2*. Gen má alespoň 9 exonů a 8 intronů, příslušný protein má podobnou

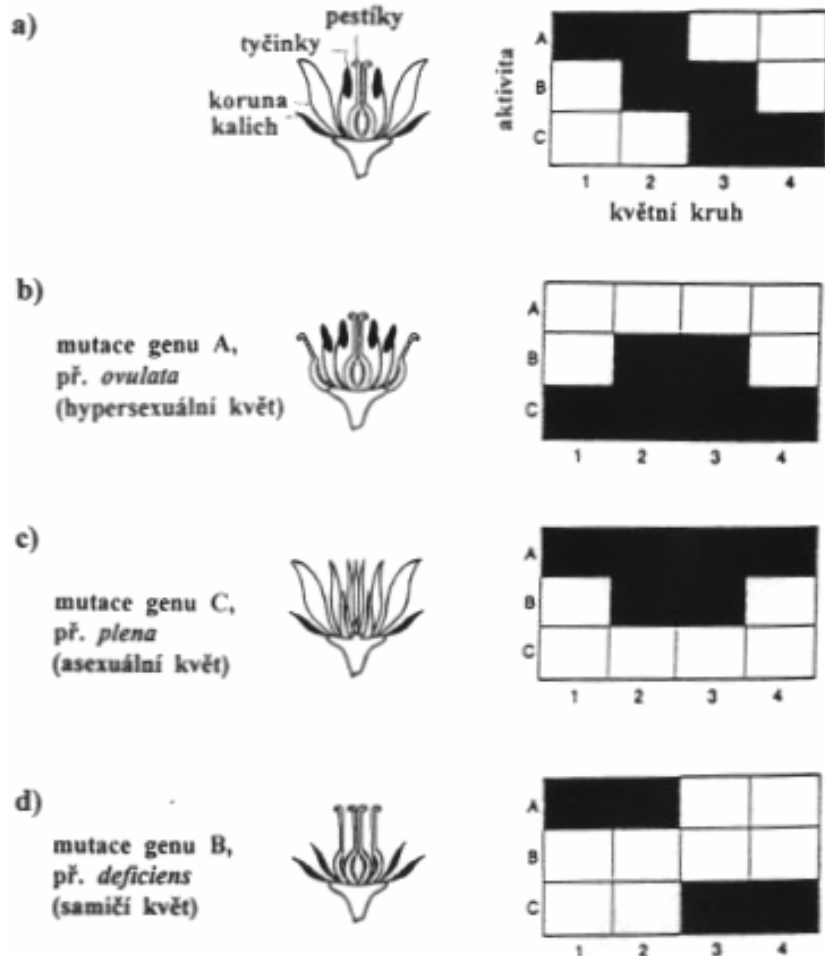
Obr. 86. Fenotypový projev mutací homeotických genů ve květech *Arabidopsis thaliana* (podle Schwarz-Sommerové et al., 1990).

(a) Normální typ se standardním uspořádáním květních orgánů ve čtyřech kruzích: 1. kališní lístky, 2. korunní plátky, 3. tyčinky, 4. pestíky.

(b) Nepřítomnost transkripčního faktoru kódovaného genem skupiny A (např. mutace genu *ovulata*) vede ke vzniku „hypersexuálních“ květů s uspořádáním kruhů: 1. pestíky, 2. tyčinky, 3. tyčinky, 4. pestíky.

(c) Absence transkripčního faktoru kódovaného genem skupiny C (např. mutace genu *plena*) vede ke vzniku „asexuálních“ květů s uspořádáním kruhů: 1. kališní lístky, 2. korunní plátky, 3. korunní plátky, 4. kališní lístky.

(d) Nepřítomnost transkripčního faktoru kódovaného genem skupiny B (např. mutace genu *deficiens*) vede ke vzniku „supersamičích“ květů s uspořádáním kruhů: 1. kališní lístky, 2. kališní lístky, 3. pestíky, 4. pestíky.



doménu sekvenční podobnosti se dvěma dříve identifikovanými transkripčními faktory, lidským *serum response factor* (SRF) a produktem *MCM1*⁺ genu u kvasinky. Doména sestává z 58 aminokyselin a zprostředkovává vazbu DNA k těmto transkripčním faktorům. Putativní funkce proteinu *agamous* jako transkripčního faktoru je ve shodě s rolí genu *agamous* jako selektorového genu, který řídí expresi mnoha jiných genů. Gen *agamous* je exprimován pouze ve květech, transkripce začíná s tvorbou prvních orgánových primordií a pokračuje v průběhu kvetení. Když Schwarz-Sommerová charakterizovala protein kódovaný genem *deficiens* z *Antirrhinum*, zjistila u něj, že má stejnou DNA-vazebnou doménu jako protein *agamous* u *Arabidopsis* i u jiných transkripčních faktorů. Tuto doménu nazvala **MADS**, protože podobná oblast byla identifikována v *MCM1* (kvasinky), *agamous*, *deficiens* a *SRF* (člověk) transkripčních faktorech (box 22). Rostlinné homeotické geny řídící diferenciaci květů tedy neobsahují homeobox (živočišného typu), nýbrž *MADS-box*, který má podobnou délku (asi 180 pb) a základním prvkem sekundární struktury příslušného MADS-proteinu je opět α -šroubovice. Gen *deficiens* je transkribován opět jen v květních primordiích. Tyto výsledky potvrzují očekávání, že rostlinné homeotické geny obecně kódují regionálně exprimované transkripční faktory.

Gen *CURLY LEAF* (*CLF*) je u *Arabidopsis* nezbytný pro stabilní expresi květních homeotických genů a kóduje protein s homologií k produktu drozofilního genu *Enhancer of Zeste* (Polycomb-group). Homeotické geny specifikují identitu sériově se opakujících jednotek, jako jsou květní kruhy nebo články těla u hmyzu. Jak u rostlin, tak u živočichů jsou transkribovány v přesných prostorových uspořádáních a určité kombinace genů aktivních v buňce specifikují její identitu. U drozofily je osud buněk determinován časně, v době tvorby buněčného blastodermu a jejich alternativní osudy jsou selektovány a determinovány perzistentní aktivitou homeotických genů. Časné regulátory (ANT-C a BX-C) jsou exprimovány tranzientně a udržování specifické exprese v pozdějších stádiích zajišťují dvě antagonistické skupiny genů - Polycomb (*Pc-G*) a *trithorax* (*trx-G*). V *Pc-G* mutantech je v embryích exprese homeotických genů založena správně, ale v pozdějším embryonálním a dospěleckém vývoji se vývojová exprese dostává za normální hranice. Standardní typy *Pc-G* genů jsou proto vyžadovány nikoli pro specifikaci tvarů, ale spíše k udržování represe v buněčných liniích, kde příslušné geny byly původně inaktivovány. Naproti tomu produkty standardních typů *trx-G* jsou vyžadovány k udržování aktivity.

Box 22. Srovnání aminokyselinových sekvencí v DNA-vazebné oblasti některých regulačních proteinů (MADS-doména) u rostlin (huseníček, *Arabidopsis* a hledík, *Antirrhinum*), kvasinek a člověka (podle Kalthoffa, 1996).

AP3 = *apetala 3*, homeotický květní gen izolovaný z *Arabidopsis*, **DEF** = *deficiens*, homeotický květní gen z *Antirrhinum*, **AG** = *agamous*, homeotický květní gen izolovaný z *Arabidopsis*, **MCM1** = kvasinkový MCM1 genový produkt, **SRF** = lidský SR (*serum response*) faktor.

Jednotlivá písmena představují aminokyseliny, pomlčky reprezentují shodnou AMK s proteinem AP3, velká písmena představují AMK podobné svou chemickou povahou AMK v AP3, malá písmena zastupují AMK odlišné chemické povahy. Zlomky představují podíl shodných AMK, tj. vzájemnou homologii s AP3 proteinem.

	1	11	
AP3:	R G K I Q I K R I E	N Q T R R Q V T Y S	
DEF:	- - - - -	- - - - -	
AG:	- - - - E - - - - -	- t - - - - -	F c
MCM1:	- r - - E - - f - -	- k - r - h - -	F -
SRF:	- v - - k M e f - D	- k i r - y t -	F -
	21	31	
AP3:	K R R N G L F K K A	H E L T V L C D A R	
DEF:	- - - - -	- - - S - - - -	K
AG:	- - - - - l - - -	y - - S - - - -	e
MCM1:	- - K h - l m - - -	f - - S - - t g	T q
SRF:	- - K t - l m - - -	y - - S t - t g	T q
	41	51	58
AP3:	V S I I M F S S S N	K L H E Y I S P	
DEF:	- - - - - i - - T Q	- - - - -	53/58
AG:	- A L - V - - - r g	R - y - - s n n	40/58
MCM1:	- l L L V v - e T g	i V y t F s T -	26/58
SRF:	- I L L V a - e T g	H V y t F a T r	19/58

Studium buněčných linií u rostlin naznačilo, že osud buněk není determinován, ale spíše je závislý na jejich pozici a determinace nastává až prostřednictvím interakcí mezi sousedními buňkami. V době květní indukce se však prýtové meristémy stávají determinovanými ke tvorbě květenství nebo květů. U *Arabidopsis* je gen *AGAMOUS* (*AG*) vyžadován ke specifikaci tvorby tyčinek a karpelů: je tedy odpovědný za determinaci květního meristému. U kukuřice je analogem gen *zag1*, který podporuje determinaci květního meristému, avšak neovlivňuje identitu orgánů. Gen *AG* kóduje protein náležející do MADS-box rodiny transkripčních faktorů, jeho mRNA je omezena na oblast jeho funkce, tedy 3. a 4. květní kruh. Negativním regulátorem genu *AG* je gen *CURLY LEAF* (*CLF*). Funkce standardní alely genu *CLF* je vyžadována k represí transkripce *AG* v listech, větvích květenství a ve starších květech. Udržování transkripční represe homeotických genů v průběhu tvorby orgánů je velmi důležité, neboť nepatřičná exprese těchto genů může ovlivnit osud buněk v pozdějším vývoji. Recesivní mutace *clf* vede například ke tvorbě staminoidních pletiv na korunních plátcích vlivem ektopické exprese *AG* v pozdějším vývinu petalů. Produkt genu *CLF* má rozsáhlou strukturní homologii s produktem genu *Pc-G* drozofily. Navíc má *CLF* také funkční homologii, protože analýza exprese *AG* ve květech mutanta *clf* ukazuje, že *CLF* není vyžadován k iniciaci specifikace *AG*, ale spíše k udržování represe v průběhu pozdějších stádií vývoje (box 23). Produkt genu *CLF* je tak vedle proteinu MEDEA (viz kapitola 3.2.2) druhým známým rostlinným proteinem, jehož funkce i struktura jsou analogické drozofilím i savčím proteinům ze skupiny Polycomb.

Box 23. Charakteristika genu *CURLY LEAF* (podle Goodriche et al., 1997).

- n** recesivní mutace *Arabidopsis* izolovaná transpozonovou mutagenezou (*Ac/Ds* elementy vnesené pomocí agrobakteriálního vektoru)
- n** pleiotropní fenotypový projev mutace *clf* na listovou a květní morfologii a na dobu kvetení, neovlivňuje kořeny, hypokotyl ani kotyledony
- n** listy *CLF* jsou široké s plochou čepelí, listy mutanta *clf* jsou úzké se zkadeřenou čepelí, intenzita zkadeření vzrůstá od báze rostliny k vrcholu
- n** mutanty *clf* kvetou o několik týdnů dříve než standardní typ
- n** kališní lístky u wt-rostlin uzavírají poupě až do pozdního vývoje květu, u mutantů *clf* je kalich méně zakřivený a způsobuje předčasné otevírání květů

- n** květy mutantů vykazují částečné homeotické transformace:
kalich → karpely, koruna → tyčinky
- n** fenotyp mutantů *clf* odpovídá fenotypu transgenních rostlin s konstitutivní expresí genu *AGAMOUS* (= homeotický gen s MADS-doménou specifikující tvorbu tyčinek a karpelů)
- n** Northern analýza mutantů prokázala „nepatřičnou“ přítomnost mRNA homeotických květních genů *AGAMOUS* a *APETALA3* v listech
- n** gen *CLF* je vyžadován k potlačování exprese genu *AG* v hypokotylu, kotyledonech, listech, stoncích a některých částech květů
- n** gen *CLF* není vyžadován ke specifikaci funkce *AG*, nýbrž k udržování specifity exprese v průběhu vývoje
- n** protein CLF má rozsáhlou strukturní homologii s represory obsahujícími chromodoménu u drozofily (Polycomb) a člověka

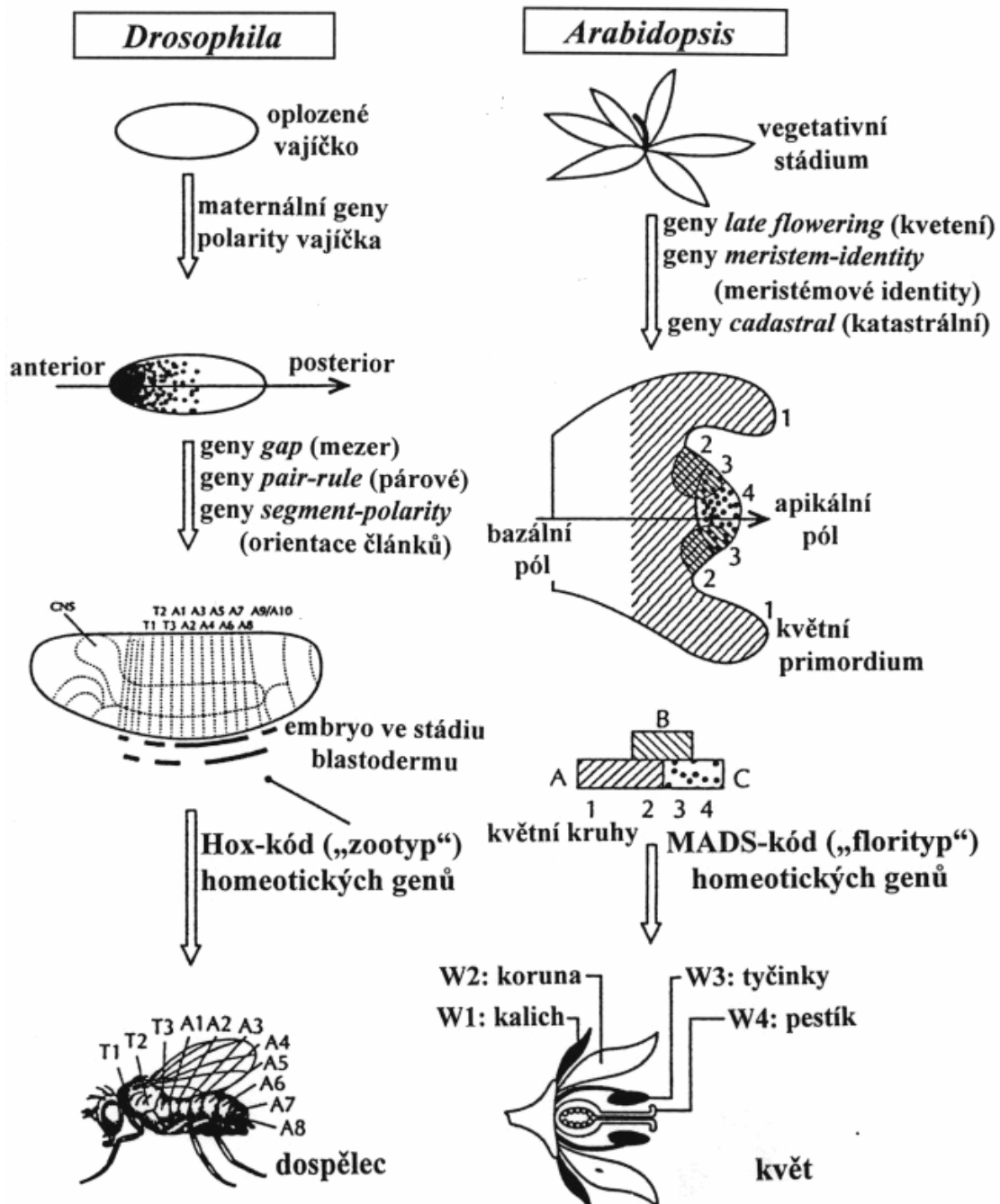
Znamé rostlinné homeotické geny mají shodné vlastnosti s homeotickými geny u drozofily a myši: mutace v těchto genech způsobují homeotické transformace, jejich exprese je omezena na určitá orgánová primordia a kódují putativní transkripční faktory. Na základě těchto podobností by se daly očekávat i další vlastnosti, jako u drozofily a myši: shlukování v komplexy a homeobox. Dosud studované rostlinné homeotické geny jsou však rozptýleny na několika chromozómech, tvoří tedy shluky. MADS-box, přítomný u mnoha homeotických proteinů má přibližně stejnou délku jako homeodoména a tvoří podobné α -šroubovice, které se vážou ke specifickým rozpoznávacím motivům DNA, ale není žádná sekvenční podobnost k homeodoméně. To ovšem neznamená, že rostliny tvoří proteiny s homeodoménami. Gen kódující takový protein, *knotted-1*, byl izolován u kukuřice (mutace mění vývin listů, viz kapitola 3.2.3). Sekvenční podobnost mezi homeodoménou kódovanou genem *knotted-1* a homeodoménami jiných organismů není vysoká (22/64 aminokyselin s lidským a 12/64 s drozofilovým proteinem). Na základě několika dosud identifikovaných homeotických genů a homeoboxových genů se zdá, že tvoří dvě odlišné skupiny. Hlavním znakem homeotických genů je jejich biologická funkce: specifikují (svou aktivitou nebo inaktivitou) tvorbu (*pattern*) determinovaných stavů podél embryonální osy. Tato funkce je zjevně realizována transkripčními faktory s homeodoménou a jinými transkripčními faktory s odlišnou DNA-vazebnou doménou,

jako je MADS-box. Hlavním rysem homeoboxových genů je rys biochemický: kódují transkripční faktory s homeodoménou. U živočichů, většina homeotických genů jsou homeoboxové geny uspořádané ve vysoce konzervovaných shlucích (*Hox-like clusters*). Rostliny tento znak evidentně nemají. U rostlin se homeotické a homeoboxové geny vyvinuly nezávisle. Tato disjunkce naznačuje, že každá z těchto dvou funkcí (dávající vznik odlišným determinovaným stavům a tvořící transkripční faktory s homeodomény) byla dostatečně adaptivní a interaktivní, aby byla konzervována v průběhu evoluce (obr. 87).

Recentně byla izolována u *Arabidopsis*, hledíku (*Antirrhinum*) i některých dalších druhů rostlin celá řada genů, které určují základní rysy tvořícího se květenství. Například gen *centroradialis* (*cen*) u hledíku hraje klíčovou roli v udržování meristému květenství. Květenství hledíku normálně tvoří neurčitý počet květů, avšak mutanty *cen* ve květenství tvoří terminální květ, který zastavuje vývoj květenství po produkci několika málo bočních květů. Gen *cen* tedy umožňuje meristému květenství udržovat sám sebe zábranou tvorby květu na vrcholu. Homologním genem je u *Arabidopsis* gen *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*), exprimovaný subapikálně v meristému květenství: je vyžadován k negativní regulaci genů meristémové identity v meristému květenství. Vývojová blokáda vývinu květenství je důležitá u brukvovitých plodin, květáku a brokolice. Hlávka květáku je blokována v časném vývinu květenství a je směsí meristémů květenství a květů. U květáku je totiž mutace (stop kodon) v genu meristémové květní identity, *CAULIFLOWER* (*CAL*). U brokolice nastává blokáda až v mnohem pozdějším stádiu vývoje po tvorbě květů s úplnou výbavou květních orgánů.

U většiny druhů rostlin dochází k přeměně apikálního meristému z vegetativního stavu na generativní (indukce kvetení) v závislosti na faktorech vnějšího prostředí, zejména světla a teplotě. Některé rostliny vyžadují k indukci kvetení chladové působení, tzv. jarovizaci (*vernalization*). Jarovizace je typickým epigenetickým procesem, který je omezen na jedinou pohlavní generaci; nepřenáší se do pohlavního potomstva. Bylo prokázáno, že chladové působení navozuje rozsáhlé snížení hladiny metylcytozinu v rostlinném genomu a současně demonstrovali, že předčasné kvetení lze navodit i pomocí hypometylační látky, 5-azacytidinu. Homeotické geny, které řídí tvorbu květních orgánů, jsou zvláště citlivé na regulaci exprese prostřednictvím metylace cytozinu. Experimentální hypometylace rostlinného genomu (navozená aplikací 5-azacytidinu nebo prostřednictvím protismyslného genu k DNA-metyltransferáze) vede především ke změnám identity květních kruhů a ke snížení samčí i samičí fertility. U dvoudomé knotovky bílé dokonce vede k pohlavnímu zvratu: samčí květy tvoří i pestíky (hermafroditismus).

Obr. 87. Analogické principy řízení diferenciacce těla drozofily a tvorby květů huseníčku (podle Theissen a Saedlera, 1995). U obou modelů dochází nejdříve k vytvoření gradientu poziční informace (jako následek exprese genových kaskád), na jejichž bázi specifické kombinace účinků homeotických genů determinují identitu jednotlivých segmentů těla nebo květu podél antero-posteriorní resp. apikálně-bazální osy.

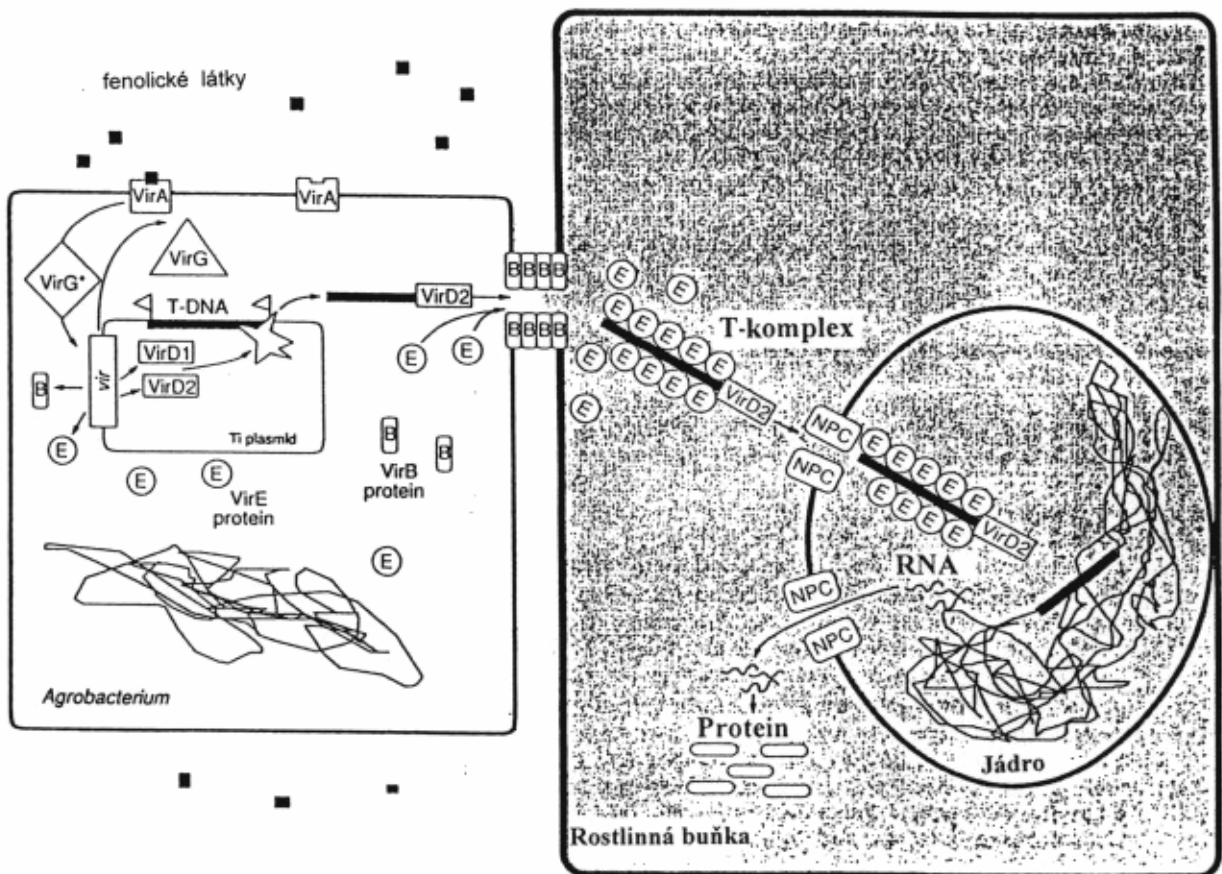


3.2.5 Modulace rostlinného vývoje transgenozí

Konstrukce transgenních rostlin je cenným nástrojem v základním výzkumu při studiu struktury a stability genomu, regulace genové exprese, izolaci genů i při analýze molekulárních mechanismů vývoje a metabolismu rostlin. Nejrozšířenějším vektorem k přenosu DNA do rostlin jsou agrobakteriální plazmidy, zejména Ti-plazmid (*tumour inducing*) půdní patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která je schopna infikovat většinu druhů dvouděložných a nahosemenných rostlin za tvorby tzv. *crown-gall* nádorů. Tato bakterie po infekci rostlinné buňky stabilně včleňuje část svého onkogenního plazmidu do rostlinných chromozomů. Tohoto procesu lze využít k přenosu žádaných genů po jejich předchozí integraci do transponované sekvence DNA (T-DNA, *transferred DNA*), obklopené definovanými hraničními sekvencemi nukleotidů. Vlastní morfologii a fyziologii rostlinných nádorů ovlivňují geny ze segmentu T-DNA, které jsou v nádorových buňkách konstitutivně exprimovány. Jde o geny, jejichž produkty katalyzují syntézu rostlinných hormonů: auxinu (tryptofan-2-monooxygenáza, *iaaM*, a indolyl-3-acetamidhydroláza, *iaaH*) a cytokininu (izopentenyltransferáza, *ipt*). Pro využití agrobakteriálních plazmidů v genovém inženýrství je důležité, že k přenosu T-DNA dochází i tehdy, když jsou onkogeny eliminovány mutací nebo dokonce delecí. Infikované rostlinné buňky pak nedávají vznik neorganizovaným nádorům, nýbrž po diferenciaci v podmínkách explantátových kultur *in vitro* mohou poskytovat fertilní transgenní rostliny.

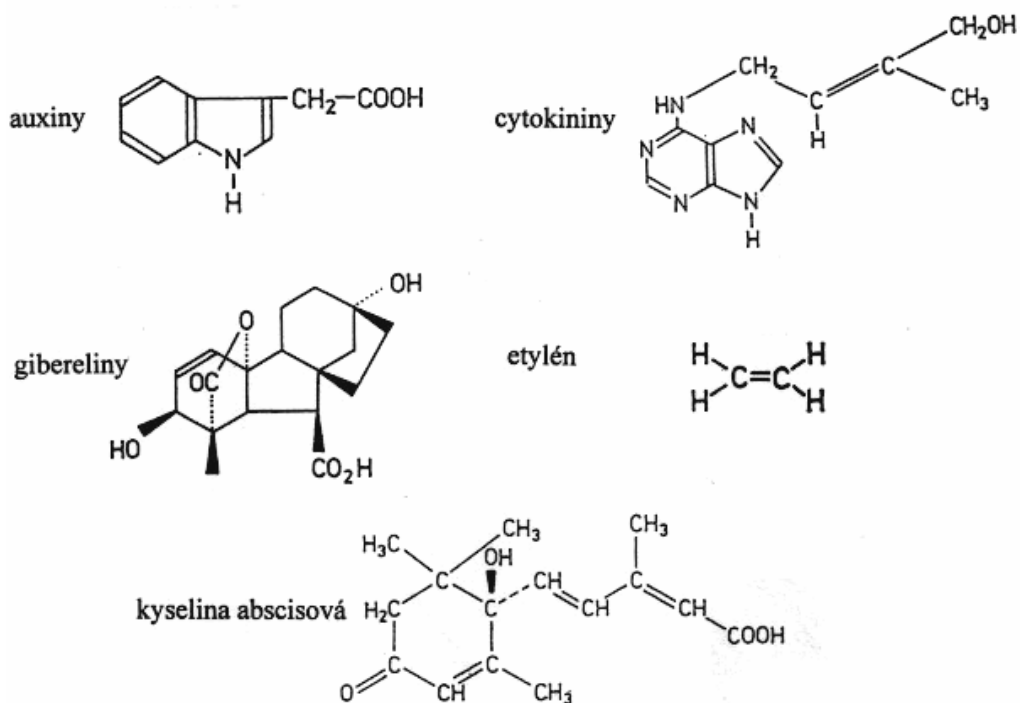
Přenos genetické informace z bakterie *A. tumefaciens* do rostlinného genomu je ojedinělým příkladem genetické výměny mezi organizmy z různých říší. Procesy, které přitom probíhají, však nejsou nijak výjimečné. Jedná se v podstatě o adaptace dvou prokaryotických procesů: aktivace genové exprese v reakci na vnější stimul prostřednictvím dvoukomponentního pozitivního regulačního systému v bakterii a konjugativní přenos T-DNA z donorové bakterie do recipientní rostlinné buňky (obr. 88). Přenosové funkce jsou v *A. tumefaciens* kódovány plazmidovými i chromozomálními virulentními geny. V transformačním procesu hrají rozhodující úlohu hranice segmentu T-DNA, které jsou tvořeny přímým opakováním ne zcela shodných 25 pb úseků DNA. Jakákoli DNA lokalizovaná mezi těmito hranicemi může být transportována a integrována do rostlinných chromozomů, přičemž rozhodující úlohu hraje pravá hraniční sekvence, od které přenos T-DNA začíná. Finálně je T-DNA integrována do rostlinného chromozomu procesem náhodné (ilegitimní) rekombinace s pomocí rostlinných enzymů: kovalentní integrace zajišťuje její mitotickou i meiotickou stabilitu.

Obr. 88. Schéma přenosu úseku T-DNA onkogenního plazmidu Ti z bakteriální buňky *Agrobacterium tumefaciens* do rostlinné buňky (podle Tinlanda, 1996). Fenolické látky, uvolněné z poraněné buňky, se vážou na bakteriální protein VirA, který aktivuje protein VirB s následkem stimulace exprese celé oblasti virulence (*vir* regulon) lokalizované na plazmidu Ti. Produkt genu *VirD1* je specifická nukleáza: způsobí vyštěpení jednoho vlákna úseku T-DNA z plazmidu. Na 5'-konec se váže molekula proteinu VirD2 (funkce „pilota“) a dále se na T-DNA naváže několik set molekul proteinu VirE (ochrana před rostlinnými nukleázami). Tento komplex je přenášén do rostlinné buňky. Kovalentní včlenění T-DNA do chromozómů je náhodné (založeno jen na mikrohomologiích několika nukleotidů rostlinné a T-DNA, tzv. ilegální rekombinace) a je realizováno výhradně rostlinnými enzymy (stejně jako její pozdější transkripce a translace).



Rostliny v různých částech svého těla a v různých fázích vývoje vytvářejí několik skupin morfogenních látek, které jsou souborně označovány jako **regulátory růstu** nebo rostlinné hormony. Patří sem zejména auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a etylen (obr. 89). Jsou pro vývoj rostliny zpravidla nezbytné, avšak jejich účinky jsou výrazně méně specifické než u živočichů. Každý z hormonů má řadu biologických funkcí a fenotypových efektů: mají pleiotropní účinky. Některé hormony vytvářejí výrazné gradienty: například auxin je syntetizován především v apikálním meristému, kde je jeho hladina nejvyšší a postupně bazipetálně klesá. Tento gradient auxinu má mj. za následek jev zvaný apikální dominance: supresi výše lokalizovaných axilárních pupenů (cf. gradient hlavových inhibitorů a potlačování tvorby hlavy u nezmara). Při kultivaci a regeneraci *in vitro* jsou rostlinné somatické buňky obvykle dependentní jen na exogenně přidávaném auxinu a cytokininu: ostatní typy růstových regulátorů si tedy extirpované buňky vytvářejí samy dle své potřeby. Hormony se šíří v rostlinném těle, kde se vážou se na membránové nebo cytoplazmatické proteinové receptory.

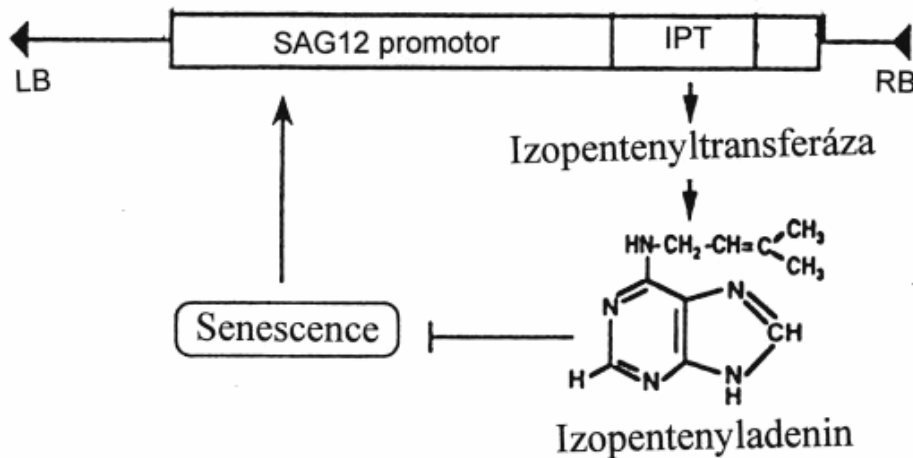
Obr. 89. Hlavní typy rostlinných hormonů - růstových regulátorů. Zejména auxiny, cytokininy a gibereliny patří mezi stimulační látky, které jsou vyžadovány k buněčnému dělení a obvykle se syntetizují v meristematických oblastech (vytvářejí gradienty morfofenů a působí přes proteinové receptory). Mají pleiotropní účinky a často působí navzájem synergicky nebo antagonicky.



Produkt jednoho z agrobakteriálních onkogenů, izopentenyltransferázy (*ipt*), která kondenzací izopentenylpyrofosfátu a adenosinmonofosfátu (AMP) dává vznik izopentenyl-AMP, je pravděpodobně klíčovým enzymem v biosyntéze cytokininů. Izopentenyl-AMP je rostlinou rychle transformován v biologicky aktivní cytokininy, zejména deriváty zeatinu. Gen kódující izopentenyltransferázu z *A. tumefaciens* byl se silným konstitutivním promotorem z vnesen do rostlin tabáku. Tyto transgenní rostliny měly až stonásobně vyšší hladinu cytokininu ve srovnání s normálními rostlinami a vykazují ztrátu apikální dominance, potlačování procesu stárnutí a zejména neschopnost tvorby kořenů. Gan a Amasino (1995) izolovali z *Arabidopsis thaliana* gen, který je exprimován výhradně při procesu stárnutí listů. Promotor tohoto genu pak naklonovali ke strukturnímu agrobakteriálnímu genu kódujícímu izopentenyltransferázu (*ipt*) a tento chimérický gen vnesli do rostlin tabáku. Jakmile v listech transgenních rostlin nastal proces stárnutí (který normálně vede k jejich programované smrti), došlo k indukci syntézy cytokininů, tím bylo stárnutí potlačeno a listy dále vykazovaly fotosyntetickou aktivitu. Aktivita transgenu byla tedy řízena autoregulačním mechanismem a rostliny nejevily žádné nežádoucí symptomy nadprodukce cytokininů (např. neschopnost tvorby kořenů). Tato práce je názorným příkladem, jak je možné pomocí transgenozy ovlivnit procesy stárnutí rostlin (obr. 90). V podobných experimentech byl do rostlin vnesen gen *ipt*, do něhož byl mezi promotor a kódující oblast genu vklonován mobilní genetický element. Takto upravený gen je exprimován pouze v případě, kdy dojde k vyštěpení mobilního elementu. Pokud k vyštěpení transponovatelného elementu došlo až v pozdější době vývoje rostliny a pouze v některých oblastech prýtu, rostliny byly schopny tvořit kořeny. Vysoká hladina cytokininu v listech odrážela vyšší četnost transpozice mobilního elementu a měla za následek tvorbu drobných výhonků prýtů a květů na okrajích listů (viviparie). Květní pupeny dávaly vznik abnormálním květům s vysokým obsahem cytokininu, avšak s výrazně nižší hladinou transkriptů některých homeotických květních genů. Tyto výsledky naznačují, že cytokininy mohou ovlivňovat funkci homeotických genů a tedy i vývoj květních orgánů.

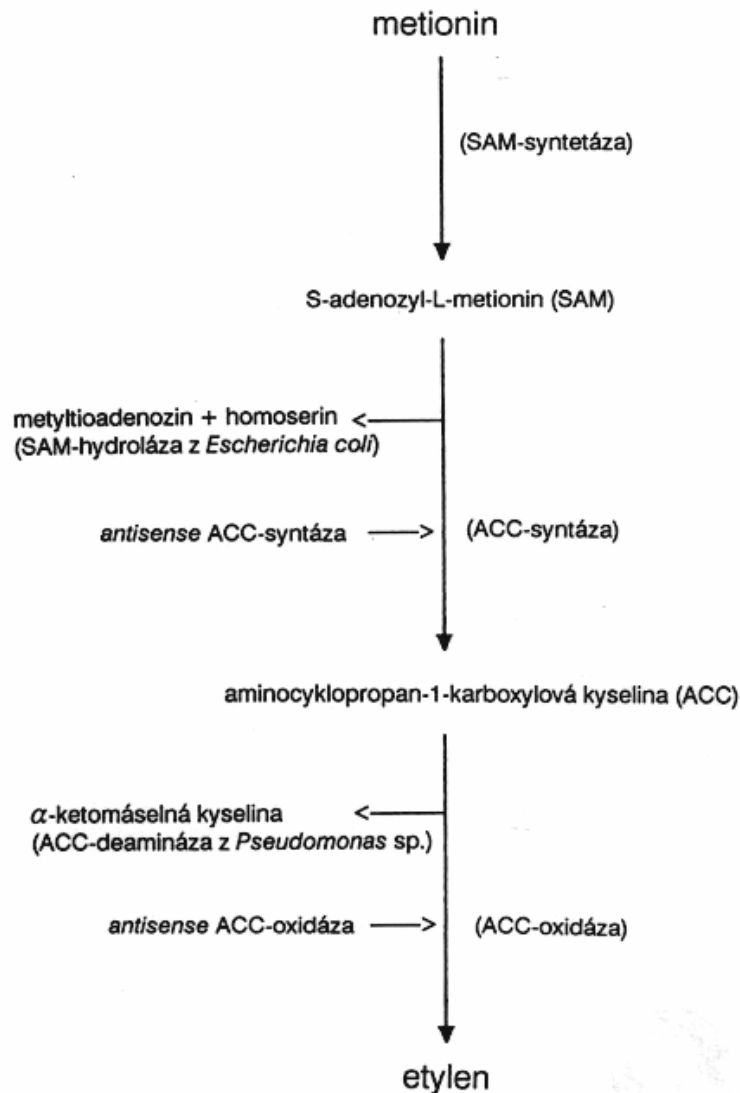
Technika transgenozy umožnila potlačení syntézy endogenního rostlinného hormonu etylenu, který mj. urychluje zrání plodů. Výchozí látkou syntézy etylenu je metionin, který spolu s ATP dává vznik S-adenosyl-L-metioninu (SAM), jenž je dále konvertován v aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) s pomocí enzymu ACC-syntázy. Finální reakcí biosyntézy etylenu je oxidace ACC na etylen (C_2H_4), katalyzovaná ACC oxidázou.

Obr. 90. Inhibice senescence listů autoregulovanou produkcí cytokininu (podle Gan a Amasino, 1995). Cytokinin patří mezi rostlinné hormony, které mj. podporují dělení buněk a odpovídají za juvenilní stav pletiv a orgánů. Klíčovým enzymem jeho syntézy je izopentenyl transferáza (ipt), která je kódována i oblastí T-DNA bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Byl zkonstruován chimérický gen, kde strukturní oblast genu *ipt* je naklonována pod promotor genu *SAG12*, který je exprimován v průběhu senescence u *Arabidopsis*. Tento chimérický gen byl vpraven do pomocného plazmidu mezi hraniční oblasti T-DNA (R_B a L_B) a s pomocí agrobakteriální transformace vnesen do rostliny tabáku. Jakmile došlo ke stárnutí listů, aktivoval inducibilní promotor *SAG12* transkripci genu *ipt*, začala syntéza cytokininu a listy se staly opět metabolicky aktivními. Tímto způsobem bylo dosaženo prodloužení vegetační doby rostliny.



Klíčovým meziproduktem syntézy etylenu je tedy SAM, který se uplatňuje i v jiných metabolických drahách (zejména jako univerzální donor metylových skupin). Byly již připraveny transgenní rostliny rajčete, do kterých vnesli SAM-hydrolázový gen z bakteriofága *T3 Escherichia coli*. Enzym SAM-hydroláza katalyzuje rozklad SAM na metyltioadenozin a homoserin, což má za následek kritický nedostatek SAM pro řadu buněčných reakcí. Aby nedocházelo k některým nežádoucím poruchám metabolismu rostliny, byl gen kódující SAM-hydrolázu naklonován pod kontrolu tkáňově specifického promotoru, který je aktivován pouze v průběhu zrání plodů rajčete. Výsledné transgenní rostliny se vyznačovaly normálním fenotypem, avšak syntéza etylenu ve zrajících plodech byla silně redukována, což mělo za následek požadované brzdění přezrávání plodů (obr. 91).

Obr. 91. Modifikace syntézy etylénu v transgenních rostlinách. Etylén je plynný hormon, který mj. urychluje zrání plodů. Výchozí látkou syntézy etylénu je metionin, který spolu s ATP dává vznik S-adenosyl-L-metioninu (SAM), jenž je dále konvertován v aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) s pomocí enzymu ACC-syntázy. Finální reakcí biosyntézy etylénu je oxidace ACC na etylén katalyzovaná ACC oxidázou. Ve schématu jsou znázorněny dva základní strategické přístupy genového inženýrství: introdukce chimérických bakteriálních genů, které rozkládají meziprodukty syntézy etylénu (SAM-hydroláza z bakteriofága *T3 Escherichia coli* nebo ACC-deamináza z *Pseudomonas*) a vnesení protismyslných genů (*antisense genes*), jež inhibují expresi rostlinných genů kódujících enzymy ACC-syntázu nebo ACC-oxidázu.



V samčích pohlavních orgánech, prašnicích, se tvoří až několik tisíc specifických mRNA. Klíčovou roli při tvorbě pylu hraje prašníkové výstelkové pletivo (tapetum), kde se tvoří mnoho specifických proteinů a jiných látek, které vyživují vyvíjející se pylová zrna nebo se stávají složkami stěny pylových zrn. Pomocí technik genového inženýrství byla izolována promotorová oblast jednoho tabákového genu specificky funkčního pouze v prašníkovém tapetu a tato sekvence byla fúzována s RNázovými geny izolovanými z *Aspergillus oryzae* a *Bacillus amyloliquefaciens*. Tyto geny kódují RNázu, enzym, který nespecificky štěpí molekuly RNA. Pomocí agrobakteriálního vektoru byly tyto konstrukty vneseny do tabáku a řepky. Expresí chimérických RNázových genů selektivně destrukovala tapetum při vývinu prašníku, bránila tvorbě pylu a vedla k rostlinám se samčí sterilitou.

Byla již izolována řada homeotických genů ovlivňujících květní morfologii a některé z nich byly prostřednictvím agrobakteriálních vektorů přeneseny do jiných druhů rostlin. Z řepky olejky (čeleď *Brassicaceae*) byl například izolován gen *agamous*, jehož exprese je přísně regulována a který normálně odpovídá za tvorbu orgánů třetího a čtvrtého květního kruhu (tyčinky a pestíky). Tento gen byl po naklonování pod silný konstitutivní promotor vnesen do rostlin tabáku (čeleď *Solanaceae*). Transgenní rostliny vykazovaly předpokládané homeotické květní transformace: přeměnu sepalů v pestíky a petalů v tyčinky. Transkripční faktor tvořený genem *agamous*, odpovídající za tvorbu pohlavních orgánů, byl tedy vlivem nespecifického (konstitutivního) promotoru tvořen i v "nepatřičných" pletivech základů kalichu a koruny, kde aktivoval geny determinující tvorbu tyčinek a pestíků. Tato práce demonstruje možnosti cílené modifikace struktury květních orgánů i vysokou fylogenetickou stabilitu rostlinných transkripčních faktorů. Podobně lze modifikovat morfologii rostlin i vnášením homeoboxových genů a jejich ektopickou expresí: například konstitutivně exprimovaný gen *knotted* způsobil zvýšené členění složených listů u rajčete (viz kapitola 3.2.3).

4 Determinace a vývoj pohlavnosti

Schopnost reprodukce je základní vlastností živých organismů. Vedle rozmnožování nepohlavního (klonování, vznik jedinců se shodným genotypem jako je mateřský), které je rozšířené u rostlin a některých nižších živočichů, je hlavním typem rozmnožování pohlavní, při kterém dochází k rekombinaci genetické informace (při meiotickém crossing-overu) a kombinaci genomů odlišných gamet. Evolučně nižším typem je hermafroditismus: pohlaví jedinců není rozlišeno, vytvářejí gamety obou pohlavních typů popř. jen izogamety (většina druhů rostlin a některých nižších živočichů). Evolučně vyšším typem je pohlavní dimorfismus (gonochorismus): samčí a samičí jedinci vytvářejí ve svých pohlavních orgánech jen gamety svého určitého typu. Základní rysy pohlavnosti jsou u všech eukaryotických organismů shodné: vyvinuly se dva typy pohlaví (pohlavních orgánů a v nich vznikajících gamet, samčích a samičích) a nová generace vzniká splýváním gamet, které se podrobily redukčnímu dělení (box 24).

Box 24. Determinace pohlaví u obratlovců a krytosemenných rostlin. Nejčastějším typem je u obratlovců genetická determinace (s homogametním pohlavím samičím XX/XY, popř. samčím ZZ/ZW), u nižších obratlovců se vyskytuje determinace environmentální (TSD, *temperature sex determination*). Rostliny jsou převážně hermafrodité: výjimkou jsou dvoudomé, kde se vyvinuly všechny typy pohlavní determinace (XX/XY, ZZ/ZW a HSD - *hormonal sex determination*).

skupina	XX/XY	ZZ/ZW	TSD
ryby	+	+	+
obojživelníci	+	+	+
plazi	+	+	+
ptáci	-	+	-
savci	+	-	-
rostliny			
(asi 90 % druhů)	-	-	-
knotovka	+	-	-
šťovík	+(X/A)	-	-
jahodník	-	+	-
bažanka	-	-	HSD

4.1 Zárodečná dráha a tvorba pohlavních buněk

Ve vývoji embrya živočichů nejsou některé buňky využity ke stavbě těla, ale uloženy jako primordiální zárodečné buňky (například u hlístic, hmyzu a obratlovců). Theodor Boveri pozoroval v roce 1904 neobvyklé chování chromozómů u hlístice *Ascaris* (nyní označovaná *Parascaris*; má pouze dva páry velkých chromozómů). Po prvním dělení oplozeného vajíčka chromozómy v jedné ze dvou blastomer fragmentují na mnoho částí a většina z těchto fragmentů je ztracena. Tento výjimečný jev se nazývá *chromatin diminution* a probíhá v buňce, která je určena k účasti na tvorbě těla. Druhá blastomera dává později vznik zárodečným buňkám a v této buněčné linii zůstávají chromozómy intaktní. V průběhu dalších dělení se historie opakuje: pouze buňky v přímé dráze k primordiálním zárodečným buňkám zachovávají celé chromozómy, zatímco všechny budoucí somatické buňky ztrácejí chromatin. Boveri prokázal, že u tohoto červa „cytoplazmatické determinanty“ chrání chromozómy buněk zárodečné dráhy od fragmentace.

U **drozofily** jsou primordiální zárodečné buňky prvními buňkami, které se tvoří v embryu. Nazývají se pólovými buňkami, protože vznikají na posteriorním pólu vyvíjejícího se vajíčka. Když se pólové buňky tvoří, uzavírají pólové granule. Jsou to fibrózní konglomeráty obsahující proteiny a RNA a představují zárodečné buněčné determinanty. Tyto determinanty jsou buď odvozeny z maternálně aktivního genu *oskar* nebo jsou alokovány do posteriorní oblasti vajíčka pod organizačním vlivem produktu genu *oskar*. Když jsou produkty genu *oskar* injikovány pod anteriorní pól vajíčka, způsobí to ektopický vývoj pólových buněk na anteriorním konci embrya: tyto pólové buňky však nevstupují do gonád.

U **savců** jsou první primordiální zárodečné buňky dispergovány u posteriorního žloutkového vaku, odtud migrují ke gonádám. V časně gonádě obratlovců imigrující primordiální zárodečné buňky kolonizují periferní vrstvu samičího cortexu nebo vnitřek samčí medully. V tomto stádiu ještě není pohlaví embrya definitivně určeno. V případě vývinu gonády v testis, řízené master genem *SRY* na Y chromozómu, primordiální zárodečné buňky ve vrstvě cortexu mizejí a buňky z medully diferencují ve spermatogonia. U samic (vzhledem k absenci Y, a tedy i genu *SRY*) se gonáda vyvíjí ve vaječník. Přežívají pouze primordiální zárodečné buňky cortexu a stávají se oogonii.

U **rostlin** se zárodečná dráha v embryonálním vývoji nevytváří: pohlavní orgány se diferencují jako modifikované listové struktury původem z vegetativních meristémů.

Z diploidních progenitorových buněk pak meiózou nevznikají gamety, nýbrž haploidní spóry. Je zajímavé, že osudy meiotických produktů jsou přitom analogické meióze u živočichů. V samčí dráze všechny čtyři spóry (pylová zrna) přežívají, zatímco v samičí dráze obvykle přežívá jen jediná megaspóra a zbývající tři haploidní produkty zanikají (cf. oocyt a polární tělíska u živočichů).

4.2 Mechanizmy determinace pohlaví

Pohlavní determinace nastává hierarchickým způsobem z bipotenciálních rudimentů pohlavních orgánů. V principu existují dvě skupiny spouštěcích mechanismů určení pohlaví: **genetický** a **environmentální**. Genetický typ určení pohlaví byl prvně odhalen křížením (genetickou analýzou) a obvykle souvisí s evolucí pohlavních chromozómů (heterochromozómů). Ty byly prvně pozorovány u brouka potměníka (*Tenebrio*) již v roce 1905: samečci mají kromě autozómů jeden pár morfologicky odlišných chromozómů (X a Y), zatímco u samic je pár shodných pohlavních chromozómů (XX). Pohlaví, které má pár odlišných pohlavních chromozómů, se obecně nazývá heterogametické, protože dává vznik zásadně dvěma typům gamet obsahujícím chromozóm X nebo Y. Pohlaví s párem shodných pohlavních chromozómů se nazývá homogametické: všechny gamety jsou stejného typu. U některých druhů jsou heterogametickým pohlavím jedinci samičí (s pohlavními chromozómy ZW) a samečci jsou homogametičtí (ZZ), tento typ je označován jako *Abaxas* nebo ptačí.

U hlístice *Caenorhabditis elegans* jsou jedinci XX jsou hermafrodité, nondisjunkcí chromozómu X vznikají samci XO. Pohlaví je dáno poměrem X/A (jako u drozofily), sexualita somatických buněk je určena sekvenčním účinkem komplexní série genů: *her-1*, tři *tra* genů a tři *fem* genů. Tyto geny také určují, zda zárodečné buňky se stanou spermiemi nebo oocyty (box 25).

Drozofila má systém XY/XX, pohlaví je však determinováno jinak (XXY jsou fertilní samičky, XO jsou sterilní samci). Bridges zjistil, že pohlaví je určováno poměrem X/A: X nese samičí geny, A nesou samčí. Byly izolovány čtyři X-vázané geny, **numerátorové geny** (*sisterless-a*, *sis-b*, *sis-c* a *runt*) a dosud jediný autozomální **denominátorový gen** (*deadpan*). Numerátorové a denominátorové geny kódují transkripční faktory, které řídí expresi genu *sex-lethal* (*Sxl*), který musí být aktivní u samic a inaktivní ve vývinu samců. K zapnutí genu *Sxl* musí být poměr X/A = 1. U drozofily jsou principy bipotenciality pohlavních orgánů a vývoje

Box 25. Hlavní genetické dráhy pohlavní determinace u modelových živočichů.

Caenorhabditis elegans

pohlavní fenotyp je buněčně autonomní (kritický gen *Xol-1* je negativní transkripční faktor)

hermafrodité (AAXX):

X : A = 1,0 ® *XO lethal-1* vypnut ® *tra-1* zapnut ® **diferenciace hermafrodita**

samečci (AAX0):

X : A = 0,5 ® *XO lethal-1* zapnut ® *tra-1* vypnut ® **samčí diferenciace**

Drosophila melanogaster

pohlavní fenotyp je buněčně autonomní (kritický gen *Sxl* kóduje faktor sestřihu mRNA: spuštění genu *Sxl* je řízeno produkty X-vázaných numerátorových a autozomálně-vázaných denominátorových genů)

samičky (AAXX):

X : A = 1,0 ® *Sex lethal* zapnut ® sestřih *TRA* ® *Dsx^F* ® **samičí diferenciace**

samečci (AAXY):

X : A = 0,5 ® *Sex lethal* vypnut ® *Dsx^M* ® **samčí diferenciace**

savci

pohlavní fenotyp je řízen hormonálně (kritický gen *SRY* je vázán na chromozómu Y, produktem je transkripční faktor s HMG-doménou)

samičky (AAXX):

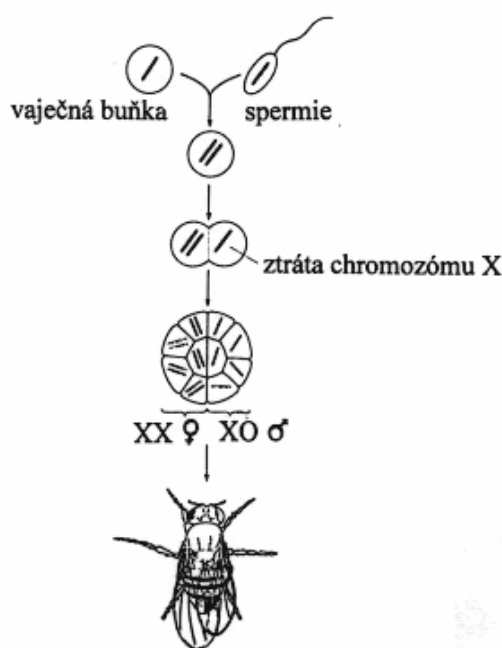
- *SRY* nepřítomen ® **vaječník** ® (**estrogen**) ® **samičí diferenciace**

samečci (AAXY):

SRY zapnut ® **testes** ® **hormony - AM, TS a DHTS** ® **samčí diferenciace**

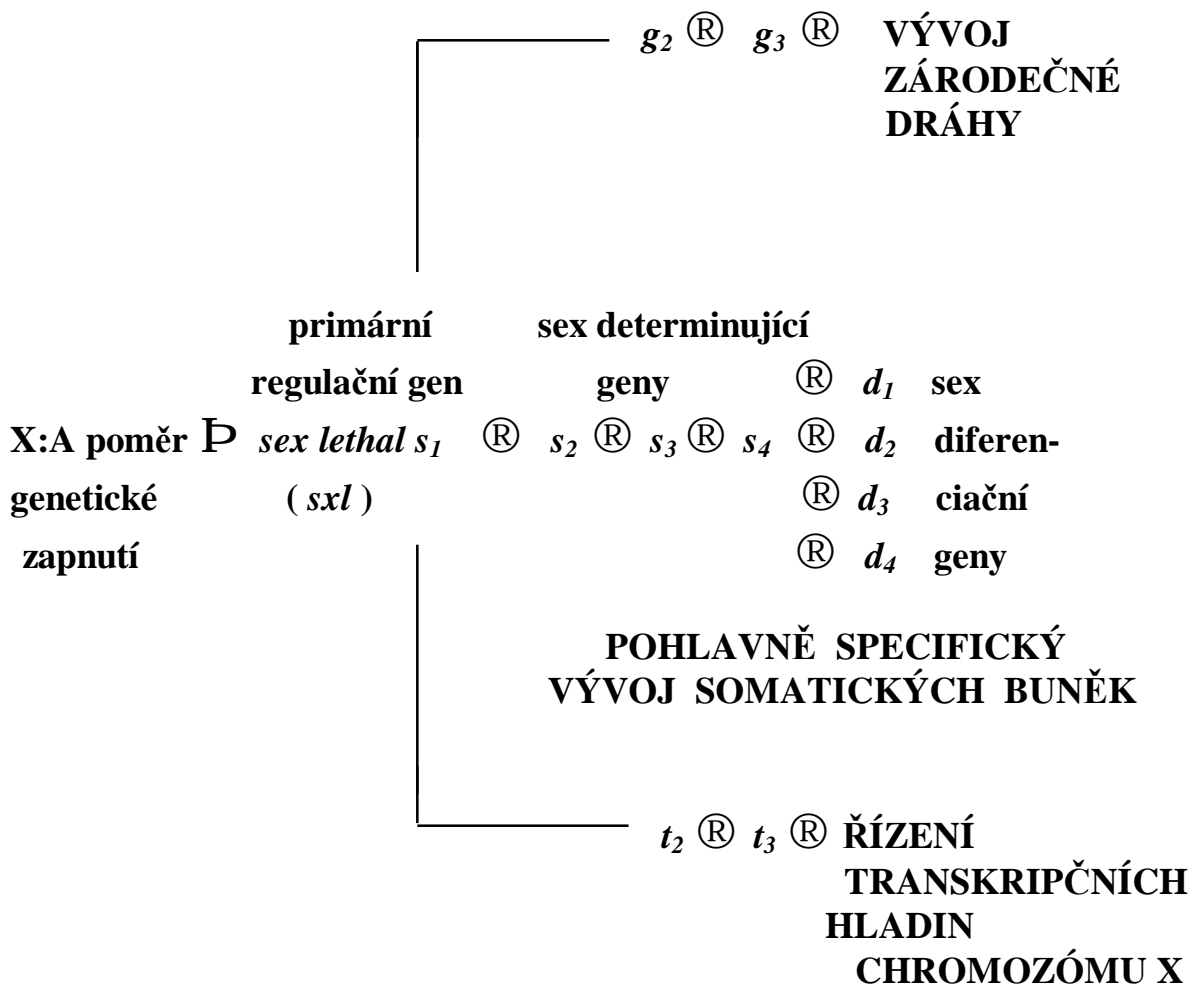
pohlavních vývodů analogické jako u savců. Pohlaví je však určováno poměrem počtu chromozómů X k autozómům (X/A), pohlavní orgány vznikají z imaginálních terčků. Drozofila a jiný hmyz nemají pohlavní hormony. Pohlavní fenotyp je tedy buněčně autonomní: každá buňka se pohlavně diferencuje podle svého genotypu. Lze to demonstrovat na sexuálních mozaikách, kde dojde při prvním dělení zygoty ke ztrátě jednoho chromozómu X (gynandromorfismus, obr. 92). Pohlavní vývoj zahrnuje řadu genů, které jsou řízeny hierarchicky. Počátečním rozhodnutím je poměr X/A, pak rozhoduje funkce genu *sex lethal* (*sxl*), potom sex-determinující geny a nakonec sex-diferenciační geny. Poměr X/A zapíná/nezapíná gen *sex lethal* (primární regulační gen), který dále reguluje tři separátní sady regulačních genů, kde každá řídí jednu z drah: (a) vývoj zárodečné linie, (b) pohlavně specifický vývoj somatických buněk nebo (c) transkripční

Obr. 92. Tvorba gynandromorfni mozaiky u drozofily způsobená ztrátou chromozómu X při dělení zygoty (podle Goodwina, 1991). U drozofily je pohlaví určeno poměrem počtu chromozómů X k počtu sad autozómů (A). Poměr $2X : 2A$ vede ke vzniku samičího pohlaví, $X0 : 2A$ ke vzniku samečka. Drozofila však nemá (na rozdíl třeba od savců) pohlavní hormony. Pohlavní fenotyp jedince tedy není dán působením hormonů, nýbrž genotypem každé individuální buňky (*cell autonomous sex phenotype*). Proto pokud dojde při prvním dělení zygoty XX v jedné dceřinné buňce ke ztrátě chromozómu X, vznikne genetická pohlavní mozaika: polovina těla (XX) bude mít samičí fenotyp a druhá polovina těla (X0) samčí fenotyp.



hladiny chromozómů X (obr. 93). Sex-determinující geny mají pohlavně specifické funkce. Tato specifita je důsledkem alternativního sestřihu příslušných mRNA: u samic má sestřih za následek tvorbu funkčního transkriptu, který je translatován, zatímco u sameček nikoli (dáno přítomností přídatného exonu se stop kodony, které brání translaci). Posledním sex-

Obr. 93. Hierarchická determinace genetického řízení pohlaví u drozofily (podle Goodwina, 1991). Geny řídící expresi pohlaví působí v kaskádách: jedny geny řídí projev dalších genů. Základem je poměr počtu chromozómů X a autozómů. Tento poměr ovlivňuje účinek genu *sex lethal* (*sxl*), který je primárním a klíčovým sex determinujícím genem. Gen *sxl* reguluje tři oddělené série regulačních genů, které řídí tři významné vývojové dráhy: (1) tvorbu zárodečné linie, (2) pohlavně specifický vývoj somatických buněk a (3) řízení transkripčních hladin chromozómů X (u drozofily se vyvinula pozitivní kompenzace dávky genů: sameček X0 má jediný chromozóm X „hyperaktivní“).

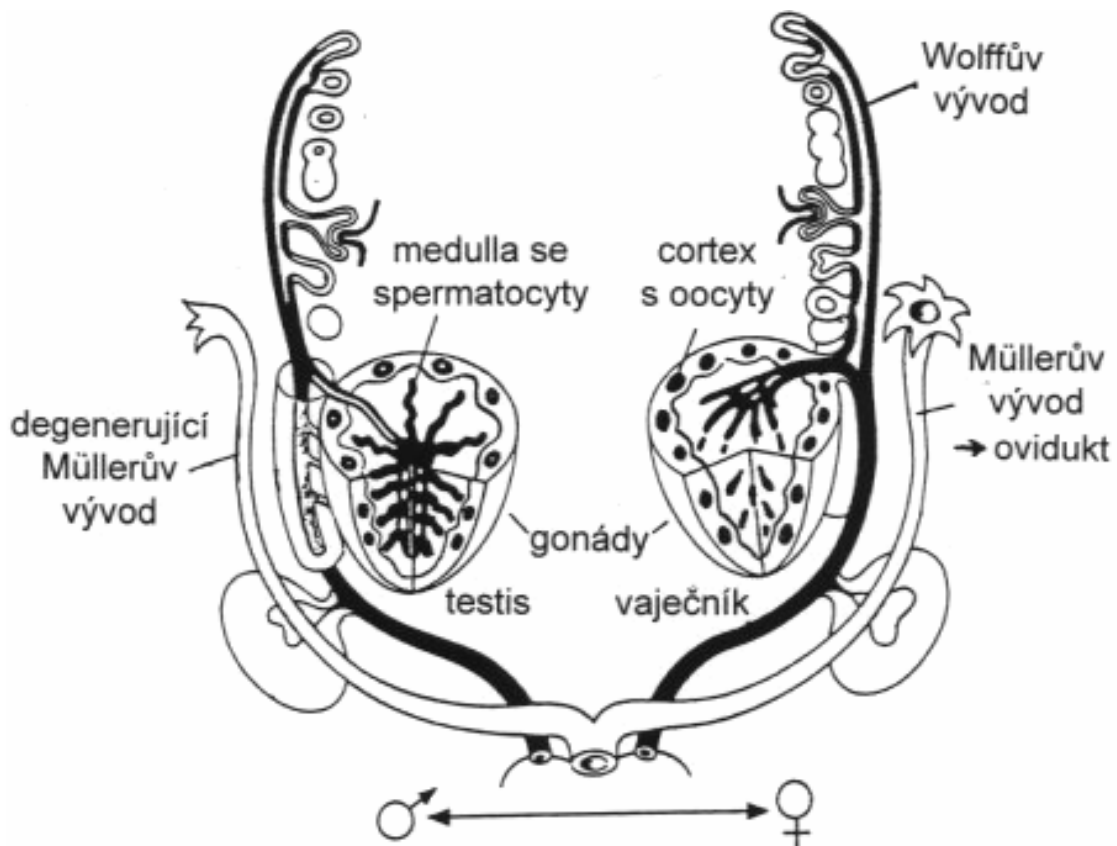


determinujícím genem (s_4) je gen *double sex* (*dsx*), klíčový gen regulační dráhy. Tento gen je sestříhován v samčí nebo samičí verze kódujících transkriptů. Specifita funkce genu *double sex* je regulována ostatními sex-determinačními geny včetně genu *sex lethal*. Mutace *dsx* vedou k intersexům s oběma typy pohlavních orgánů a sníženou fertilitou. Samčí a samičí verze *dsx* transkriptů zapínají samčí/samičí sex-diferenciační geny (ty tvoří transkripty vždy jen u jediného pohlaví).

Oddělení pohlaví je u živočichů tak podobné, že by se čekalo, že bude založeno již v časně evoluci: opak je však pravdou a mechanismy vedoucí ke tvorbě pohlaví jsou u různých živočišných druhů různé. Savci mají odlišný pár pohlavních chromozómů, větší X a menší Y (u samců), zatímco samci ptáků jsou ZZ a samice heterogametické ZW. U ostatních obratlovců jsou systémy XY i ZW, popřípadě (někteří plazi) pohlavní chromozómy vůbec nemají a pohlaví je určováno environmentálně (teplotou inkubace vajíček).

U **savců** jsou embryonální reprodukční struktury (včetně gonád a genitálií) u obou pohlaví stejné (u člověka až do 7. týdne po oplození), nediferencovaná gonáda se vyvine ve vaječník za nepřítomnosti testis-indukčního signálu (gen je na kratším ramenu Y). Pohlavní hormony, které se tvoří těmito gonádami, regulují další sexuální diferenciaci. U myši byla identifikována translokace oblasti *Sxr* (*sexual reversal*) z Y na X, vedla ke vzniku XX sameček. Oblast *Sxr* nese *testis-determining factor* (*Tdy*), u člověka se tento gen nazývá *TDF*. Naopak delece *TDF* na Y vede ke vzniku XY sameček. Nediferencovaná gonáda je tvořena dvěma vrstvami, vnějším epitelem a vnitřní medullou. Pohlavní diferenciaci (efekt produktu *TDF*) má za následek růst a diferenciaci jedné vrstvy a potlačení druhé: epitel tvoří vaječník a medulla testis. Zárodečné buňky migrují posléze do gonád a nakonec dají vznik gametám. Jiné buňky gonád sekretují pohlavní hormony. Též se přestaví embryonální systém vývodů: Müllerův vývod se stane vývodem vaječníků, dělohou a horní vaginou a u samic Wolffův vývod degeneruje. U sameček Müllerův vývod degeneruje a Wolffův diferencuje jako epididymis, vas deferens a semenný váček. Samčí vývoj je založen prostřednictvím sekrece tří hormonů testes: (a) Anti-Müllerův hormon (AMH) způsobuje degeneraci Müllerova vývodu. (b) testosteron způsobuje diferenciaci testes a Wolfova vývodu (c) dihydrotestosteron indukuje maskulinní dráhu vývoje externích genitálií (obr. 94). Po odstranění zárodečných gonád v bipotenciálním stádiu vždy vzniká fenotypově samice: tedy estrogen, který je tvořen normálně ve vaječnicích, není nezbytný pro vývoj samičích znaků (je však nutný pro dospívání v pubertě).

Obr. 94. Vývoj primárních pohlavních orgánů člověka (podle Müllera, 1997). V časně embryogenezi obsahují gonády jedinců XX a XY potenciálně samičí i samčí zárodečné buňky. U XY embryí však primordiální buňky kůry (cortexu) degenerují pod vlivem TDF (*testis determining factor*), produktu genu *SRY* lokalizovaného na chromozómu Y, a gonáda se stává testis (vznik semenných váčků v centru, *medulla*). Současně u samečka degeneruje účinkem faktoru AMDF (*anti-müllerian-duct factor*) primární Müllerův vývod a z Wolffova vývodu se stává účinkem androgenu testosteronu *vas deferens*. U XX embryí dochází vlivem nepřítomnosti TDF ke vzniku samičích gonád. Primordiální buňky kůry se stávají oocyty a záhy (na rozdíl od samečků) vstoupí do meiózy. Gonáda se stává vaječником a Müllerův vývod oviduktem.

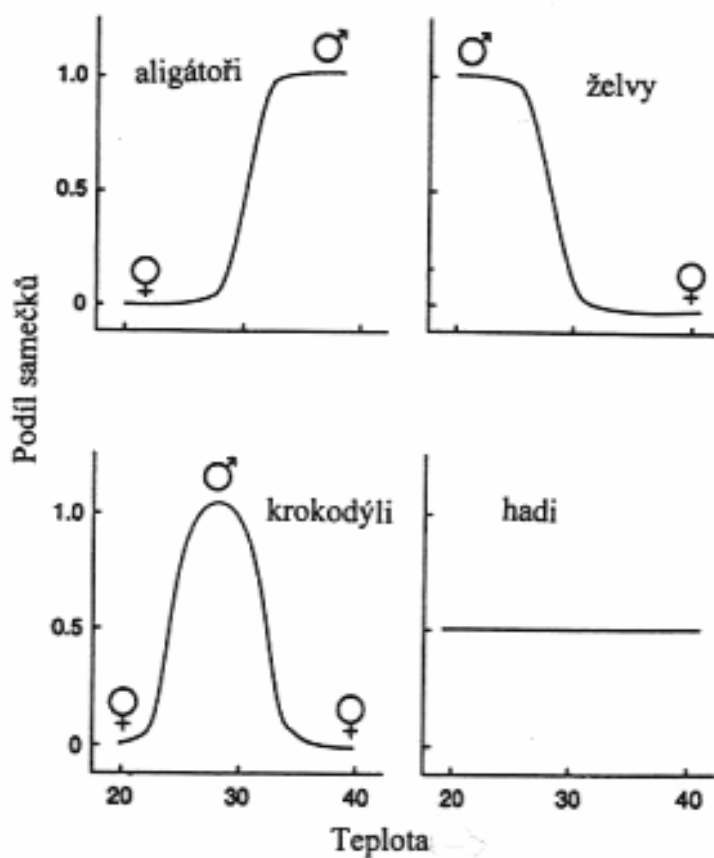


U savců je efekt abnormálního počtu pohlavních chromozómů odlišný od drozofily. XXY jsou sterilní samci (u člověka Klinefelterův syndrom), XO jsou samice (u člověka sterilní Turnerův syndrom; takové myši jsou však fertlní). Embryo je v počátku vývinu samců a samic shodné (zárodečná rýha - rudimenty testes a vaječníků). Embryo má dvě sady vývodů: Wolffův

(potenciálně samčí) a Müllerův (potenciálně samičí). Fetální testes hrají kritickou úlohu v pohlavním vývoji produkci hormonů: jejich aktivita způsobuje samčí vývoj, absence vede k samičímu vývoji. Byla klonována oblast chromozómu Y, *SRY* (*sex determining Y*), z blízkosti pseudoautozomálního (PAR) rozhraní, asi 35 kb dlouhá, zřejmě kóduje kritický faktor samčí determinace. Crossing-over, který zahrnuje i oblasti mimo PAR může způsobit sex reverzi: vznikají pak samci XX nebo samice XY (translokace). Transgenní samice se *SRY* jeví určité znaky samců, jsou však sterilní, neboť jim chybí ještě další Y-geny nezbytné pro spermatogenezi. Gen *SRY* obsahuje oblast konzervovanou u různých savců a kóduje protein s 79-aminokyselinovým motivem, známým jako HMG-doména. Může se vázat na DNA a reguluje transkripci dalších genů nezbytných pro samčí vývin. V průběhu savčí embryogeneze se testes diferencují dříve a rychleji než vaječníky. Také XY embrya rostou rychleji ještě dříve než se vytvoří genitální rýha: Y akceleruje růst časných embryí, zatímco paternální X ho retarduje. Je možné, že samci tak potlačují vliv estrogenů matky. Při selhání mechanismu determinace pohlaví se může vyvinout abnormalita sexuálního vývoje: hermafroditismus, vznik ovotestes nebo testes a vaječníky. Testes nebo ovotestes se vyvinou na pravé straně, zatímco vaječníky vždy na levé. Důvod této asymetrie není jasný.

U jiných obratlovců - ptáků, plazů a ryb - gen *SRY* nebyl nalezen a gen podobný byl identifikován u samců i samic, což naznačuje, že sex je tu determinován jiným mechanismem. Ptáci mají značnou asymetrii gonadální diferenciace: u samic se pouze levá gonáda vyvine ve vaječník, zatímco pravá zůstává zakrňelá nebo testikulární. U plazů, obojživelníků a ryb jsou mechanismy determinace pohlaví typu XX/XY nebo ZW/ZZ, u jiných druhů je sex teplotně determinován (TSD, *temperature-dependent sex determination*, neboli ESD, *environmental sex determination*). TSD je hojný u plazů, kde má obvykle za následek přebytek počtu samic (*female bias*). U ještěrek a aligátorů vedou nízké teploty ke vzniku samiček a vysoké ke vzniku samečků, zatímco u mnoha druhů želv je to obráceně (obr. 95). Hadi však mají pohlavní chromozómy typu ZZ/ZW (obecně GSD, *genotypic sex determination*). Teplotně senzitivní perioda se odehrává v embryogenezi v době, kdy nastává gonadální vývoj. Tento mechanismus TSD lze zvrátit aplikací steroidních hormonů: estrogény feminizují embrya. Extrémní sexuální dimorfismus se vyvinul u mořského červa *Bonellia viridis*, kde pohlaví jedince je určováno prostředím. Pokud se oplozené vajíčko vyvíjí izolovaně, červ se promění ve velkou samičku s vidličkovitým rypáčkem. Pokud se však dostane do rypáčku samice, vyvine se v maličkého samečka (bičkatý organizmus parazitující v samičce). Některé druhy ryb zase mění své pohlaví v průběhu života. U

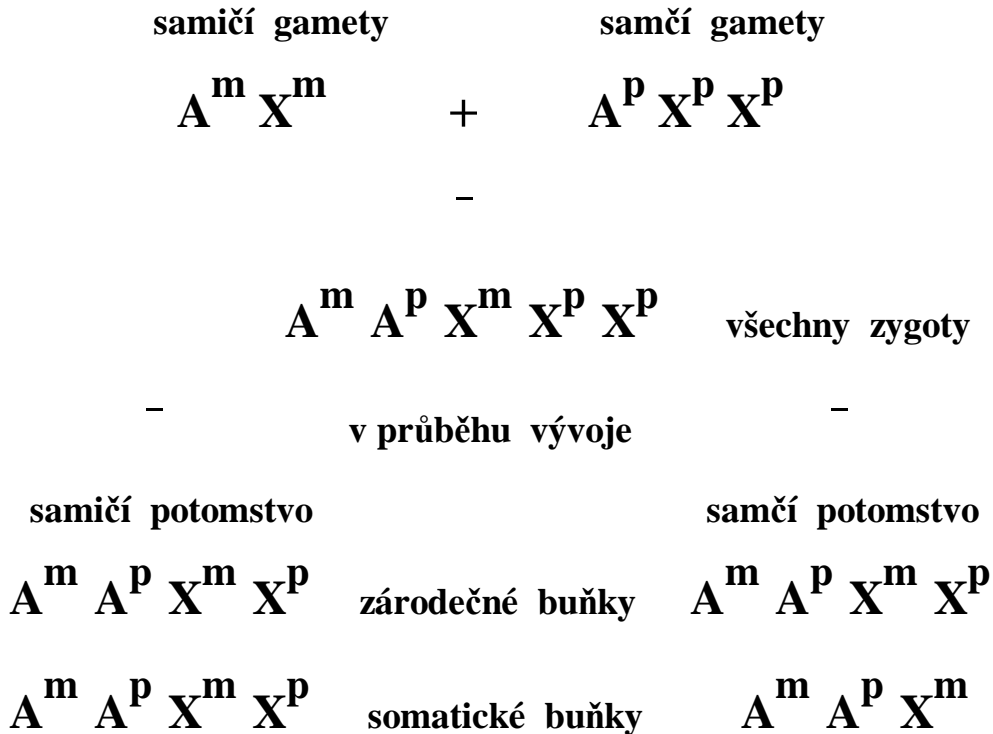
Obr. 95. Environmentálně řízená pohlavní determinace u plazů (podle Mittwochové, 1996). U plazů se vedle genetické determinace pohlaví (XX/XY a ZW/ZZ) vyskytuje u některých druhů i teplotně řízená pohlavní diferenciace (TSD, *temperature-dependent sex determination*). Z volně kladených vajíček se vylíhnou samečci nebo samičky v závislosti na teplotě prostředí, přitom u různých druhů plazů je tento vliv odlišný. Například u aligátorů se při vyšší teplotě líhnou z vajíček samečci, u mnoha druhů želv naopak samičky. Evolučně se tento systém zřejmě vyvinul k tomu, aby dle měnících se životních podmínek v vznikali v daném období preferenčně jedinci určitého pohlaví. V praxi však obvykle v důsledku teplotního typu determinace pohlaví dochází k přebytku samiček (*female bias*), což je pro živočišný druh výhodnější.



jiného červa, *Dinophilus*, tvoří samičky velká a malá vajíčka, která se po fertilizaci vyvinou v samičky respektive samečky. Zde je determinací poměr objemu cytoplazmy k jádru. U všech těchto druhů tedy nejsou pohlavní chromozómy ani jiný genetický typ determinace pohlaví. U hmyzu nacházíme velkou variabilitu v determinaci pohlaví: od typu X/A (drozofila), dominantního chromozómu Y (*Musca domestica*), XX-X0 systém v somatických buňkách (*Sciara coprophilia*) až po teplotně determinované pohlaví (*Aedes simulans*). U *Sciara* (Diptera) souvisí determinace

s rozdílně imprintovaným chromozómem X. Jeden ze dvou paternálně zděděných chromozómů X je vždy eliminován: pokud však dojde v somatických buňkách embrya k eliminaci obou paternálních X, vyvine se z něj sameček (obr. 96).

Obr. 96. Epigenetická determinace pohlaví u dvoukřídlého hmyzu *Sciara coprophilia* (podle Goodwina, 1991). *Sciara* má v podstatě (buněčně autonomní) mechanismus determinace pohlaví typu drozofila (XX/X0), je však ustavován v somatických buňkách složitým epigenetickým procesem. Zygoty mají kromě dvou sad autozómů ($A^m A^p$) tři chromozómy X, jeden maternálního původu (X^m) a dva paternální (X^p). V průběhu vývoje zárodečných buněk dochází u obou pohlaví k eliminaci jednoho X^p , u sameček však při meióze nedochází k disjunkci chromozómů X (spermie jsou aneuploidní, AXX). Pohlaví je determinováno počtem chromozómů X v somatických buňkách. Pokud je v nich eliminován jen jeden paternální X, vznikají samičky (genotyp $A^m A^p X^m X^p$), zatímco při vývojové eliminaci obou paternálních chromozómů X vznikají samečci ($A^m A^p X^m$).



TSD se evidentně nemůže realizovat u savců a ptáků, neboť tito jsou teplokrevní, mají svou stálou fyziologickou teplotu. Proč jsou savci typu X/Y a ptáci Z/W? U savců se samčí embryo vyvíjí v děloze v prostředí bohatém na estrogen, produkty aktivního chromozómu Y urychlují růst a umožňují časnou produkci samčích pohlavních hormonů. Ptačí embryo se vyvíjí mimo těla matky, samičí heterogametnost umožňuje časnou produkci estrogenu. Termín pohlavní zvrát (*sex reversion*) původně znamenal jen změnu samečka v samičku nebo naopak. Zahrnuje však například i změny během života jedince: některé ryby jsou v mladším stádiu života samci, později se stávají samicemi (*protogynous hermaphroditism*). Determinace pohlaví je definována jako proces výběru buď samčí nebo samičí pohlavní diferenciací dráhy. Sexuální diferenciace pak znamená původ nebo expresi pohlavních rozdílů v průběhu ontogeneze. U drozofily nemá kastrace žádný vliv na pohlavní znaky, neboť drozofila nemá pohlavní hormony a je zde buněčná determinace pohlaví. U vyšších obratlovců je diferenciace pohlaví převážně řízena pohlavními hormony a v menším rozsahu je pod přímou genetickou kontrolou.

Box 26. Základní (hermafroditní, jednodomé a dvoudomé) a přechodové typy pohlavnosti a jejich četnost u druhů krytosemenných rostlin.

druhy rostlin	typ květů	výskyt druhů
oboupohlavné (hermafroditní)	jediný typ květů s tyčinkami a pestíky	72 %
andromonoecické nebo	jedinci tvoří květy samčí a oboupohlavné	10 %
gynomoecické	jedinci tvoří květy samičí a oboupohlavné	
jednodomé (monoecické)	oddělené květy samčí a samičí na téže rostlině	7 %
androdioecické nebo	jedinci se samčími a jedinci s obou- pohlavními květy	7%
gynodioecické	jedinci se samičími a jedinci s obou- pohlavními květy	
dvoudomé (dioecické, gonochorické)	oddělení jedinci s květy samčími nebo samičími	4%

Rostliny jsou převážně hermafrodité (tvoří bisexuální květy), účinkům inbrední deprese je však obvykle bráněno cizosprášením. Druhým extrémem u krytosemenných rostlin je relativně málo četná dvoudomost (dioecie), kdy rostliny jsou gonochoristy: tvoří dva druhy jedinců, samčí a samičí. Mezi těmito dvěma základními typy existuje velká variabilita přechodových typů, včetně rostlin jednodomých (samčí a samičí květy se vyvíjejí na odlišných částech rostliny) až po mozaikovou sexualitu v populacích (box 26).

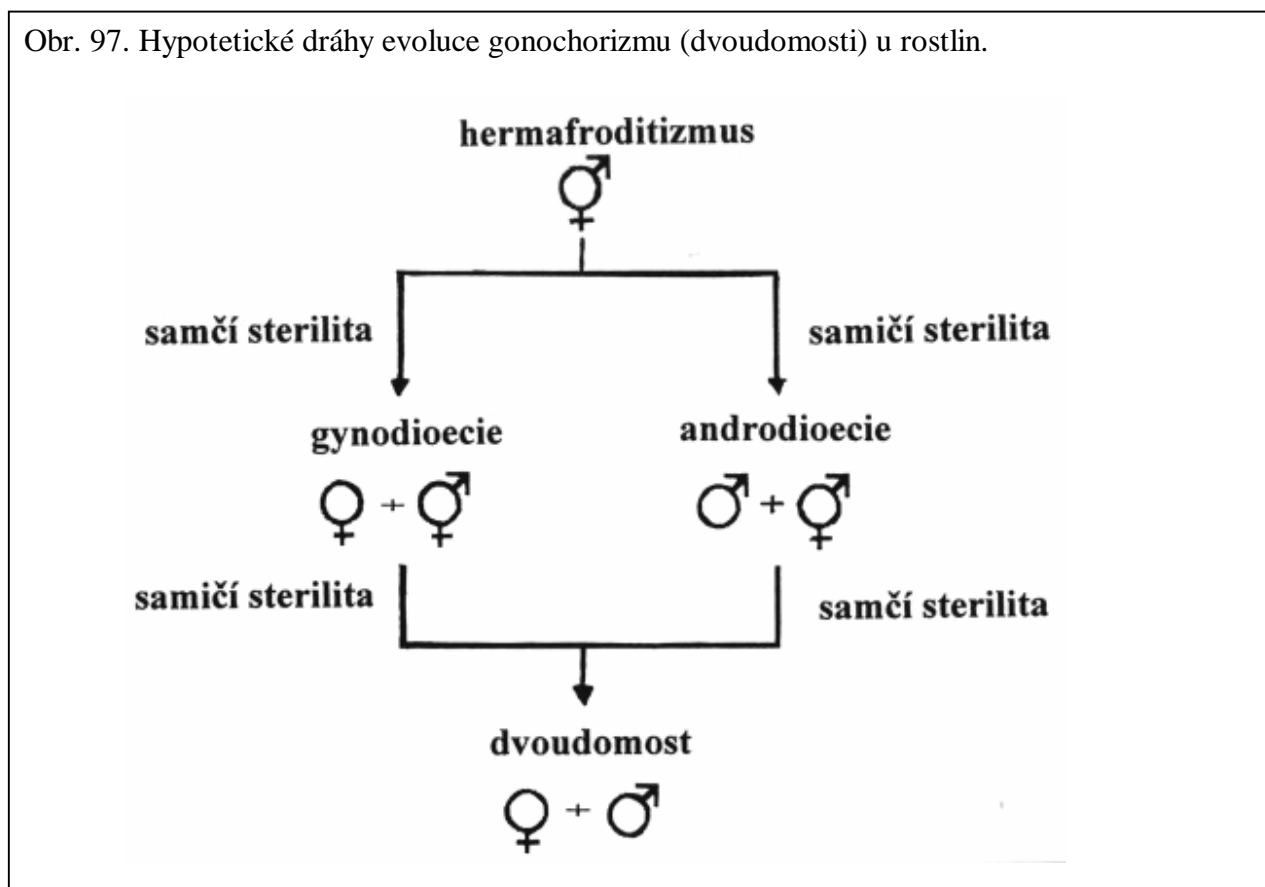
U rostlin dvoudomých se setkáváme s velkou různorodostí pohlavní determinace, a to i v rámci úzkých systematických skupin (dokonce i uvnitř jednotlivých rodů), podobně je tomu u hmyzu. U některých z nich se pohlavní chromozómy nevyvinuly a pohlaví je tu určováno jediným (tykvíce, *Ecballium elaterium*) nebo více lokusy (bažanka, *Mercurialis annua*). Až na malé výjimky se u dvoudomých rostlin s vyvinutými heterochromozómy vyskytuje jako homogametní pohlaví samičí, XX. Pohlaví je pak určováno jako u typu drozofila, X/A (chmel, šťovík) nebo u typu savčího s dominantním chromozómem Y (knotovka, box 27).

Box 27. Determinace pohlaví u dvoudomých rostlin s heteromorfními pohlavními chromozómy (podle Grantové et al., 1994). U chromozómu Y je vyznačena jeho velikost ve srovnání s autozómy (malý - M, střední - S, nebo velký - V) a charakter chromatinu (euchromatický - E, nebo heterochromatický - H).

<i>čeleď/ druh</i>	<i>samčí</i>	<i>samičí</i>	<i>chromozóm Y</i>	<i>typ pohlavní determinace</i>
konopovité:				
chmel otáčivý	XY	XX	M (E)	X / A
chmel japonský	XY ₁ Y ₂	XX	V (H)	X / A
konopí seté	XY	XX	V (?)	X / A
hvozdíkovité:				
knotovka bílá	XY	XX	V (E)	Y
knotovka červená	XY	XX	V (E)	Y
<i>Melandrium dicline</i>	XY	XX	S (E)	Y
tykvovité:				
<i>Coccinea indica</i>	XY	XX	V (H)	Y
rdesnovité:				
<i>Rumex hastatulus</i>	XY	XX	V (E)	X / A + Y
šťovík kyselý	XY ₁ Y ₂	XX	V (H)	X / A

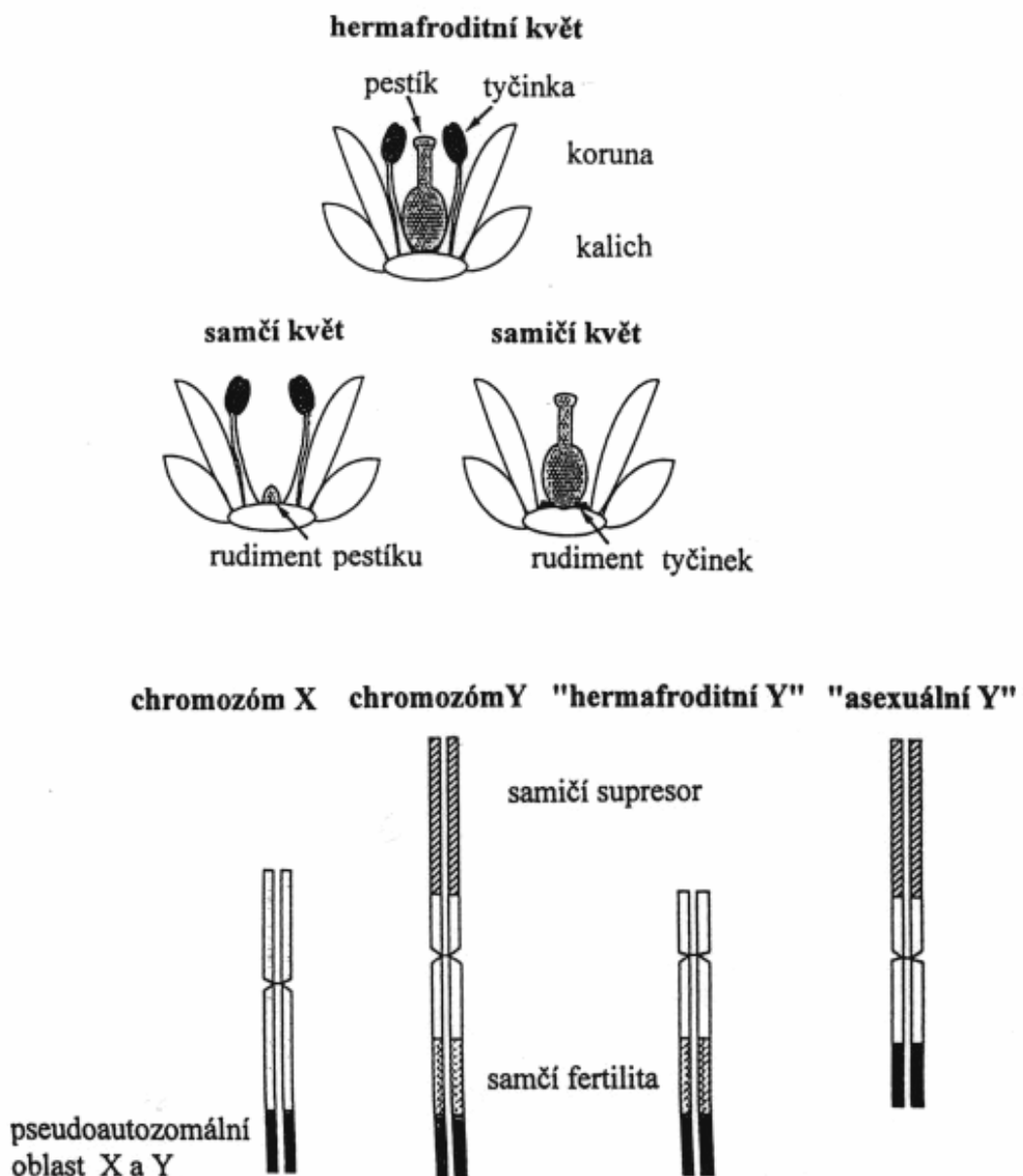
Z heterogenity determinace a exprese pohlaví u rostlin je zřejmé, že oddělená pohlaví se zde vyvinula relativně recentně. Je pravděpodobné, že mutace vedoucí k samčí nebo samičí sterilitě může mít zejména dva pozitivní důsledky. Rostliny s absencí jednoho typu pohlavního orgánu mohou mít vyšší fertilitu opačného pohlaví. Gonochorická individua se samozřejmě nemohou samoopylovat, a proto jejich potomstva netrpí následkem inbrídingu (obr. 97).

Obr. 97. Hypotetické dráhy evoluce gonochorizmu (dvoudomosti) u rostlin.



Pokud je u dvoudomých rostlin přítomen (samčí) chromozóm Y, bývá největší komponentou karyotypu a často i heterochromatický (zřejmě s vysokým obsahem repetitivních sekvencí). Molekulární mechanismy determinace pohlaví u dvoudomých rostlin nejsou dosud objasněny. Vzhledem ke snadno odlišitelným pohlavním chromozómům se klasickým modelem ke studiu dvoudomosti u rostlin stala knotovka bílá (obr. 98). Její chromozómy X a Y mají určitou oblast homologie (pseudoautozomální oblast), kde dochází k párování v meióze. Radiační mutagenezou bylo provedeno první mapování chromozómu Y, který má v procesu pohlavní determinace dvojí funkci: rozhoduje o realizaci samčího vývoje květů (tvorba tyčinek s

Obr. 98. Determinace a projev pohlaví u modelové dvoudomé rostliny knotovka bílá (podle Grantové et al., 1994). Knotovka má savčí typ determinace pohlaví (X/Y), kde chromozóm Y (největší v genomu) kóduje jak supresor vývoje samičích pohlavních orgánů (karpelů), tak i faktory nezbytné pro tvorbu samčích pohlavních orgánů (tyčinek). Delece nebo mutace v oblasti genů samičího supresoru tedy vedou ke vzniku hermafroditů, zatímco delece genů samčí fertility mají za následek tvorbu asexuálních rostlin. Ve květech standardních samčích (AAXY) a samičích (AAXX) rostlin jsou vždy patrné rudimenty orgánů opačného pohlaví. Pohlavnost se u většiny dvoudomých druhů manifestuje tím, že v jejich květech dochází k relativně pozdní vývojové blokádě tvorby karpelů u samčích a tyčinek u samičích rostlin.

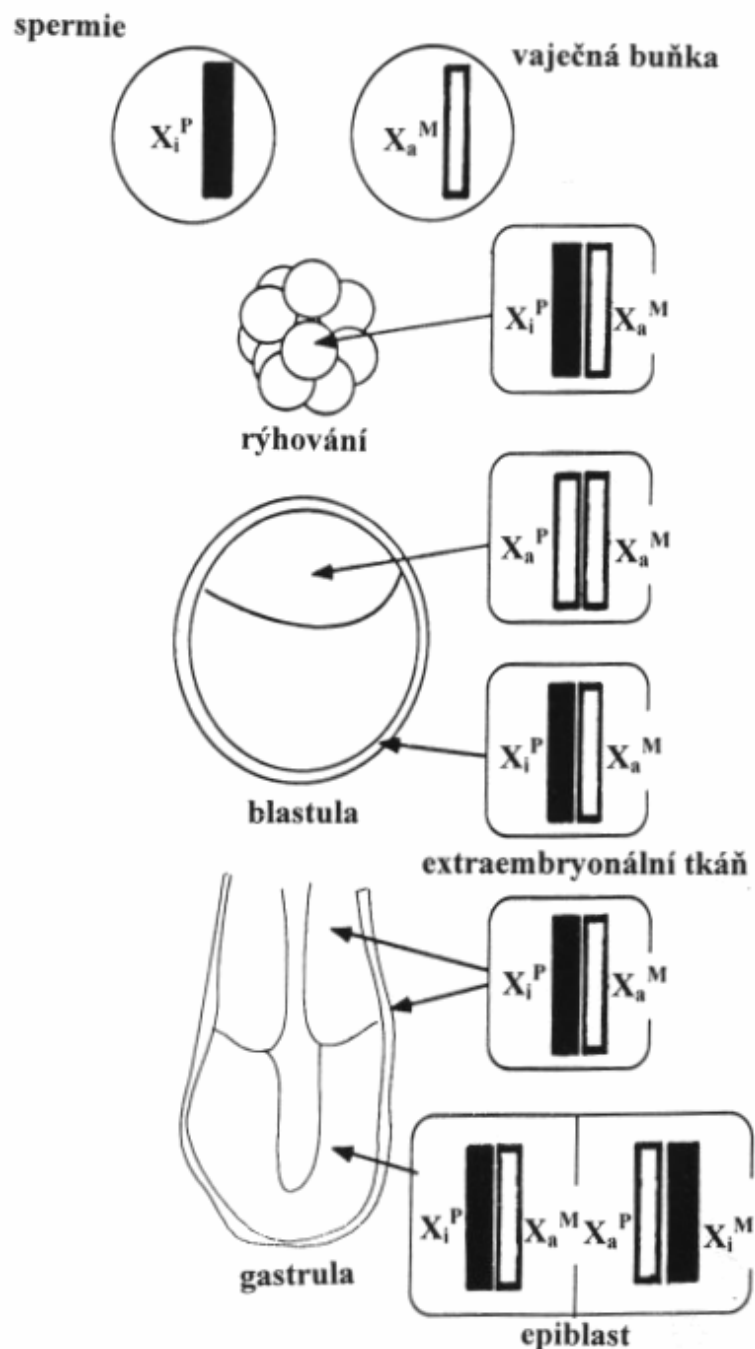


fertilním pylem) a současně i o vývojové blokádě samičího programu. Delece heterologního ramene chromozómu Y vedly ke tvorbě hermafroditních rostlin, zatímco delece v oblasti homologního ramene způsobovaly asexuálnost (sterilitu). Z těchto pokusů tedy vyplývá, že gen/geny kódující supresor samičího vývojového programu se nacházejí na p-ramenu a gen/geny odpovědné za samčí vývoj a fertilitu na q-ramenu. Rostliny netvoří žádné pohlavní hormony a nejeví ani pohlavní dimorfismus: samčí a samičí rostliny se liší obvykle jen svými květy. V nich dochází k vývojové blokádě vždy jednoho z pohlavních programů: v samčích květech s tyčinkami lze pozorovat rudimenty pestíků, v samičích květech s pestíky jsou rudimenty zakrslých tyčinek. Pohlavní zvrát je u některých druhů dvoudomých rostlin relativně častý (např. u bažanky), ať už environmentálními vlivy nebo experimentální aplikací určitých hormonů (auxiny, cytokininy nebo gibereliny). U typů s diferencovanými pohlavními chromozómy je však pohlaví determinováno striktně a jeho reverze může nastat pouze mutací nebo indukovanou změnou genové exprese.

4.3 Kompenzace dávky genů

Jako kompenzace dávky genů označujeme jevy nebo procesy, kterými dochází ke srovnávání hladiny genových produktů při rozdílném počtu kopií genu, chromozómu nebo celé genomové sady v buněčném jádře. Známým příkladem této kompenzace jsou geny nesené pohlavními chromozómy u některých živočichů. Ke kompenzaci dochází obvykle jen u těch druhů, kde homogametním pohlavím (XX) jsou samičky popř. hermafrodité (např. drozofila, *Caenorhabditis*, savci). Jelikož jejich chromozóm X nese geny nezbytné pro vývin jedinců obou pohlaví, vyvinuly se v průběhu evoluce mechanismy, které kompenzují odlišný počet kopií chromozómů X u samečků a samiček a zajišťují stejnou hladinu produktů genů. V principu existují dva typy těchto regulačních mechanismů, pozitivní a negativní. Pozitivní (*up-regulation*) mechanismus se vyvinul u drozofily: na jediném X chromozómu u samečka (XY nebo X0) se aktivují regulátory (zesilovače), které zajišťují přibližně dvojnásobnou transkripční aktivitu jeho příslušných X-vázaných genů. U hlístice *Caenorhabditis* funguje negativní kontrolní systém (*down-regulation*): v homogametních hermafroditech (XX) jsou aktivovány regulační geny, které redukují hladiny X-transkriptů na úroveň samečků (X0). U savců se vyvinul také negativní regulační mechanismus: homogametní samičky mají jeden ze svých dvou chromozómů X

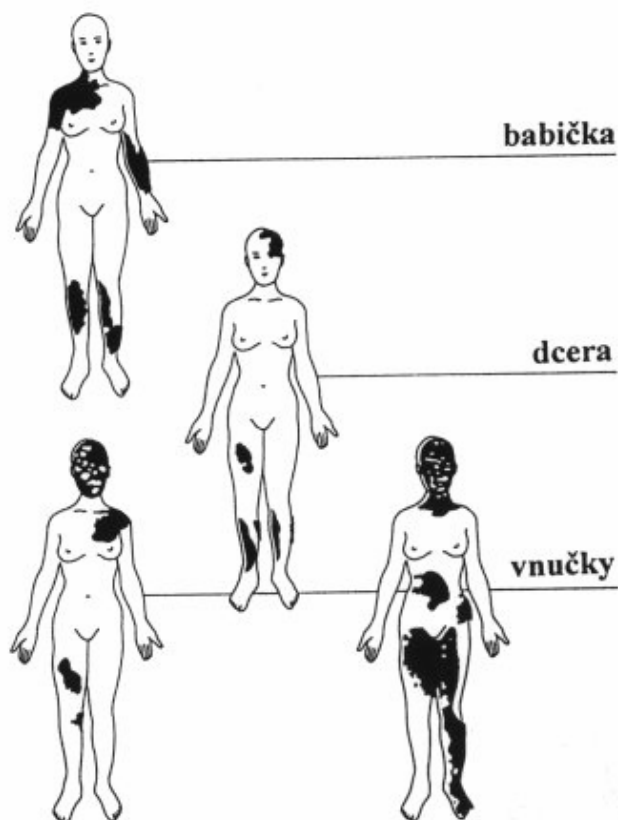
Obr. 99. Cyklující aktivita X chromozómu (aktivní X_a versus inaktivní X_i) v průběhu ontogeneze u placentálních savců (podle Jamiesona et al., 1996). X chromozóm je inaktivován před samčí meiózou, zatímco ve vaječných buňkách zůstává aktivní. Tento stav je zachován v průběhu rýhování, avšak při tvorbě blastuly dochází ve vlastním základu embrya k rozsáhlé demetylací DNA, která vede k aktivitě paternálního (X^P) i maternálního (X^M) chromozómu; v extraembryonální tkáni (placentě) zůstává X^P inaktivní. Ve stádiu gastrulace pak dochází u samic k náhodné inaktivaci (lyonizaci) paternálního nebo maternálního X chromozómu, což vede k výslednému mozaikovému fenotypu.



inaktivován (lyonizace, obr. 99). U primitivnějších savců, vačnatců, je inaktivován vždy chromozóm X paternálního původu, tento chromozóm se replikuje v pozdní S fázi a obsahuje hypoacetylované histony H4. U samic placentálních savců (včetně člověka) nastává inaktivace chromozómu X až po implantaci embrya do stěny dělohy a v tomto mnohobuněčném embryu dochází k náhodné inaktivaci chromozómu X paternálního a maternálního původu, takže výsledkem je mozaikový expresní fenotyp (obr. 100). V extraembryonálních tkáních (placentě) je však inaktivován vždy paternální chromozóm X.

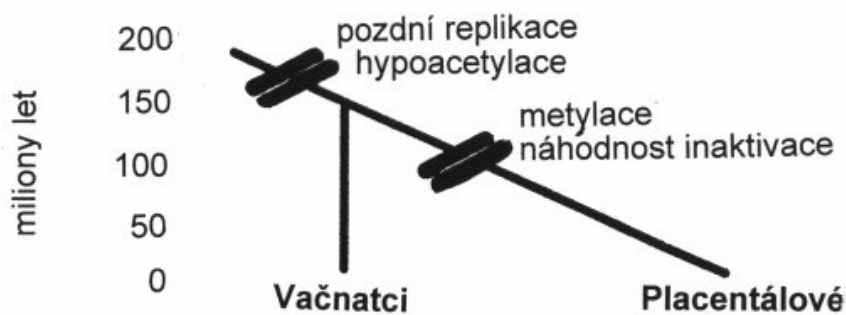
Obr. 100. Demonstrace náhodné inaktivace chromozómu X u ženy (podle Goodwina, 1991).

Jelikož savčí chromozóm X nese geny potřebné pro vývoj samic (XX) i samečků (XY), podrobuje se kompenzaci své dávky: jeden samičí chromozóm X je v průběhu časné embryogeneze inaktivován. K této inaktivaci dochází v několikabuněčném embryu náhodně, tedy bez ohledu na maternální či paternální původ chromozómu X, výsledkem je mozaikový fenotyp exprese genů vázaných na chromozóm X u samic. Na obrázku je lokalizace oblastí dědičné X-vázané kožní choroby (*anhidrotic dysplasia*) u tří generací žen. Lokalizace mutantních tkání jsou náhodné, vznikají vždy mozaiky, avšak odlišné u jednotlivých žen.



U placentálů je X-inaktivace též provázena hypoacetylací histonů a pozdní replikací jako u vačnatců, inaktivní X je však navíc hypermetylován (metylace cytozinu, box 28). V interfázi je možné ho pozorovat jako kondenzované Barrovo tělísko (fakultativní heterochromatin). Analýzy kinetiky inaktivace X-genů versus metylace DNA a hypoacetylace histonů na X chromozómu prokázaly, že inaktivace nastává dříve než modifikace DNA a histonů.

Box 28. Evoluce a srovnání mechanismů inaktivace chromozómu X u samic vačnatců a placentálních savců (podle Wakefielda et al., 1997). K oddělení vývojových větví vačnatců a placentálů došlo asi před 150 milióny let. Pozdní replikace inaktivního chromozómu X a hypoacetylace jeho nukleozomálních histonů jsou mechanismy vývojově starší, zatímco hypermetylace DNA a náhodnost inaktivace se vyvinuly později, pouze u placentálů.



vačnatci :

hypoacetylace histonů

pozdní replikace X

inaktivace paternálního X

nejsou rozdíly v CpG metylacích

inaktivace je nestabilní

inaktivace je jen částečná

inaktivace je tkáňově specifická

sex chromatin není výrazný

placentálové :

= hypoacetylace histonů

= pozdní replikace X

¹ náhodná inaktivace X (v trofoblastu však paternální)

¹ inaktivní X obsahuje hypermetylované CpG ostrůvky

¹ inaktivace je hyperstabilní

¹ inaktivace (téměř) celého chromozómu

¹ inaktivace není tkáňově specifická

¹ dobře odlišitelný sex chromatin (Barrovo tělísko)

Z těchto výsledků vyplývá, že zmíněné chemické modifikace zřejmě nepředstavují příčinu inaktivace, ale spíše epigenetické mechanismy, kterými je inaktivní stav permanentně udržován. Inaktivace X počíná od lokusu *XIST*, který kóduje netranslatovanou RNA zajišťující inaktivaci (téměř celého) chromozómu v pozici *cis*. Gen *XIST* je tak jedním z mála genů, který je transkripčně aktivní na inaktivním X chromozómu a naopak nefunkční na aktivním X. Chromozóm X u samic savců je aktivován v zárodečných buňkách, avšak inaktivován v průběhu samčí meiózy. X chromozóm u savců se tedy v průběhu vývinu organismu podrobuje periodickým změnám své aktivity a je proto modelovým objektem ke studiu epigenetických inaktivačních procesů.

4.4 Úloha pohlavnosti

Již Hofmeister v polovině minulého století zjistil, že rostliny alternují mezi dvěma odlišnými fázemi, střídání generací. Střídání fází je důsledkem pohlavní reprodukce, vzniku haploidních gamet. Délka těchto dvou fází je však různorodá u odlišných organismů: zvláště u řas a protist, kde životní cykly sahají od úplného haploidního vývoje přes haploidní-diploidní (somatický vývoj v obou fázích) až k plně diploidnímu (obr. 101). Většina mnohobuněčných organismů se podrobuje somatickému vývoji v diploidním stavu, spíše výjimkou jsou řasy, houby, mechy a kapradiny, částečně i krytosemenné rostliny (gametofyt). Další výjimkou jsou u živočichů **arrhenotokie**: haploidní samečci se vyvíjejí z neoplozených vajíček - např. někteří červi, pavouci, stejnokřídlí, brouci a sociální blanokřídlí - mravenec, včela, vosa, a **pseudoarrhenotokie**: samečci se vyvíjejí z oplozených vajíček, avšak následně eliminují nebo epigeneticky umlčují paternální genom - např. někteří pavouci, stejnokřídlí, brouci a dvojkřídlí. Je však zřejmé, že diploidie je evolučně výhodnější: čím jsou rostliny na vyšším stupni fylogenetického vývoje, tím více převažuje diploidní sporofyt (box 29).

Sex je paradoxem, protože klade-li příroda důraz na genetickou přesnost, výhodou je asexuální reprodukce, která tvoří jedince tak dokonalého, jako je mateřský. Sexuální reprodukce však zahrnuje přetváření genomu: produkce gamet zahrnuje rekombinaci a fertilizaci, při které fúzí genomy odlišných rodičů, pak tvoří ještě více genetických kombinací. Dalším paradoxem je cena za sex, primárně je jím vůbec cena za tvorbu samečka. Pohlavnost je odlišena i u jednobuněčných prokaryot a eukaryot, u většiny vyšších živočichů (všech obratlovců) a u

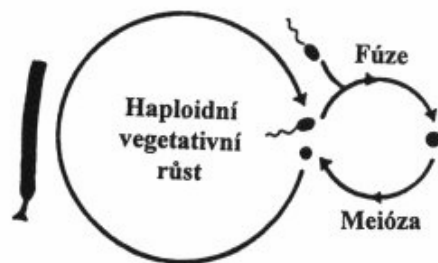
Obr. 101. Diverzita životních cyklů: střídání haploidních a diploidních generací (podle Mable a Otto, 1998).

(a) Haplontický cyklus u zelené řasy *Ulothrix*: buněčné dělení a vývoj se odehrávají výhradně v haploidní fázi. Gamety fúzí za vzniku diploidní zygoty, která se ihned podrobí meióze a dává vznik haploidním spórám.

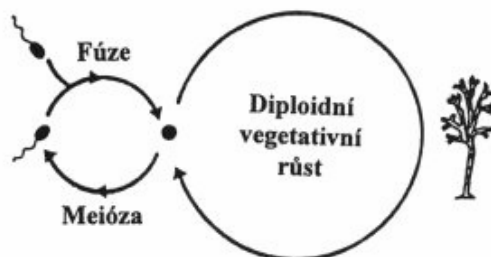
(b) Diplontický cyklus u hnědé řasy *Fucus* (a většiny živočišných druhů): buněčné dělení a vývoj se odehrávají výhradně v diploidní fázi. Haploidie je redukována na jednobuněčné gamety, které ihned fúzí za tvorby diplofáze.

(c) Izomorfní střídání haploidie a diploidie u zelené řasy *Ulva*: buněčné dělení a vývoj se odehrávají v haplofázi i diplofázi. Haploidní gametofyt dává mitózou vznik gametám a diploidní sporofyt dává meiózou haploidní spóry. Heteromorfní rodozměna (střídání nestejných morfologických struktur) se vyskytuje u všech cévnatých rostlin.

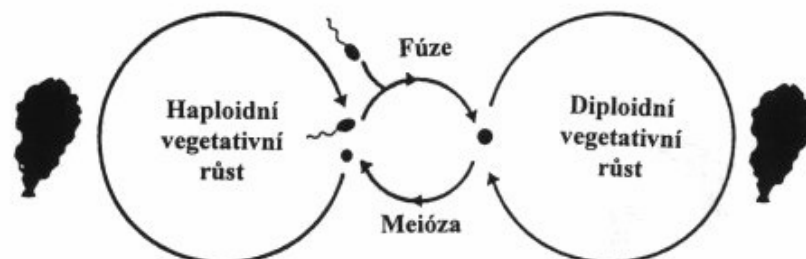
a) Haploidní cyklus



b) Diploidní cyklus



c) Haplo-diploidní cyklus



Box 29. Střídání haploidních a diploidních životních cyklů.

výhody diploidie :

- n** škodlivé mutace bývají recesivní, jsou tudíž maskovány
- n** frekvence škodlivých alel je nízká, diploid tvořený náhodným křížením neponese dvě mutantní kopie lokusu
- n** mutantní jedinci s prodlouženou diplofází by měly mít vyšší fitness a diploidie je tak selektivně zvýhodněna
- n** maskování mutací se projeví v somatických buňkách v průběhu vývoje
- n** dvě kopie každého genu zvyšují rychlost adaptace diploidů v novém prostředí
- n** diploidie představuje skrytou genetickou variabilitu, která může být užitečná v novém životním prostředí

výhody haploidie :

- n** maskování škodlivých mutací u diploidů je výhodné pro individuum, ale nevýhodné pro potomstvo, které je zdědí
- n** mutace jsou přímo eliminovány, haploidní populace nesou méně mutací a mají vyšší fitness než populace diploidní
- n** haploidní buňky mají nutriční výhodu, jsou menší, mají vyšší poměr povrchu k objemu, snazší transport živin
- n** replikace DNA, energeticky velmi náročná, probíhá v polovičním rozsahu

výhody haplo-diplo-cyklů :

- n** výhoda v extrémních životních podmínkách, kdy haplotypy a diplotypy přežívají v odlišných ekologických nikách
- n** jednotlivé morfologické stavy mohou být regulovány environmentálně
- n** umožňuje dva způsoby disperze genetického materiálu: via haploidní gamety / diploidní zygoty tvořené gametofytem a haploidní spóry tvořené diploidním sporofytem
- n** sex se vyskytuje jen v poloviční míře

některých druhů rostlin. Některé organizmy jsou výjimečně asexuální (např. bezobratlí vodní Rotifera), sexuální se dělí na hermafrodity a gonochoristy. Hlavní předností sexuality je odstraňování škodlivých mutací a představuje tak možnost evolučního pokroku (box 30).

Box 30. Shrnutí výhod a nevýhod pohlavní rozmnožování.

n e v ý h o d y :

- n** poloviční rychlost rozmnožování
- n** vyředování vlastního genetického materiálu
- n** dochází k rozpadu osvědčených genových kombinací
- n** vyžaduje složitý fyziologický aparát
- n** časově i energeticky náročná činnost
- n** možnost šíření parazitických organizmů
- n** kritická velikost populace

v ý h o d y :

- n** možnost současné selekce několika výhodných mutací
- n** zbavování se sousedství nevýhodných mutací
- n** udržování polymorfizmu v populaci
- n** udržování diploidního stavu alel v genomu
- n** snižování vzájemné konkurence mezi sourozenci
- n** výběr jedinců ideálně přizpůsobených stanovišti
- n** snížení podobnosti mezi rodičem a potomstvem
- n** vznik pohlavního rozmnožování je evolučně jednosměrný proces

Zajímavý je častý výskyt sociální monogamie u živočichů, její význam je však nejasný. Někdy žijí v párech, starají se o mláďata, i když samice bývají oplodněny i jinými samci. Monogamie je zřejmě evolučně favorizována, jejich mláďata mají při péči obou rodičů větší šanci na přežití. U savců, krytosemenných rostlin a mnoha druhů hmyzu se vyvinul genomový (parentální) imprinting, „genomová válka sexů“ (*tug-of-war*). Tento jev popírá základní dogma biologie, že geny zděděné od otce a matky hrají stejnou roli v potomstvu: dosud ne zcela detailně známé biochemické procesy způsobují selektivní umlčování paternálních nebo maternálních kopií genů.

5 Epigenetické procesy

Epigenetické řízení vývoje lze definovat jako modulace genové exprese prostřednictvím mechanismů, které jsou nadřazeny informaci dané primární sekvencí DNA. Častým výsledkem epigenetických procesů jsou odlišné exprese různých kopií stejného genu (alel) v daném buněčném jádře. Epigenetické efekty jsou někdy považovány za poněkud mystické, neboť představují paradox klasické genetiky: dvě alely - někdy i se zcela shodnou primární genetickou informací - se dědí do potomstva v odlišných stavech (potenciální aktivita resp. inaktivita). Jinými slovy, jde o dědičnost negenetických stavů: existují dvě možné (diskontinuální) alternativní formy genové aktivity. Lewin (1998) považuje jednu z forem za základní („naivní“, forma aktivní), které je dosaženo jednoduše syntézou odpovídající látky. Alternativní formou je stav determinovaný, kdy dochází k rozlišení komponent od „naivního“ stavu. Epigenetické efekty mají v principu dva hlavní typy mechanismů v závislosti na tom, zda cílovým místem pro konverzi z „naivního“ na determinovaný stav je DNA nebo protein. Modifikací DNA jsou kovalentní adice chemických skupin do specifických sekvencí DNA, nejčastěji metylace cytozinu v dinukleotidu CpG, což je obvykle spojeno s inaktivací cílové sekvence. Tato modifikace je děděna epigeneticky, protože existuje systém, který po replikaci DNA rozpoznává hemimetylované sekvence a konvertuje je na plně (v obou vláknech) metylované. Epigenetický stav může být navozen metylací *de novo* nebo naopak revertován odstraněním metylové skupiny: buď postupně replikativně (absencí „udržovací“ metylace v sérii buněčných dělení) nebo aktivní demethylací (recentně identifikován enzym cytozin-demetyláza, Bhattacharya et al. 1999). Epigenetické stavy mohou být také navozeny modifikací proteinů, zejména acetylací nukleozomálních histonů. Acetylace i deacetylace jsou aktivními procesy katalyzovanými příslušnými enzymy (histon acetylázy a deacetylázy). Na rozdíl od metylací DNA však dosud není zcela jasné, jakým mechanismem dochází k reprodukci specificky acetylovaných stavů při buněčném dělení. Je možné, že tento mechanismus je podobný metylacím DNA: přítomnost acetylovaných histonů dává signál acetylázám působit na nemodifikované histony ve stejném nebo sousedním nukleozómu.

Dnes je zřejmé, že klíčovou roli v řízení aktivity genů hraje struktura příslušné oblasti chromatinu (*protein templating*). Určitá oblast chromatinu může existovat ve dvou formách: potenciálně aktivní a potenciálně inaktivní (inaktivní konformace je obvykle navozena determinovaným stavem). Tyto stavy jsou (1) udržovány replikací chromatinu při buněčných děleních a (2) mohou se šířit do (různě vzdálených) sousedních oblastí chromatinu. Příkladem

tohoto horizontálního šíření epigenetické informace je pozičně-variegační efekt u drozofily: pravděpodobnost inaktivace genu translokovaného do místa poblíž heterochromatinu klesá s jeho vzdáleností od heterochromatinového bloku. Epigenetické jevy se manifestují rozmanitým způsobem (box 31), proto je nutné tyto jevy vymezit určitými kritérii: (1) musí být způsobeny (popř. provázeny) diskrétní změnou metylace DNA nebo modifikací jaderných proteinů, (2) udržovány při replikaci chromatinu, (3) plně reverzibilní (s četností o několik řádů vyšší než u mutací). Následky epigenetických modifikací jsou nejvýraznější v případech genomového imprintingu u savců, kde dvě parentální alely (maternální a paternální) vykazují alternativní stavy schopnosti své funkce. Tvorba imprintu, obvykle spjatá se specifickou metylací CpG v určité sekvenci DNA v buňkách zárodečné dráhy, je v generační souslednosti plně reverzibilním a obousměrně cyklujícím procesem. Alely paternálního původu procházejí i oocyty a získávají tak maternální imprint a podobně maternální alely získávají paternální imprint při spermatogenezi. Z toho je zřejmé, že modifikace i demodifikace jsou aktivními procesy. Klasickým příkladem epigenetických jevů je tvorba (obvykle fakultativního) heterochromatinu, který umlčuje aktivitu určitého lokusu (např. paramutace u rostlin), oblasti chromozómu, celého chromozómu (např. lyonizace chromozómu X u savců) nebo genomové sady (u některých druhů hmyzu). Za epigenetický jev však není možné považovat tvorbu heterochromatinu obecně, pokud neexistuje jeho alternativní (tj. aktivní) stav. Takovým příkladem je konstitutivní heterochromatin, který obsahuje rozsáhlé oblasti repetitivních, nikdy netranskribovaných úseků DNA.

Stabilní děděná inaktivace určitých sad genů je významným regulačním faktorem buněčného cyklu eukaryotické buňky a v mnohobuněčných organizmech je nezbytná k udržování determinovaných stavů genové exprese v průběhu individuálního vývoje. V časném embryonálním vývoji generují mechanismy tvorby tvarů v každé buňce určité kombinace regulačních faktorů. Následně musí být tyto specifické expresní stavy udržovány po mnoho buněčných generací, aby v průběhu diferenciací vznikaly příslušné správné struktury. Genetická analýza embryogeneze drozofily ukázala, že odpovědnost za udržování vývojové determinace mají dvě skupiny genů, *Polycomb group (Pc-G)* a *trithorax group (trx-G)*. Geny skupiny *Polycomb* jsou odpovědné za udržování permanentní inaktivity homeotických genů, zatímco geny *trithorax* jsou nezbytné k udržování aktivního stavu. Je možné, že se tyto mechanismy vyvinuly právě u drozofily jako alternativa k mechanismům metylace DNA (5-metylcytosin nebyl u drozofily prokázán). Regulační úlohy těchto genů spočívají v řízení struktury chromatinu.

Box 31. Srovnání epigenetických procesů u krytosemenných rostlin a savců.

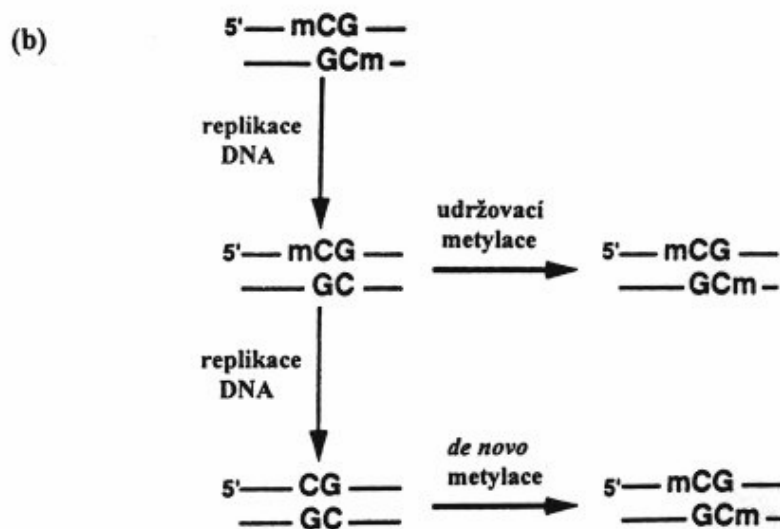
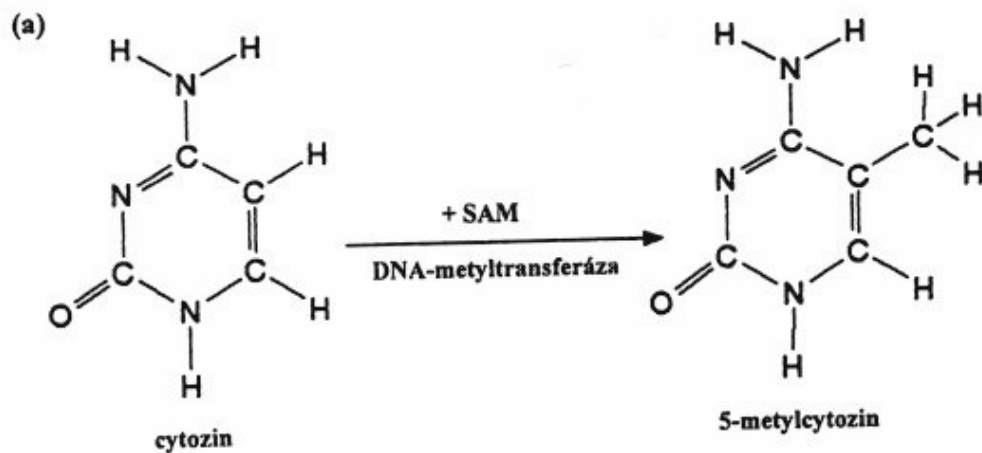
	Krytosemenné rostliny	Savci
Epigenetické procesy		
parentální imprinting	pouze v extraembryonálních pletivech – triploidní endosperm (2 maternální genomy + 1 paternální genom)	řada genů v embryonálních tkáních, karcinomy dizomického původu, projev mnoha nervových chorob v závislosti na rodičovském původu
kontrola výživy embrya		extraembryonální paternální inaktivace X-chromozomu
možnost androgeneze, partenogeneze a polyploidie	vysoká (přirozeně i experimentálně)	nemají
alelické interakce	paramutace, transgeny	transvekce
kompensace dávky genů nesených pohlavními chromozomy	lyonizace X-chromozomu u některých dvoudomých rostlin?	lyonizace jednoho samičího X-chromozomu
inaktivace transgenů	velmi častý jev	častý jev
funkční (popř. genetická) haploidie	gametofytická fáze vývinu, pohlavní chromozomy u některých dvoudomých rostlin	pohlavní chromozomy, alelická exkluze v buňkách produkujících imunoglobuliny, tvorba haploidních gamet
parentální dominance u mezidruhových hybridů	běžný jev	častý jev
specifická ztráta (sad) chromozomů	mezidruhové hybridy u ječmene	hybridní buňky v kulturách <i>in vitro</i>

5.1 Úloha metylací DNA

V epigenetických procesech, které odpovídají za funkční plasticitu genomu, hrají rozhodující úlohu metylace DNA, struktura chromatinu a kinetika replikace DNA. Je dokázáno, že metylace DNA (zejména cytozinu, obr. 102a) v promotorových oblastech negativně ovlivňuje expresi genů u většiny eukaryotických organismů (Jost a Saluz 1993). Zatímco v jaderných genomech savčích druhů je metylováno asi jen 8 % cytozinových bází, u rostlin dosahuje tato hodnota až 30 %. Vysoký stupeň metylace rostlinných genomů je způsoben především značným obsahem hypermetylovaných repetitivních sekvencí (až 90 % genomu). Navíc je rostlinná DNA metylována v sekvencích CpG, CpNpG i v nesymetrických sekvencích DNA, zatímco v genomech obratlovců se metylace cytozinu vyskytuje téměř výhradně v dubletech CpG.

Genomy obsahují výrazně hypermetylované i hypometylované oblasti: hypermetylované domény zahrnují repetitivní sekvence DNA (konstitutivní heterochromatin), které se nepodrobují procesu crossing-over při meióze, zatímco hypometylované domény (tzv. hypometylované CpG ostrůvky) jsou rekombinačně aktivní a představují především konstitutivně exprimované geny. V některých výjimečných případech, jako je inaktivace (lyonizace) jednoho ze dvou pohlavních chromozómů X v samičích buňkách savců (kompenzace dávky genů nesených tímto chromozómem), dochází k hypermetylaci celého chromozómu. Methylace cytozinu se při mitotickém dělení buňky dědí pomocí udržovacích DNA-metyltransferáz. Znamená to, že tyto metylázy rozpoznávají hemimetylovanou DNA, vznikající semikonzervativní replikací, a metylují nová, dceřinná vlákna DNA (obr. 102b). Tento mechanismus tak poskytuje molekulární základ pro buněčnou dědičnost specifických genových aktivit v průběhu individuálního vývoje. Ztráta metylace může vést k dědičným abnormalitám v expresi genů, které nazýváme epimutacemi (Holliday 1990). Nejčastěji užívaným činidlem k experimentální indukci změn metylačního stavu DNA je 5-azacytidin, který může být do DNA včleňován na místo cytozinu nebo 5-metylcytozinu a blokuje metylaci DNA kovalentní vazbou do aktivního centra DNA-metyltransferáz. Methylace promotorových úseků genů jsou často spojeny s jejich inaktivací a jsou orgánově specifické. Bylo též prokázáno, že metylace DNA jsou zodpovědné za aktivaci a inaktivaci rostlinných mobilních genetických elementů a vnesených cizorodých genů (viz kapitola 5.4). Methylace může inhibovat genovou expresi tím, že brání vazbě specifických proteinových transkripčních faktorů, například vazbou metylcytozin-specifických proteinů.

Obr. 102. Metylace eukaryotické DNA. **(a)** Nejčastější chemickou modifikací DNA je metylace cytozinu v pozici 5-C pyrimidinového kruhu: donorem metylové skupiny je S-adenozylmetionin (SAM), reakce je katalyzována DNA-metyltransferázami. **(b)** Replikací symetricky metylovaných CpG dubletů vzniká hemimetylovaná DNA, jejíž dceřinné vlákno je obvykle metylováno udržovací DNA-metyltransferázou. Pokud dojde k další replikaci hemimetylované DNA bez metylace dceřinného vlákna, vznikají nemetylované CpG dublety. K jejich pozdější metylaci může dojít činností enzymů *de novo* DNA-metyltransferáz. Recentně bylo prokázáno, že v eukaryotických buňkách je přítomen i enzym DNA-demetyláza, který je schopen demetylovat cytozin i bez replikace DNA.



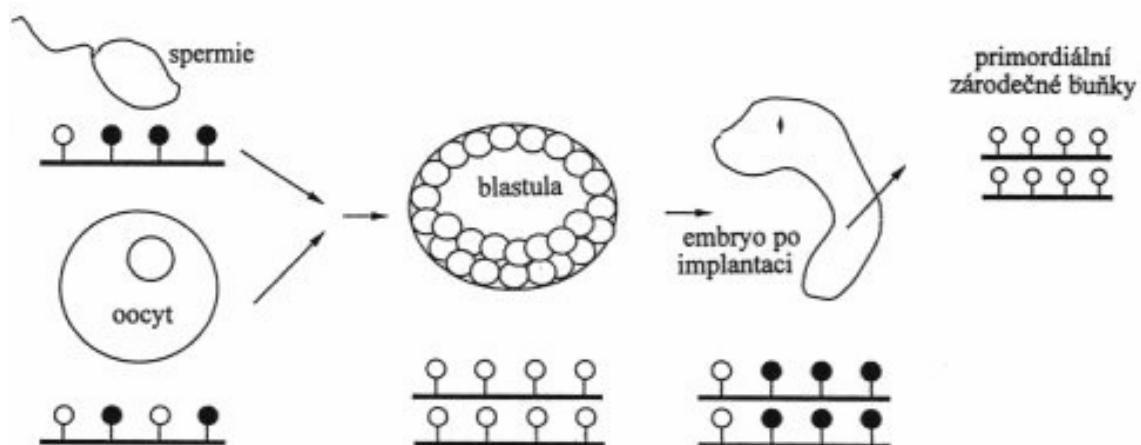
Ačkoli role metylace cytozinu v inaktivaci genů je evidentní, je pravděpodobné, že metylace DNA není příčinným, ale spíše sekundárním procesem, který zajišťuje přenos informace o aktivitě genů (epigenetické informace) v průběhu buněčných dělení. Demethylace se jeví jako nezbytný krok směrem k transkripční aktivaci genů tímto mechanismem kontrolovaných, ne všechny demetylované geny jsou však aktivní. Znamená to, že demethylace samotná nestačí k zahájení transkripce; další mechanismy, zejména vazba regulačních proteinů, jsou k nezbytné k realizaci transkripce. Ne všechny eukaryotické geny jsou regulovány prostřednictvím metylace DNA. Tyto výjimky potvrzují, že metylace je pouze jedním z mnoha možných mechanismů užívaných v genetické regulaci. Drozofila, hlístice, kroužkovci a některé houby postrádají systém metylace DNA. Naznačuje to, že se tento mechanismus v evoluci živočichů a rostlin objevil relativně pozdě jako nástroj ke globální regulaci transkripce.

Analýzou metylace mnoha savčích genů bylo zjištěno, že genom spermií je hypermetylován, zatímco DNA vaječné buňky je metylována podstatně méně. Rovněž bylo prokázáno, že genom je rozsáhle hypometylován na počátku časného stadia vývoje embrya a ve stádiu blastuly. Konečným výsledkem demetylačních reakcí je vysoký počet jednotlivých nemetylovaných míst v jádrech moruly a blastuly. Pravděpodobným vysvětlením těchto rozsáhlých demetylací je nové přetváření genomu (z hlediska jeho budoucí exprese) před zahájením normálního programu zárodečného vývoje (obr. 103). Finální metylační spektra regulačních sekvencí genů v různých tkáních jsou ustavena během pozdního zárodečného vývoje a mohou se měnit až do dospělosti. U samců i samic jsou zárodečné linie odvozeny od primordiálních buněk; překvapuje proto, že všechny dosud analyzované sekvence DNA v jádrech primordiálních buněk jsou nemetylovány. Methylace DNA mají klíčový význam v embryogenezi savců i mnoha jiných živočichů: demethylace navozené hypometylačními látkami nebo mutagenezou genů kódujících DNA metyltransferázy obvykle vedou ke smrti embrya ve stádiu gastrulace (experimentálně již zjištěno u myší, ptáků a ryb).

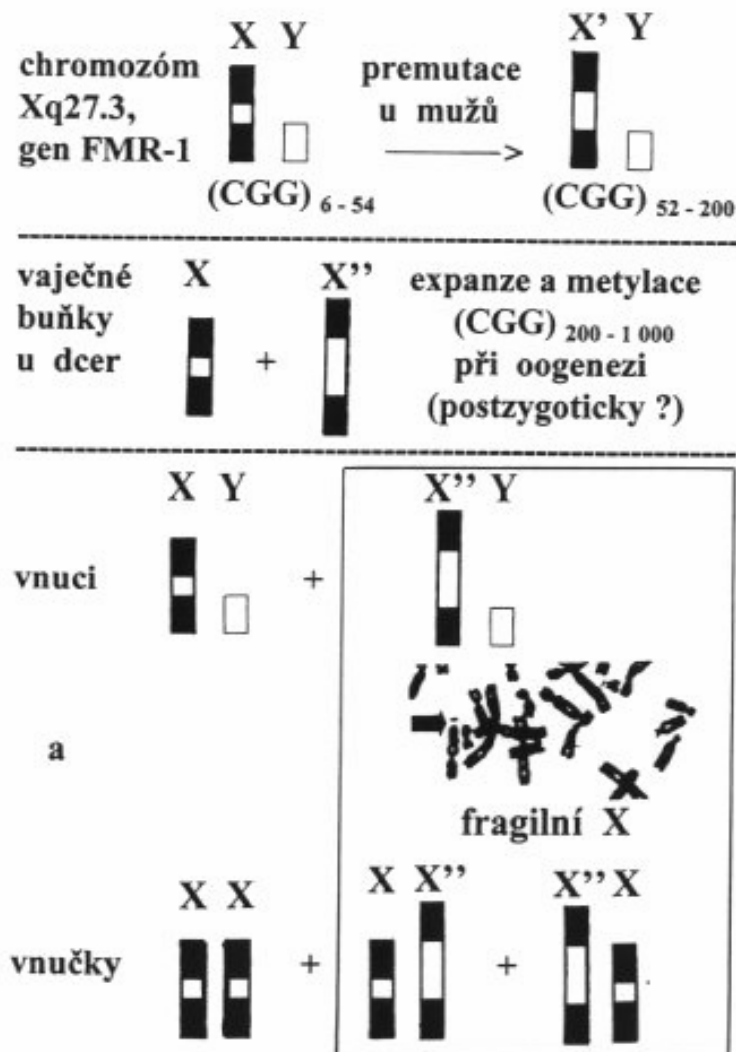
Modifikace DNA metyltransferázové aktivity též navozují hypermetylací nebo hypometylací řady genů hrajících roli v kancerogenezi a mohou tak způsobovat vznik nádorového bujení (Wachsman, 1997). S metylací DNA, obzvláště v tripletech CpCpG, také úzce souvisí některé další choroby, jako například Martin-Bellův syndrom (fragilní chromozóm X). Tato těžká mentální choroba je způsobena rozsáhlou amplifikací a následnou metylací tripletů CpCpG v genu *FMR-1*, který pak nevytváří produkt nezbytný k normální funkci mozku (obr. 104). Je zajímavé, že jednotlivé fáze této poruchy nastávají (popř. se projevují) sex-

specificky. K premutaci (primární expanzi tripletu) dochází u mužů, k rozsáhlé expanzi a metylaci tripletu naopak při oogenezi a konečně, vzhledem k inaktivaci jednoho chromozómu X u žen a hemizygotnímu charakteru X u mužů, se choroba projevuje především v následné mužské generaci. Některé recentní výsledky naznačují, že hlavní role metylací DNA v savcích buňkách může spočívat v umlčování transpozónů, které tvoří až třetinu jejich genomu. Metylace promotorů transpozónů vede k jejich inaktivitě a vzhledem k relativně častým bodovým mutacím (deaminací metylcytozinu nastává tranzice cytozin → tymin) i k jejich postupné destrukci. Někteří autoři se domnívají, že velké bloky heterochromatinu, které se vyskytují například v centromerických oblastech chromozómů, jsou právě „pohřebištěm“ umlčených a destruovaných transpozónů i retroelementů (Yoder and Bestor, 1996).

Obr. 103. Dynamika globálních metylací DNA v průběhu časné embryogeneze savců (podle Brandeise et al., 1993). Celková metylace genomu spermií je vyšší než u buněk vaječných. V průběhu preimplantačního období (vývoj blastuly) se většina sekvencí DNA (s výjimkou těch, které jsou imprintovány) podrobuje rozsáhlé demetylaci. K *de novo* metylaci genomu dochází až po implantaci embrya do děložní stěny. Primordiální zárodečné buňky jsou výrazně hypometylovány. Původ této hypometylace může být teoreticky dvojitý: buď zárodečné buňky představují subpopulaci buněk, která není metylována v postimplantačním embryu, nebo jsou opět po gastrulaci demetylovány. Prázdné symboly reprezentují nemetylované geny, tmavé symboly geny metylované.



Obr. 104. Schéma vzniku a dědičnost těžké mentální retardace, Martin-Bellova syndromu (fragilní chromozóm X), u člověka (podle Oostra a Willems, 1995). Molekulární podstatou choroby je expanze a následná metylace trinukleotidové repetice CGG přítomné v prvním exonu uvnitř 5' netranslatované oblasti genu *FMR1* lokalizovaného na chromozómu X. K premutaci (X') dochází u muže, k vlastní expanzi a metylaci (X'') dochází při oogenezi u jeho dcer. Výsledkem je metylovaný a netranslatovaný gen *FMR1* v další generaci. Mentální retardace se projevuje výrazněji u vnuků než u vnuček, neboť jde o X-vázaný gen (postižené vnučky jsou mozaikou buněk s aktivním paternálním X a mutovaným maternálním X''): uvnitř těla může docházet k metabolické kooperaci). Karyologicky lze tuto vadu diagnostikovat jako zlomený chromozóm X (na obrázku označen šipkou).



Mnohé údaje o úloze metylací ve vývoji rostlin byly získány s použitím inhibitorů metylace DNA nebo transgenních rostlin, které nesly protismyslné konstrukty pro gen DNA metyltransferázy. Některé z fenotypových projevů celkové hypometylace byly podobné u více rostlinných druhů (trpasličí vrůst, předčasné kvetení, homeotické květy, snížená fertilita) a v některých případech byly tyto změny, podobně jako hypometylace, přenosné do pohlavního potomstva. Navzdory významným vývojovým defektům jsou hypometylované rostliny životaschopné, zatímco srovnatelná demetylace u savců je pro zárodek letální. Tento rozdíl může ukazovat na to, že rostliny a savci využívají mechanismus metylace DNA odlišným způsobem. Vývojová plasticita rostlin a jejich relativní tolerance k neprogramovaným změnám genové exprese umožňují dovršení rostlinného vývojového programu navzdory rozsáhlým změnám genomové metylace. Zatímco imprinting rodičovských genomů (realizovaný prostřednictvím odlišné metylace) je u myši nepostradatelný pro zdárný vývoj, imprinting u rostlin pravděpodobně ovlivňuje pouze endosperm, nikoli však embryo.

Arabidopsis má alespoň tři cytozin-metyltransferázové geny (*MET1*, *MET2* a *CHMET*). Transgenní rostliny nesoucí antisense geny *MET1* mají pouze 10-30 % hladiny 5-mC. Recesivní mutace genu *ddm1* má za následek obdobnou globální genomovou demetylací, ale zřejmě neovlivňuje metyltransferázovou aktivitu. Některé rostlinné geny (například květní katastrální gen *SUPERMAN*) jsou často podrobovány epimutacím a mohou být ovlivněny i genetickým pozadím hypometylovaných rostlin (nesoucích mutaci *ddm1* nebo protismyslný konstrukt *anti-MET1*). Sousední oblasti těchto genů zřejmě obsahují sekvence, které „přitahují“ metylace, například dinukleotidové (CpA/T, 50 pb) repetice blízko transkripčního počátku, jako je tomu u genu *SUPERMAN*. Podobná vlákna pyrimidinů se vyskytují i v Robertsonových mutátorových transpozónech u kukuřice, které reagují na metylace změnou exprese sousedních genů.

Častý výskyt recesivních mutací v živočišných i rostlinných buněčných kulturách může být způsoben *de novo* metylázovou aktivitou, která umlčuje jednu ze dvou kopií genu (zejména pokud tato inaktivace nemá selekční nevýhodu): ve druhé (aktivní) kopii genu pak může nastat vlivem stresových podmínek kultivace normální mutace. Experimentální aplikace 5-azacytidinu může ovšem umlčený gen reaktivovat. Dědičné změny genové aktivity způsobené modifikací DNA označujeme jako epimutace. Metylace *de novo* nebo ztráta metylace (spontánní nebo navozená účinkem a 5-azacytidinu) tedy navozují přímé a zpětné epimutace. Ke ztrátě metylačního záznamu může docházet například nižší při účinnosti „udržovací“ (*maintenance*) DNA-metyltransferázy nebo aktivací enzymů s demetylázovou aktivitou.

Metylace cytozinu ve specifických úsecích DNA lze studovat především s pomocí restričních endonukleáz, které v některých případech neštěpí cílovou sekvenci, pokud tato obsahuje metylovaný cytozin (box 32). Restriční fragmenty jsou potom analyzovány Southernovou hybridizací nebo polymerázovou řetězovou reakcí (obr. 105). Problémem však je skutečnost, že metylace hraje regulační úlohu pouze v promotorech, a to i v jejich úsecích, které jsou často velmi vzdáleny počátku transkripce. Není také jisté, zda se k detekci příslušné metylace najde vždy vhodná restriktáza. Novější a účinnější technikou, která umožňuje přesnou lokalizaci 5-metylcytosinu v rozsáhlejších úsecích DNA, je genomové sekvenování.

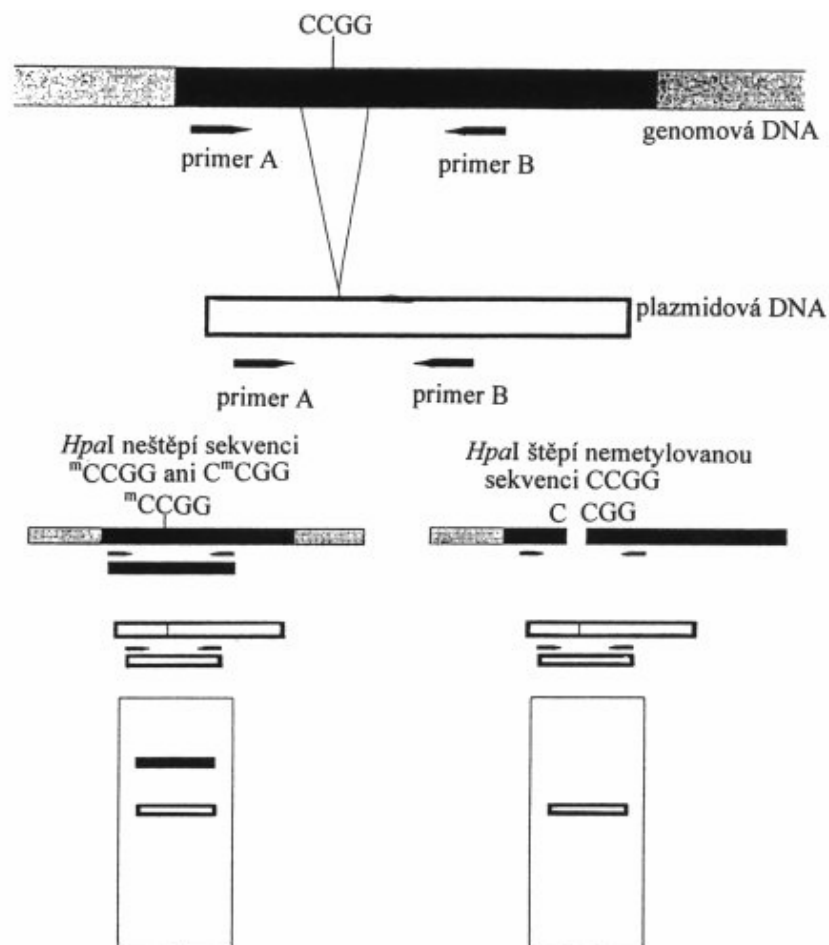
Box 32. Přehled některých dvojic izoschizomerů restričních endonukleáz odlišně citlivých vůči přítomnosti 5-metylcytosinu (^mC) v cílové sekvenci (podle McClellanda a Nelsona, 1988).

Analýzou restričních fragmentů po jejich separaci na agarózovém gelu a Southernově hybridizaci lze identifikovat metylaci jednotlivých reziduí cytozinu v definovaných úsecích DNA (genech).

Například srovnáním hybridizačních spekter po štípání *MspI* a *HpaII* lze detekovat metylaci vnitřního cytozinu v sekvenci CCGG. W značí adenin nebo thymin.

<i>restriční enzym</i>	<i>cílová sekvence</i>	<i>metylované sekvence štěpené</i>	<i>metylované sekvence neštěpené</i>
<i>MspI</i>	C/CGG	C ^m CGG	^m CCGG, ^m C ^m CGG
<i>HpaII</i>			^m CCGG, C ^m CGG, ^m C ^m CGG
<i>MboI</i>	/GATC	GAT ^m C	
<i>Sau3AI</i>			GAT ^m C
<i>XmaI</i>	C/CCGGG	CC ^m CGGG	^m CCCGGG
<i>SmaI</i>		C ^m CCGGG	CC ^m CGGG, ^m CCCGGG
<i>MvaI</i>	CC/WGG	^m CCWGG, C ^m CWGG	^m C ^m CWGG
<i>EcoRII</i>		^m CCWGG	C ^m CWGG, ^m C ^m CWGG

Obr. 105. Detekce specifické metylace DNA v genomu pomocí techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) po štěpení DNA restriční endonukleázou citlivou vůči metylaci cytozinu v cílové sekvenci (podle Meyera et al., 1993). Předpokladem použití této metody je znalost nukleotidových sekvencí obklopujících studované místo metylace (v tomto případě metylace vnitřního cytozinu v tetranukleotidu CCGG). Genomová DNA je štípána restriční endonukleázou *HpaII*, která sekvenci CCGG nerozštěpí, pokud je kterýkoli ze dvou cytozinů metylován: takový úsek DNA je amplifikován z primerů, které jej obklopují. Pokud však genomová DNA není v příslušném místě metylována, dojde ke štěpení C/CGG a úsek se neamplifikuje technikou PCR. Jako vnitřní kontrola pro úplnost štípání i reakci PCR je přidána plazmidová DNA, která obsahuje naklonovaný úsek genomové DNA, v němž však místo CCGG bylo odstraněno. Po separaci produktů PCR na agarózovém gelu musí být vždy přítomen amplifikovaný fragment plazmidu, zatímco přítomnost/absence amplifikované genomové DNA je důkazem metylované/nemetylované cílové sekvence CCGG.



Je možné shrnout, že metylace DNA jsou významným, reverzibilním biologickým signalizačním systémem, který umožňuje buňkám i organismům řídit procesy svého vývoje. Mají pleiotropickou úlohu a uplatňují se především v imprintingu, obraně vůči invazním sekvencím DNA a též v procesech ontogeneze (box 33).

Box 33. Přehled biologických úloh metylací DNA u eukaryotických organismů.

- n** představují významný epigenetický mechanismus: chemická modifikace nukleotidů nevede ke změnám genetického kódu, avšak může modulovat transkripci příslušné oblasti DNA
- n** obecný, negativní regulační mechanismus řízení genové exprese
- n** nejhojnější chemicky modifikovanou bází je 5-metylcytosin (5-mC)
(u savců je metylováno asi 5 % cytozinových reziduí, u vyšších rostlin až 25 %)
- n** nejvyšší obsah 5-mC je v oblastech nekódujících repetitivních sekvencí,
nejnižší četnost v CpG ostrůvcích konstitutivně exprimovaných genů
- n** metylace cytozinu hraje roli jen v regulačních oblastech genů, zatímco výskyt 5-mC
v kódujících oblastech exprese genů neovlivňuje (*DNA methylation paradox*)
- n** u většiny živočišných druhů nacházíme metylace cytozinu (téměř) výhradně v dubletech CpG,
u rostlin se vyskytují v dubletech CpG, tripletech CpNpG i v nepalindromatických sekvencích
- n** u některých druhů eukaryot nebyly metylace cytozinu zjištěny (kvasinky a octomilka)
- n** obranný mechanismus vůči invazní DNA (transpozónům, infekčním parazitům a transgenům);
DNA-metyltransferázy rozpoznávají cizorodé sekvence, metylují je a tím inaktivují
- n** zajišťují genomový imprinting alel v závislosti na rodičovském původu: u savců byla
jednoznačně prokázána přímá korelace imprintingu (umlčování alel) a metylace cytozinu
- n** podílejí se na řízení procesů ontogeneze a zajišťování dědičnosti exprese genů v buněčných
liniích (buněčná paměť)
- n** jeden chromozóm X u samic placentálních savců, který se podrobuje inaktivaci (lyonizaci),
obsahuje hypermetylované CpG ostrůvky
- n** indukovaná hypometylace genomu (mutací nebo inhibicí DNA-metyltransferázy) vede obecně
k aktivaci umlčených genů: u savců má fatální důsledky (embryonální letalita), zatímco
rostliny ji tolerují: dochází však u nich ke změnám reprodukčního vývojového programu
- n** prokázána korelace hypermetylace, pozdní replikace DNA a hypoacetylace histonů

5.2 Struktura chromatinu a acetylace histonů

Základní strukturní jednotkou chromatinu ve všech eukaryotických buňkách je vysoce konzervativní bazická nukleozómová částice. Sestává z oktamerového komplexu histonů (po dvou histonových molekulách H2A, H2B, H3 a H4), kolem kterého je obtočeno 147 párů bazí levotočivého superhelixu DNA. Molekula DNA tvoří kolem histonového jádra nukleozómu 1,65 otáčky a menší a větší žlábký susedních otoček vytvářejí kanálky, kterými N-terminální konce histonů vyčnívají z jádra nukleozómu. Tyto konce nukleozomálních histonů nemají definovanou sekundární strukturu a jsou často posttranslačně enzymaticky modifikovány, což ovlivňuje jejich elektrický náboj i funkci.

Histony jsou vysoce četné, nízkomolekulární, silně bazické jaderné proteiny, které se vážou na DNA pouze elektrostatickými silami. Všechny základní typy histonů (H1, H2A, H2B, H3 a H4) jsou přítomny u většiny eukaryot: pouze u řas a hub se vyskytuje odlišný histon namísto H2A a H2B, u kvasinek je odlišný protein místo H1 (box 34). Distální části histonových molekul (*basic arms*) nesou pozitivní náboje a mohou být variabilní, zatímco centrální části jejich molekul (*globular domains*) obsahují nepolární aminokyseliny a jsou konzervativní. U vyšších eukaryot jsou téměř shodné aminokyselinové sekvence histonů H3 a H4, nejméně konzervativní je internukleozomální H1. S výjimkou H4 jsou histony (zejména H1) u každého druhu zastoupeny v několika variantách (kódovány genovými rodinami, desítky až stovky kopií genů), výskyt jednotlivých variant často závisí na fázi ontogeneze.

Histony jsou nejčastěji modifikovanými buněčnými proteiny a tyto modifikace ovlivňují strukturu chromatinu i expresi příslušných oblastí DNA (box 35). Kovalentní adice různých chemických struktur obvykle eliminují pozitivní náboje některých aminokyselin (zejména lyzinu a argininu) a tím snižují elektrostatickou vazbu histonů k DNA. Acetylace histonů je reverzibilní přenos acetylové skupiny z acetyl-koenzymu A na ϵ -aminoskupinu lyzinu, vedoucí k neutralizaci jejího pozitivního náboje (obr. 106). Acetylace je katalyzována histon acetyltransferázami (HAT) a deacetylace histon deacetylázami (HD). V jednom nukleozómu může být acetylováno až 26 lyzinových reziduí (obr. 107) lokalizovaných v N-distálních ramenech histonového oktameru H4 (4 lyziny), H3 (4), H2A (1) a H2B (4). Acetylace/deacetylace histonů vedou ke změnám struktury nukleozómů a jejich schopnosti vázat regulační proteiny a slouží tak k remodelování transkripčních aktivit genů posttranslační

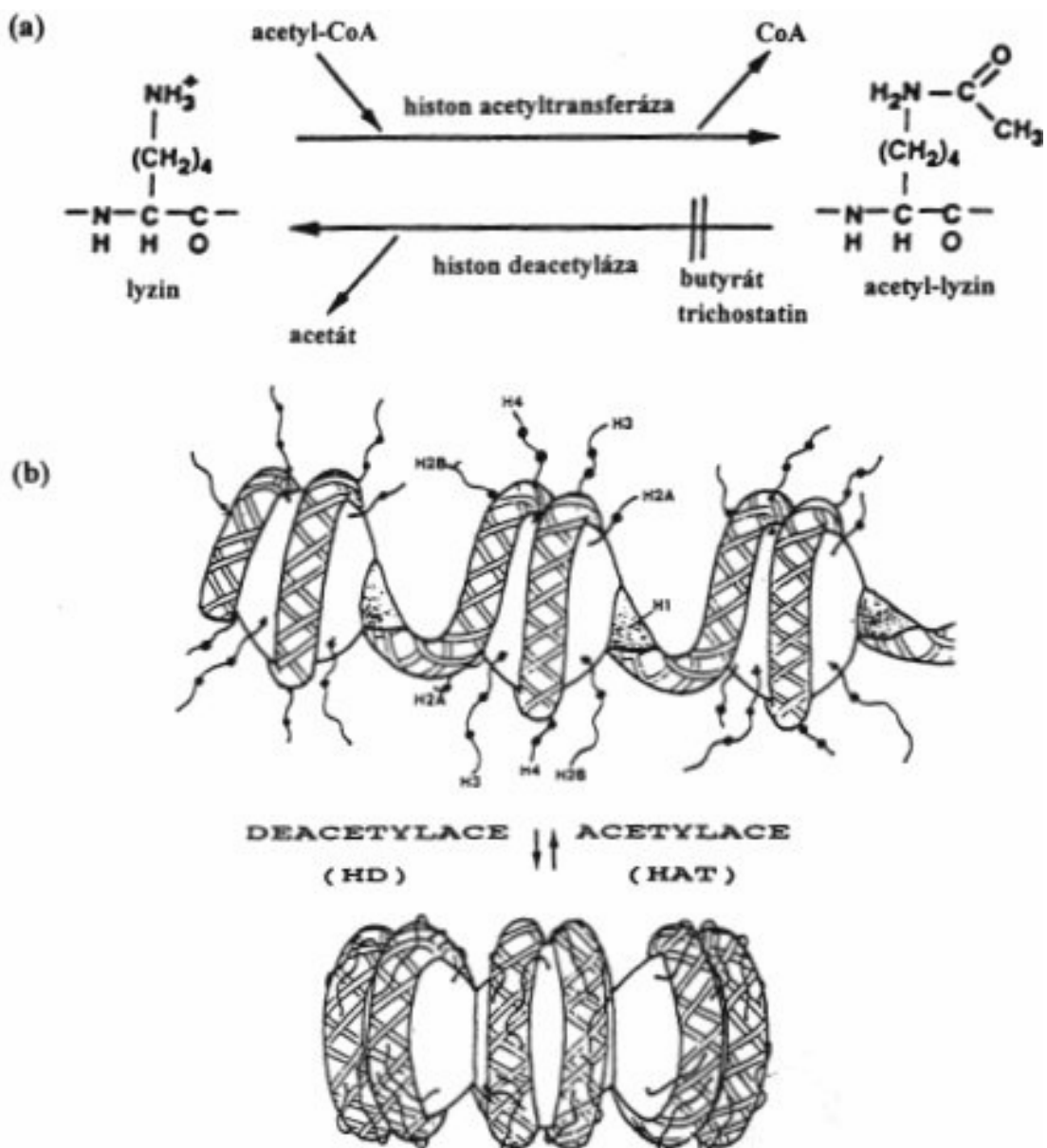
Box 34. Základní charakteristika histonů.

- n** četné, nízkomolekulární, silně bazické jaderné proteiny
- n** snadno izolovatelné z chromatinu působením roztoků kyselin nebo koncentrovaných solí
- n** vazba na DNA pouze elektrostatickými silami
- n** všechny základní typy histonů (H1, H2A, H2B, H3 a H4) přítomny u většiny eukaryot: pouze u řas a hub odlišný histon místo H2A a H2B, u kvasinek odlišný protein místo H1
- n** distální části molekul (*basic arms*) nesou pozitivní náboje a mohou být variabilní
- n** centrální části molekul (*globular domains*) obsahují nepolární aminokyseliny a jsou konzervativní
- n** u vyšších eukaryot jsou téměř shodné aminokyselinové sekvence histonů H3 a H4, nejméně konzervativní je H1
- n** s výjimkou H4 jsou histony (zejména H1) u každého druhu zastoupeny v několika variantách (kódované genovými rodinami, obvykle 10^1 až 10^2 kopií), výskyt závisí na fázi ontogeneze
- n** v erytrocytech obratlovců (s výjimkou savců, kde jádro zcela mizí) je histon H1 nahrazen H5
- n** základní typy histonů:

<i>typ</i>	<i>molekulová hmotnost</i>	<i>počet AMK</i>	<i>obsah lyzinu</i>	<i>obsah argininu</i>
H1	17 000 - 28 000	200 - 265	27 %	2 %
H2A	13 900	129 - 155	11 %	9 %
H2B	13 800	121 - 148	16 %	6 %
H3	15 300	135	10 %	15 %
H4	11 300	102	11 %	4 %

modifikací histonů (obr. 108). Acetylace histonů představuje, spolu s metylací a kinetikou replikace DNA, jeden z možných mechanismů buněčné paměti v mitóze (přenos epigenetické informace). Přesvědčivé důkazy o korelaci acetylace nukleozomálních histonů a (potenciálně) transkribovaných úseků DNA byly podány především metodou imunofluorescenčního barvení chromozómů drozofily a savců. S pomocí protilátek proti specificky acetylovaným histonům H4 byly na polytenních chromozómech drozofily detekovány diskrétní proužky, které odpovídaly

Obr. 106. Reverzibilní acetylace nukleozomálních histonů. **(a)** Lyzinová rezidua v molekulách histonů mohou být acetylována na ϵ -aminoskupině: donorem acetylové skupiny je acetylkoenzym A, reakce je katalyzována histon acetyltransferázami, HAT (buď jako posttranslační úprava v cytoplasmě nebo až v nukleozómech). Zpětná reakce je katalyzována histon deacetylázami (HD), které mohou být experimentálně blokovány účinkem butyrátu nebo trichostatinu. **(b)** Hypotetický efekt acetylace N-terminálních domén histonů na kompaktaci nukleozomů. Díky acetylaci ztrácejí histony svůj pozitivní náboj a neváží se těsně na elektronegativní DNA, čímž dochází k relativnímu rozvolnění nukleozomů (stav umožňující transkripci). Naopak deacetylace histonů vede k jejich silné elektrostatické vazbě na DNA a k vyšší kondenzaci nukleozomů, což reprezentuje transkripční inaktivaci (podle Tordery et al., 1993).



Box 35. Nejčastější chemické modifikace histonů.

n acetyl [- CO - CH₃]

acetylace lyzinu v histonech H3, H4, H2A, H2B i H1 ovlivňují uspořádání nukleozómů a aktivitu genů

n metyl [- CH₃]

metylace lyzinu a histidinu v histonech H1, H2B, H3 a H4 ovlivňují replikaci DNA

n fosfát [- O - PO - (OH)₂]

zvýšená fosforylace H1 odpovídá za tvorbu heterochromatinu a kondenzaci chromozómů

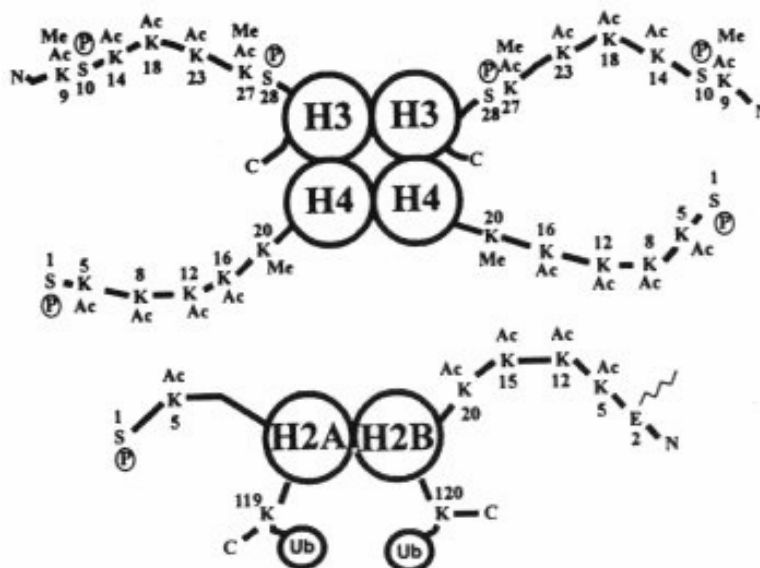
n ADP-ribozyl [-ribóza-P-P-ribóza-adenin]

ribozylace kyseliny glutamové, glutaminu nebo lyzinu v molekulách H1, H2A, H2B a H3

n peptidy [př. ubiquitin, 76 aminokyselin]

ubiquitinizace lyzinu v histonech H2A a H2B, koreluje s aktivitou genů, v mitóze mizí

Obr. 107. Místa potenciální modifikace terminálních oblastí nukleozomálních histonů, H2A-H2B dimerů a (H3-H4)₂ tetramerů (podle Davie, 1998). Tyto modifikace představují kovalentní vazbu určitých molekul a bývají (zřejmě s výjimkou metylací) reverzibilní: acetylace (Ac), fosforylace (P), metylace (Me), ubiquitinace (Ub) a poly-ADP-ribozylace (značena vlnovkou). Kromě koncových aminokyselin (asparagin, N; cystein, C) jsou vyznačeny a očíslovány pouze ty, které mohou být chemicky modifikovány: lyzin (K), serin (S) a kyselina glutamová (E).

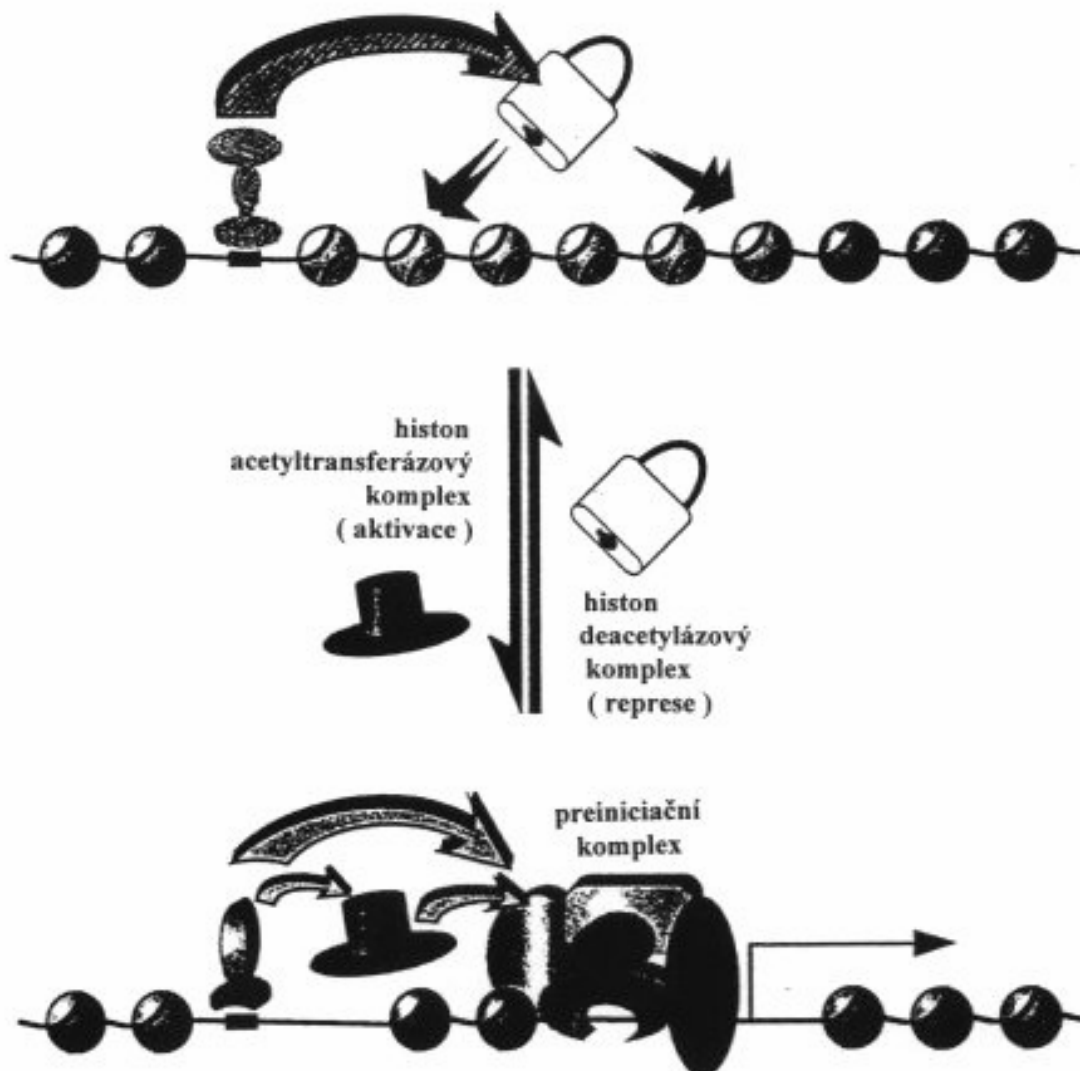


jednotlivým oblastem genů. Srovnání značení samčího a dvou samičích chromozómů X protilátkou vůči H4-acetyl-lyzin-16 ukázalo, že samčí chromozóm X, který se u drozofily podrobuje pozitivní kompenzaci dávky genů a je transkribován s přibližně dvojnásobnou intenzitou ve srovnání s autozomy, je hyperacetylován. Imunobarvení lidských a myších chromozómů vedlo k identifikaci acetylovaných H4 oblastí, které odpovídaly R-proužkům (transkripčně aktivní oblasti). Snad nejpřesvědčivějším důkazem vztahu acetylce histonů a aktivity příslušných genových oblastí byla demonstrace nepřítomnosti acetylce H4 na inaktivním (lyonizovaném) chromozómu X u savců. Rozsáhlé hypoacetylce histonů H4 a H3 byly taktéž prokázány v transkripčně inaktivním mikronukleu u prvoka *Tetrahymena*, zatímco aktivní makronukleus je hyperacetylován (box 36).

Box 36. Základní rysy acetylce nukleozomálních histonů a jejich úloha v řízení genové exprese.

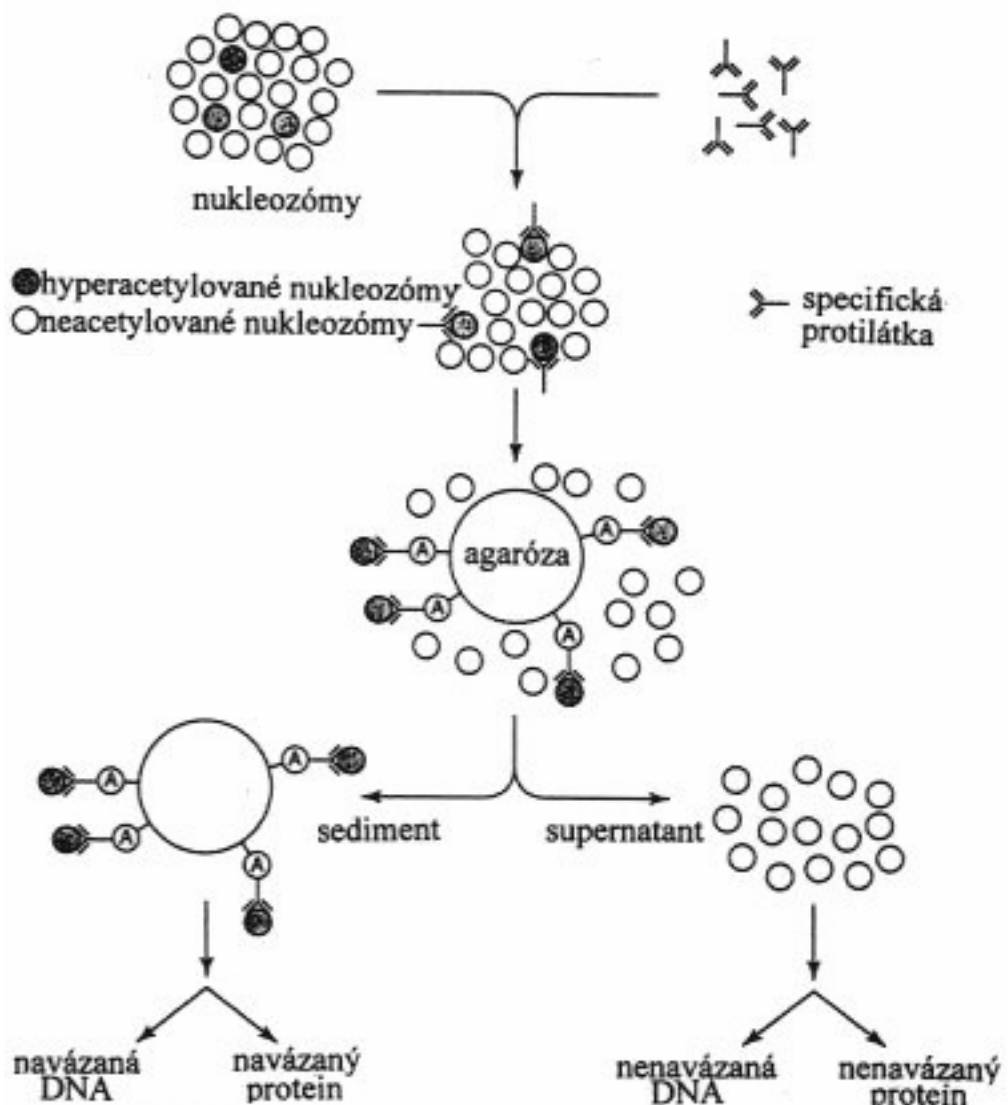
- n** reverzibilní přenos acetylové skupiny z acetyl-koenzymu A na ϵ -aminoskupinu lyzinu, vedoucí k neutralizaci jejího pozitivního náboje
- n** v jednom nukleozómu může být acetylováno až 26 lyzinových reziduí lokalizovaných v N-distálních ramenech histonového oktameru H4 (4), H3 (4), H2A (1) a H2B (4)
- n** acetylce / deacetylce histonů vedou ke změnám struktury nukleozómů a jejich schopnosti vázat regulační proteiny
- n** slouží k remodelování transkripčních aktivit genů posttranslační modifikací histonů, acetylce katalyzována histon-acetyltransferázami (HAT) a deacetylce histon-deacetylázami (HD)
- n** histony jsou částečně acetylovány již před vstupem do nukleozómů (tzv. cytosolická acetylce)
- n** experimentální studia: inženýrství histonových genů, biochemická analýza chromatinu, imunocytologické a imunoprecipitační studie, inhibitory HD (butyrát sodný, trichostatin A)
- n** prokázána korelace deacetylce H3 a H4 s inaktivitou savčího chromozómu X
- n** jeden z mechanismů dědičnosti buněčné paměti v mitóze (přenos epigenetické informace)
- n** u savců prokázána souvislost s metylací DNA: metylace zřejmě slouží jako signály k nastavení lokální acetylce nukleozomálních histonů

Obr. 108. Model regulace genové exprese prostřednictvím cílené acetylace/deacetylace nukleozomálních histonů (podle Kuo a Allis, 1998). DNA-vazebné represory indukují histon-deacetylázové (HD) komplexy (označeny symbolem zámku), které způsobují deacetylaci nukleozómů a represi transkripce. Vazba transkripčního induktoru naopak aktivuje histon-acetyltransferázový (HAT) komplex (symbol klobouku), dochází k hyperacetylaci nukleozómů a rozvolnění chromatinové sktruktury, vazbě preiniciačního komplexu a aktivaci transkripce.



Zatímco lokalizace acetylovaných lyzinů na chromozómech nebo jejich úsecích se provádí imunofluorescenčním barvením, detekce acetylace chromatinové struktury definovaných genů je obvykle realizována technikou imunoprecipitace (obr. 109). Na bázi syntetických

Obr. 109. Schéma imunoprecipitační analýzy chromatinu, která umožňuje lokalizovat acetylované histony na specifických sekvencích DNA (*chromatin immunoprecipitation, CHIP*, podle Crane-Robinsonové a Wolffeho, 1998). Izolovaný chromatin, fragmenovaný na nukleozómy mikrokokální nukleázou, tvoří konjugáty s protilátkou vůči acetylovanému histonu a tyto jsou imobilizovány na proteinu A agarózových kuliček. Takto mohou být analyzovány oddělené frakce acetylovaného a neacetylovaného chromatinu a následně Southernovou hybridizací nebo PCR zjišťována acetylace jednotlivých fragmentů DNA (genů).



oligopeptidů shodných s N-terminálními oblastmi histonových molekul byly připraveny protilátky, které se vážou na specificky acetylované pozice lyzinů. Izolovaná jádra, šetrně připravená z různých tkání eukaryot, jsou rozštěpena na jednotlivé nukleozómy popř. oligonukleozómy a tyto jsou v suspenzi „vychytávány“ specifickou protilátkou. Tak je možné vždy rozdělit chromatin na frakce, které se liší stavem acetylce určitého lyzinu v molekule určitého histonu. Takto lze stanovit například celkovou velikost frakce acetylovaného chromatinu jádra nebo acetylaci nukleozómových struktur určitého genu. Recentní sledování korelace transkripce, metylace DNA a acetylce histonů u savců naznačují, že kritickým atributem potenciální aktivity genů je stav acetylce chromatinu a metylace zřejmě slouží pouze jako „značky“, kam se přes specifické proteiny vážou histon-deacetylázové komplexy (box 37).

Box 37. Schéma experimentů naznačujících vztah acetylce histonů, aktivity příslušných genů a metylací DNA. Analýzou metylace a acetylce genů v kultivovaných savčích buňkách bylo prokázáno, že metyl-CpG-vazebný protein asociuje s represorovým komplexem obsahujícím histon deacetylázu (HD): transkripční represe *in vivo* je zrušena inhibitorem HD, trichostatinem, i když se metylace genu nemění (Nan et al. 1998). Další experimenty sledující expresi transgenů, jejich metylaci a lokální obsah acetylovaných histonů pak naznačily, že metylace DNA slouží jako mechanismus pro nastavení lokální histonové deacetylce a dává tak vznik udržovatelným epigenetickým chromozomálním stavům (Eden et al. 1998).

imunoprecipitace

nemetylovaný transgen ® acetylovaná frakce nukleozómů

imunoprecipitace

metylovaný transgen ® neacetylovaná frakce nukleozómů

+ *inhibitor HD*

metylovaný transgen ® zvýšení transkripce

DNáza I

metylovaný transgen ® chromatin není štěpen (je kondenzovaný)

+ *inhibitor HD, DNáza I*

metylovaný transgen ® chromatin se štěpí (je rozvolněn)

V některých fázích ontogeneze jsou regulérní typy histonů nahrazovány jejich specifickými variantami. Extrémním příkladem jsou jádra samčích gamet živočichů i rostlin, spermíí. Cílem této substituce histonů je vždy navodit dočasně, ale velmi spolehlivě, inaktivní stav chromatinu, který by zabraňoval transkripci jader ve spermíích až do doby, kdy dojde k aktivaci zygoty. V jádrech spermíí živočichů obvykle dochází k úplné restrukturalizaci a velká část histonů je nahrazena silně bazickými protaminy s vysokým obsahem argininu, které s DNA nevytvářejí nukleozómovou strukturu (box 38). V generativním (a posléze i spermatických) jádrech pylu rostlin byly zase identifikovány specifické varianty histonů H2 a H3.

Box 38. Charakteristika specifických spermatických jaderných proteinů - protaminů.

- n** malé, vysoce bazické proteiny o nízké hmotnosti (jen 30 až 50 aminokyselin, m. h. 4 000 až 6 000)
- n** zřejmě představují mechanismus dočasné inaktivace spermatického genomu
- n** velmi variabilní u různých druhů živočichů
- n** u savců nacházíme jen jeden až několik typů protaminů
- n** vysoký obsah argininu (až 60 % aminokyselin)
- n** cysteiny zprostředkují kondenzaci (inaktivaci) chromatinu bisulfidickými vazbami mezi protaminy
- n** asi 20 % genomu spermíí si zachovává vazbu s histony
- n** protamin-DNA komplexy se vyskytují pouze v jádrech spermíí a nemají nukleozómovou strukturu
- n** po oplození jsou protaminy fosforylovány a nahrazeny somatickými histony z cytoplazmy vaječné buňky
- n** aminokyselinová sekvence lidského protaminu P1:

1 Ala - Arg - Tyr - Arg - Cys - Cys - Arg - Ser - Gln - Ser -
 11 Arg - Ser - Arg - Tyr - Tyr - Arg - Gln - Arg - Gln - Arg -
 21 Ser - Arg - Arg - Arg - Arg - Arg - Arg - Ser - Cys - Gln -
 31 Thr - Arg - Arg - Arg - Ala - Met - Arg - Cys - Cys - Arg -
 41 Pro - Arg - Tyr - Arg - Pro - Arg - Cys - Arg - Arg - His

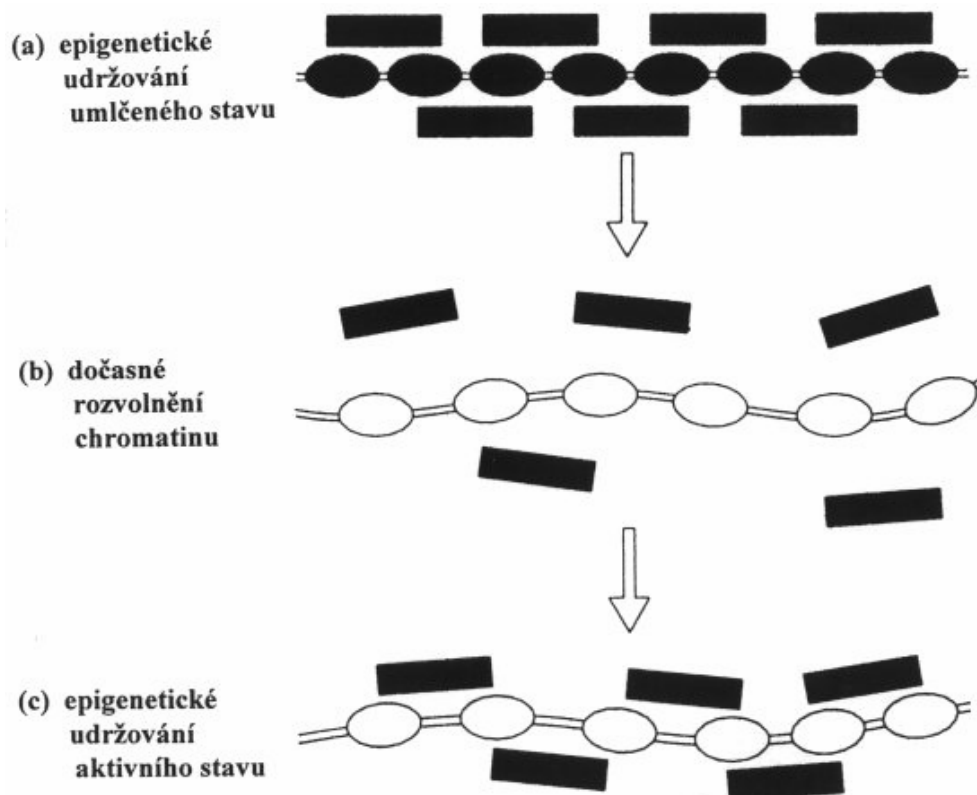
Inaktivace euchromatických genů, potřebná k řízení diferenciální genové exprese v průběhu individuálního vývoje, využívá podobných mechanismů jako fungují v konstitutivním heterochromatinu (např. v oblastech centromer). U některých proteinů, asociovaných s umlčenými chromatinem, byl nalezen společný motiv, **chromodoména**.

Obr. 110. Hypotetická úloha proteinů s chromodoménami v uchovávání epigeneticky determinovaných stavů (podle Cavalli a Paro, 1998).

(a) Umlčování genů indukuje vznik kompaktních chromatinových struktur (tvorba hypoacetylovaných nukleozómů, tmavé ovály) zabraňujících přístupu transkripčních faktorů. Chromodoménové proteiny (obdélníky) udržují kompaktaci chromatinu a její přenos přes buněčná dělení.

(b) Aplikace inhibitoru histon-deacetyláz indukuje hyperacetylaci histonů (prázdné ovály), rozvolnění chromatinu a odstranění chromoproteinů.

(c) Po odstranění inhibitoru může epigenetická regulace udržovat hyperacetylaci specifických míst chromatinu, která je zajišťována chromoproteiny.



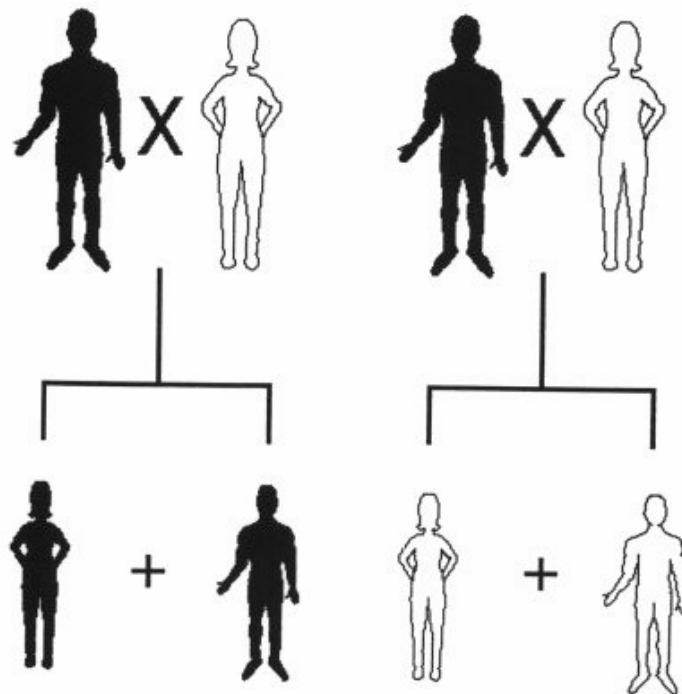
Chromodoména byla poprvé identifikována jako konzervovaný motiv v heterochromatinu drozofily v proteinu HP1 (modifikátorem heterochromatinem-indukovaného pozičního efektu variegace, PEV, při kterém dochází k metastabilní inaktivaci velkých bloků genů sousedících s heterochromatinem) a Polycomb (*Pc*, celá skupina genů se nazývá *Polycomb group*, PcG, proteiny nezbytné ke stabilní represi vývojových regulátorů, jako jsou například homeotické geny). Ve většině případů jsou proteiny s chromodoménou nalezeny v reprimovaných chromatinových doménách a byly funkčně označeny jako transkripční represory (obr. 110). Nově však byly identifikovány i v proteinech s aktivační funkcí, např. v samčím specifickém letálním proteinu (MSL)-3 drozofily, který hraje roli v hyperaktivaci samčího chromozómu X. Nejvyšší podobnost mají se dvěma malými DNA vazebnými proteiny histonového typu u archebakterií. Proteiny skupiny Polycomb se vážou asi na sto míst na polytenních chromozómech a jsou odpovědné za udržování represe cílových míst DNA při mitózách.

Nebyly nalezeny žádné specifické sekvence DNA, na které se vážou chromodomény třídy HP1. Heterogenita interagujících oblastí DNA naznačuje, že tyto proteiny se mohou vázat na mnoho odlišných oblastí chromozómů. Naproti tomu jsou elementy DNA vazající proteiny skupiny Polycomb dobře charakterizovány: nazývají se *Polycomb Response Elements (PREs)* a odpovídají za umlčování genů. Takové homologní oblasti DNA též mohou spolu interagovat s následkem umlčování např. transgenů (kosuprese u drozofily, podobně jako byla popsána u rostlin). Regulační sekvence genů u drozofily a kvasinek obsahující *PREs* se tedy mohou podrobovat epigenetickým zapínáním/vypínáním regulovaným proteiny s chromodoménou (např. Polycomb). Skutečnost, že odpovídající chromatinové stavy mohou být děděny za nepřítomnosti kovalentní modifikace DNA (např. metylace) naznačuje, že epigenetické mechanismy založené na proteinech mohou být velmi stabilní a mohly by být užity v regulaci jiných jevů, jako jsou imprinting u savců nebo paramutace u rostlin.

5.3 Genomový imprinting

Parentální (též nazývaný genomový nebo gametický) **imprinting** je definován jako reverzibilní proces, kdy specifická modifikace genů v parentální generaci vede k funkčním rozdílům mezi paternálními a maternálními genomy v diploidních buňkách potomstva. Je významným faktorem v embryonálním vývinu savců a jeho jednoznačnými důkazy jsou geny, jejichž alely jsou aktivní pouze paternálního nebo maternálního původu, tj. jejich exprese závisí výhradně na pohlaví rodiče, od kterého byla příslušná alela zděděna (obr. 111).

Obr. 111. Základní schéma fenotypového projevu parentálního genomového imprintingu na abstraktním příkladu dědičnosti exprese genu kódujícího kožní pigment u člověka. Vlevo je zobrazen imprinting maternální: alela mateřského původu (kódující bílý pigment) je v potomstvu synů i dcer umlčena, exprimuje se zde alela otcovská (černý pigment). Vpravo je příklad imprintingu paternálního: alela otcovského původu (černý pigment) je v potomstvu umlčena, projeví se pouze alela mateřská (bílý pigment).



Tradičně uváděným příkladem genomového imprintingu jsou neekvivalentní reciproká křížení mezi koněm a oslem, odlišnými druhy téhož rodu. V obou směrech křížení vznikají odlišní hybridní jedinci (samci a samice mezka resp. muly, obr. 112), kteří jsou sterilní. Mezci a muly mají víceméně intermediální fenotypy mezi koněm a oslem, vždy se však poněkud více podobají své matce (mezci oslí kobyly a muly koňské kobyly). Tento výsledek lze však interpretovat různými hypotézami. (1) Vliv genomového imprintingu: mezek je jedincem se samičím imprintingem osla a samčím imprintingem koně, u muly je tomu naopak. (2) Vliv cytoplazmatických determinant vaječné buňky: zygota vzniká z genomů vaječné buňky a spermie plus cytoplazmy (a v ní uložených mRNA a proteinů) vaječné buňky. Mezek tedy získal vaječné cytoplazmatické determinanty osla, zatímco mula je má od koně. (3) Teoreticky také nelze vyloučit další vliv látek přicházejících z těla matky (např. hormonů), v jejímž těle k vývoji plodu dochází.

Obr. 112. Neekvivalentní reciproká křížení mezi koněm a oslem.

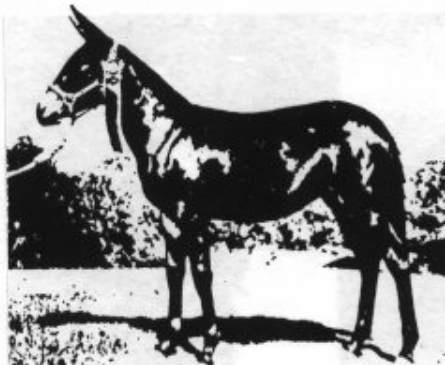
oslí kobyly x hřebec koně

→ **mezek**



koňská kobyly x hřebec osla

→ **mula**



detail hlavy koně, muly a mezka

(zleva doprava)



K vytvoření imprintu genu (tj. informace o jeho potenciální expresi nebo transkripční inaktivitě) dochází v průběhu meiotického dělení nebo tvorby gamet a jeho mechanismem jsou s velkou pravděpodobností především metylace DNA. U savců bylo dosud identifikováno asi 20 imprintovaných lokusů, kdy bylo jednoznačně a na molekulární úrovni prokázáno, že jsou exprimovány uniparentálně (box 39).

Box 39. Příklady imprintovaných lokusů u člověka, myši a v endospermu kukuřice prokázané na molekulární úrovni.

<i>organismus:</i>	<i>lokus:</i>	<i>aktivní alela:</i>	<i>funkce genu:</i>
člověk	<i>WT1</i>	mateřská	nádorový represor
	<i>IGF2</i>	otcovská	růstový faktor
	<i>H19</i>	mateřská	nádorový represor
	<i>ZNF127</i>	otcovská	transkripční faktor
	<i>SNRPN</i>	mateřská	sestřih hn-mRNA
myš	<i>Igf2</i>	otcovská	růstový faktor
	<i>H19</i>	mateřská	nádorový represor
	<i>Mash2</i>	mateřská	tvorba spongiofoblastu
	<i>Ins1,2</i>	otcovská	růstové faktory
	<i>Mas</i>	otcovská	angiotensinový represor
	<i>Snrpn</i>	mateřská	sestřih hn-mRNA
	<i>P57kip2</i>	mateřská	regulace buněčného cyklu
	<i>Xist</i>	otcovská (jen v placentě)	RNA způsobující X-inaktivaci
kukuřice	<i>ESF</i>	otcovská	velikost endospermu
	<i>R</i>	mateřská	tvorba pigmentu
	zeiny	mateřská	zásobní proteiny
	tubuliny	mateřská	proteiny mikrotubulů

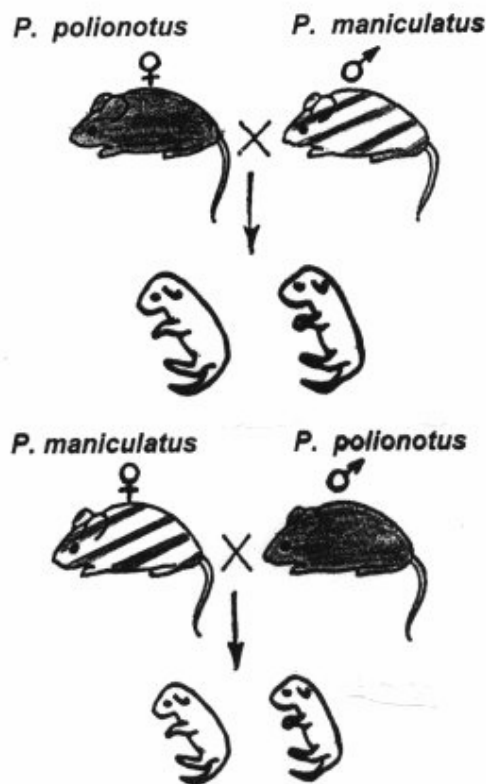
Počátkem osmdesátých let byly provedeny dnes již klasické experimenty s transplantací jader v rané zygotě u myši. Po oplození oocyty spermií, když jsou ještě obě buněčná jádra oddělena, lze mikroinjekcí jedno nebo druhé jádro odstranit nebo nahradit jádrem z jiné pohlavní buňky. Kontrolní pokusy prokázaly, že po substituci obou jader jinými jádry oocyty a spermií se zygota dál vyvíjí a vzniká normální embryo a posléze fertilní myš. Technika přenosu jader však umožnila generovat i neobvyklé kombinace jader: tak byla zkonstruována embrya gynogenetická (se dvěma jádry oocyty, tj. dvěma maternálními genomy) i androgenetická (se dvěma spermatickými jádry, tj. dvěma paternálními genomy). Tato embrya však nikdy nevedla k dokonalému vývoji. Obvykle zastavila růst ve stádiu několika desítek buněk, jen výjimečně se vyvíjela dál, avšak abnormálním způsobem. Gynogenetická embrya měla zejména potlačenou tvorbu placenty, androgenetická embrya byla zase špatně vyvinutá. Z těchto výsledků vyplynul jednoznačný závěr, že pro řádný vývin embrya i dospělého jedince je u savců třeba kombinace genomů odlišných pohlaví, paternálního a maternálního.

Savci a semenné rostliny mají společný rys placentálního chování: embrya rostou a jsou vyživovány matkou po dlouhou dobu vývoje. Vyznačují se často i polygamií, tj. potomstvo určité matky má často různé otce. Tyto dva rysy mohly vést k evoluci paternálních faktorů, které podporují růst embrya na účet jeho matky a sourozenců, a maternálních faktorů, které směřují k omezení růstu embrya. Základem této teorie je skutečnost, že zralá embrya, která jsou větší, mají větší šanci k přežití, a tak optimální strategií pro otce je zplodit velká embrya s různými matkami. Naproti tomu pro matku, která nese cenu za poskytování látek embryím a má stejný genetický podíl na každém z nich, je lepší produkovat četnější, stejně velká embrya. Tato teorie vysvětluje fenomén genomového imprintingu, který se vyvinul u savců i vyšších rostlin. Maternálně a paternálně děděné kopie většiny genů jsou exprimovány shodně, avšak v některých případech genomový imprinting umlčuje kopii zděděnou od jednoho z rodičů. V některých případech jsou přednostně exprimovány mateřské kopie genů, které směřují k inhibici růstu embrya, zatímco ty, které jsou exprimovány z otcovské kopie často růst podporují (jak to odpovídá teorii parentálního konfliktu).

Výživa embrya v těle matky je zřejmě pod její striktní kontrolou: embryo musí být dostatečně zásobeno nutričními látkami od matky, nesmí však vést k jejímu přílišnému vyčerpání nebo dokonce ohrožení života. Tuto hypotézu (*parent-offspring conflict*) lze podpořit mnoha experimentálními důkazy, zejména inaktivací paternálního chromozómu X v trofektodermu savců, která může bránit nadměrnému vývinu placenty. Další vysvětlení lze nalézt u

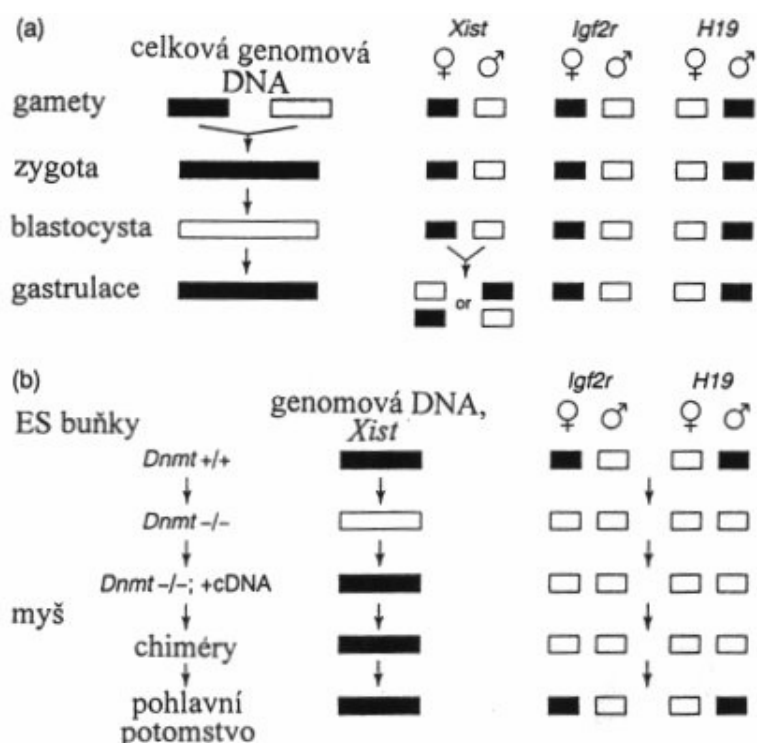
promiskuitních druhů savců, kdy se v těle matky vyvíjí současně více embryí po oplození několika, odlišně „zdatnými“ otci: maternální kontrola nad výživou potenciálně odlišných embryí umožní jejich relativně rovnoměrný vývin. Jedním z příkladů hypotézy parentálního konfliktu jsou reciproká křížení mezi dvěma druhy myši, monogamní *Peromyscus polionotus* a polygamní (polyandrická) *P. maniculatus*. Když je samice monogamní myši *P. polionotus* křížena s polygamním samcem *P. maniculatus*, vzniká potomstvo velkých jedinců, protože samice postrádá imprintingový mechanismus k nastavení funkce svých genů k potlačení samčích, růst-podporujících genů. Reciproké křížení (polygamní samice křížena s monogamním samcem) pak dává vznik malým myším mláďatům, protože samec není schopen kompenzovat samičí, růst-inhibující geny. Tyto rozdíly ve velikosti čerstvě narozených myši přetrvávají během celého života (obr. 113).

Obr. 113. Demonstrace genomového imprintingu a teorie parentálního konfliktu na příkladu recipročných křížení mezi monogamním druhem myši *Peromyscus polionotus* (*old field mouse*) a polygamním druhem *P. maniculatus* (*deer mouse*). Ve směru křížení na horním obrázku vzniká potomstvo větších rozměrů, protože matka monogamního typu nemá vyvinuty mechanismy k potlačení účinku paternálně řízených růstových faktorů (podle Jaenische, 1997).



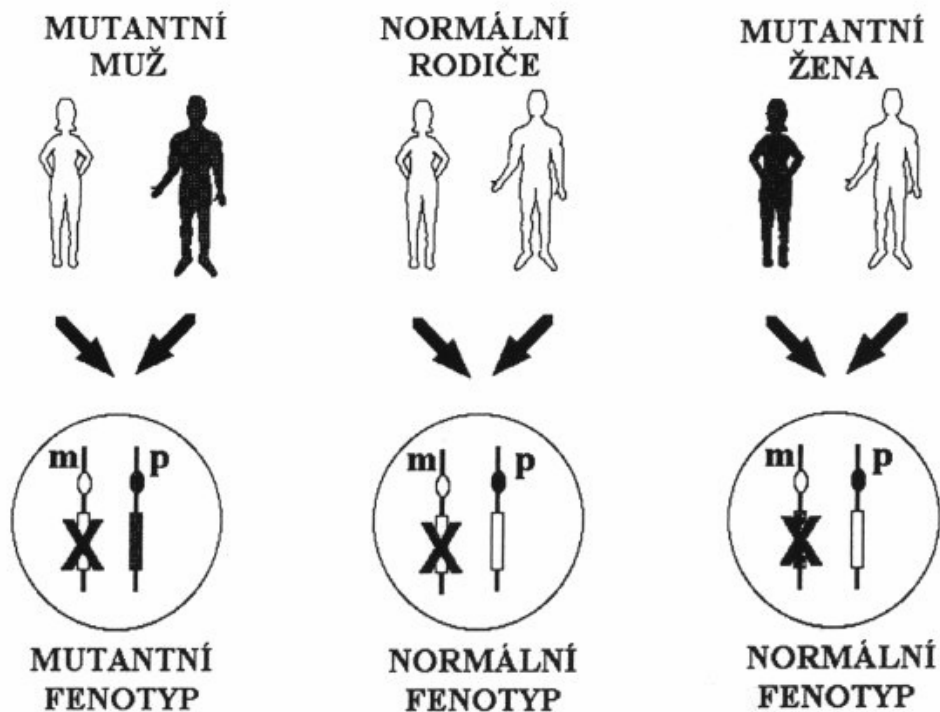
Typickým rysem imprintovaných genů je jejich asynchronní replikace a odlišná metylace DNA: reprimované alely se replikují ve fázi S buněčného cyklu později a mají obvykle vyšší stupeň metylace cytozinu v promotorových oblastech (obr. 114).

Obr. 114. Korelace procesů genomového imprintingu a metylace příslušných genů u člověka (podle Jaenische, 1997). *Xist* je gen inaktivačního centra chromozómu X, *Igf2* a *H19* jsou imprintované lokusy na chromozómu 11; metylované (inaktivní) lokusy jsou vybarveny tmavě. (a) Genomová metylace je v gametách a zygotě relativně vysoká, v průběhu blastogeneze dochází k rozsáhlým demethylacím genomu, avšak v somatických buňkách gastruly se opět genom remetyluje. Těmto metylačním změnám se však nepodrobují imprintované geny. Paternální alela *Igf2* je stále aktivní (a nemetylovaná), zatímco aktivní je alela *H19* maternálního původu. Maternální *Xist* je inaktivován a metylován (tedy chromozóm X je aktivní) až do stádia gastrulace, kdy se chromozóm X podrobuje v buňkách embrya náhodné inaktivaci. Paternální chromozóm X je od stádia spermie inaktivní (*Xist* je tedy exprimován). (b) Mutace genu kódujícího DNA-metyltransferázu (*Dnmt*) ukazuje, že k nastavení imprintu genů *Igf2* a *H19* dochází výhradně v zárodečné dráze. V mutovaných embryonálních kmenových (ES) buňkách (*Dnmt*^{-/-}) nastává celková výrazná demethylace genomu včetně genů *Xist*, *Igf2* a *H19*. Po vnesení cDNA genu DNA-metyltransferázy dochází k opětné remetylaci (včetně *Xist*), avšak specifické (monoalelická) metylace imprintovaných genů je dosaženo až při tvorbě pohlavních buněk.



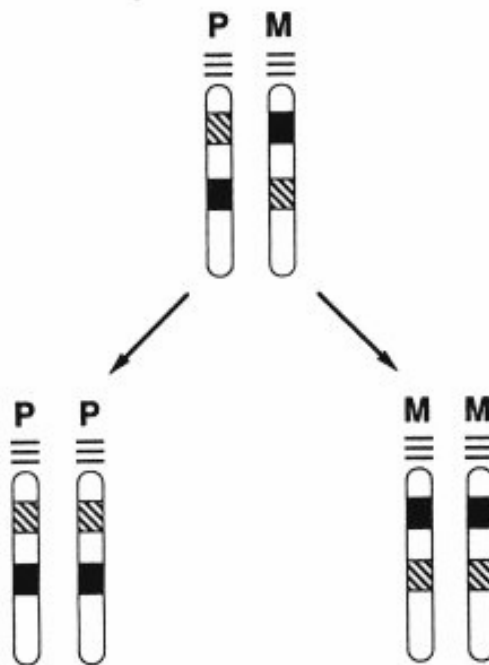
Mutace, které vedou u člověka k vývojovým nebo fyziologickým poruchám, se někdy v potomstvu projevují v závislosti na tom, od kterého rodiče (otce nebo matky) byla mutace zděděna (obr. 115). Týká se to samozřejmě jen těch lokusů, které se podrobují parentálnímu imprintingu. Na vlastním pohlaví potomka přitom v principu nezáleží. I nepostižený jedinec (např. s imprintovanou, tj. umlčenou maternální mutací) je však potenciálním přenašečem mutace do pohlavního potomstva.

Obr. 115. Fenotypový projev mutace maternálně imprintovaného lokusu v potomstvu člověka. Pokud jsou oba rodiče zdraví, maternálně (m) zděděná alela se u dětí neexprimuje a projeví se nemutovaná alela paternálního (p) původu (schéma uprostřed). Pokud je matka nositelkou mutace imprintovaného genu, mutace se u dětí neprojeví, neboť lokus je maternálně imprintován (mutantní alela není exprimována, příklad vpravo). Je-li však nositelem mutace otec, mutantní fenotyp se může v potomstvu objevit, neboť paternální alela je exprimována (vlevo). Symboly mutantních rodičů a mutovaných alel v zygote jsou tmavě vybarveny, křížkem jsou přeškrtnuty imprintované maternální alely.



Je zajímavé, že tyto imprintované lokusy nejsou na chromozómech lokalizovány rozptýleně, ale mnohé vytvářejí shluky. Ve většině těchto genových shluků jsou zastoupeny společně (vedle sebe) geny paternálně a maternálně imprintované. Častou příčinou poruch imprintingu a těžkých lidských chorob je uniparentální disomie: jeden z párů chromozómů není přítomen v paternální a maternální kopii, nýbrž oba chromozómy jsou paternálního nebo maternálního původu. Tím dojde ke kritické chybě v naprogramované genové expresi imprintovaných lokusů: jeden lokus je exprimován biparentálně, zatímco druhý není exprimován vůbec (obr. 116).

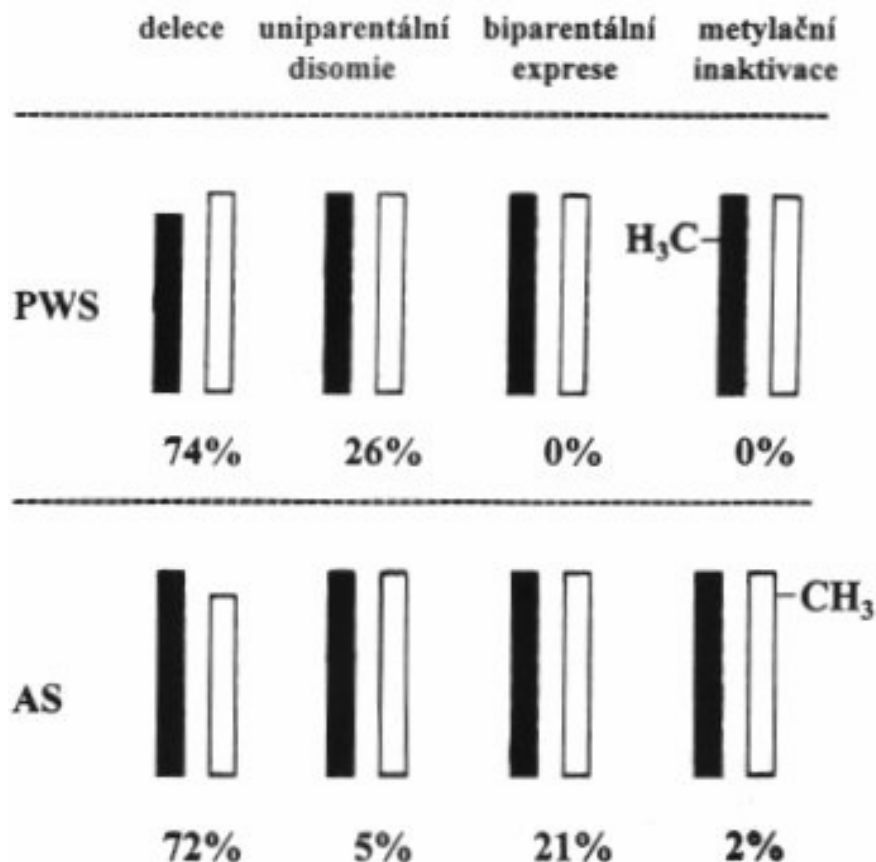
Obr. 116. Diagram prezentující jednu z nejčastějších příčin poruch genomového imprintingu - uniparentální disomie (podle Cassidy, 1995). V normální buňce (nahore) musí být přítomen v každém páru chromozómů vždy jeden paternální (P) a jeden maternální (M), protože jsou odlišně imprintovány (šrafovaně aktivní gen, tmavě inaktivní - imprintovaný gen). Po meiotické nondisjunkci a fertilizaci nastává trisomie s možností následné mitotické ztráty nadpočetného chromozómu, což může vést k uniparentální disomii s chybnou (pouze paternální nebo maternální) expresí genů.



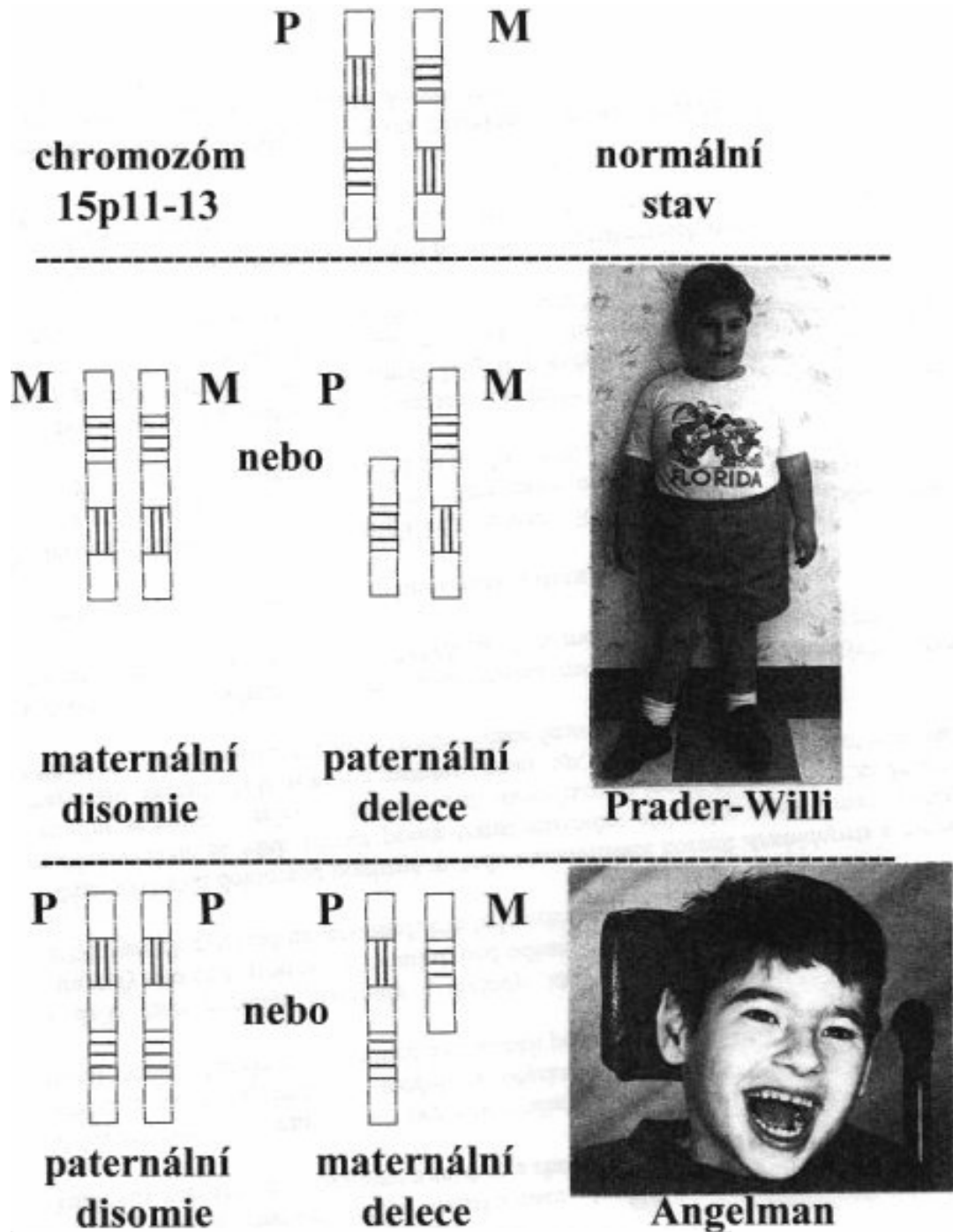
Nejznámějšími příklady takových imprintovaných shluků jsou oblasti na lidských chromozómech číslo 15 a 11. V obou případech je tu umístěno několik genů exprimovaných

výhradně maternálně a několik genů exprimovaných paternálně; jen takovýto stav vede k životu normálního jedince. Změna exprese těchto genů (v důsledku nestandardní aktivace, inaktivace, delece nebo uniparentální disomie), má fatální důsledky na zdravotní stav plodu, dítěte nebo dospělé; obvykle jde o těžké mentálně-fyzické syndromy často provázené nádorovým bujením. Nejznámějšími příklady takových postižení jsou choroby související s chybnou expresí imprintovaných genových shluků na kratším ramenu chromozómu číslo 15 (Prader-Williovův a Angelmanův syndrom, obr. 117 a 118) a na kratším ramenu chromozómu 11 (Beckwith-Wiedemannův syndrom, obr. 119).

Obr. 117. Frekvence příčin vedoucích k výskytu pacientů s Prader-Williovým syndromem (PWS, zkoumáno 35 pacientů) a Angelmanovým syndromem (AS, vyšetřeno 35 pacientů): obě choroby souvisejí s chybnou expresí paternálně a maternálně imprintovaného genového shluku na chromozómu 15 (podle Driscolla, 1994). Výsledky naznačují, že choroba PWS (lehčí postižení) vzniká pouze následkem příslušné paternální delece nebo uniparentální disomie, zatímco AS (těžké postižení) má několik více možných příčin, včetně biparentální exprese a chybné inaktivace metylací DNA. Paternální kopie chromozómu 15 je znázorněna vždy tmavě.

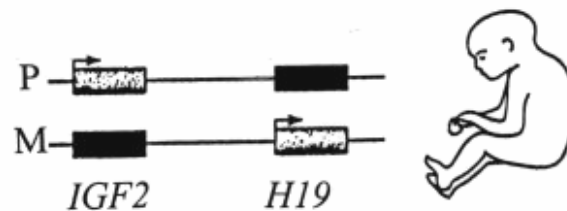


Obr. 118. Vrozené lidské choroby související s rodičovským imprintingem genových shluků: Prader-Williův a Angelmanův syndrom. Reprezentují středně těžké resp. těžké komplexní neurovegetativní choroby, které jsou způsobeny poruchami exprese - obvykle uniparentální disomií (následkem nondisjunkce) nebo delecí - dvou odlišně, maternálně (M) a paternálně (P), imprintovaných oblastí p11-13 na chromozómu 15 (podle Cassidy, 1995). Exprimované lokusy jsou vyšrafovány svisle, imprintované (neaktivní) lokusy jsou šrafovány vodorovně.



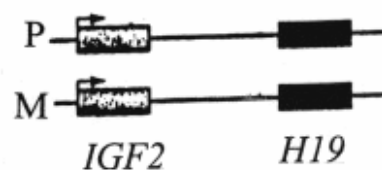
Obr. 119. Beckwith-Wiedemannův syndrom, tj. nadměrný fetální růst následovaný nádorovým bujením v dětském věku, je výsledkem chybné exprese rodičovských alel: paternální alely *IGF2* (kódující *insulin-like growth factor II*) a maternální alely *H19* (kódující mRNA, která zřejmě není translatována; funkce spočívá v potlačování růstu embrya) v oblasti p15.5 chromozómu 11 (podle Reika, 1996). Tmavě vyplněné symboly lokusů znázorňují jejich inaktivitu (často provázenou metylací DNA). Jde o demonstraci úlohy genomového imprintingu v parentálním konfliktu (cf. zarážející analogie s následky funkce genu *MEDEA* u krytosemenných rostlin) a příklad shlukování imprintovaných genů.

(I) normální jedinci exprimují paternální (P) alelu *IGF2* a maternální (M) alelu *H19* :

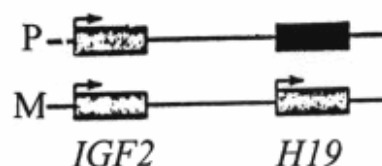


(II) pacienti s Beckwith-Wiedemannovým syndromem způsobeným chybnou expresí parentálních lokusů *IGF2* a/nebo *H19* :

(a) exprese paternální i maternální alely lokusu *IGF2*,
suprese obou alel *H19*

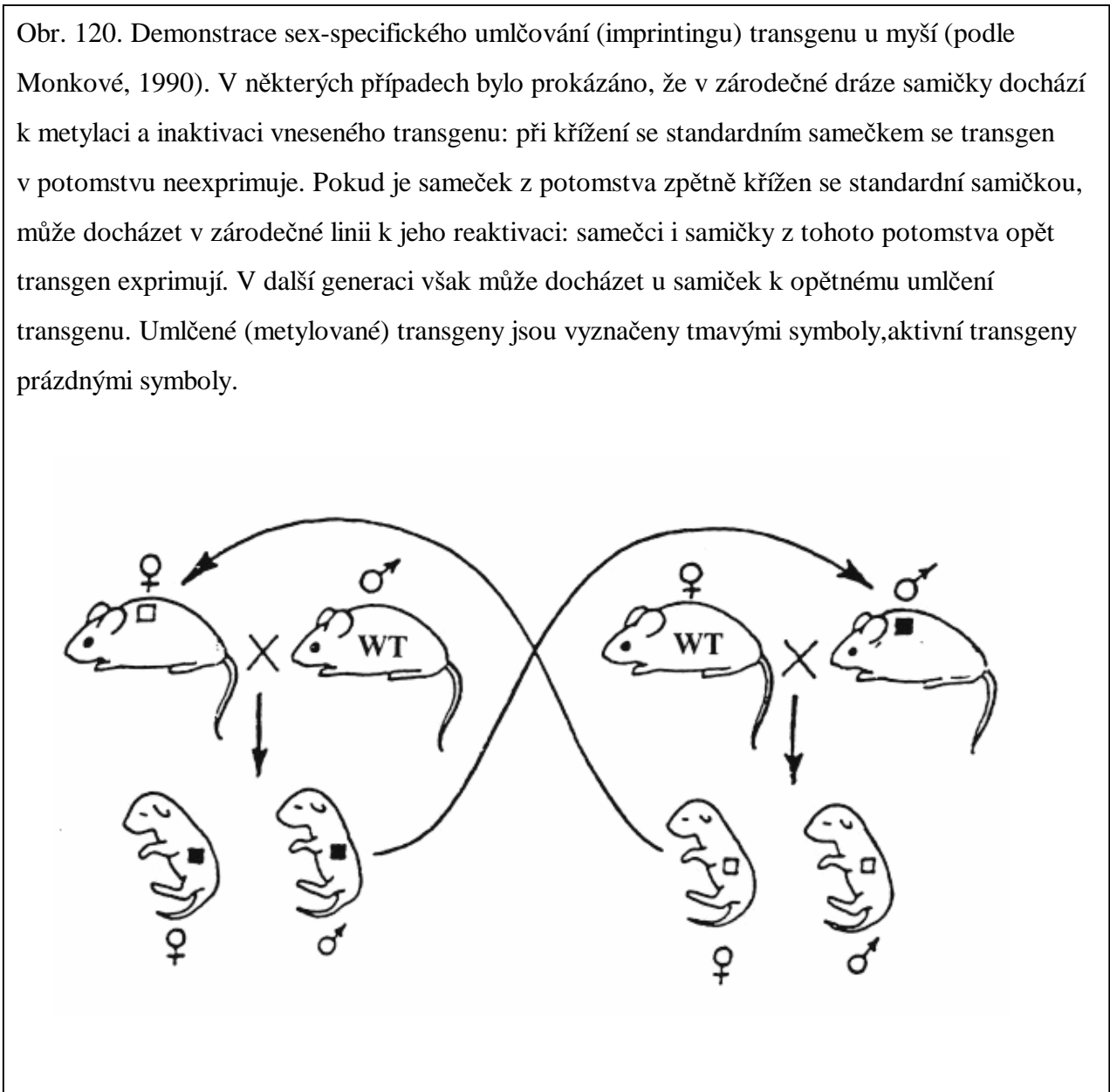


(b) exprese paternální i maternální alely lokusu *IGF2*,
normální exprese maternální alely *H19*



U myši bylo popsáno i pohlavně specifické umlčování transgenů. V mnoha případech dochází k metylaci a umlčování transgenů v těle samic nebo při vzniku jejich pohlavních buněk, což vede ke ztrátě exprese v potomstvu; u samečků tento jev pozorován nebyl (obr. 120). Je pravděpodobné, že tento jev souvisí s parentálním imprintingem nebo s odlišnou stringencí samicí a samčí zárodečné dráhy vůči cizorodým sekvencím DNA.

Obr. 120. Demonstrace sex-specifického umlčování (imprintingu) transgenu u myši (podle Monkové, 1990). V některých případech bylo prokázáno, že v zárodečné dráze samičky dochází k metylaci a inaktivaci vneseného transgenu: při křížení se standardním samečkem se transgen v potomstvu neexprimuje. Pokud je sameček z potomstva zpětně křížen se standardní samicí, může docházet v zárodečné linii k jeho reaktivaci: samečci i samičky z tohoto potomstva opět transgen exprimují. V další generaci však může docházet u samic k opětovnému umlčení transgenu. Umlčené (metylované) transgeny jsou vyznačeny tmavými symboly, aktivní transgeny prázdnými symboly.



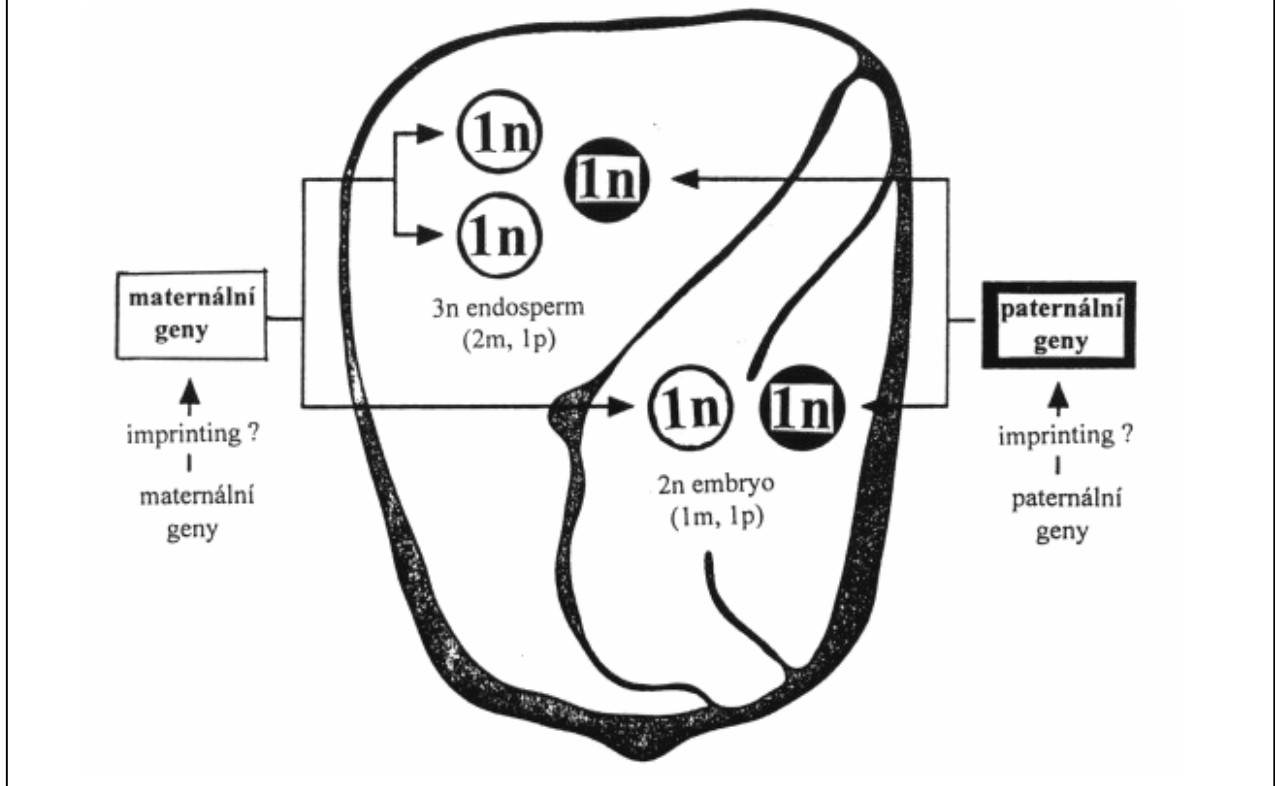
Dalším příkladem imprintingu rozsáhlé oblasti genů je chromozóm X u samic savců, který je paternálně inaktivován v trofoblastu placenty (viz kapitola 4.3). Epigenetické umlčování

autozomálních genů nastoluje v podstatě hemizygotní stav organismu s ohledem na imprintované geny. Je zjevné, že hlavní význam parentálního imprintingu u savců spočívá v kontrolním mechanismu správného složení zygoty (a posléze diploidního individua) z jedné kompletní sady chromozómů matky a druhé sady z otce. Další vysvětlení existence imprintingu u savců lze hledat na základě skutečnosti, že embrya se vyvíjejí v těle matky (podobně jako u je tomu u krytosemenných rostlin, kde se imprinting evolučně vyvinul v pletivu vyživujícím embryo). Parentální imprinting se vyskytuje například i u hmyzu: pohlavní chromozómy jednoho z rodičů nebo dokonce jeho celý genom je inaktivován nebo fyzicky eliminován: tento jev souvisí s determinací pohlaví (viz kapitola 4.2).

Imprinting je zdánlivě kontraproduktivní, neboť umlčuje jednu kopii genu (odnímá výhodu diploidie, „rezervní“ alely), u některých druhů hmyzu dokonce umlčuje a poté eliminuje u samečků celé sady chromozómů. U savců hraje genomový imprinting klíčovou roli ve vývinu, a pokud je chybný, vede k nádorům a genetickým chorobám. Imprinting je válkou pohlaví, vedenou mezi otcem a matkou (*tug-of-war*). Funguje zejména u polygammích druhů. Asi polovina z 25 známých savčích imprintovaných genů působí tak, že otcové mají záměr umlčovat geny, které brzdí růst, což vede ke zvýšení rychlosti růstu embrya a k silnějšímu potomstvu. To může být v rozporu se zájmem matky, která umlčuje své růst-podporující geny k udržení vývinu embrya pod svou kontrolou. Totéž platí o několika objevených genech, které jsou imprintovány v endospermu krytosemenných rostlin. Imprinting byl prvně popsán v 30. letech (Charles Metz, Washington), který pozoroval, že ve spermiích některých druhů hmyzu dochází k delecí chromozómů zděděných od otce. Imprinting u savců a rostlin je subtilnější, zahrnuje jen jednotlivé lokusy a slouží k přiměřenému vývinu embrya, které se vyvíjí v těle matky jako efektivní parazit.

Germinální (gametický) imprinting má u savců a rostlin za následek specifickou expresi maternálně nebo paternálně zděděných alel relativně malého počtu lokusů. U živočichů jsou androgenetická a gynogenetická embrya abortivní - ztrácejí schopnost tvořit embryonální popř. extraembryonální tkáň. Rostliny jsou méně náchylné k účinkům zárodečného imprintingu, často tvoří i životaschopné haploidy (přirozenou partenogenezí nebo experimentální androgenezí) nebo polyploidy. Genomový imprinting se u krytosemenných rostlin zřejmě vyvinul jen v pletivu endospermu, produktu druhého oplození. Pro tvorbu endospermu jsou vyžadovány oba rodičovské genomy, a to vždy v určitém poměru v závislosti na evolučním typu zárodečného vaku (obr. 121).

Obr. 121. Rovnováha mezi maternálními a paternálními genomy při tvorbě triploidního endospermu a diploidního embrya u kukuřice (podle Howella, 1998). Zdárný vývin endospermu vyžaduje určitý poměr mezi maternálními a paternálními genomy (u kukuřice je to $2m : 1p$), jeho změna obvykle vede k aborcí endospermu a potažmo i embrya. Studia exprese specifické exprese parentálních alel ukazují, že rozdíly mezi maternálním a paternálním genomem jsou způsobeny imprintingem.



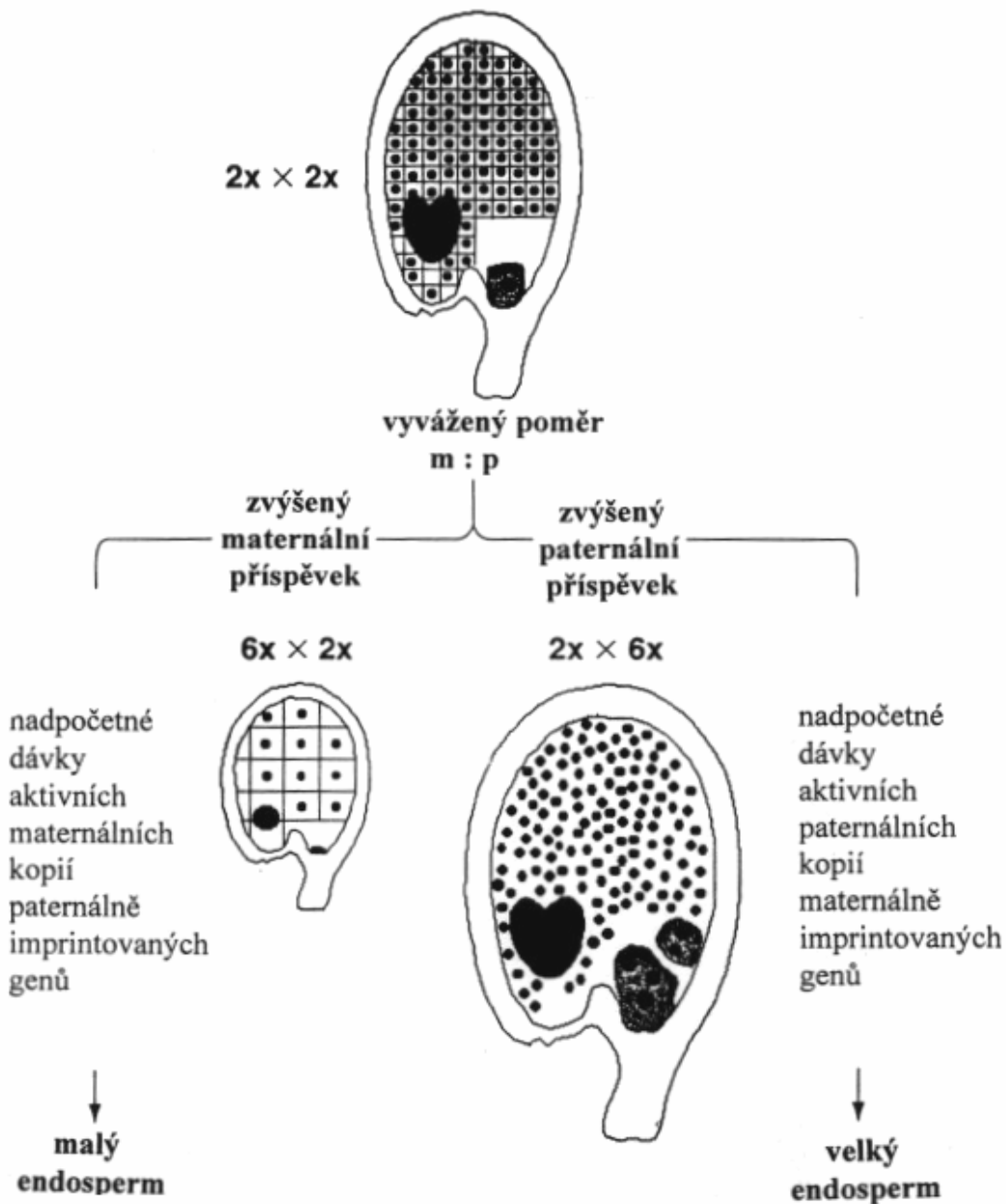
Parentální imprinting v embryonální dráze u rostlin nebyl prokázán. Proti jeho existenci svědčí řada skutečností, zejména pak výskyt androgenetických a partenogenetických rostlin, které jsou zcela viabilní, i když postrádají genom druhého rodiče (samičího resp. samčího). Parentální imprinting však byl prokázán v extraembryonálním výživovém pletivu, endospermu, u krytosemenných rostlin: některé alely se tu exprimují jen původem z matky, jiné jen z pylového rodiče. Původ endospermu je spojen s druhým oplozením, kdy jedno spermatické jádro pylové láčky splývá se dvěma samičími jádry pólovými za vytvoření obvykle triploidního endospermu. Tento unikátní proces může být důležitý pro zachování epigenetických rozdílů, které řídí vývoj endospermu a potažmo i embrya. Kermicle a Alleman (1990) předpokládají, že parentální imprinting, realizovaný v souvislosti s nestejným příspěvkem genů od samičího resp. samčího rodiče (obvykle se kombinují dva genomy samičí s jedním genomem samčím), vede k odlišným hladinám genové exprese v endospermu. Modelovým objektem ke studiu parentálního imprintingu

u rostlin je endosperm kukuřice. Pokud se mezi sebou kříží rostliny o odlišném stupni ploidie, dochází ke změně poměru maternálních a paternálních genomů v endospermu, což obvykle vede k zániku endospermu i embrya. Například při křížení diploidní mateřské rostliny s tetraploidním pylovým donorem je v endospermu poměr genomů dva maternální ku dvěma paternálním (tzv. *paternal excess*) a dochází zpočátku k extrémně rychlému vývinu endospermu, který však později zaniká. Naopak při křížení tetraploidní matky s diploidním otcem je poměr genomů čtyři maternální k jednomu otcovskému (tzv. *maternal excess*), endosperm se vyvíjí pomalu a posléze též abortuje. Je zřejmé, že imprinting v rostlinném endospermu se evolučně vyvinul jako nástroj k regulaci přiměřené výživy embrya ve vztahu k matce (v jejímž těle se embryo vyvíjí, podobně jako u savců), případně i k rovnoměrnému vývinu embryí původem od různých otců (pylových donorů).

Gametický imprinting u rostlin (potvrzující teorii parentálního konfliktu) byl jednoznačně prokázán v recentních pracích i na modelovém objektu *Arabidopsis*. Křížení mezi hexaploidními a diploidními rostlinami (*interploidy-crosses*, $6n \times 2n$ a reciproké) změnila rovnováhu maternálních a paternálních genomů v semenu, a tedy i počet aktivních kopií imprintovaných genů. Teorie parentálního konfliktu říká, že imprintované geny exprimované pouze z paternálního genomu podporují embryonální růst, zatímco geny exprimované pouze z maternálního genomu působí inhibičně. U *Arabidopsis* křížení matky $6n$ a otce $2n$ (*maternal excess*) přináší extra kopie aktivních maternálních genů (které jsou paternálně imprintovány, tj. potlačeny), což vede k poklesu počtu mitóz v endospermu, zvýšené celularizaci endospermu a celkově menšímu endospermu i embryu. Křížení matky $2n$ a otce $6n$ (*paternal excess*, vede k aborci semen) přináší extra kopie aktivních paternálních genů (které jsou maternálně imprintovány, tj. potlačeny), což vede ke zvýšení počtu mitóz v endospermu, jeho opožděné celularizaci a celkově většímu endospermu i embryu (obr. 122).

Dosud bylo u rostlin identifikováno jen několik imprintovaných genů, které jsou v endospermu exprimovány uniparentálně. Jsou to především geny z kukuřice: například tubulin, regulační gen zásobního proteinu zeinu, *dzr* a transkripční faktor (gen *r*), který reguluje biosyntézu antokyanu. V každém případě byla maternálně zděděná alela hypometylována a silně transkribována (*over-expression*), zatímco alela paternálního původu byla více metylována nebo měla redukovanou hladinu exprese (box 39).

Obr. 122. Účinky doze parentálních genomů na vývin semen *Arabidopsis* (podle Scotta et al., 1998). Přiměřeného vývinu embrya a endospermu je dosaženo při křížení mezi diploidními jedinci (poměr genomů rodičů v zygotě 1:1, v endospermu 2m:1p). Opylení hexaploida diploidem vede k nadpočetným maternálním kopiím genomu, což se projeví nedostatečně vyvinutým endospermem a potlačeným embryem. Při reciprokém opylení diploida pylem z hexaploidní rostliny dochází k paternálnímu excessu: tvorba abundančního necelularizovaného endospermu vede k aborci embrya. Křížení mezi polyploidy a diploidy tedy způsobují fatální narušení rovnováhy mezi maternálními a paternálními genomy (zřejmě dochází ke změně počtu kopií imprintovaných genů v endospermu), což potvrzuje teorii parentálního konfliktu.



Box 40. Genomový imprinting v endospermu krytosemenných rostlin.

- n** zřejmě jediný případ genomového imprintingu u rostlin vůbec,
a to pouze v extraembryonální dráze (endosperm, produkt druhého oplození)
- n** nejčastějším druhem endospermu je triploidní typ *Polygonum*, ($3n = 2m + 1p$;
tj. dva maternální plus jeden paternální genom): tzv. balanční genomový faktor (EBN, *endosperm balance number*) je tedy $2m : 1p$
- n** opylení tetraploida diploidním pylem ($4n \times 2n$) vede ke změněnému EBN = $4m : 1p$
(*maternal excess*)
- n** opylení diploida tetraploidním pylem ($2n \times 4n$) vede ke změněnému EBN = $2m : 2p$
(*paternal excess*): v obou případech může přebytek maternálních nebo paternálních genomů
vést k absorci endospermu i embrya
- n** geny kódující tzv. *endosperm size factors*, podmiňující tvorbu endospermu,
jsou imprintovány: funkční jsou pouze alely původem ze samčích gamet
(zřejmě důkaz teorie parentálního konfliktu)
- n** lokus *R*, podmiňující pigmentaci aleuronu (vnější vrstvy endospermu),
jeho dominantní alela *R* je plně aktivní pouze tehdy, je-li původem ze samičí dráhy:
genotyp rr/r ($= 2m/p$, diploidní embryo) má bezbarvý aleuron,
genotypy RR/r ($= 2m/p$, diploidní hybrid) a RR/rr ($= 2m/2p$, diploid \times tetraploid) jsou červené,
genotypy rr/R ($= 2m/p$, diploidní hybrid) a rr/RR ($= 2m/2p$, diploid \times tetraploid) jsou skvrnité
- n** další geny, jejichž alely jsou aktivní pouze tehdy, pocházejí-li ze samičí dráhy:
tubuliny (buněčný cytoskelet) a zeiny (kódující zásobní proteiny semen kukuřice);
mateřská rostlina má tedy zřejmě pod kontrolou přísun zásobních látek vyvíjejícímu se
embryu (*tug-of-war between mother and progeny*)
- n** u jiných druhů rostlin je vzhledem k odlišnému vývinu zárodečného vaku EBN rozdílný:
typ *Oenothera* ($2n = 1m : 1p$), typ *Fritillaria* ($5n = 4m : 1p$) nebo *Peperomia* ($9n = 8m : 1p$)
- n** u některých druhů s tetrasporickým zárodečným vakem dochází v polyploidním endospermu
k inaktivaci až tří nadpočetných genomů maternálního původu: u křivatce (*Gagea*) jsou
inaktivované genomy (fakultativní heterochromatin) hypermetylovány a hypoacetylovány

5.4 Jiné epigenetické jevy

Chromozomální imprinty jsou modifikace primárního genetického materiálu, které nemají za následek změnu nukleotidových sekvencí, ale jsou děděny, chromozomálně přes mitózu a příležitostně i přes meiózu. Imprintování se odehrává v somatických a zárodečných buněčných děleních, např. v embryonálních tkáních živočichů a v meristémech a endospermu krytosemenných rostlin. Ve zvláštním případě imprintování zárodečné dráhy jsou modifikace pohlavně specifické a jsou vymazány a znovu-nastaveny po meióze. Modifikační enzymy, například DNA-metyltransferázy a histon deacetylázy, stejně jako jiné chromatinové komponenty, hrají imprintující úlohu u živočichů i rostlin. U rostlin je nejčastějším zkoumaným jevem chromozomálního imprintingu umlčování transgenů.

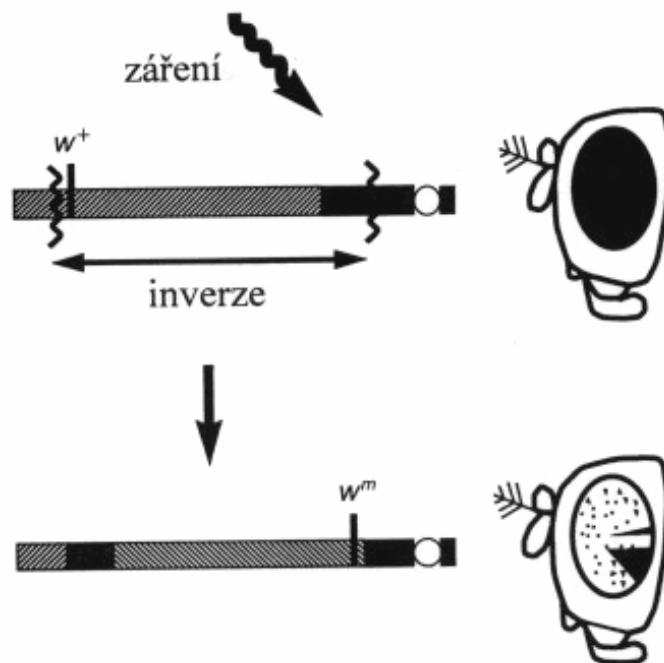
Somatický imprinting se odehrává mimo zárodečnou dráhu. U rostlin jsou jeho nejznámějším příkladem paramutace a cyklující aktivita transpozónů, odehrávají se v embryích a meristémech v průběhu vegetativního a generativního vývoje. Gen *SUPERMAN* kóduje transkripční faktor s doménou zinkových prstů vyžadovaný k založení poziční identity uvnitř květu (viz kapitola 3.2.4). Je exprimován v průběhu časného vývoje květu a účastní se na determinování hranice mezi jednotlivými kruhy. U *Arabidopsis* bylo identifikováno několik nestabilních epialel od genu *SUPERMAN*: epimutace se projevovaly změněnou květní morfologií a alely byly hypermetylovány v místě počátku transkripce. Revertující alely byly méně metylovány a geny měly normální funkci, když byly klonovány v bakteriích a poté exprimovány v rostlinách. Tyto výsledky naznačují, že za změněnou expresi genu jsou odpovědné metylace. Jiným příkladem jsou epialely genu biosyntézy tryptofanu (*PAI2*). Malá genová rodina má 2-4 alely. U variet, kde jsou 4 kopie, všechny jsou hypermetylovány. Spontánní revertanty jsou četné a vyznačují se ztrátou metylace lokusu. Tento jev je podobný paramutacím, ne všechny dosud studované paramutace však korelují se změnou metylace.

Stochastické změny metylace DNA v genomu eukaryot se mohou projevovat jako aktivace nebo umlčování genů a vést ke změněnému fenotypu: nazývají se epimutacemi. Tyto metylační změny jsou buď reparovány nebo mohou být přenášeny do pohlavního potomstva: takové změny jsou nazývány epimutacemi. U rostlin byly často popsány jako výsledek stresu daného vnějšími přírodními faktory (např. tzv. genotrofy u lnu) nebo procesy dediferenciace a diferenciace v explantátových kulturách *in vitro* (tzv. epigenetická složka somaklonální

variability). Epimutace obvykle bývají nestálé (po jedné nebo několika pohlavních generacích vyznívají, tj. revertují) a bylo experimentálně prokázáno, že obvykle přímo souvisejí s genomovou metylací. Za jednu z příčin dynamické proměnlivosti genotypu i fenotypu rostlin a živočichů je považována aktivita mobilních genetických elementů: jejich mobilita však též závisí na metylaci příslušných promotorů.

Také u drozofily, podobně jako u jiných eukaryotických organismů, byly popsány rozsáhlé oblasti genomu obsahující netranskribovaný heterochromatin (např. chromozóm Y, centromerické a subtelerické oblasti nebo vývojově regulované lokusy homeotických genů). Dnes již klasickým příkladem demonstrujícím úlohu okolního chromatinu na expresi přilehlého

Obr. 123. Příklad pozičně-variegačního efektu na X-vázaný gen *white*⁺ (*w*⁺) nezbytný pro tvorbu červeného pigmentu oka drozofily (podle Henikoffa, 1990). Horní obrázek ukazuje normálně exprimovaný gen *w*⁺. Ionizující záření však indukovalo chromozomální zlomy (znázorněny vlnovkami), které vedly k inverzím, translokacím a transpozicím. Pokud se tak gen *white* přemístil do blízkosti heterochromatinu (dolní obrázek), stává se alelou *white-mottled* (*w*^m): mozaiková exprese se projevuje jako četné sektory červených buněk v mutantním, bílém oku. Vlevo jsou pozice genu *white* na chromozómu X vzhledem k centromerickému heterochromatinu (tmavě), vpravo odpovídající fenotypy oka.

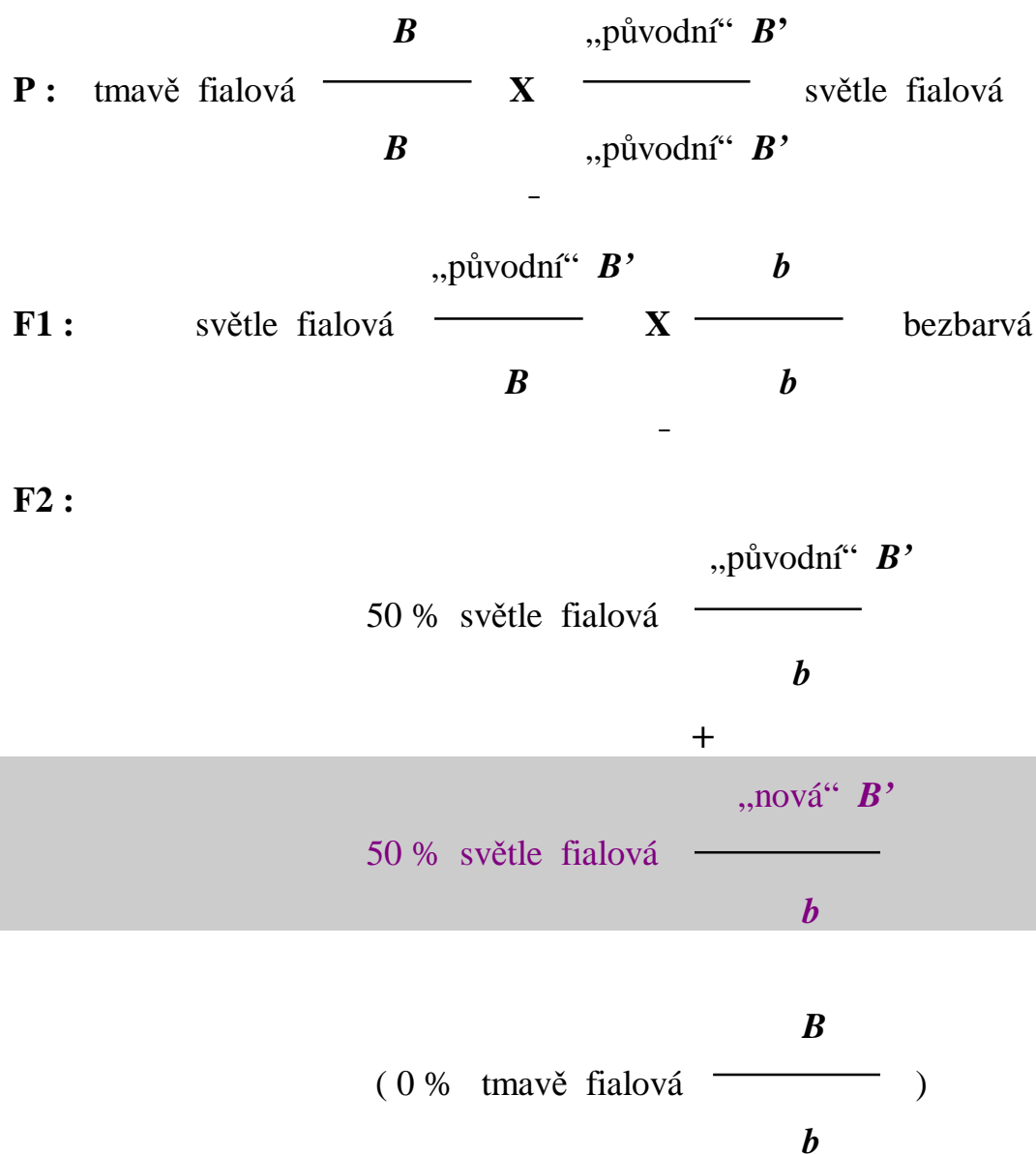


genu je **pozičně variegační efekt**, PEV (*position effect variegation*, obr. 123). Jako poziční mutanty jsou označovány takové geny, které byly přemístěny (restrukturací sekvencí DNA, obvykle po ozáření) z euchromatinu do oblasti heterochromatinu nebo jeho sousedství, což mělo za následek částečné umlčení jejich transkripce. Jeho typickým znakem je účinek heterochromatinu i na velmi vzdálené oblasti, řádově tisíce až milióny bazí DNA. Tento poziční efekt navozuje metastabilní stav genů nacházejících se v těchto oblastech, což má za následek jejich úplnou nebo částečnou inaktivaci v různých typech buněk, tkání a orgánů (tzv. mozaiková genová exprese). Genů, jejichž exprese byla ovlivněna blízkostí heterochromatinu, byla u drozofily izolována celá řada (tzv. *PEV alleles*): některé jsou buněčně autonomní (např. uvedený *white-mottled*), jiné jsou geny regulační. Typickým rysem je vždy mozaiková exprese: malé, velké a sektorové oblasti exprese/suprese naznačují, že k determinaci dochází v různých fázích vývoje a sektory tak reprezentují buněčné klony (tzv. buněčný imprinting).

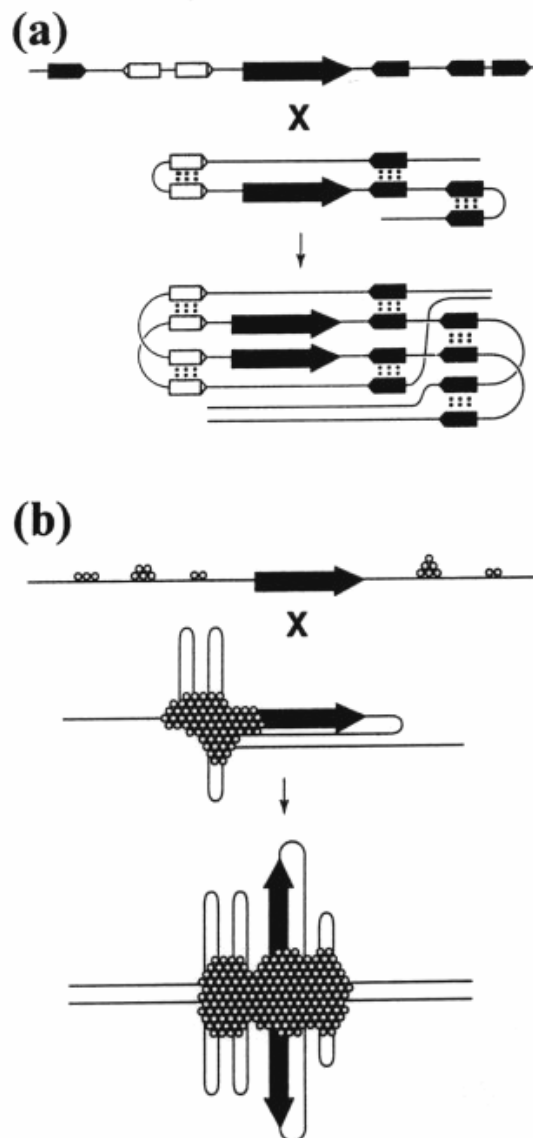
Paramutace jsou definovány jako interakce mezi alelami, které vedou k mitoticky a meioticky dědičné změně exprese jedné z alel v rostlinných buňkách. Pojem paramutace zavedl do genetiky Alexandr Brink v padesátých letech k popisu jevu, který je v kontradikci s Mendelovým zákonem o nezávislé segregaci alel. Paramutace může být též označena jako typ imprintingu, neboť genetická aktivita jedné, senzitivní alely (tzv. paramutovatelné) může být změněna účinkem jiné alely (tzv. paramutagenní) způsobem, který přetrvává, i když tyto dvě alely meioticky segregují. Paramutace obvykle navozují redukci genové funkce (nevedou k jejímu úplnému potlačení) a v určité frekvenci, významně vyšší než u standardních mutací, dochází k její reverzi. Nejznámějším příkladem jsou paramutační jevy související se třemi geny (lokusy *r*, *b* a *pl*, kódující transkripční faktory) regulujícími syntézu antokyanu u kukuřice (obr. 124). Paramutace však byly popsány i u jiných druhů rostlin (například rajčete, petunie nebo tabáku) a ovlivňují i tvorbu chlorofylu a tvar listů. Změny paramutovatelných alel nebyly na molekulární úrovni dosud zcela objasněny: první výsledky naznačují změny v metylacích cytozinu, diskutuje se též úloha struktury chromatinu (obr. 125). Jisté rysy paramutací naznačují souvislosti s jinými, již více objasněnými epigenetickými jevy. Předpokládá se, že v sousedství těchto paramutovatelných lokusů se nacházejí repetitivní sekvence, odkud by se šířilo umlčování (analogie s pozičním efektem u drozofily). Souběžně nebo alternativně je studována vazba specifických proteinů s represorovou funkcí (proteiny typu Polycomb, již identifikované i u rostlin). Analogickým jevem, při kterém dochází k alelickým interakcím závislým na párování alel nebo jejich fyzické blízkosti, je transvekce u drozofily.

Obr. 124. Schéma indukce paramutací u kukuřice (podle Pattersona a Chandlera, 1995).

Homozygotní rostliny B/B jsou tmavě fialové, protože dochází k vysoké akumulaci antokyanu, zatímco homozygoty B'/B' tvoří méně pigmentu. Dceřinný fenotyp B'/B je podobný rostlinám B'/B' . Homozygoty b/b antokyan nevytvářejí, neboť alela b je nefunkční. Křížením rostlin B'/B a b/b vzniká výhradně světle fialové potomstvo (namísto teoreticky očekávané mendelistické segregace 50 % světle fialových B'/b a 50 % tmavě fialových B/b rostlin). Alela B' se chová jako paramutagenní: v heterozygotních rostlinách B'/B vyvolává dědičnou změnu paramutovatelné alely B na „novou“ alelu B' .



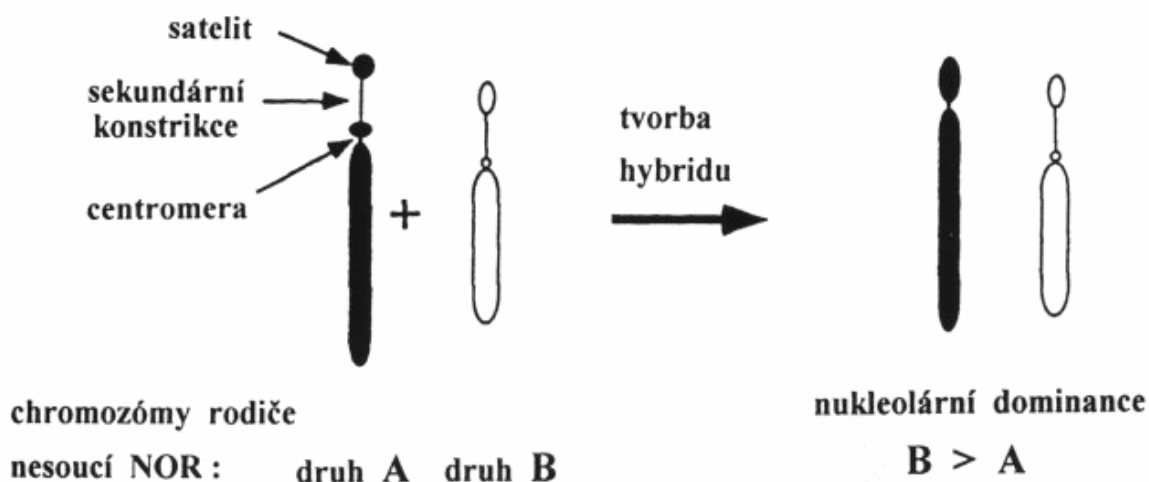
Obr. 125. Modely vysvětlující podstatu paramutací u rostlin a jiných alelických interakcí vedoucích k dědičným změnám v expresi genů (podle Hollicka et al., 1997). Geny jsou znázorněny velkými tmavými šipkami značícími směr transkripce; repetitivní sekvence DNA jsou vyznačeny menšími boxy. **(a)** Tvorba heterochromatinu indukovaná párováním okolních repetitivních sekvencí. Při paramutagenním stavu vznikají stabilní asociace repetitivních sekvencí vedoucí k rozšíření inaktivity (nebo omezené aktivity) z paramutagenní (dole) na paramutovatelnou alelu (nahore). **(b)** Tvorba heterochromatinu způsobená vazbou regulačních proteinů s chromodoménou (vyznačeny kroužky). Model předpokládá, že v okolí paramutovatelné (nahore) a paramutagenní (dole) alely jsou četná vazebná místa pro chromoproteiny. Kooperativní interakce alel vedou ke zvýšené asociaci chromatinových proteinů a k umlčování alel.



Vyšší počet chromozómových sad - **polyploidie** - v somatických buňkách celého organismu je tolerován jen u některých nižších živočišných druhů, zatímco u rostlin jde o jev téměř běžný. Vysoký obsah DNA v jádře mnoha rostlinných druhů bývá často uváděn do souvislosti s jejich polyploidní evolucí. Polyploidy mohou sestávat ze shodných sad chromozómů (autopolyploidie) nebo druhově odlišných (allopolyploidie). Pokud dochází ke stabilizaci počtu chromozómových sad vytvořením jejich sudých násobků, mohou být polyploidy plně fertillní. Polyploidní rostliny se svým fenotypem obvykle odlišují od diploidů: zůstává však otázkou, zda jsou všechny jejich alely aktivní nebo jsou některé (nadpočetné) alely umlčovány (viz přehled Soltis and Soltis, 1993). Analýzy transkripčních i translačních produktů některých genů naznačují, že u polyploidů obvykle dochází ke vzrůstu genové exprese v korelaci s počtem chromozómových sad, zatímco u aneuploidů zvýšený počet kopií daného chromozómu k vyšší hladině genové exprese nevede.

Parentální dominance je častý epigenetický jev popsáný zejména u mezidruhových nebo mezirodových hybridů rostlin, kdy dochází k přednostní expresi jen jednoho z rodičovských genomů. Příkladem je kříženec žita a pšenice (zv. *Triticale*), který je fenotypově bližší žitu než

Obr. 126. Nukleolární dominance je epigenetický proces, kdy v buňkách mezidruhového hybridu (rostlin i živočichů) dochází k umlčení organizátoru jadérka (NOR, *nucleolus organizing region*) získaného od jednoho z rodičů (podle Pikaarda, 1998). Cytologicky se projevívá vymizením sekundární konstriktce a satelitu na příslušném metafázním chromozómu hybridu. Tento jev pozoroval již Navashin v roce 1928 a nazval jej *differential amphiblasty*.

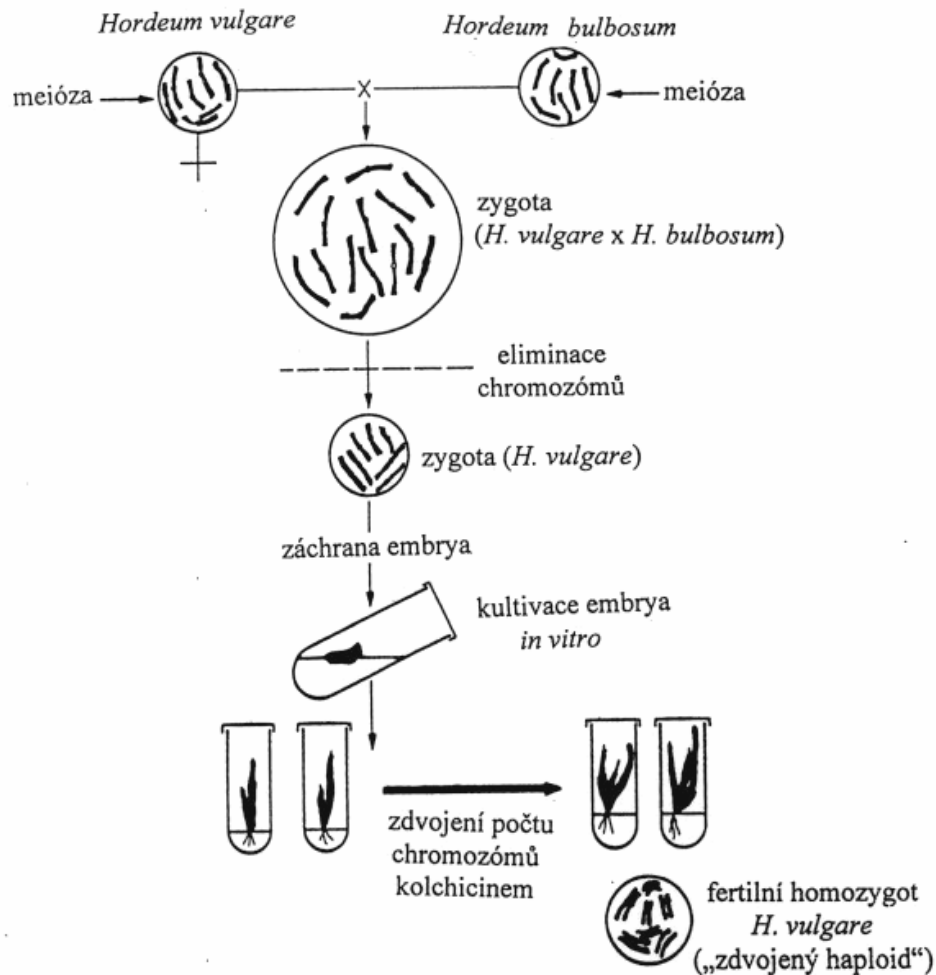


pšenici. Analýzy takových hybridů ukázaly, že parentální dominance souvisí s prostorovým uspořádáním rodičovských genomů v interfázovém jádře a metylací DNA: aktivní genom jednoho z rodičů bývá situován spíše na periférii jádra, zatímco umlčovaný genom druhého z rodičů bývá lokalizován centrálněji a může být hypermetylován. Nukleolární dominance (obr. 126) je blíže příbuzný epigenetický jev, který popisuje tvorbu jádřičky okolo rRNA genů zděděných pouze od jednoho rodiče u mezidruhových hybridů nebo allopolyploidů. Vyskytuje se u rostlin, hmyzu, obojživelníků a savců. I když jeho molekulární mechanismus nebyl dosud objasněn, některé novější výsledky naznačují, že souvisí se specifickou hypermetylací DNA a deacetylací histonů neexprimovaných rRNA genů.

Extrémním příkladem parentální dominance je inaktivace nebo dokonce úplná eliminace genomu jednoho z rodičů, popsaná jako přirozený proces u některých druhů hmyzu nebo při mezidruhovém křížení rostlin. U rostlin byla popsána i specifická eliminace chromozómů, a to při mezidruhovém křížení kulturního ječmene (*Hordeum vulgare*) s planým ječmenem *H. bulbosum*. V časných fázích embryogeneze dochází k replikaci a rozchodu chromozómů pouze od jednoho z rodičů (*H. vulgare*), takže dopěstováním nezralých embryí *in vitro* je možné izolovat haploidní rostliny kulturního ječmene. Tato strategie se využívá ve šlechtění: na haploidní úrovni se provádí selekce žádaných genotypů a tyto jsou posléze převedeny na homozygotní diploidy (obr. 127).

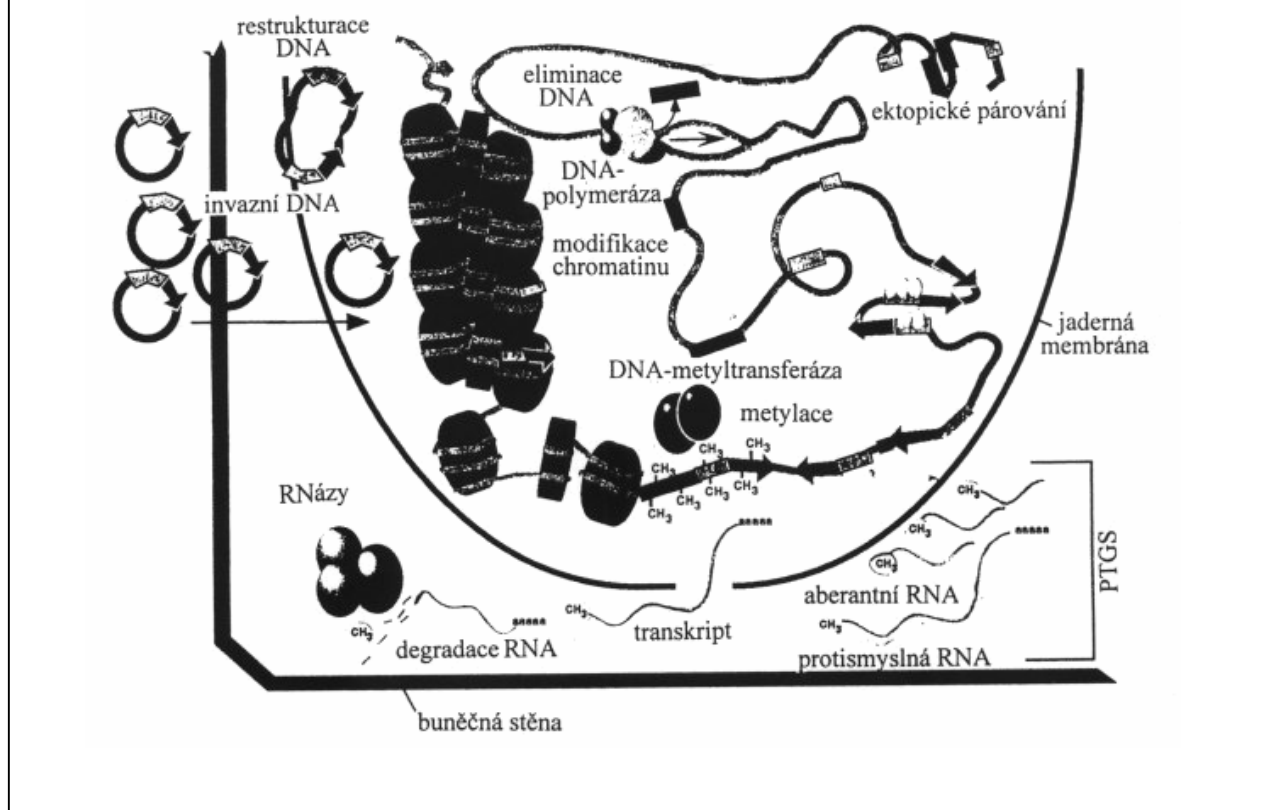
Genové inženýrství rostlin, živočichů i hub odhalilo jejich rozmanité molekulární mechanismy jejich obranných schopností vůči invazním sekvencím DNA - transgenům, mobilním genetickým elementům i přímým parazitům (například virovým nukleovým kyselinám). Jde obvykle o degradaci nebo umlčování (na různé úrovni, transkripční i posttranskripční) cizorodých sekvencí DNA. Nejčastěji jde o fenomén transkripčního umlčování genů (zevrubně studovaný na modelových transgenních rostlinách), pro recipientní organismus alespoň částečně sekvencně homologních, zvaný *RIGS* (*repeat-induced gene silencing*). Jeho mechanismy jsou obvykle *cis*-inaktivace (metylace a umlčování tandemově se opakujících kopií integrovaných transgenů), *trans*-inaktivace (jev analogický paramutacím: metylovaná kopie genu způsobí změnu své původně aktivní kopie na inaktivní) nebo *co*-suprese (koordinované umlčování dvou nebo více homologních genů). Většina z nich zjevně souvisí s metylací DNA a následnou heterochromatinizací na základě párování homologních sekvencí DNA (obr. 128). Časté jsou i případy posttranskripčního umlčování transgenů (*PTGS*, *posttranscriptional gene silencing*):

Obr. 127. Specifická eliminace chromozómů ječmene *Hordeum bulbosum* v mezidruhovém hybridu s *H. vulgare* (podle Mantella et al., 1985). Po oplození dochází v zygotě vždy k eliminaci celé chromozómové sady původem z *H. bulbosum*. Pokud jsou nezralá embrya dopěstována v kultuře *in vitro*, je možné připravit haploidní rostliny kulturního ječmene (*H. vulgare*). Po selekci na úrovni haplofáze lze připravit fertillní homozygotní diploidy, významný šlechtitelský materiál.



transgen je transkribován, avšak jeho mRNA je ještě před potenciální translací degradována. Příčiny této degradace mohou být různé: například párováním s *antisense* mRNA tvořenou z jiné, obráceně orientované kopie transgenu, nebo poté, co hladina mRNA dosáhne

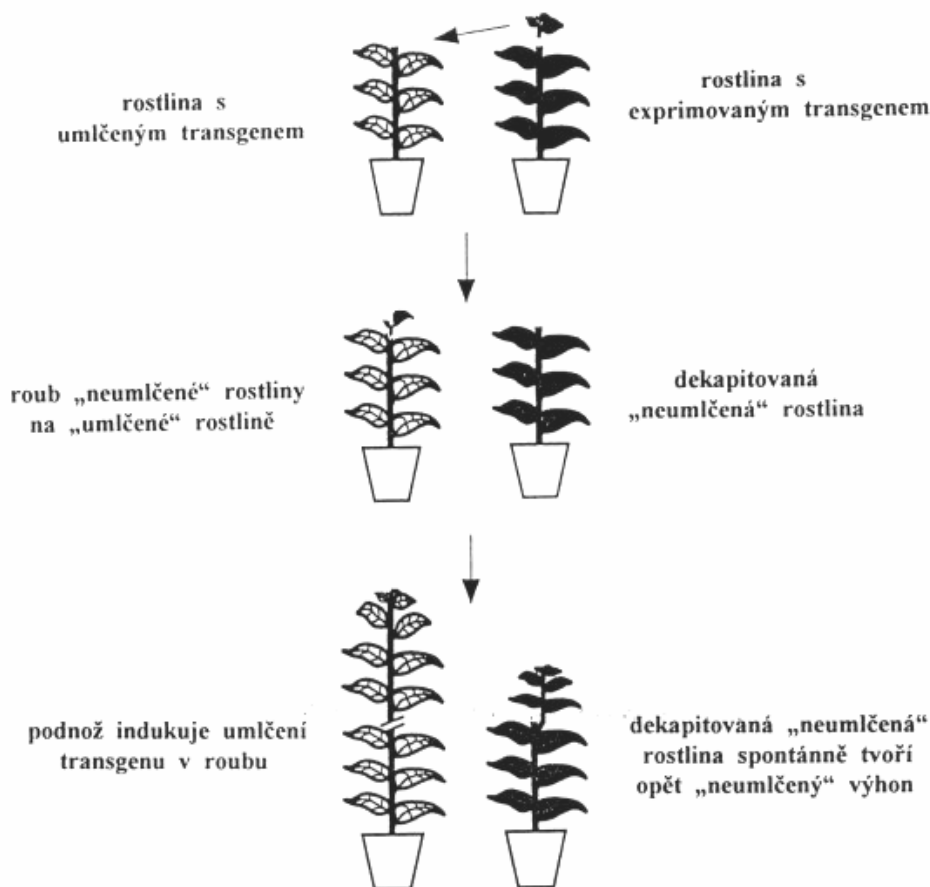
Obr. 128. Mechanizmy inaktivace a eliminace invazních nukleových kyselin (podle Kumpatly et al., 1998). Po průchodu buněčnou stěnou může být cizorodá DNA fragmentována cytoplazmatickými DNázami nebo eliminována chybným párováním při meióze. Pokud je však stabilně integrována do chromozómů, může být inaktivována modifikací chromatinu (kompaktace nukleozómů), účinkem metyltransferáz (symboly metylových skupin) nebo kompeticí o faktory transkripce. Signálem k transkripční inhibici může být ektopické párování více homologních kopií invazní DNA. Při posttranskripčním umlčování genů (PTGS, *post-transcriptional gene silencing*) mohou být invazní RNA nebo transkripty odvozené z invazní DNA inaktivovány degradací RNázami, stimulovanými následkem tvorby nadbytku RNA nebo její protismyslné nebo aberantní formy.



určité vyšší hladiny, která vede k indukci její enzymatické degradace (obr. 129). Je zajímavé, že podobné mechanismy umlčování duplicitních sekvencí DNA jako u rostlin se též vyvinuly u hub.

I když strukturní stabilita transgenů v rostlinách je vzhledem k jejich integraci do chromozómů vysoká, dochází často k jejich inaktivaci, zejména v případě přítomnosti více kopií transgenů v rostlinném genomu. K této inaktivaci, která je obvykle provázena metylací jejich promotorů, může docházet, pokud jsou transgeny organizovány jako tandemová opakování (*cis-*

Obr. 129. Posttranskripční umlčování transgenů systemickým přenosem difúzibilní látky z podnože na roub (podle Palauqui et al., 1997). Byly připraveny dvě nezávislé transgenové rostliny, z nichž jedna (vpravo, tmavá) exprimovala vnesený transgen, zatímco u druhé došlo k posttranskripčnímu umlčení transgenů (příslušná mRNA se tvoří, ale není translatována; vlevo, značena světle). Po přenosu roubu z „aktivní“ rostliny na „umlčenou“ se roub dále vyvíjí, avšak transgen je umlčen účinkem blíže nespecifikované, transgen-specifické látky, která difunduje z podnože do roubu (levá řada). Po dekapitaci rostliny s aktivním transgenem dochází k vývinu úžlabního pupene v nový vrchol, exprese transgenů se však nemění. Chemická povaha této látky dosud nebyla identifikována.



inaktivace), nebo jeden metylovaný transgen může inaktivovat jiný v pozici *trans* mechanismem analogickým u paramutací, případně může docházet ke koordinovanému "umlčování" dvou nebo více homologních transgenů (*co-suppression*, Matzke a Matzke 1993). Procesy inaktivace

založené na úplné nebo částečné homologii úseků DNA transgenů probíhají na úrovni transkripční nebo posttranskripční. Předpokládá se, že párování homologních sekvencí může způsobovat inaktivní genetický stav cestou metylace *de novo* a heterochromatinizace (transkripční inaktivace) nebo mRNA produkty více transgenů se akumulují, až dosáhnou kritické hladiny, při které dochází k jejich rychlé degradaci (posttranskripční inaktivace). "Umlčování" transgenů v rostlinách je dnes široce využíváno jako modelový systém ke studiu interakcí homologních sekvencí DNA, neboť by k němu mohlo docházet i u endogenních genů, zejména v polyploidních rostlinách. Z praktického hlediska je však umlčování transgenů vážnou překážkou při aplikacích technik genového inženýrství v biotechnologiích a šlechtitelské praxi.

Výše uvedené epigenetické jevy se týkaly především savců a krytosemenných rostlin. S mnoha dalšími příklady se však můžeme setkat i u většiny jiných skupin eukaryotických organismů. U některých nálevníků (např. *Tetrahymena*) se ve vegetativních buňkách vyskytují dvě strukturně i funkčně odlišná jádra: transkripčně aktivní makronukleus (který se podrobuje polyploidizaci i rozsáhlé restrukturační a v pohlavní fázi vývoje je zcela degradován) a inertní mikronukleus. V průběhu konjugace dochází k aktivaci mikronukleu, meióze, fertilizaci a postzygotické dělení dává vznik novému makronukleu a mikronukleu. Tyto procesy aktivace/inaktivace a degradace jsou řízeny komplexním vývojovým programem. Imunofluorescenční analýzy s pomocí specifických antisér prokázaly v makronukleu přítomnost acetylovaných histonů H4, zatímco mikronukleus byl hypoacetylován s výjimkou jeho stádia replikace a chromatinové restrukturační.

U modelové kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou nejlépe prostudovanými geny, které podléhají epigenetickým procesům umlčování, kódující ribozomální RNA a geny řídící konjugační typ (lokusy *HM*) a telomerové oblasti. Na jejich inaktivaci se podílejí jak sekvence DNA v pozici *cis*, tak i faktory ovlivňující strukturu chromatinu. Patří mezi ně zejména proteiny zvané Sir1p-4p (*silent information regulator*), které indukují i udržují transkripční umlčování lokusů *HM*, kde tvoří komplexy s histon deacetylázou. Jiný represor, Rpd3p (*reduced potassium dependency*), umlčuje kvasinkové telomery a má přímo deacetylázovou aktivitu. Právě u kvasinek bylo cílenou mutagenézou genů vedoucích k modifikacím lyzinových reziduí v histonových aminoterminálních doménách prokázáno, že klíčovou roli v potenciální aktivaci genů i rozsáhlejší oblastí genomu hrají acetylace nukleozomálních histonů H3 a H4. Přímý důkaz hypoacetylace histonů v umlčených lokusech *HM* byl demonstrován metodou imunoprecipitace s antiséry specifickými pro odlišně acetylované izoformy histonu H4. Aplikace inhibitoru histon

deacetyláz, trichostatinu, vedla k hyperacetylaci a aktivaci centromerického heterochromatinu a tento stav byl mitoticky dědičný v buněčných liniích. U jiných vřeckovýtrusých hub (např. *Neurospora*) byla popsána řada epigenetických jevů vedoucích k umlčování genů (studováno zejména na transgenních organizmech) DNA metylacemi a mutacemi. Nejznámějším z nich je inaktivace duplicitních genů lokálními mutacemi (tranzice G-C na A-T) zvaná *RIP* (*rearrangement induced premeiotically* neboli *repeat induced point mutation*). Je pravděpodobné, že tyto epigenetické mechanismy se vyvinuly jako obranný systém pohlavní fáze hub vůči parazitním sekvencím DNA včetně transponovatelných elementů, tedy zřejmě analogicky jako u rostlin a savců.

6 Citovaná a doporučená literatura

- Adams, R.L.P.: DNA methylation. *Principles Med. Biol.* 5 (1996) 33
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., New York 1994
- Bartolomei, M.S., Tilghman, S.M.: Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31 (1997) 493
- Berking, S.: Pattern formation in Hydrozoa. *Naturwissenschaften* 84 (1997) 381
- Bewley, J.D.: Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9 (1997) 1055
- Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., Szyf, M.: A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 379 (1999) 579
- Birchler, J.A.: Dosage analysis of maize endosperm development. *Annu. Rev. Genet.* 27 (1993) 181
- Bonet, F.J., Azbaid, L., Olmedilla, A.: Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? *Protoplasma* 202 (1998) 115
- Brandeis, M., Ariel, M., Cedar, H.: Dynamics of DNA methylation during development. *BioEssays* 15 (1993) 709
- Browder, L.W., Erickson, C.A., Jeffery, W.R.: *Developmental Biology*. Saunders College Publishing, Philadelphia 1991
- Bůžek, J.: Kompenzace dávký genů v rostlinné buňce. *Biol. listy* 63 (1998) 39
- Bůžek, J., Říha, K., Šíroky, J., Ebert, I., Greilhuber, J., Vyskot, B.: Histone H4 underacetylation in plant facultative heterochromatin. *Biol. Chem.* 379 (1998) 1235
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V.: *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, New York 1997
- Cassidy, S.B.: Uniparental disomy and genomic imprinting as causes of human genetic disease. *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 13
- Cavalli, G., Paro, R.: Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr. Opin Cell Biol.* 10 (1998) 354
- Clark, S.E.: The shoot meristem as a site of continuous organogenesis. *Semin. Cell Devel. Biol.* 7 (1996) 873
- Coen, E.S.: The role of homeotic genes in flower development and evolution. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1991) 241
- Crane-Robinson, C., Wolffe, A.P.: Immunological analysis of chromatin: FIS and CHIPS. *Trends Genet.* 14 (1998) 477
- Černohorský, Z.: *Základy rostlinné morfologie*, SPN, Praha 1964
- Davie, J.R.: Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin Genet. Devel.* 8 (1998) 173
- Driscoll, D.J.: Genomic imprinting in humans. *Hum. Genet. Med.* 4 (1994) 37

- Eady, C., Lindsey, K., Twell, D.: The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *Plant Cell* 7 (1995) 65
- Eden, S., Hashimshony, T., Keshet, I., Cedar, H., Thorne, A.W.: DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394 (1998) 842
- Erdelská, O.: Embryológia krytosemenných rastlín. Veda, Bratislava 1981
- Fosket, D.E.: *Plant Growth and Development - a Molecular Approach*. Academic Press, San Diego 1994
- Gan, S., Amasino, R.M.: Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270 (1995) 1986
- Gasser, S.M., Paro, R., Stewart, F., Aasland, R.: Epigenetic control of transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 1
- Gilbert, S.F.: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Sunderland 1988
- Goldberg, R.B.: Plants: novel developmental processes. *Science* 240 (1988) 1460
- Goldberg, R.B., Barker, S.J., Perez-Grau, L.: Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56 (1989) 151
- Goldberg, R.B., de Paiva, G., Yadegari, R.: Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266 (1994) 605
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., Coupland, G.: A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386 (1997) 44
- Goodwin, B. (ed.): *Development*. Hodder & Stoughton, Milton Keynes 1991
- Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Široký, J., Pan, W.H., Macas, J., Saedler, H.: Genetics of sex determination in flowering plants. *Devel. Genet.* 15 (1994) 214
- Grossniklaus, U., Vielle-Caldaza, J.P., Hoepfner, M.A., Gagliano, W.B.: Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280 (1998) 446
- Heard, E., Clerc, P., Avner, P.: X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31 (1997) 571
- Henikoff, S.: Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet.* 6 (1990) 422
- Hennig, W.: Heterochromatin. *Chromosoma* 108 (1999) 1
- Hollick, J.B., Dorweiler, J.E., Chandler, V.L.: Paramutation and related allelic interactions. *Trends Genet.* 13 (1997) 302
- Holliday, R.: The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238 (1987) 163
- Howell, S.H.: *Molecular Genetics of Plant Development*, Cambridge University Press, Cambridge 1998
- Chan, R.L., Gago, G.M., Palena, C.M., Gonzales, D.H.: Homeoboxes in plant development. *Biochem. Biophys. Acta* 1442 (1998) 1

- Chen, Z.J., Pikaard, C.S.: Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. *Genes Devel.* 11 (1997) 2124
- Jaenisch, R.: DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 13 (1997) 323
- Jamieson, R.V., Tam, P.P.L., Gardiner-Garden, M.: X-chromosome activity: impact of imprinting and chromatin structure. *Int. J. Dev. Biol.* 40 (1996) 1065
- Janoušek, B.: Determinace pohlaví u krytosemenných rostlin. *Biol. listy* 61 (1996) 101
- Janoušek, B., Široký, J., Vyskot, B.: Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol. Gen. Genet.* 250 (1996) 483
- Jorgensen, R.: The germinal inheritance of epigenetic information in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 339 (1993) 173
- Jost J.P., Saluz H.P. (ed.): *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Birkhäuser Verlag, Basel 1993
- Judd, B.H.: Transvection: allelic cross talk. *Cell* 53 (1988) 841
- Jürgens, G.: Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* 81 (1995) 467
- Kalthoff, K.: *Analysis of Biological Development*. McGraw-Hill, New York 1996
- Kermicle, J.L., Alleman, M.: Gametic imprinting in maize in relation to the angiosperm life cycle. *Development Suppl.* (1990) 9
- Komárek, S.: *Dějiny biologického myšlení*. Vesmír, Praha 1997
- Kumputla, S.P., Chandrasekharan, M.B., Iyer, L.M., Li, G., Hall, T.C.: Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 97
- Kuo, M.H., Allis, C.D.: Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20 (1998) 615
- Lawrence, P.A.: *The Making of a Fly. The Genetics of Animal Design*. Blackwell Science Ltd., Oxford 1992
- Lewin, B.: The mystique of epigenesis. *Cell* 93 (1998) 301
- Lewis, E.B.: Genes and developmental pathways. *Amer. Zool.* 3 (1963) 33
- Lewis, E.B.: Homeosis: the first 100 years. *Trends Genet.* 10 (1994) 341
- Loewy, A.G., Siekevitz, P., Menninger, J.R., Gallant, J.A.N.: *Cell Structure and Function - an Integrated Approach*. Saunders College Publ., Philadelphia 1991
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A.L., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Harada, J.J.: *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON 1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93 (1998) 1195
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., Chaudhuri, A.M.: Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 296
- Lyndon, R.F.: *Plant Development - the Cellular Basis*. Unwin Hyman, London 1990
- Mable, B.K., Otto, S.P.: The evolution of life cycles with haploid and diploid phases. *BioEssays* 20 (453) 1998

- Mantell, S.H., Matthews, J.A., McKee, R.A.: Principles of Plant Biotechnology, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1985
- Markoš, A.: Povstávání živého tvaru. Academia, Praha 1997
- Matzke, M., Matzke, A.J.M.: Genomic imprinting in plants: parental effects and *trans*-inactivation phenomena. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 53
- Maynard Smith, J.: Models of a dual inheritance system. *J. Theor. Biol.* 143 (1990) 41
- Maynard Smith, J.: Evolutionary Genetics. Oxford University Press, Oxford 1998
- McClelland, M., Nelson, M.: The effect of site-specific DNA methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases - a review. *Gene* 74 (1988) 291
- McSteen, P., Hake, S.: Genetic control of plant development. *Curr. Opinion Biotechnol.* 9 (1998) 189
- Meyer, E., Duharcourt, S.: Epigenetic programming of developmental genome rearrangements in Ciliates. *Cell* 87 (1996) 9
- Meyer, P., Heidmann, I., Niedenhof, I.: Differences in DNA-methylation are associated with a paramutation phenomenon in transgenic petunia. *Plant J.* 4 (1993) 89
- Meyerowitz, E.M.: Plants and the logic of development. *Genetics* 145 (1997) 5
- Mittwoch, U.: Sex-determining mechanisms in animals. *TREE* 11 (1996) 63
- Monk, M.: Variation in epigenetic inheritance. *Trends Genet.* 6 (1990) 110
- Monk, M.: Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Devel. Genet.* 17 (1995) 188
- Mordhorst, A.P., Toonen, M.A.J., de Vries S.C.: Plant embryogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16 (1997) 535
- Müller, W.A.: Developmental Biology. Springer Verlag, New York 1997
- Nan, X.S., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A.: Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393 (1998) 386
- Nedvědová, L.: Genetická regulace morfogeneze květu *Arabidopsis thaliana*. *Biol. listy* 60 (1995) 133
- Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y.C., Williams, C., Repetti, P., Fischer, R.L.: A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5319
- Ondřej, M.: Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia, Praha 1992
- Ondřej, M., Rakouský, S., Beneš, K.: Genová regulace vývoje kořenů *Arabidopsis thaliana*. *Biol. listy* 63 (1998) 277
- Oostra, B.A., Willems, P.J.: A fragile gene. *BioEssays* 17 (1995) 941
- Osborne, D.J., Boubriak, I.I.: DNA and desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 4 (1994) 175
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., Vaucheret, F.: Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16 (1997) 4738

- Paleček, J.: Základy vývojové biologie. Karolinum, Praha 1993
- Patterson, G.I., Chandler, V.L.: Paramutation in maize and related allelic interactions. In: Gene Silencing in Higher Plants and Related Phenomena in Other Eukaryotes, Meyer, P. (ed.), Springer Verlag, Berlin 1995
- Pikaard, C.S.: Nucleolar dominance. In: Transcription of Ribosomal RNA Genes by Eukaryotic RNA Polymerase I, Paule, M.R. (ed.), Springer, Austin 1998
- Pirrotta, V.: Chromatin-silencing mechanisms in *Drosophila* maintain patterns of gene expression. Trends Genet. 13 (1997) 314
- Purves, W.K., Orians, G.H., Heller, H.C., Sadava, D.: Life - the Science of Biology. Sinauer Associates, Sunderland 1998
- Razin, A., Cedar, H.: DNA methylation and embryogenesis. In: DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance, Jost, J.P., Saluz, H.P. (ed.), Birkhauser Verlag, Basel 1993
- Ray, A.: New paradigms in plant embryogenesis: maternal control comes in different flavors. Trends Plant Sci. 3 (1998) 325
- Reik, W.: Genetic imprinting: the battle of the sexes rages on. Exptl. Physiol. 81 (1996) 161
- Reik, W., Maher, E.R.: Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. Trends Genet. 13 (1997) 330
- Richards, E.J.: DNA methylation and plant development. Trends Genet. 13 (1997) 319
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., Riggs, A.D. (ed.): Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1996
- Říha, K.: Rostlinné telomery a telomeráza. Biol. listy 63 (1998) 301
- Říha, K., Fajkus, J., Široký, J., Vyskot, B.: Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. Plant Cell 10 (1998) 1691
- Scott, R.J., Spielman, M., Bailey, J., Dickinson, H.G.: Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. Development 125 (1998) 3329
- Scott, R.J., Vinkenoog, R., Spielman, M., Dickinson, H.G.: Medea: murder or mistrial? Trends Plant Sci. 3 (1998) 460
- Selker, E.U.: Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion? Trends Genet. 13 (1997) 296
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., Sommer, H.: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. Science 250 (1990) 931
- Slack, J.M.W.: From Egg to Embryo - Determinative Events in Early Development. Cambridge University Press, Cambridge 1991
- Slack, J.M.W., Holland, P.W.H., Graham, C.F.: The zootype and the phylotypic stage. Nature 361 (1993) 490
- Sládeček, F.: Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia, Praha 1958
- Soltis, D.E., Soltis, P.S.: Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Crit. Rev. Plant Sci. 12 (1993) 243

- Steeves, T.A., Sussex, I.M.: Patterns in Plant Development. Cambridge University Press, Cambridge 1994
- Stein, P., Worrad, D.M., Belyaev, N.D., Turner, B.M., Schultz, R.M.: Stage-dependent redistributions of acetylated histones in nuclei of the early preimplantation mouse embryo. *Mol. Reprod. Devel.* 47 (1997) 421
- Šebánek, J., Sladký, Z., Procházka, S.: Experimentální morfologie rostlin. Academia, Praha 1983
- Tanaka, I.: Development of male gametes in flowering plants. *J. Plant Res.* 106 (1993) 55
- Tautz, D. (ed.): Development Genes and Evolution. Springer, New York 1997
- Theissen, G., Saedler, H.: MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 5 (1995) 628
- Tinland, B.: The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 1 (1996) 178
- Tordera, V., Sendra, R., Pérez-Ortín, J.E.: The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia* 49 (1993) 780
- Turner, B.M.: Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 21
- Twell, D., Park, S.K., Lalanne, E.: Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 305
- Vanyushin, B.F., Kirnos, M.D.: DNA methylation in plants. *Gene* 74 (1988) 117
- Vermaak, D., Wolffe, A.P.: Chromatin and chromosomal controls in development. *Devel. Genet.* 22 (1998) 1
- Vyskot, B.: Genetická podmíněnost fyziologických procesů. In: Fyziologie rostlin, Procházka, S. et al. (ed.), Academia, Praha 1998
- Vyskot, B.: Role of DNA methylation in plant reproductive development. In: Sex Determination in Plants, Ainsworth, C. (ed.), Bios Scientific Publishers, Oxford 1999
- Vyskot, B., Araya, A., Veuskens, J., Negrutiu, I., Mouras, A.: DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol. Gen. Genet.* 239 (1993) 219
- Vyskot, B., Koukalová, B., Kovařík, A., Sachambula, L., Reynolds, D., Bezděk, M.: Meiotic transmission of a hypomethylated repetitive DNA family in tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 91 (1995) 659
- Vyskot, B., Široký, J., Hladilová, R., Belyaev, N.D., Turner, B.M.: Euchromatic domains in plant chromosomes as revealed by H4 histone acetylation and early replication. *Genome* 42 (1999) 343
- Wachsman, J.T.: DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to cancerogenesis. *Mutation Res.* 375 (1997) 1
- Waddington, C.H.: Organisers and Genes. Cambridge University Press, Cambridge 1940
- Wakefield, M.J., Keohane, A.M., Turner, B.M., Graves, J.A.M.: Histone underacetylation is an ancient component of mammalian X chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 9665
- Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K., Link, G.: Molecular Plant Development. Oxford University Press, Oxford 1998

- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (1997) 810
- Wolf, E., Zakhartchenko, V., Brem, G., J.: Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J. Biotechnol.* 65 (1998) 99
- Wolfe, S.L.: *Molecular and Cellular Biology*. Wadsworth Publishing Co., Belmont 1993
- Wolffe, A.: *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, San Diego 1999
- Wolpert, L.: *Triumf embrya*. Academia, Praha 1995
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E.: *Principles of Development*. Current Biology Ltd., London 1998
- Yoder, J.A., Bestor, T.H.: Genetic analysis of genome methylation patterns in plants and mammals. *Biol. Chem.* 377 (1996) 605
- Žurovec, M.: *Molekulární biologie živočichů*. Jihočeská univerzita, České Budějovice 1999

Poděkování autora

Dovoluji si upřímně poděkovat Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze (jmenovitě doc. MUDr. Jiřímu Jonákovi, DrSc.), díky němuž bylo možné tento učební text vydat. Práce vznikla v rámci mých přednášek v kurzu molekulární biologie a genetiky doktorského studia biomedicínských věd v Praze a výuky předmětu „vývojová genetiká“ na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně a taktéž v rámci řešení projektů Grantové agentury České republiky a Grantové agentury AV ČR. V neposlední řadě také děkuji svým studentům za technickou pomoc při zpracovávání rukopisu.