

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

Katedra buněčné biologie

Oddělení vývojové biologie

Bakalářská práce na téma:

**Molekulární podstata zárodečné plazmy u
obojživelníků**

Vypracovala: Petra Špirhanzlová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. RNDr. Vladimír Krylov , Ph.D.

Praha, 2010

Děkuji svému školiteli Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za odborné konzultace a cenné rady.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha, 2010

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Abstract	5
3. Úvod	6
4. Morfologie a složení zárodečné plazmy	7
5. Funkce zárodečné plazmy	8
6. Změny v germinálních granulách zárodečné plazmy během vývoje	8
6.1 Agregace	9
6.2 Ingrese	10
6.3 Lokalizace	10
7. Molekulární podstata zárodečné plazmy	12
7.1 Distribuce RNA v rámci oocyty	13
7.1.1 METRO neboli Časná dráha	13
7.1.2 Vg1 dráha	13
8. Nejvýznamnější molekuly zárodečné plazmy	14
8.1 Xcat 2	14
8.2 Xdazl	15
8.3 Xpat	16
8.4 <i>DEADSouth</i>	17
8.5 Fatvg	17
8.6 XDead end	18
8.7 Vg1	19
9. Závěr	20
10. Seznam literatury	22

1. Abstrakt

Zárodečná plazma rodu *Xenopus* vzniká v previtellogenních oocytech v rámci oblasti bohaté na mitochondrie, která se nazývá mitochondriální oblak (mitochondrial cloud). Po vzniku je zárodečná plazma lokalizovaná v rámci celého vegetálního kortexu ve formě malých ostrůvků. Po oplození se formuje do velkých částic spočívajících na vegetálním pólu embrya a následně je distribuována mezi blastomery přímo obklopující vegetální pól. Zárodečná plazma se skládá z velkého množství germinálních granulí, mitochondrií, ribozomů a RNA. Je dokázáno, že některé RNA v ní obsažené jsou zodpovědné za formování linie primordiálních zárodečných buněk. *XDead end* protein je zodpovědný za formování primordiálních zárodečných buněk a za jejich řádnou migraci a přežití. *Fatvg* zasahuje do správné segregace determinantů zárodečných buněk a předpokládá se, že odstranění *Fatvg* z embryí má za následek inhibici kortikální rotace a transportu organel. *Xdazl* je nutný pro ranou diferenciaci PGC a je nepřímo požadován pro migraci PGC přes entoderm. Některé proteiny zárodečné plazmy, například *Fatvg* a *Xcat-2* se uplatňují mimo jiné v určování dorzo-ventrální osy.

Klíčová slova

Zárodečná plazma, germinální granule, mitochondriální oblak, *Xcat 2*, *Xdazl*, *Xpat*, *DEADSouth*, *Fatvg*, *Dead end*.

2. Abstract

Xenopus germ plasm originates in previtellogenic oocytes in an area rich in mitochondria - the mitochondrial cloud. After its first appearance, the germ plasm localises to the vegetative pole of the egg and takes the form of small islands. After fertilization, the germ plasm aggregates at the apex of the vegetal pole of the embryo and then it separates into blastomers directly surrounding the vegetal pole. The germ plasm consists of mitochondria, germinal granules, ribozomes and various ribonucleic acids (RNAs). In *Xenopus*, the germ plasm RNAs are required for the formation of the primordial germ cell line. *XDead end* is fundamental for the migration, differentiation and survival of germ cells. Embryos depleted of *fatvg* are defective in primordial germ cell (PGC) formation and cortical rotation and organelle transport are inhibited in these embryos. *Xdazl* is required for early PGC differentiation and indirectly contributes to the migration of PGCs through the endoderm. Some germ plasm proteins, for example, *Fatvg* and *Xcat-2*, also play an important role in the determination of the dorsal/ventral axis.

Key words: germ plasm, germinal granules, mitochondrial cloud, Xcat 2, Xdazl, Xpat, DEADSouth, Fatvg, Dead end.

3. Úvod

Pohlavní buňky- gamety, které jsou nezbytné pro rozmnožování živočichů, se formují z primordiálních zárodečných buněk. Během embryogeneze dochází k diferenciaci zárodečné linie různými způsoby.

U savců se při vývoji mnoha tkání a orgánových komplexů uplatňuje takzvaná indukce. Při ní jedna skupina buněk působí na druhou a má tak vliv na její budoucí diferenciaci. První významné důkazy indukce můžeme zaznamenat u embryí většiny živočichů během finálních stádií gastrulace (Edwards and Beard 1997).

U obojživelníků dochází k oddělení zárodečné linie ve fázi časného embryonálního vývoje buněk na základě gradientu vnitrobuněčných kompartmentů. V roce 1929 byla na vegetální části oocyty objevena část plazmy, která se liší v zastoupení ribonukleových kyselin. Při pokusech s UV zářením bylo zjištěno, že tento oddíl cytoplazmy má vliv na budoucí formaci primordiálních zárodečných buněk (PGC) a byl pojmenován jako "zárodečná plazma" (Ikenishi and Kotani, 1975).

Zárodečná plazma se objevuje v oocyty krátce po oplození. Její výskyt se dá zaregistrovat již u oplozeného nesegmentovaného vajíčka a formuje se v oblasti charakteristické vysokým počtem mitochondrií (mitochondriální oblak). Mitochondriální oblak se prvně objevuje již v previtellogenních oocytech ve stádiu I a je charakterizovaný velkým množstvím mitochondrií, germinálních granulí a RNA (Wilk et al. 2005).

Zdá se, že vznik zárodečné plazmy koreluje spíše s aktivací oocyty, než s přítomností spermie.

Po vzniku je zárodečná plazma lokalizovaná v rámci celého vegetálního kortexu ve formě malých ostrůvků. Po oplození nebo po uměle vyvolané aktivaci se její pozice mění a ve čtyř až osmibuněčném stádiu se formuje do velkých částic spočívajících na vegetálním pólu embrya (Whittington and Dixon 1975).

Následují tři pochody (detailně popsány v kapitole 6), ve kterých je zárodečná plazma distribuována mezi blastomery přímo obklopující vegetativní pól

a objevuje se hluboko v entodermu ve stádiu gastruly a neuruly (Ikenishi and Kotani 1975).

Na začátku gastrulace se dají některé buňky obsahující zárodečnou plazmu detekovat v presumpčním entodermu a jsou považovány za presumpční primordiální kmenové buňky (pPGC). Tyto buňky potom migrují do genitální rýhy, kde u nich nakonec dochází k diferenciaci v primordiální zárodečné buňky (Smith and Williams 1975, Whittington and Dixon 1975, Tanabe and Kotani 1974) .

Ve své bakalářské práci se věnuji problematice zárodečné plazmy obojživelníků se zaměřením na rod *Xenopus*. Postupně nastíním funkci a složení zárodečné plazmy, její formování a v hlavní kapitole rozeberu základní molekuly, které se v zárodečné plazmě vyskytují včetně jejich funkcí.

4. Morfologie a složení zárodečné plazmy

Zárodečná plazma různých obratlovců i bezobratlých se skládá z germinálních granulí (P granule u *Caenorhabditis elegans* a polární granule u *Drosophily*). Je bohatá na mitochondrie, ribozomy a pigmentové granule a velmi často se spojuje s malými žlutkovými destičkami. Germinální granule obsahují množství malých a velkých mitochondriálních rRNA (Smith and Williams 1975, Kloc et al. 2002).

Ostrůvky zárodečné plazmy jsou snadno pozorovatelné díky silnému zabarvení anilinovou modří a díky charakteristickým granulím, které korespondují co se velikosti týče s mitochondriemi (Ikenishi, Kotani and Tanabe 1974).

Kvantitativní odhady množství zárodečné plazmy v embryích různých vývojových stádií ukazují, že její zastoupení se v různých blastomerách liší; obvykle jedna až dvě blastomery obsahují až 85% zárodečné plazmy embrya. Během rýhování se celkový objem zárodečné plazmy nemění (Whittington and Dixon 1975).

To, že některé blastomery obsahují pouze malé množství zárodečné plazmy, nás nutí k otázce, zda je její objem nezbytný pro definování buňky jako

presumptivní primordiální zárodečné buňky. Nikdy nebyla pozorována buňka obsahující zárodečnou plazmu, která by zároveň nevykazovala vlastnosti typické pro presumptivní primordiální zárodečné buňky, ale nicméně zní logicky, že alespoň minimum zárodečné plazmy je potřeba (Whittington and Dixon 1975).

5. Funkce zárodečné plazmy

Předpokládá se, že zárodečná plazma slouží jako místo, které chrání určité komponenty zárodečných buněk před signály, specifickými pro diferenciaci buněk somatických a má tedy vliv na formování linie primordiálních zárodečných buněk (Kloc et al. 2002).

Germinální granule si lze představit jako organely, díky kterým je zamezeno předčasnému vyčerpání potřebných molekul, potřebných v rámci embryonálního vývoje (Kloc et al. 2002).

Matrix zárodečné plazmy slouží také jako kotva molekul, které se uplatňují při oogenezi nebo které se potřebují transportovat do zárodečných buněk (Kloc et al. 2002).

RNA lokalizovaná v zárodečné plazmě může hrát strukturní roli nebo může být zapojena do shlukování germinálních granulí či do diferenciaci zárodečných buněk. Při experimentech se z oocytů odstraňuje RNA pomocí užití antisense oligonukleotidů a zkoumají se důsledky její absence na embryu. Funkce jednotlivých RNA obsažených v zárodečné plazmě jsou podrobně popsány v následujících kapitolách (Zhou and King 1996b).

6. Změny v germinálních granulích zárodečné plazmy během vývoje

Díky použití ultratenkých částí embryí bylo možné detailně analyzovat procesy, při kterých dochází ke změnám zárodečných granulí během vývoje.

Po oplození obsahuje zárodečná plazma velké množství malých (cca 250 nm v průměru) sférických germinálních granulí. Zjistilo se, že dochází

k postupnému vytvoření jejich ultrastruktury v embryu mezi oplozením a osmibuněčným stádiem (Kloc et al. 2002).

Během časného rýhování malé germinální granule splývají do komplexnějších agregátů. Zárodečná plazma osmibuněčného embrya obsahuje pár nepravidelných velkých granulí, které na průřezu vykazují komplexní a variabilní morfologii. Mezi oplozením a stádiem neuruly zmizí velké germinální granule a primordiální buňky neuruly obsahují pouze pár malých (Kloc et al. 2002).

Proces umístování a distribuce zárodečné plazmy, ke kterým dochází po oplození, se dělí do tří fází: 1) agregace, 2) ingrese a 3) lokalizace (Ressom and Dixon 1988)

6.1 Agregace

V oplozených oocytech je zárodečná plazma s jistotou identifikována po dvou hodinách od oplození (v dvoubuněčném stádiu). V této fázi se skládá z malých ostrůvků granulární bezžloutkové cytoplazmy, která se silně zbarvuje při použití naftalenové černi.

Čtyři hodiny po oplození ve stádiu 16-ti buněk se množství ostrůvků snižuje na 4-25 na embryo.

V rozmezí 6 – 8 hodin po oplození se počet částí nemění, což znamená, že agregace ostrůvků do větších celků je kompletní 4 hodiny po oplození. V této fázi hrají velkou roli mikrotubuly a dochází k syntéze proteinů.

Při rozdělování zárodečné plazmy mezi blastomery je velmi důležité rýhování. V oplozeném vajíčku, poté co je dokončeno shlukování, jsou od sebe části zárodečné plazmy separovány pomocí membrány blastomer a navíc jsou rovnány podél rýhy. Tímto způsobem je zárodečná plazma rozdělena mezi první 4 blastomery a je připravena na další fázi – ingresi (Ressom and Dixon 1988).

6.2 Ingrese

Během agregace dochází k pohybu cytoplazmy paralelně k povrchu vajíčka. Ingrese již podle názvu zahrnuje pohyb do nitra buňky, které je přibližně kolmé k povrchu.

Distribuce zárodečné plazmy ve embryích 6 hodin po oplození je ve srovnání se stavem 4 hodiny po oplození v horizontální rovině poněkud užší. Dochází k rychlým změnám umístění zárodečné plazmy z povrchu směrem hluboko do vegetální cytoplazmy (Ressom and Dixon 1988).

Ve stádiu 4-6 hodin po oplození proudí cytoplazma z místa na vegetálním pólu dovnitř a nese s sebou pigmentové granule a části zárodečné plazmy. Pigmentové granule za sebou zanechávají snadno detekovatelnou stopu.

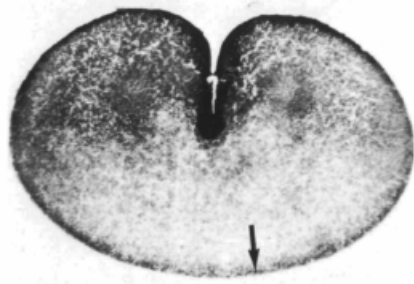
Ingrese nezávisí na rýhování, mikrotubulech nebo mikrofilamentech a nezahrnuje syntézu proteinů (Ressom and Dixon 1988).

6.3 Lokalizace

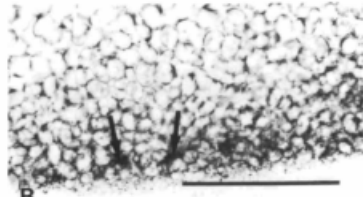
Šest hodin po oplození se distribuce zárodečné plazmy výrazně nemění.

V rozmezí 8 -10 hodin po oplození je počet a morfologie částic cytoplazmy stejná jako v čase 6 hodin. Z toho můžeme vyvozovat, že se zárodečná plazma začíná umísťovat do příslušného regionu cytoplazmy zhruba 6 hodin po oplození (Ressom and Dixon 1988)

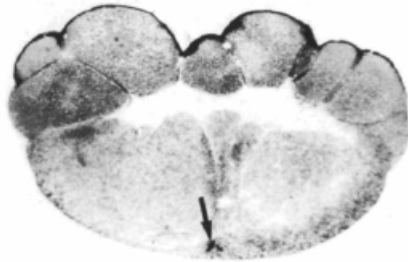
Pozorováním bylo zjištěno, že v 85 % embryích ve stádiu rýhování, jsou ostrovy zárodečné plazmy asociovány s jedním pólem mitotického vřeténka. Toto spojení je primárně zodpovědné za udržení zárodečné plazmy v nejspodnější třetině vajíčka. Na druhou stranu je zárodečná plazma občas k vidění hned pod blastocoelem, a to nejspíše proto, že není nikterak vázána. Jako následek lokalizace částí zárodečné plazmy uvnitř blastomer dochází v průběhu rýhování k rozdělení zárodečné plazmy pouze do jedné z dceřinných buněk při každé cytokinezi (Ressom and Dixon 1988).



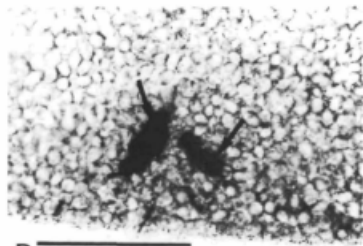
1A



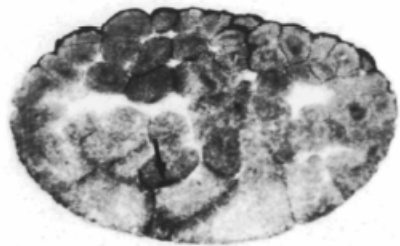
B



C



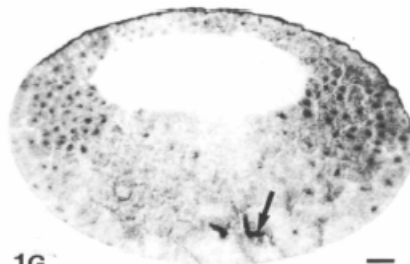
D



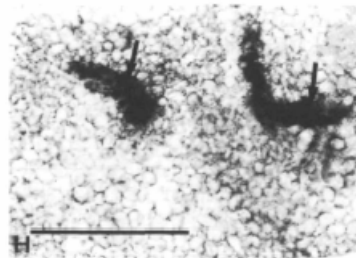
E



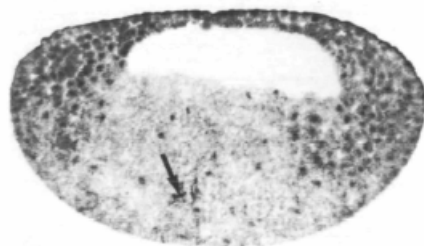
F



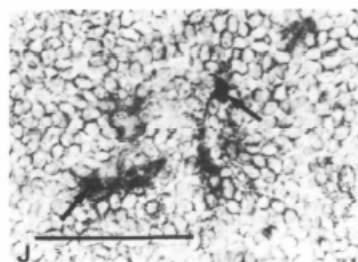
1G



H



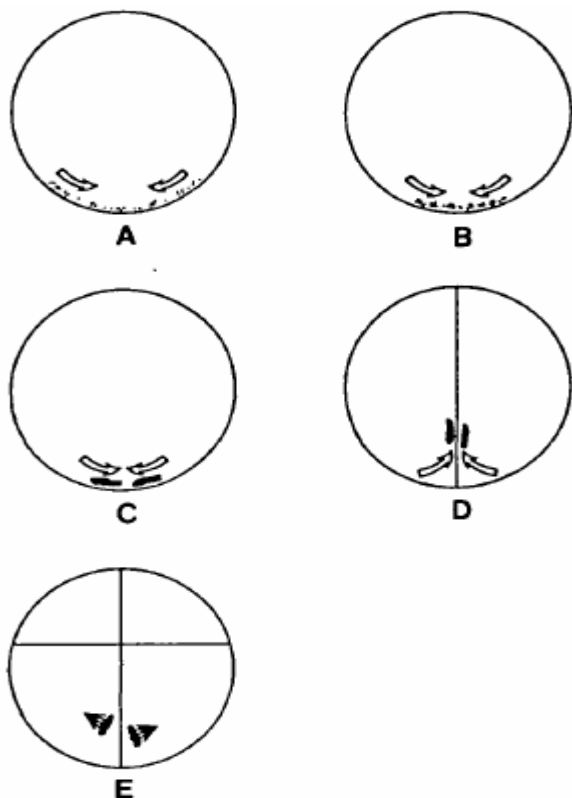
I



J



Obr.1 Distribuce a reorganizace zárodečné plazmy v normálních embryích zafixovaných v intervalech 2 hodin. Části zárodečné plazmy jsou označeny šipkou. (A,B) 2h p.f.; (C,D) 4h p.f.; (E,F) 6h p.f.; (G,H) 8h p.f.; (I,J) 10h p.f. (Převzato z Resson and Dixon 1988).



Obr.2 Ilustrace tří fází přemístování a reorganizace zárodečné plazmy oocytů *Xenopa* po oplození (A-C) agregace, (D) ingrese, (E) lokalizace. (Převzato z Resson and Dixon 1988).

7. Molekulární podstata zárodečné plazmy

Zárodečná plazma obsahuje determinanty rozhodující o osudu zárodečných buněk. Pokud je při experimentu z oocytů odebrána, dojde k abnormální migraci zárodečných buněk, ke snížení jejich počtu nebo ke kompletní sterilitě dospělých jedinců. Při definované dávce UV záření na vegetativní stranu oocytu těsně před prvním rýhováním dochází ke sterilizaci ve 100% případech (Czolowska 1969), (Ikenishi et al. 1974).

Pokud ovšem je vegetativní plazma neozářených oocytů injikována do vegetativní poloviny ozářeného embrya, dojde k obnovení zárodečné linie. Z těchto výsledků můžeme vyvodit, že UV citlivý materiál umístěný v okolí

vegetativního pólu oplozeného oocytu je zodpovědný za diferenciaci zárodečné linie (Czolowska 1969, (Ikenishi et al. 1974).

7.1 Distribuce RNA v rámci oocytu

Zdá se vysoce pravděpodobné, že funkce různých RNA mohou souviset s jejich distribucí mezi specifickými kompartmenty zárodečné plazmy.

Na toto téma byla provedena studie distribuce RNA v různých oddílech zárodečné plazmy během oogeneze a embryogeneze (Kloc et al. 2002).

Během oogeneze *Xenopa* existují dvě hlavní cesty lokalizace RNA:

7.1.1 METRO neboli Časná dráha

METRO (the message transport organiser) je část mitochondriálního oblaku, která se nachází na jeho vegetálním pólu. Tato oblast obsahuje velké množství germinálních granulí a lokalizovaných RNA. V oocytu ve stádiu II se začíná mitochondriální oblak vzdalovat od jádra a slučuje se do nedaleké kortikální oblasti, čímž přenáší RNA a germinální granule. Lokalizované RNA tak využívají mitochondriální oblak jako prostředek přenosu na vegetální kortex (Billett and Adam 1976, Kloc et al. 2002).

Nejznámější RNA, které se transportují METRO drahou jsou například *Xlsirts*, *Xcat2*, *Xwnt11*, *Xdazl*, *Xpat*, *Dead South*, *B7/Fingers*, and *C10/XFACS* (Kloc et al. 2002).

Výsledky ukazují, že z jedenácti studovaných RNA využívajících METRO dráhu jsou pouze 3 (*Xcat2*, *Xpat* and *DEADSouth*) lokalizovány v granulích, zatímco *Xdazl* a *FatVg* se nachází mezi granulemi (Kloc et al. 2002).

7.1.2. Vg1 dráha

RNA, které se vydávají *Vg1* drahou jsou přítomny již v oocytu ve stádiu I, ale začínají se lokalizovat až poté, co mitochondriální oblak dojde k vegetálnímu kortexu. Nejznámější RNA, které se takto lokalizují, jsou *Vg1* a *VegT* a nově také *XDead* (Chang et al. 2004).

Ve chvíli, kdy se mitochondriální oblak začíná rozptylovat, jsou tyto RNA nashromážděné v okolí a následně se přemisťují do tenké subkortikální vrstvy pomocí mikrotubulů a kinesinů I a II (Chang et al. 2004).

Nedávno bylo dokázáno, že RNA jako *fatVg* a *DEATHSouth* využívají při lokalizaci jak mitochondriální oblak, tak i pozdní dráhu.

8. Nejvýznamnější molekuly zárodečné plazmy

Nejvýznamnějšími molekulami zárodečné plazmy jsou ***Xcat 2***, ***Xdazl***, ***Xpat***, ***DEADSouth***, ***Fatvg*** a ***Dead end***. V kapitole je také zmíněna ***Vg1 RNA***, která vykazuje mezoderm indukující vlastnost, ovšem není typickou součástí zárodečné plazmy

8.1 *Xcat 2*

Xcat 2 RNA je komponent zárodečné plazmy, který je translačně reprimován během oogeneze. *Xcat 2* nebyl nalezen v oocytech v době před nebo poté, co byla jeho RNA lokalizována v zárodečné plazmě. Předpokládá se, že *Xcat 2* RNA je funkčně oddělena brzy po transkripci (Zhou and King 1996a).

Ve čtyřbuněčném embryu je *Xcat 2* RNA koncentrována do cca 80ti malých ostrůvků na vegetálním pólu embrya. V pozdějších stádiích se soustřeďuje do větších subbuněčných ostrovů, které se nacházejí pouze ve čtyřech buňkách, předpokládaném počtu pPGC. *Xcat 2* RNA se zdá být exprimována pouze maternálně a je lokalizována se zárodečnou plasmou během oogeneze a ve čtyřbuněčném stádiu. V poslední době se ukazuje, že je součástí germinálních granulí, které se formují v mitochondriálním oblaku (Zhou and King 1996a).

Sekvenční analýzy potvrdily, že *Xcat 2* mRNA kóduje protein, který patří do CCHC RNA-binding rodiny zinc finger proteinů. Nejbližší příbuzná RNA *Xcat 2* v této rodině je *nanos*, RNA lokalizována na posteriorním pólu oocyty *Drosophily*, jejíž proteinový produkt funguje jako supresor translace transkripčního faktoru *hunchback* (Mosquera et al. 1993). Umístění a maternální exprese *Xcat 2* RNA

naznačuje, že role jejího proteinu spočívá v nastavování regionálních rozdílů genové exprese, které se projevují v časném vývoji.

Dlouho se předpokládalo, že *Xcat 2* mRNA může sloužit jako RNA vazebný protein v presumpčních entodermálních buňkách, který potlačuje reakce na podněty spouštějící indukci mezodermu. Experimenty, které se snažily dokázat platnost této teorie však selhaly.

Je možné, že *Xcat 2* ustanovuje vegetální dorzalizující region nebo Nieuwkoopovo centrum tak, že kontroluje translaci maternálního dorzálního mezodermálního signálu (nejspíše *noggin* nebo člena wnt rodiny)(MacArthur et al. 1999).

Experimentálně se také zjistilo, že *Xcat 2* by mohl mít funkci při narušování vazby nukleových kyselin, což umožňuje translaci dorzálního signálu (MacArthur et al. 1999).

8.2 *Xdazl*

Xdazl je RNA obsažena v zárodečné plazmě, která kóduje RNA binding protein, jenž může vystupovat jako funkční homolog proteinu *Boule* u *Drosophily*. Protein *Boule* je potřebný pro vstup buňky do mitotického dělení. *Xdazl* i *Boule* jsou příbuzné lidskému DAZ a DAZL a myššímu *Dazl* genu, které jsou také zapojeny do diferenciac gamet (Houston and King 2000).

Dle umístění *Xdazl* v zárodečné plazmě se usuzuje, že *Xdazl* je zodpovědný za vývoj PGC u *Xenopa*. *Xdazl* je přítomen v mitochondriálním oblaku oocytů ve stádiu I a zůstává exprimován až po stádium neuruly.

Xdazl RNA je exprimována také v zárodečných buňkách varlete, ale v žádné ze somatických tkání.

Specifické vyčerpání maternální *Xdazl* RNA má za následek absenci či nedostatek PGC. Při odstranění *Xdazl*, PGC nemigrují úspěšně z ventrálního k dorsálnímu entodermu a nemůžou dosáhnout dorsálního mesenteria. Agregace zárodečné plazmy a vnitrobuněčné pohyby značí, že se defekt projevuje až po formaci PGC. *Xdazl* je nutný pro ranou diferenciaci PGC a je nepřímo požadován pro jejich migraci přes entoderm.

Jako RNA binding protein, *Xdazl* může regulovat translaci nebo expresi faktorů, které zprostředkovávají migraci PGC (Houston and King 2000).

8.3 Xpat

Xpat RNA je jeden z hlavních komponentů zárodečné plazmy *Xenopa* a předpokládá se, že hraje roli v její lokalizaci, formování a udržování (Machado et al. 2005).

Xpat mRNA je nepřetržitě přítomna od previtellogenního stádia I oogeneze až po stádium pulce, ve kterém PGC migrují a vstupují do dorzálního mezenteria a dosahují vyvíjejících se gonád. *Xpat* je koncentrován v ostrovech zárodečné plazmy během oplození a během jejich hromadění kolem vegetálního pólu vajíčka (Machado et al. 2005).

Na rozdíl od *Xpat* RNA, *Xpat* protein není výlučně obsažen pouze v zárodečné plazmě. V časných oocytech a pozdních stádiích primordiálních zárodečných buněk se nachází převážně v jejich jádrech. *Xpat* byl také detekován v jádře a cytoplazmě některých somatických buněk (ektodermálních buňkách pulčních embryí). Cytoplazmický *Xpat* přestává být rozptýlený v pozdních stádiích PGC a jeho lokalizace je perinukleární. Proto, i když se *Xpat* nachází na různých místech v buňce, v zárodečné plazmě je více koncentrován a nabývá jedinečné strukturální vlastnosti (Hudson and Woodland 1998).

Experimenty dokázaly, že *Xpat* protein má schopnost se přemisťovat do vegetálního kortexu v plně narostlých oocytech a shromáždit se do struktur, které vypadají a chovají se jako ostrovy zárodečné plazmy. To je zajímavé, protože zárodečná plazma se normálně formuje a lokalizuje do vegetálního kortexu mnohem dříve během oogeneze a předpokládá se, že její formování je omezeno pouze do takto raných stádií (Machado et al. 2005).

Zdá se, že v oocytu se *Xpat* přemisťuje pomocí asociace s mikrotubulárními motory, což je chování, které může vést k jejich shromažďování v mitochondriálním oblaku.

Objev, že se *Xpat* protein může transportovat do vegetálního pólu a může formovat struktury podobné zárodečné plazmě dokonce i v plně vyvinutém oocytu, ukazuje, že formování zárodečné plazmy a udržování její struktury je aktivní, trvající proces (Machado et al. 2005).

8.4 *DEADSouth*

Složka zárodečné plazmy *DEADSouth* je specifická DEAD-box RNA helikáza příbuzná eIF4A.

Experimentálně bylo ukázáno, že *DEADSouth* je exprimován jako samostatná 3.1 kb dlouhá RNA pouze ve vaječnicích a varlatech (MacArthur et al. 2000).

DEADSouth RNA zůstává v konstantních úrovních po celou dobu oogeneze, zvyšuje své množství během gastrulace a nedá se detekovat na konci gastrulace.

Při zkoumání drah lokalizace *DEADSouth* RNA bylo objeveno, že *DEADSouth* RNA užívá obou známých způsobů- jednak časnou dráhu pomocí mitochondriálního oblaku, tak i pozdní dráhu užívající asociace s mikrotubuly (Kloc et al. 2002).

DEADSouth RNA může být detekována v ooplazmě časných oocytů v diplotenním stádiu. V průběhu formování mitochondriálního oblak v něm *DEADSouth* RNA akumuluje. V oocytech stádia II se *DEADSouth* RNA vyskytuje ve vegetálním kortexu s tím, že její lokalizace je identická jako u ostatních popsaných RNA specifických pro mitochondriální oblak. Mezi stádii III a IV se *DEADSouth* signál zeslabuje a rozšiřuje se po celém vegetálním kortexu. Expresní profil se pak již nemění do konce oogeneze (MacArthur et al. 2000).

8.5 *Fatvg*

Fatvg je mRNA nacházející se na periferiích vesikulů umístěných ve vegetálním kortexu mezi mitochondriemi a malými organelami typickými pro zárodečnou plasmu a v cytoplazmě vegetálního kortexu (Chan, Kloc and Etkin 1999).

Fatvg se dostává do vegetálního kortexu METRO i pozdní drahou. Frakce *Fatvg* mRNA, která využívá METRO dráhu, je sdružována se zárodečnou plazmou, zatímco frakce využívající pozdní dráhu asociuje s veškerým vegetálním kortexem (Kloc et al. 2002).

Dle současných studií se dá vyvodit, že maternálně exprimovaný *Fatvg* hraje dvojí roli ve specifikaci tělní osy a linie zárodečných buněk. Tato dvojí funkce způsobuje, že maternální dorsalizující faktory a determinanty zárodečných buněk se nejsou schopné oddělit v embryích ochuzených o *Fatvg* (Chan et al. 2007).

Je to také první příklad kódující RNA, která hraje důležitou roli jak v určování zárodečné linie, tak i dorzo-ventrální osy.

V embryích ochuzených o *Fatvg* je utlumena dorzální akumulace β -kateninu, který za normálních okolností aktivuje expresi genů důležitých pro formování dorzálních struktur. U embryí ve stádiu časného rýhování je β -katenin shromážděn v subkortikální cytoplazmě dorzálního sektoru. Úroveň β -kateninu narůstá dorzálně a ve stádiu 32 buněk je β -katenin přemístěn do jádra dorzálních blastomer (Chan et al. 2007).

Embrya s odebraným *Fatvg* jsou fenokopii embryí ochuzených o β -katenin. Dorzální akumulace β -kateninu byla narušena v embryích ochuzených o *Fatvg*, v těchto případech se β -katenin shromažďoval ve vegetálním pólu. V embryích bez *Fatvg* také dochází k inhibici kortikální rotace a transportu organel.

Odstraněním *Fatvg* z embryí jsou způsobeny defekty ve formování PGC. Taková embrya vykazují snížení počtu nebo úplnou absenci zárodečných buněk. *Fatvg* ovlivňuje formování zárodečných buněk tím, že zasahuje do správné segregace jejich determinantů během procesu specifikace PGC (Chan et al. 2007).

8.6 XDead end

Dead end mRNA kóduje RNA vazebný protein a byla již dříve identifikována jako komponent zárodečné plazmy u *Danio rerio* (Weidinger et al. 2003) stejně tak jako u embryí *Xenopa*. V oocytech stádia I a v raných stádiích II je *XDead end* mRNA obsažen v rámci celé cytoplazmy.

Od pozdního stádia II se transkripty začínají nacházet více ve vegetálním kortexu. Ve stádiu III- IV je tato mRNA obsažena v celém vegetálním kortexu, kde zůstává až po stádium VI.

Dle tohoto vzorce se usuzuje, že *XDead end* mRNA patří do skupiny pozdně se lokalizujících RNA a je prvním objeveným komponentem zárodečné plazmy, který využívá pouze pozdní cestu lokalizace (Horvay et al. 2006).

Po prvním buněčném dělení je *XDead end* RNA distribuována na vegetální konec obou blastomer, což je charakteristické pro transkripty asociované se zárodečnou plasmou. V 8-16-ti buněčném stádiu se *XDead end* RNA nachází v ostrůvkách zárodečné plazmy na vegetálním pólu.

Ve stádiu gastruly je *XDead end* mRNA detekována jako izolovaná a rozptýlená v rámci žlutkové zátky. Během neurulace není exprese zvenčí embrya vidět, ovšem v částech embrya ve stádiu neuruly je zřetelné, že *XDead end* je exprimován v izolovaných buňkách umístěných v okolí budoucího střeva.

Ve stádiu ocasního pupene se dají transkripty slabě detekovat v migrujících primordiálních zárodečných buňkách (Horvay et al. 2006).

Pro zjištění funkce *XDead end* byla provedena mikroinjekce antisense morpholino oligonukleotidů (DE-MO). Pozorování ukázala, že *XDead end* je nezbytný pro řádnou migraci zárodečných buněk a nejspíš také pro jejich diferenciaci a přežití.

Velmi zajímavé bylo také zjištění, že po injekci *Dead end* z *Danio rerio* spolu s DE-MO došlo k znovuoobnovení linie zárodečných buněk. Z toho vyplývá, že funkce *Dead end* je zachována mezidruhově (Weidinger et al. 2003).

8.7 *Vg1*

Vg1 mRNA je člen TGF β rodiny a je jednou z prvních objevených specifických mRNA nacházejících se v oocytech. Během oogeneze se *Vg1* mRNA omezuje do vegetální cytoplazmy oocytů a je nakonec je detekovatelná v nejvíce vegetálních blastomerách embrya. *Vg1* není typickým komponentem zárodečné plazmy, je však důležitým faktorem indukujícím mezoderm (Birsoy et al. 2006).

Vegetální buňky blastuly mají dvě důležité funkce: diferencují se v entoderm embrya a signalizují přilehlým marginálním regionům aby formovaly mezoderm. Proto je *Vg1* pravděpodobným signálem indukujícím mezoderm (Birsoy et al. 2006).

Embrya se sníženou expresí *Vg1* se vyvíjí normálně až do stádia gastruly. Poté při porovnání s kontrolními embryi u nich dochází k některým abnormalitám. Po oplození množství *Vg1* mRNA a proteinu klesá přes stádium gastruly, protože v této době nedochází k žádné transkripci zygotické *Vg1* (Elisha et al. 1995) .

Redukce *Vg1* proteinu pod 50% zastaví vývoj ve stádiu gastruly. K podobnému efektu dochází, pokud se *Vg1* protein vyčerpá aplikací morpholino oligo *Vg1MO*.

Načasování formování blastoporu je u embryí se sníženým množstvím *Vg1* opožděné a blastoporus zůstává zvětšen ve stádiu pozdní gastruly. Ve stádiu neuruly vykazují embrya ochuzená o *Vg1* různou míru poškození v rámci utváření anterioposteriorní a dorzo-ventrální osy.

6ng antisense oligo způsobí, že se embrya vyvíjí se ztrátou hlavových struktur, zatímco nižší dávky mají za následek vývoj zakrslých embryí. Z histologického hlediska je vidět, že u *Vg1* ochuzených embryí ve stádiu ocasního pupene se vyskytují všechny tři zárodečné vrstvy. Byly však pozorovány absence chordy, fúze somitů a redukované nebo abnormální neurální struktury (Birsoy et al. 2006).

9. Závěr

Cílem mé bakalářské práce je shrnutí základních poznatků o molekulární podstatě zárodečné plazmy rodu *Xenopus*.

Na základě laboratorních výsledků je dnes již jasné, že zárodečná plazma je komplexní struktura, která obsahuje RNA kódující proteiny mající důležitou roli v diferenciaci zárodečné linie buněk. Z hlediska správného vývoje je výhodné, když se germinální buňky oddělí záhy po oplození, protože s každým dělením narůstá riziko poškození DNA způsobené mutacemi.

Protein *XDead end* je zodpovědný nejen za formování PGC, ale také za jejich řádnou migraci a přežití. *Fatvg* ovlivňuje formování zárodečných buněk tím, že zasahuje do správné segregace determinantů zárodečných buněk. *Xdazl* je nutný pro ranou diferenciaci PGC a je nepřímo zahrnut do migrace PGC přes entoderm.

V dnešní době probíhá výzkum, zabývající se zjišťováním dalších funkcí komponentů zárodečné plazmy. Některé její proteiny, například *Fatvg* a *Xcat-2* se uplatňují mimo jiné v určování dorzo-ventrální osy. Předpokládá se, že odstranění *Fatvg* z embryí má za následek inhibici kortikální rotace a transportu organel.

RNA obsažené v zárodečné plazmě se lokalizují do vegetálního kortexu buď drahou užívající mitochondriální oblak nebo později pomocí mikrotubulů. Mnoho vědeckých prací se zabývá otázkami, kterou dráhu RNA využívají. Hlavní komponenty zárodečné plazmy migrující pomocí mitochondriálního oblaku jsou *Xcat2*, *Xdazl*, *Xpat*. Oproti tomu *XDead end* RNA se transportuje pouze pozdní drahou. Nedávno bylo dokázáno, že *fatVg* a *DEATHSouth* využívají jednak mitochondriální mrak, tak i částečně pozdní dráhu.

Velký význam má také zjištění, že u některých proteinů zárodečné plazmy může docházet k mezidruhové interakci, jak je tomu například v případě *Dead end* u *Xenopa* a *Danio rerio*.

10. Použitá literatura:

- Billett, F. & E. Adam (1976) The structure of the mitochondrial cloud of *Xenopus laevis* oocytes. *J Embryol Exp Morphol*, 36, 697-710.
- Birsoy, B., M. Kofron, K. Schaible, C. Wylie & J. Heasman (2006) Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development*, 133, 15-20.
- Chan, A., M. Kloc & L. Etkin (1999) fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development*, 126, 4943-53.
- Chan, A., M. Kloc, C. Larabell, M. LeGros & L. Etkin (2007) The maternally localized RNA fatvg is required for cortical rotation and germ cell formation. *Mech Dev*, 124, 350-63.
- Chang, P., J. Torres, R. Lewis, K. Mowry, E. Houliston & M. King (2004) Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 15, 4669-81.
- Czolowska, R. (1969) Observations on the origin of the 'germinal cytoplasm' in *Xenopus laevis*. *Embryol. exp. Morph*, 22, 229-51.
- Edwards, R. & H. Beard (1997) Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod*, 3, 863-905.
- Elisha, Z., L. Havin, I. Ringel & J. Yisraeli (1995) Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 14, 5109-14.
- Forristall, C., Pondel, M., Chen, L. & King, M. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* 121, 201-208
- Horvay, K., M. Claussen, M. Katzer, J. Landgrebe & T. Pieler (2006) *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev Biol*, 291, 1-11.
- Houston, D. & M. King (2000) A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development*, 127, 447-56.
- Houston, D., Zhang, J., Maines, J., Wasserman, S. & King (1998) M. A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* boule. *Development* 125, 171-180.

- Hudson, C. & H. Woodland (1998) Xpat, a gene expressed specifically in germ plasm and primordial germ cells of *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, 73, 159-68.
- Ikenishi, K., M. Kotani & K. Tanabe (1974) Ultrastructural changes associated with UV irradiation in the "germinal plasm" of *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 36, 155-68.
- Ikenishi K. & M. Kotani (1975) Ultrastructure of the „germinal plasm“ in *Xenopus* embryos after cleavage. *Development, Growth and Differentiation*, 17.
- Ikenishi K. (1998) Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Develop. Growth Differ.* 40, 1-10
- Kamimura, M., Kotani, M. & Yamagata, K.(1980)The migration of presumptive primordial germ cells through the endodermal cell mass in *Xenopus laevis*: a light and electron microscopic study. *J Embryol Exp Morphol* 59, 1-17 .
- Kloc, M., Bilinski, S. & Dougherty, M. (2007) Organization of cytoskeleton and germ plasm in the vegetal cortex of *Xenopus laevis* oocytes depends on coding and non-coding RNAs: three-dimensional and ultrastructural analysis. *Exp Cell Res* 313, 1639-1651 .
- Kloc, M., Bilinski, S., Pui-Yee Chan, A. & Etkin, L. (2000) The targeting of Xcat2 mRNA to the germinal granules depends on a cis-acting germinal granule localization element within the 3'UTR. *Dev Biol* 217, 221-229 (2000).
- Kloc, M., M. Dougherty, S. Bilinski, A. Chan, E. Brey, M. King, C. J. Patrick & L. Etkin (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol*, 241, 79-93.
- Kloc, M. & Etkin, L. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlirt RNA. *Science* 265, 1101-1103 (1994).
- Kloc, M., Larabell, C., Chan, A. & Etkin, L. Contribution of METRO pathway localized molecules to the organization of the germ cell lineage. *Mech Dev* 75, 81-93 (1998).
- Lehman R., Rongo Ch. (1993) Germ plasm formation and germ cell determination. *Dev Biol*, 4, 149-159
- Kloc, M., Spohr, G. & Etkin, L. Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in *Xenopus* oocytes. *Science* 262, 1712-1714 (1993).
- MacArthur, H., M. Bubunencko, D. Houston & M. King (1999) Xcat2 RNA is a translationally sequestered germ plasm component in *Xenopus*. *Mech Dev*, 84, 75-88.

- MacArthur, H., D. Houston, M. Bubunenko, L. Mosquera & M. King (2000) DEADSouth is a germ plasm specific DEAD-box RNA helicase in *Xenopus* related to eIF4A. *Mech Dev*, 95, 291-5.
- Machado, R., W. Moore, R. Hames, E. Houlston, P. Chang, M. King & H. Woodland (2005) *Xenopus* Xpat protein is a major component of germ plasm and may function in its organisation and positioning. *Dev Biol*, 287, 289-300.
- Mosquera, L., C. Forristall, Y. Zhou & M. King (1993) A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development*, 117, 377-86.
- Ressom, R. & K. Dixon (1988) Relocation and reorganization of germ plasm in *Xenopus* embryos after fertilization. *Development*, 103, 507-18.
- Rangan P., DeGennaro M., Jaime-Bustamante K., Coux R., Martinho R., Lehmann R., (2009) Temporal and spatial control of germ plasm RNAs, *Curr Biol*. 19, 72-77
- Robb, D., Heasman, J., Raats, J. & Wylie, C. A kinesin-like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell* 87, 823-831 (1996).
- Schnapp, B., E. Arn, J. Deshler & M. Highett (1997) RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Semin Cell Dev Biol*, 8, 529-40.
- Sekizaki, H. et al. Tracing of *Xenopus tropicalis* germ plasm and presumptive primordial germ cells with the *Xenopus tropicalis* DAZ-like gene. *Dev Dyn* 229, 367-372 (2004).
- Smith, L. & M. Williams (1975) Germinal plasm and determination of the primordial germ cells. *Symp Soc Dev Biol*, 3-24.
- Tanabe, K. & M. Kotani (1974) Relationship between the amount of the 'germinal plasm' and the number of primordial germ cells in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 31, 89-98.
- Weidinger, G., J. Stebler, K. Slanchev, K. Dumstrei, C. Wise, R. Lovell-Badge, C. Thisse, B. Thisse & E. Raz (2003) dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol*, 13, 1429-34.
- Whittington, P. & K. Dixon (1975) Quantitative studies of germ plasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol*, 33, 57-74.
- Wilk, K., S. Bilinski, M. Dougherty & M. Kloc (2005) Delivery of germinal granules and localized RNAs via the messenger transport organizer pathway to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes occurs through directional expansion of the mitochondrial cloud. *Int J Dev Biol*, 49, 17-21.

Zhou, Y. & M. King (1996a) Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development*, 122, 2947-53.

Zhou, Y. & M. King (1996b) RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*, 179, 173-83.