

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:  
Molekulární biologie a biochemie organismů  
Studijní obor:  
Speciální chemicko-biologické obory



Lucie Smidžárová

Orientovaný růst buněk mimo nervovou soustavu v modelovém organismu  
*Caenorhabditis elegans*

Non-neuronal cell outgrowth in *Caenorhabditis elegans* model system

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.

Praha, 2022

### **Poděkování:**

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Marii Macůrkové, Ph.D., za věnovaný čas, vstřícnost, trpělivost a cenné rady. Poděkování patří také mé rodině a partnerovi, za podporu při psaní této bakalářské práce.

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1. května 2022

Podpis

## Abstrakt

Orientovaný růst buněk je důležitým procesem pro správný vývoj tkání, při kterém dochází k regulovaným změnám buněčných tvarů. Důležitou roli v tomto mechanismu hraje remodelace cytoskeletálních elementů v rostoucích částech buňky, která je regulována mnoha extracelulárními i intracelulárními faktory. Tato práce se zabývá orientovaným růstem buněk mimo nervovou soustavu u modelového organismu *Caenorhabditis elegans*, konkrétně růstem vylučovací kanálové buňky a invazí buňky kotevní. Mechanismus růstu vylučovací buňky se částečně podobá růstu neuronů, navíc však obsahuje jedinečný mechanismus růstu prostřednictvím zvětšování intracelulárního lumen. V případě kotevní buňky růstové mechanismy podporují porušení bazální membrány a invazivní chování podobné chování rakovinných buněk. Mechanismy růstu těchto buněk tak mohou sloužit i jako model pro některé lidské patologie jako jsou cystická onemocnění ledvin, nebo metastázy rakovinných buněk, a proto by další studium v této oblasti mohlo vést k získání nových poznatků o těchto nemocech. Na konci práce jsou dále stručně popsány další non-neuronální buňky modelového organismu *C. elegans*, u nichž se orientovaný růst objevuje.

**Klíčová slova:** růst buněk, vylučovací kanálová buňka, kotevní buňka, signalizace, cytoskelet

## **Abstract**

Oriented cell growth is an important process for regular tissue development, in which regulated changes in cell shapes occur. An important role in this mechanism is played by remodelling of cytoskeletal elements in the growing parts of the cell, which is regulated by many extracellular and intracellular factors. This bachelor's thesis is focused on oriented non-neuronal cells growth in the model organism *Caenorhabditis elegans*, specifically the growth of the excretory cell and the anchor cell invasion. The growth mechanism of the excretory canal cell is in many aspects similar to growth of neurons, however it also involves a unique mechanism of growth through extension of an intracellular lumen. In case of the anchor cell the growth mechanisms support the basement membrane disruption and invasive behavior reminiscent of metastatic cancer cells. Regulation of growth of these two cells thus could serve as a good model for human pathologies such as cystic kidney disease or cancer cell metastasis, and therefore further study in this area could lead to new insights into these diseases. At the end of the thesis, other non-neuronal cells with oriented growth in the model organism *C.elegans* are briefly described.

**Key words:** cell outgrowth, excretory canal cell, anchor cell, signalling, cytoskeleton

## Seznam použitých zkratk

3' UTR	3' konec DNA
AC	kotevní buňka
ADPKD	autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin
AQP	aquaporin
ATP	adenosin trifosfát
CLIC	chloridový intracelulární kanál
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
ER	endoplazmatické retikulum
ERM	ezrin-radixin-moesin
EXOC	podjednotka komplexu exocyst
GDP	guanosin difosfát
GEF	guaninový výměnný faktor
HDA	histon deacetyláza
Hmc	hlavová mezodermální buňka
MMP	matrixová metaloproteináza
mRNA	messenger RNA
MT MMP	matrixová metaloproteináza membránového typu
MTOC	mikrotubuly-organizující centrum
PAR	receptory aktivované proteázou
PI(4,5)P2	fosfatidylinositol-4,5-bisphosfosfát
PKC	protein kináza c
STRIPAK	komplex fosfatázy a kinázy interagující se striatinem
UT	děložní toroidy
UTSE	buňka děložního švu
UV	vulvální buňka
VPC	vulvální prekurzorová buňka
Wnt	wingless/integrated

# Obsah

Úvod.....	1
1 Modelový organismus <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	2
1.1 Anatomie .....	2
1.2 Embryonální a postembryonální vývoj.....	3
2 Vylučovací kanálová buňka.....	4
2.1 Vylučovací soustava <i>C. elegans</i> .....	4
2.2 Osmoregulace .....	5
2.3 Vývoj vylučovací kanálové buňky .....	6
2.3.1 Specifikace kanálové buňky - Notch signalizace.....	6
2.3.2 Orientovaný růst kanálové buňky.....	7
2.3.3 Cytoskelet a jeho role v růstu vylučovacích kanálů.....	11
2.4 Faktory důležité pro vývoj vylučovací kanálové buňky.....	12
2.4.1 Vakuolární ATPáza .....	12
2.4.2 ERM-1 .....	12
2.4.3 EXC proteiny.....	13
2.4.4 Transkripční faktory klíčové pro diferenciaci kanálové buňky.....	15
2.4.5 CCM-3.....	17
2.5 Vylučovací kanálová buňka <i>C. elegans</i> jako model pro lidská onemocnění .....	17
2.5.1 Cystická onemocnění ledvin .....	17
3 Kotevní buňka .....	18
3.1 Buňky v oblasti vulvo-děložního spojení .....	18
3.1.1 Kotevní buňka (AC) .....	18
3.1.2 Další buňky vulvo-děložního spojení.....	20
3.2 Mechanismus invaze kotevní buňky.....	20
3.2.1 Průběh invaze .....	20
3.2.2 Porušení bazální membrány .....	21
3.2.3 Invadopodia .....	22
3.3 Faktory podporující torbu invazivní membrány .....	23
3.3.1 UNC-6 a UNC-40.....	23
3.3.2 Integriny INA-1 a PAT-3 .....	24
3.4 Proinvazivní transkripční faktory .....	25
3.4.1 FOS-1 .....	25
3.4.2 HLH-2, NHR-67 a EGL-43.....	26
3.5 Invaze kotevní buňky jako model pro lidská onemocnění .....	26

4	Další případy non-neuronálních buněk s orientovaným růstem .....	27
4.1	Růstové procesy v průběhu epidermální morfogeneze.....	28
4.2	Samčí ocas .....	28
4.3	Hlavová mezodermální buňka .....	29
4.4	Svalové výběžky.....	29
5	Závěr .....	30
	Použitá literatura .....	30

## Úvod

Buněčný růst je důležitým faktorem pro správný vývoj organismu. Zahrnuje dva hlavní mechanismy, samotný růst, kdy dochází k hromadění buněčné hmoty, a buněčnou proliferaci, kdy dochází k buněčnému dělení. Ačkoliv jsou tyto mechanismy vzájemně propojené, mohou fungovat i nezávisle na sobě. Například postmitotické neurony mohou růst, aniž by docházelo k jejich dělení, a oplozené vajíčko se dělí, aniž by docházelo k jeho růstu (Lloyd, 2013). Výsledná velikost buněk je určována jak rovnováhou mezi růstem a dělením buněk, tak intracelulární i extracelulární signalizací (Conlon *et al.*, 2001). Zatímco buňky různých typů se ve své velikosti mnohdy výrazně odlišují, buňky stejného typu mají tendenci udržovat si velikost konstantní. Mezi další mechanismy buněčného růstu je možné zahrnout také buněčnou migraci, diferenciaci a buněčnou smrt. (Carmona-Fontaine, Matthews a Mayor, 2008; Sivakumar a Kurpios, 2018). Tato práce se však těmito mechanismy nebude zabývat. Bude zaměřena převážně na orientovaný růst buněk, při kterém dochází ke změnám jejich tvaru.

V orientovaném růstu mají důležitou úlohu cytoskelet a regulátory cytoskeletální dynamiky, jejichž funkcí je regulovat navigaci cytoskeletu v rostoucí části buněk a koordinovat cytoskeletální přestavby. Tyto regulátory jsou spojené s aktinovými vlákny, mikrotubuly i s intermediálními filamenti. Asi nejlépe popsáním modelem pro orientovaný růst buněk je růst neuronálních výběžků. Probíhá ve třech stále se opakujících fázích, kdy nejprve dochází k protruzi, při které filopodia a lamelipodia bohatá na aktin začnou vyčnívat z rostoucího okraje buňky. Protruze je regulována pomocí chemotaxe. Chemoatraktant slouží k navádění polarizovaného růstového kužele, bohatého na F-aktinová vlákna a protruze je tak upřednostňována na té straně, na kterou chemoatraktant působí. Následuje invaze mikrotubulů a váčkový transport, směřovaný do rostoucího okraje buňky. Poslední fází je ustálení, kdy je rostoucí špička stabilizována pomocí depolymerace kortikálního aktinu a smrštěním plazmatické membrány kolem mikrotubulových vláken. V rámci stabilizační fáze dochází také k ustanovení obousměrného transportu (Goldberg a Burmeister, 1986; Dent a Gertler, 2003).

Orientovaný růst však není omezen jen na neuronální buňky. Ačkoliv je růst neuronů dobrým modelem pro orientovaný růst buněk, tato práce se bude zabývat mechanismem orientovaného růstu v non-neuronálních buňkách modelového organismu *Caenorhabditis elegans*. Výhodou studia orientovaného růstu v háďátku jsou podrobné znalosti o chování buněk v průběhu vývoje tohoto organismu a také možnost pozorovat růstové procesy uvnitř jedince v podmínkách, kdy je buňka obklopena svým přirozeným prostředím.

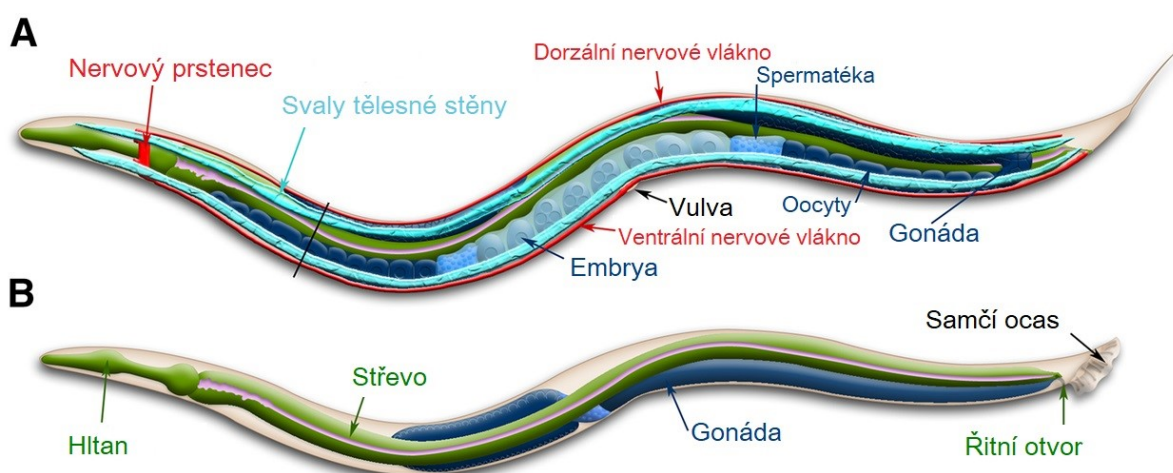
# 1 Modelový organismus *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* (Háďátka obecné) je modelovým organismem, využívaným zejména pro studium molekulární biologie, neurobiologie a vývojové biologie. Jedná se o volně žijící, nepatogenní hlístice, které se živí převážně bakteriemi. Mezi jejich přednosti patří malá velikost, krátký životní cyklus, snadná reprodukce a levná kultivace. V laboratorních podmínkách jsou kultivovány na agarových miskách s bakteriemi *Escherichia coli* při teplotě kolem 20 °C. V roli modelového organismu háďátka poprvé využil Sydney Brenner, který se zabýval mapováním mutantů *C. elegans* a výsledky své práce publikoval v roce 1974 (Brenner, 1974).

## 1.1 Anatomie

Jedinci *C. elegans* mají nesegmentované, bilaterálně souměrné, transparentní tělo a dospělci dosahují délky přibližně 1 milimetr. Nejčastěji se vyskytují jako hermafroditi, ojediněle se v populaci mohou objevit i samci.

Tělní stěna a trávicí soustava jsou odděleny tělní dutinou pseudocoelom, která je vyplněna tekutinou a slouží jako hydrostatická kostra. Vnější část těla je tvořena kutikulou, hypodermis, vylučovacím systémem, nervovými buňkami a svaly. Nervová soustava je tvořena nervovým prstencem, který je spojený s dorzálním a ventrálním nervovým vláknem. Vnitřní část tvoří hltan, střevo a gonády. Háďátka nemají dýchací a oběhový systém (Altun a Hall, 2006; viz Obr. 1).



Obrázek 1: Anatomie *C. elegans*, A-hermafrodit, B-samec, převzato:

(WormBook - [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_celegansintro/celegansintro\\_fig3.jpg](http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro_fig3.jpg)) a upraveno

## 1.2 Embryonální a postembryonální vývoj

Při optimálních podmínkách trvá životní cyklus *C. elegans* přibližně 3,5 dne. Během této doby dojde k vývoji embrya v dospělé. V průběhu embryonálního stádia dochází k regulovanému dělení buněk a vzniku buněčných linií, ze kterých poté vznikají jednotlivé orgány. Během postembryonálního stádia jedinec prochází vývojem přes larvální stádia L1-L4 až do reprodukce schopného dospělé.

*C. elegans* má tzv. mozaikový (determinační) vývoj. Má přesně definovaný počet buněk, kde každá buňka má předem danou trajektorii a umístění na konci vývoje. V první fázi buněčného dělení vzniká šest kmenových buněk, které se dále dělí a dají vzniknout budoucím orgánům. Buněčné linie jsou označovány jako AB, C, D, E, MS, P4 a G (Deppe *et al.*, 1978). V rámci časného embryonálního vývoje také dochází k oddělení pohlavní linie. Embryogeneze trvá přibližně 16 hodin a je ukončena ve stádiu 556 somatických a 2 primordiálních zárodečných buněk.

V průběhu postembryonálního vývoje dochází k dalšímu buněčnému dělení, migraci buněk a apoptóze. V průběhu L2 stádia také dochází k rozrůznění hermafroditů a samců, kteří doposud měli podobnou strukturu. Postembryonální vývoj je ukončen stádiem dospělé, který má 959 somatických buněk v případě hermafrodita a 1031 somatických buněk v případě samce (Sulston a Horvitz, 1977).

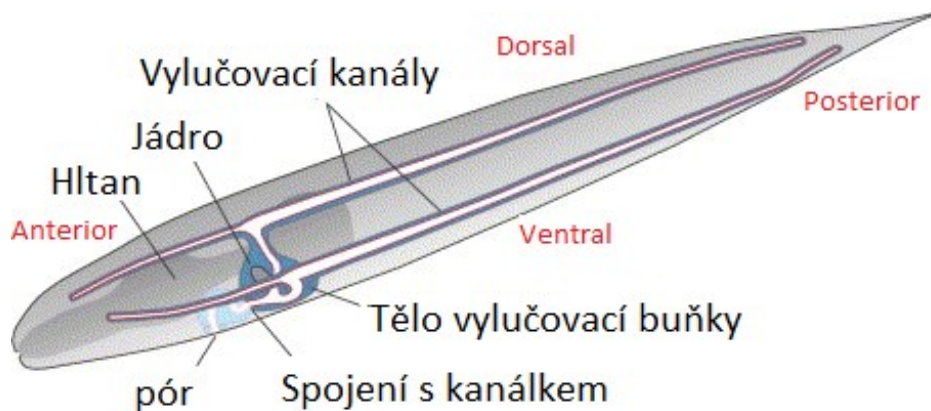
V průběhu vývoje může také dojít k pozastavení a vytvoření stádia dauer. Jedná se o stádium dormance, do kterého může přejít L2 larva. Ve stádiu dauer dochází k omezení příjmu potravy, pozastavení růstu a omezení pohybu v postembryonálním vývoji. Toto stádium je reverzibilní a je tvořeno na základě nepříznivých vnějších podmínek, jako je nedostatečné množství potravy v podobě bakterií, nebo výkyvy teploty mimo optimální hodnoty (15 – 25 °C) (Cassada a Russell, 1975).

## 2 Vylučovací kanálová buňka

První buňkou, jejíž vývoj a růst bude podrobněji popsán, je jedna z buněk vylučovací soustavy, takzvaná vylučovací kanálová buňka.

### 2.1 Vylučovací soustava *C. elegans*

Vylučovací soustava *C. elegans* je tvořena jemnou tubulární sítí, a mezi její hlavní funkce patří sekrece a osmoregulace. Jednotlivé tubuly jsou široké 1-2  $\mu\text{m}$  a dlouhé 100-1000  $\mu\text{m}$  (Nelson a Riddle, 1984; Lubarsky a Krasnow, 2003). Celý systém se skládá ze třech osmoregulačních buněk, dvou přidružených neuronů a vylučovací žlázy, která je tvořena dvoujaderným syncytiem. Jádra osmoregulačních buněk jsou lokalizována v oblasti hlavy jedince a buňky se nacházejí na ventrální straně hltanu a střeva, těsně za faryngeálně-intestinální chlopní. Mezi osmoregulační buňky se řadí pórová buňka, kanálek a vylučovací kanálová buňka. Jednotlivé osmoregulační buňky vznikají odlišným mechanismem (Sundaram a Buechner, 2016; viz Obr. 2).



Obrázek 2: Vylučovací soustava *C. elegans*, převzato: (Buechner, 2002) a upraveno

Pórová buňka je epidermální buňka, tvořící vyústění vylučovací soustavy na povrch zvířete, která spojuje kanálek s tělní kutikulou. Další osmoregulační buňkou vylučovací soustavy je kanálek, který tvoří spojení mezi pórovou buňkou a vylučovací kanálovou buňkou. Na úrovni spojení kanálku a kanálové vylučovací buňky se také nachází dvoujaderná žláza, vznikající srůstem dvou žláznových buněk do tvaru písmene A (Kenneth Nelson, Albert a Riddle, 1983).

Poslední osmoregulační buňkou je vylučovací kanálová buňka, jejímž vznikem se bude podrobně zabývat celá tato kapitola. Vylučovací buňka je spojena s kanálkem a pórem, čímž tvoří systém pro odvádění přebytečných tekutin z těla. Mezi její hlavní funkce tak patří sekrece

a osmoregulace (Sundaram a Buechner, 2016). Jedná se o největší mononukleární buňku háďátka ve tvaru písmene H, která je tvořena dvěma bežešvými tubuly na každé straně těla a spojnici nacházející se ventrálně v oblasti hltanu. Tato spojnice je tvořena tělem buňky, jehož součástí je i buněčné jádro. Dva páry vylučovacích kanálů se táhnou bilaterálně, anteriorně a posteriorně, lemují tak celé tělo jedince. Průměr jejich lumen není konstantní. Je nejširší u těla buňky, směrem ke koncům se zužuje a anteriorní kanály jsou kratší a užší než kanály posteriorní. Lumen kanálů je dále obklopen malými kanálky (takzvané kanalikuly), které zvětšují apikální povrch.

Buňka vzniká z buněčné linie AB už v průběhu embryogeneze a své plné délky dosáhne po 12 hodinách od vylíhnutí, v polovině L1 stádia, kdy sahá od anteriorního konce k posteriornímu konci zvířete na úroveň konečníku (Sulston *et al.*, 1983). V dalších vývojových stádiích už buňka roste společně s jedincem a zvětšuje se z 300  $\mu\text{m}$  v L1 stádiu na 1 mm ve stádiu dospělce (McShea *et al.*, 2013).

Na růstu vylučovacího kanálu se podílejí dva mechanismy – lumenogeneze a navádění rostoucí kanálové špičky. Zatímco lumenogeneze je neorientovaný proces, kdy lumen kanálu vzniká mechanismem vyhloubení endoteliálních buněk a následným splynutím váčků, prodlužování rostoucí špičky kanálu je orientované a vysoce regulované za pomoci signalizace. Takto vznikající tubuly jsou bežešvé a apikální a bazální povrch jsou od sebe zcela odděleny. Apikální povrch kanálu je exponovaný směrem do lumen, bazální povrch směrem k ostatním tkáním a povrchy se liší mimo jiné i v odlišné rychlosti růstu. Jediný šev, který je součástí této buňky se nachází v místě spojení buňky s kanálkem a vylučovací žlázovou buňkou (Sundaram a Buechner, 2016). Jako bežešvé tubuly se formují například i kapiláry v cévním systému obratlovců (Bär, Güldner a Wolff, 1984), terminální tracheální buňky u *Drosophila melanogaster* (Maruyama a Andrew, 2012) nebo pylové láčky u rostlin. Vznik a vývoj kanálové buňky poskytuje jednoduchý model pro tubulogenezi a regulaci průměru tubulů.

## 2.2 Osmoregulace

Kanálová buňka je důležitým osmoregulačním a sekrečním orgánem. Jedinec přijímá vodu nepřetržitě skrz kutikulu a podkoží. Přebytečná voda je pak shromažďována uvnitř kanálů vylučovací buňky a vnitřní hydrostatický tlak a osmolarita jsou regulovány rychlostí proudění vody v kanálech. Přebytečná voda poté proudí z kanálů do kanálku a prostřednictvím póru je vylučována z těla ven.

U stádia dauer byla navíc pozorována pulzace kanálů vylučovací buňky, což je přisuzováno zvýšené potřebě regulovat množství vody v těle v průběhu vývoje jedince. Zvýšená aktivita vylučovací buňky spolu se záškuby hltanových svalů a otevření střevního lumen jsou prvními známkami toho, že probíhá nastartování vývoje po klidovém stádiu. K další pulzaci kanálu může docházet také v L3 vývojovém stádiu a v případě změny tonicita média. Čím více hypotonické médium je, tím rychleji kanál pulzuje. Pulzace kanálů však byly pozorovány pouze u larválních stádií, u dospělců pulzace pozorována nebyla (Kenneth Nelson, Albert a Riddle, 1983; Ghosh a Sternberg, 2014).

## 2.3 Vývoj vylučovací kanálové buňky

### 2.3.1 Specifikace kanálové buňky – Notch signalizace

Pro vznik kanálové buňky je nezbytná signalizace zprostředkovaná signální dráhou Notch, která probíhá již v průběhu embryogeneze. U *C. elegans* se vyskytují dva transmembránové Notch receptory, GLP-1 a LIN-12, jejichž uvolňování je regulováno navázáním ligandu, kterým je v případě háďátka LAG-2. Při signalizaci tak jedna buňka exprimuje receptor, druhá ligand a při jejich spojení dojde ke spuštění série štěpení. Tímto štěpením je následně uvolněna intracelulární doména receptoru, která vstoupí do jádra buňky a aktivuje tam genovou expresi ve spojení s DNA-vazebným proteinem LAG-1 (Wilkinson, Fitzgerald a Greenwald, 1994; Artavanis-Tsakonas, Rand a Lake, 1999; Priess, 2005).

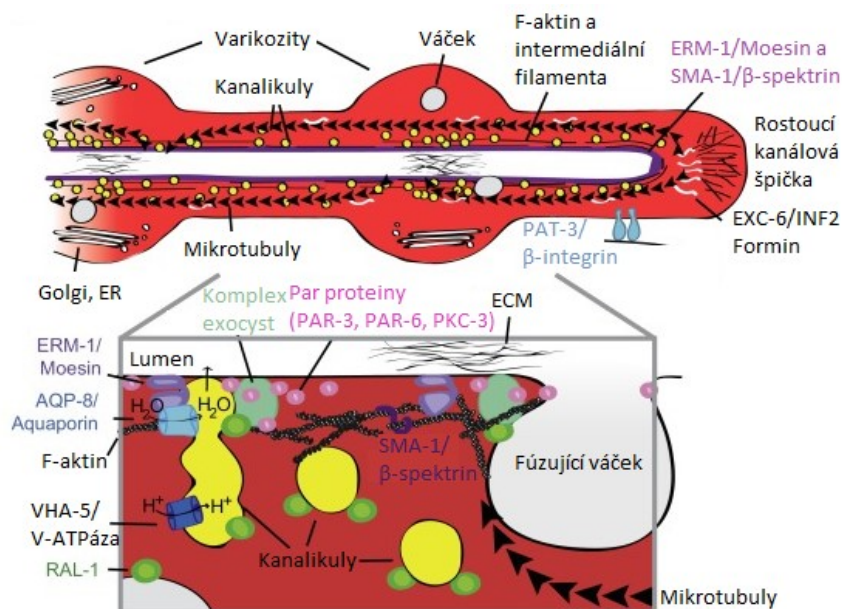
Notch signalizace působí v několika fázích. V první a druhé fázi dělení vznikají nejprve dvě buňky AB a P1, které se následně dělí. Buňka AB se dělí podél příčné osy a jedna z dceřiných buněk je vždy posunuta směrem anteriorně, značí se ABa a druhá dceřiná buňka je posunuta posteriorně a značí se ABp. Po sérii několika dalších dělení již Notch signalizace zajišťuje specifikaci vylučovací buňky, která je produkována jedním z potomků buňky AB, ABp1papp. Kanálová buňka je dále zdrojem ligandu LIN-3/EGF, který dále přispívá také k aktivaci Ras signální dráhy. Ras signalizace slouží ke specifikaci lokalizace buněk a určuje identitu tubulů a pórů. Notch i Ras signalizace tak fungují postupně při vývoji vylučovací soustavy *C. elegans* (Abdus-Saboor *et al.*, 2011). Vylučovací buňka chybí jak u dvojitých mutantů *glp-1* a *lin-12*, tak u mutantů *lag-2* nebo *lag-1*, jejichž funkce se překrývají (Sulston *et al.*, 1983; Priess, 2005).

## 2.3.2 Orientovaný růst kanálové buňky

Růst kanálové buňky je regulovaný proces, který je zajišťován dvěma hlavními mechanismy. Prvním z nich je tvorba lumen, která ačkoliv se podílí na elongaci kanálů, není sama o sobě výslovně orientovaným růstem, ale vzhledem k tomu, že k orientovanému růstu významně přispíván bude podrobněji popsána. Druhým mechanismem je prodlužování a navigace rostoucí špičky kanálu, která je orientovaná a dochází pomocí ní k navádění rostoucího kanálu správným směrem.

### 2.3.2.1 Navigace špičky kanálu

Orientovaný růst špičky kanálu je prvním z mechanismů podílejících se na komplexním vývoji kanálové buňky. Hlavní roli v prodlužování kanálu mají aktinová filamenta, akumulovaná ve špičce rostoucího kanálu, mezi bazální a apikální membránou. Shluk F-aktinových filament je orientován ve směru růstu špičky. Dále je v růstové špičce lokalizováno také mikrotubuly organizující centrum (MTOC), ze kterého mikrotubuly vyrůstají. Ty jsou naopak nasměrovány vůči tělu kanálové buňky a táhnou se bazolaterálně podél lumen (Shaye a Greenwald, 2015; Sundaram a Buechner, 2016; viz Obr. 3).



Obrázek 3: Struktura a organizace rostoucího kanálu vylučovací buňky. Apikální membrána rostoucího kanálu je hojně obklopena kanalikuárními váčky, obsahujícími V-ATPázu a aquaporin AQP-8, a cytoskeletálními elementy, které zahrnují aktinová filamenta, mikrotubuly i intermediální filamenta. Aktinový cytoskelet je mimo apikální membránu lokalizovaný také v rostoucí špičce kanálu, kde se výrazně podílí na orientovaném růstu. Zatímco mikrotubuly a aktinová filamenta jsou vzájemně propojena pomocí forminu EXC-6, funkcí ERM-1/moesinu a SMA-1/β-spektrinu je stabilizace aktinu na apikální membráně. převzato: (Sundaram a Cohen, 2017) a upraveno

Kanály vylučovací buňky musí být naváděny tak, aby vrůstaly mezi hypodermální buňky a bazální membránu, která odděluje hypodermis a tělní dutinu pseudocoelom. Spojení kanálové buňky s hypodermálními buňkami tak umožňuje správný růst kanálu, který je právě hypodermálními buňkami podporován. (Suzuki *et al.*, 2001). Ačkoliv jsou kanály po celý život spojeny s hypodermis, tyto spoje se stárnutím jedince slábnou. Ve stáří tak může dojít k oddělení špičky kanálu od podkoží, což vede ke zkrácení vylučovacího kanálu (Buechner, 2002).

Není známo mnoho extracelulárních naváděcích faktorů, které by určovaly směr růstu kanálu. Jako takový naváděcí faktor slouží například netrin UNC-6 a jeho receptor UNC-5, které řídí navigaci dorzálního růstu kanálů (Hedgecock *et al.*, 1987; Hedgecock, Culotti a Hall, 1990; Merz *et al.*, 2001). U jedinců nesoucích mutaci v genu *lin-17* kódujícím homologu receptoru Frizzled dochází k přerůstání kanálu do špičky ocasu, kam za normálních okolností nezasahuje (Hedgecock *et al.*, 1987). To naznačuje, že na navigaci kanálu by se mohla podílet i Wnt signální dráha, nicméně u žádného z Wnt mutantů dosud nebyl popsán fenotyp spojený s růstem kanálů. Pro navigaci jsou dále nezbytné složky extracelulární matrix, zejména lamininy EPI-1 a LAM-1 (Zhu *et al.*, 1999; Hutter *et al.*, 2000). Zastavení růstu kanálu bylo pozorováno také v případě mutace v integrinu PAT-3 (Hedgecock *et al.*, 1987), který složky extracelulární matrix rozpoznává.

### **2.3.2.2 Lumenogeneze**

Lumenogeneze je druhým z mechanismů, podílejících se na růstu vylučovací kanálové buňky. Nejprve dojde k iniciaci tvorby lumen, a následně k jeho expanzi jednak zvýšeným hydrostatickým tlakem, jednak kontinuálním vezikulárním transportem, kdy se váčky spojují s apikální membránou a tím lumen rozšiřují. (Khan *et al.*, 2013; Armenti, Chan a Nance, 2014).

Lumen kanálů vylučovací buňky vzniká pravděpodobně mechanismem vyhloubení (cell hollowing). Jedná se o proces, kdy buňka internalizuje svou plazmatickou membránu za vzniku vnitřních váček, které později splynou a vytvoří intracelulární, apikální doménu tubulu. Při vzniku lumen dochází ke splývání jak endocytických váček, které jsou odvozené z plazmatické membrány, tak exocytických váček, odvozených z Golgi (Kamei *et al.*, 2006; Sundaram a Cohen, 2017). Tento mechanismus vyhloubení funguje jak na úrovni jedné buňky, kdy dochází ke vzniku vylučovací kanálové buňky, tak může překlenovat i více spojených buněk, jako například při vzniku mnohobuněčných cév obratlovců (Jewett a Prekeris, 2018).

Před dalším růstem lumen vylučovacího kanálu musí nejprve dojít k ustanovení apikálně-bazální polarity, kdy se apikální strana kanálu nachází uvnitř buňky. Polarita je ustanovena za pomoci intracelulárního vezikulárního transportu a apikální membrána je tak nasměrována správným směrem pro růst lumen. K narůstání lumen do délky a šířky dochází postupným splýváním váčků s apikálním povrchem (Gervais a Casanova, 2010).

Není zcela zřejmé, odkud přesně pocházejí váčky, které zahajují tvorbu lumen. Někteří autoři předpokládají, že by se mohlo jednat o váčky vzniklé pinocytózou (Berry *et al.*, 2003). Jakmile je však základ lumen vytvořen, pokračuje lumenogeneze tubulů tak, že specializované váčky na apikálním povrchu zfúzí za pomoci proteinů PAR a komplexu exocyst (Armenti, Chan a Nance, 2014). Exocyst je proteinový komplex složený z osmi podjednotek (EXOC1-8) a jeho funkcí je zacílení sekrečních váčků na plazmatickou membránu před fúzí, která je zprostředkována V-SNARE a T-SNARE proteiny (Waters a Hughson, 2000; Liu a Guo, 2012; Wu a Guo, 2015). Aktivátorem komplexu exocyst je GTPáza RAL-1, která je lokalizována v exocytických váčkách a řídí tak apikální fúzi váčků potřebných pro tvorbu lumen. RAL-1 se tak podílí jak na fúzi váčků s plazmatickou membránou, tak na jejich tvorbě (Hyenne *et al.*, 2015). Ztrátou RAL-1 nebo ztrátou komplexu exocyst je růst lumen inhibován a k jeho vývoji nedochází. Dále jsou RAL-1 a komplex exocyst nezbytné i pro správný vývoj larev a pro osmoregulaci. Komplex exocyst je uvnitř vylučovacího kanálu a dalších polarizovaných buněk lokalizován společně s proteiny PAR (PAR-3, PAR-6 a PKC), které zprostředkovávají samotnou polarizaci. Protein RAL-1 tak rekrutuje komplex exocyst do membrány, zatímco proteiny PAR směřují membránově lokalizované proteiny komplexu exocyst do polarizované domény (Armenti, Chan a Nance, 2014).

Mezi další faktory podílející se na vzniku a rozšiřování lumen se řadí endozomální transport a lumenální tok. Endozomální transport je zajišťován pomocí endozomálních váčků. V lumenogenezi vylučovacích kanálů funguje několik populací endozomů – endozomy obsahující GTPázy RAB-5, RAB-7 nebo RAB-11. Pokud je exprese GTPáz narušena RNA interferencí, lumenogeneze a expanze lumen jsou inhibovány (Khan *et al.*, 2019). RAB-5 značí časně endozomy, RAB-7 pozdní endozomy a RAB-11 recyklační endozomy (Chavrier *et al.*, 1990; Mattingly a Buechner, 2011). Dalším důležitým faktorem je lumenální tok, který podporuje expanzi lumenální membrány. Aktin-vázající protein ERM-1 přechodně přitahuje k membráně váčky obsahující aquaporin AQP-8. Ačkoliv genom *C. elegans* kóduje jedenáct různých aquaporinů (AQP 1-11), ve vylučovacím systému háďátka byla detekována pouze exprese AQP-8 (Mah *et al.*, 2007). Po vložení AQP-8 do apikální membrány dojde k toku vody

do lumen, čímž se zvýší hydrostatický tlak a je podporováno roztažení lumen (Khan *et al.*, 2013). Zatímco dodávání lumenální membrány je zajišťováno endozomálními váčky, translumenální tok je zajišťován váčky kanalikulů, které obsahují AQP-8. Oba tyto procesy jsou závislé na ERM-1 (Khan *et al.*, 2019). Jakmile jsou kanály vytvořeny, do prodlužování je zapojena i řada dalších transportních proteinů.

### **2.3.2.3 Koordinace apikálního a bazálního růstu**

Jelikož apikální a bazální membrána vylučovací kanálové buňky jsou oddělené, je oddělený i jejich růst. Nejprve dochází k růstu vnější (bazální) membrány, který je analogický růstu axonálního kuželu, a až později dochází vlivem osmoregulační aktivity a vezikulárního transportu i k rozšiřování lumenální (apikální) membrány. Jelikož růst špičky kanálu předchází růstu lumen, vyrůstající kanál zpočátku lumen postrádá a bazolaterální povrch „předbíhá“ o několik mikrometrů povrch apikální. Jakmile však dojde k vytvoření bazální a apikální povrchové membrány, prodlužují se již společně i přesto, že nemají žádnou laterální membránu, která by je spojovala (Gervais a Casanova, 2010; Kolotuev *et al.*, 2013).

Hlavním faktorem zajišťujícím koordinaci růstu apikální a bazální membrány je EXC-5, protein z rodiny FGD Rho GEF faktorů, jehož funkcí je zajistit správné umístění cytoskeletálních elementů a vyrovnávat tak růst cytoskeletu na obou površích. EXC-5 působí v signální dráze s faktorem CDC-42, kdy při vysoké aktivitě EXC-5 dochází k aktivaci CDC-42, což vede ke stimulaci růstu apikální membrány. Pokud je aktivita EXC-5 nízká, dochází k inhibici CDC-42 a ke stimulaci růstu bazální membrány (Suzuki *et al.*, 2001; Buechner, 2002; Mattingly a Buechner, 2011).

Dalším faktorem podílejícím se na koordinaci růstu apikální a bazální membrány na špičce kanálu je formin EXC-6. Ten společně s cytoskeletálními vlákny slouží k propojení apikální a bazální membrány. Mezi jeho hlavní funkce patří nukleace bazolaterálně lokalizovaných mikrotubulů a akumulace F-aktinu na rostoucí špičce kanálu, kde aktin pomáhá vytlačovat bazální membránu vpřed. Mutanti v genu *exc-6* vykazují jedinečný fenotyp zkrácených kanálů, které obsahují více souvislých lumen normálního průměru (Buechner *et al.*, 1999; Shaye a Greenwald, 2015).

### 2.3.3 Cytoskelet a jeho role v růstu vylučovacích kanálů

Klíčovou rolí při orientovaném růstu vylučovací kanálové buňky hraje cytoskelet, který se podílí jak na prodlužování a navigaci buněčných kanálů, tak na vzniku a stabilizaci struktury lumen. Je také určujícím faktorem tvaru a průměru vylučovací buňky.

Cytoskeletálními elementy podílejícími se na prodlužování rostoucí špičky jsou aktinová filamenta, akumulovaná v rostoucí špičce a mikrotubuly lokalizované podél lumen vylučovací buňky. Aktinová filamenta ve špičce rostoucích kanálů působí pomocí mechanismu opakované polymerace a depolymerace aktinu, při které dochází k vytlačování růstové špičky kanálu a tím pádem k jeho růstu (Sundaram a Buechner, 2016).

Na vzniku lumen kanálové buňky spolupracují již všechny tři složky cytoskeletu. Pro samotné zahájení tvorby lumen je potřeba perilumenální aktin ACT-5. Pro jeho prodlužování je vyžadována role mikrotubulů tvořených  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinem, a role proteinů intermediálních filament IFC-2, IFA-4 a IFB-1. Každá z těchto tří složek cytoskeletu má svojí funkci a společně spolupracují na tvorbě a následném prodlužování lumen (Khan *et al.*, 2019). Aktinová filamenta a mikrotubuly přivádějí endozomální a kanalikulární váčky do lumen, kde je jejich fúze v případě endozomů a dokování v případě kanalikulárních váček prostorově regulována intermediálními filamenty (Schottenfeld-Roames a Ghabrial, 2012; Khan *et al.*, 2019). V kanálové buňce jsou exprimovány tři proteiny intermediálních filament, IFC-2, IFA-4 a IFB-1. Jsou exprimovány na apikální straně kanálů a poskytují buňce mechanickou oporu. Mutace v genech *ifc-2*, *ifa-4* a *ifb-1* mohou vyvolat fenotyp zkrácených vylučovacích kanálů s cystami naplněnými tekutinou a částečnou ztrátou aktinu v apikální části kanálu (Al-Hashimi *et al.*, 2018).

S funkcí cytoskeletu jsou spojeny také faktory zprostředkávající přenos informace z receptorů zachycujících naváděcí molekuly právě na cytoskeletální vlákna. Tyto regulátory jsou spojené s aktinovými vlákny, mikrotubuly i s intermediálními filamenty. Takovým regulátorem je u *C. elegans* například UNC-53, který slouží k přichycení polymerujících mikrotubulů a aktinových filament v rostoucí oblasti buňky, čímž podporuje stabilizaci buněčného růstu převážně v anterior-posteriorním směru. UNC-53 také propojuje UNC-5 a UNC-40, což jsou receptory pro netrin UNC-6, s intracelulárním cytoskeletem. Narušení exprese *unc-53* vede k narušení anterior-posteriorního růstu v buňkách, ve kterých je gen exprimován, včetně vylučovacích kanálů. Naopak nadměrná exprese *unc-53* vede k přehnanému růstu buněk. UNC-53 má také své obratlovčí homology, neuronální navigátory

NAV-1, NAV-2 a NAV-3, které řídí extenze růstových kuželů neuronů (Stringham *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2009; Stringham a Schmidt, 2009).

## 2.4 Faktory důležité pro vývoj vylučovací kanálové buňky

### 2.4.1 Vakuolární ATPáza

Vakuolární ATPáza je protonová pumpa, důležitá pro řadu buněčných funkcí, jako je transportu iontů, acidifikace váčků a organel, nebo vezikulární transport, kde se přímo účastní fúze váčků. V-ATPáza se nachází prakticky v každé eukaryotické buňce, a i přesto že se nazývá vakuolární, vyskytuje se v mnoha intracelulárních membránách, jako jsou lysozomy, endozomy, Golgiho váčky, sekreční váčky, synaptické váčky, klatrinové váčky, nebo plazmatická membrána. Pokud je pumpa lokalizována v endozomálních membránách, protony jsou transportovány do váčků a vakuol, pokud je lokalizována na plazmatické membráně, protony jsou transportovány do extracelulární tekutiny (Beyenbach a Wiczorek, 2006; Hahn-Windgassen a Van Gilst, 2009).

Podjednotky V-ATPázy jsou také důležité pro vývoj vylučovací kanálové buňky. Podjednotky V-ATPázy jsou kódovány geny *vha*, které mohou být u háďátka vysoce exprimovány ve vylučovací kanálové buňce, ztráta exprese podjednotek VHA-5, VHA-8 nebo VHA-12 vede ke vzniku silně rozšířených kanálů (Hahn-Windgassen a Van Gilst, 2009). Předpokládá se, že podjednotky V-ATPázy by se mohly podílet na regulaci splývání váčků s apikální membránou a tím ovlivňovat formování lumen (Sundaram a Buechner, 2016).

### 2.4.2 ERM-1

Proteiny z rodiny ERM (ezrin-radixin-moesin) jsou proteiny schopné propojovat membránu a cytoskelet (Fehon, Mcclatchey a Bretscher, 2010). U *C. elegans* je exprimován pouze jeden ERM protein, a to ERM-1, který je lokalizován pod povrchem většiny polarizovaných tkání, včetně vylučovací buňky. Jeho hlavní funkcí je rekrutovat aktin membráně směřující do lumen a podpořit tak expanzi lumenální membrány, zvětšení lumen a s tím spojené prodlužování kanálů vylučovací buňky. Ztráta *erm-1* způsobuje vážné cystické defekty ve vylučovacích kanálech (Göbel *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2019). Pro aktivaci ERM proteinů je potřeba konformační změna z neaktivní cytoplazmatické formy na aktivní formu vázající aktin a membránu, kdy je protein N-koncovou doménou připojen k buněčné membráně a C-koncovou doménou k aktinu (Sato *et al.*, 1992; Bretscher, Edwards a Fehon, 2002; Ramalho

*et al.*, 2020). Přechod do otevřené aktivní konformace zahrnuje navázání na membránový lipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PI(4,5)P<sub>2</sub>) a fosforylaci threoninového zbytku na C-konci (Simons *et al.*, 1998).

### 2.4.3 EXC proteiny

Velkou skupinu faktorů ovlivňujících vývoj a růst vylučovací buňky tvoří proteiny kódované *exc* geny, které byly identifikovány právě na základě defektů v morfologii vylučovací buňky (Exc fenotyp) (Buechner *et al.*, 1999). U *exc* mutantů dochází nejčastěji k tomu, že kanály vylučovací buňky jsou značně zkrácené a obsahují různě veliké cysty naplněné tekutinou. Cysty se mohou vyskytovat pouze v určitých částech, nebo po celé délce kanálu.

Bylo identifikováno osmnáct genů, které mají vliv na růst a průměr kanálu a jejichž mutací dojde ke vzniku zmíněného cystického fenotypu. V této kapitole však bude podrobněji popsáno pouze několik z nich (Buechner *et al.*, 1999; Al-Hashimi *et al.*, 2019).

#### 2.4.3.1 EXC-7

Gen *exc-7* kóduje protein EXC-7, jehož nejbližším homologem je protein ELAV u *Drosophila melanogaster* (Fujita *et al.*, 2003). Hraje důležitou funkci při regulaci vývoje kanálů vylučovací buňky tím, že reguluje schopnost βH-spektrinu, kódovaného genem *sma-1*, tvořit dlouhé vylučovací kanály během postembryonálního růstu. SMA-1 je součástí apikálního cytoskeletu a EXC-7 se váže na jeho 3' UTR konec mRNA, čímž ovlivňuje jeho expresi (McKeown, Praitis a Austin, 1998; Fujita *et al.*, 2003). βH-spektrin je tak dalším z důležitých faktorů ovlivňujících vývoj lumen. Mutanti v tomto genu vykazují fenotyp neuspořádané terminální cytoskeletální sítě, mají kanály zkrácené přibližně na polovinu a obsahují malé cysty po celé délce kanálu, které se objeví až v době líhnutí (Yang *et al.*, 2020).

#### 2.4.3.2 EXC-2

Gen *exc-2* kóduje protein intermediálních filamentů IFC-2, exprimovaný na apikální straně kanálů vylučovací buňky. Protein IFC-2 se na apikální membráně vyskytuje společně s dalšími proteiny intermediálních filamentů IFB-1 a IFB-4, a ačkoliv IFC-2 a IFA-4 vzájemně interagují, lokalizace IFC-2 je na ostatních dvou proteinech nezávislá. Mutanti v genu *exc-2* mají kanály vylučovací buňky zkrácené na méně než polovinu a vykazují silně cystický fenotyp po celé délce kanálů. Dále v kanálech dochází k výraznému ztenčení, případně i ztrátě apikální membrány kanálu bohaté na aktin (Hüsken *et al.*, 2008; Al-Hashimi *et al.*, 2018).

### 2.4.3.3 EXC-5

Gen *exc-5* kóduje protein EXC-5 homologní s guaninovým nukleotidovým výměnným faktorem (GEF), který geneticky interaguje s genem *cdc-42* kódujícím GTPázu rodiny Rho (Mattingly a Buechner, 2011). EXC-5 tak řídí vývoj vylučovacího kanálu regulací aktivity Rho GTPázy. Prostřednictvím CDC-42 ovlivňuje EXC-5 aktivitu forminů INFT-2 a CYK-1 na apikální straně membrány kanálu (Shaye a Greenwald, 2016) a zároveň má také vliv na recyklaci endozomálních váčků pocházejících z apikální membrány (Mattingly a Buechner, 2011). INFT-2 ale ovlivňuje i aktivitu aktinu v růstové špičce kanálu, EXC-5 a CDC-42 tak současně ovlivňují jak růst membrány lumen, tak růstové špičky (Shaye a Greenwald, 2016). V případě mutace v genu *exc-5* dojde opět k vytvoření cystického fenotypu a v tomto případě jsou veliké tekutinou naplněné cysty tvořené převážně na rostoucích špičkách kanálů (Suzuki *et al.*, 2001; Buechner, 2002).

### 2.4.3.4 EXC-9

Gen *exc-9* kóduje protein EXC-9 homologní s lidským proteinem CRIP1 (cystein-rich protein 1), jehož biochemická funkce je zatím nejasná (Grussendorf *et al.*, 2016). EXC-9 lokalizuje na apikální povrch kanálů vylučovací buňky a je potřeba pro jejich správný vývoj a udržení tvaru. EXC-9 je na apikální membráně lokalizovaný pomocí proteinu intermediálních filament IFC-2. (Al-Hashimi *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). Pokud dojde k mutaci v genu *exc-9*, mutanti vykazují fenotyp zkrácených kanálů se středně velkými cystami naplněnými tekutinou na distálních koncích lumen (Yang *et al.*, 2020). Tvar kanálové buňky je ovlivněn i nadměrnou expresí EXC-9, kdy vznikají podobné fenotypy, jako při nadměrné expresi EXC-5. Kanály jsou normálně polarizovány a vytvářejí lumen z apikálního povrchu, ale struktura bazolaterálního povrchu nezbytného pro prodlužování kanálů není zachována (Tong a Buechner, 2008).

### 2.4.3.5 EXC-1

Gen *exc-1* kóduje protein EXC-1 homologní s proteiny IRG rodiny, které hrají důležitou roli v autofagii a imunitní odpovědi (Yang *et al.*, 2020). Nachází se opět na apikálním povrchu kanálů vylučovací buňky. EXC-1 je jakýmsi prostředníkem mezi EXC-9 a EXC-5, jelikož působí upstream od EXC-5 a downstream od EXC-9, přičemž se váže na jeho N-koncovou doménu. Funkce EXC-1, EXC-9 a EXC-5 jsou tak vzájemně provázány a působí postupně při regulaci transportu endozomů v kanálech vylučovací buňky. EXC-1 a EXC-9 pak podporují

apikální transport zprostředkovaný RAB proteiny (Grussendorf *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2020). Mutanti v tomto genu opět vykazují cystický fenotyp, který vzniká tím, že se akumulují časné endozomy, chybí recyklační endozomy a kanály mají abnormální apikální cytoskeletální strukturu (Grussendorf *et al.*, 2016).

#### **2.4.3.6 EXC-4**

Gen *exc-4* kóduje protein EXC-4, který je vyžadován jak pro tvorbu lumen vylučovacího kanálu, tak pro udržování jeho architektury. EXC-4 kóduje homolog z rodiny proteinů CLIC, proteinů chloridového intracelulárního kanálu. Je exprimován v kanálové buňce i po ukončení růstu a vývoje, po celý život jedince. Mutace v tomto genu opět vyvolá fenotyp cystických kanálů (Berry *et al.*, 2003).

Kromě EXC-4 je homologem proteinů CLIC také protein EXL-1, který sice není exprimován v buňce vylučovacího kanálu, ale v případě ztráty funkce *exc-4* je schopen jeho funkci při vývoji kanálové buňky nahradit. Protein EXL-1 nese neklasický jaderný lokalizační signál, který u EXC-4 chybí (Liang *et al.*, 2017).

#### **2.4.3.7 EXC-6**

Gen *exc-6* kóduje protein EXC-6, jehož hlavní funkcí při vývoji kanálů je regulovat aktinový a mikrotubulární cytoskelet. Je ortologem forminu INF2 u obratlovců. EXC-6 tak reguluje akumulaci F-aktinu na špičkách rostoucích tubulů a dynamiku bazolaterálně lokalizovaných mikrotubulů (Shaye a Greenwald, 2015). Při mutacích v tomto genu mají kanály normální průměr, ale lumen se často rozděluje do více menších kanálků, které se později buď spojí, nebo nechají slepé zakončení. Délka kanálů je v případě mutace v tomto genu různorodá (Buechner *et al.*, 1999).

### **2.4.4 Transkripční faktory klíčové pro diferenciaci kanálové buňky**

Defekty v růstu a organizaci kanálů vylučovací buňky lze často pozorovat i u mutantů v genech kódujících transkripční faktory. Ty sice přímo nezajišťují samotný růst kanálů, ale jejich aktivita je nezbytná k expresi proteinů, které se na regulaci růstu fyzicky podílejí.

#### **2.4.4.1 CEH-6**

Prvním transkripčním faktorem je CEH-6 z rodiny faktorů obsahujících POU doménu, který je exprimován ve vylučovací buňce *C. elegans*, ale také v neuronálních buňkách a podskupině

buněk zadní části střeva. U mutantů *ceh-6* byly pozorovány defekty vylučovací buňky i zadní části střeva a u delece lokusu *ceh-6* dochází v 80 % případů k embryonální letalitě (Bürglin a Ruvkun, 2001; Armstrong a Chamberlin, 2010).

Tento transkripční faktor cílí na geny kódující kanály a transportéry a jedním z těchto genů je i *aqp-8*. AQP-8 kóduje jediný aquaporin exprimovaný ve vylučovací buňce hád'átka, který se podílí na udržování vodní rovnováhy a svojí funkci má i při růstu vylučovací buňky. {Formatting Citation}.

#### **2.4.4.2 PROS-1**

Dalším transkripčním faktorem je PROS-1, homolog savčího faktoru Prox-1, dříve nazývaný CEH-26, který je nezbytný pro tvorbu kanálů vylučovací buňky. PROS-1 cílí na několik genů, které zprostředkovávají extenzi lumen vylučovacího kanálu, jako jsou například IFB-1 kódující intermediální filamenty, guaninnukleotidový výměnný faktor EXC-5, aquaporinový gen *aqp-8*, nebo osmoregulační kináza GCK-3. V případě mutace PROS-1 dojde k selhání růstu kanálových buněk a lumen (Kolotuev *et al.*, 2013).

#### **2.4.4.3 LIN-26**

LIN-26 je transkripčním faktorem, který pravděpodobně nemá savčí homolog. Je složen z dvou motivů zinkového prstu a může kódovat buď transkripční aktivátor, nebo transkripční represor. Pokud gen *lin-26* kóduje transkripční represor, cílí na geny specifikující osud neuronálních buněk. V případě, že gen *lin-26* kóduje transkripční aktivátor, jeho cílem jsou geny, které specifikují osud hypodermálních buněk, které zahrnují vnější epitel, konečník a vylučovací systém. LIN-26 je tak důležitý pro diferenciaci a udržování epitelu a mutace tak vedou k epidermální degeneraci a defektům v kanálech vylučovací buňky, což je pro jedince letální (Labouesse, Sookhareea a Horvitz, 1994).

#### **2.4.4.4 NHR-31**

Čtvrtým transkripčním faktorem důležitým pro diferenciaci kanálové buňky je NHR-31. Jedná se o jaderný receptor *C. elegans* homologní se savčím faktorem HNF4, který je vyžadován pro expresi genů *vha*, které kódují vakuolární ATPázu. Dále je tento transkripční faktor také nezbytný pro koordinovaný růst apikální a bazální membrány kanálu, odolnost vůči osmotickému stresu a normální vývoj vylučovacích buněk (Hahn-Windgassen a Van Gilst,

2009). V případě mutace NHR-31 dochází k nekontrolovanému růstu kanálů a narušení osmoregulačních funkcí (Hahn-Windgassen a Van Gilst, 2009).

### **2.4.5 CCM-3**

Dalším z genů, které regulují vývoj tubulů u *C. elegans* je také gen *ccm-3*, který má klíčovou roli při rozšiřování a udržování struktury kanálů vylučovací buňky. Je lokalizován na apikální membráně spolu s GCK-1 a STRIPAK a podporuje endocytickou recyklaci RAB-11, pomocí CDC-42 vazebné kinázy MRCK-1, která interaguje právě s GCK-1 a STRIPAK (Lant *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2017). Pokud dojde ke ztrátě funkce genu *ccm-3*, vznikne cystický fenotyp s výrazně zkrácenými kanály a jedinec je sterilní (Lant *et al.*, 2018).

## **2.5 Vylučovací kanálová buňka *C. elegans* jako model pro lidská onemocnění**

Vývoj vylučovací kanálové buňky *C. elegans* je dobrým modelem pro řadu lidských onemocnění, jejichž základem jsou abnormality biologických tubulů. Při srovnání lidského genomu s genomem háďátka bylo také potvrzeno, že pro 60-80% lidských genů je možné najít homolog i v háďátku (Ganner a Neumann-Haefelin, 2017). Mezi takové nemoci patří například polycystické onemocnění ledvin, kardiovaskulární onemocnění, cerebrální kavernózní malformace Charcot-Marie-Tooth neuropatie a některé další (Lubarsky a Krasnow, 2003; Sundaram a Buechner, 2016).

### **2.5.1 Cystická onemocnění ledvin**

Četné cysty v renální oblasti jsou pozorovány u řady lidských chorob, jako je autozomálně dominantní polycystické onemocnění ledvin (ADPKD), nefronotóza, Meckel-Gruberův syndrom a Bardet-Biedlův syndrom.

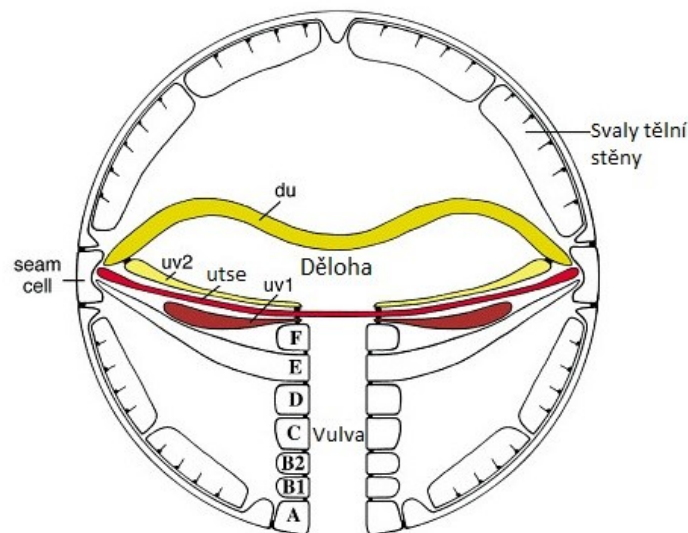
ADPKDA je nejčastějším cystickým onemocněním ledvin, patří mezi nejčastější lidské monogenetické poruchy a postihuje přibližně 1 z 1000 jedinců. V průběhu onemocnění se pomalu vyvíjejí cysty naplněné tekutinou, které vznikají podél proximálních a distálních tubulů sběrných kanálků v obou ledvinách, což vede až k terminálnímu onemocnění ledvin vedoucímu k selhání. S tímto onemocněním souvisejí geny, které kódují polycystin-1 a 2. K poruchám v PDK-1 dochází v 85% případů a PDK-2 v 15% případů (Lubarsky a Krasnow, 2003; Ganner a Neumann-Haefelin, 2017)

### 3 Kotevní buňka

#### 3.1 Buňky v oblasti vulvo-děložního spojení

Vulva *C. elegans* je ektodermální orgán, tvořený sedmi soustřednými toroidy označenými A-F. Na dorzálním konci je spojena s ventrálním koncem dělohy pomocí buňky děložního švu a propojuje tak dělohu s vnějším prostředím.

Děloha je mesodermálním orgánem a je odvozena z několika buněčných linií. Nacházejí se v ní toroidní buňky, tvořící vnitřní epitel dělohy, vulvové buňky, spojující dělohu s vulvou a dorzální děložní buňky, které tvoří dorzální část dělohy (Ghosh a Sternberg, 2014; viz Obr. 4). Vulva a děloha jsou hlavním aparátem pro kladení vajíček, páření a ukládání embryí po vnitřním oplození.



Obrázek 4: Vulvo-děložní spojení *C. elegans* je tvořeno buňkou děložního švu (utse) a vulválními buňkami (uv1 a uv2). Vulva je složena ze sedmi děložních toroidů (A-F) a děloha je vystlaná děložními buňkami (du), které tvoří dorzální část dělohy.

převzato: (Hubbard a Greenstein, 2000) a upraveno

##### 3.1.1 Kotevní buňka (AC)

Kotevní buňka *C. elegans* je specializovanou děložní buňkou, spojující vulvální a děložní tkáň, jejíž signalizace je nezbytná pro správný vývoj vulvy a ventrální dělohy (Sternberg a Horvitz, 1986).

Je specifikována už v průběhu L2 vývojového stádia, kdy se o volbě osudu kotevní buňky rozhoduje mezi dvěma ekvivalentními somatickými buňkami gonády. Z jedné buňky se stane ventrální prekurzorová buňka a z druhé buňka kotevní. Obě tyto buňky mají zpočátku stejnou

šanci stát se kotevní nebo ventrální prekurzorovou buňkou. Rozhodnutí je zprostředkováno za pomoci Notch signalizační dráhy, ve které LIN-12/Notch funguje jako receptor pro LAG-2/Delta. Obě tyto molekuly jsou nejprve produkovány v obou buňkách. Později však díky fluktuacím v expresi dojde k rozrůznění a omezení exprese *lin-12* pouze na předpokládanou vulvální prekurzorovou buňku a exprese *lag-2* na předpokládanou kotevní buňku (Kimble a Hirsh, 1979; Newman, White a Sternberg, 1995; Newman, White a Sternberg, 1996). Specifikaci dále pomáhá také exprese transkripčních faktorů *hlh-2*, *egl-43* a jaderného receptoru *nhr-67* (Schindler a Sherwood, 2011; Lattmann, Deng a Hajnal, 2020).

Kotevní buňka má hned několik funkcí. Exprimuje protein LIN-3/EGF, který působí prostřednictvím receptoru LET-23/EGFR a následně LET-60/Ras. Receptory jsou lokalizované ve vulválních prekurzorových buňkách a při spuštění signální kaskády dojde k indukci tří ze šesti vulválních prekurzorových buněk k vulválnímu osudu. Hladina LIN-3 musí být přesně regulována, protože při nadbytku dochází k nadměrnému vývoji vulválních tkání a při nedostatku vulvální prekurzorové buňky selhávají v přijímání vulválních osudů (Hill a Sternberg, 1992).

Dalším signálem produkovaným kotevní buňkou je LAG-2, který je přijímán receptory LIN-12 lokalizovanými na sousedních děložních buňkách. Tato signální kaskáda přiměje sousední děložní buňky k přijetí osudu  $\pi$ . Osm z těchto dvanácti  $\pi$  buněk později splývá za vzniku buňky děložního švu, která následně splývá s kotevní buňkou za vzniku devítijaderného syncytia (Newman, White a Sternberg, 1996; Medwig-Kinney *et al.*, 2020). Kotevní buňka a transkripční faktory exprimované v jejím jádře jsou tak nezbytné i pro vývoj buňky děložního švu (Ghosh a Sternberg, 2014).

Kotevní buňka hraje klíčovou roli při vývoji reprodukčního systému *C. elegans* a její hlavní funkcí je fyzické propojení vulvy a dělohy. To je zprostředkováno pomocí mechanismu buněčné invaze, kdy kotevní buňka indukuje rozpad bazální membrány oddělující obě tkáně a zahájí jejich propojení (Sherwood a Sternberg, 2003). Poté co kotevní buňka pronikne skrz bazální membránu, invaduje mezi centrální vulvální prekurzorové buňky vulF (Hagedorn a Sherwood, 2011). K vulvo-děložnímu propojení dochází v průběhu L3 vývojového stádia a je nezbytné pro pozdější procesy páření a kladení embryí (Sherwood a Plastino, 2018).

### 3.1.2 Další buňky vulvo-děložního spojení

Utse, neboli buňka děložního švu slouží k propojení dělohy s laterální tělní stěnou. Jedná se o syncytium ve tvaru H, které je tvořeno fúzí osmi děložních buněk a buňky kotevní. K fúzi dochází během raného larválního stádia L4, následuje migrace jader podél předozadní osy a růst fúzovaných buněk. Konečného tvaru buňka dosáhne až v letargickém L4 larválním stádiu (Ghosh a Sternberg, 2014). Dalšími buňkami vulvo-děložního spojení jsou vulvální pohlavní svaly. To jsou hladké svaly, jejichž hlavní funkcí je zajištění průchodu vajíček skrz dělohu a vulvu při kladení. Jsou tvořené dvěma typy vulválních svalových buněk (*vm1* a *vm2*), k jejichž vývoji a uspořádání dochází během L3 stádia vývoje (Wang *et al.*, 2020).

## 3.2 Mechanismus invaze kotevní buňky

Spojení dělohy a vulvy je iniciováno mechanismem buněčné invaze. Ta je stimulována především buňkami 1° vulvální linie, které generují difuzní signál podporující invazní chování a navádějí tak invadující výběžky kotevní buňky (Sherwood a Sternberg, 2003).

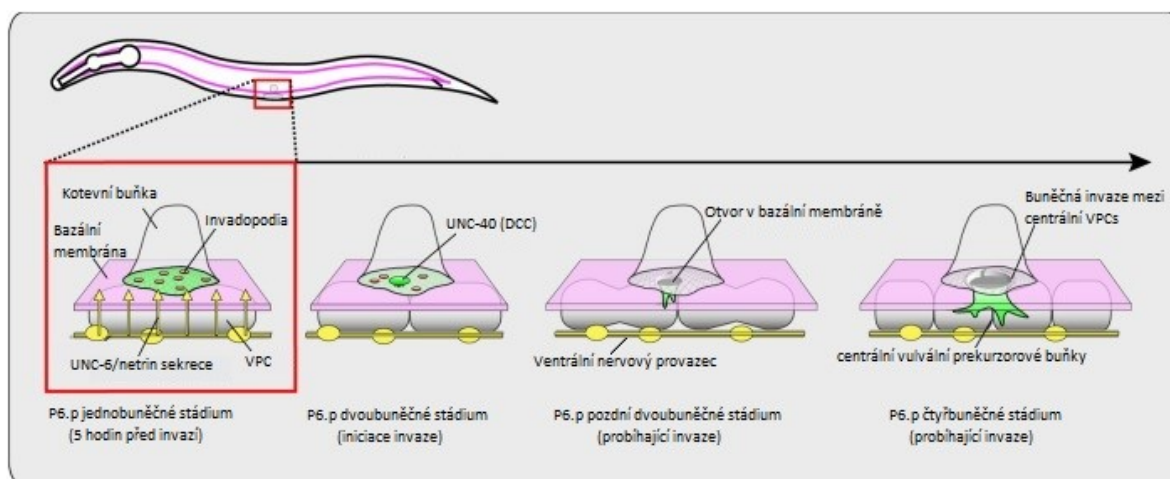
Při narušení mechanismu invaze dochází k narušení propojení vulvy a dělohy. Jedinci pak vykazují fenotypy vyčnívající vulvy – fenotyp Pvl a jsou defektní v kladení embryí – fenotyp Egl (Matus *et al.*, 2010).

### 3.2.1 Průběh invaze

V časném L3 larválním stádiu, přibližně 5 hodin před invazí, dochází k sekreci netrinu UNC-6 z ventrálního nervového provazce, který působí ve spojení s integrinem. Tato signalizace vede k vytvoření invazivní membrány na bázi F-aktinu na rozhraní kotevní buňky a bazální membrány.

Později, během středního L3 larválního stádia vylučují vulvální prekurzorové buňky difuzní signál. Tento signál navádí výrůstky invazivní membrány kotevní buňky, které narušují bazální membránu na spojení vulvy a dělohy.

V pozdním L3 larválním stádiu už dochází k vytvoření otvoru v bazální membráně, kterým kotevní buňka invaduje mezi centrální vulvální prekurzorové buňky, čímž je zahájeno spojení vulvální a děložní tkáně (Hagedorn a Sherwood, 2011; viz Obr. 5).



Obrázek 5: Mechanismus invaze kotevní buňky. K invazi kotevní buňky dochází během L3 larválního stádia. Před samotnou invazí, během jednobuněčného stádia P6.p, tvoří kotevní buňka polarizovanou invazivní membránu a invadopodia bohatá na F-aktin. Invadopodia během pozdního dvoubuněčného P6.p stádia naruší bazální membránu a za podpory netrinové signalizace vzniká invazivní výběžek, který postupně invaduje skrz bazální membránu.,  
převzato: (Morrissey, Hagedorn a Sherwood, 2013) a upraveno

### 3.2.2 Porušení bazální membrány

Většina tkání *C. elegans* je obalena bazální membránou a výjimkou nejsou ani vulvální a děložní buňky, které jsou tímto od sebe odděleny. Mezi hlavní složky bazální membrány patří laminin a kolagen typu IV (Jayadev a Sherwood, 2017; Sherwood a Plastino, 2018).

Pro porušení bazální membrány, proinvazivní genovou expresi a vytvoření invazivních výběžků je nezbytné zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Pokud by k tomuto zastavení nedošlo a cyklus by pokračoval dál, zabránilo by to invazi. Na tomto zastavení a následné expresi proinvazivních genů se podílejí transkripční faktory EGL-43, HLH-2 a NHR-67, jejichž další funkcí je například i specifikace kotevní a ventrální prekurzorové buňky v L2 vývojovém stádiu (Lattmann, Deng a Hajnal, 2020). Zastavení buněčného cyklu je také nezbytné pro správné působení histondeacetylázy HDA-1, která funguje jako regulátor buněčné diferenciace a po zastavení buněčného cyklu podporuje proinvazivní genovou expresi a tvorbu invadopodií (Matus *et al.*, 2015).

Další důležitou roli při porušení bazální membrány hrají matrixové metaloproteinázy (MMP). Jedná se o rodinu endopeptidáz závislých na zinku, které štěpí proteiny bazální membrány včetně lamininu, kolagenu a signálních proteinů (Nikolaou a Machesky, 2019). V genomu *C. elegans* se nachází šest takových MMP genů (*zmp-1-6*) (Altincicek *et al.*, 2010), z toho *zmp-1*, *zmp-3* a *zmp-6* jsou exprimovány přímo v kotevní buňce (Matus *et al.*, 2015; Kelley *et*

*al.*, 2019) a *zmp-4* a *zmp-5* v jejím blízkém okolí (Kelley *et al.*, 2019). Jsou lokalizovány v invadopodiích i v blízkosti invazivního výběžku kotevní buňky a jejich funkcí je usnadnění invaze pomocí enzymatické degradace bazální membrány. I přesto, že jsou MMP pro invazi kotevní buňky důležité, překvapivě nejsou nezbytné, neboť i při absenci všech pěti výše zmíněných metaloproteináz k porušení bazální membrány dojde. V nepřítomnosti MMP mění invazivní buňka svoji taktiku porušování bazální membrány a ke své invazi používá místo enzymatické síly sílu fyzickou. V nepřítomnosti MMP je tak invaze zajištěna za pomoci F-aktinového nukleátoru *Arp2/3*, který podporuje polymeraci F-aktinu na invazivní buněčné membráně, dojde ke vzniku invazivního výběžku a ten fyzicky roztrhne a vytlačí bazální membránu (Cáceres *et al.*, 2018; Kelley *et al.*, 2019). Proces pronikání skrz bazální membránu vyžaduje značné množství energie. Na to reagují také mitochondrie a to tím, že se lokalizují do míst porušení bazální membrány, kde poskytují lokalizovaný ATP podporující zvýšenou tvorbu F-aktinové sítě (Kelley *et al.*, 2019). Rovněž bylo popsáno, že dochází k orientovanému transportu transportérů glukózy a glykolytických enzymů k invazivní membráně, čímž je podpořena produkce ATP v místě tvorby invadopodií (Garde *et al.*, 2022).

### 3.2.3 Invadopodia

Invadopodia jsou dynamické výběžky plazmatické membrány o průměru přibližně 1,0  $\mu\text{m}$ . Jsou složené z F-aktinu, aktinových regulátorů, signálních proteinů a dynamicky transportovatelné invadopodiální membrány bohaté na PI(4,5)P<sub>2</sub>. Tvoří se podél invazivní buněčné membrány a řídí buněčnou invazi přes bazální membránu. Narušení bazální membrány pomocí invadopodií je kombinací enzymatické funkce metaloproteináz a mechanického porušení. Jejich dozráváním vznikají invazivní výběžky pronikající skrz bazální membránu (Murphy a Courtneidge, 2011; Lohmer *et al.*, 2016; Sherwood a Plastino, 2018).

Tvorba invadopodií je stimulována přibližně 5 hodin před samotnou invazí nespecifikovaným difuzním podnětem, který je produkován vulválními prekurzorovými buňkami. Tento difuzní signál indukuje buněčnou invazi tím, že aktivuje Rho GTPázu CDC-42, která je lokalizována na rozhraní kotevní buňky a bazální membrány. CDC-42 přispívá k membránové lokalizaci svého efektorového proteinu WSP-1/N-WASP. Ztráta exprese *cdc-42* nebo *wsp-1* vede k tvorbě méně invadopodií a opožděnému porušení bazální membrány (Lohmer *et al.*, 2016). Rho GTPáza CDC-42 tak podporuje polymeraci F-aktinu v invadopodiích, čímž se vytvoří síla k porušení bazální membrány (Sherwood a Plastino, 2018).

Dalším faktorem podporujícím tvorbu invadopodií je Rab GDP disociační inhibitor GDI-1. Jeho aktivita je stejně jako aktivita CDC-42 řízena proinvazivními signály z vulválních prekursorových buněk. Hlavní funkcí GDI-1 je zprostředkování membránového transportu, kdy podporuje přidání membrány do invadopodií a tím jim umožní jejich růst. V případě ztráty *gdi-1* není invadopodiální membrána směřována do membrány invadopodií (Lohmer *et al.*, 2016).

Invadopodiální membrána kotevní buňky je aktivně recyklována za pomoci endolyzozomálního komplexu a zacílena zpět na invazivní buněčnou membránu, kde opět vznikají nová invadopodia (Hagedorn *et al.*, 2014). Na recyklaci invadopodiálních membrán z endolyzozomu se podílí cytoskeletální regulátory UNC-60/kofilin nebo UNC-34/VASP (Hagedorn *et al.*, 2014; Wang, Chi a Sherwood, 2014). UNC-60 rozkládá F-aktinová vlákna a při jeho ztrátě dochází k akumulaci shluků statického F-aktinu na invazivní buněčné membráně a zároveň k hromadění složek invadopodiální membrány v endolyzozomálním kompartmentu. Následkem toho nejsou invadopodia schopná proniknout bazální membránou (Hagedorn *et al.*, 2014). V případě ztráty UNC-34 naopak dochází ke snížení hladiny F-aktinu a k jeho relokaci na laterální membrány, důsledkem je opět neschopnost invadopodií proniknout bazální membránou (Wang, Chi a Sherwood, 2014).

### **3.3 Faktory podporující tvorbu invazivní membrány**

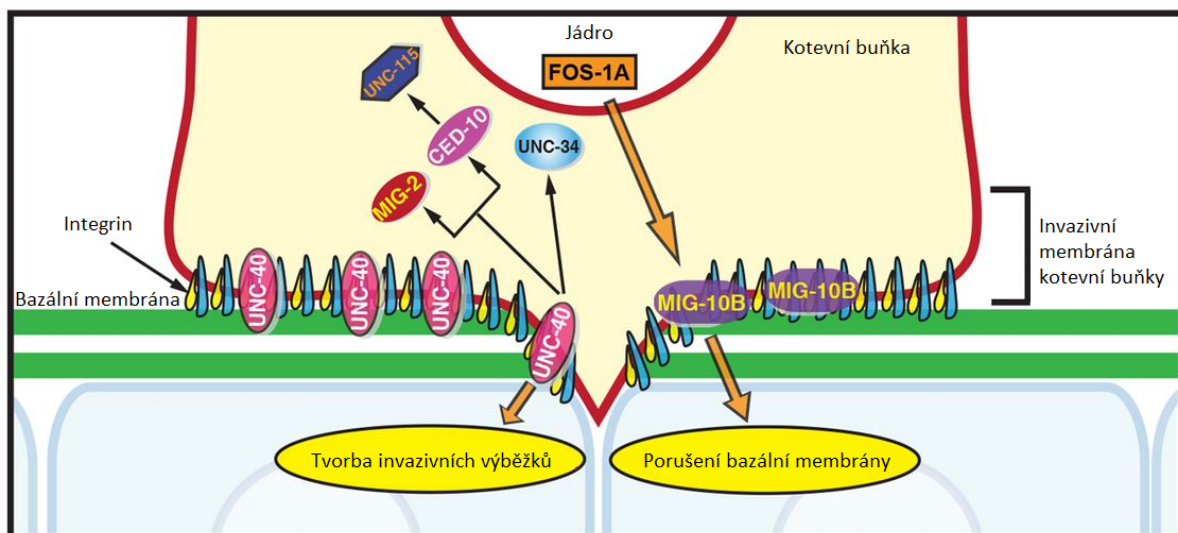
#### **3.3.1 UNC-6 a UNC-40**

Zásadní roli při invazi kotevní buňky hraje netrinová dráha. Netrinový receptor UNC-40 je lokalizován přímo na membráně kotevní buňky, koncentruje se v místě porušení bazální membrány a v reakci na netrin UNC-6 stimuluje regulátory F-aktinu, řídící buněčnou invazi. U obratlovců působí místo netrinového receptoru UNC-40 receptor DCC (Hagedorn *et al.*, 2013; Morrissey, Hagedorn a Sherwood, 2013, viz Obr. 6).

Netrin UNC-6 je kódován genem *unc-6* a jeho mutanti vykazují fenotyp defektní v invazi kotevní buňky. Hlavní funkcí netrinu UNC-6 je tak orientace invazivní membrány za pomoci regulace F-aktinu. Před samotnou invazí dochází nejprve k sekreci netrinu UNC-6 z ventrálního nervového provazce a ten následně stimuluje nahromadění UNC-40 na plazmatické membráně kotevní buňky na té straně, odkud přichází UNC-6 signál. Pomocí receptoru UNC-40 dojde k polarizaci a membrána je obohacena o F-aktin, aktinové regulátory a PI(4,5)P2. Za pomoci netrinu UNC-6 je tak podpořena tvorba invazivních výběžků (Ziel *et al.*, 2009; Hagedorn *et al.*,

2013). Je zajímavé, že UNC-40 se dokáže shlukovat na membráně a stimulovat tvorbu aktinu i v nepřítomnosti UNC-6, nicméně v tomto případě nejsou shluky UNC-40 směřovány jen na jedno místo, ale mohou se vyskytovat kdekoli na povrchu buňky. UNC-6 tak slouží jako nezbytný polarizační signál (Wang *et al.*, 2014).

Netrinový receptor UNC-40 je kódován genem *unc-40*, jehož ztráta vede k absenci tvorby invazivních výběžků. Jeho hlavní funkcí je zajistit dozrávání invadopodií ve stabilní invazivní výběžky, což vede k zastavení tvorby dalších invadopodií a k urychlení odstranění bazální membrány. Následně je invazivní výběžek kotevní buňky pomocí UNC-40 navigován skrz porušenou bazální membránu do vulvální tkáně (Hagedorn *et al.*, 2013; Morrissey, Hagedorn a Sherwood, 2013).



Obrázek 6: Interakce faktorů podporujících tvorbu invazivní membrány. Integrin INA-1/PAT-3 mají funkci lešení, které řídí přenos a stabilizaci jak netrinového receptoru UNC-40, tak lamellipodinu MIG-10b. Zatímco za pomoci netrinových receptorů UNC-40 je zprostředkována samotná tvorba invazivních výběžků, lamellipodin MIG-10b má svoji roli při porušování bazální membrány. Převzato: (Wang, Chi a Sherwood, 2014) a upraveno

### 3.3.2 Integriny INA-1 a PAT-3

Dalším faktorem lokalizovaným na membráně kotevní buňky je heterodimer integrinů  $\alpha$  a  $\beta$  INA-1/PAT-3, který také podporuje invazi kotevní buňky pomocí regulace F-aktinu (Hagedorn *et al.*, 2009; Hagedorn *et al.*, 2013, viz Obr. 6). Integriny jsou lokalizovány na membráně kotevní buňky a jejich hlavní funkcí je regulovat tvorbu invazivní membrány tím, že podpoří zacílení receptoru UNC-40 na invazivní membránu kotevní buňky. Tím opět dojde k polarizaci membrány a obohacení invazivní membrány o F-aktin, aktinové regulátory a PI(4,5)P2 (Hagedorn *et al.*, 2009). Netrinová a integrinová dráha však zjevně mají nepřekrývající se funkce, neboť zatímco v případě ztráty exprese UNC-6 lokalizují aktinové regulátory nebo

PI(4,5)P2 stále na membránu (Ziel *et al.*, 2009), v případě ztráty exprese integrinů tyto molekuly z membrány mizí (Hagedorn *et al.*, 2009). Na ne zcela se překrývající funkce drah také ukazuje protein MIG-10/Lamellipodin, jehož ztráta narušuje schopnost invaze kotevní buňky. MIG-10 funguje jako cytoskeletální organizátor a v kotevní buňce lokalizuje na membránu způsobem závislým na integrinech, ale nikoliv na UNC-40, jak je tomu v jiných buněčných typech (Wang, Chi a Sherwood, 2014). Integriny INA-1/PAT-3 tak zřejmě podporují aktivitu netrinové dráhy při buněčné invazi v kotevní buňce stimulací membránové lokalizace potřebných faktorů (Hagedorn *et al.*, 2009).

### 3.4 Proinvazivní transkripční faktory

V této kapitole budou popsány čtyři transkripční faktory, které podporují samotnou invazi kotevní buňky. Patří mezi ně *fos-1*, *hlh-2*, *nhr-67* a *egl-43*. Tři z těchto faktorů (*hlh-2*, *nhr-67* a *egl-43*) hrají roli už v průběhu L2 vývojové fáze, kdy se podílí na regulaci signální dráhy Notch, která specifikuje kotevní buňku. V L3 vývojovém stádiu se k nim přidá ještě gen *fos-1* a dohromady mají úlohu v invazi kotevní buňky (Medwig-Kinney *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2020).

#### 3.4.1 FOS-1

Protein FOS-1 je kódovaný genem *fos-1* a patří do Fos rodiny bZIP transkripčních faktorů. Je exprimován v kotevní buňce *C. elegans* a jeho hlavní funkcí je řídit pronikání kotevní buňky skrz bazální membránu. Mutanti v genu *fos-1* sice normálně rozšiřují své výběžky směrem k vulválním buňkám, invadopodia ale nejsou schopná porušit bazální membránu a proniknout skrz ni do vulvální tkáně (Sherwood *et al.*, 2005; Ziel *et al.*, 2009). FOS-1 iniciuje invazi kotevní buňky zvýšením exprese *egl-43L* v kotevní buňce, čímž dojde k aktivaci metaloproteinázy *zmp-1* a protocadherinu *cdh-3*, které se dále podílejí na invazi (Rimann a Hajnal, 2007). Přímým transkripčním cílem FOS-1 je také gen pro lamellipodin *mig-10* (Wang, Chi a Sherwood, 2014, viz Obr. 6).

Další funkcí FOS-1 je pozitivní regulace exprese genu pro fúzogen AFF-1, jehož funkce je nezbytná pro fúzi kotevní buňky a buněk vulvo-děložního švu po dokončení invaze kotevní buňky (Sapir *et al.*, 2007).

### 3.4.2 HLH-2, NHR-67 a EGL-43

HLH-2, NHR-67 A EGL-43 jsou dalšími transkripčními faktory ovlivňujícími invazi kotevní buňky, jejichž funkce jsou vzájemně provázané (Medwig-Kinney *et al.*, 2020).

HLH-2 je transkripční faktor s motivem helix-loop-helix, který je v kotevní buňce exprimován jak během její specifikace, tak v průběhu buněčné invaze. Snížení exprese *hlh-2* vede ke snížené koncentraci F-aktinu na invazivní membráně, což potvrzuje jeho roli v regulaci cytoskeletální polaritě. Další z jeho funkcí je transkripční regulace genů zapojených do invaze kotevní buňky, jako jsou protocadherin *cdh-3*, nebo hemicentin *him-4* a také se může přímo vázat na promotor transkripčního faktoru *nhr-67* (Schindler a Sherwood, 2011; Medwig-Kinney *et al.*, 2020).

NHR-67 je jaderný hormonální receptor, jehož hlavní funkcí je zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, které je nezbytné pro invazi kotevní buňky a udržování kotevní buňky v postmitotickém stavu. Děje se tak pomocí regulace exprese inhibitoru cyklin-dependentní kinázy CKI-1 (Matus *et al.*, 2015). Exprese NHR-67 je stimulována v přítomnosti EGL-43 a HLH-2. Zároveň NHR-67 zpětně reguluje hladinu HLH-2, pokud dojde k vyčerpání NHR-67, dojde i ke snížení hladiny HLH-2 (Medwig-Kinney *et al.*, 2020).

Třetím transkripčním faktorem je EGL-43/Evil, vyskytující se ve dvou izoformách. Delší z izoform, EGL-43L, je v kotevní buňce exprimován díky aktivaci faktorem FOS-1 a její hlavní funkcí je regulace rozpadu bazální membrány a podpora invaze kotevní buňky (Hwang, Meruelo a Sternberg, 2007; Medwig-Kinney *et al.*, 2020). EGL-43 také pozitivně reguluje expresi FOS-1 (Deng *et al.*, 2020). Kromě úlohy v buněčné invazi hraje *egl-43* roli i během specifikace osudu  $\pi$ -buněk (Newman, White a Sternberg, 1995).

### 3.5 Invaze kotevní buňky jako model pro lidská onemocnění

Invaze do vulválního epitelu slouží jako model pro invazi buněk přes bazální membrány. Toto buněčné chování je nedílnou součástí embryonálního vývoje, imunitní odpovědi a zvýšená buněčná invazivita je charakteristická pro rakovinné metastázy (Medwig-Kinney *et al.*, 2020). Invaze kotevní buňky tak může být dobrým modelem i pro lidská onemocnění, kromě metastázy rakovinných buněk to mohou být i onemocnění jako jsou revmatoidní artritida, nebo astma (Ingram *et al.*, 2011).

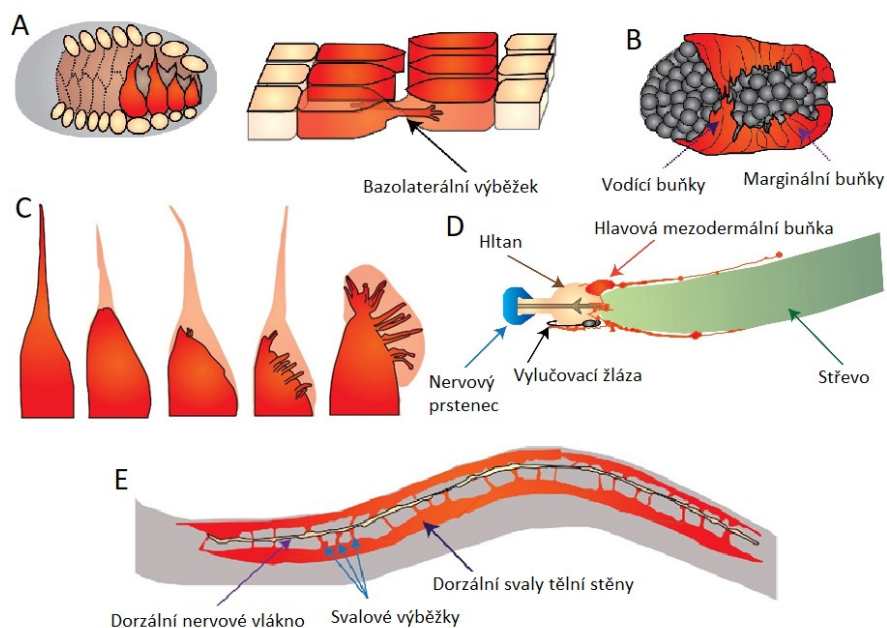
Ačkoliv většina faktorů, které jsou u obratlovců spojené s tvorbou invadopodií se nachází i v modelu *C. elegans*, tři klíčové faktory háďátku chybí. Při tvorbě obratlovcích invadopodií se

navíc vyskytuje cortactin, který podporuje nukleaci F-aktinu, metaloproteinázy membránového typu (MT-MMP) a adaptorové proteiny Tks4/5. Složení invadopodií hád'átka a obratlovců se tak strukturně liší (Morrissey, Hagedorn a Sherwood, 2013).

Dalším rozdílem mezi invadopodií hád'átka a obratlovců je doba jejich přetrvávání a invaze. Zatímco invadopodia v kotevní buňce přetrvávají přibližně minutu, ta, která narušují bazální membránu, přibližně 5 minut, invadopodia rakovinných buněk mohou přetrvávat i déle než hodinu. Invaze kotevní buňky pak trvá asi 90 minut a invaze rakovinných buněk může trvat i několik dnů. Důvod proč tomu tak je, zatím není jasný, ale předpokládá se, že by mohly hrát roli rozdíly v signalizaci, vlastnostech buněčné matrix, nebo rozdílné vnitřní buněčné faktory (Lohmer *et al.*, 2014).

#### 4 Další případy non-neuronálních buněk s orientovaným růstem

V této kapitole bude obecně popsáno několik dalších případů orientovaného růstu u non-neuronálních buněk v modelovém organismu *C. elegans*, konkrétně růstové procesy v průběhu epidermální morfogeneze, vznik samčího ocasu, hlavová mezodermální buňka a vznik svalových výběžků. Všechny tyto procesy jsou vysoce regulované a závisí při nich primárně na remodelaci cytoskeletálních elementů na špičkách extenzivních výběžků (viz Obr. 7). Je zajímavé, že kromě cytoskeletálních proteinů sdílejí jednotlivé buňky jen velmi omezené množství faktorů, které jejich růst regulují (Ghosh, Vetrone a Sternberg, 2017).



Obrázek 7: A - interkalace dorzálních epidermálních buněk, B – uzavření ventrální štěrby, C – vývoj samčího ocasu, D – hlavová mezodermální buňka, E - Svalové výběžky *C. elegans*, převzato: (Ghosh, Vetrone a Sternberg, 2017) a upraveno

## 4.1 Růstové procesy v průběhu epidermální morfogeneze

V průběhu embryonální epidermální morfogeneze dochází ke dvěma případům orientovaného růstu buněk, při nichž epidermální buňky migrují tak, aby došlo k obalení embrya a vytvoření souvislé epidermis. Oba tyto procesy probíhají přibližně ve stejnou dobu, ale na opačných stranách embrya. (Williams-Masson *et al.*, 1998)

Prvním procesem je interkalace dorzálních epidermálních buněk, při níž dochází k prolínání buněk v místě dorzální střední čáry. Interkalace začíná tím, že epidermální prekurzorové buňky získají klínový tvar s hroty orientovanými ke střední čáře. Následně se každá klínová buňka vmezeřuje mezi své dvě kolaterální buňky na protější straně embrya a hroty buněk se dále protahují. Nakonec dojde k migraci buněčných jader na opačné strany buněk a ke vzájemnému prolínání a vytvoření spoje. Dorzální interkalace probíhá od anteriorního konce k posteriornímu a k jejímu dokončení dochází až ve chvíli, kdy začíná proces ventrálního uzavírání. Tuto synchronizaci mají na starost dva páry ukazatelových buněk, které se vmezeřují jako poslední (Williams-Masson *et al.*, 1998; Hardin, 2005; Ghosh, Vetrone a Sternberg, 2017; viz Obr. 7A).

Druhým procesem je uzavírání ventrální štěrbiny, které probíhá ve dvou krocích. Nejprve dochází ke spojení dvou párů vodících buněk v oblasti ventrální střední čáry, čímž vznikne kapsa, která se v rámci druhého kroku postupně uzavírá a ostatní ventrální marginální buňky se svými kolaterálními buňkami vytvoří spojení. Celý proces je regulován komplexem aktivujícími komplex *Arp2/3*, který reguluje polymeraci aktinu v prodlužujícím se výběžku ventrálních marginálních buněk (Williams-Masson, Malik a Hardin, 1997; Ghosh, Vetrone a Sternberg, 2017; viz Obr. 7B).

Po uzavření ventrální kapsy epidermální buňky vytvoří syncytium (Williams-Masson *et al.*, 1998) a dochází k embryonální elongaci, kdy je fazolovité embryo převedeno do podlouhlého červovitého tvaru (Priess a Hirsh, 1986; Hardin, 2005).

## 4.2 Samčí ocas

Dalším případem orientovaného růstu buněk je růst samčího ocasu, tvořeného vějířem s devíti páry smyslových paprsků, jejichž poloha je předem daná (Baird *et al.*, 1991).

Vývoj této kopulační struktury probíhá postembryonálně, v L4 larválním stádiu. Nejprve dochází k zakulacení hypodermálních buněk na špičce ocasu, ty se poté stáhnou dozadu a ztratí tak adhezi k larvální kutikule. Takto vzniknou papily, určující polohu dospělých paprsků ve

vějíři. Buňky za sebou také zanechávají čirou tekutinu v extracelulárním prostoru, která je přenášena prostřednictvím vakuol a vznikají tak přechodné vakuolární otoky. V průběhu vývoje kopulační struktury dochází k fúzi buněk, změně tvaru a polohy buněk, k migraci jader a ke změnám v buněčných asociacích (Nguyen *et al.*, 1999; viz Obr. 7C).

### 4.3 Hlavová mezodermální buňka

Hlavová mezodermální buňka (hmc) je také buňkou s orientovaným růstem. Má anteriorně a posteriorně rozšířené výběžky, postupující podél dorzální a ventrální tělní stěny, které se rozdvíjejí na úrovni hltanu. K vývoji hmc dochází už během embryonálního stádia. Z progenitorových SGP buněk se nejprve vyvinou dvě hlavové mezodermální buňky (hmcL a hmcR). Obě buňky migrují k dorzální střední čáře a jakmile jí dosáhnou, hmcR podstoupí programovanou buněčnou smrt. HmcL se bez dalšího dělení diferencuje jako mezodermální hlavová buňka a získává svůj charakteristický tvar písmene H (Altun a Hall, 2005; Ghosh, Vetrone a Sternberg, 2017; Mathies *et al.*, 2019; viz Obr. 7D).

### 4.4 Svalové výběžky

Poslední zmíněnou buňkou s orientovaným růstem jsou svalové výběžky, nervosvalová spojení tvořená extenzí plazmatické membrány, sestávající se z tenké stopky, která vychází z těla svalové buňky, a rozdvojeného konce, který se dotýká nervového provazce. Svalové výběžky tak slouží ke kontaktu svalových buněk s motorickými axony (viz Obr. 7E)

Membránové extenze vytváří všech 95 svalových buněk *C. elegans* a zatímco L1 larvy mají pouze jeden až dva svalové výběžky na svalovou buňku, dospělci mají tři až pět svalových výběžků na svalovou buňku (Dixon a Roy, 2005). Pokud jedinec v průběhu vývoje projde stádiem dauer, dochází u něj k tvorbě nadpočetných svalových výběžků, které přetrvávají až do jeho dospělosti, což svědčí o faktu, že extenze svalové membrány jsou nevratné (Dixon *et al.*, 2008).

Tvorba svalových výběžků je regulována za pomoci chemoatraktantů, mezi které patří například proteiny MADD-4 a MADD-2, pomocí nichž jsou svalové výběžky přitahovány k ventrální i k dorzální střední linii (Alexander *et al.*, 2010; Seetharaman *et al.*, 2011; D'Souza *et al.*, 2016).

## 5 Závěr

Cílem této práce bylo popsat orientovaný růst non-neuronálních buněk u modelového organismu *C. elegans*. Podrobněji byly popsány mechanismy orientovaného růstu u vylučovací kanálové buňky a mechanismy buněčné invaze u buňky kotevní. Oba tyto mechanismy jsou závislé na remodelaci cytoskeletálních elementů v rostoucí části buňky a jedná se o vysoce regulované procesy, na kterých je závislý správný vývoj jedince. Přestože se jedná o buňky s velmi odlišnou funkcí, v regulaci růstu se v obou případech uplatňuje vedle cytoskeletu řada společných faktorů, zejména netrinová a integrinová dráha. Vylučovací kanálová buňka kromě růstu v oblasti špičky nabízí i unikátní model růstu prostřednictvím tvorby lumen, čehož lze využít i pro studium lidských onemocnění vylučovací soustavy. Naproti tomu invazivní chování kotevní buňky představuje dobrý model pro studium buněčné invazivity v nepatologickém kontextu a zejména v přirozeném 3D prostředí, což může přinést užitečné poznatky přenositelné na chování rakovinných buněk. V závěru práce jsou pak zmíněny i další non-neuronální buňky *C. elegans*, které v průběhu diferenciaci procházejí orientovanými změnami tvaru.

## Použitá literatura

- Abdus-Saboor, I. *et al.* (2011) „Notch and Ras promote sequential steps of excretory tube development in *C. elegans*“, *Development*, 138(16), s. 3545–3555. doi: 10.1242/dev.068148.
- Al-Hashimi, H. *et al.* (2018) „Tubular Excretory Canal Structure Depends on Intermediate Filaments EXC-2 and IFA-4 in *Caenorhabditis elegans*“, *Genetics*, 210(2), s. 637. doi: 10.1534/GENETICS.118.301078.
- Al-Hashimi, H. *et al.* (2019) „Novel exc Genes Involved in Formation of the Tubular Excretory Canals of *Caenorhabditis elegans*“, *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9(5), s. 1339–1353. doi: 10.1534/G3.119.200626.
- Alexander, M. *et al.* (2010) „MADD-2, a homolog of the opitz syndrome protein MID1, regulates guidance to the midline through UNC-40 in *Caenorhabditis elegans*“, *Developmental Cell*, 18(6), s. 961–972. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2010.05.016.
- Altincicek, B. *et al.* (2010) „Role of matrix metalloproteinase ZMP-2 in pathogen resistance and development in *Caenorhabditis elegans*“, *Developmental & Comparative Immunology*, 34(11), s. 1160–1169. doi: 10.1016/J.DCI.2010.06.010.
- Altun, Z. F. a Hall, D. H. (2005) „WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Muscle System - Head Mesodermal Cell“, *WormAtlas*. Editoval L. A. Herndon. doi: 10.3908/wormatlas.1.10. (\*)
- Altun, Z. F. a Hall, D. H. (2006) „WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction“, *WormAtlas*. Editoval L. A. Herndon. doi: 10.3908/wormatlas.1.1. (\*)
- Armenti, S. T., Chan, E. a Nance, J. (2014) „Polarized exocyst-mediated vesicle fusion directs

- intracellular lumenogenesis within the *C. elegans* excretory cell", *Developmental Biology*, 394(1), s. 110–121. doi: 10.1016/J.YDBIO.2014.07.019.
- Armstrong, K. R. a Chamberlin, H. M. (2010) „Coordinate regulation of gene expression in the *C. elegans* excretory cell by the POU domain protein CEH-6", *Molecular Genetics and Genomics*, 283(1), s. 73–87. doi: 10.1007/S00438-009-0497-8/TABLES/3.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. a Lake, R. J. (1999) „Notch signaling: cell fate control and signal integration in development", *Science (New York, N.Y.)*, 284(5415), s. 770–776. doi: 10.1126/SCIENCE.284.5415.770.
- Baird, S. E. *et al.* (1991) „Pattern formation in the nematode epidermis: determination of the arrangement of peripheral sense organs in the *C. elegans* male tail", *Development (Cambridge, England)*, 113(2), s. 515–526. doi: 10.1242/DEV.113.2.515.
- Bär, T., Güldner, F. H. a Wolff, J. R. (1984) „Seamless' endothelial cells of blood capillaries", *Cell and tissue research*, 235(1), s. 99–106. doi: 10.1007/BF00213729.
- Berry, K. L. *et al.* (2003) „A *C. elegans* CLIC-like Protein Required for Intracellular Tube Formation and Maintenance", *Science*, 302(5653), s. 2134–2137. doi: 10.1126/science.1087667.
- Beyenbach, K. W. a Wicczorek, H. (2006) „The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation", *Journal of Experimental Biology*, 209(4), s. 577–589. doi: 10.1242/JEB.02014. (\*)
- Brenner, S. (1974) „THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS", *Genetics*, 77(1), s. 71–94. doi: 10.1093/genetics/77.1.71.
- Bretscher, A., Edwards, K. a Fehon, R. G. (2002) „ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex", *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3:8, 3(8), s. 586–599. doi: 10.1038/nrm882. (\*)
- Buechner, M. *et al.* (1999) „Cystic canal mutants in *Caenorhabditis elegans* are defective in the apical membrane domain of the renal (excretory) cell", *Developmental biology*, 214(1), s. 227–241. doi: 10.1006/DBIO.1999.9398.
- Buechner, M. (2002) „Tubes and the single *C. elegans* excretory cell", *Trends in Cell Biology*, 12(10), s. 479–484. doi: 10.1016/S0962-8924(02)02364-4. (\*)
- Bürglin, T. R. a Ruvkun, G. (2001) „Regulation of ectodermal and excretory function by the *C. elegans* POU homeobox gene *ceh-6*", *Development*, 128(5), s. 779–790. doi: 10.1242/DEV.128.5.779.
- Cáceres, R. *et al.* (2018) „Forces drive basement membrane invasion in *Caenorhabditis elegans*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(45), s. 11537–11542. doi: 10.1073/PNAS.1808760115/VIDEO-2.
- Carmona-Fontaine, C., Matthews, H. a Mayor, R. (2008) „Directional cell migration in vivo", <http://dx.doi.org/10.4161/cam.2.4.6747>, 2(4), s. 240–242. doi: 10.4161/CAM.2.4.6747.
- Cassada, R. C. a Russell, R. L. (1975) „The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Biology*, 46(2), s. 326–342. doi: 10.1016/0012-1606(75)90109-8.
- Chavrier, P. *et al.* (1990) „Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments", *Cell*, 62(2), s. 317–329. doi: 10.1016/0092-

8674(90)90369-P.

Conlon, I. J. *et al.* (2001) „Extracellular control of cell size", *Nature Cell Biology* 2001 3:10, 3(10), s. 918–921. doi: 10.1038/ncb1001-918.

D'Souza, S. A. *et al.* (2016) „The MADD-3 LAMMER Kinase Interacts with a p38 MAP Kinase Pathway to Regulate the Display of the EVA-1 Guidance Receptor in *Caenorhabditis elegans*", *PLoS Genetics*, 12(4), s. 1006010. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1006010.

Deng, T. *et al.* (2020) „The *Caenorhabditis elegans* homolog of the *Evi1* proto-oncogene, *egl-43*, coordinates G1 cell cycle arrest with pro-invasive gene expression during anchor cell invasion", *PLOS Genetics*, 16(3), s. e1008470. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1008470.

Dent, E. W. a Gertler, F. B. (2003) „Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance", *Neuron*, 40(2), s. 209–227. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00633-0. (\*)

Deppe, U. *et al.* (1978) „Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Biology*, 75(1), s. 376–380.

Dixon, S. J. *et al.* (2008) „Insulin-like signaling negatively regulates muscle arm extension through DAF-12 in *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Biology*, 318(1), s. 153–161. doi: 10.1016/J.YDBIO.2008.03.019.

Dixon, S. J. a Roy, P. J. (2005) „Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*", *Development (Cambridge, England)*, 132(13), s. 3079–3092. doi: 10.1242/DEV.01883.

Fehon, R. G., Mcclatchey, A. I. a Bretscher, A. (2010) „Organizing the Cell Cortex: The role of ERM proteins", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), s. 276–287. doi: 10.1038/nrm2866. (\*)

Fujita, M. *et al.* (2003) „The role of the ELAV homologue EXC-7 in the development of the *Caenorhabditis elegans* excretory canals", *Developmental Biology*, 256(2), s. 290–301. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00040-X.

Ganner, A. a Neumann-Haefelin, E. (2017) „Genetic kidney diseases: *Caenorhabditis elegans* as model system", *Cell and Tissue Research*, 369(1), s. 105–118. doi: 10.1007/S00441-017-2622-Z/TABLES/2. (\*)

Garde, A. *et al.* (2022) „Localized glucose import, glycolytic processing, and mitochondria generate a focused ATP burst to power basement-membrane invasion", *Developmental Cell*, 57(6), s. 732-749.e7. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2022.02.019.

Gervais, L. a Casanova, J. (2010) „In Vivo Coupling of Cell Elongation and Lumen Formation in a Single Cell", *Current Biology*, 20(4), s. 359–366. doi: 10.1016/J.CUB.2009.12.043/ATTACHMENT/52DC13DC-8624-4404-9D57-51AB811D171A/MMC4.MOV.

Ghosh, S. a Sternberg, P. W. (2014) „Spatial and molecular cues for cell outgrowth during *C. elegans* uterine development", *Developmental biology*, 396(1), s. 121–135. doi: 10.1016/J.YDBIO.2014.09.028.

Ghosh, S., Vetrone, S. A. a Sternberg, P. W. (2017) „Non-neuronal cell outgrowth in *C. elegans*", *Worm*, 6(3–4), s. e1405212. doi: 10.1080/21624054.2017.1405212.

Göbel, V. *et al.* (2004) „Lumen morphogenesis in *C. elegans* requires the membrane-cytoskeleton linker *erm-1*", *Developmental Cell*, 6(6), s. 865–873. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2004.05.018/ATTACHMENT/DE94C385-3566-4084-83A2-

03CF1255EE3B/MMC2.AVI.

Goldberg, D. J. a Burmeister, D. W. (1986) „Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy", *The Journal of Cell Biology*, 103(5), s. 1921. doi: 10.1083/JCB.103.5.1921.

Grussendorf, K. A. *et al.* (2016) „Facilitation of endosomal recycling by an IRG protein homolog maintains apical tubule structure in *Caenorhabditis elegans*", *Genetics*, 203(4), s. 1789–1806. doi: 10.1534/GENETICS.116.192559/-/DC1.

Hagedorn, E. J. *et al.* (2009) „Integrin Acts Upstream of Netrin Signaling to Regulate Formation of the Anchor Cell's Invasive Membrane in *C. elegans*", *Developmental cell*, 17(2), s. 187. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2009.06.006.

Hagedorn, E. J. *et al.* (2013) „The netrin receptor DCC focuses invadopodia-driven basement membrane transmigration in vivo", *The Journal of Cell Biology*, 201(6), s. 903. doi: 10.1083/JCB.201301091.

Hagedorn, E. J. *et al.* (2014) „ADF/cofilin promotes invadopodial membrane recycling during cell invasion in vivo", *The Journal of Cell Biology*, 204(7), s. 1209. doi: 10.1083/JCB.201312098.

Hagedorn, E. J. a Sherwood, D. R. (2011) „CELL INVASION THROUGH BASEMENT MEMBRANE: THE ANCHOR CELL BREACHES THE BARRIER", *Current opinion in cell biology*, 23(5), s. 589. doi: 10.1016/J.CEB.2011.05.002.

Hahn-Windgassen, A. a Van Gilst, M. R. (2009) „The *Caenorhabditis elegans* HNF4 $\alpha$  Homolog, NHR-31, Mediates Excretory Tube Growth and Function through Coordinate Regulation of the Vacuolar ATPase", *PLOS Genetics*, 5(7), s. e1000553. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1000553.

Hardin, J. (2005) „Epidermal morphogenesis", *WormBook*. doi: 10.1895/wormbook.1.35.1.

Hedgecock, E. M. *et al.* (1987) „Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*", *Development*, 100(3), s. 365–382. doi: 10.1242/DEV.100.3.365.

Hedgecock, E. M., Culotti, J. G. a Hall, D. H. (1990) „The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*", *Neuron*, 4(1), s. 61–85. doi: 10.1016/0896-6273(90)90444-K.

Hill, R. J. a Sternberg, P. W. (1992) „The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*", *Nature*, 358(6386), s. 470–476. doi: 10.1038/358470a0.

Hubbard, E. J. A. a Greenstein, D. (2000) „The *Caenorhabditis elegans* gonad: A test tube for cell and developmental biology", *Developmental Dynamics*, 218(1), s. 2–22. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(200005)218:1<2::AID-DVDY2>3.0.CO;2-W. (\*)

Hüsken, K. *et al.* (2008) „Maintenance of the intestinal tube in *Caenorhabditis elegans*: the role of the intermediate filament protein IFC-2", *Differentiation*, 76(8), s. 881-s3. doi: 10.1111/J.1432-0436.2008.00264.X.

Hutter, H. *et al.* (2000) „Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes", *Science*, 287(5455), s. 989–1010. doi: 10.1126/SCIENCE.287.5455.989/SUPPL\_FILE/1036101S2\_THUMB.GIF. (\*)

Hwang, B. J., Meruelo, A. D. a Sternberg, P. W. (2007) „*C. elegans* EVI1 proto-oncogene,

- EGL-43, is necessary for Notch-mediated cell fate specification and regulates cell invasion", *Development (Cambridge, England)*, 134(4), s. 669–679. doi: 10.1242/DEV.02769.
- Hyenne, V. *et al.* (2015) „RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion", *Journal of Cell Biology*, 211(1), s. 27–37. doi: 10.1083/jcb.201504136.
- Ingram, J. L. *et al.* (2011) „Airway Fibroblasts in Asthma Manifest an Invasive Phenotype", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(12), s. 1625. doi: 10.1164/RCCM.201009-1452OC.
- Jayadev, R. a Sherwood, D. R. (2017) „Basement membranes", *Current Biology*, 27(6), s. R207–R211. doi: 10.1016/J.CUB.2017.02.006.
- Jewett, C. E. a Prekeris, R. (2018) „Insane in the apical membrane: Trafficking events mediating apicobasal epithelial polarity during tube morphogenesis", *Traffic*, 19(9), s. 666–678. doi: 10.1111/TRA.12579. (\*)
- Kamei, M. *et al.* (2006) „Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo", *Nature*, 442(7101), s. 453–456. doi: 10.1038/nature04923.
- Kelley, L. C. *et al.* (2019) „Adaptive F-actin polymerization and localized ATP production drive basement membrane invasion in the absence of MMPs", *Developmental cell*, 48(3), s. 313. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2018.12.018.
- Kenneth Nelson, F., Albert, P. S. a Riddle, D. L. (1983) „Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system", *Journal of Ultrastructure Research*, 82(2), s. 156–171. doi: 10.1016/S0022-5320(83)90050-3.
- Khan, L. A. *et al.* (2013) „Intracellular lumen extension requires ERM-1-dependent apical membrane expansion and AQP-8-mediated flux", *Nature Cell Biology 2012 15:2*, 15(2), s. 143–156. doi: 10.1038/ncb2656.
- Khan, L. A. *et al.* (2019) „A tensile trilayered cytoskeletal endotube drives capillary-like lumenogenesis", *Journal of Cell Biology*, 218(7), s. 2403–2424. doi: 10.1083/JCB.201811175.
- Kimble, J. a Hirsh, D. (1979) „The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Biology*, 70(2), s. 396–417. doi: 10.1016/0012-1606(79)90035-6.
- Kolotuev, I. *et al.* (2013) „A pathway for unicellular tube extension depending on the lymphatic vessel determinant Prox1 and on osmoregulation", *Nature Cell Biology*, 15(2), s. 157–168. doi: 10.1038/ncb2662.
- Labouesse, M., Sookhareea, S. a Horvitz, H. R. (1994) „The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-26* is required to specify the fates of hypodermal cells and encodes a presumptive zinc-finger transcription factor", *Development*, 120(9), s. 2359–2368. doi: 10.1242/DEV.120.9.2359.
- Lant, B. *et al.* (2015) „CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling", *Nature Communications 2015 6:1*, 6(1), s. 1–13. doi: 10.1038/ncomms7449.
- Lant, B. *et al.* (2018) „Interrogating the *ccm-3* Gene Network", *Cell Reports*, 24(11), s. 2857–2868.e4. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.08.039/ATTACHMENT/C5377C29-1E1A-4A6A-8D6E-E6C62FF6FF01/MMC2.XLSX.
- Lattmann, E., Deng, T. a Hajnal, A. (2020) „To Divide or Invade: A Look Behind the Scenes

of the Proliferation-Invasion Interplay in the *Caenorhabditis elegans* Anchor Cell", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, s. 616051. doi: 10.3389/FCELL.2020.616051.

Liang, J. *et al.* (2017) „Chloride intracellular channel proteins respond to heat stress in *Caenorhabditis elegans*", *PLOS ONE*, 12(9), s. e0184308. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0184308.

Liu, J. a Guo, W. (2012) „The exocyst complex in exocytosis and cell migration", *Protoplasma*, 249(3), s. 587–597. doi: 10.1007/S00709-011-0330-1/FIGURES/2. (\*)

Lloyd, A. C. (2013) „The Regulation of Cell Size", *Cell*, 154(6), s. 1194–1205. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.053. (\*)

Lohmer, L. L. *et al.* (2014) „Invadopodia and basement membrane invasion in vivo", *Cell Adhesion & Migration*, 8(3), s. 246. doi: 10.4161/CAM.28406.

Lohmer, Lauren L. *et al.* (2016) „A Sensitized Screen for Genes Promoting Invadopodia Function In Vivo: CDC-42 and Rab GDI-1 Direct Distinct Aspects of Invadopodia Formation", *PLoS Genetics*, 12(1), s. 1005786. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1005786.

Lohmer, L L *et al.* (2016) „A Sensitized Screen for Genes Promoting Invadopodia Function In Vivo: CDC-42 and Rab GDI-1 Direct Distinct Aspects of Invadopodia Formation", *PLoS Genet*, 12(1), s. 1005786. doi: 10.1371/journal.pgen.1005786.

Lubarsky, B. a Krasnow, M. A. (2003) „Tube Morphogenesis: Making and Shaping Biological Tubes", *Cell*, 112(1), s. 19–28. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01283-7. (\*)

Mah, A. K. *et al.* (2007) „Transcriptional regulation of AQP-8, a *Caenorhabditis elegans* aquaporin exclusively expressed in the excretory system, by the POU homeobox transcription factor CEH-6", *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), s. 28074–28086. doi: 10.1074/JBC.M703305200/ATTACHMENT/7A2FD571-3FA9-4E9E-8F46-CA8F7994EC15/MMC1.ZIP.

Maruyama, R. a Andrew, D. J. (2012) „*Drosophila* as a model for epithelial tube formation", *Developmental Dynamics*, 241(1), s. 119–135. doi: 10.1002/DVDY.22775. (\*)

Mathies, L. D. *et al.* (2019) „mRNA profiling reveals significant transcriptional differences between a multipotent progenitor and its differentiated sister", *BMC Genomics*, 20(1), s. 427. doi: 10.1186/s12864-019-5821-z.

Mattingly, B. C. a Buechner, M. (2011) „The FGD homologue EXC-5 regulates apical trafficking in *C. elegans* tubules", *Developmental Biology*, 359(1), s. 59–72. doi: 10.1016/J.YDBIO.2011.08.011.

Matus, D. Q. *et al.* (2010) „In Vivo Identification of Regulators of Cell Invasion Across Basement Membranes", *Science Signaling*, 3(120), s. ra35. doi: 10.1126/scisignal.2000654.

Matus, D. Q. *et al.* (2015) „Invasive cell fate requires G1 cell-cycle arrest and histone deacetylase-mediated changes in gene expression", *Developmental cell*, 35(2), s. 162. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2015.10.002.

McKeown, C., Praitis, V. a Austin, J. (1998) „*sma-1* encodes a betaH-spectrin homolog required for *Caenorhabditis elegans* morphogenesis", *Development*, 125(11), s. 2087–2098. doi: 10.1242/dev.125.11.2087.

McShea, M. A. *et al.* (2013) „Abelson interactor-1 (ABI-1) interacts with MRL adaptor protein MIG-10 and is required in guided cell migrations and process outgrowth in *C.*

- elegans", *Developmental biology*, 373(1), s. 1–13. doi: 10.1016/J.YDBIO.2012.09.017.
- Medwig-Kinney, T. N. *et al.* (2020) „A developmental gene regulatory network for *C. elegans* anchor cell invasion", *Development (Cambridge, England)*, 147(1). doi: 10.1242/DEV.185850.
- Merz, D. C. *et al.* (2001) „Multiple Signaling Mechanisms of the UNC-6/netrin Receptors UNC-5 and UNC-40/DCC in Vivo", *Genetics*, 158(3), s. 1071–1080. doi: 10.1093/GENETICS/158.3.1071.
- Morrissey, M. A., Hagedorn, E. J. a Sherwood, D. R. (2013) „Cell invasion through basement membrane: The netrin receptor DCC guides the way", *Worm*, 2(3), s. e26169. doi: 10.4161/WORM.26169.
- Murphy, D. A. a Courtneidge, S. A. (2011) „The ‚ins‘ and ‚outs‘ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(7), s. 413. doi: 10.1038/NRM3141. (\*)
- Nelson, F. K. a Riddle, D. L. (1984) „Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery", *The Journal of experimental zoology*, 231(1), s. 45–56. doi: 10.1002/JEZ.1402310107.
- Newman, A. P., White, J. G. a Sternberg, P. W. (1995) „The *Caenorhabditis elegans* lin-12 gene mediates induction of ventral uterine specialization by the anchor cell", *Development*, 121(2), s. 263–271. doi: 10.1242/DEV.121.2.263.
- Newman, A. P., White, J. G. a Sternberg, P. W. (1996) „Morphogenesis of the *C. elegans* hermaphrodite uterus", *Development*, 122(11), s. 3617–3626. doi: 10.1242/dev.122.11.3617.
- Nguyen, C. Q. *et al.* (1999) „Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Male Tail Tip", *Developmental Biology*, 207(1), s. 86–106. doi: 10.1006/DBIO.1998.9173.
- Nikolaou, S. a Machesky, L. M. (2019) „Invasion by Force: The *C. elegans* Anchor Cell Leads the Way", *Developmental Cell*, 48(3), s. 287–288. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2019.01.024.
- Pal, S. *et al.* (2017) „CCM-3 Promotes *C. elegans* Germline Development by Regulating Vesicle Trafficking Cytokinesis and Polarity", *Current Biology*, 27(6), s. 868–876. doi: 10.1016/J.CUB.2017.02.028/ATTACHMENT/9D68D443-4B1A-42C4-A406-50184A07CF9C/MMC5.MP4.
- Priess, J. R. (2005) „Notch signaling in the *C. elegans* embryo.", *WormBook : the online review of C. elegans biology*, s. 1–16. doi: 10.1895/WORMBOOK.1.4.1. (\*)
- Priess, J. R. a Hirsh, D. I. (1986) „*Caenorhabditis elegans* morphogenesis: The role of the cytoskeleton in elongation of the embryo", *Developmental Biology*, 117(1), s. 156–173. doi: 10.1016/0012-1606(86)90358-1.
- Ramalho, J. J. *et al.* (2020) „C-terminal phosphorylation modulates ERM-1 localization and dynamics to control cortical actin organization and support lumen formation during *Caenorhabditis elegans* development", *Development (Cambridge)*, 147(14). doi: 10.1242/DEV.188011/266934/AM/C-TERMINAL-PHOSPHORYLATION-MODULATES-ERM-1.
- Rimann, I. a Hajnal, A. (2007) „Regulation of anchor cell invasion and uterine cell fates by the egl-43 Evi-1 proto-oncogene in *Caenorhabditis elegans*", *Developmental biology*, 308(1),

s. 187–195. doi: 10.1016/J.YDBIO.2007.05.023.

Sapir, A. *et al.* (2007) „AFF-1, a FOS-1-regulated fusogen, mediates fusion of the anchor cell in *C. elegans*“, *Developmental cell*, 12(5), s. 683–698. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2007.03.003.

Sato, N. *et al.* (1992) „A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites“, *Journal of Cell Science*, 103(1), s. 131–143. doi: 10.1242/JCS.103.1.131.

Schindler, A. J. a Sherwood, D. R. (2011) „The transcription factor HLH-2/E/Daughterless regulates anchor cell invasion across basement membrane in *C. elegans*“, *Developmental biology*, 357(2), s. 380. doi: 10.1016/J.YDBIO.2011.07.012.

Schmidt, K. L. *et al.* (2009) „The cell migration molecule UNC-53/NAV2 is linked to the ARP2/3 complex by ABI-1“, *Development*, 136(4), s. 563–574. doi: 10.1242/DEV.016816.

Schottenfeld-Roames, J. a Ghabrial, A. S. (2012) „Whacked and Rab35 polarize dynein-motor-complex-dependent seamless tube growth“, *Nature Cell Biology* 2012 14:4, 14(4), s. 386–393. doi: 10.1038/ncb2454.

Seetharaman, A. *et al.* (2011) „MADD-4 Is a Secreted Cue Required for Midline-Oriented Guidance in *Caenorhabditis elegans*“, *Developmental Cell*, 21(4), s. 669–680. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2011.07.020/ATTACHMENT/DEC91617-85F4-4757-8037-98196819B45E/MMC1.PDF.

Shaye, D. D. a Greenwald, I. (2015) „The disease-associated formin INF2/EXC-6 organizes lumen and cell outgrowth during tubulogenesis by regulating F-actin and microtubule cytoskeletons“, *Developmental Cell*, 32(6), s. 743–755. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2015.01.009/ATTACHMENT/83D6F7E4-5DB6-4429-89B2-2C8C9768AAD7/MMC5.MP4.

Shaye, D. D. a Greenwald, I. (2016) „A network of conserved formins, regulated by the guanine exchange factor EXC-5 and the GTPase CDC-42, modulates tubulogenesis in vivo“, *Development (Cambridge)*, 143(22), s. 4173–4181. doi: 10.1242/DEV.141861/VIDEO-3.

Sherwood, D. R. *et al.* (2005) „FOS-1 Promotes Basement-Membrane Removal during Anchor-Cell Invasion in *C. elegans*“, *Cell*, 121(6), s. 951–962. doi: 10.1016/J.CELL.2005.03.031.

Sherwood, D. R. a Plastino, J. (2018) „Invading, Leading and Navigating Cells in *Caenorhabditis elegans* : Insights into Cell Movement in Vivo“, *Genetics*, 208(1), s. 53–78. doi: 10.1534/genetics.117.300082.

Sherwood, D. R. a Sternberg, P. W. (2003) „Anchor Cell Invasion into the Vulval Epithelium in *C. elegans*“, *Developmental Cell*, 5(1), s. 21–31. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00168-0.

Simons, P. C. *et al.* (1998) „C-Terminal Threonine Phosphorylation Activates ERM Proteins to Link the Cell’s Cortical Lipid Bilayer to the Cytoskeleton“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), s. 561–565. doi: 10.1006/BBRC.1998.9823.

Sivakumar, A. a Kurpios, N. A. (2018) „Transcriptional regulation of cell shape during organ morphogenesis“, *Journal of Cell Biology*, 217(9), s. 2987–3005. doi: 10.1083/JCB.201612115. (\*)

Sternberg’, P. W. a Robert Horvitz, H. (1986) *Pattern Formation during Vulval Development in C. elegans*, *Cell*.

- Stringham, E. *et al.* (2002) „unc-53 controls longitudinal migration in *C. elegans*“, *Development*, 129(14), s. 3367–3379. doi: 10.1242/DEV.129.14.3367.
- Stringham, E. G. a Schmidt, K. L. (2009) „Navigating the cell“, <https://doi.org/10.4161/cam.3.4.9451>, 3(4), s. 342–346. doi: 10.4161/CAM.3.4.9451. (\*)
- Sulston, J. E. *et al.* (1983) „The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*“, *Developmental Biology*, 100(1), s. 64–119. doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4.
- Sulston, J. E. a Horvitz, H. R. (1977) „Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*“, *Developmental Biology*, 56(1), s. 110–156. doi: 10.1016/0012-1606(77)90158-0.
- Sundaram, M. V. a Buechner, M. (2016) „The *Caenorhabditis elegans* Excretory System: A Model for Tubulogenesis, Cell Fate Specification, and Plasticity“, *Genetics*, 203(1), s. 35–63. doi: 10.1534/GENETICS.116.189357. (\*)
- Sundaram, M. V. a Cohen, J. D. (2017) „Time to make the doughnuts: Building and shaping seamless tubes“, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, s. 123–131. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2016.05.006. (\*)
- Suzuki, N. *et al.* (2001) „A putative GDP–GTP exchange factor is required for development of the excretory cell in *Caenorhabditis elegans*“, *EMBO reports*, 2(6), s. 530–535. doi: 10.1093/EMBO-REPORTS/KVE110.
- Tong, X. a Buechner, M. (2008) „CRIP homologues maintain apical cytoskeleton to regulate tubule size in *C. elegans*“, *Developmental Biology*, 317(1), s. 225–233. doi: 10.1016/J.YDBIO.2008.02.040.
- Wang, X. *et al.* (2020) „RSU-1 Maintains Integrity of *Caenorhabditis elegans* Vulval Muscles by Regulating  $\alpha$ -Actinin“. doi: 10.1534/g3.120.401185.
- Wang, Z. *et al.* (2014) „UNC-6 (netrin) stabilizes oscillatory clustering of the UNC-40 (DCC) receptor to orient polarity“, *The Journal of cell biology*, 206(5), s. 619–633. doi: 10.1083/JCB.201405026.
- Wang, Z., Chi, Q. a Sherwood, D. R. (2014) „MIG-10 (lamellipodin) has netrin-independent functions and is a FOS-1A transcriptional target during anchor cell invasion in *C. elegans*“, *Development (Cambridge)*, 141(6), s. 1342–1353. doi: 10.1242/DEV.102434/-/DC1.
- Waters, M. G. a Hughson, F. M. (2000) „Membrane Tethering and Fusion in the Secretory and Endocytic Pathways“, *Traffic*, 1(8), s. 588–597. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010802.x.
- Wilkinson, H. A., Fitzgerald, K. a Greenwald, I. (1994) „Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision“, *Cell*, 79(7), s. 1187–1198. doi: 10.1016/0092-8674(94)90010-8.
- Williams-Masson, E. M. *et al.* (1998) „The Cellular Mechanism of Epithelial Rearrangement during Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Dorsal Hypodermis“, *Developmental Biology*, 204(1), s. 263–276. doi: 10.1006/DBIO.1998.9048.
- Williams-Masson, E. M., Malik, A. N. a Hardin, J. (1997) „An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis“, *Development*, 124(15), s. 2889–2901. doi: 10.1242/DEV.124.15.2889.
- WormBook* (nedatováno). Dostupné z: <http://www.wormbook.org/> (Viděno: 23. březem 2022).

Wu, B. a Guo, W. (2015) „The Exocyst at a Glance". doi: 10.1242/jcs.156398.

Yang, Z. *et al.* (2020) „Terminal web and vesicle trafficking proteins mediate nematode single-cell tubulogenesis", *The Journal of cell biology*, 219(11). doi: 10.1083/JCB.202003152/152057.

Zhu, X. *et al.* (1999) „Identification of Epi-1 Locus as a Laminin  $\alpha$  Chain Gene in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* and Characterization of Epi-1 Mutant Alleles", <https://doi.org/10.3109/10425179909033950>, 10(4–5), s. 207–217. doi: 10.3109/10425179909033950.

Ziel, Joshua W *et al.* (2009) „UNC-6 (netrin) orients the invasive membrane of the anchor cell in *C. elegans*". doi: 10.1038/ncb1825.

Ziel, Joshua W. *et al.* (2009) „UNC-6 (Netrin) Orients the Invasive Membrane of the Anchor Cell in *C. elegans*", *Nature cell biology*, 11(2), s. 183. doi: 10.1038/NCB1825.

Přehledové články jsou označeny (\*).