

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Praktická geobiologie



Anna Hruběšová

Mechanismy determinace zárodečných linií u živočichů
Mechanisms of germline specification in animals

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radka Reifová, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Především děkuji své školitelce RNDr. Radce Reifové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost, kterou mi během celého procesu věnovala. Dále děkuji své rodině a přátelům za jejich neustálou podporu, povzbuzení a trpělivost po celou dobu mého studia.

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 29.04. 2025

Anna Hruběšová

Abstrakt

Determinace zárodečné linie je klíčovým vývojovým procesem u mnohobuněčných organismů, který zajišťuje vznik primordiálních zárodečných buněk (PGC), z nichž se následně vyvíjejí gamety. Tyto buňky jsou zásadní pro předávání genetické informace do dalších generací. Proces specifikace zárodečných buněk popisují dva hlavní modely – zděděný model, který je založený na dědičnosti zárodečné plazmy a indukovaný model založený na signálních interakcích mezi buňkami. Pro tyto procesy hrají významnou roli molekulární determinanty zárodečné linie, mezi které patří například proteiny Vasa, Piwi, Oskar, Nanos/Pumilio, atd., které jsou nezbytné pro správný vývoj a funkci zárodečných buněk. Kromě těchto determinantů se v determinaci a vývoji zárodečné linie může uplatňovat i programovaná DNA eliminace, která představuje genetický mechanismus umožňující trvalé rozlišení somatické a zárodečné linie. Tento proces spočívá v selektivní eliminaci repetitivních sekvencí a určitých genů v somatických buňkách, čímž se zachovává integrita genetické informace v zárodečných buňkách. Tato práce shrnuje současné poznatky o molekulárních faktorech a mechanismech, které řídí determinaci zárodečné linie, a zároveň zdůrazňuje význam těchto procesů z evolučního hlediska.

Klíčová slova: zárodečná linie, zárodečné buňky, molekulární determinanty zárodečné linie, zděděný model, indukovaný model, programovaná DNA eliminace

Abstract

Germline determination is a key developmental process in multicellular organisms that ensures the formation of primordial germ cells (PGCs), from which gametes subsequently develop. These cells are essential for the transmission of genetic information to the next generation. Two main models describe the process of germ cell specification: the inherited model, which is based on germ plasm inheritance, and the induced model, which is based on signaling interactions between cells. Molecular determinants of the germline, including proteins such as Vasa, Piwi, Oskar, Nanos/Pumilio, etc., which are essential for proper germ cell development and function, play an important role in these processes. In addition to these determinants, programmed DNA elimination may also be involved in germline determination and development, which is a genetic mechanism that allows permanent differentiation between somatic and germline. This process involves the selective elimination of repetitive sequences and specific genes in somatic cells, thereby preserving the integrity of genetic information in germ cells. This paper summarizes the current knowledge of the molecular factors and mechanisms that control germline determination, while highlighting the evolutionary significance of these processes.

Key words: germline, germ cells, molecular determinants of germline, inherited model, inductive model, programmed DNA elimination

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Zárodečná linie buněk.....	2
3	Determinanty zárodečné linie.....	4
3.1	Modely specifikace zárodečných linií.....	4
3.1.1	Zděděný model.....	5
3.1.1.1	Zárodečná plazma (germ plasm) a zárodečné granule (germinal granuls)	5
3.1.1.2	Oskar a bucky ball.....	7
3.1.2	Indukční model.....	9
3.2	Základní molekulární faktory určující zárodečnou linii.....	10
3.2.1	Piwi.....	10
3.2.2	Vasa.....	12
3.2.3	Nanos/Pumilio.....	13
3.2.4	Tudor.....	15
3.2.5	Fragilis.....	16
3.2.6	Stella.....	16
3.2.7	Blimp1.....	16
3.2.8	E- kadherin.....	17
3.2.9	další.....	17
4	Programovaná DNA eliminace a její role v rozlišení zárodečné a somatické linie	22
5	Evoluční význam.....	25
6	Závěr.....	28
7	Seznam literatury.....	30

1 Úvod

Vývoj zárodečné linie buněk a její oddělení od somatické linie buněk představuje klíčový vývojový proces pro všechny mnohobuněčné organismy. Správná determinace a vývoj zárodečné linie je zásadní pro zachování reprodukční schopnosti a genetické integrity organismu. Tato bakalářská práce se zaměřuje na komplexní mechanismy, které řídí determinaci a vývoj zárodečných linií především u modelových organismů, s důrazem na molekulární determinanty a evoluční aspekty vývojového procesu (Extavour & Akam, 2003a).

Práce se zabývá jak charakteristikou zárodečné linie a buněk, tak se i podrobně zaměřuje na molekulární determinanty, které hrají klíčovou roli v tomto procesu, a to jak z pohledu zděděných determinantů (preformace), tak prostřednictvím mechanismů indukce (Elkouby et al., 2021; Ewen-Campen et al., 2010a; Extavour & Akam, 2003a). Jedna kapitola bude věnována zásadním molekulárním faktorům, jako jsou proteiny Piwi (Juliano et al., 2011a), Vasa (Lasko & Ashburner, 1988) a Nanos/Pumilio (Curtis et al., 1997), Tudor (Arkov et al., 2006), Fragilis (Lange et al., 2003), Stella (L. Han et al., 2019), Blimp1 (Ahmed et al., 2016) a E-kadherinu (Di Carlo & De Felici, 2000a), a dalším, které se podílejí na regulaci tohoto procesu.

Speciální kapitola bude věnována programované DNA eliminaci (PDE) a její potenciální roli v rozlišení zárodečné a somatické linie u některých linií živočichů (Chmielewska et al., 2018). V závěru práce se zaměřím na evoluční význam zárodečné linie a PDE s cílem pochopit, jak se tyto mechanismy vyvíjely a jak ovlivňují diverzitu a adaptaci živočichů (Bergeron et al., 2023; Devlin et al., 2023). Tato práce si klade za cíl poskytnout ucelený pohled na determinaci zárodečné linie a zdůraznit její význam pro vývoj, reprodukci a evoluci živočichů.

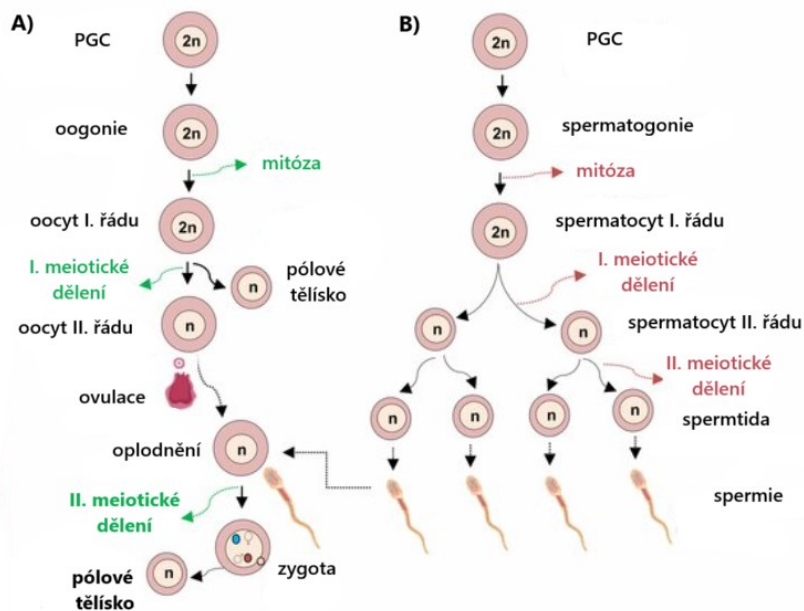
2 Zárodečná linie buněk

Zárodečné buňky jsou jediné buňky v mnohobuněčných organismech, které mají schopnost předávat svoji genetickou informaci do dalších generace, a to díky tomu, že se z nich stanou gamety, zatímco ze somatických buněk vzniknou všechny ostatní části těla. Vše začíná oddělením zárodečných a somatických buněk od sebe, což většinou nastává během ranné embryogeneze. Zárodečným buňkám po oddělení somatické linie se říká primordiální zárodečné buňky (PGC) (Extavour & Akam, 2003a; Seervai & Wessel, 2013a).

PGC jsou specifikovány jinde v organismu než v gonádách, a proto do gonád, kde probíhá samotná gametogeneze (vznik gamet), musí domigrovat. Samotná migrace může být provedena několika způsoby, u savců PGC migrují přes tkáň a u ptáků migrují pomocí cirkulačního systému/krve (Soto-Suazo & Zorn, 2005). Proces zahrnující migraci obsahuje několik fází jako je iniciace, samotná migrace, regulace signálů a následné ukončení migrace. PGC se pohybují pomocí amébovitého pohybu a důležitou roli hrají biochemické signály a vlastností okolního prostředí (Gross-Thebing et al., 2020; Soto-Suazo & Zorn, 2005), vedení PGS tak především řídí přitažlivé i odpudivé signály. Další důležitou složkou jsou kadheriny, zejména E-kadherin a N-kadherin, které hrají zásadní roli v buněčné adhezi během migrace PGC do gonád (Di Carlo & De Felici, 2000a; Pipek et al., 2020). U obratlovců PGC během své migrace putují z extraembryonální oblasti až ke genitální liště. Tato migrace je klíčová pro jejich správný vývoj a případnou diferenciaci v gamety v gonádách. (Soto-Suazo & Zorn, 2005).

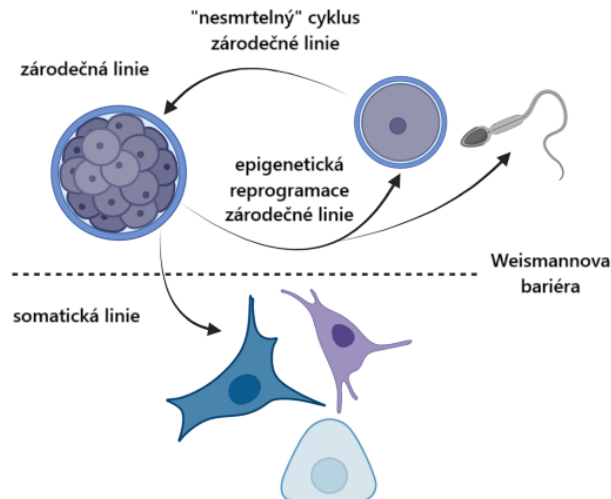
Dalším krokem vývoje zárodečné linie je gametogeneze, během které probíhá meióza. Ta umožňuje přechod buněk z diploidního stavu ($2n$) do haploidního stavu (n), což vede ke vzniku haploidních gamet (Seervai & Wessel, 2013a). Tento krok je extrémně důležitý, co se týče vzniku genetické variability a sexuálního rozmnožování. Odehrává se v genitálních tkáních (vaječníky/testes), přičemž gametogeneze u samců se nazývá spermatogeneze a u samic oogeneze. Spermatogeneze (tvorba spermií) probíhá v semenotvorných kanálcích varlat. Její součástí je mitotické dělení spermatogonií, čímž vznikají primární spermatocyty, následně podléhají meióze I a II za vzniku haploidních spermatid. Během meiózy I se homologní chromozomy párují, pomocí synaptonemálního komplexu (první profáze), který má za úkol propojení a umožní crossing-over, což je proces, ve kterém dochází k rekombinacím alel. Po tomto kroku se vytváří dva sekundární spermatocyty (spermatocyty II řádu), které následně čeká meióza II. Ta má za úkol oddělení chromatid od sebe a dává vzniku spermatidám, které se pak diferencují ve spermie procesem spermiogeneze, zahrnujícím kondenzaci jádra a tvorbu bičíku. Ke spermatogenezi nastává v průběžně v dospělosti (Maamar et al., n.d.).

Oogeneze začíná už během embryonálního vývoje, a to ve vaječnících, kde se vytvářejí oogonie a poté i primární oocyty (oocyt I řádu) a podstupují meiózu I. Ve fázi diplotene je meiotické dělení zastaveno. Po hormonální stimulaci, které je většinou dosaženo až v dospělosti, je jeden z primárních oocytů je stimulován hormony (folikulostimulační hormon, FSH, estrogen), které navodí zrání primárního oocytu a vzniká sekundární oocyt (oocyt II řádu), při kterém vzniká i pólóvé tělísko. Dále je ovšem oocyt zastaven a až po oplození projde meiózou II, za vzniku zralého vajíčka a dalšího pólóvého tělíska (Maamar et al., n.d.).



Obrázek 1 A) proces oogeneze a následné oplození B) proces spermatogeneze (převzato a přeloženo z (Muhammad & Li, 2023))

Oddělení rolí buněk většinou v ranné embryogenezi a zamezuje somatickým buňkám předávat genetickou informaci a nově vzniklé mutace, které mohly vzniknout během vývoje či vlivem prostředí. Tomuto jevu říkáme Weismannova bariéra, koncept této teorie byl zformulován německým biologem Augustem Weismannem v 19. století. Jeho cílem bylo zjistit, proč se genetické mutace v somatických buňkách, které jsou způsobené např. prostředím, nepropisují do dalších generací (August Weismann, 1893). Pouze zárodečné buňky jsou schopny předávat genetickou informaci následujícím generacím, což je činí klíčovými nejen pro uchování genetické integrity, ale i pro ontogenezi/vývoj mnohobuněčných organismů, přičemž mutace v těchto buňkách mohou jejich integritu narušit (Devlin et al., 2023).



Obrázek 2 Segregace somatické a zárodečné linie, mezi kterou se tvoří Weismannova bariéra, která brání přenosu primárně mutací ze somatické do zárodečné linie. Zárodečné buňky jsou často označovány jako "nesmrtelné", protože přenáší dědičnou informaci z generace na generaci. (převzato a přeloženo zEwe & Rechavi, 2023)

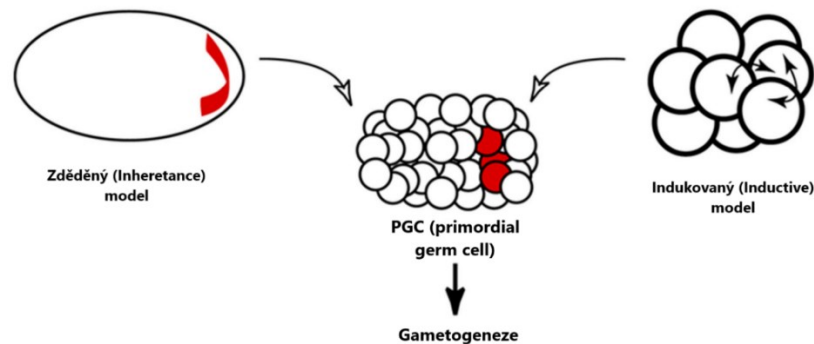
3 Determinanty zárodečné linie

Zárodečná linie je během svého vývoje velice pečlivě kontrolována a regulována, aby nedošlo k zbytečným defektům. Tyto defekty by mohly mít ohromný dopad na potomky dané generace a v krajních případech by mohly vést až k neplodnosti a tím pádem i zániku linie. V průběhu vývoje je pro zárodečnou linii důležitých několik desítek proteinů a faktorů, které slouží jako determinanty, specifikují, udržují a diferencují zárodečné buňky během embryonálního vývoje (Lehmann & Rongo, 1993). Mezi determinanty najdeme nejenom proteiny, ale i RNA a epigenetické faktory, které se podílí na správném průběhu vývoje linie, a proto jsou klíčovou součástí vývoje zárodečných linií (Allegrucci et al., 2005).

3.1 Modely specifikace zárodečných linií

V dnešní době jsou rozeznávány dva modely specifikace zárodečných linií, i když hranice mezi nimi může být poněkud neostrá. Jde o zděděný model (preformace), kde se faktory dědí v podobě gradientů proteinů či RNA molekul v oocytu a indukovaný model, kde je zárodečná linie indukovaná až v průběhu ontogeneze (Extavour & Akam, 2003b). Přestože tyto dva modely fungují na jiných principech, sdílejí jisté podobnosti, které jsou nezbytnou součástí vývoje zárodečné linie. Mezi klíčové determinanty zárodečné linie patří proteiny jako Piwi, Vasa a Nanos/Pumilio nebo jejich homology (proteiny které mají jistou strukturní, funkční nebo sekvenční podobnost s jiným proteinem v důsledku původu ze společného předka), tyto faktory jsou podrobněji vysvětleny v kapitole 3.2. (Seervai & Wessel, 2013a; Seydoux & Braun, 2006; Tsuda et al., 2003; C. Wang & Lehmann, 1991; Yang et al., 2015).

Většina výzkumů spojených determinanty zárodečných linií byla pozorována na zavedených modelových organismech jako je *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* či *Danio rerio*.



Obrázek 3 Zobrazení dvou modelů (zděděný a indukovaný) specifikace PGC. Červeně jsou označené buňky, ze kterých se stanou později pomocí gametogeneze zárodečné buňky (převzato a přeloženo Seervai & Wessel, 2013a).

3.1.1 Zděděný model

V tomto modelu jsou během oogeneze do oocyty vkládány mateřské determinanty, jako jsou RNA a proteiny. Tyto determinanty, včetně zárodečného plazmatu a specifických proteinů, jako je protein Oskar u *Drosophila melanogaster* nebo zárodečných granulí u *Caenorhabditis elegans*, hrají zásadní roli při určování zárodečné linie. Tento model je charakterizován lokalizovanou distribucí těchto determinantů uvnitř oocyty, které jsou pak zděděny zárodečnými buňkami během raných embryonálních dělení. Jak bezobratlí, jako jsou *D. melanogaster* a *C. elegans*, tak i někteří obratlovci využívají tento mechanismus pro specifikaci své zárodečné linie (Houston & King, 2000a; Saffman & Lasko, 1999; Seervai & Wessel, 2013a).

3.1.1.1 Zárodečná plazma (germ plasm) a zárodečné granule (germinal granules)

Pólové buňky (pole cells), které jsou prvními stavebními kameny zárodečné linie u mnoha živočišných druhů a tvoří se v raném vývoji. U některých organismů se shromažďují na posteriorním (zadním) pólu krátce po oplodnění (u *D. melanogaster* 90-120 minut po fertilizaci). Tam se také objeví speciální cytoplazmatická oblast známá jako pólová plazma (pole plasm), která obsahuje v tu chvíli všechny potřebné zárodečné determinanty a napomáhá tak pólovým buňkám se stát zárodečnými (Extavour & Akam, 2003b; Saffman & Lasko, 1999). Pólová plazma je v této části procesu hlavním determinantem pro určení, které buňky

se stanou zárodečnými. Determinanty se v tomto místě (posteriorním/zadním pólu) shromažďují převážně v posledních fázích oogeneze (Colonna et al., 2023; Ephrussi & Lehmann, 1992).

Pólová plazma tedy slouží jako cytoplazmatický rezervoár obsahující determinanty zárodečných buněk, ale v okamžiku, kdy jsou tyto determinanty uspořádány a využity pro tvorbu zárodečných buněk, se přemění na zárodečnou plazmu. Vztah mezi zárodečnou a pólovou plazmou je velice složitý a hraje zde důležitou roli prostorové uspořádání a molekulární interakce při formování funkční zárodečné linie v průběhu raného embryonálního vývoje (Lehmann, 2016; Saffman & Lasko, 1999).

Zárodečná plazma je cytoplazmatická oblast v buňce, která je nezbytná pro diferenciaci a vývoj zárodečných linií, bez ohledu na jeho umístění v embryu. Hlavním komponentem zárodečné plazmy jsou RNA (většina piRNA) a proteiny, které slouží jako determinanty či pomáhají k sestavení samotné plazmy (Lehmann, 2016; Saffman & Lasko, 1999). Zárodečná plazma je kritickou složkou vývoje a specifikace zárodečných buněk a slouží jako zásobárna základních molekulárních determinantů potřebných pro vznik zárodečných buněk a linií. Tím, že poskytuje specifické RNA a proteiny lokalizované v oocytu, zajišťuje zárodečná plazma to že pouze buňky, které tyto determinanty zdědí, se mohou diferencovat na PGC (Extavour & Akam, 2003a; Houston & King, 2000a; Seervai & Wessel, 2013a).

Díky RNA tělíškům nazvané zárodečné granule (germinal granules), které jsou pod elektronovým mikroskopem elektronově hustá a nemají membránu (T. W. Han et al., 2012; Houston & King, 2000b; Mahowald, 1962) a nejsou většinou vázány na membránu buňky (Dobrynin et al., 2022; T. W. Han et al., 2012), můžeme dobře rozpoznat zárodečnou plazmu. Zárodečné granule byly zkoumány u mnoha živočichů jak bezobratlých (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*), tak i obratlovců (obojživelníci a *Danio rerio*), přičemž v průběhu let dostaly rozdílnou terminologii (viz tabulka 1) (Dobrynin et al., 2022).

Rozdílné názvy získaly především kvůli změnám velikosti, funkce a asociace s organelami, jelikož v různých fázích vývoje zárodečných buněk mění i místo výskytu v zárodečné plazmě. Složení těchto granulí je vesměs podobné, primárně jsou složeny z RNA a proteinů vázajících se na RNA. Na mRNA můžeme najít delší 3' nepřekládaná oblast (3' UTR) mRNA často obsahuje vazebná místa pro regulační proteiny, které řídí spíše translaci než transkripci. Známým příkladem je protein CPEB1, který se váže na specifické sekvence v

3' UTR a reguluje načasování translace mRNA. Tato regulace je zvláště důležitá během rané embryogeneze a na konci oogeneze, tedy ve fázích, kdy je transkripce z velké části neaktivní. V těchto obdobích jsou proteiny potřebné pro vývoj produkovány překladem mateřské mRNA, která byla syntetizována a uložena dříve ve vajíčku. CPEB1 řídí, kdy jsou tyto uložené mRNA překládány, tím, že moduluje jejich polyadenylační stav a zajišťuje, že proteiny jsou vytvářeny ve správný čas, aby podpořily správný vývoj (Dobrynin et al., 2022; T. W. Han et al., 2012; Kochanek & Wells, 2013).

<i>Jméno druhu</i>	<i>Jméno struktury</i>
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Houbová tělíska (Sponge bodies)</i>
	<i>Polární granule (Polar granules)</i>
	<i>Nuage</i>
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>P-granule (P-granules)</i>
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Mitochondrial cloud/nuage</i>
	<i>Balbaniho tělíska (Balbiani bodies)</i>
<i>Mus musculus</i>	<i>Nuage</i>
<i>Danio rerio</i>	<i>Nuage/ Intermitochondriální cement</i>
	<i>(intermitochondrial cement)</i>

Tabulka 1 Názvy zárodečných granul (germinal granuls) u vybraných živočichů (převzato a přeloženo z Dobrynin et al., 2022)

3.1.1.2 Oskar a bucky ball

Jeden z klíčových faktorů, který je zapojení do vytváření zárodečné plazmy je Oskar (Osk). Tento protein je experimentován a nejvíce sledovaný na modelovém organismu *D. melanogaster*, nicméně se objevuje i u dalších bezobratlých. Další protein, u kterého se ukázalo, že má podobnou funkci, je bucky ball, vyskytující se u obratlovců (Krishnakumar et al., 2018).

Když se v oocytu po zhruba 90-120 minutách po fertilizaci začínají tvořit póly, dojde k produkci Osk mRNA sesterskými buňkami do posteriorní/zadní části pólu (syncytia), kde se jeho mRNA bude schraňovat jako součást zárodečné plazmy/pólové plazmy (Ephrussi et al., 1991a; Jeske et al., 2015; Krishnakumar & Dosch, 2018; Saffman & Lasko, 1999). Osk mRNA je transportováno do posteriorního/zadního pólu pomocí mikrotubulů a dále se také zvýší koncentrace ostatní proteinů, které jsou závislé na koncentraci Osk. S ostatními proteiny komunikuje pomocí 3'UTR (netranslatované oblasti) RNA, konkrétně na C-koncovou Osk doménu na kterou můžou navázat jak své vlastní mRNA, tak 3' UTR jiných mRNA, jako je Nanos (Nos) (Ephrussi et al., 1991b; Lehmann, 2016). Pokud jsou zárodečné granule obsahující Osk protein zděděny, dochází k diferenciaci buněk na zárodečné buňky (Lehmann, 2016). V procesu se také uplatňují jiné determinanty, které jsou popsány v dalších kapitolách 3.2.

Vzhledem k tomu, že hladina proteinu Osk a Nanos spolu výrazně koreluje, mutace Osk ovlivňuje jiné RNA a proteiny v zadní části pólu embrya a jakákoliv mislokace vede k ektopickým zárodečným buňkám, které jsou ovšem plně funkční (Saffman & Lasko, 1999). Také u mutantů může docházet k vážným vývojovým defektům v břišní oblasti (Jenny et al., 2006) či úplné ztrátě zárodečných linií, jako třeba v případech, kdy se osk mRNA úplně sníží a vede to až k časné zastavení oogeneze a následné sterilitě vajíčka v dospělosti (Jenny et al., 2006).

U *D. melanogaster* a téměř u všech bezobratlých se protein Osk produkuje ve dvou izoformách: krátký Osk (short Osk) a dlouhý Osk (Long Osk) (Krishnakumar & Dosch, 2018). Každá izoforma má odlišné funkce, které jsou klíčové pro vývoj zárodečných buněk a sestavení zárodečné plazmy (Hurd et al., 2016). Short Osk se vyskytuje ve větším množství, je zhruba 467 aminokyselin dlouhá a její primární funkce je vytvoření zárodečné plazmy v zadní části oocytu, kde i schraňuje proteiny jako Vasa, Tudor atd. a tím i dochází k indukci pólových buněk (Ephrussi et al., 1991b; Jeske et al., 2015; Krishnakumar & Dosch, 2018; Markussen et al., 1995; Yang et al., 2015). Dále se lokalizuje v zárodečných granulích, ve kterém můžeme najít mRNA a jiné proteiny. Long Osk je zhruba 606 aminokyselin dlouhý a jeho hlavní funkce je ukotvení zárodečné plazmy a short Osk na zadní část oocytu (Ephrussi et al., 1991b; Krishnakumar & Dosch, 2018; Markussen et al., 1995; Yang et al., 2015). Ke dvěma izoformám dochází pomocí alternativních iniciací translace ze dvou startovacích/start kodonů (Jeske et al., 2015; Markussen et al., 1995)

Samotný protein Osk se skládá ze dvou domén a to N – terminální LOKUS (OSK-N) a C-koncovou Osk doménu (Osk- C). Na N-terminálním konci lokusu se nachází doména, která formuje dimer stabilizovaný vodíkovými vazbami. Tato doména má strukturu winged-helix-turn-helix, skládá se ze tří šroubovic α a dvou vláken β , složených do svazku tří nebo čtyř alfa šroubovic, na něž je nabalen dvouvláknový antiparalelní list β . Tato doména také výhradně interaguje s RNA helikázou Vasa (Jeske et al., 2015; Yang et al., 2015). Osk- C je podobný strukturou lipáze, má globulární doménu složenou ze sedmi α -šroubovic, dvou β -řetězců a několika dlouhých smyček (Yang et al., 2015), dohromady tvoří kulovitou strukturu. Tato doména má také RNA vazebnou aktivitu a interaguje s 3' UTR klíčových zárodečných mRNA, jako je např. Nanos. Zhruba dvě třetiny povrchu této domény OSK jsou kladně nabitě nebo hydrofobní (Jeske et al., 2015; Lehmann, 2016).

Přestože se ukázalo, že bucky ball (Buc) zprostředkovává podobnou funkci jako Osk, nebylo zjištěno, že by byl jeho homolog. Tyto dva proteiny mají kompletně jinou strukturu (Bontems et al., 2009). Buc pomáhá k sestavení zárodečné plazmy během oogeneze a rané embryogeneze (Lehmann & Rongo, 1993). Buc mRNA je tedy lokalizován v plazmě ale i v germinal granuls (u obratlovců většinou Balbiani bodies). Stejně jako u Osk, mutanti bucky ball nesestaví germ plasm, což vede k nevytvoření zárodečných buněk. U mutantů, u kterých dojde k nadměrné expresi tohoto genu, dojde k indukci ektopických zárodečných buněk (Bontems et al., 2009; Lehmann & Rongo, 1993).

3.1.2 Indukční model

Naopak indukovaný model zahrnuje specifikaci zárodečných buněk prostřednictvím signálních interakcí mezi buňkami. K tomuto dochází později v embryogenezi a hrají zde velkou roli indukční signály a determinanty, které zamezí vzniku somatické buňky a místo toho vytvoří buňku zárodečnou. V embryu není určené místo, kde by se determinanty schraňovaly jako to bylo v předešlém modelu (Ewen-Campen et al., 2010a; Extavour & Akam, 2003b). Některé studie nabízejí teorie, že indukční mechanismus je pro mnohobuněčné organismy výhodnější, jelikož nabízí flexibilnější specifikaci zárodečných buněk na základě podnětů z prostředí (Bergeron et al., 2023). Evolučně by se tak mohlo jednat o výhodnější model specifikace, jelikož organismus může reagovat na podněty z prostředí později v embryogenezi.

3.2 Základní molekulární faktory určující zárodečnou linii

Tato kapitola se zaměřuje na klíčové molekulární faktory, které hrají zásadní roli ve specifikaci, vzniku, udržování a diferenciaci zárodečné linie. Mezi tyto faktory patří jak široce uznávané markery Piwi, Vasa a Nanos/Pumilio, tak i další důležité proteiny jako Tudor (Tud), Blimp1, Stella, Fragilis a E-kadherin. Tyto molekuly zastupují široké spektrum funkcí – od remodelace chromatinu a transkripční regulace přes ochranu genomu, RNA metabolismus, translaci až po buněčnou signalizaci a adhezi. Piwi například chrání integritu genomu piRNA-řízeným umlčováním transpozonů, Vasa reguluje RNA metabolismus nezbytný pro vývoj zárodečných buněk a Nanos/Pumilio udržuje jejich identitu prostřednictvím translace. Tato kapitola zdůrazňuje komplexnost molekulárních mechanismů, v nichž tyto proteiny spolupracují a umožňují tak správný vývoj a zachování zárodečné linie napříč mnohobuněčnými organismy.

3.2.1 Piwi

Piwi protein se zařazuje jako jeden z klíčových konzervovaných genů pro zárodečnou linii, který patří do rodiny Argonautů (Brennecke et al., 2007; Liu et al., 2004; Seervai & Wessel, 2013b). Jejich hlavní rolí je umlčování transpozomů prostřednictvím asociace s piRNA (Kalmykova et al., 2005). Ostatní z rodiny Argonautů se podílí na mechanismu RNA interference (RNAi) prostřednictvím malých interferujících RNA (siRNA), které rozpoznává enzym Dicerem (Meng et al., 2017). Obecně rodina Argonautů je významnou skupinou pro umlčování RNA, která na sebe váže různé malé nekódující RNA (miRNA, siRNA, piRNA), které vedou ke štěpení mRNA nebo inhibici translace (Höck & Meister, 2008).

U *D. melanogaster* můžeme najít rovnou tři druhy Piwi: Piwi, Aubergine (Aub) a Ago3 (Brennecke et al., 2007; Höck & Meister, 2008; Juliano et al., 2011b; Weick & Miska, 2014), všechny jsou důležité pro zárodečný vývoj fertilitu (Juliano et al., 2011a). Tato skupina genů je zapojená už od ranné embryogeneze, přičemž jsou velice integrované při tvorbě pólových buněk a také formování osy těla (body-axis patterning) (Darricarrère et al., 2013; Juliano et al., 2011b). Formování osy těla je obzvláště důležité, jelikož jakékoliv abnormality či mutace mohou způsobit špatnou migraci PGC a tím i neplodnost či vývojové abnormality (zvláště v oblasti podbřišku) (Brennecke et al., 2007; Juliano et al., 2011b; Van Den Brink & Van Oudenaarden, 2021). Piwi je jaderný gen, který najdeme jak v zárodečné, tak i somatické linii, za to Aub a Ago3 najdeme v cytoplazmě, a to konkrétně ve struktuře „nuage“ (Brennecke et al., 2007; Juliano et al., 2011b). Tyto proteiny můžeme najít i u jiných organismů, jejich homology a porovnání či umístění můžete najít v tabulce 5.

Druh	Jméno proteinu	Homolog	Umístění
<i>Drosophila melanogaster</i>	P-element induced wimpy testes (Piwi)	Piwi	jádro somatických a zárodečných buněk gonád
	Aubergine (Aub)	Aub	zárodečná plazma, zárodečné granule (nuage)
	Argonaute3 (Ago3)	Ago3	zárodečná plazma, zárodečné granule (nuage)
<i>Mus musculus</i>	Miwi	Piwi	cytoplazma
	Mili	Aub	cytoplazma
	Miwi2	Ago3	neví se (exprimace při spermatogenezi)
<i>Danio rerio</i>	Ziwi	Aub/Piwi	zárodečná plazma, zárodečné granule (p- granule)
	Zili	Aub	zárodečná plazma, zárodečné granule (p-granule)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Prg-1	Aub/Piwi	zárodečné granule (p-granule)
	Prg-2	Aub/Piwi	zárodečná linie (moc se zatím neví)

Tabulka 2 Porovnání homologů s Piwi proteiny u různých organismů a jejich umístění v buňce (přeloženo z Juliano et al., 2011a)

Proteiny Piwi hrají zásadní roli ve vývoji a funkci zárodečné linie u mnoha druhů (Carmell et al., 2002). Regulují udržování zárodečných buněk, determinaci zárodečné linie a gametogenezi, včetně meiózy a spermiogeneze (Juliano et al., 2011). Kritickou funkcí Piwi proteinů je umlčování transpozonů prostřednictvím jejich interakce s piRNA, která chrání genom před aktivitou transpozabilních elementů a tím zajišťuje i genomovou stabilitu (Aravin et al., 2007; Brennecke et al., 2007). Kromě toho se Piwi proteiny podílejí na epigenetické

regulaci, jako je tvorba heterochromatinu a metylace DNA, a také na posttranskripční regulaci genů degradací nebo stabilizací mRNA (Ozata et al., 2019)

Transponovatelné elementy jsou DNA sekvence, které se v rámci genomu mohou pohybovat, jsou nedílnou součástí organismu jak eukaryotických, tak prokaryotických. U některých organismů tvoří velkou část genomu, tyto elementy však mohou vytvářet mutace a s ohledem na procentuální zastoupení v genomu by se mohli kumulovat během let či předávat do dalších generací (Brennecke et al., 2007). Piwi má v zárodečné linii za úkol potlačovat transpozomy a to díky piRNA (PIWI interacting RNA), které jsou zhruba 21-35 nukleotidů dlouhé (Weick & Miska, 2014). Další charakteristickou vlastností piRNA jsou jejich konce, na 5' konci najdeme uridin a 3' konec je přítomna methylace. (Juliano et al., 2011a)22). V různých organismech, jako je *D. melanogaster*, *C. elegans*, *M. musculus*, *D. rerio* se značné množství piRNA tvoří v oblastech mezi geny, kde se nachází spousta transponovatelných elementů (TE). Proteiny Piwi hrají v tomto procesu zásadní roli, neboť potlačují aktivitu transponovatelných elementů (TE), a tímto způsobem chrání integritu genomu zárodečných buněk. Mutace v genech Piwi, Aub nebo Ago3 mohou tuto represi narušit, což vede k deregulaci TE a genomové nestabilitě (Weick & Miska, 2014).

Dále také Piwi interaguje s proteinem Vasa (Thomson & Lin, 2009), který se také řadí jako jeden z důležitých molekulárních faktorů pro zárodečnou linii. Tento protein je konzervovaný a spolu s Piwi proteiny se nachází v zárodečných granulích.

3.2.2 Vasa

Vasa patří k jedněm z klíčových genů pro vývoj zárodečné linie. Prvně byl tento gen objeven u *D. melanogaster*, ale s postupem času se ukázalo, že má spousty homologů u jiných živočichů (Gustafson & Wessel, 2010; Hay et al., 1988; Seervai & Wessel, 2013). Díky objevení podobnosti elf4a a Vasa se můžeme domnívat, že tento gen slouží jako translační regulátor při určování a udržování zárodečných buněk (Lasko & Ashburner, 1988).

Strukturně se řadí mezi DEAD-box RNA helikázy (Linder & Lasko, 2006; Toru Sengoku, 2006), které dokážou hydrolyzovat ATP. Díky tomu se mohou vázat na nukleové kyseliny a pomáhají remodelovat sekundární strukturu RNA. Svůj název dostaly podle přítomnosti sekvence Asp (D)–Glu (E)–Ala (A)–Asp (D), v jádru samotného DEAD – box proteinu se nachází dvě konzervované domény podobné/příbuzné ReqA, které jsou spojené pomocí linkeru (Linder & Lasko, 2006). Právě tato doména se váže na RNA a ATP, díky

čemuž dochází ke změně konformace (otevřená/uzavřená) (Sengoku et al., 2006; Taschuk & Cherry, 2020).

Klíčové funkce Vasy v zárodečné linii spočívají ve formování pólové plazmy a regulaci na úrovni transkripce i translace. Interaguje také s proteinem Oskar (Osk) a zajišťuje stabilitu zárodečné linie. Mutace v tomto genu mají negativní dopad na vývoj nebo samotnou tvorbu zárodečných linií. Díky aktivitě RNA helikázy schopné rozplétat RNK a zapojené do mnoha metabolických procesů RNA — jako jsou transkripce, biogeneze ribozomů, sestřihování (splicing), editace RNA a export z jádra, dochází k posttranslační regulaci. Tyto procesy zahrnují iniciaci translace a obratnost RNA (Linder & Lasko, 2006; Seervai & Wessel, 2013c).

Interakce mezi Vasou a eIF5B má zásadní vliv na proces iniciace translace proteinů i na samotný průběh translace. Pokud dojde k mutacím oslabujícím tuto interakci, může to vést k problémům se sterilitou nebo sníženou fertilitou u organismů. Gen Vasa hraje klíčovou roli při definování prostorové orientace oocyty konkrétně jeho anteroposteriorní a dorzoventrální osy, což je nezbytné pro správný vývoj embrya později během ontogeneze. Dále také interaguje s Osk, což vede k sestavení polárních granulí, které jsou zásadní pro samotný vývoj zárodečných linií. Tyto dva geny jsou taky životně důležité ke správnému umístění Nanos mRNA, které zodpovídají za regulaci exprese raného vývoje embrya, tak i celkovou organizaci budoucího organismu (Breitwieser et al., 1996; Johnstone & Lasko, 2004; Kubíková et al., 2020).

3.2.3 Nanos/Pumilio

Další důležitý gen, který byl prvně objeven u *D. melanogaster* je Nanos (Nos) (Irish et al., 1989). Jedná se o velice konzervovaný gen napříč živočichy, který hraje klíčovou roli pro vývoj zárodečných linií, určení polarity přední a zadní osy embrya (anterior–posterior osa) regulací translace specifických mRNA a přispívá k tvorbě abdominálních segmentů (De Keuckelaere et al., 2018; Ewen-Campen et al., 2010; Kobayashi et al., 1996). Kromě své role při tvorbě os je Nos nezbytný pro přežití a správnou migraci (PGC) do gonád. Mutace v genu Nos mohou vést k defektům ve vývoji a migraci zárodečných buněk, což ovlivňuje plodnost (De Keuckelaere et al., 2018). Nos geny se nacházejí téměř u všech druhů, včetně obratlovců i bezobratlých (Extavour & Akam, 2003b). Rodina genů Nos zahrnuje několik homologů, přičemž různé druhy mají různý počet variant. Například *C. elegans* má tři homology: Nanos1, Nanos2 a Nanos3 (De Keuckelaere et al., 2018).

Nos bychom zařadili do skupiny RNA vazebných proteinů a skládá se z karboxylového motivu zinc finger (CCHC)₂ na C terminálním konci (De Keuckelaere et al., 2018) a na tyto domény se později mohou vázat RNA a proteiny. Můžeme i očekávat variabilitu ve velikosti proteinu Nos, většinou se jedná o 100-400 aminokyselin. Zinc finger motiv obsahuje dva motivy C2HC, tento motiv je také důležitý pro vazbu RNA a interakci s Pumilio (De Keuckelaere et al., 2018; Ewen-Campen et al., 2010b).

Nos interaguje s mnoha proteiny a molekulami, ale jedna z nejvýznamnějších interakcí je s proteinem Pumilio. Společně tvoří komplex, který reguluje vývoj zárodečné linie a genovou expresi tím, že působí jako post-transkripční represor (De Keuckelaere et al., 2018; Ewen-Campen et al., 2010b). Tento komplex funguje u *D. melanogaster* na principu svorky (Weidmann et al., 2016), kdy Nos se naváže na NRE (Nanos regulatory/response elements) (De Keuckelaere et al., 2018), které najdeme na 3' nepřekládané oblasti (UTR) mRNA. Na každém NRE můžeme najít PRE (Pumilio Response Element), což slouží jako specificky sekvenčně dané vazebné místo (Curtis et al., 1997). Nos funguje jako svorka, které obklopuje Pumilio i RNA (De Keuckelaere et al., 2018; Weidmann et al., 2016). K regulaci exprese dochází, když se Pumilio váže na specifické oblasti mRNA, které mají za cíl regulovat nebo potlačovat prostřednictvím různých mechanismů. Tyto mechanismy zahrnují komplex CCR4-NOT, který po zkrácení poly(A) ocasu vede k degradaci mRNA. Alternativně se komplex CCR4-NOT může vázat a potlačovat mRNA, což vede k její degradaci (Arvola et al., 2019). Represivní komplexy mohou zůstat spojené s mRNA.

Mezi další interagující molekuly řadíme E-kadherin a Vimentin, gen *Dmrt1* a komplex CCR4-NOT. Nos zvyšuje Vimentinu délku poly-A konce a stabilizuje tím translaci. Gen *Dmrt1*, poté co interaguje s *nanos3*, se lépe množí a dělí do zárodečných buněk, zatím co komplex CCR4-NOT degraduje a reguluje mRNA. Mutanti Nos narušují funkci E-kadherinu v buněčné adhezi, což může přispět k tvorbě nádorů (Weidmann et al., 2016).

Pumilio bychom mohli také zařadit mezi RNA vazebné proteiny, patří však do rodiny PUF. Stejně jako Nos je najdeme u většiny organismů a hned ve více formách, jelikož se stejně jako Nos během evoluce konzervovaly (De Keuckelaere et al., 2018; Goldstrohm et al., 2018). Primární funkce toho proteinu jsou především potlačení genové exprese a někdy i degradace mRNA, ale také hraje roli ve vývoji zárodečných buněk, genové stabilitě, migraci PGC a buněčném cyklu (Goldstrohm et al., 2018; Sternburg et al., 2023; Wickens et al., 2002).

Protein se skládá z N terminálního konce, PUM-HD (Pumilio Homology Domain) domény, ve které je TRM (Tripartite Recognition Motif). Samotná PUM-HD doména je vytvarovaná do tvaru půlměsíce a obsahuje zhruba osm alfa helixů. TRM je vnořená do této domény a funguje jako vyhledavač specifických sekvencí na RNA, díky kterému se může pumilio na mRNA přichytit (Goldstrohm et al., 2018; Sternburg et al., 2023; Wickens et al., 2002).

3.2.4 Tudor

Rodina proteinů Tudor, je velice bohatá a vyznačuje se především přítomností Tudor domény. Tato doména obsahuje zhruba 60 aminokyselin, a díky této specifické struktuře umožňuje proteinům s těmito doménami plnit roli adaptorů, které rozpoznávají a interagují s methylovanými lysinovými a argininovými zbytky na daných molekulách (Pek et al., 2012; Sprangers et al., 2003). Tyto proteiny můžeme najít u mnoha organismů, včetně savců (Arkov et al., 2006).

Tyto proteiny hrají důležitou roli hned v několika aspektech metabolismu RNA. Především se jedná o regulaci malých RNA drah (piRNA, siRNA, miRNA), sestřihu (splicing), dále se podílejí na organizaci chromatinu a modifikaci histonů a spolupracují v molekulárních komplexech, což naznačuje jejich společnou roli v různých buněčných procesech (Pek et al., 2012).

Již v předešlé kapitole jsem u proteinu Piwi zmiňovala regulaci malých RNA (konkrétně piRNA) a Tudor se v tomto procesu také podílí. Dokáže navázat na substráty a zaujímá funkci adaptéru, který napomáhá k sestavování komplexů pro genovou regulaci (Ghildiyal & Zamore, 2009; Pek et al., 2012). V RNA interferenci pomáhá umlčovat transpozomy a v RISC komplexu pomáhá stříhat RNA (Pek et al., 2012).

Zvláště bych chtěla zdůraznit roli u *D. melanogaster* v zárodečných granulích – zde jako polar granuls. Tudor hraje v tomto případě velmi důležitou roli, jelikož on sám je součástí polárních granulí, a dokonce napomáhá udržovat velikost a počet granulí. Dále také jeho domény jsou nezbytné pro lokalizaci určitých proteinů právě v těchto granulích, a tento mechanismus přispívá k tvorbě a vývoji zárodečných buněk (Arkov et al., 2006; Boswell & Mahowald, 1985).

3.2.5 Fragilis

Rodina genů *Fragilis* kóduje transmembránové proteiny, které jsou zvláště u savců evolučně konzervované a u myši se nachází na chromozomu 7 (Lange et al., 2003). Tato rodina sčítá několik genů (konkrétně až pět), ovšem pro zárodečnou linii jsou nejdůležitější *fragilis1* a *fragilis3*. Tyto transmembránové proteiny pomáhají determinovat a udržovat zárodečnou linii specifickými mechanismy. *Fragilis1* se uvolňuje do buněk, které se později stanou PGC, tudíž tento protein stojí (společně s dalšími) na začátku diferenciace zárodečných linií. Zatímco *fragilis3* se exprimuje už do migrujících buněk a pomáhá udržet integritu zárodečné linie (Tanaka et al., 2005).

3.2.6 Stella

Tento protein, známý také jako *Dppa3* nebo *PGC7* hraje klíčovou roli v časném embryonálním vývoji zejména v PCS (Payer et al., 2003). Jako gen s maternální efektem ochraňuje genom před modifikacemi, zejména před enzymem TET (Ten-Eleven Translocation), který přeměňuje 5-methylcytosin na 5-hydroxymethylcytosin. Tento krok je především důležitý pro DNA metylaci (odstranění methylové skupiny), která může mít za následek změnu struktury chromatinu či vliv na genovou expresi. *Stella* interaguje s TET a potlačuje jeho funkci a tím i zamezuje umožnění metylace (Bian & Yu, 2013).

Stella není důležitá pro počáteční specifikaci zárodečných buněk u myši, ale hraje roli při udržování zárodečné linie (L. Han et al., 2019), navíc její nedostatek může způsobovat vývojové vady. Jeho absence v embryonálním vývoji může vést k potížím plodnosti organismu, zejména je studována na myších (Payer et al., 2003), u kterých vznikají PGC i bez ní, ale účastní se důležité funkce zejména během přechodu z mateřské do zygotické fáze (MZT), což je kritický proces raného vývoje a zajišťuje správnou aktivaci embryonálního genomu (Huang et al., 2017). Celkově jde tedy říct že, její specifická role při specifikaci zárodečných buněk je méně kritická ve srovnání s jejími širšími funkcemi během MZT.

3.2.7 Blimp1

Blimp1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1), známý také jako *PRDM1* je klíčový protein, zejména u savců, kde hraje významnou roli při segregaci zárodečných buněk. Jeho exprese v raných fázích embryonálního vývoje je klíčová pro buněčnou diferenciaci a celkový vývoj (Hopf et al., 2011). U savců je obzvláště důležitý, jelikož se podílí při tvorbě mléčných žláz, placenty, a dokonce i končetin, ale tyto funkce zastává až v pozdějším vývoji embrya (Ahmed et al., 2016). Rozmanitost funkcí tohoto proteinu ukazuje i to, že dokáže

ovlivnit imunní systém, kde ovlivňuje specifickou i vrozenou imunitu (Nadeau & Martins, 2022).

Blimp1 je především transkripční represor, který udržuje zárodečnou linii tím, že potlačuje somatickou expresi. Dále je velice důležitý pro regulaci PGC, jelikož se syntetizuje už v prekurzorech PGC a také v nich posiluje signálů (markerů) pro vznik zárodečné linie (Hopf et al., 2011). Absence Blimp1 v embryu prekurzorů PGS, způsobí nedostatečnou represii somatických a genů a následné buňky, ze kterých by se v normálním případě staly PGC, budou vytvářet buňky podobné PGC, které ale nedokáží migrovat. Toto bude mít za následek neplodnost potomka (Saitou et al., 2005).

3.2.8 E- kadherin

E -kadherin patří do skupiny kadherinů, které můžeme najít především v buněčné adhezi, jelikož jsou to transmembránové proteiny. Kadheriny tvoří adhezní spoje, které vyžadují ionty vápníku v extracelulárním prostředí, aby stabilizovaly svou strukturu a usnadnily adhezi mezi buňkami (Maître & Heisenberg, 2013). Kadheriny můžeme dělit do několika skupin: klasické (N a E- kadheriny), desmosomální, protokadherin a atypické kadheriny (Punovuori et al., 2021).

Významnost E -kadherinu pro zárodečnou linii ukazuje fakt, že má hned několik funkcí, již zmiňovanou roli při migraci, udržování hranice mezi somatickou a zárodečnou linií, tato funkce je známá u *D. melanogaster*, kdy ztráta či mutace E- kadherinu způsobuje fúzi buněk. Dále je také důležitý v pozdějším vývoji pro uspořádání tkání a adheze (Jenkins et al., 2003). V procesu adheze, kde je právě E- kadherin klíčovou molekulou, která usnadňuje agregaci zárodečných buněk a migraci (Di Carlo & De Felici, 2000b).

3.2.9 další

Determinace zárodečné linie je komplexní proces, který zahrnuje řadu molekulárních faktorů. Kromě těch, které jsme již zmínili, existuje mnoho dalších, které hrají klíčovou roli např. BMP4, Bruno, Capuccino, Germ-cell-less, Staufen a mnoho dalších. Všechny jejich funkce jsou rozepsané v tabulce 3, včetně jejich mutací (Ewen-Campen et al., 2010a; Extavour & Akam, 2003a; Houston & King, 2000a; Saffman & Lasko, 1999; Seervai & Wessel, 2013a).

Protein/Gen	Funkce	Organismy	Mutace	Zdroje
Piwi	udržení identity zárodečné linie regulací transpozonů prostřednictvím dráhy piRNA	<i>Drosophila melanogaster, C. elegans, Mus musculus</i>	porušení udržení zárodečné linie, neplodnost	(Brennecke et al., 2007; Darricarrère et al., 2013; Juliano et al., 2011a; Kalmykova et al., 2005)
Vasa	sestavení zárodečných granulí a specifikaci zárodečné linie	<i>Drosophila melanogaster, C. elegans, Danio rerio</i>	selhání ve vývoji zárodečných buněk, neplodnost	(Breitwieser et al., 1996; Gustafson & Wessel, 2010; Lasko & Ashburner, 1988)
Nanos/Pumilio	potlačuje expresi/represe somatických genů v buňkách zárodečné linie	<i>Drosophila melanogaster, C. elegans</i>	ztráta identity germinální linie, somatická diferenciace??	(Curtis et al., 1997; De Keuckelaere et al., 2018; Goldstrohm et al., 2018; Irish et al., 1989; Kobayashi et al., 1996)
Tudor	sestavení zárodečných granulí a specifikace zárodečné linie	<i>Drosophila melanogaster, C. elegans</i>	porušení vývoje zárodečných buněk	(Arkov et al., 2006; Boswell & Mahowald, 1985)

Fragilis	regulace migrace a vývoj zárodečných buněk	<i>Mus musculus</i>	abnormální migrace zárodečných buněk, snížená plodnost	(Lange et al., 2003)
Stella	zachování pluripotence v PGC	<i>Mus musculus</i>	snížená pluripotence, porušený vývoj zárodečných buněk	(Bian & Yu, 2013; L. Han et al., 2019; Huang et al., 2017)
Blimp1	potlačení exprese/represe somatických genů v PGC	<i>Mus musculus</i>	selhání ve specifikaci PGC	(Ahmed et al., 2016; Hopf et al., 2011)
E- kadherin	adheze a interakce buněk během raného vývoje – migrace	<i>Mus musculus</i> , <i>Danio rerio</i>	porušená migrace a adheze zárodečných buněk	(Di Carlo & De Felici, 2000a; Jenkins et al., 2003)
BMP4	reguluje diferenciaci PGC, ovlivňuje tvorbu dorzoventrální osy (a hraje roli v diferenciaci oogoniálních kmenových buněk u myší)	<i>Mus musculus</i> , <i>Xenopus laevis</i>	porušená diferenciaci PGC, vývojové abnormality	(Hopf et al., 2011)

Oskar	sestavování zárodečného plazmatu a specifikaci zárodečné linie, působí jako scaffoldový protein pro nábor dalších komponent zárodečného plazmatu	<i>Drosophila melanogaster</i> (a další holometabolní hmyz)	selhání ve sestavení zárodečného plazmatu, ztráta buněk zárodečné linie	(Ephrussi et al., 1991b; Ephrussi & Lehmann, 1992; Jenny et al., 2006; Jeske et al., 2015; Lehmann, 2016)
Bucky ball	sestavení zárodečné plazmy, nezbytný pro polaritu oocyty a tvorby zárodečných buněk	<i>Danio rerio</i>	selhání tvorby zárodečné plazmy a zárodečných buněk, neplodnost	(Bontems et al., 2009)
Bruno (Bru)	reguluje translaci mRNA pro zárodečnou plazmu	<i>Drosophila melanogaster</i>	porušený vývoj zárodečné linie kvůli nesprávné regulaci mRNA	(Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999; Webster et al., 1997)
Capuccino (Capu)	lokalizace mRNA pro zárodečnou plazmu	<i>Drosophila melanogaster</i>	abnormální lokalizace zárodečného plazmatu,	(Extavour & Akam, 2003a)

			porušený vývoj zárodečné linie	
Germ-cell-less (Gcl)	formace zárodečných buněk	<i>Drosophila melanogaster</i>	selhání ve formaci zárodečných buněk, neplodnost	(Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999)
Staufen (Stau)	lokalizace a translace mRNA pro zárodečnou linii	<i>Drosophila melanogaster</i>	porušený vývoj zárodečné linie kvůli nesprávné lokalizaci mRNA	(Ewen- Campen et al., 2010a; Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999)
PIE-1	potlačení exprese somatických genů; součást P granulí	<i>C. elegans</i>	ztráta zárodečné linie díky špatné diferenciaci	(Ewen- Campen et al., 2010a; Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999)
MEX-1	specifikace zárodečných buněk; součást P granulí	<i>C. elegans</i>	narušují segregaci P granulí, zabraňují tvorbě zárodečných buněk	(Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999)

POS-1	regulace buněk v rané embryogenezi	<i>C. elegans</i>	narušení vývoje zárodečných buněk	(Saffman & Lasko, 1999)
MES (např. MES-2/3/4/6)	regulátory chromatinu; udržují expresi genů zárodečné linie a epigenetický stav	<i>C. elegans</i>	sterilita kvůli ztrátě exprese genů zárodečné linie a nesprávné regulaci chromatinu	(Extavour & Akam, 2003a; Saffman & Lasko, 1999)

Tabulka 3 Souhrn genů/proteinů determinující zárodečnou linii, popisující jejich funkci, zastoupení u modelových organismů a mutaci

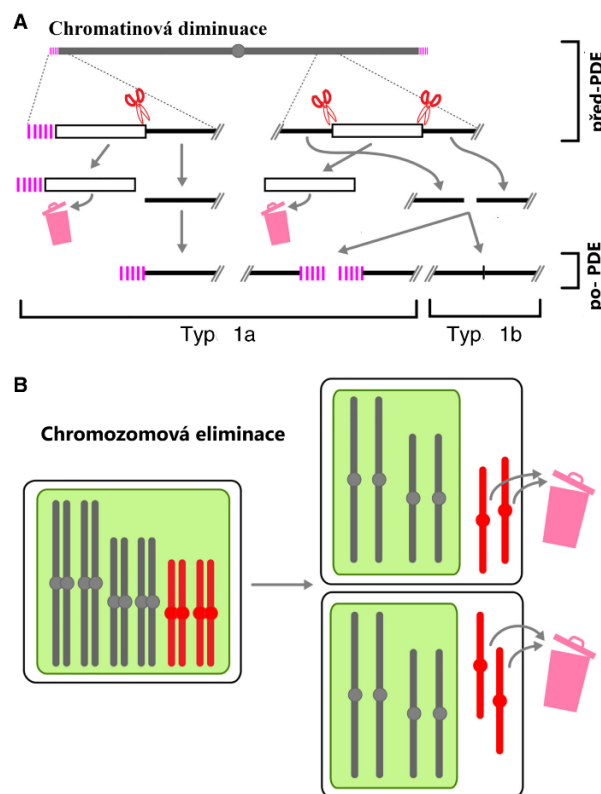
4 Programovaná DNA eliminace a její role v rozlišení zárodečné a somatické linie

U některých linií živočichů bývá rozlišení zárodečné a somatické linie spojeno s programovanou DNA eliminací části genomu v somatických buňkách. Programovaná DNA eliminace je proces, ve kterém dochází k odstranění fragmentů genomu nebo rovnou celého chromozomu z některých buněk organismu. Velmi často je to ze somatických buněk, a to v průběhu raného embryonálního vývoje v době, kdy dochází k rozlišení zárodečných a somatických buněk. Tento proces byl pozorován u celé řady eukaryotických organismů, včetně některých druhů hmyzu, pěvců, sliznatek a mihulí anebo hlístic (Smith et al., 2020; Zagoskin & Wang, 2021).

V roce 1887 Theodor Boveri poprvé pozoroval tento proces u háďátka *Parascaris univalens*. Jeho výzkum vedl k poznání, že podstatná část chromatinu je eliminována ze somatických buněk během rané embryogeneze, zatímco zárodečné buňky zůstávají nedotčeny (Maderspacher, 2008; Zagoskin & Wang, 2021).

U programované DNA eliminace můžeme určit dva různé typy, které se objevují, a to takzvaná chromozomová eliminace nebo chromatinová diminuace. Chromozomová eliminace je typická pro pěvce, některé skupiny hmyzu, sliznatky a mihule. Během toho procesu dochází ke ztrátě jednoho i více chromozomu (Mochizuki, 2024; J. Wang & Davis, 2014).

Chromatinová diminuace je proces, při kterém dojde ke zlomení chromozomu a ulomený konec chromozomu je později degradován v cytoplasmě (Etter et al., 1991a). Tento typ můžeme najít u organismů jako hlístice atd. (Mochizuki, 2024; J. Wang & Davis, 2014). K redukci chromatinu většinou dochází v ranné embryogenezi v jádře (a to konkrétně při mitóze – anafáze druhého dělení), kde dochází k zlomení pomocí double-strand-break části chromozomu a jeho následné eliminaci. Tento proces provází i diferenciace zárodečných a somatických linií (Etter et al., 1991a; Streit & Davis, 2016; Tobler, 1986), právě aby nedošlo k redukci chromatinu v zárodečných buňkách. Samotné načasování a množství eliminovaného chromatinu se ale může lišit (Streit & Davis, 2016). Existují dva typy chromatinové diminuace jeden, díky kterému dojde k eliminaci konce/raménka chromozomu, a proto poté mohou vznikat „de novo“ telomery. V druhém typu dochází k eliminaci vnitřní části chromozomu, následně zbylé části chromozomu jsou poté ligovány (Mochizuki, 2024).



Obrázek 4 Průběh chromatinové diminuace a chromozomové eliminace (přeloženo a převzato z Mochizuki, 2024)

Během tohoto procesu je eliminována u mnoha živočichů velká část genomu. Somatické buňky jsou tak zbaveny především repetitivních sekvencí, některé geny a transponovat elementy (J. Wang et al., 2017; Zagoskin & Wang, 2021). Nejlépe jsou

prozkoumané eliminované části genomu u Hlístic (Nematoda) kdy studie ukázala, že může dojít k eliminaci 5-10% (studie byla zaměřená na *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis* a *Parascaris univalens*)(J. Wang et al., 2017). Ovšem u jiných organismů, se toto procentuální zastoupení může lišit. V některých případech se může jednat až o 90 % (Chmielewska et al., 2018).

Podle studie vědců z Institutu zoologie na univerzitě ve Fribourgu, zkoumané na *Ascaris lumbricoides*, se většina eliminované části skládá z mobilních prvků Tas (transposon-like element of *Ascaris*). Zhruba jedna čtvrtina Tas-1 byly eliminovány ze somatické linie, zatímco všechny Tas-2 byly eliminovány. Ze studie tedy vychází, že Tas1 jsou po genomu náhodně rozprostřené, zatímco Tas-2 jsou umístěny v oblastech, které vždy podléhají DNA eliminaci. S Tas jsou také odstraněny i sekvence v okolí těchto transponovatelných elementů (Aeby et al., 1986). Další studie, u stejného organismu, zjistila, že je eliminován ALEP-1, který má ribozomální funkci a nezbytný pro samotnou buňku a translaci. Tato eliminace může sloužit jako permanentní genová regulace pro somatické buňky (Etter et al., 1991b).

Programovaná DNA eliminace tak může mít více než jednu funkci, a to samotné rozlišení somatické a zárodečné linie, evoluční adaptace, umlčování genů a repetitivních sekvencí, determinaci pohlaví a samotné napomáhání vzniku nových genů (Smith et al., 2020; Zagoskin & Wang, 2021). Právě díky výskytu v ranné embryogenezi dokáže PDE diferenciovat somatické a zárodečné buňky, díky trvalému umlčení repetitivních sekvencí a specifických genů, které se nadále exprimují v zárodečných buňkách. Díky tomuto procesu tak dojde k trvalému rozlišení zárodečné a somatické linie, které vybočuje z klasických modelů specifikace (Zagoskin & Wang, 2021) .

Mezi další organismy, u kterých dochází k PDE, jsou pěvci. U této skupiny ptáků dochází specifickému odstranění celého chromozomu, zvaného germ – linerestricted chromosom (GRC). Pro výzkum toho fenoménu se ve většině případů používá zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*). V roce 1998 si poprvé tohoto jevu všimla Maria Ines Pigozzi a Alberto Solari, během studie meiotického chování pohlavních chromozomů u samic a samců ptáků. Během toho však našli chromozom v zárodečných buňkách, který však chyběl v buňkách kostní dřeně/somatických buňkách (Pigozzi & Solari, 1998). Později se však ukázalo, že GRC je přítomen u všech druhů pěvců (Torgasheva et al., 2019).

Při procesu programované DNA eliminaci dochází k selektivní eliminaci chromozomů ze somatických buněk během časně embryogeneze. Tyto chromozomy sdílejí charakteristiky s

B chromozomy (P. Borodin et al., 2022), které se vyskytují v řadě organismů a jejich obsah většinou není životně důležitý pro organismy. Jsou to převážně parazitické chromozomy, které se často dělí nemendelistické (Ahmad & Martins, 2019; Dhar et al., 2019). GRC se nacházejí u všech zkoumaných pěvců, ale vykazují mezidruhovou variabilitu, pokud jde o velikost a genetické složení (P. Borodin et al., 2022; Torgasheva et al., 2019). Samice mají typicky dvě kopie GRC, zatímco samci mají jednu, což může vést k sexuálnímu dimorfismu (Pigozzi & Solari, 2005a). U samců je GRC téměř vždy eliminován ze spermatocytů během prvního meiotického dělení gametogeneze, což vede k jeho primárnímu přenosu přes mateřskou linii (Pigozzi & Solari, 1998c, 2005; P. M. Borodin, 2023; Pei et al., 2022). Tento proces zajišťuje, že GRC jsou převážně zděděny od samic, ačkoli byly pozorovány vzácné případy otcovské dědičnosti (P. M. Borodin, 2023).

5 Evoluční význam

Zárodečné linie jsou klíčové pro evoluci, protože přenášejí genetický materiál z jedné generace na druhou. Tento přenos genetické informace umožňuje zachování a vznik genetické variability, která slouží jako základ pro evoluční mechanismy, jako je přirozený výběr a genetický drift. Zárodečné linie tak ovlivňují přežití a reprodukční úspěch potomků, a nakonec formují evoluční směrování druhů (Crow, 2000). Evoluce je pro každý organismus velice důležitá, jelikož jim dovoluje se přizpůsobit se pořád měnícímu se prostředí, dále také pomáhá k lepší reprodukční úspěšnosti, jelikož podporuje genetickou variabilitu a vybírá evoluční znaky a chování které to podporují (Bergeron et al., 2023; Crow, 2000).

S modely determinace souvisí dvě hypotézy: Hypotéza o specifikaci PGC (PGC-Specification Hypothesis), deterministicko-stochastická hypotéza (Deterministic-Stochastic Hypothesis). Hypotéza o specifikaci PGS tvrdí, že zděděný model pomocí oddělení somatický a zárodečných buněk a tím umožňuje flexibilitu, která by se měla především projevit v proteinových sekvencích a morfologické variabilitě. Tato hypotéza je závislá především na somatickém signálu a jeho přesnosti, která poté může snižovat či zvyšovat evoluční rychlost. Hypotéza má svoje kritiky, kteří poukazují na fakt, že se zatím nenašlo žádné výrazné zrychlení evoluce proteinů a speciaci/ morfologickou rozmanitost v těchto liniích. Toto ovšem toto může být způsobeno je vývojové časování a ekologické niky (Johnson & Alberio, 2015; Whittle & Extavour, 2017).

Hypotéza ovšem nespĺnila očekávaný výsledek, se kterým se počítalo – nenašlo se viditelné/výrazné zrychlení v evoluci proteinů a morfologických strukturách v těchto liniích. Tento fakt ovšem může být vysvětlen ekologickou nikou a časováním vývoje.

Zatímco druhá deterministicko-stochastická hypotéza se spíše zaměřuje na období a čas ve, kterém dochází k specifikaci PGC a označuje ho také jako hlavního činitele pro evoluci. Hypotéza pracuje s dvěma mechanismy: deterministická a stochastická. Zatímco deterministický model se ranně specifikuje a zahrnují oba modely – indukce a preformace, stochastický model zahrnuje organismy, které se později specifikují, a tudíž mohou být ovlivněny vnějšími faktory. Hypotéza předpokládá, že deterministický model bude v průběhu evoluce vykazovat rychlejší a rozmanitější variabilitu a tudíž bude převládat nad scholastickým (Johnson & Alberio, 2015; Whittle & Extavour, 2017).

Samotná diferenciace somatické a zárodečné linie, může představovat výhody pro daný mnohobuněčný organismus. Týká se to především snížení počtu dělení a omezení mutací, tím i kompetice mezi buňkami ke vzniku zárodečné linie a také i uvolnění tlaku (Wahl & Murray, 2016).

Právě díky diferenciaci linií, mohou somatické buňky plně převzít svoji funkci a specializovat se v tělech mnohobuněčných organismů. Toto může poskytovat zárodečným liniím před např.: oxidativním stresem nebo replikačními chybami/mutacemi, které se často kumulují v somatických buňkách a díky tomu uvolní i zárodečné buňky od selekčního tlaku a zárodečné linie jsou také v některých případech orientovány do míst s nižším vystavením k mutagenům (Wahl & Murray, 2016). Tento fakt je dobře viditelný ve studii od B. Milhollanda z Albert Einstein College of Medicine z New Yorku, kdy somatické fibroblasty u myši naakumulovaly mutace v míře $\sim 2 \times 10^{-7}$ na pár bází (bp), zatímco v zárodečné linii je to $\sim 5 \times 10^{-9}$ (bp). Tento rozdíl vzniká v důsledku toho, že zárodečné buňky minimalizují replikační cykly (Milholland et al., 2017). To že by v zárodečných buňkách vznikalo méně mutací, může být také způsobeno zvýšením mechanismů na opravy DNA či programovanou buněčnou smrt, jehož právě ta eliminuje spermatogonie nesoucí relativně vyšší frekvenci mutací. Naopak mezi reparační procesy DNA můžeme zařadit: base excision repair (BER) nebo mismatch repair systém (Murphey et al., 2012) .

Rychlost dělení somatických buněk se výrazně liší v závislosti na typu tkáně. Zatímco některé tkáně, jako například střevní epitel nebo kůže, mají vysoký obrat a dělí se často, jiné tkáně obsahují buňky, které se dělí zřídka nebo vůbec. Během života organismu, jako je *Mus*

musculus, mohou somatické buňky projít několika až tisíci děleními v závislosti na typu tkáně a délce života organismu. Naproti tomu zárodečné buňky procházejí během gametogeneze omezenějším počtem dělení. U *Mus musculus* proces od PGC ke zralé gametě obvykle zahrnuje přibližně 20-30 buněčných dělení u mladých dospělých jedinců, ačkoli tento počet se u mužů s věkem zvyšuje, jelikož se dělí po celý život. U samic je počet dělení nižší, protože oögonie vstupují do meiózy během embryogeneze a po narození se dále nedělí (Maamar et al., n.d.).

Zatímco rychlost a počet dělení somatických buněk jsou tedy velmi variabilní a závislé na tkáni, zárodečné buněk se vyznačují relativně stálým a nižším počtem dělení během gametogeneze.

6 Závěr

Proces určení zárodečné linie je u mnohobuněčných organismů různorodý a je klíčový pro přenos genetické informace mezi generacemi. Zárodečné buňky, které dávají vzniknout pohlavním buňkám, jsou zásadní pro kontinuitu druhu a obvykle se oddělují od somatických buněk již v raných fázích embryonálního vývoje, i když načasování a mechanismy se mezi druhy liší. Oddělení zárodečné a somatické linie vytváří tzv. Weismannovu bariéru, která omezuje dědičnost, jelikož brání přenosu mutací ze somatických buněk do zárodečných. U živočichů se vyvinuly dva hlavní modely specifikace zárodečné linie: zděděný model, u kterého jsou mateřské determinanty, jako jsou Oskar, Vasa, Nanos a Piwi, lokalizovány ve specializovaných cytoplazmatických oblastech, jako je zárodečná plazma či zárodečné granule; a indukovaný model, kde je osud zárodečných buněk určen později prostřednictvím mezibuněčné signalizace, jak je tomu u savců.

Molekulární determinanty, které se často využívají jako markery zárodečných buněk, hrají klíčovou roli při specifikaci, udržování a ochraně zárodečné linie. Některé z nich, například Piwi, Vasa nebo Nanos/Pumilio, jsou vysoce konzervované proteiny, které se podílejí na sestavování specializovaných cytoplazmatických komponentů (zárodečné granule, pólová plazma) či jsou v nich lokalizovány. Tyto faktory chrání identitu zárodečné linie, potlačují expresi somatických genů a regulují aktivitu transponovatelných elementů. Navzdory rozdílům v mechanismu specifikace jsou často konzervované cesty a interakce proteinů, které zajišťují správné založení a udržení zárodečných buněk napříč různými živočišnými taxony. Na tomto mechanismu se podílí opravdu veliké množství molekulárních determinantů, které jsem shrnula v tabulce 3.

Rozlišení mezi zárodečnou a somatickou linií u některých organismů zahrnuje programovanou eliminaci DNA, genetický mechanismus, který selektivně odstraňuje repetitivní sekvence a specifické geny, čímž vytváří trvalý molekulární rozdíl mezi těmito buněčnými typy. Tento proces přispívá k udržení identity zárodečné linie tím, že brání expresi somatických genů v zárodečných buňkách. Evoluční význam diferenciaci zárodečné a somatické linie spočívá ve vytvoření odlišných linií, které snižují mutační zátěž, omezují buněčnou konkurenci a chrání genomovou integritu napříč generacemi.

Navzdory velkému pokroku v porozumění procesům determinace zárodečné a somatické linie zůstává několik otázek nevyjasněných. Především se týkají neprozkoumaností některých živočišných druhů, protože většina znalostí pochází z modelových organismů. Dále je

charakteristika některých molekulárních determinantů dobře prozkoumaná, avšak jejich evoluční původ a funkční rozmanitost napříč taxony zatím nejsou zcela objasněny. Rovněž není plně objasněno vzájemné působení mezi zděděným a induktivním modelem specifikace, což by mohlo přinést mnoho odpovědí na rozdílné mechanismy těchto procesů.

7 Seznam literatury

- Aeby, P., Spicher, A., de Chastonay, Y., Müller, F., & Tobler, H. (1986). Structure and genomic organization of proretrovirus-like elements partially eliminated from the somatic genome of *Ascaris lumbricoides*. *The EMBO Journal*, *5*(12), 3353–3360. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1986.TB04650.X>
- Ahmad, S. F., & Martins, C. (2019). The Modern View of B Chromosomes Under the Impact of High Scale Omics Analyses. *Cells*, *8*(2), 156. <https://doi.org/10.3390/CELLS8020156>
- Ahmed, M. I., Elias, S., Mould, A. W., Bikoff, E. K., & Robertson, E. J. (2016). The transcriptional repressor Blimp1 is expressed in rare luminal progenitors and is essential for mammary gland development. *Development*, *143*(10), 1663–1673. <https://doi.org/10.1242/DEV.136358>
- Allegrucci, C., Thurston, A., Lucas, E., & Young, L. (2005). Epigenetics and the germline. *Reproduction (Cambridge, England)*, *129*(2), 137–149. <https://doi.org/10.1530/REP.1.00360>
- Arkov, A. L., Wang, J. Y. S., Ramos, A., & Lehmann, R. (2006). The role of Tudor domains in germline development and polar granule architecture. *Development*, *133*(20), 4053–4062. <https://doi.org/10.1242/DEV.02572>
- August Weismann. (1893). Das Keimplasma Eine Theorie der Vererbung. *Nature 1893 47:1212*, *47*(1212), 265–266. <https://doi.org/10.1038/047265a0>
- Bergeron, L. A., Besenbacher, S., Zheng, J., Li, P., Bertelsen, M. F., Quintard, B., Hoffman, J. I., Li, Z., St. Leger, J., Shao, C., Stiller, J., Gilbert, M. T. P., Schierup, M. H., & Zhang, G. (2023). Evolution of the germline mutation rate across vertebrates. *Nature 2023 615:7951*, *615*(7951), 285–291. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05752-y>
- Bian, C., & Yu, X. (2013). PGC7 suppresses TET3 for protecting DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), 2893. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1261>
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M. C., & Dosch, R. (2009). Bucky Ball Organizes Germ Plasm Assembly in Zebrafish. *Current Biology*, *19*(5), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.038>
- Borodin, P., Chen, A., Forstmeier, W., Fouché, S., Malinovskaya, L., Pei, Y., Reifová, R., Ruiz-Ruano, F. J., Schlebusch, S. A., Sotelo-Muñoz, M., Torgasheva, A., Vontzou, N., & Suh, A. (2022). Mendelian nightmares: the germline-restricted chromosome of songbirds. *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, *30*(2–3), 255–272. <https://doi.org/10.1007/S10577-022-09688-3>
- Borodin, P. M. (2023). Germline-restricted chromosomes of the songbirds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, *27*(6), 641–650. <https://doi.org/10.18699/VJGB-23-75>
- Boswell, R. E., & Mahowald, A. P. (1985). tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, *43*(1), 97–104. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90015-7)
- Breitwieser, W., Markussen, F. H., Horstmann, H., & Ephrussi, A. (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes & Development*, *10*(17), 2179–2188. <https://doi.org/10.1101/GAD.10.17.2179>
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*, *128*(6), 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.01.043/ATTACHMENT/909C68CF-C4E9-4F6C-A273-F7102CEA8E1F/MMC2.XLS>
- Chmielewska, M., Dedukh, D., Haczkiwicz, K., Rozenblut-Kościsty, B., Kaźmierczak, M., Kolenda, K., Serwa, E., Pietras-Lebioda, A., Krasikova, A., & Ogielska, M. (2018). The programmed DNA elimination and formation of micronuclei in germ line cells of the natural hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus*. *Scientific Reports 2018 8:1*, *8*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26168-z>

- Colonna, M. M., Schedl, P., & Deshpande, G. (2023). Germline/soma distinction in *Drosophila* embryos requires regulators of zygotic genome activation. *ELife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.78188>
- Crow, J. F. (2000). The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Reviews Genetics* *2000 1:1*, *1*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1038/35049558>
- Curtis, D., Treiber, D. K., Tao, F., Zamore, P. D., Williamson, J. R., & Lehmann, R. (1997). A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *EMBO Journal*, *16*(4), 834–843. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.4.834>
- Darricarrère, N., Liu, N., Watanabe, T., & Lin, H. (2013). Function of Piwi, a nuclear Piwi/Argonaute protein, is independent of its slicer activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(4), 1297–1302. https://doi.org/10.1073/PNAS.1213283110/SUPPL_FILE/SD02.DOCX
- De Keuckelaere, E., Hulpiau, P., Saeyns, Y., Berx, G., & van Roy, F. (2018). Nanos genes and their role in development and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(11), 1929. <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2766-3>
- Devlin, D. K., Ganley, A. R. D., & Takeuchi, N. (2023). A pan-metazoan view of germline-soma distinction challenges our understanding of how the metazoan germline evolves. *Current Opinion in Systems Biology*, *36*, 100486. <https://doi.org/10.1016/J.COISB.2023.100486>
- Dhar, M. K., Kour, J., & Kaul, S. (2019). Origin, Behaviour, and Transmission of B Chromosome with Special Reference to *Plantago lagopus*. *Genes*, *10*(2), 152. <https://doi.org/10.3390/GENES10020152>
- Di Carlo, A., & De Felici, M. (2000a). A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Developmental Biology*, *226*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9861>
- Di Carlo, A., & De Felici, M. (2000b). A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Developmental Biology*, *226*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9861>
- Dobrynin, M. A., Bashendjieva, E. O., & Erukashvily, N. I. (2022). Germ Granules in Animal Oogenesis. *Journal of Developmental Biology*, *10*(4), 43. <https://doi.org/10.3390/JDB10040043>
- Elkouby, Y. M., Loganathan, R., Zhiguo Li, X., Pelegri, F., & Hansen, C. L. (2021). Primordial Germ Cell Specification in Vertebrate Embryos: Phylogenetic Distribution and Conserved Molecular Features of Preformation and Induction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 730332. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.730332>
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1991a). oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, *66*(1), 37–50. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90137-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90137-N)
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1991b). oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, *66*(1), 37–50. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90137-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90137-N)
- Ephrussi, A., & Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature*, *358*(6385), 387–392. <https://doi.org/10.1038/358387A0>
- Etter, A., Aboutanos, M., Tobler, H., & Müller, F. (1991a). Eliminated chromatin of *Ascaris* contains a gene that encodes a putative ribosomal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(5), 1593–1596. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.5.1593>
- Etter, A., Aboutanos, M., Tobler, H., & Müller, F. (1991b). Eliminated chromatin of *Ascaris* contains a gene that encodes a putative ribosomal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(5), 1593. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.5.1593>
- Ewe, C. K., & Rechavi, O. (2023). The third barrier to transgenerational inheritance in animals: somatic epigenetic resetting. *EMBO Reports*, *24*(4).

<https://doi.org/10.15252/EMBR.202256615/ASSET/73CFE291-EDD9-409B-8EC4-DF213F20E2AC/ASSETS/GRAPHIC/EMBR202256615-FIG-0003-M.PNG>

- Ewen-Campen, B., Schwager, E. E., & Extavour, C. G. M. (2010a). The molecular machinery of germ line specification. *Molecular Reproduction and Development*, 77(1), 3–18. <https://doi.org/10.1002/MRD.21091>
- Ewen-Campen, B., Schwager, E. E., & Extavour, C. G. M. (2010b). The molecular machinery of germ line specification. *Molecular Reproduction and Development*, 77(1), 3–18. <https://doi.org/10.1002/MRD.21091>
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003a). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869–5884. <https://doi.org/10.1242/DEV.00804>
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003b). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869–5884. <https://doi.org/10.1242/DEV.00804>
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 2009 10:2, 10(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Goldstrohm, A. C., Hall, T. M. T., & McKenney, K. M. (2018). Post-transcriptional Regulatory Functions of Mammalian Pumilio Proteins. *Trends in Genetics : TIG*, 34(12), 972. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2018.09.006>
- Gross-Thebing, S., Truszkowski, L., Tenbrinck, D., Sánchez-Iranzo, H., Camelo, C., Westerich, K. J., Singh, A., Maier, P., Prengel, J., Lange, P., Hüwel, J., Gaede, F., Sasse, R., Vos, B. E., Betz, T., Matis, M., Prevedel, R., Luschnig, S., Diz-Muñoz, A., ... Raz, E. (2020). Using migrating cells as probes to illuminate features in live embryonic tissues. *Science Advances*, 6(49). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABC5546/SUPPL_FILE/ABC5546_SM.PDF
- Gustafson, E. A., & Wessel, G. M. (2010). Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 32(7), 626. <https://doi.org/10.1002/BIES.201000001>
- Han, L., Ren, C., Zhang, J., Shu, W., & Wang, Q. (2019). Differential roles of Stella in the modulation of DNA methylation during oocyte and zygotic development. *Cell Discovery*, 5(1), 9. <https://doi.org/10.1038/S41421-019-0081-2>
- Han, T. W., Kato, M., Xie, S., Wu, L. C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G., & McKnight, S. L. (2012). Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell*, 149(4), 768–779. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.04.016>
- Hay, B., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1988). Identification of a component of *Drosophila* polar granules. *Development*, 103(4), 625–640. <https://doi.org/10.1242/DEV.103.4.625>
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2). <https://doi.org/10.1186/GB-2008-9-2-210>
- Hopf, C., Viebahn, C., & Püschel, B. (2011). BMP signals and the transcriptional repressor BLIMP1 during germline segregation in the mammalian embryo. *Development Genes and Evolution*, 221(4), 209–223. <https://doi.org/10.1007/S00427-011-0373-5/FIGURES/5>
- Houston, D. W., & King, M. Lou. (2000a). Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Current Topics in Developmental Biology*, 50, 155–181. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50008-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50008-8)
- Houston, D. W., & King, M. Lou. (2000b). Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Current Topics in Developmental Biology*, 50, 155-IN2. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50008-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50008-8)

- Huang, Y., Kim, J. K., Do, D. V., Lee, C., Penfold, C. A., Zylitz, J. J., Marioni, J. C., Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2017). Stella modulates transcriptional and endogenous retrovirus programs during maternal-to-zygotic transition. *ELife*, 6, e22345. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.22345>
- Hurd, T. R., Herrmann, B., Sauerwald, J., Sanny, J., Grosch, M., & Lehmann, R. (2016). Long Oskar controls mitochondrial inheritance in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell*, 39(5), 560. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2016.11.004>
- Irish, V., Lehmann, R., & Akam, M. (1989). The *Drosophila* posterior-group gene nanos functions by repressing hunchback activity. *Nature* 1989 338:6217, 338(6217), 646–648. <https://doi.org/10.1038/338646a0>
- Jenkins, A. B., McCaffery, J. M., & Van Doren, M. (2003). *Drosophila* E-cadherin is essential for proper germ cell-soma interaction during gonad morphogenesis. *Development*, 130(18), 4417–4426. <https://doi.org/10.1242/DEV.00639>
- Jenny, A., Hachet, O., Závorszky, P., Cyrklaff, A., Weston, M. D. J., St Johnston, D., Erdélyi, M., & Ephrussi, A. (2006). A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development*, 133(15), 2827–2833. <https://doi.org/10.1242/DEV.02456>
- Jeske, M., Bordi, M., Glatt, S., Müller, S., Rybin, V., Müller, C. W., & Ephrussi, A. (2015). The Crystal Structure of the *Drosophila* Germline Inducer Oskar Identifies Two Domains with Distinct Vasa Helicase- and RNA-Binding Activities. *Cell Reports*, 12(4), 587–598. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.06.055>
- Johnson, A. D., & Alberio, R. (2015). Primordial germ cells: the first cell lineage or the last cells standing? *Development (Cambridge, England)*, 142(16), 2730. <https://doi.org/10.1242/DEV.113993>
- Johnstone, O., & Lasko, P. (2004). Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development*, 131(17), 4167–4178. <https://doi.org/10.1242/DEV.01286>
- Juliano, C., Wang, J., & Lin, H. (2011a). Uniting Germline and Stem Cells: the Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse Organisms. *Annual Review of Genetics*, 45, 10.1146/annurev-genet-110410-132541. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-110410-132541>
- Juliano, C., Wang, J., & Lin, H. (2011b). *Uniting Germline and Stem Cells: The Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse Organisms*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132541>
- Kalmykova, A. I., Klenov, M. S., & Gvozdev, V. A. (2005). Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Research*, 33(6), 2052–2059. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI323>
- Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., & Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* 1996 380:6576, 380(6576), 708–711. <https://doi.org/10.1038/380708a0>
- Kochanek, D. M., & Wells, D. G. (2013). CPEB1 regulates the expression of MTDH/AEG-1 and glioblastoma cell migration. *Molecular Cancer Research*, 11(2), 149–160. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0498/354127/P/CPEB1-REGULATES-THE-EXPRESSION-OF-MTDH-AEG-1-AND>
- Krishnakumar, P., & Dosch, R. (2018). Germ Cell Specification: The Evolution of a Recipe to Make Germ Cells. *Germ Cell*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.71557>
- Krishnakumar, P., Riemer, S., Perera, R., Lingner, T., Goloborodko, A., Khalifa, H., Bontems, F., Kaufholz, F., El-Brolosy, M. A., & Dosch, R. (2018). Functional equivalence of germ plasm organizers. *PLoS Genetics*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1007696>
- Kubíková, J., Reinig, R., Salgania, H. K., & Jeske, M. (2020). LOTUS-domain proteins - Developmental effectors from a molecular perspective. *Biological Chemistry*, 402(1), 7–23. https://doi.org/10.1515/HSZ-2020-0270/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2020-0270_FIG_003.JPG

- Lange, U. C., Saitou, M., Western, P. S., Barton, S. C., & Surani, M. A. (2003). The Fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Developmental Biology*, 3, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-3-1>
- Lasko, P. F., & Ashburner, M. (1988). The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 1988 335:6191, 335(6191), 611–617. <https://doi.org/10.1038/335611a0>
- Lehmann, R. (2016). Germ plasm biogenesis –an Oskar-centric perspective. *Current Topics in Developmental Biology*, 116, 679. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2015.11.024>
- Lehmann, R., & Rongo, C. (1993). Germ plasm formation and germ cell determination. *Seminars in Developmental Biology*, 4(3), 149–159. <https://doi.org/10.1006/SEDB.1993.1018>
- Linder, P., & Lasko, P. (2006). Bent out of Shape: RNA Unwinding by the DEAD-Box Helicase Vasa. *Cell*, 125(2), 219–221. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.030>
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1102513>
- Maamar, M. Ben, Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (n.d.). *Epigenetic transgenerational inheritance, gametogenesis and germline development* †. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaob085>
- Mahowald, A. P. (1962). Fine structure of pole cells and polar granules in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 151(3), 201–215. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1401510302>
- Maitre, J. L., & Heisenberg, C. P. (2013). Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Current Biology*, 23(14), R626. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.06.019>
- Markussen, F. H., Michon, A. M., Breitwieser, W., & Ephrussi, A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), 3723–3732. <https://doi.org/10.1242/DEV.121.11.3723>
- Meng, H., Wang, Z., Wang, Y., Zhu, H., & Huang, B. (2017). Dicer and Argonaute Genes Involved in RNA Interference in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), e03230-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03230-16>
- Milholland, B., Dong, X., Zhang, L., Hao, X., Suh, Y., & Vijg, J. (2017). Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. *Nature Communications*, 8, 15183. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS15183>
- Mochizuki, K. (2024). Programmed DNA elimination. *Current Biology*, 34(18), R843–R847. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2024.07.103>
- Muhammad, T., & Li, J. (2023). Regulation of germline proteostasis by HSF1 and insulin/IGF-1 signaling. *Biochemical Society Transactions*, 51(2), 501–512. <https://doi.org/10.1042/BST20220616/943735/BST-2022-0616C.PDF>
- Murphey, P., McLean, D. J., McMahan, C. A., Walter, C. A., & McCarrey, J. R. (2012). Enhanced Genetic Integrity in Mouse Germ Cells. *Biology of Reproduction*, 88(1), 6. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.112.103481>
- Nadeau, S., & Martins, G. A. (2022). Conserved and Unique Functions of Blimp1 in Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.805260>
- Ozata, D. M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O’Carroll, D., & Zamore, P. D. (2019). PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews. Genetics*, 20(2), 89–108. <https://doi.org/10.1038/S41576-018-0073-3>
- Payer, B., Saitou, M., Barton, S. C., Thresher, R., Dixon, J. P. C., Zahn, D., Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Nakano, T., & Surani, M. A. (2003). *stella* Is a Maternal Effect Gene Required for Normal

- Early Development in Mice. *Current Biology*, 13(23), 2110–2117.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.11.026>
- Pei, Y., Forstmeier, W., Ruiz-Ruano, F. J., Mueller, J. C., Cabrero, J., Camacho, J. P. M., Alché, J. D., Franke, A., Hoepfner, M., Börno, S., Gessara, I., Hertel, M., Teltscher, K., Knief, U., Suh, A., & Kempnaers, B. (2022). Occasional paternal inheritance of the germline-restricted chromosome in songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(4), e2103960119. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2103960119/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Pek, J. W., Anand, A., & Kai, T. (2012). Tudor domain proteins in development. *Development*, 139(13), 2255–2266. <https://doi.org/10.1242/DEV.073304>
- Pigozzi, M. I., & Solari, A. J. (1998). Germ cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromosome Research*, 6(2), 105–113. <https://doi.org/10.1023/A:1009234912307/METRICS>
- Piprek, R. P., Kloc, M., Mizia, P., & Kubiak, J. Z. (2020). The Central Role of Cadherins in Gonad Development, Reproduction, and Fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218264>
- Punovuori, K., Malaguti, M., & Lowell, S. (2021). Cadherins in early neural development. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78(9), 4435. <https://doi.org/10.1007/S00018-021-03815-9>
- Richardson, B. E., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:1, 11(1), 37–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2815>
- Saffman, E. E., & Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 55(8–9), 1141–1163. <https://doi.org/10.1007/S000180050363>
- Saitou, M., Payer, B., O'carroll, D., Ohinata, Y., Surani, M. A., O'carroll, D., Azim Surani, M., Azim, / M, & Wellcome, S. ; (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle*, 4(12), 1736–1740. <https://doi.org/10.4161/CC.4.12.2209>
- Seervai, R. N. H., & Wessel, G. M. (2013a). Lessons for inductive germline determination. *Molecular Reproduction and Development*, 80(8), 590–609. <https://doi.org/10.1002/MRD.22151>
- Seervai, R. N. H., & Wessel, G. M. (2013b). Lessons for inductive germline determination. *Molecular Reproduction and Development*, 80(8), 590–609. <https://doi.org/10.1002/MRD.22151>
- Seervai, R. N. H., & Wessel, G. M. (2013c). Lessons for inductive germline determination. *Molecular Reproduction and Development*, 80(8). <https://doi.org/10.1002/mrd.22151>
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S., & Yokoyama, S. (2006). Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell*, 125(2), 287–300. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.01.054>
- Seydoux, G., & Braun, R. E. (2006). Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell*, 127(5), 891–904. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.11.016>
- Smith, J. J., Timoshevskiy, V. A., & Saraceno, C. (2020). Programmed DNA Elimination in Vertebrates. *Annual Review of Animal Biosciences*, 9, 173. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANIMAL-061220-023220>
- Soto-Suazo, M., & Zorn, T. M. (2005). Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim. Reprod*, 147–160.
- Sprangers, R., Groves, M. R., Sinning, I., & Sattler, M. (2003). High-resolution X-ray and NMR Structures of the SMN Tudor Domain: Conformational Variation in the Binding Site for Symmetrically Dimethylated Arginine Residues. *Journal of Molecular Biology*, 327(2), 507–520. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00148-7)

- Sternburg, E. L., Lillibridge, J. J., Phandthong, R., & Karginov, F. V. (2023). Mammalian pumilio proteins control cellular morphology, migration, and adhesion. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30004-4>
- Streit, A., & Davis, R. E. (2016). Chromatin Diminution. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0001181.PUB2>
- Tanaka, S. S., Yamaguchi, Y. L., Tsoi, B., Lickert, H., & Tam, P. P. L. (2005). IFITM/mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Developmental Cell*, 9(6), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.010>
- Taschuk, F., & Cherry, S. (2020). DEAD-Box Helicases: Sensors, Regulators, and Effectors for Antiviral Defense. *Viruses*, 12(2), 181. <https://doi.org/10.3390/V12020181>
- Thomson, T., & Lin, H. (2009). The Biogenesis and Function PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 355. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.24.110707.175327>
- Tobler, H. (1986). The Differentiation of Germ and Somatic Cell Lines in Nematodes. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 13, 1–69. https://doi.org/10.1007/978-3-540-39838-7_1
- Torgasheva, A. A., Malinovskaya, L. P., Zadesenets, K. S., Karamysheva, T. V., Kizilova, E. A., Akberdina, E. A., Pristyazhnyuk, I. E., Shnaider, E. P., Volodkina, V. A., Saifitdinova, A. F., Galkina, S. A., Larkin, D. M., Rubtsov, N. B., & Borodin, P. M. (2019). Germline-restricted chromosome (GRC) is widespread among songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 11845–11850. https://doi.org/10.1073/PNAS.1817373116/SUPPL_FILE/PNAS.1817373116.SAPP.PDF
- Toru Sengoku, O. N. A. N. S. K. S. Y. (2006). *Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa*. <https://doi.org/10.2210/PDB2DB3/PDB>
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., & Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5637), 1239–1241. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1085222>
- Van Den Brink, S. C., & Van Oudenaarden, A. (2021). *3D gastruloids: a novel frontier in stem cell-based in vitro modeling of mammalian gastrulation*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.06.007>
- Wahl, M. E., & Murray, A. W. (2016). Multicellularity makes somatic differentiation evolutionarily stable. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(30), 8362–8367. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1608278113/-DCSUPPLEMENTAL>
- Wang, C., & Lehmann, R. (1991). Nanos Is the Localized Posterior Determinant in *Drosophila*. *Cell*, 66, 637–647.
- Wang, J., & Davis, R. E. (2014). Programmed DNA Elimination in Multicellular Organisms. *Current Opinion in Genetics & Development*, 0, 26. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2014.03.012>
- Wang, J., Gao, S., Mostovoy, Y., Kang, Y., Zagoskin, M., Sun, Y., Zhang, B., White, L. K., Easton, A., Nutman, T. B., Kwok, P. Y., Hu, S., Nielsen, M. K., & Davis, R. E. (2017). Comparative genome analysis of programmed DNA elimination in nematodes. *Genome Research*, 27(12), 2001–2014. <https://doi.org/10.1101/GR.225730.117/-DC1>
- Webster, P. J., Liang, L., Berg, C. A., Lasko, P., & Macdonald, P. M. (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes & Development*, 11(19), 2510. <https://doi.org/10.1101/GAD.11.19.2510>
- Weick, E. M., & Miska, E. A. (2014). piRNAs: from biogenesis to function. *Development*, 141(18), 3458–3471. <https://doi.org/10.1242/DEV.094037>
- Weidmann, C. A., Qiu, C., Arvola, R. M., Lou, T. F., Killingsworth, J., Campbell, Z. T., Tanaka Hall, T. M., & Goldstrohm, A. C. (2016). *Drosophila nanos* acts as a molecular clamp that modulates the

RNA-binding and repression activities of pumilio. *ELife*, 5(AUGUST).
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.17096>

Whittle, C. A., & Extavour, C. G. (2017). Causes and evolutionary consequences of primordial germ-cell specification mode in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), 5784–5791. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1610600114/-/DCSUPPLEMENTAL>

Wickens, M., Bernstein, D. S., Kimble, J., & Parker, R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends in Genetics*, 18(3), 150–157. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02616-6/ASSET/FEADC44C-2810-4924-8770-2B72ABC34BA2/MAIN.ASSETS/GR4.JPG](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02616-6/ASSET/FEADC44C-2810-4924-8770-2B72ABC34BA2/MAIN.ASSETS/GR4.JPG)

Yang, N., Yu, Z., Hu, M., Wang, M., Lehmann, R., & Xu, R. M. (2015). Structure of Drosophila Oskar reveals a novel RNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(37), 11541–11546.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1515568112/SUPPL_FILE/PNAS.201515568SI.PDF

Zagoskin, M. V., & Wang, J. (2021). Programmed DNA elimination: silencing genes and repetitive sequences in somatic cells. *Biochemical Society Transactions*, 49(5), 1891.
<https://doi.org/10.1042/BST20190951>