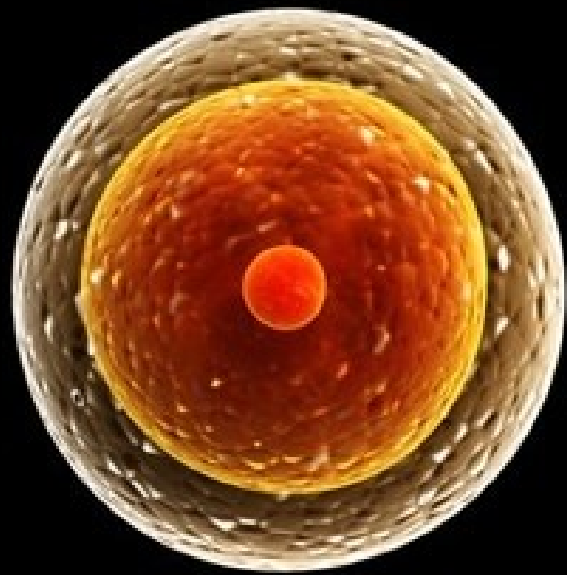
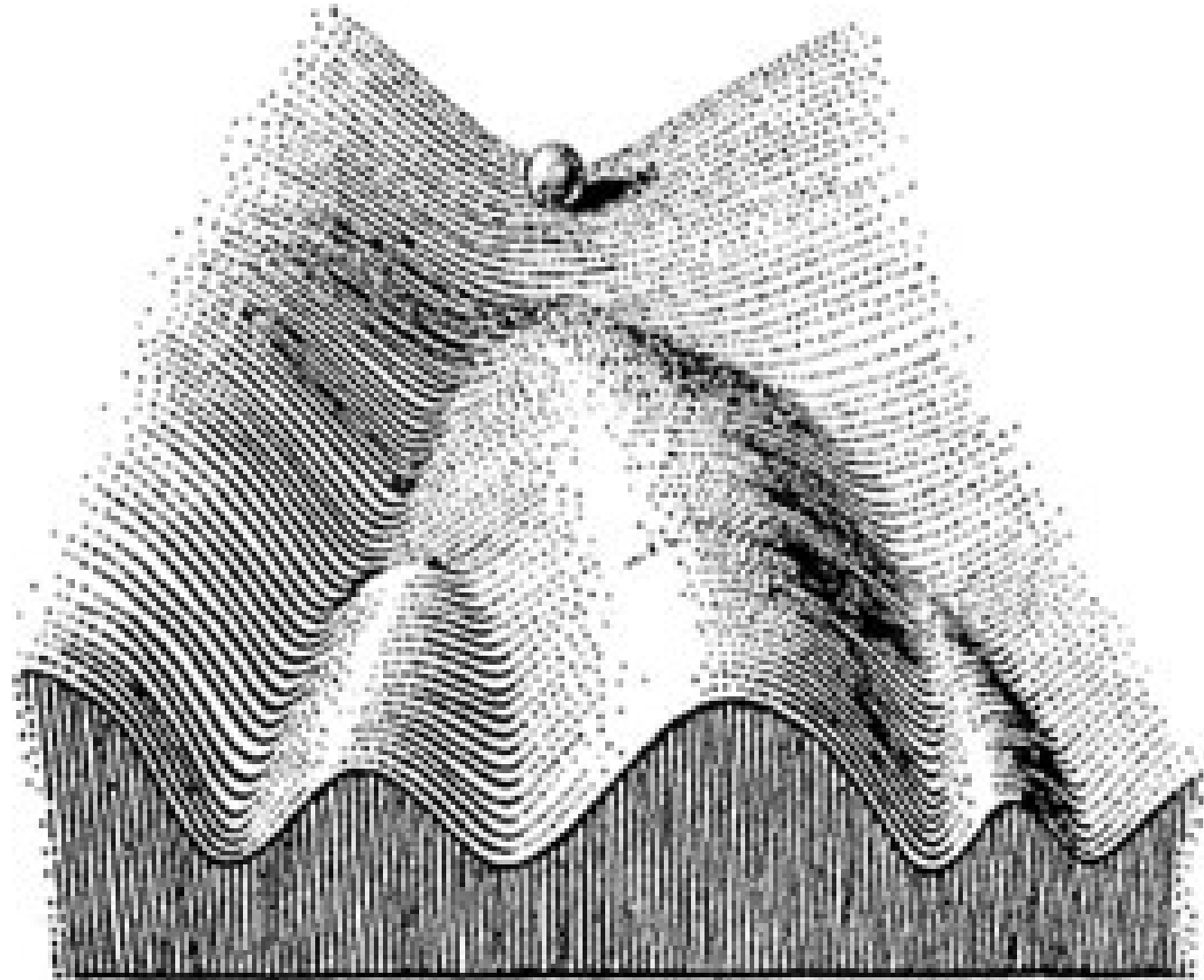


# Sledování osudu buněk

Experimentální embryologie





The strategy of the genes  
C.H. Waddington, 1957

# Analýza buněčného osudu vs migrace

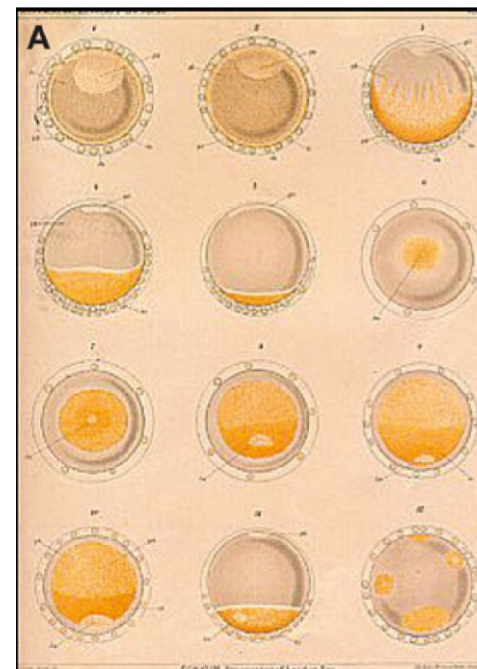
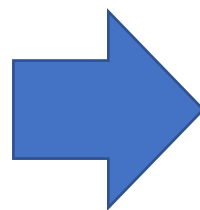
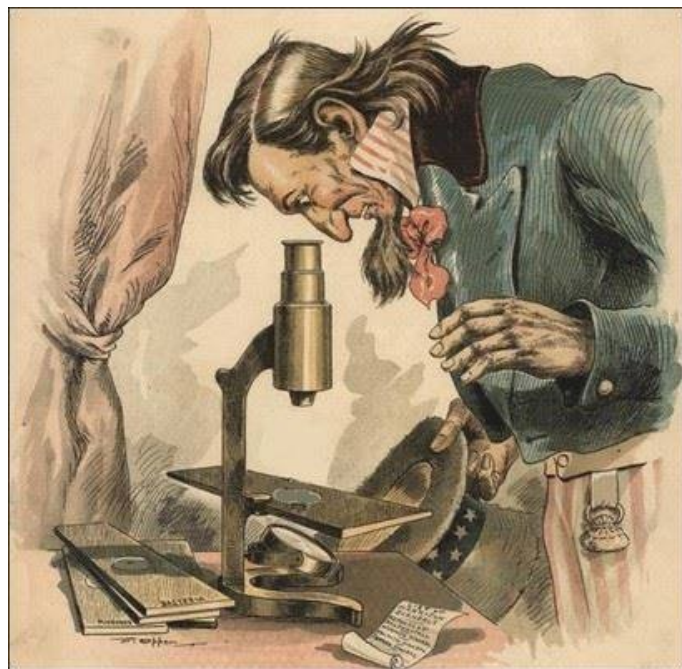
- Sledováním buněčného osudu rozumíme analýzu potomků zkoumané buňky/buněk. Zajímá nás například, ve kterých orgánech či strukturách můžeme nalézt potomky zkoumané buňky, nebo jakým buněčným typům dává zkoumaná buňka vzniknout.
- Velkým rozdílem oproti migračním analýzám (např. cell tracking) zde tedy je, že sledujeme **potomstvo** buňky. Tím pádem musíme počítat s dělením buněk a upravit tomu experimentální techniku.

# Vizuální metody sledování buněčného osudu

(historie, Dil a jiná barvení, transgenní přístupy (GFP, LacZ), Cre-Lox a Confetti systém)

# Historické přístupy

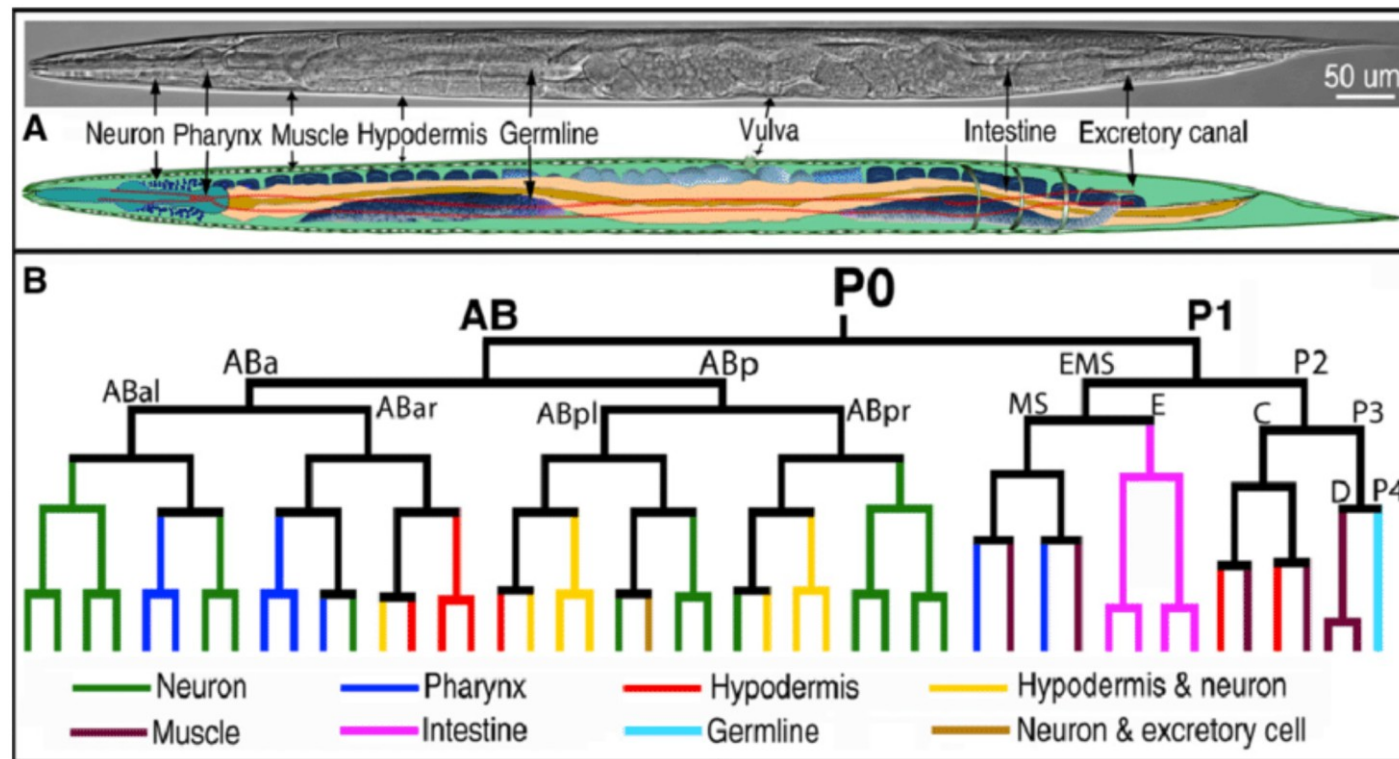
- Jednoduše, **přímé sledování** ve světelném mikroskopu



- Může to vypadat primitivně, ale už v 19. století byly takto položeny základy embryologie.

# Mapování *C. elegans*

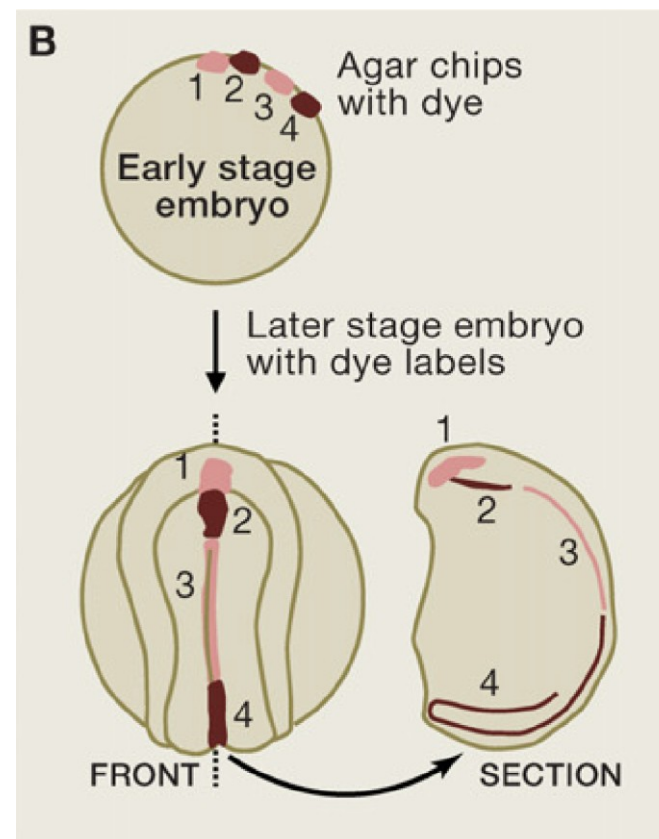
- Přímým pozorováním (live imaging) byl např. v roce 1983 zmapován osud **všech** buněk *C. elegans*



10.15252/msb.20145857.

# Historické přístupy

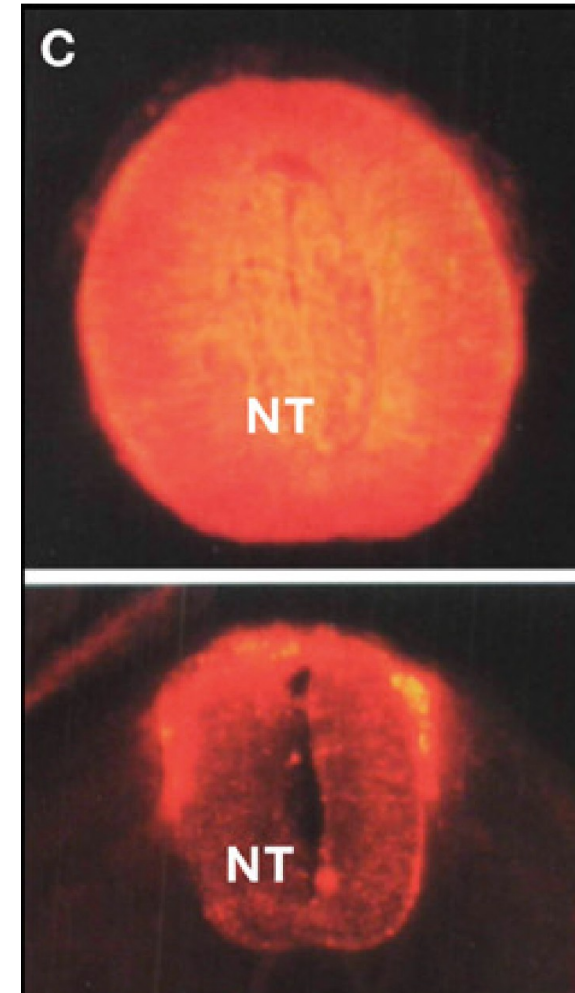
- Sledování nabarvených **agarových zrněk**
  - Aplikace na povrch nebo i dovnitř buněk





# Vitální barviva

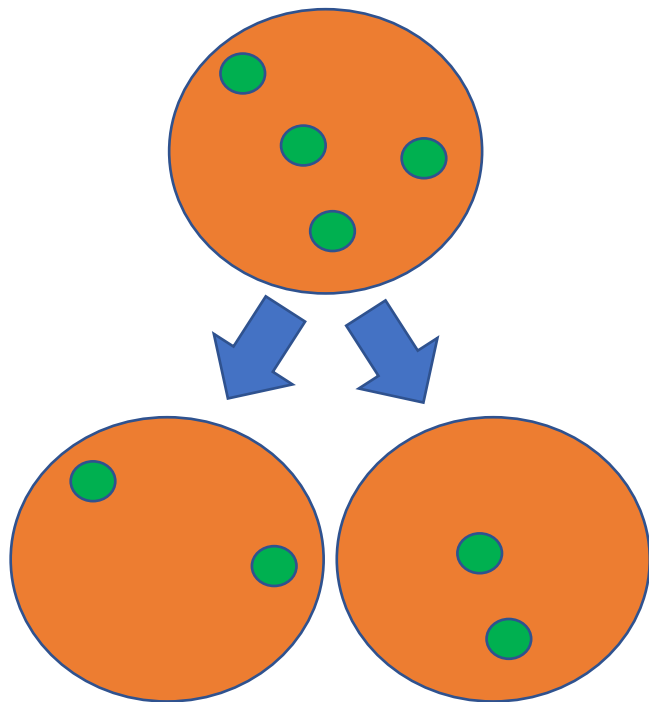
- Cílem je, obarvit sledovanou buňku tak, aby se barva přenesla i na potomstvo, ale ne na sousední buňky.
- Zároveň nesmí být barvou ovlivněn osud, chování a fungování buňky.
- Klasickými příklady jsou **DiI** (indocarbocyanine) a **DiO** (oxacarbocyanine). Jedná se o lipid-solubilní barvy, která jsou schopny začlenit se do buněčné membrány a poté zesílí svůj signál.
- Dále lze použít např.
  - **fluorescenčně značený dextran** (injekce dovnitř buňky)
  - **HRP** (Horseradish peroxidase) – opět injekce do buňky, po přidání substrátu produkuje světelný signál
- Hlavní limitací těchto přístupů je riziko označení sousedních buněk a také postupné vyředění barvy s postupujícím dělením buněk.



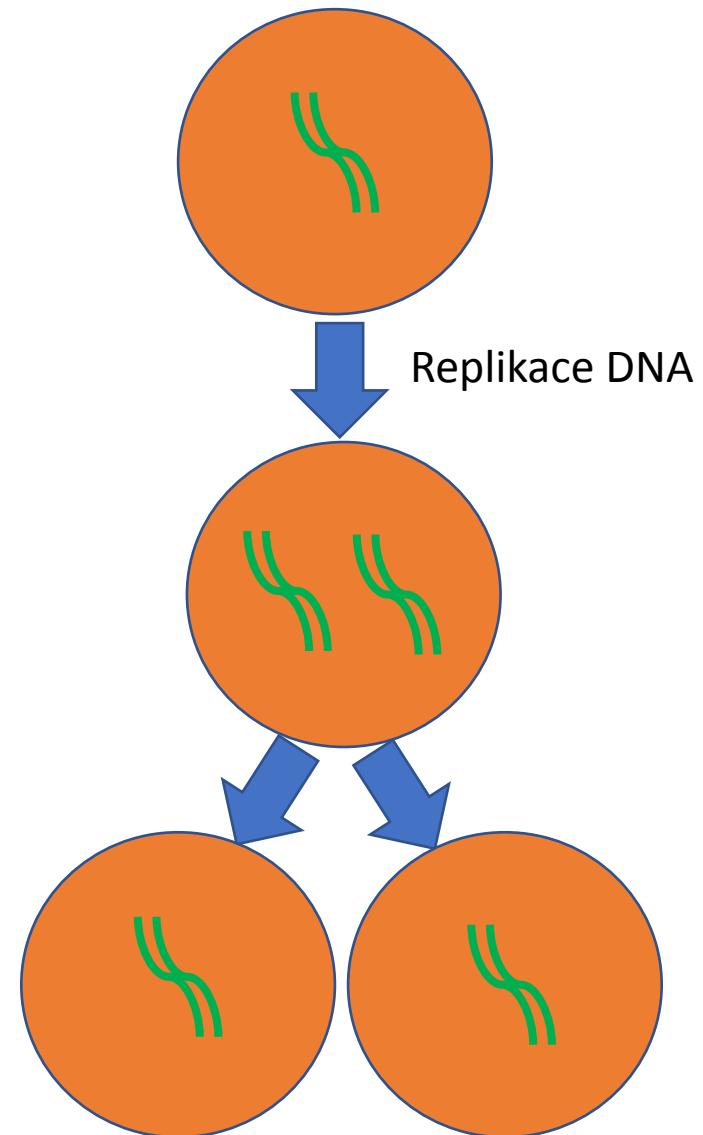
# Transgenní přístupy

- Principem těchto metod je, přenést do sledovaných buněk gen kódující barevnou značku – např. geny **GFP** a **LacZ**
  - **GFP** – Green Fluorescent Protein, po excitaci modrým světlem produkuje zelený světelný signál
  - **LacZ** – gen kódující enzym  $\beta$ -galaktosidázu, která po přidání X-galaktózy produkuje modrou barvu
- Existuje několik způsobů vnesení genu do buňky, které se liší především trváním exprese tohoto genu
  - **Transientní**
    - Gen je exprimován pouze krátkodobě a nedochází k jeho stabilní integraci do genomu buňky, stále jej mohou zdědit dceřinné buňky, ale postupně se vyřadí
    - Lipofekce, elektroporace, nebo mikroinjekce plazmidů
  - **Stabilní**
    - Gen je stabilně začleněn do genomu buňky a všechny dceřinné buňky jej zdědí
    - Virová transdukce

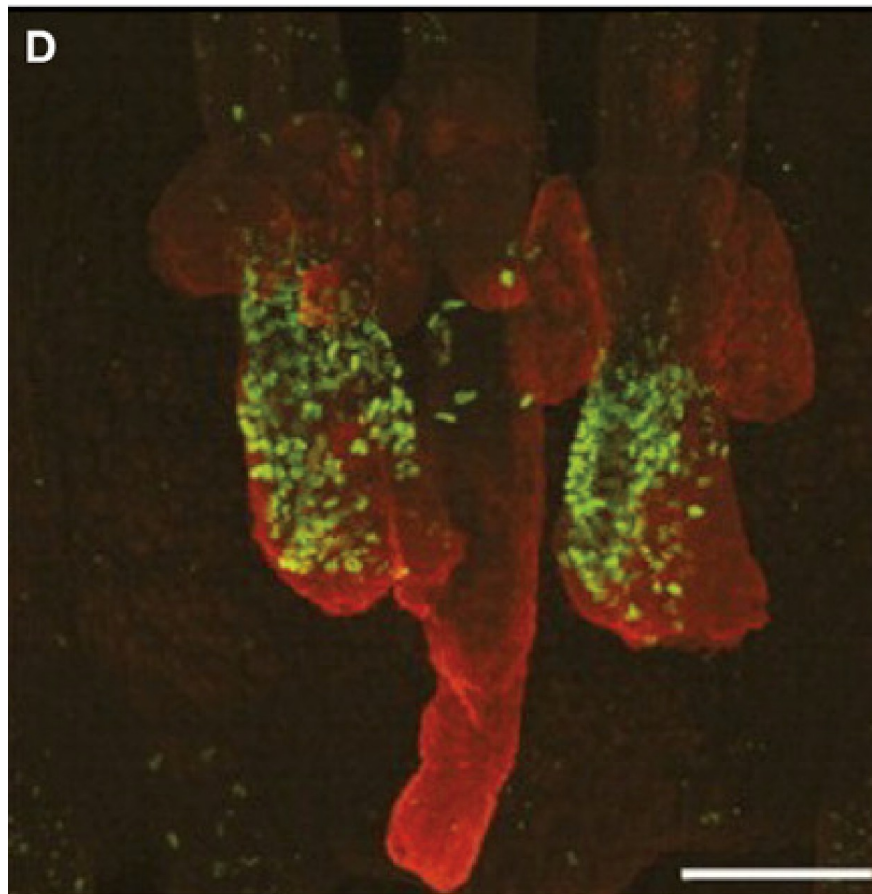
## Transientní vnesení genu



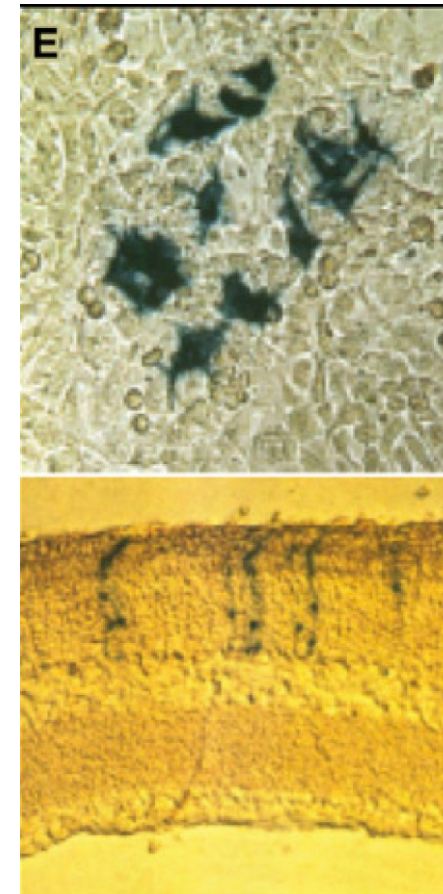
## Stabilní vnesení genu



GFP značení



LacZ značení



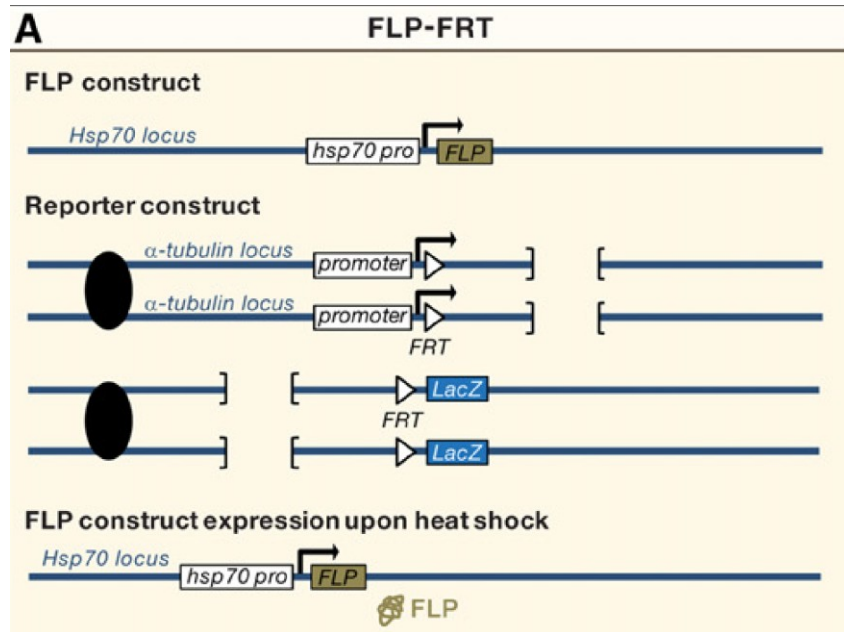
# Transplantace a využití chimér

- Dalším „klasickým“ přístupem pro sledování osudu buněk jsou **transplantační experimenty**. Výhodou je, že většinou velice lehce odlišíme buňky hostitele a graftu od sebe – např. transplantace mezi různě barvenými mloky.
- Podobně lze využít také **chimér** – embryí složených z více různých buněk. Nejprve izolujeme buňky z jednoho embrya a barevně je označíme, poté je smícháme s buňkami neznačeného embrya.
- Nevýhodou těchto přístupů je, že se jedná o poměrně zásadní zásah do tkáně/organismu.

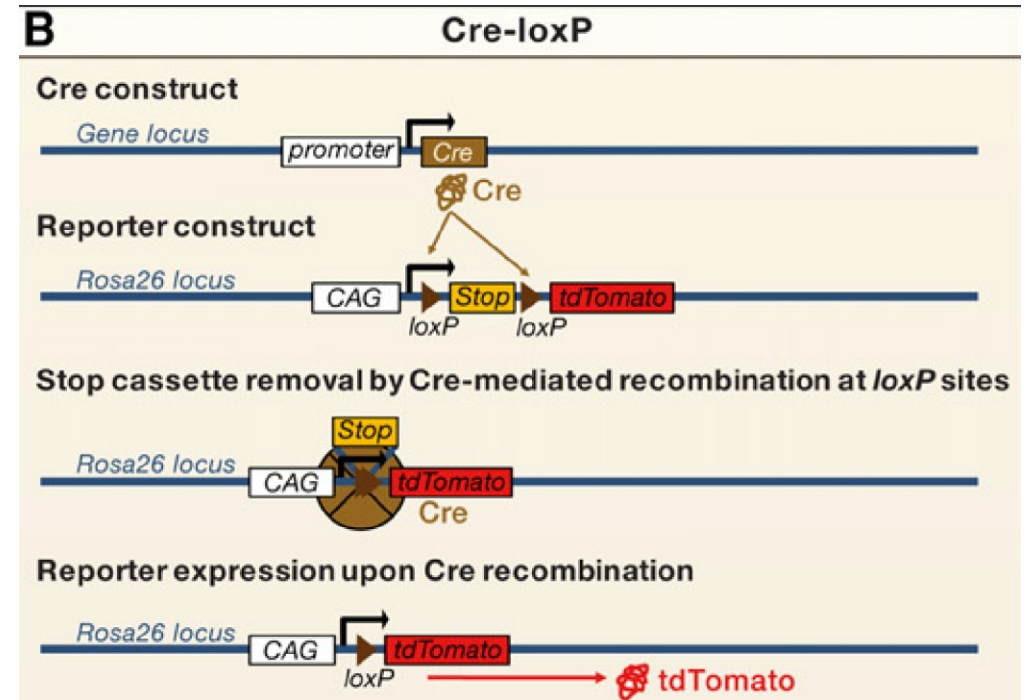




# FLP-FRT a Cre-Lox systémy



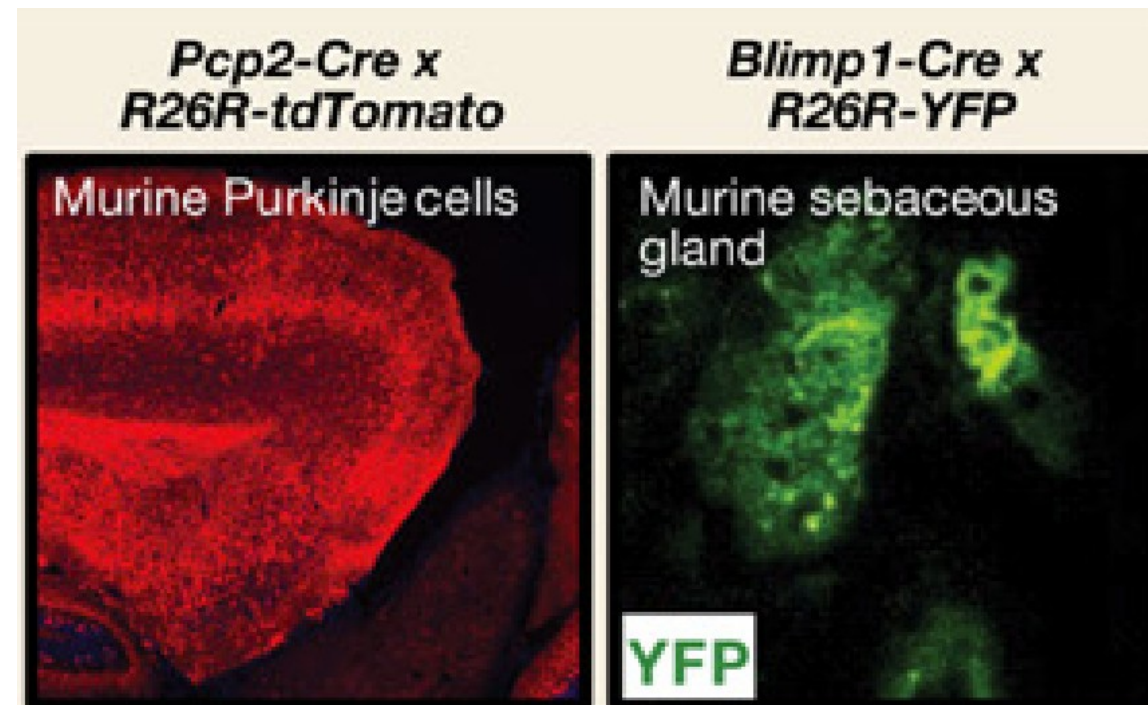
- Typicky používán v *Drosophila*
- Rekombinace vede k fúzi promotoru a reportérového genu, což spustí expresi reportéru



- Typicky používán v myších modelech
- Rekombinace vede k vystřížení STOP sekvence a spuštění exprese reportéru

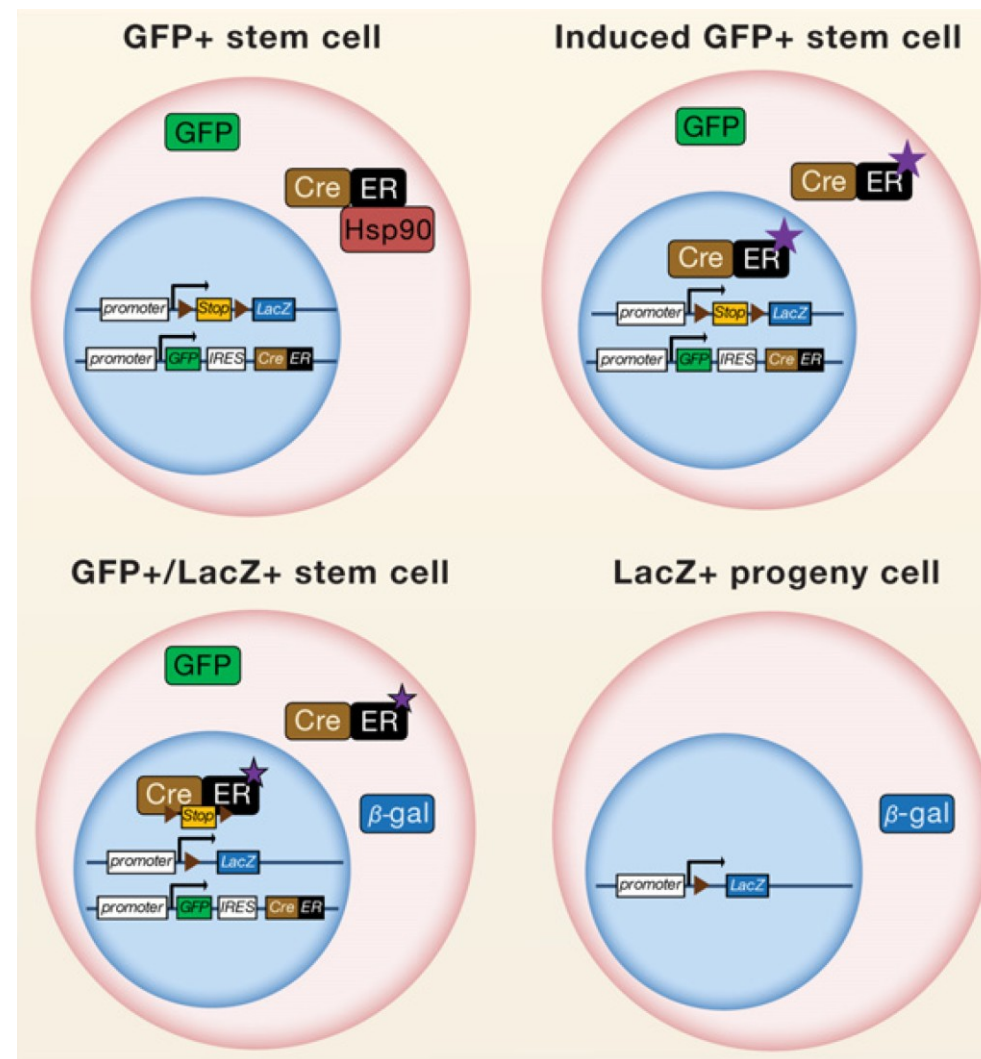
# FLP-FRET a Cre-Lox systémy

- U obou systémů je zásadní, že expresi rekombinázy lze řídit tkáňově nebo buněčně specifickým promotorem. To umožní rekombinaci a obarvení pouze ve vybraných buňkách.



# FLP-FRET a Cre-Lox systémy

- Další možností je, použít heat-schock promotor nebo třeba Tamoxifen-inducibilní rekombinázu, což nám umožní vybrat si přesný čas/vývojové stádium kdy k rekombinaci dojde. Časové a místní řízení rekombinace lze navíc i kombinovat dohromady.
- Příklad použití – sledování kmenových buněk v dospělosti. Specifický promotor nám směřuje expresi do kmenových buněk, Tamoxifenová indukce nám umožní „zapnout“ barevné značení až v dospělosti.





# FLP-FRET a Cre-Lox systémy

- Další možností je, použít heat-schock promotor nebo třeba Tamoxifen-inducibilní rekombinázu, což nám umožní vybrat si přesný čas/vývojové stádium kdy k rekombinaci dojde. Časové a místní řízení rekombinace lze navíc i kombinovat dohromady.
- Příklad použití – sledování kmenových buněk v dospělosti. Specifický promotor nám směřuje expresi do kmenových buněk, Tamoxifenová indukce nám umožní „zapnout“ barevné značení až v dospělosti.

*Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2*

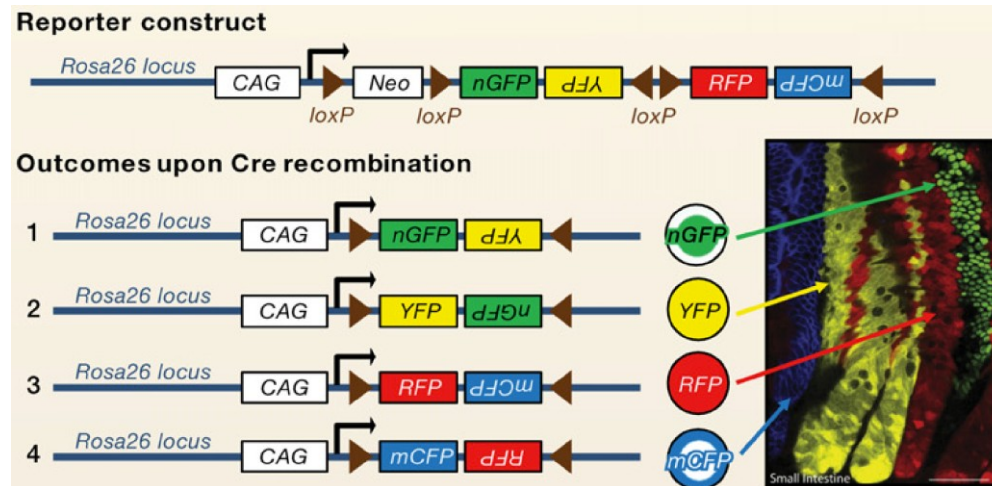


Small intestine

# Brainbow a Confetti mouse

- Jedná se o modifikace Cre-Lox systému, kde dojde k náhodnému označení každé z buněčných rodin jednou barvou.

Brainbow systém



Confetti

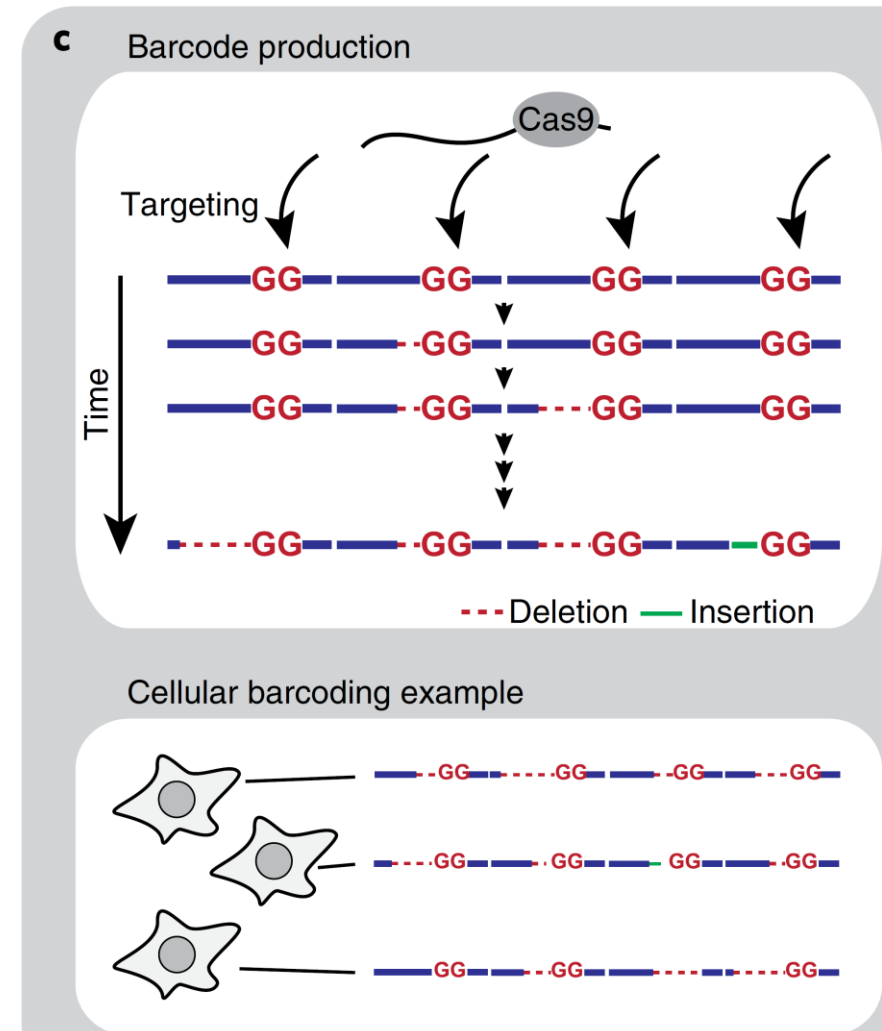
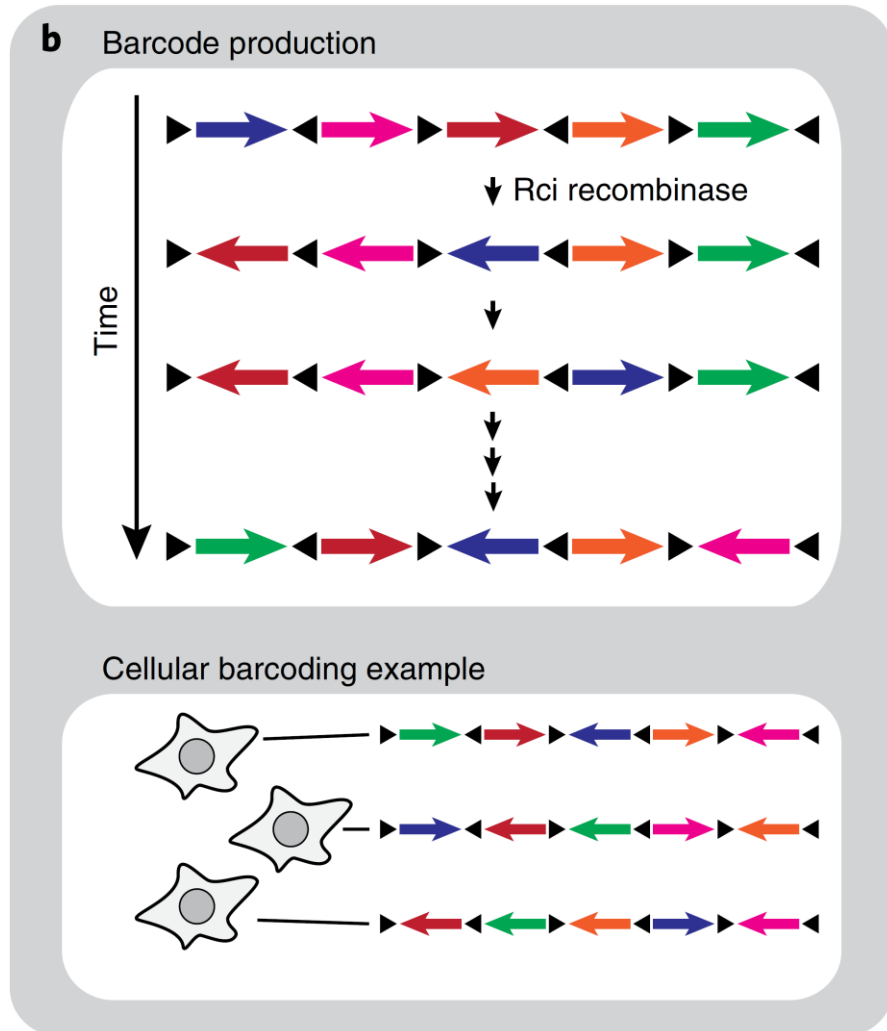


# Bonus: DNA barcoding



- S rozmachem sekvenačních technologií došlo k velkému posunu v oblasti tzv. „barcodingu“.
- V podstatě jde o to, že do buněk se stabilně vnesou různé nekódující DNA sekvence, často v mnoha kopiích. Poté se v organismu exprimuje endonukleáza nebo rekombináza, která tyto sekvence cílí a změní je. Takto provedené změny v barcodových sekvencích jsou dědičné a každá buňka tedy přenesou svoji unikátní kombinaci mutací (svůj barcode) na své potomky. Poté provedeme single-cell sekvenování a dokážeme složit dohromady kompletní mapu organismu.

# Bonus: DNA barcoding



# Zdroje

- <https://www.news-medical.net/health/Embryogenesis-Cleavage.aspx>
- <https://www.facebook.com/AntiqueMicroscopes/>
- 10.15252/msb.20145857
- 10.1242/dev.198994
- 10.1016/j.cell.2012.01.002
- <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0185-x>