

#2

Metody a modely vývojové
biologie

Základní modely

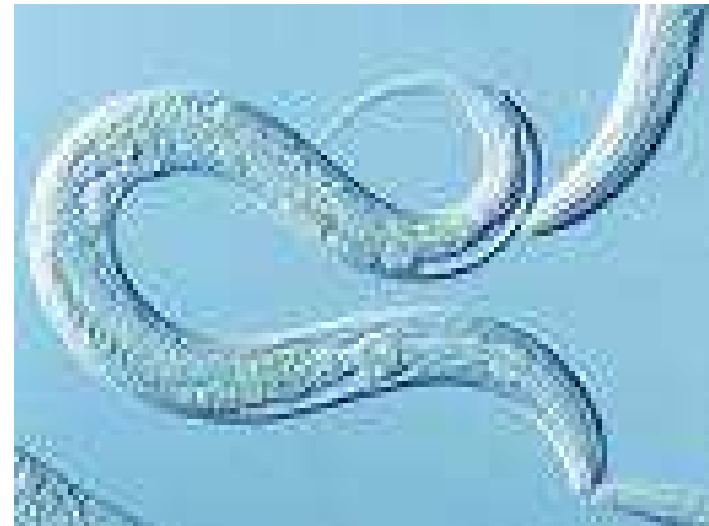
- *Coenorhabditis elegans* (háďátko)
- *Drosophila melanogaster* (octomilka)
- *Danio rerio* (zebrafish, dánio, zebříčka)
- *Xenopus tropicalis/laevis* (drápatka, frog)
- kuře (*Gallus domesticus*, chick)
- myš (*Mus musculus*, mouse)

Výhody a nevýhody jednotlivých modelů (parametry)

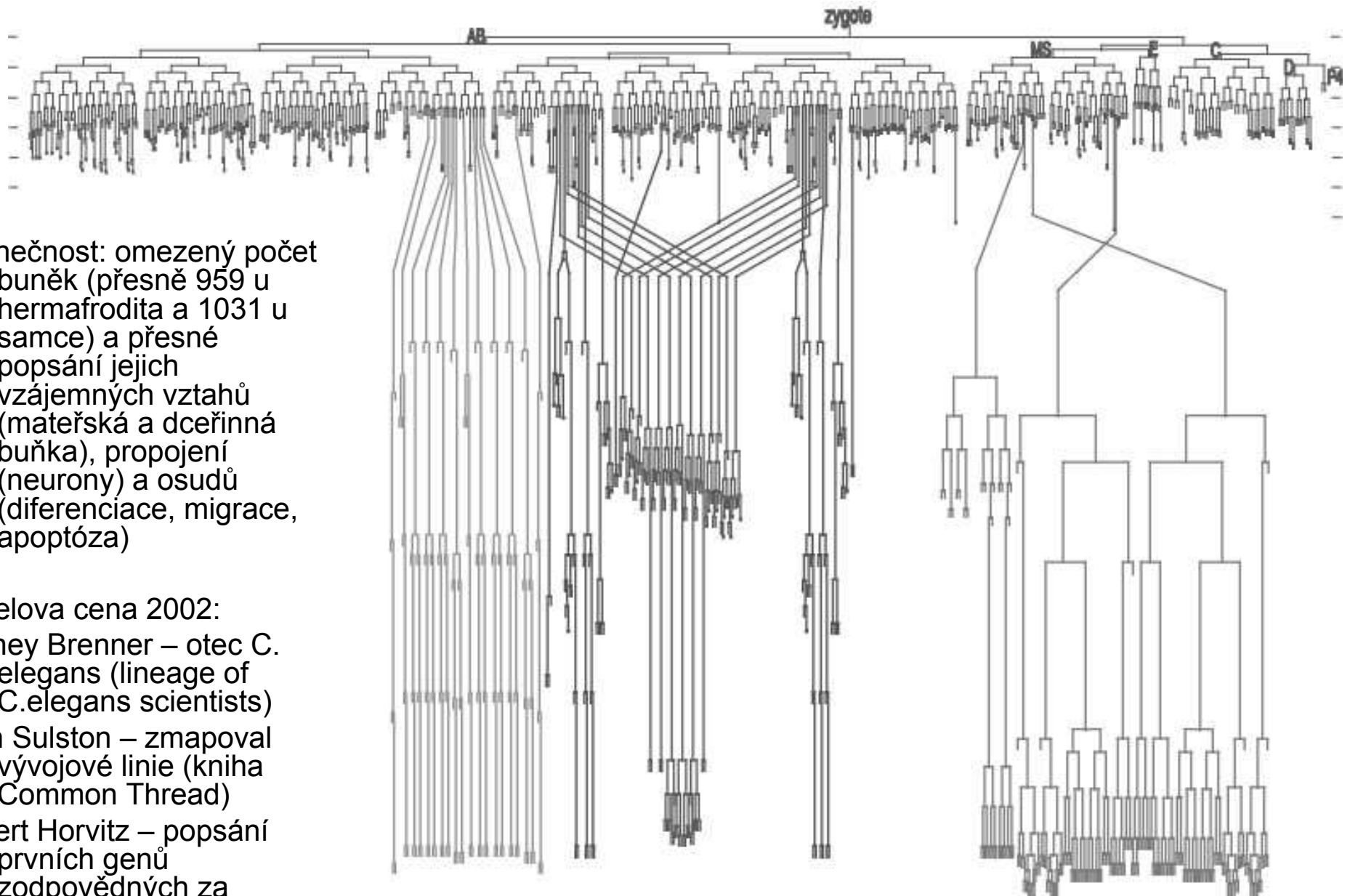
- Je model v něčem jedinečný?
- Jak moc je model přístupný genetické manipulaci?
- Jak rychle je možno provést experiment?
- Jak moc je model relevantní pro lidskou embryogenezi a medicínu?
- Jak finančně náročné je pracovat s daným modelem?
- Další parametry (vhodný pro large-scale screening?, vhodný pro in vivo imaging?, vhodný pro lineage tracing? atd.)

Coenorhabditis elegans (worm)

- asi 1 mm velký hlíst
- levný provoz
- mutantní kmeny se mohou uchovávat jako zmražené
- vhodný pro poznávání základních mechanismů vývoje a buněčných vztahů
- omezená přenositelnost konkrétních poznatků (např. o funkci jednotlivých genů) na další modelové organismy a člověka – důvodem je značná fylogenetická vzdálenost a specifické funkce mnoha genů u *C. elegans*



Coenorhabditis elegans



Jedinečnost: omezený počet buněk (přesně 959 u hermafrodita a 1031 u samce) a přesné popsání jejich vzájemných vztahů (mateřská a dceřinná buňka), propojení (neurony) a osudů (diferenciace, migrace, apoptóza)

Nobelova cena 2002:
Sydney Brenner – otec *C. elegans* (lineage of *C. elegans* scientists)
John Sulston – zmapoval vývojové linie (kniha *Common Thread*)
Robert Horvitz – popsání prvních genů zodpovědných za apoptózu

Coenorhabditis elegans

- genom sekvenován 2002, asi 20 000 genů
- genetické manipulace – RNA interference (Nobelova cena 2006 – Andrew Fire and Craigh Mello) – ponoření, mikroinjekce nebo nakrmení bakteriema s patřičnou dsRNA
- v ČR – skupina M. Jindry a M. Asahina v Českých Budějovicích
- užitečné odkazy na: <http://www.wormbase.org/> nebo <http://www.wormbook.org/>

Drosophila melanogaster



Drosophila melanogaster

- klasický genetický model už od roku 1909 (Thomas Morgan)
- vysoký stupeň poznání genetiky octomilek, nízké náklady a rychlý generační čas (2 týdny) je důvodem pro jejich využití ve vývojové biologii
- genom sekvenován 2000 – pouze 4 páry chromozómu



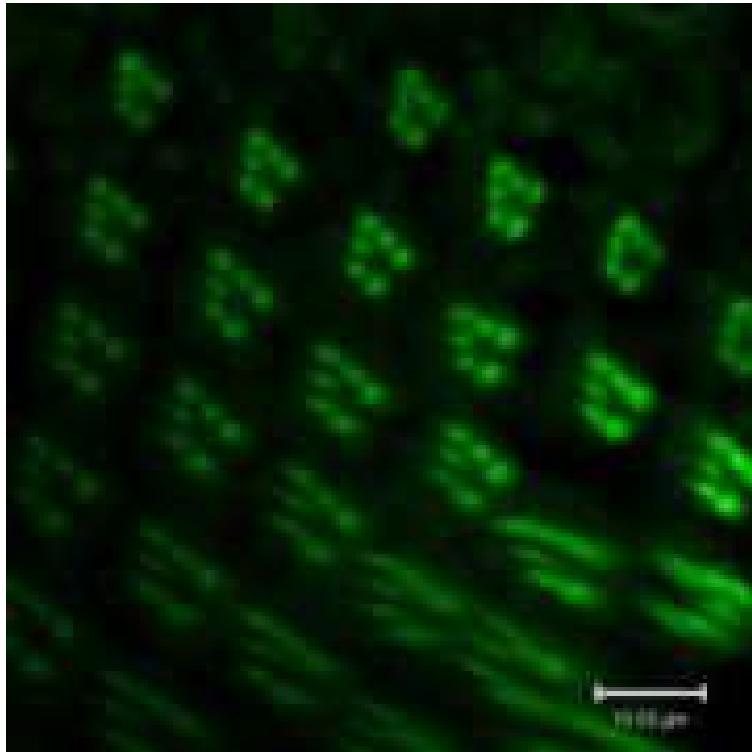
Drosophila melanogaster

- genetické modifikace:
- (i) velké spektrum kmenů s přirozenými nebo indukovanými mutacemi, které se naakumulovaly v průběhu 100 let výzkumu octomilek
- (ii) transgenní Drosophily s využitím P-elementu a pokročilých genetických technik
- (iii) od roku 2000 i specifická rekombinace (knock-out a knock-in kmeny)
- (iv) možnosti vytváření chimér a mozaik



Drosophila melanogaster

•



Homeoboxové geny

Mammals

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

HOX A ← purple, blue, cyan, light blue, green, green, yellow, yellow, yellow, yellow

HOX B ← purple, blue, cyan, light blue, green, green, green, yellow, yellow

HOX C ← cyan, light blue, green, green, yellow, yellow, yellow, yellow, yellow

HOX D ← purple, cyan, cyan, green, green, yellow, yellow, yellow, yellow, yellow

Insects

lab pb Dfd Scr Antp Ubx abdA AbdB

← purple, blue, cyan, light blue, green, green, green, yellow



Xenopus (drápatka)

- *X. laevis* – klasický model, tetraploidní – genom není sekvenován a nejsou možné stabilní genetické modifikace
- *X. tropicallis* – nově zaváděný druh, který umožňuje

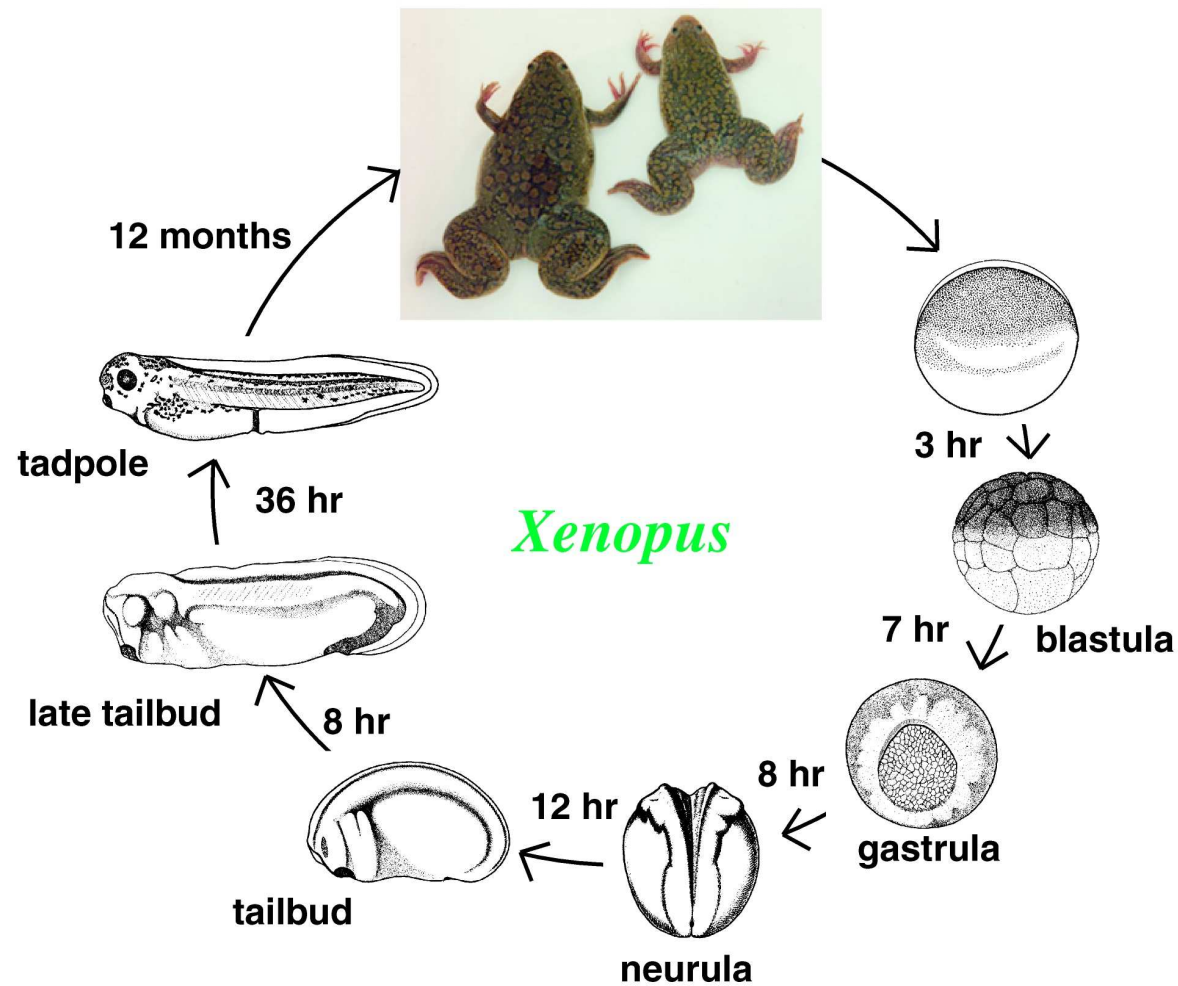


Species	<i>X. laevis</i>	<i>X. tropicalis</i>
ploidy	allotetraploid	diploid
N	18 chromosomes	10 chromosomes
genome size	3.1×10^9 bp	1.7×10^9 bp
temp. optima	16-22 ^o C	25-30 ^o C
adult size	10 cm	4-5 cm
egg size	1-1.3 mm	0.7-0.8 mm
eggs/spawn	300-1000	1000-3000
generation time	1-2 years	4 months

Xenopus (drápatka)

- výhody (modifikováno z Wikipedie):
- 1) *X. laevis* is primarily aquatic and can be maintained and bred easily in aquaria
- 2) unlike most other amphibians, *X. laevis* happily feeds on "dead" organic material
- 3) *X. laevis* is very hardy and tolerate a wide range of living conditions; and most importantly
- 4) *X. laevis* can be induced to ovulate and mate anytime of the year following a simple injection of gonadotropic hormones. This discovery in the 1930's became the basis of a simple pregnancy test for humans and led to its worldwide distribution and use
- 5. By the late 1950's and early 1960's more sensitive methods for detecting pregnancy were developed and *X. laevis* were no longer needed for this purpose. However by this time developmental biologists throughout the world had begun to exploit *Xenopus* embryos as a convenient model system. For the purpose of genetics, and some molecular studies, though, *X. laevis* is not the ideal system, in large part because it is effectively polyploid

Životní cyklus drápatky (*X. laevis*)



Genetické manipulace u *X. laevis*

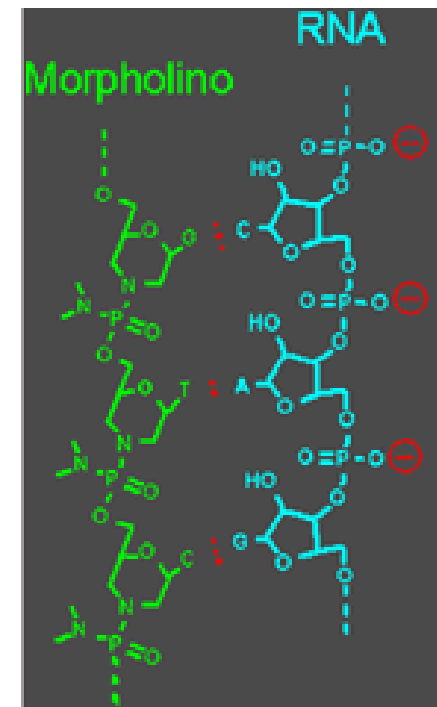
- GOF (gain-of-function) - overexpresse proteinů – mikroinjekce mRNA pro „protein of interest“ do vajíčka nebo buněk časného embrya (podle místa mikroinjekce lze určit ve kterých buňkách k overexpresi dojde)
- LOF (loss-of-function) – mikroinjekce anti-sense morpholino-oligonucleotides – specificky se váží na mRNA v místě prvního kodonu a brání tak translaci



zdvojení tělní osy indukované mikroinjekcí proteinu Wnt do ventrální blastomery

Morpholino-RNA Heteroduplex

- Watson-Crick bonds
- Bases positioned for strong binding
- Usually 25 base Morpholino oligos are used



Danio rerio (zebřička, zebrafish)

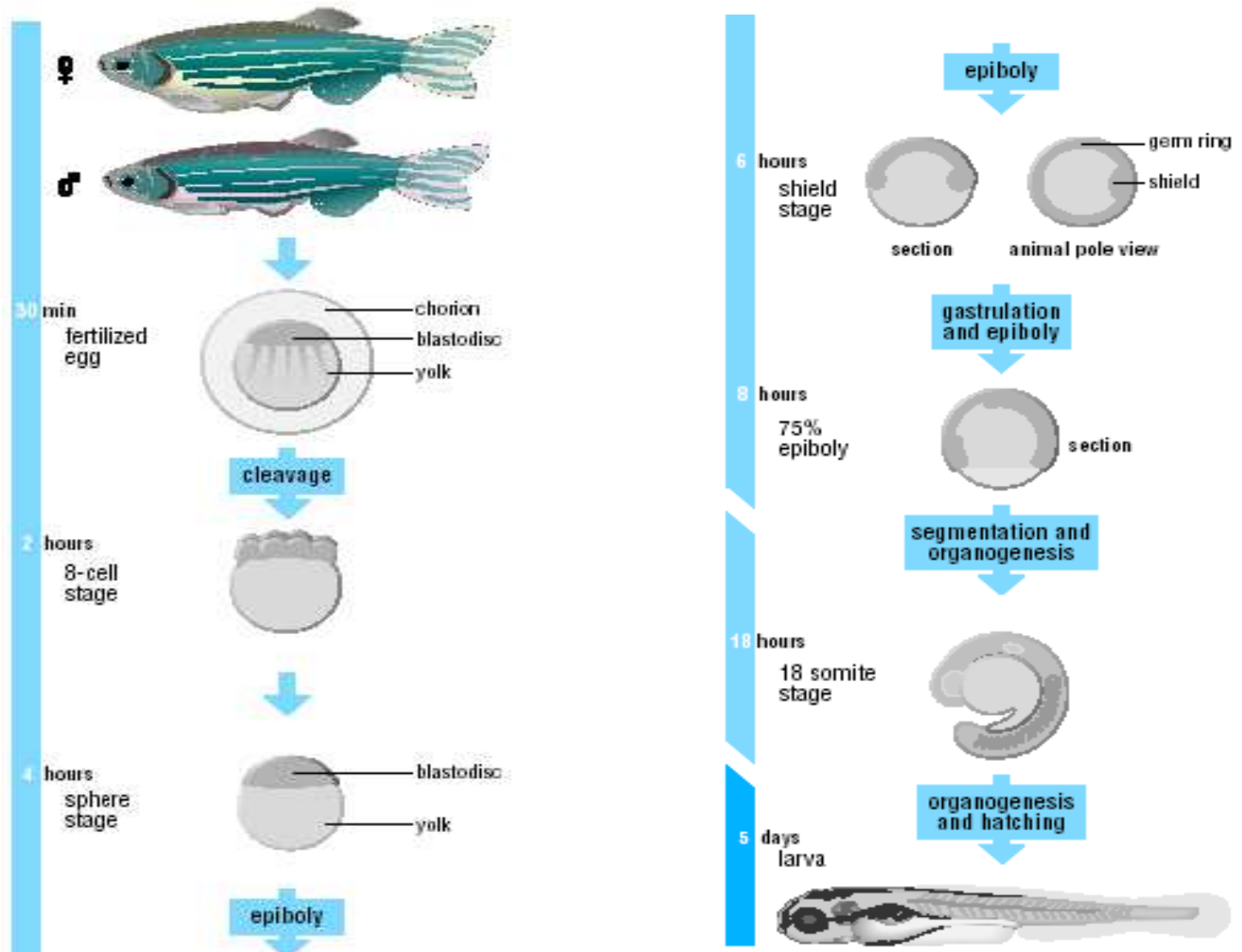


Danio rerio (zebríčka, zebrafish)

Výhody

- obratlovec
- Prolific
- průhledná embrya
- rychlý vývoj
- vnější oplození a vývoj
- jednoduchý systém
- identifikovatelné, stereotypické neurony
- možnost genetických manipulací
- A great community!

Danio rerio – rychlá embryogeneze



Genetické modifikace u *Danio rerio*

1. GOF - overexpress - injekce mRNA do vajíčka nebo embrya
2. LOF
 - a) morpholina
 - b) ENU mutageneze a skrínink
 - c) embryonální kmenové buňky a homologní rekombinace podobně jako u myši – do budoucna

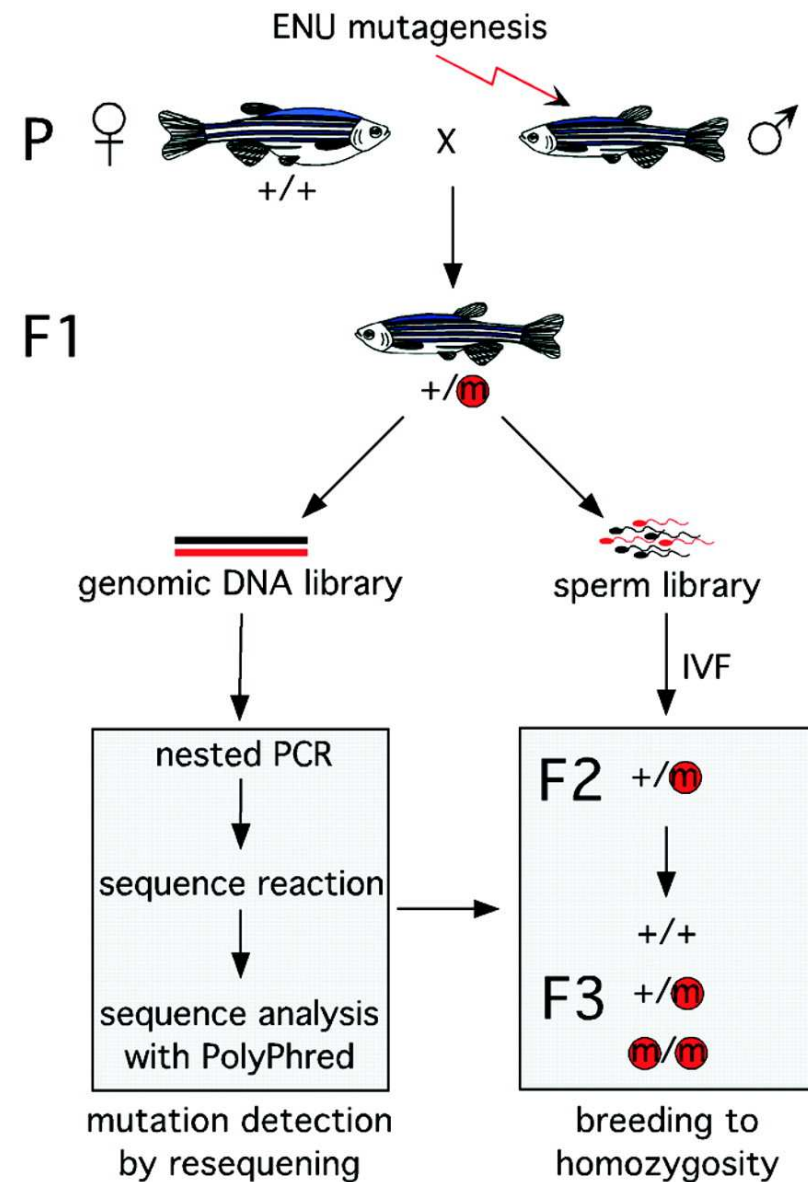
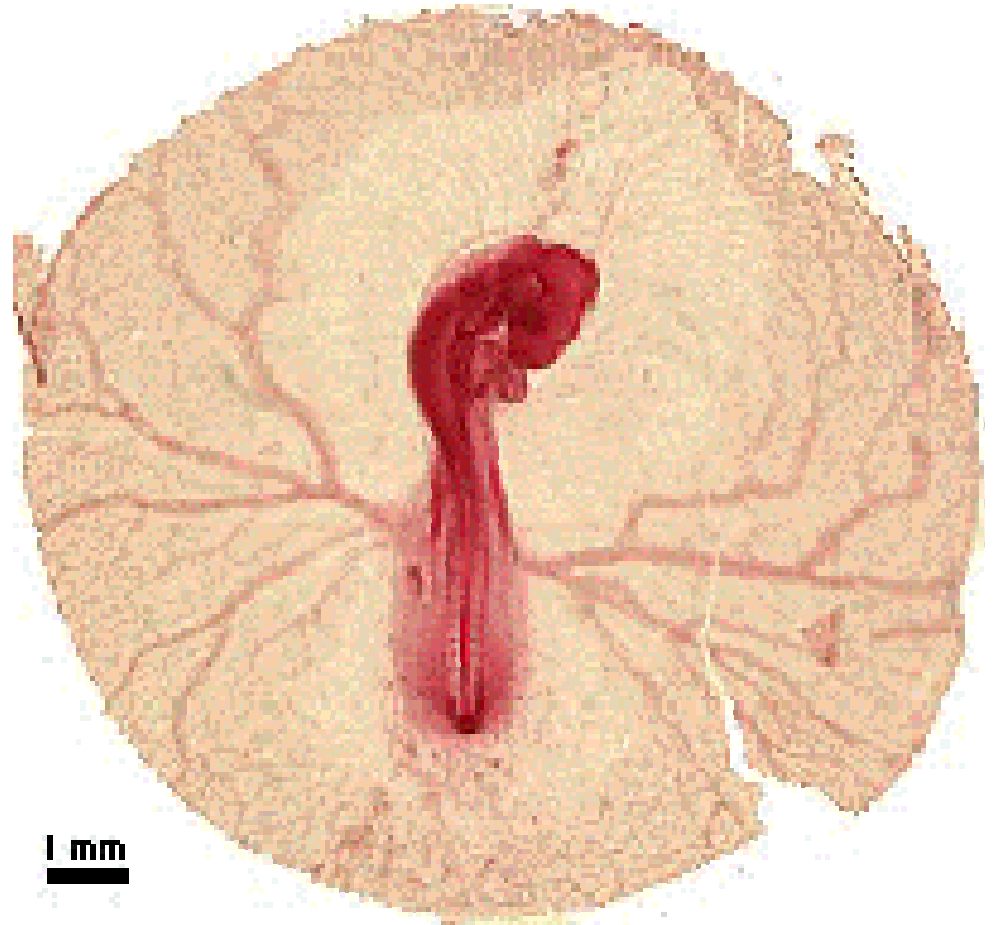


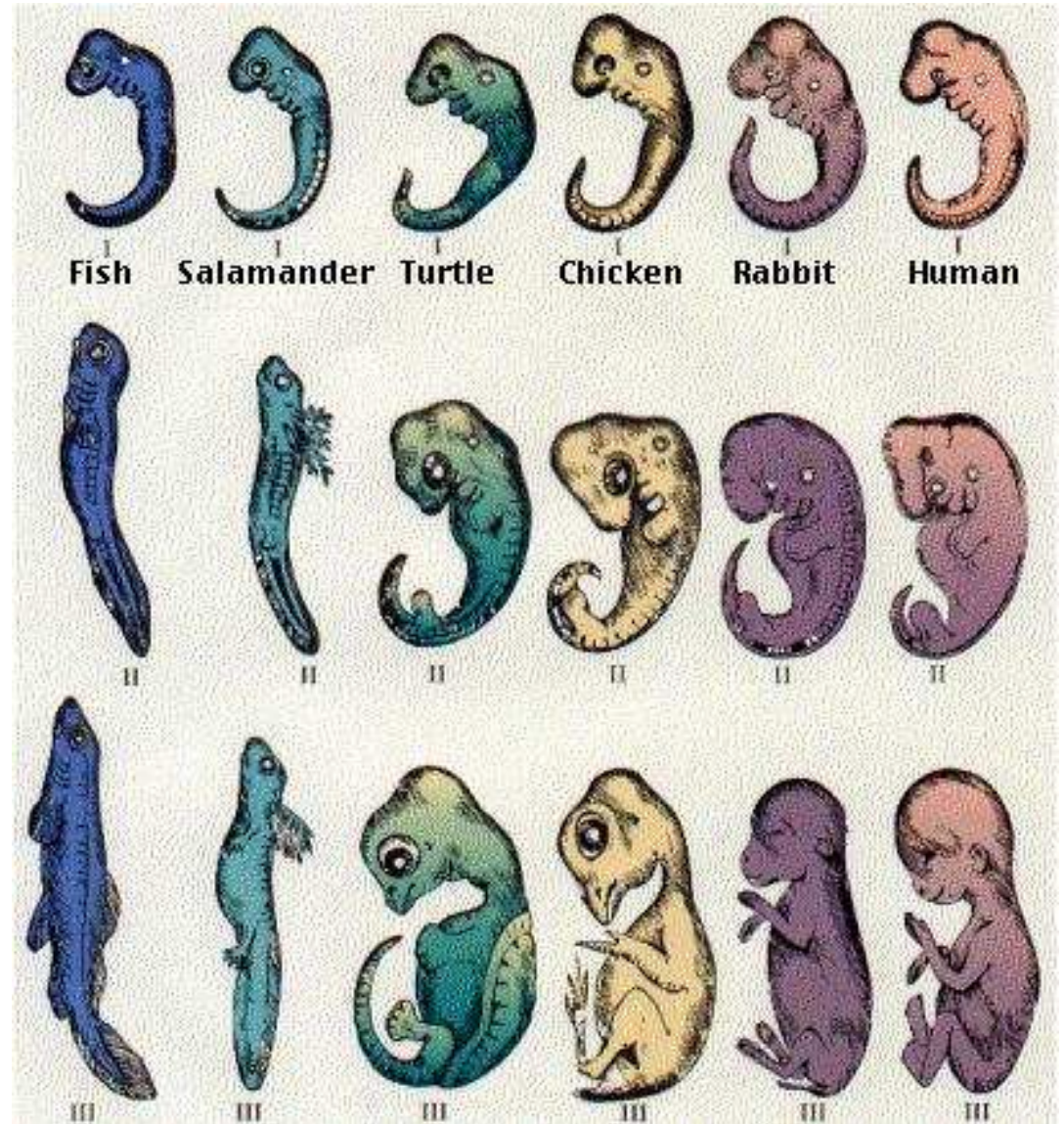
Figure 1. Overview of target-selected mutagenesis in zebrafish. Ninety-nine adult male zebrafish were mutagenized by three to five consecutive treatments with 3 mM ENU, in accordance with (32). The mutagenized fish were crossed with wild-type females to give a nonmosaic F1 generation of fish. Sperm was isolated and cryopreserved from 2679 fertile F1 males. Genomic DNA was isolated, arrayed in PCR plates, and screened for mutations by nested PCR amplification of the target gene and subsequent DNA sequence analysis. After a particular mutation was identified, in vitro fertilizations (IVF) were performed to recover the F2 line carrying the mutation (12). Finally, mutations can be bred to homozygosity and analyzed for phenotypes.

kuře (chick)

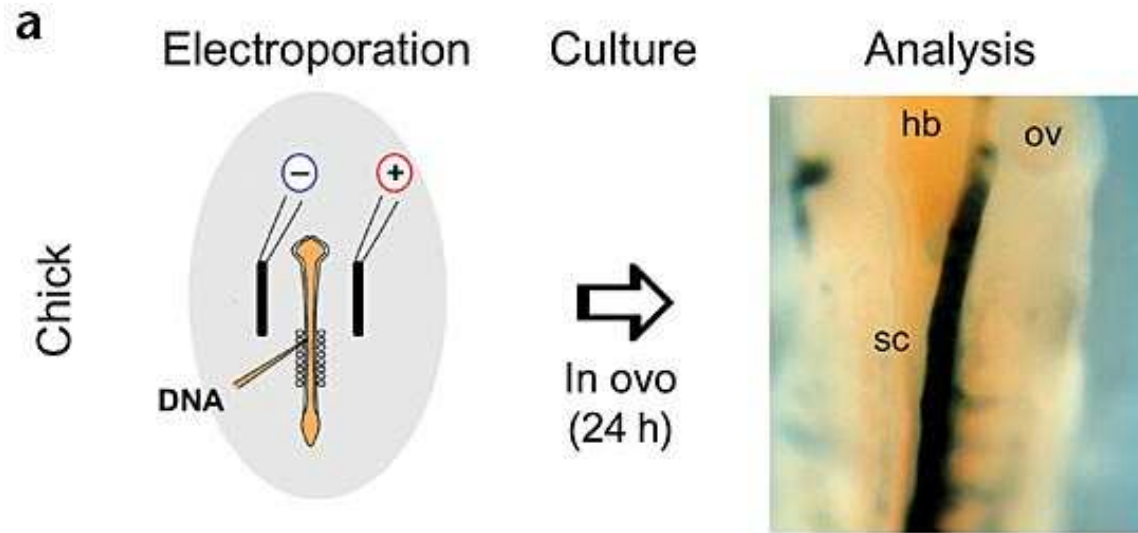


kuře (chick)

- vývoj je blízký (i molekulárně) vývoji savců, včetně člověka
- embryo snadno získatelné (jako vajíčko) a přístupné manipulaci (po odstranění skořápky 😊)
- dobře popsán klasický model, který zažívá nový rozmach s nástupem molekulárních technik
- jako jeden z prvních použit pro lineage tracing (chiméra kuře x křepelka), buňky se liší tvarem jader



Chicken electroporation



Left, the lumen of an eight-somite chicken neural tube is filled with plasmid DNA (orange) to direct *lacZ* expression. Electrodes are placed on either side of the embryo and transfer into the right side of the neural tube (toward the positive pole; +) is achieved by applying 4 50-ms pulses of 15 V each. Right, after *in ovo* culture for 24 h, *lacZ* expression (dark blue) is strongly detected on the transfected side.

Elektroporace kuřecí nervové trubice umožnila poznat jakým způsobem buňky během vývoje získávají a udržují svou identitu

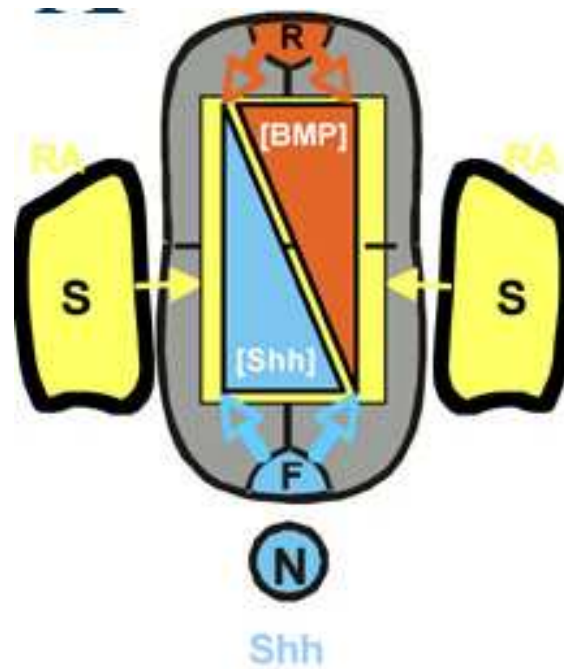
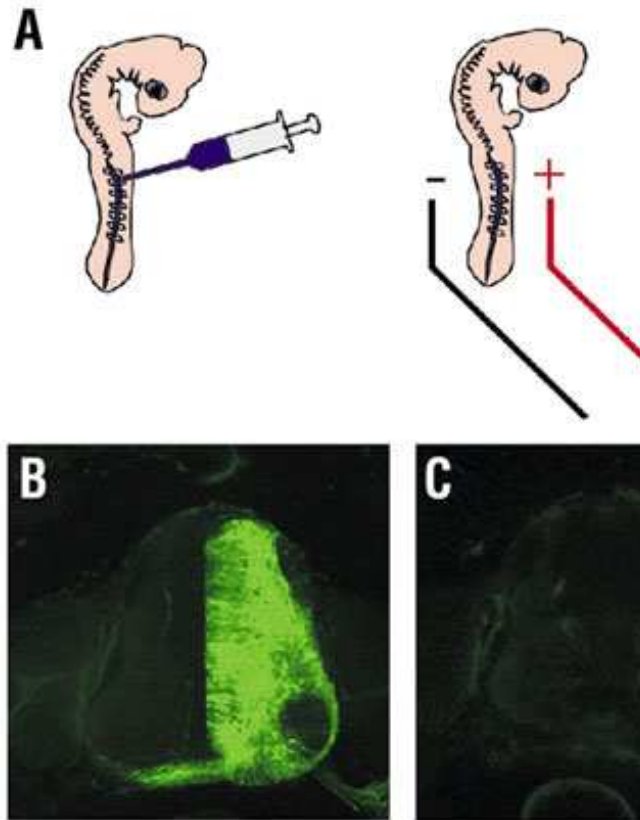
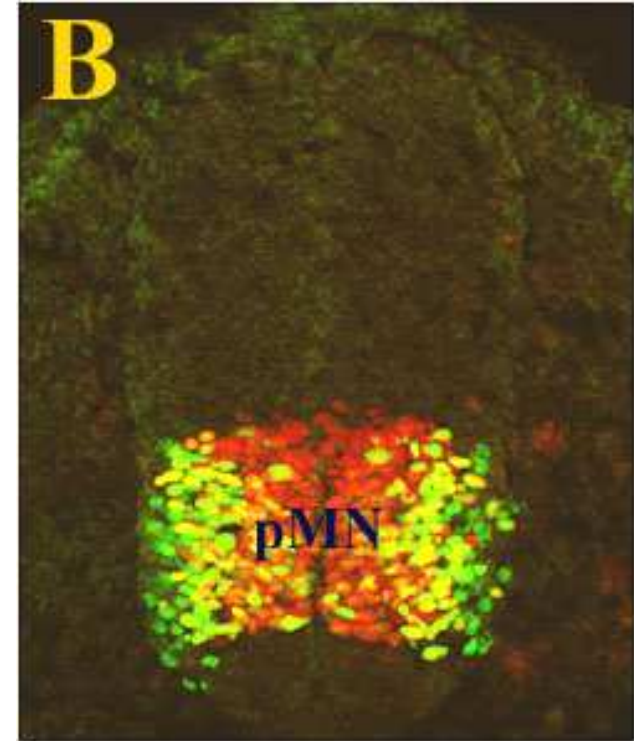


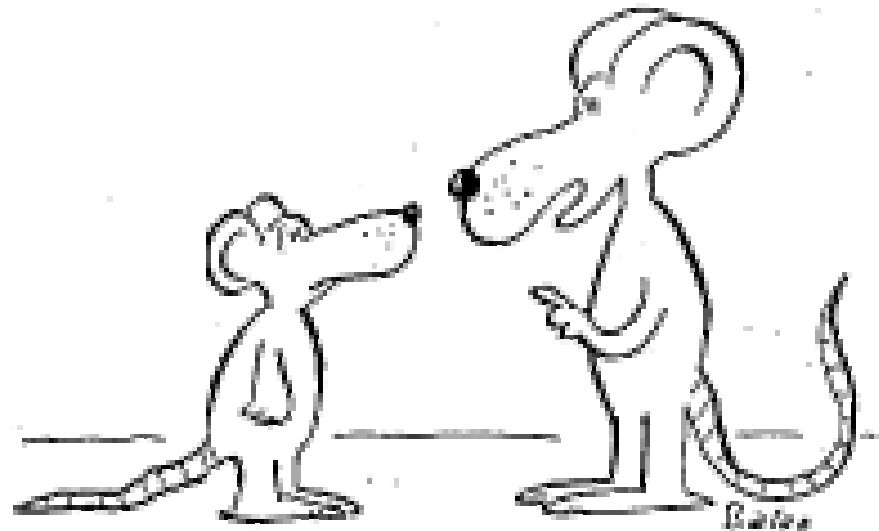
Fig. A - A model for early spinal cord development. The neural tube which will form the spinal cord is patterned into specific domains by multiple external signals which include a ventralizing Sonic Hedgehog (Shh) signal from the notochord (N) and floor plate (F), a dorsalizing BMP signal from the roof plate (R), and retinoic acid (RA) signaling from the adjacent somites (S).



Cross section of the spinal cord of an embryonic day three chicken embryo stained with fluorescent antibodies. Shown here in red is the motor neuron progenitor domain (pMN), one of many precise domains established by earlier signaling events. The pMN domain is here labelled through the use of antibodies specific for Olig2, a critical regulator of motor neuron formation. Developing motor neurons emerging from the pMN are shown labelled in green.

Myš

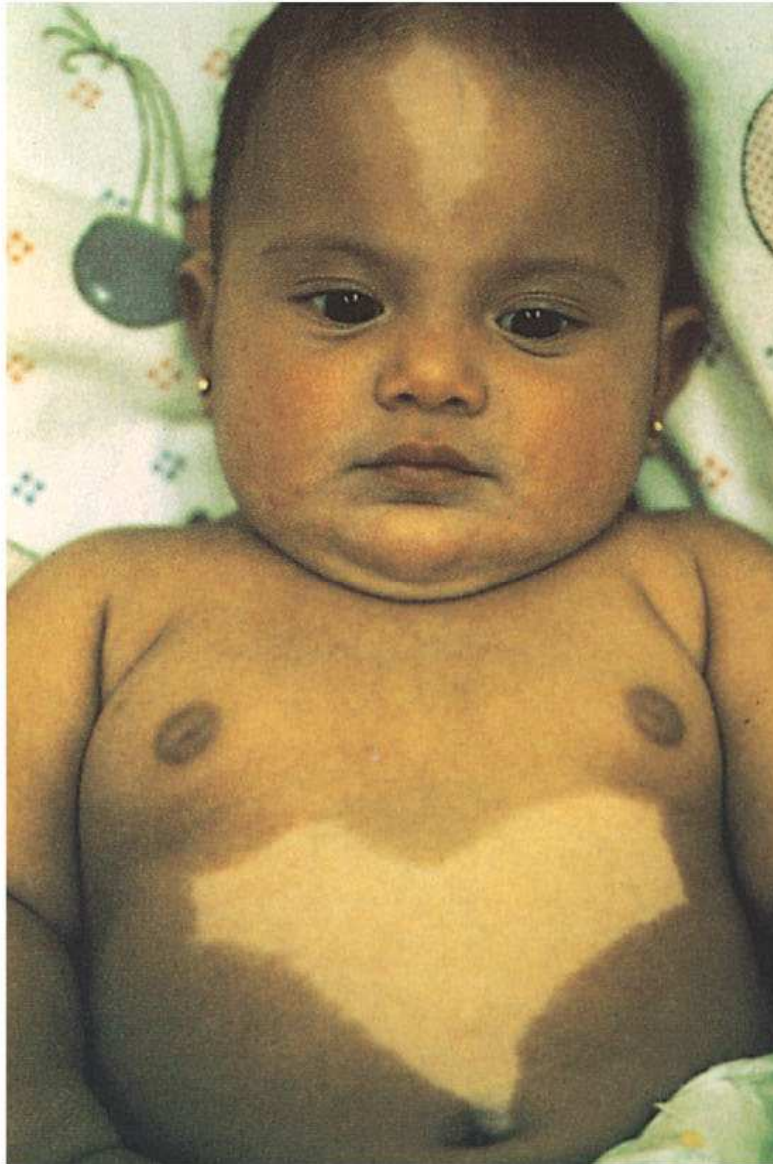
- savec
- z toho plyne, že embryonální vývoj je ze všech modelů nejpodobnější člověku
- genom sekvenován
- jedinečný díky možnostem genetických manipulací (transgenní myši)



“... and stay away from scientists – they cause cancer.”

Myš je velmi relevantní model pro studium lidské embryologie

(A)



(B)



piebaldismus

Myš - nevýhody

- relativně dlouhý generační čas
- embrya obtížně přístupná experimentální manipulaci – pouze v děloze matky
- finančně náročný model



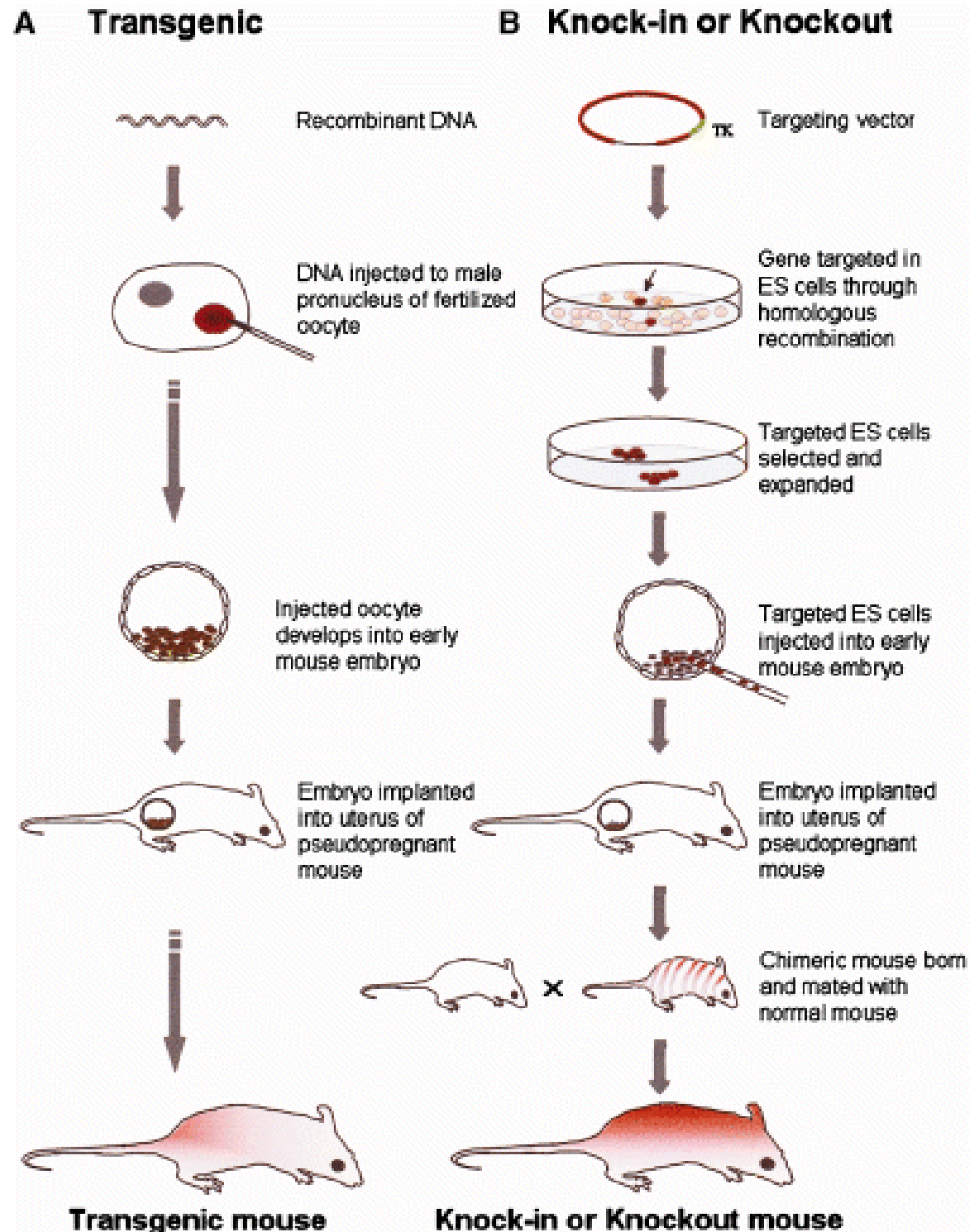
Transgenní myš

Nobelova cena 2007

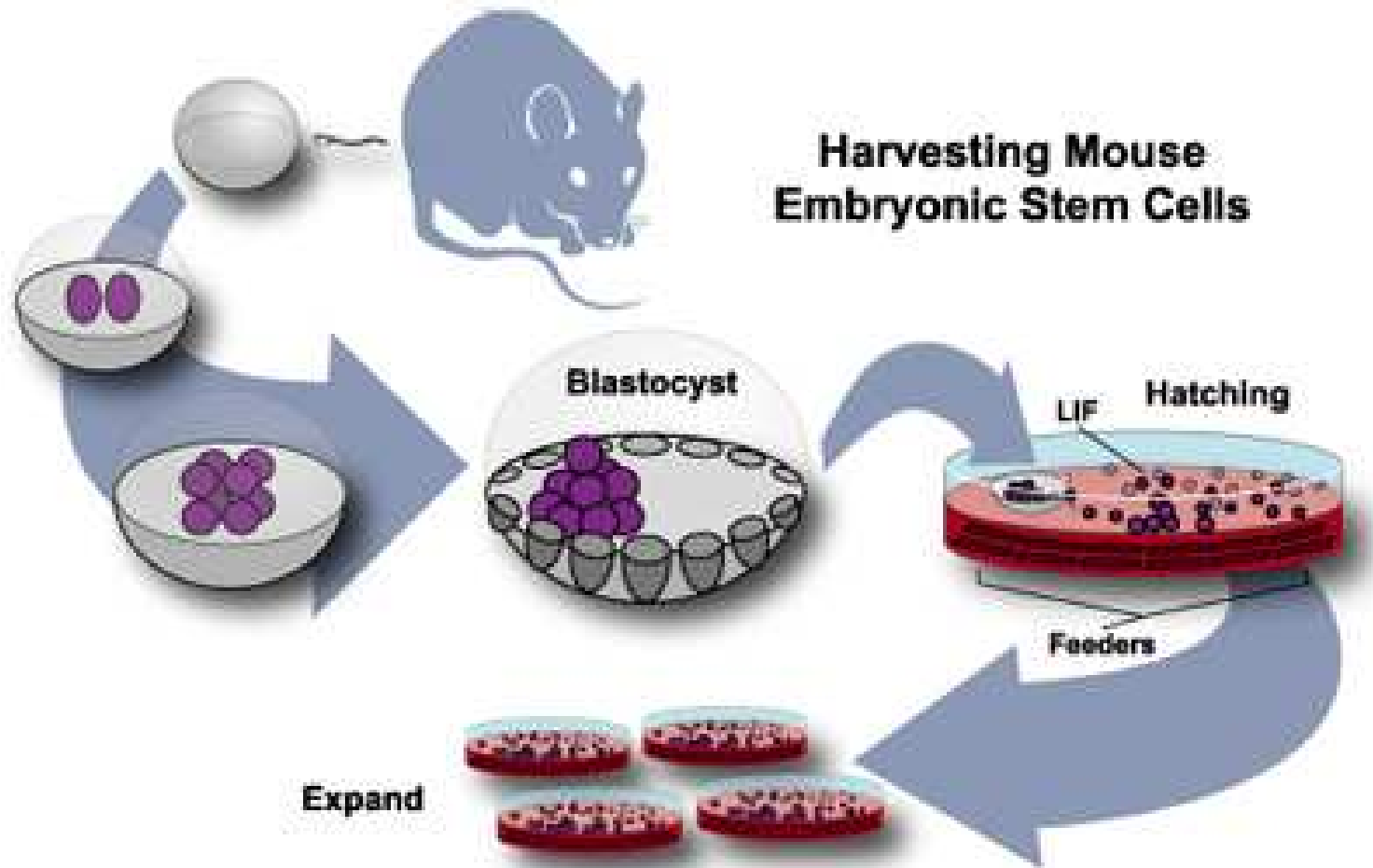
**Mario R. Capecchi,
Martin J. Evans and
Oliver Smithies**

za

„principles for
introducing specific
gene modifications in
mice by the use of
embryonic stem cells“



Příprava myších kmenových buněk



Transgenní myš – state of the art:

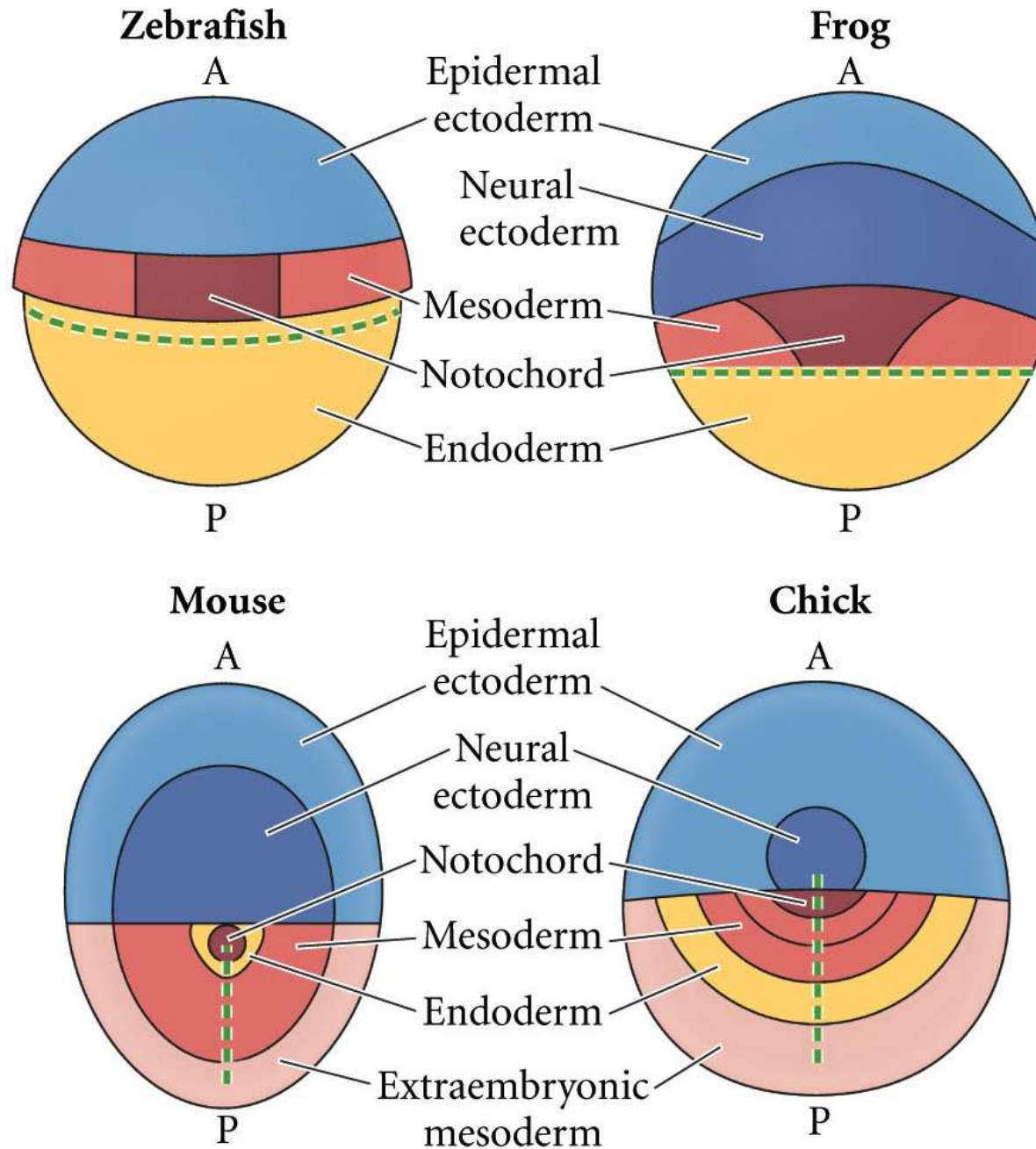
- knock-in myši – umožňují záměny genů, vnesení bodových mutací atd.
- kondicionální knock-out/in myši založené na Cre-recombinázovém systému
 - a) pouze v určité tkáni/typu buněk
 - b) pouze po vnější stimulaci (tzv. inducibilní Cre), tj. v experimentálně určeném čase
 - c) náhodně – v určitém procentu buněk, využití pro lineage tracing

Výhody a nevýhody jednotlivých experimentálních modelů vývojové biologie -summary

Table 1. Some Strengths and Weaknesses of the Main Developmental Model Systems

Organism	Ploidy	Full/Fine Staging System?	Experimental Embryology		Single Cell Tracing (Lineage or Fate Mapping)	Forward Genetics		Loss of Function (Gene Targeted)		Gain of Function			
			Pregastrula	Postgastrula		Spontaneous Mutations	Induced Mutations	Somatic Cells	Germline	Whole Embryo	Targeted (Time and Space)	ES Cells	Genome Sequenced?
<i>C. elegans</i>	2n	yes	+/-	no	yes	yes	yes	yes (RNAi)	no	no (?)	no (?)	no	yes
<i>Drosophila</i>	2n	+/-	no	+/-	no (+/-)	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no	yes
Zebrafish	pseudo-tetraploid	no	yes	+/-	yes	yes	yes	yes (MO, dom.neg.)	no	yes	no	no	yes
<i>Xenopus</i>	pseudo-tetraploid	yes	yes	no	yes (early)	no	no	yes (MO, dom.neg.)	no	yes	+/- (Dex.)	no	+/- (<i>tropicalis</i> soon)
Chick	2n	yes	yes (from blastula)	yes	yes	yes	no	yes (MO, siRNA, dom.neg.)	no	+/-	yes	yes	yes
Mouse	2n	no	+/-	+/-	+/-	yes	yes	yes (Cre/Lox)	yes	yes	yes	yes	yes

Srovnání jednotlivých modelů



Závěr: Pro obecné závěry je nejlepší modely kombinovat!

