

Metody vývojové biologie

Modelové organizmy ve vývojové biologii - obratlovci

Osnova

1. MODELOVÉ ORGANIZMY VE VÝVOJOVÉ BIOLOGII - OBRATLOVCI

- *Danio rerio*,
- *Ambystoma mexicanum*,
- *Xenopus laevis*,
- *Reptilia*,
- *Gallus gallus*,
- *Mus musculus*,
- *Sus scrofa*

Legislativa platná pro zásady práce s obratlovci

Dodržování:

- Neoficiálně: pravidlo 4R (reduction, refinement, replacement, responsibility)
- Oficiálně:
 - 1) Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb.**
 - 2) Vyhláška Ministerstva zemědělství o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat č. 419/2012 Sb. (oba v platném znění)**

Legislativa platná pro zásady práce s obratlovci

Pokusné zvíře:

- **1.** živý obratlovec, který je nebo má být použit k pokusům, s výjimkou člověka, včetně samostatně se živících larválních forem a plodů savců od poslední třetiny jejich běžného vývoje, nebo
- **2.** živý hlavonožec, který je nebo má být použit k pokusům;
- za pokusné zvíře se považuje také zvíře, které je v ranějším stadiu vývoje, než je stadium uvedené v bodě 1, pokud má být zvířeti umožněno žít nad rámec tohoto stadia vývoje a v důsledku prováděných pokusů je pravděpodobné, že po dosažení tohoto stadia vývoje je postihne bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození

Legislativa platná pro zásady práce s obratlovci

- **pokusem** se rozumí jakékoli invazivní či neinvazivní použití zvířete pro pokusné nebo jiné vědecké účely se známým nebo neznámým výsledkem nebo pro vzdělávací účely, které může zvířeti způsobit bolest, utrpení, strach nebo trvalé poškození nejméně o intenzitě odpovídající vpichu jehly podle běžné veterinární praxe. Pokusem se rozumí rovněž jakýkoli způsob jednání, který má nebo může vést k tomu, že se zvíře narodí nebo vylíhne nebo že vznikne a je zachována geneticky modifikovaná linie zvířete v takovém stavu; usmrcení zvířete pouze pro využití jeho orgánů nebo tkání se za pokus nepovažuje.
- v ČR pro chov, práci a navrhování pokusů s obratlovci nutné dodržovat legislativu a absolvovat odborný kurz:

Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č.246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání

❖ Žádost o schválení projektu pokusů (formulář na stránkách MZ)

Dánio pruhované (*Danio rerio*)

Zebříčka, Zebrafish



Úvod

- Třída: paprskoploutví (Actinopterygii)
 - Nadřád: kostnatí (Teleostei); řád: máloostí (Cypriniformes)
 - Čeleď: kaprovití (Cyprinidae)
- Původ: jižní Asie
- Délka těla až 5 cm, podél 5 charakteristických pruhů pigmentových buněk
- Pohlavní dimorfismus: samice plnější břicho, samci štíhlejší



Výhody

vs.

Nevýhody

zebřičky jako experimentálního modelu



Stovky vajíček vyvíjejících se mimo tělo samice

Rychlý a snadno pozorovatelný vývoj (díky transparentnímu embryu)

K dispozici velké množství různých mutantů; plně sekvenovaný genom

Snadná aplikace chemikálií do chovných nádrží

Snadný chov



Mnoho fyziologických a anatomických odlišností v porovnání s ostatními savčími modely vůči člověku

Duplikace genomu

Dlouhá přítomnost chorionu (až 48 hpf) může ovlivnit působení aplikovaných chemikálií

Výhody

vs.

Nevýhody

Feature	Benefit/Drawback
Advantages Easy maintenance Year round spawning High fecundity (300–600 by single female at one time) Optical transparency of early stages Swimming begins at hatching (48–72 hpf) and more complex behavior (food seeking) at 5 dpf Very rapid development Fertilization is external Minimal parental care Mutants available, genome sequenced, morpholino knockdowns possible Animal protection laws often less stringent for zebrafish embryos than for mammals Eggs develop in nonsterile, simple buffers Genome has important similarities to human (e.g., nearly all mammalian genes have a zebrafish counterpart; high conservation of key developmental genes with the human) Very small size of early embryos Small egg size and external fertilization Early embryo is permeable to small compounds Disadvantages Last common ancestor with humans was 445 million years ago Exothermic (cold-blooded) Anatomical differences with human (e.g., lack of heart septation, synovial joints, cancellous bone, limbs, and lungs) Genome duplication Presence up to 48 hpf of the chorion	Low housing costs Research can run continuously Low cost per assay Real-time (live) imaging of developmental processes and easy selection of precise developmental stages (in contrast to mammals) Behavioral studies can be made on very early stages Large number of experiments possible in short time period Embryos accessible noninvasively, can be continuously imaged; there is no placental barrier or maternal compartment to influence drug experiments Reduced epigenetic parental influence on experimental outcome Genetic basis of teratogenesis can be investigated Fewer legal restrictions on research Easy to raise and maintain embryos Common molecular pathways can be studied Only very low quantities of expensive test drugs and staining reagents needed; suitable for high throughput screening in 96 and 384 multiwell plates Very precise control of drug delivery and dosage Suitable for drug testing Far more remote from humans than other animal models such as rodents (which have a 96 million year divergence time from humans) Physiology not identical to humans Several human ethanol disorders are difficult or impossible to model in this species (e.g., cardiac septation defects) Many genes present as two copies, creating extra work to determine functional roles Interference with drug diffusion

Including information from Best et al. (2008), Tanguay and Reimers (2008), Grunwald and Eisen (2002), Gerlai et al. (2000), Gerlai (2003); Nei et al. (2001); Kimmel et al. (1995), Dahm and Geisler (2006), and Hisaoka (1958).

Způsob chovu a manipulace

- Chov v komerčně dostupných chovných systémech zajišťujících stálou cirkulaci a filtraci vody
- Světelný režim 14:10 (světlo:tma)
- Ideální teplota v chovných tancích: 26-28,5°C
- pH vody: 6,8-7,5
- Krmení: suchá i živá potrava, ad libitum
- Pravidelné čištění chovných nádob a filtrů



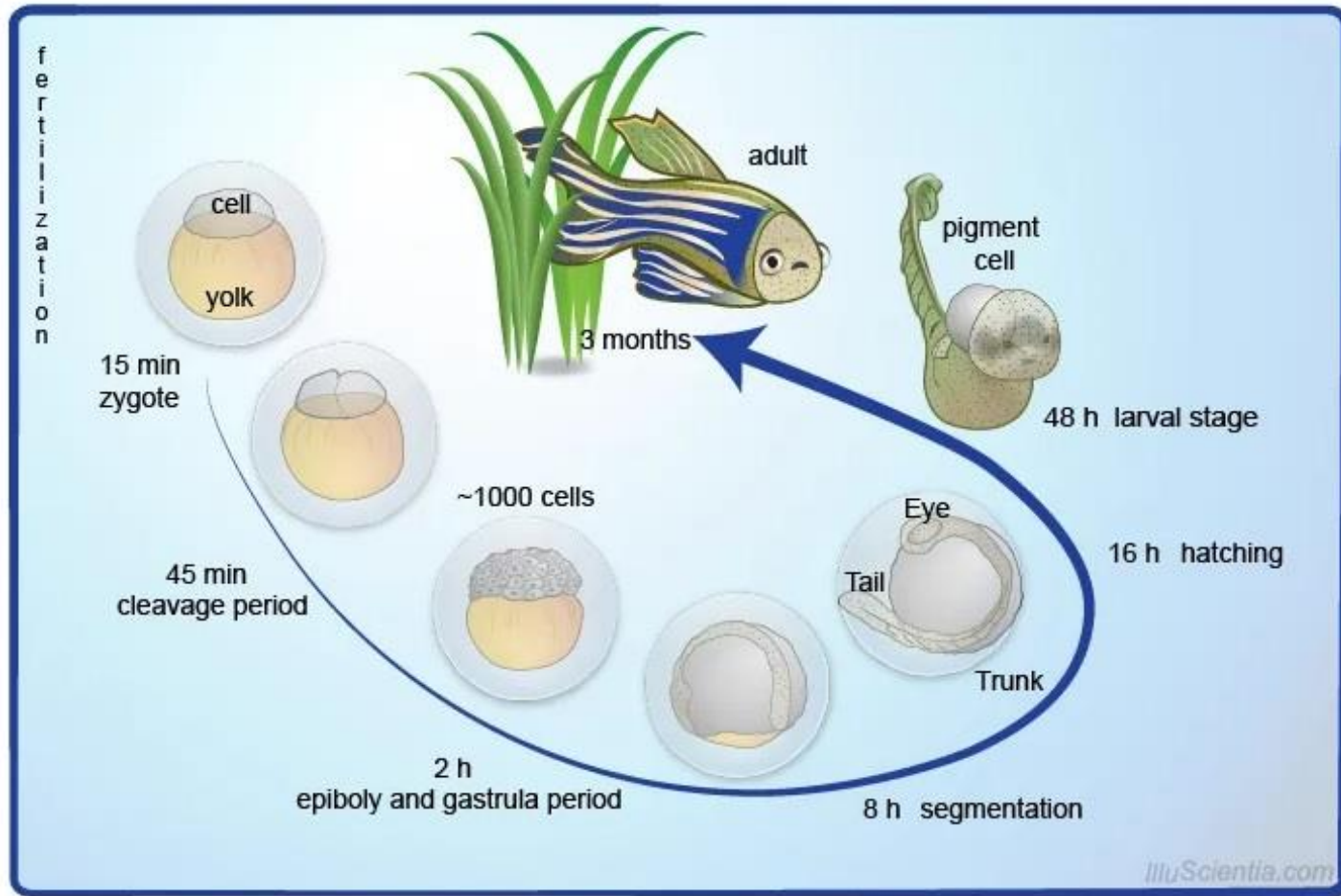
Životní cyklus

- Fertilizace mimo tělo samice při tření (brzo ráno „za úsvitu“), samice při něm vypouští jikry (ve stovkách), samec mlíčí

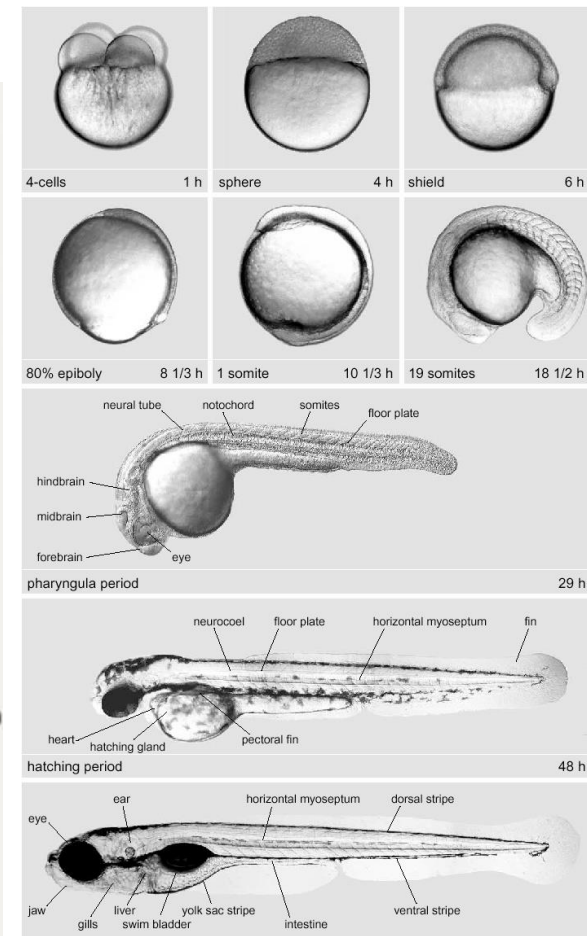
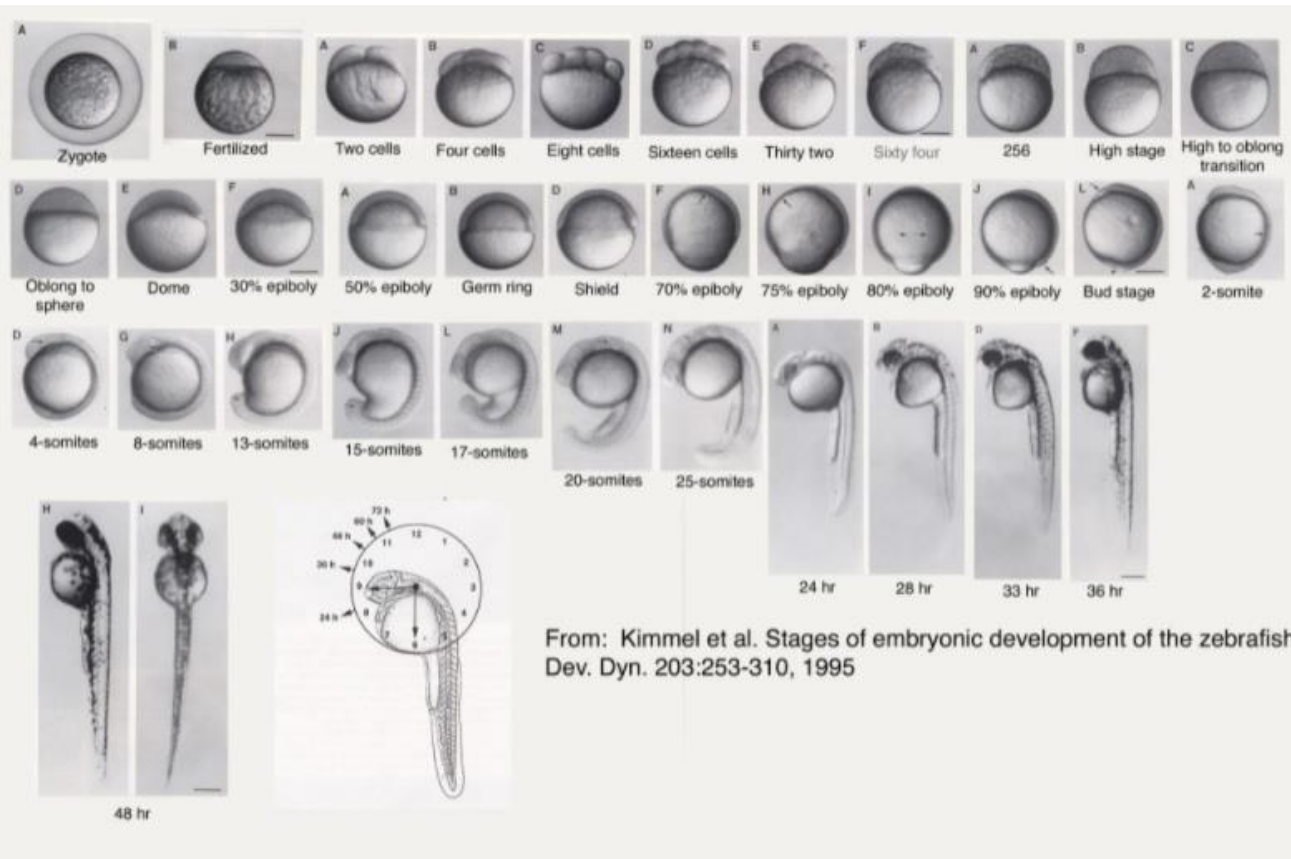


- Z oplozených jiker se líhne po 72 hodinách plůdek (larva), ten po pěti dnech začíná přijímat potravu
- Po dvou týdnech vývoje lze zařadit tank do systému s cirkulující vodou
- Pohlavní zralost po cca 3 měsících života

Životní cyklus

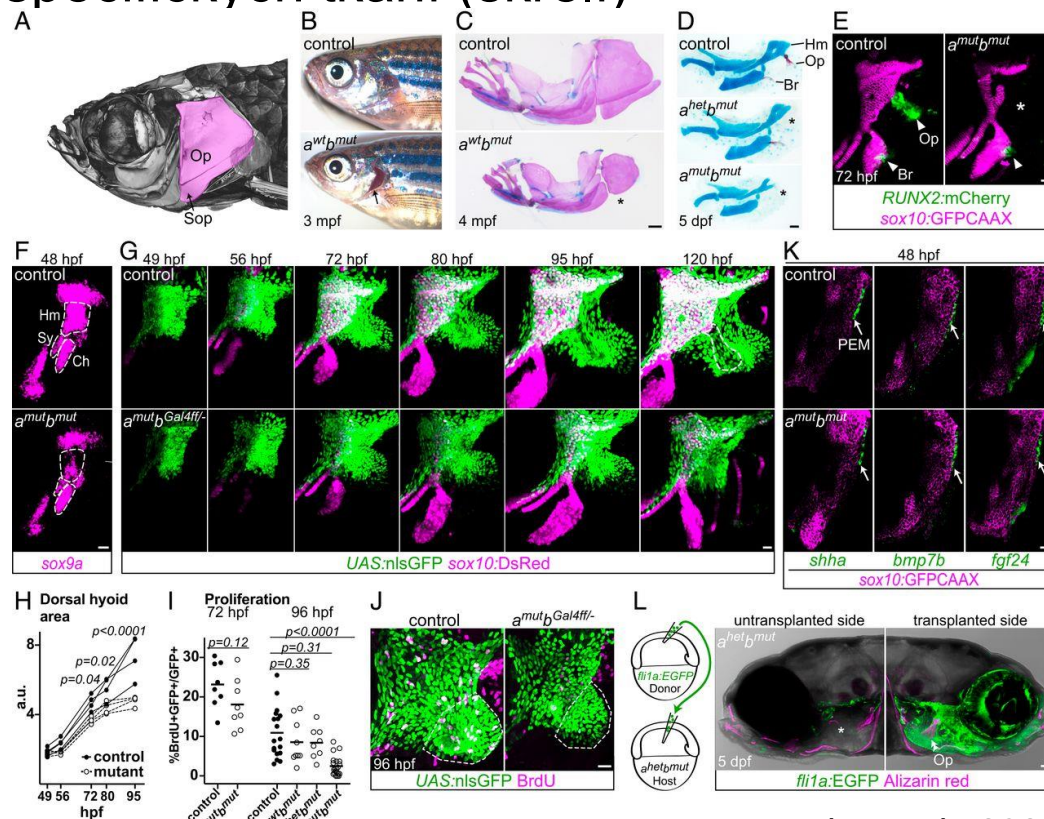


Životní cyklus



Vývojová biologie I

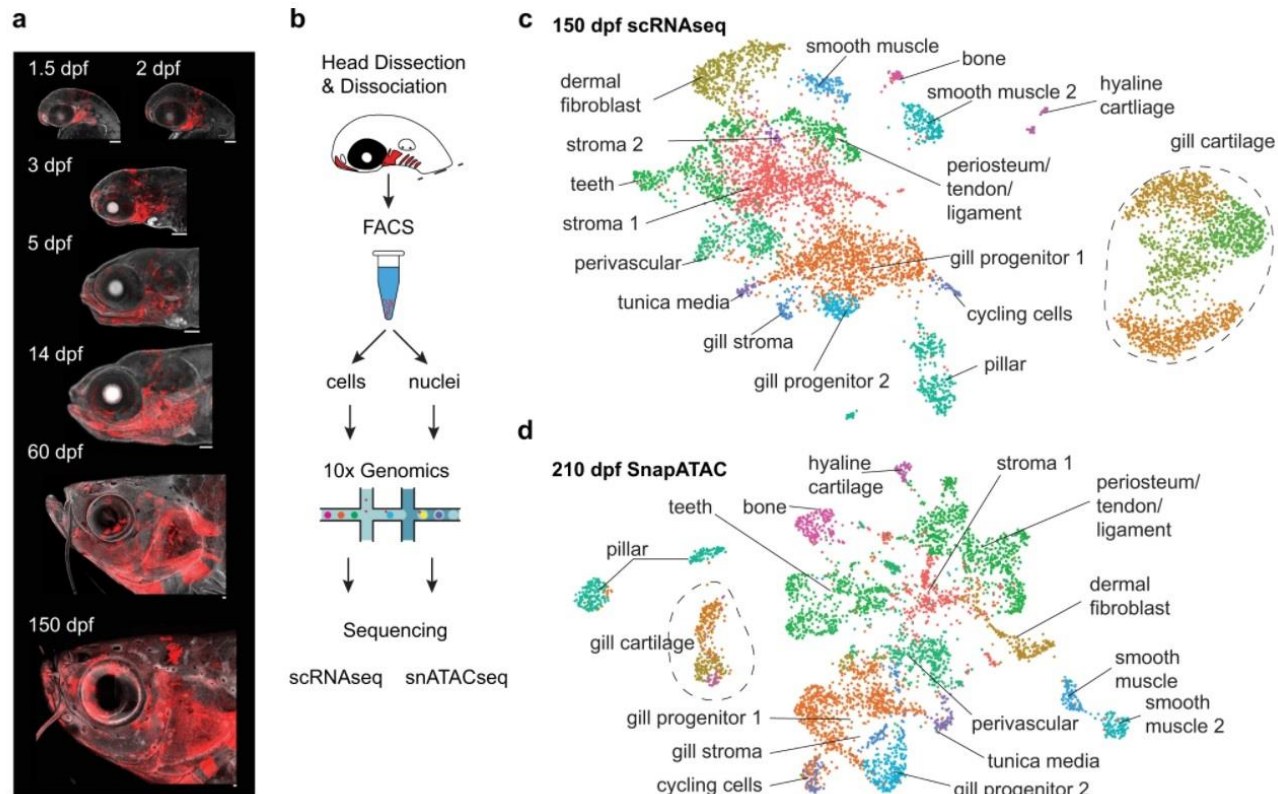
- Studium funkce genů (knock-out, knock-in genu *Pou3f3*) a jejich role při formování specifických tkání (skřelí)



Barske et al., 2020

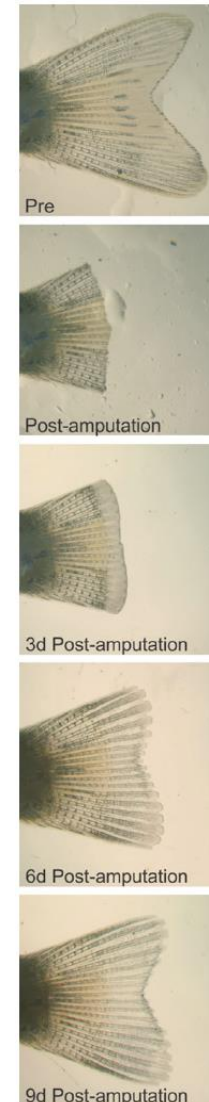
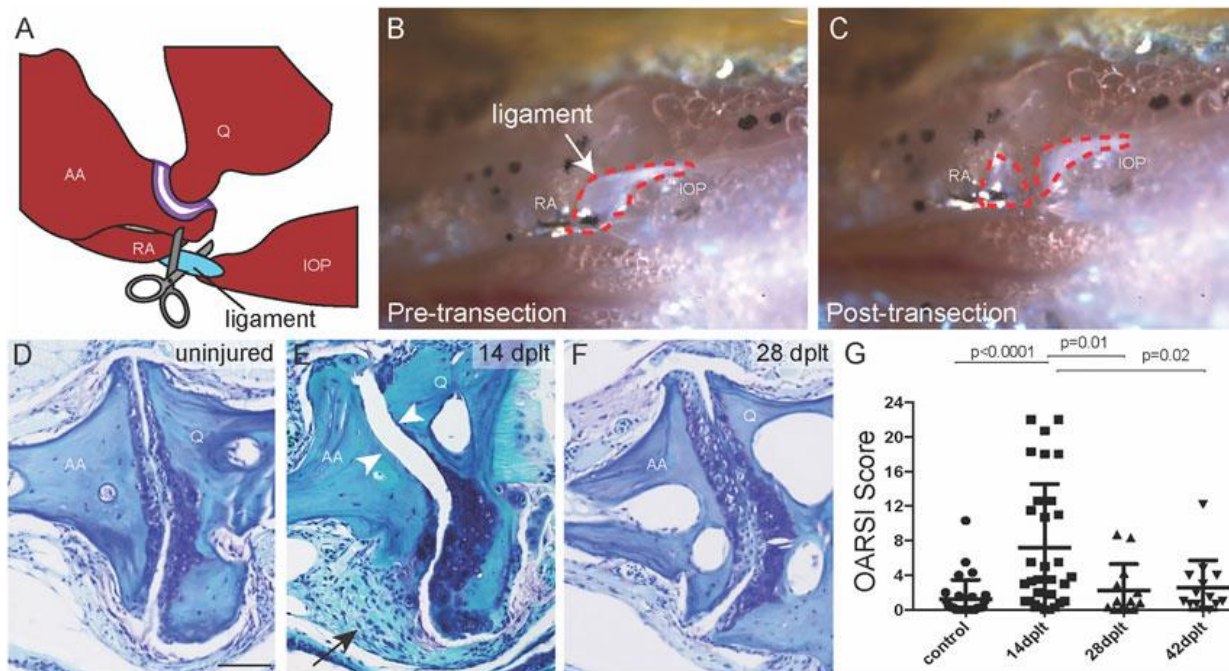
Vývojová biologie II

- Single-cell analýzy odhalující osud buněk neurální lišty a jednotlivé buněčné typy, které se z nich diferencují



Vývojová biologie III

- Studium regeneračního potenciálu rozličných struktur (ploutví, srdce, mozku, retiny, kloubu) a popis doprovodných procesů



Výzkum

- Studium pigmentace (tvorba chromatoforů)
- Toxikologické studie
- Imunologické studie
- Model pro studium: Duschenovy muskulární dystrofie, obezity, diabetu, melanomů, tuberkulózy, epilepsie

Top 25 Subjects in the Area of Zebrafish Research

Rank	Research areas	Publications	Percent
1	Developmental Biology	4662	27.010
2	Biochemistry/Molecular Biology	3058	17.717
3	Cell Biology	2423	14.038
4	Neurosciences/Neurology	1872	10.846
5	Genetics/Heredity	1681	9.739
6	Zoology	1134	6.570
7	Science & Technology Other Topics	1114	6.454
8	Toxicology	995	5.765
9	Life Sciences/Biomedicine Other Topics	699	4.050
10	Anatomy/Morphology	680	3.940
11	Biotechnology/Applied Microbiology	551	3.192
12	Environmental Sciences/Ecology	549	3.181
13	Marine/Freshwater Biology	513	2.972
14	Physiology	505	2.926
15	Hematology	503	2.914
16	Endocrinology/Metabolism	479	2.775
17	Pharmacology/Pharmacy	429	2.486
18	Biophysics	388	2.248
19	Immunology	355	2.057
20	Ophthalmology	326	1.889
21	Evolutionary Biology	318	1.842
22	Fisheries	268	1.553
23	Research Experimental Medicine	266	1.541
24	Chemistry	251	1.460
25	Veterinary Sciences	245	1.419

Další zástupci ryb využívaných v laboratořích

- Medaka (*Oryzias latipes*), japonská rýžová ryba
 - Výhody oproti daniu:
 - dvakrát menší genom než dánío (snadnější transgeneze)
 - dokáží žít v teplotách v rozmezí 0°C - 40°C
 - nenáročná na chov
 - kratší generační doba
 - dostupné velké množství inbredních linií
 - 1994 – medaky byly první obratlovci pářící se v kosmu
- Halančík (*Nothobranchius furzeri*)
 - Původem z periodických tůní Zimbabwe a Mozambiku
 - Nejrychlejší životní cyklus u obratlovců – pohlavní dospělosti dosahují 14 dnů po vylíhnutí
 - Žijí pouze 1-5 měsíců



Další informace a zajímavosti

- Příručky chovu Zebřiček v laboratorních podmínkách:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916945/>

<https://www.aaalac.org/pub/?id=E9019693-90EC-FC4A-526E-E8236CC13B28>

- Přehled veškerých molekulárně biologických informací, přes expresi genů, dostupné mutanty, protilátky, publikace a mnoho dalšího

<https://zfin.org/>

Axolotl mexický (*Ambystoma mexicanum*)



Úvod

- Třída: obojživelníci (Amphibia)
 - Podtřída: ocasatí (Caudata); řád: axolotli (Ambystomatoidea)
 - Čeleď: axolotlovití (Ambystomatoidea)
- Původ: mexická jezera (Lago de Xochimilco a Lago de Chalco)
- Délka těla až 30 cm, charakteristické externí keříčkovité žábry okolo hlavy, na ocase patrný kožní lem
- Pohlavní dimorfismus: samice plnější břicho, samci štíhlejší s viditelnými boulemi v oblasti za zadními končetinami



Výhody

vs.

Nevýhody

axolotla jako experimentálního modelu



Snadný chov druhu jako takového

Stovky vajíček vyvíjejících se mimo tělo samice

Obrovský regenerační potenciál

Díky absenci pigmentu u některých kmenů možnost přímého pozorování buněk, které jsou díky enormnímu genomu dostatečně velké



Náročný na chov co do prostoru

Dlouhá generační doba (samci rok, samice až rok a půl)

Doba páření omezená jen na určitou část v roce

Genom až příliš velký (10x v porovnání s člověkem) díky namnoženým nekódujícím sekvencím, kódujících pak srovnatelně s jinými obratlovci

Způsob chovu a manipulace

- Chov v akváriu:
 - pro jednoho axolotla o velikosti 50x40 cm a objemu 40 l
 - dno nádrže vystláno štěrkem (štěrk větší než hlava zvířete – hrozí zadušení při pozření)
 - na nádrž nesmí dopadat slunce (stínomil)
- Voda:
 - Sladká, tvrdá, bez chlóru, nutná filtrace, ale bez proudění
 - 14-20°C, pH: 6,5-7,7
- Krmivo:
 - roupice, žížaly, slimáci, nitěnky, měkčí krmný hmyz
 - syrové maso teplokrevných zvířat nevhodné

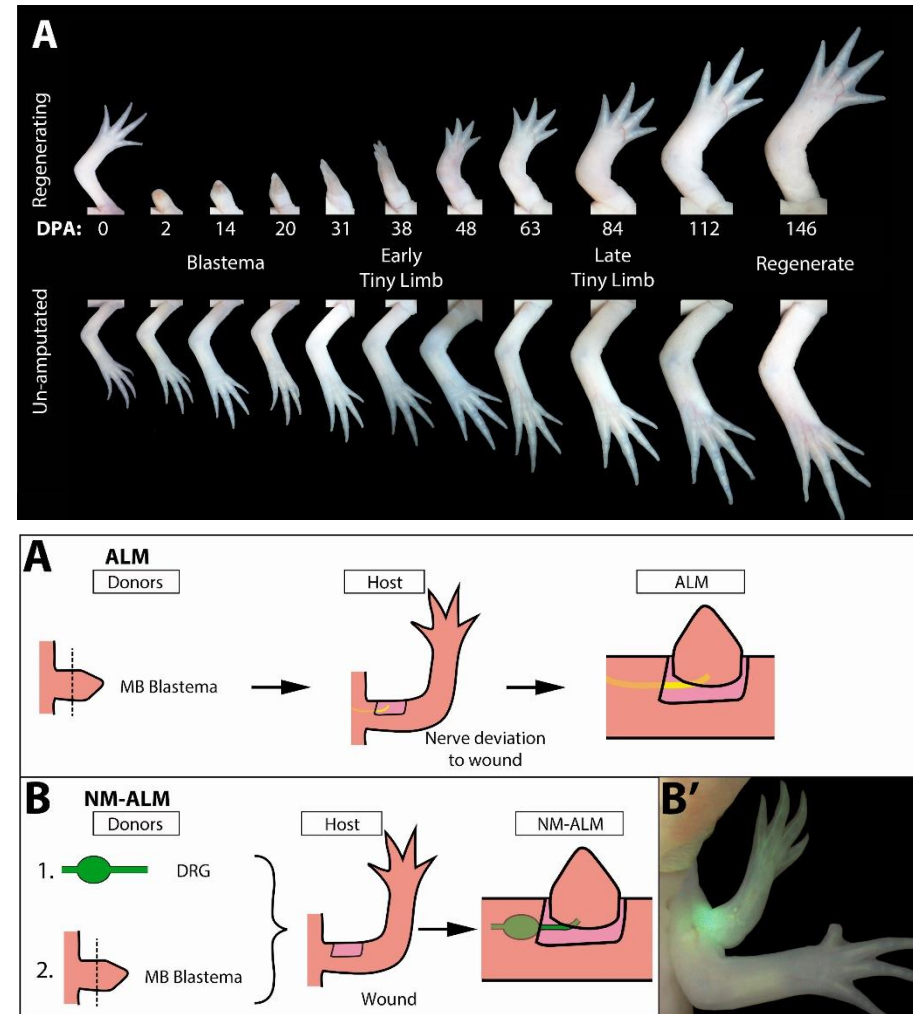
Životní cyklus

- samice pro oplodnění vajíček přijímá kloakou samcův spermatofor (vnitřní oplodnění), následně kladou až 300 vajec
- Axolotlové celý život zůstávají v larválním stádiu, neprocházejí metamorfózou – neotenie (pedomorfóza)
 - Způsobeno nedostatkem hormonu thyroxinu, pro jeho produkci totiž chybí v okolním prostředí základní stavební složka – jód
 - Umělou aplikací hormonu lze metamorfózu vyvolat
- Pohlavní dospělosti dosaženo mezi 18 a 24 měsíci



Vývojová biologie I

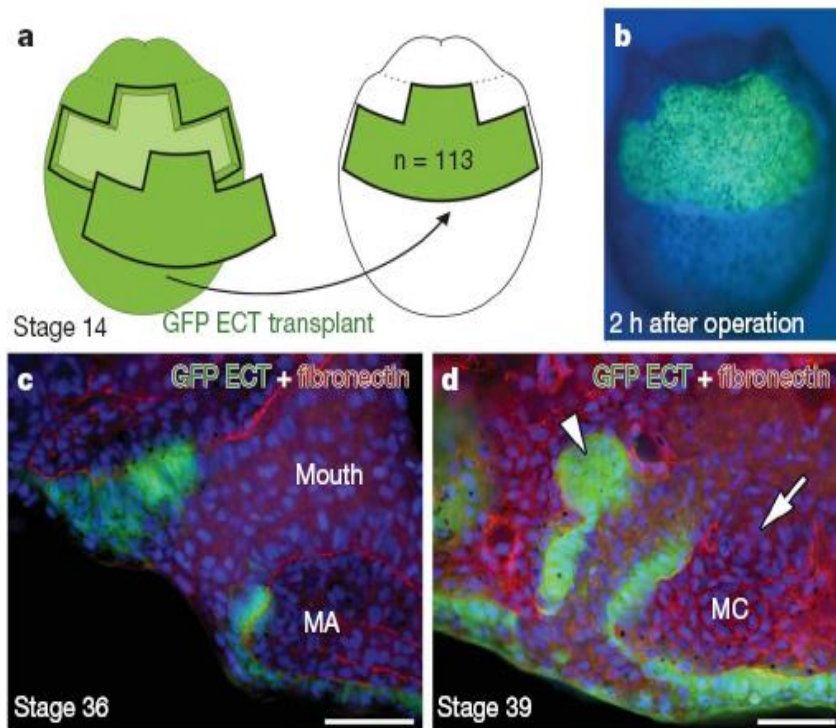
- Studium potenciálu regenerace různých částí těla (ocasů, míchy, končetin, CNS, očí, srdce, mozku) pomocí mnoha experimentálních postupů, včetně transplantací tkáně



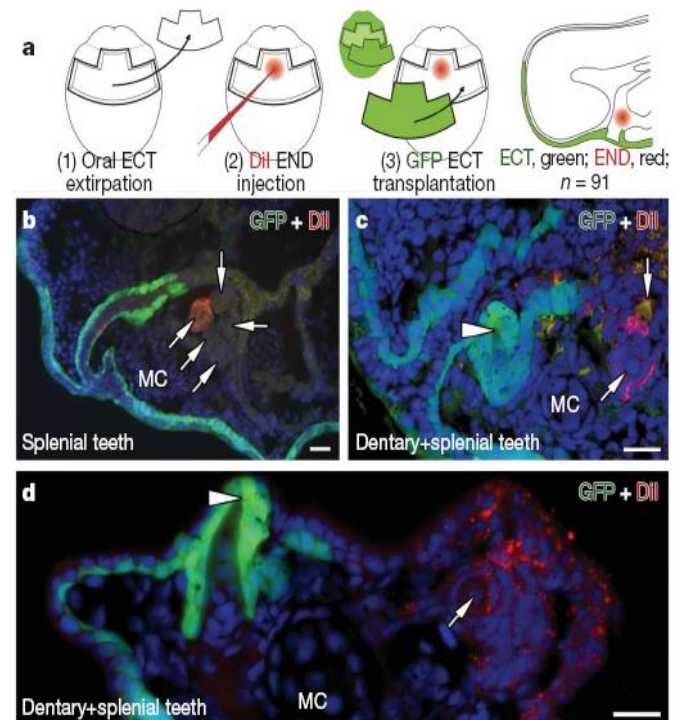
Wells et al., 2021

Vývojová biologie II

- Transplantace tkání transgenních zvířat jako nástroj pro určení původu buněk (fate-mapping)

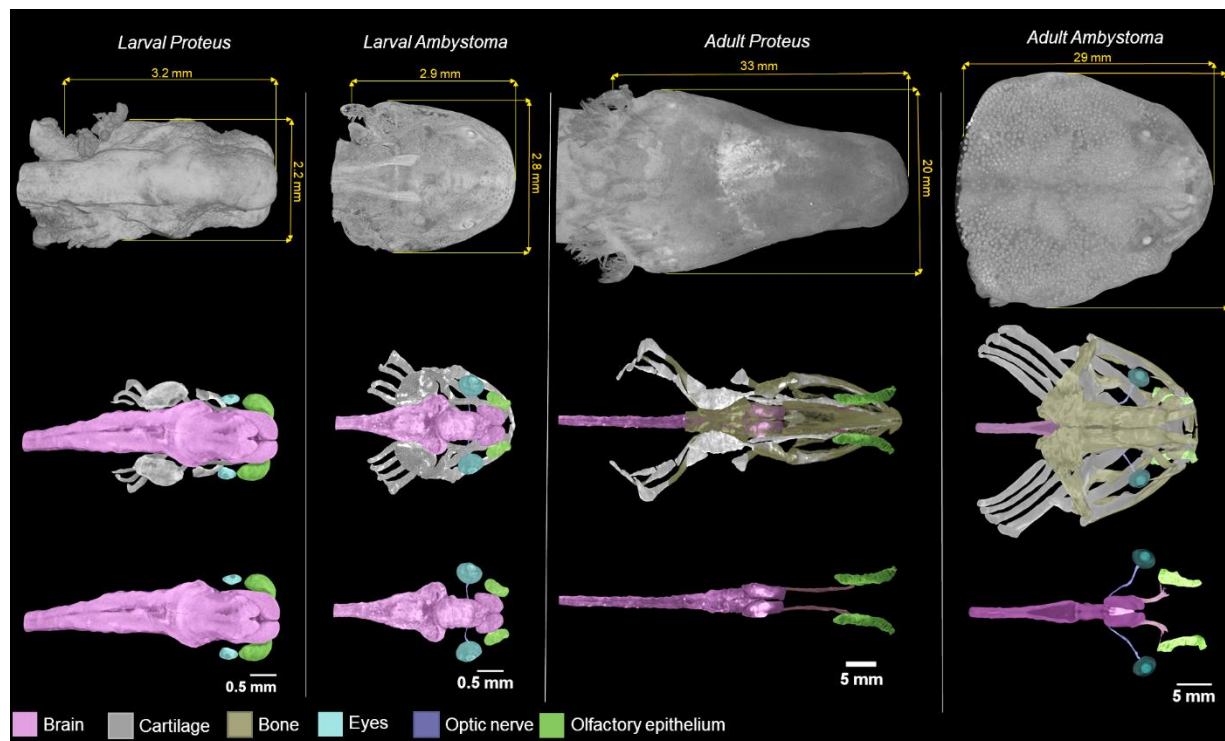


Soukup et al. 2008



Vývojová biologie III

- Studium evo-devo otázek (vývoj larvy macaráta bez očí vs. vývoj axolotla s plně vyvinutým zrakem)



Tesarova et al, 2022

Vývojová biologie III

Proteus anguinus – macarát jeskynní



Další informace a zajímavosti

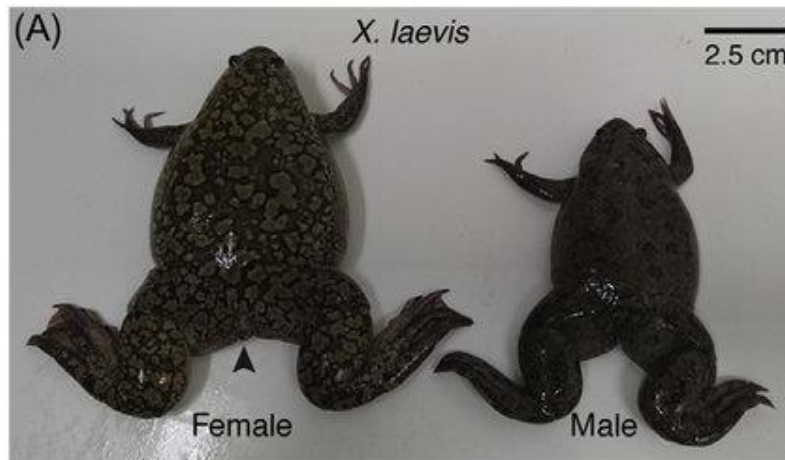
- Cesta axolotla do světových laboratoří:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jez.b.22617>
- Z oficiální webu laboratoře Elly Tanaky:
<http://tanakalab.org/fun/axolotl-poems/>
- Vše, co jste chtěli vědět o axolotlech, ale báli jste se zeptat:
http://www.axolotl.org/tiger_salamander.htm

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*)



Úvod

- Třída: obojživelníci (Amphibia)
 - Řád: žáby (Anura)
 - Čeleď: pipovití (Pipidae)
- Původ: Afrika
- výhradně akvatický druh, zadní nohy (s černými drápkami) jsou proto posunuty až za tělo
- pohlavní dimorfismus: samice větší (10 až 15 cm), samci až o třetinu menší, v době páření pak na předních nohách pářící mozoly, samice pak viditelná kloaka



Výhody

vs.

Nevýhody

drápatky jako experimentálního modelu



Snadný chov

Možnost uměle indukovat rozmnožování

Vývoj embryí mimo tělo samice a díky jejich velikosti (ø 1mm) snadná manipulace

Rychlý vývoj a velký počet (1500-3000/ samice)



Tetraploidní

Pohlavní zralosti dosahují nejdříve po roce života

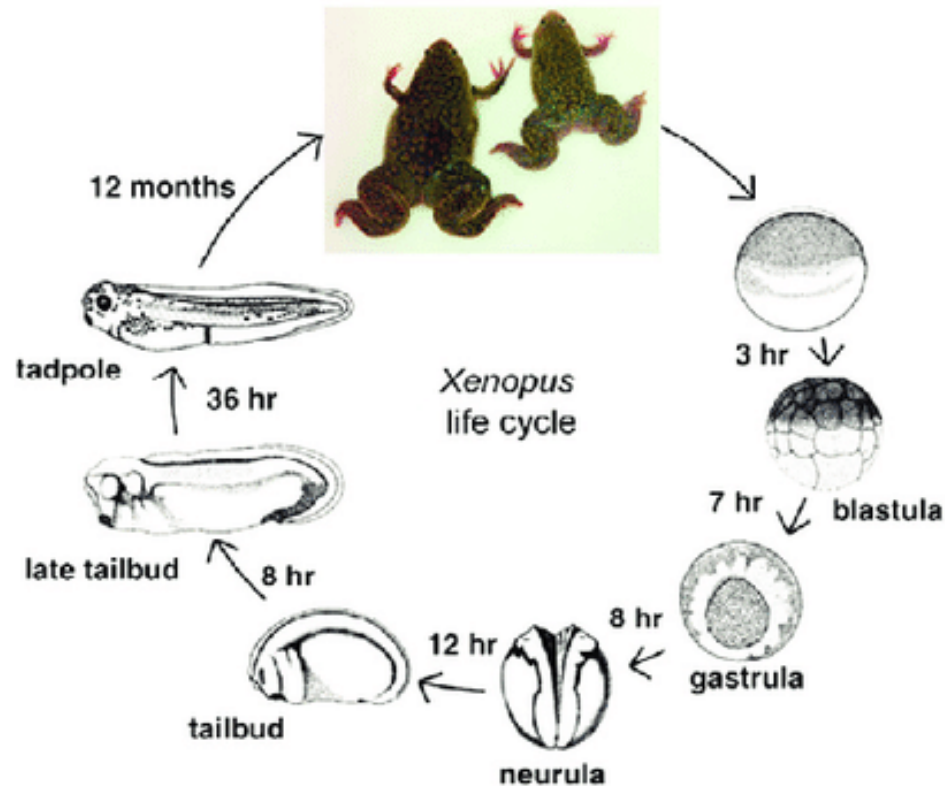
Kvalita kladených vajec s přibývajícím věkem samic klesá

Pro oplodnění samic v laboratorním prostředí nutné zabít samce

Způsob chovu a manipulace

- Chov v akváriu:
 - Pro chovný pár o velikosti 50x30 (x30) cm
 - Dno nádrže holé nebo s kameny pro úkryt
 - Akvárium je nutné dobře zakrýt – drápatky dobře skáčou
- Voda:
 - Nedoporučuje se používat intenzivní filtrace (přílišné proudění zvířata ruší)
 - 20-24°C, pH: 6-8
- Krmivo:
 - V přírodě se živí organickými zbytky a hmyzem uvázlým na vodní hladině
 - V zajetí pak krmíme larvami hmyzu, žížalami, drobnými rybkami, rybím filem či granulovaným krmivem

Životní cyklus



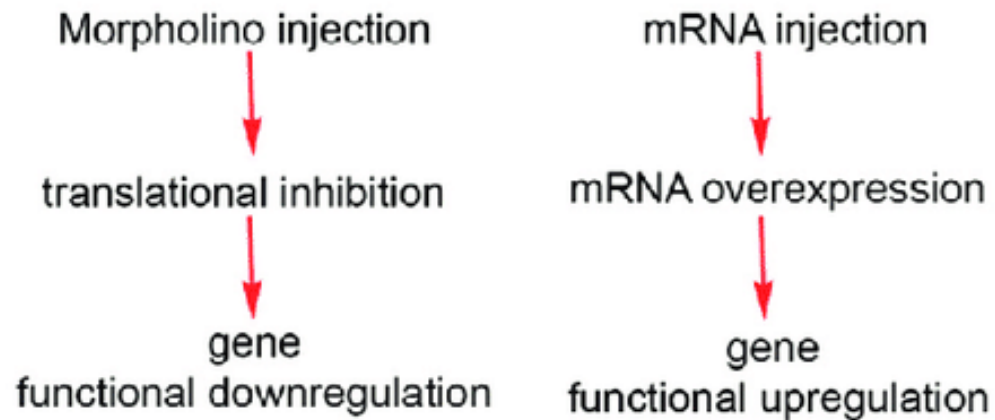
[This Is How a Tadpole Transforms Into A Frog | The Dodo - YouTube](#)

Životní cyklus

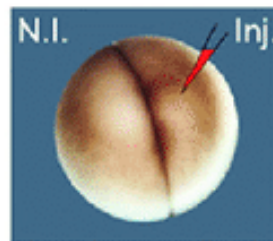


Vývojová biologie

Gene gain- and loss-of-function strategy in *Xenopus*

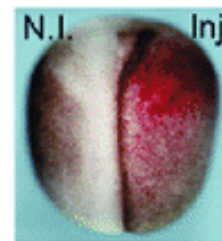


One-side injection



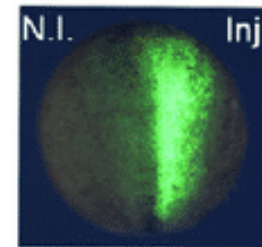
Two cells stage

LacZ



stage 20

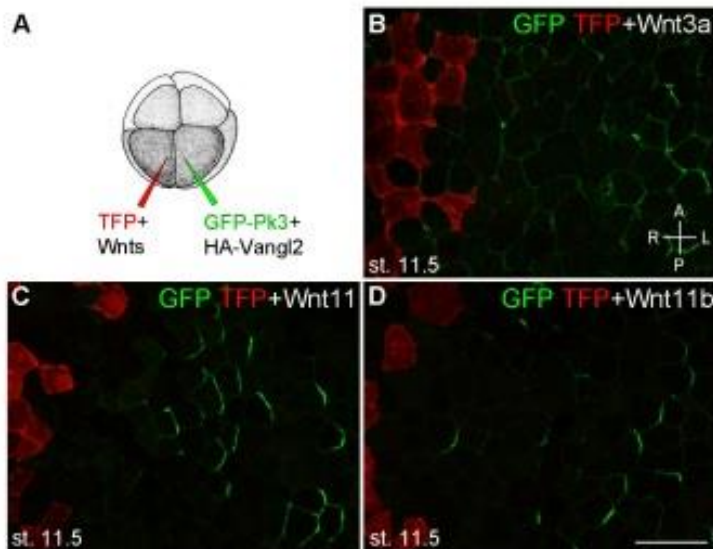
GFP



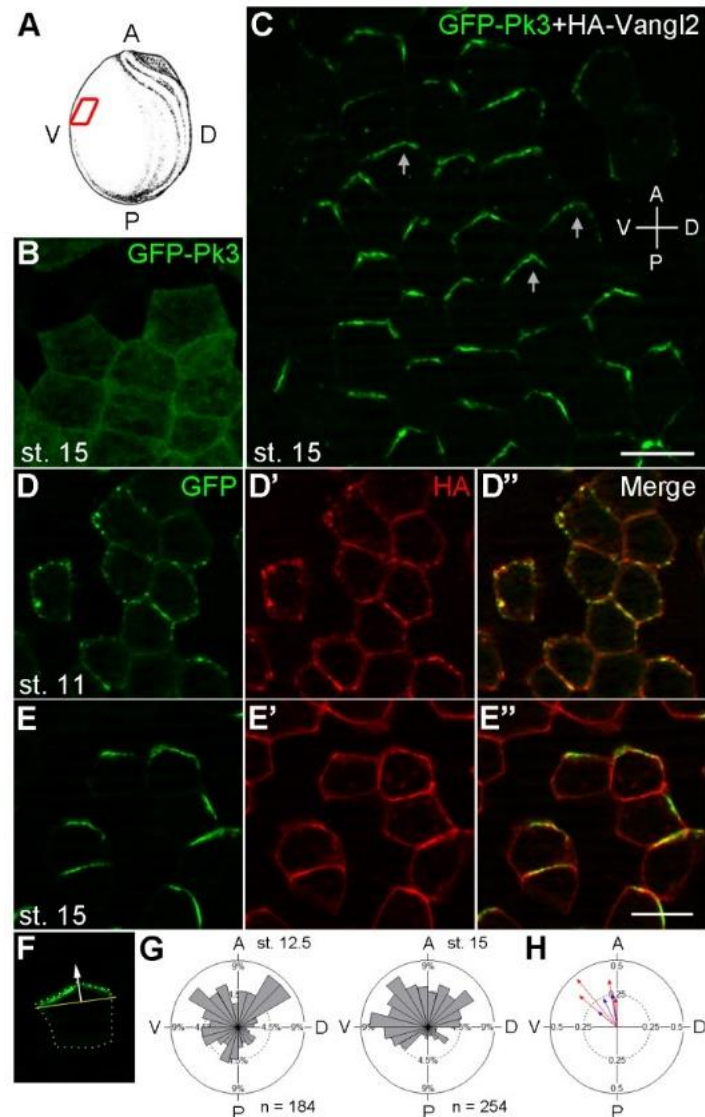
stage 20

Vývojová biologie

- Studium role Wnt proteinů v PCP při raném vývoji embryí obratlovců



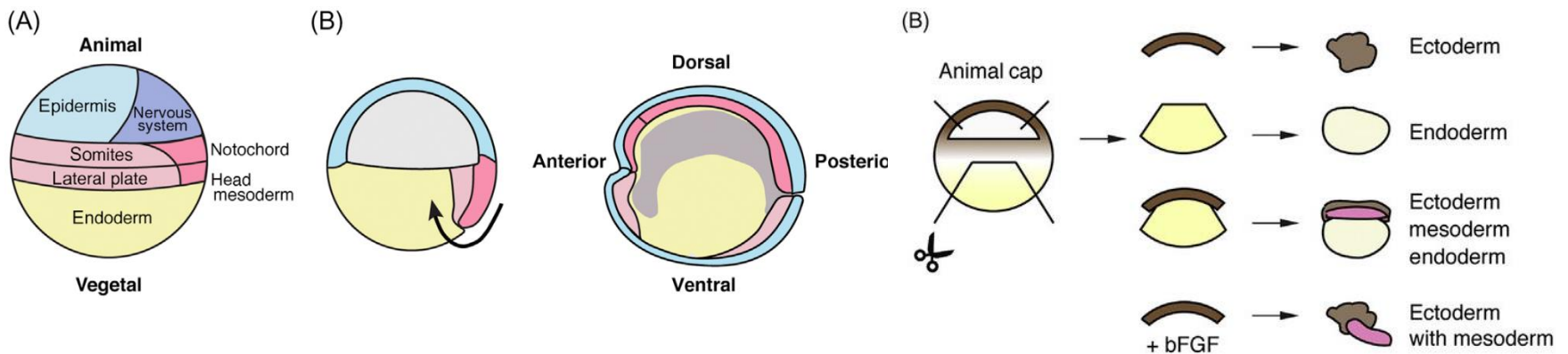
Chu and Sokol, 2016



Vývojová biologie

Animal cap assay

- využití explantátů původem z animálního pólu embryí, pomocí nichž lze testovat aktivitu a účinnost různých faktorů či signálních molekul

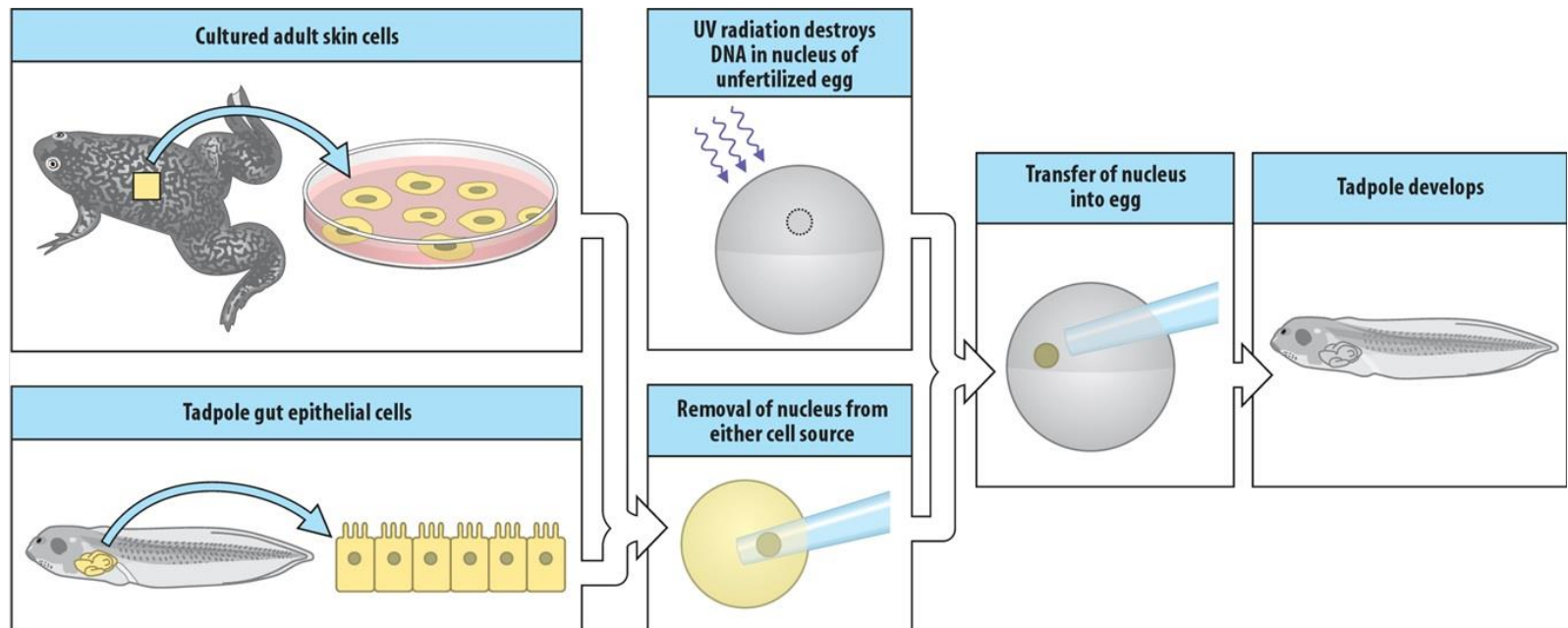


Vývojová biologie

První naklonovaný živočich?

Žába!

— John Gurdon (1962)



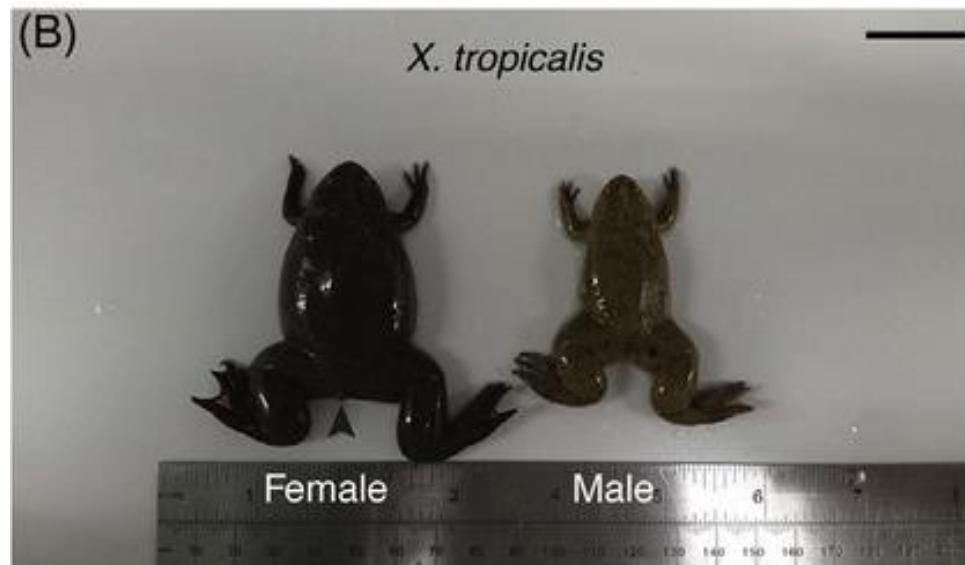
Další informace a zajímavosti

– Přehled veškerých molekulárně biologických informací:

<https://www.xenbase.org/entry/>

Další zástupci obojživelníků využívaných v laboratořích

- Drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*)
 - Výhody: diploidní, vzrůstem menší (tedy skladnější), samice kladou více vajíček
 - Nevýhody: až příliš malá (včetně vajíček) – složitější manipulace, teplota vody pro chov vyšší (27-30°C)



Plazi (*Reptilia*)



Úvod

- Nadřád/Podtřída: Lepidosauria
 - Řád: Squamata (šupinatí plazi – ještěři, hadi)
- Nadřád/Podtřída: Testudines (želvy)
- Nadřád/Podtřída: Archosauria
 - Řád: Crocodilia (krokodýli)
- Heterogenní skupina živočichů, tvoří jednu třetinu všech suchozemských živočichů
- V laboratořích spíše méně obvyklí
- Poikilotermové, tělo kryto šupinami, kladou vejce (vzácně živorodí)
- Pro ještěry a hady typická ekdyze (svlékání), mnozí ještěři jsou pak vybaveni parietálním okem

Výhody

vs.

Nevýhody

plazů jako experimentálního modelu



Málo prostudovaní s unikátními vlastnostmi a specifiky

Vývoj *in ovo* mimo tělo samice



Specifické a mnohdy náročné podmínky chovu

Vývoj embryí ve vajíčku enormně dlouhý (půl roku i déle)

Vývoj embryí ve vajíčkách i v rámci jedné snůšky asynchronní

Alligator mississippiensis (Aligátor severoamerický)

- Způsob chovu: nejčastěji na farmách
 - V případě poklesu teplot se přestávají krmit a jsou schopní hibernace (brumace)
- Životní cyklus:
 - Samice klade až 50 vajec, které se v hníždě inkubují cca 65 dní
 - Pohlaví mláďat je dáno teplotou v průběhu inkubace
 - Při teplotách nad 34°C a více – samci
 - Při teplotách 30°C a méně - samice
 - Vylíhlá mláďata se zdržují v blízkosti matky až tři roky, pohlavní dospělosti dosahují v osmi letech
 - Výzkum: vynikající regenerační schopnosti



Anolis carolinensis (*Anolis rudokrký*)

- Genom kompletně osekvenován (2014), cca 17 tisíc protein-kódujících genů
- Způsob chovu:
 - Malý, snadno chovatelný (v teráriu se zdrojem světla, tepla a UV zářením), jako potrava drobný hmyz
- Životní cyklus:
 - Samice klade cca 10 vajec měsíc po páření, juvenilové se líhnou po 30-45 dnech inkubace
 - Výzkum: regenerace končetin a nervových buněk



Python sebae (Krajta písmenkovaná)

- Škrtič, v zajetí se dožívá až 20 let, měří až 6 metrů, váhově může dosáhnout i devadesáti kilo
- Pro laboratorní účely méně praktický zástupce hadů
- Způsob chovu a manipulace
 - V teráriu, zdroj světla a tepla, potrava nejčastěji hlodavci
- Životní cyklus:
 - Samice klade jednou do roka 40-100 vajec, ty jsou v době kladení již ve stádiu organogeneze, následuje 80-90 dní inkubace, pak se mláďata líhnou

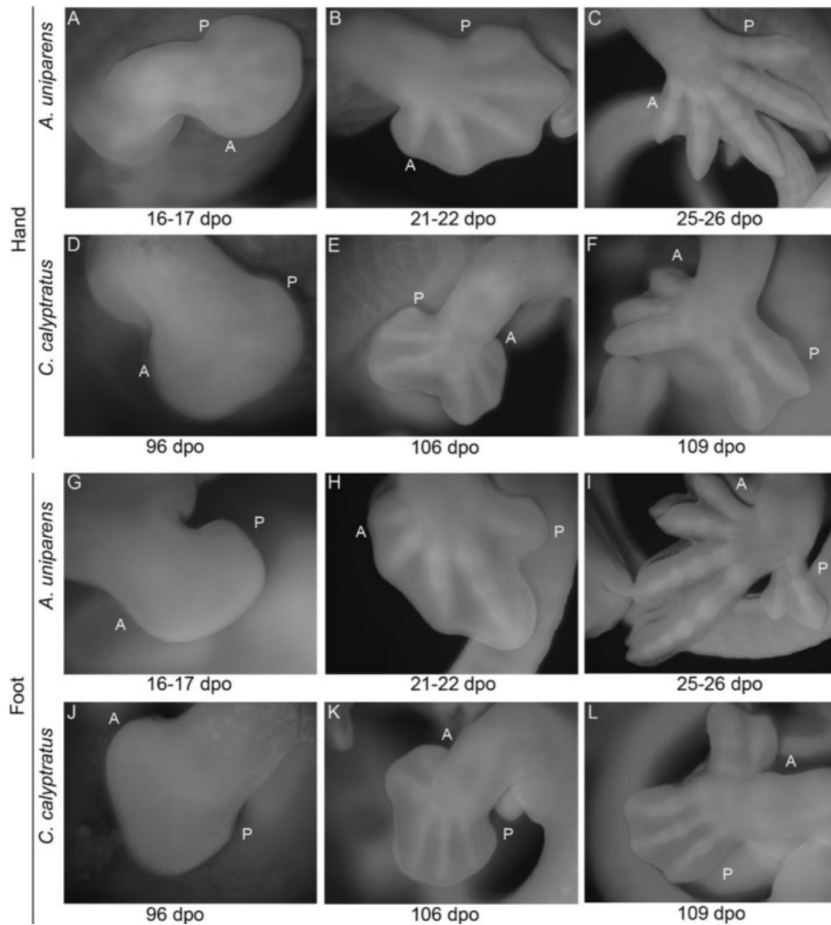


Další zástupci plazů využívaných v laboratořích

- Chameleon jemenský (*Chamaeleo calyptratus*)
- Agama vousatá (*Pogona vitticeps*)
- Gekončík noční (*Eublepharis macularius*)
- Užovka červená (*Pantherophis guttatus*)



Vývojová biologie I

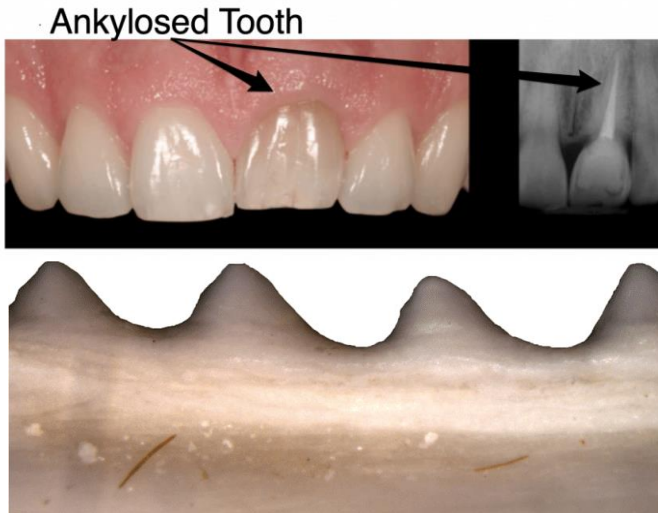
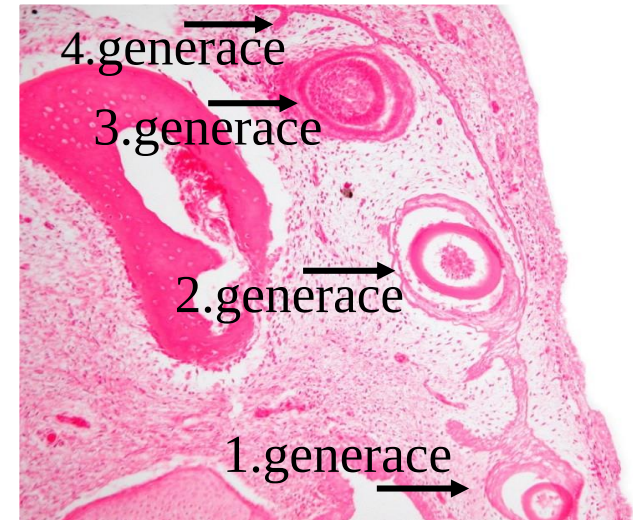


Diaz et al, 2019

- Studie popisující mechanismus vzniku morfologických rozdílů (ve velikosti těla, tvaru končetin, očí, tvaru a počtu zubů, apod) v rámci evoluce jednotlivých plazích druhů

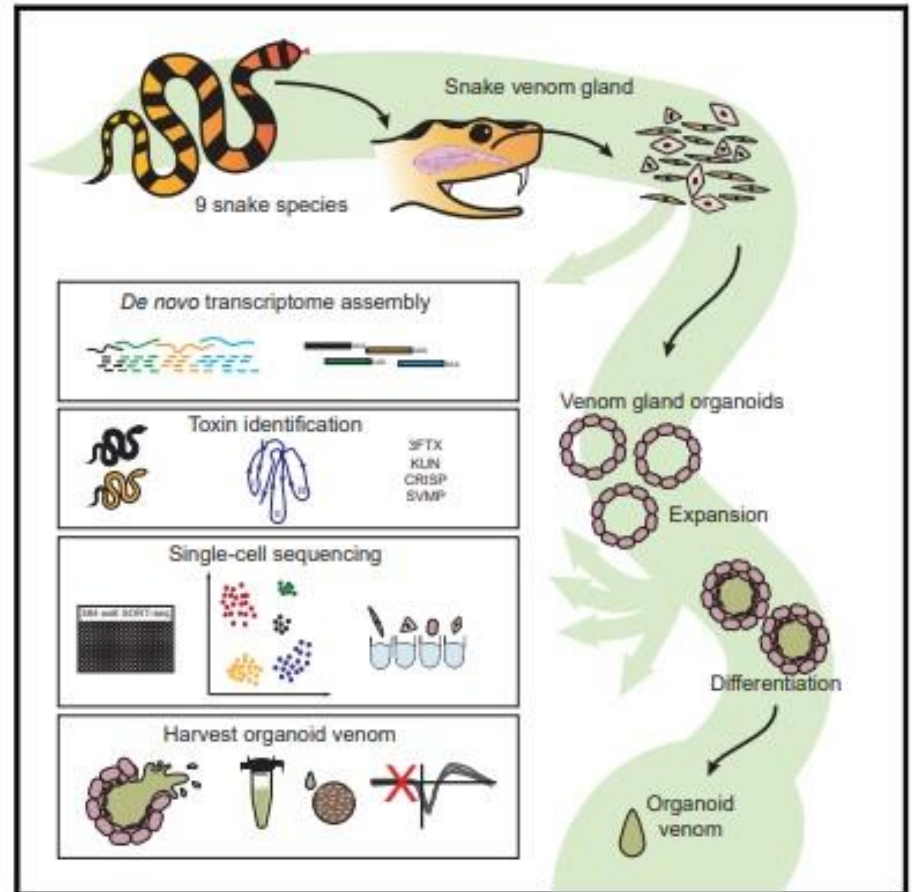
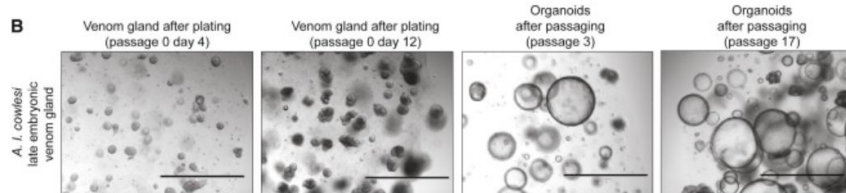
Vývojová biologie III

- Studium počtů generací zubů
 - polyfyodontní dentice u hadů
 - Náhradní zubní generace jsou tvořeny ze zubní lišty
- Studium ankylózy (chameleon)



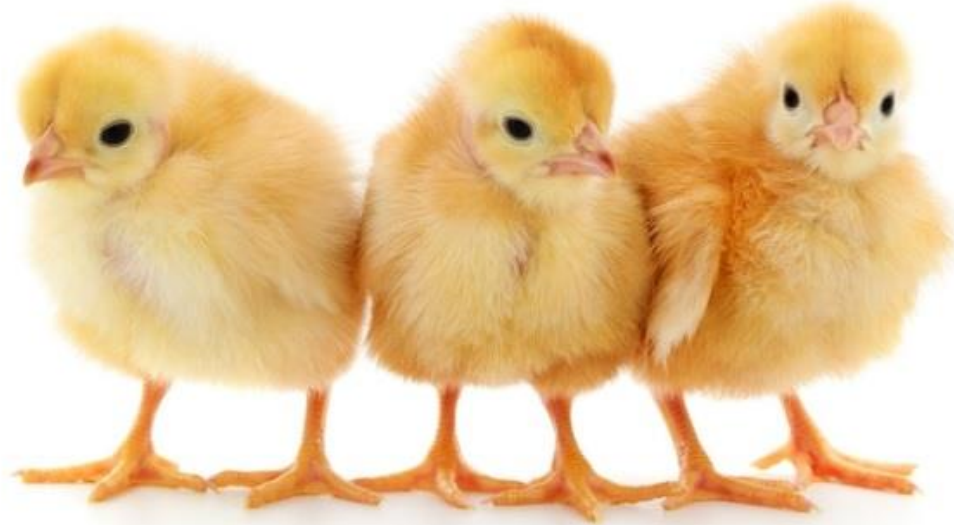
Další využití plazů ve výzkumu

- Využití přirozených vlastností plazů (jedových žláz hadů a z nich vytvořených organoidů) pro produkci látek potenciálně použitelných v medicíně



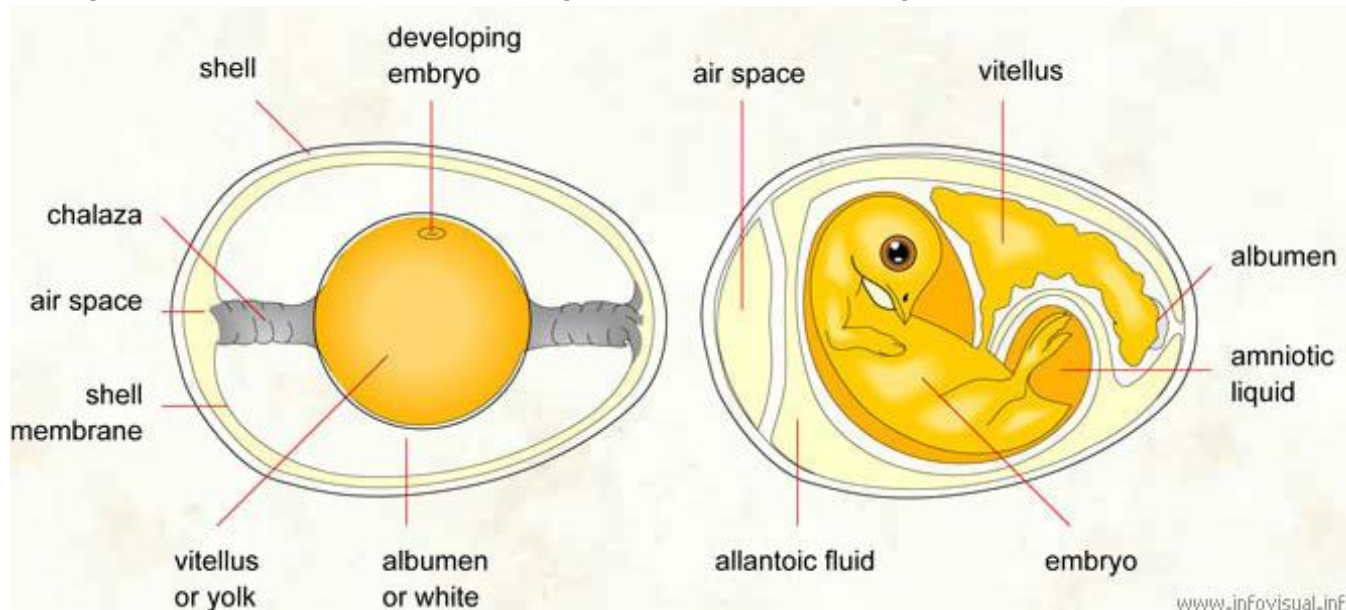
Post et al, 2020

Kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*)



Úvod

- Třída: ptáci (Aves)
 - Podtřída: letci (Neognathae)
 - Řád: hřabaví (Galliformes)
 - Čeleď: bažantovití (Phasianidae)
- Pro výzkumné účely se využívá pouze embryí vyvíjejících se uvnitř vajíčka opatřeného tvrdou vápenatou skořápkou



Výhody

vs.

Nevýhody

kura/kuřete jako experimentálního modelu



Vývoj embryí in ovo mimo tělo samice

S embryi lze po otevření skořápky manipulovat, po manipulaci lze vývoj průběžně kontrolovat

Embryo lze odebírat v přesně stanoveném stádiu

Kuřecí genom osekvenován (2004)



Samice snáší nižší počet vajec (cca 5 vajec/týden)

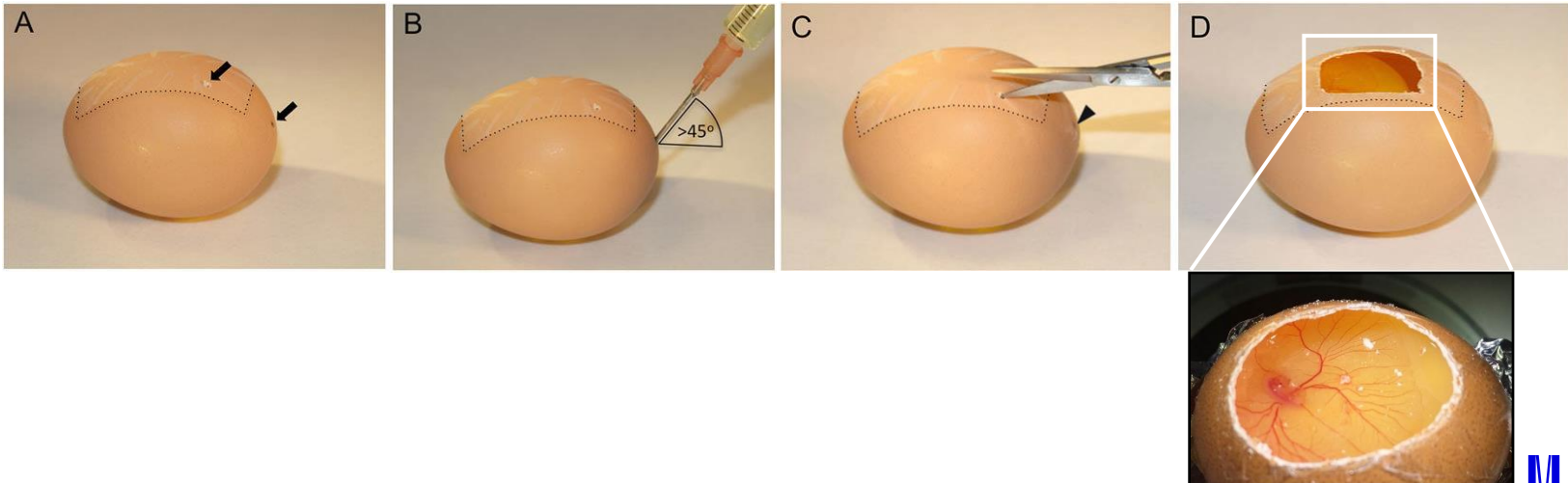
Vysoká úmrtnost embryí po manipulaci

Potenciální chov a generace vlastních (i transgenních) kuřat v laboratorních podmínkách náročný

Práce s kuřecími embryi nesterilní

Způsob inkubace a manipulace

- Vývoj embrya ve vejci začíná vložení vajíček do inkubátoru (38 °C, konstantní vlhkost)
- Vejce musí být položeno na stranu, nesmí stát (A)
- Po 1,5 dni (cca 36 hodinách = HH 10) odsáváme bílek (embryo klesne) (B), vystříháme drobný otvor do skořápky (C), který následně přelepíme a vejce vrátíme zpět do inkubátoru
- Po cílené manipulaci (injekci, implantaci, transplantaci...) přelepíme otvor a inkubujeme do odběru (D)



Životní cyklus Hamburger Hamilton Stages

In Memory of Viktor Hamburger: 1900-2001

NORMAL STAGES OF CHICK EMBRYONIC DEVELOPMENT

Hamburger V. Hamilton H.L. 1951.
A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morph 88: 49-92. *



*Reprinted in Developmental Dynamics 195, 231-72 (1992).

Poster by Drew M. Noden, Cornell University, sponsored by the American Association of Anatomists; production by Wiley-Liss, Inc.

The stage series of normal chick embryonic development is one of the most frequently cited and enduring biomedical articles ever published, and set the standards for avian species-specific stage series that have followed. The compiler of this paper, Viktor Hamburger, died in June, 2001, just a few weeks prior to his 101st birthday. In recognition of the tremendous importance of this stage series to countless research and teaching laboratories around the world, and in tribute to Prof. Hamburger's many contributions to developmental biology spanning seven decades, the editors and publisher of Developmental Dynamics commissioned the poster that accompanies this issue. Stages 1-55 (incubation days 0 through 9) were scanned from the original 1951 publication. Embryos have been retouched and cropped for this poster format, and digitally enhanced to better highlight key features of each stage. Sketches of early limb bud and branchial (pharyngeal) arch development are also included, keys for these are in the original publication.

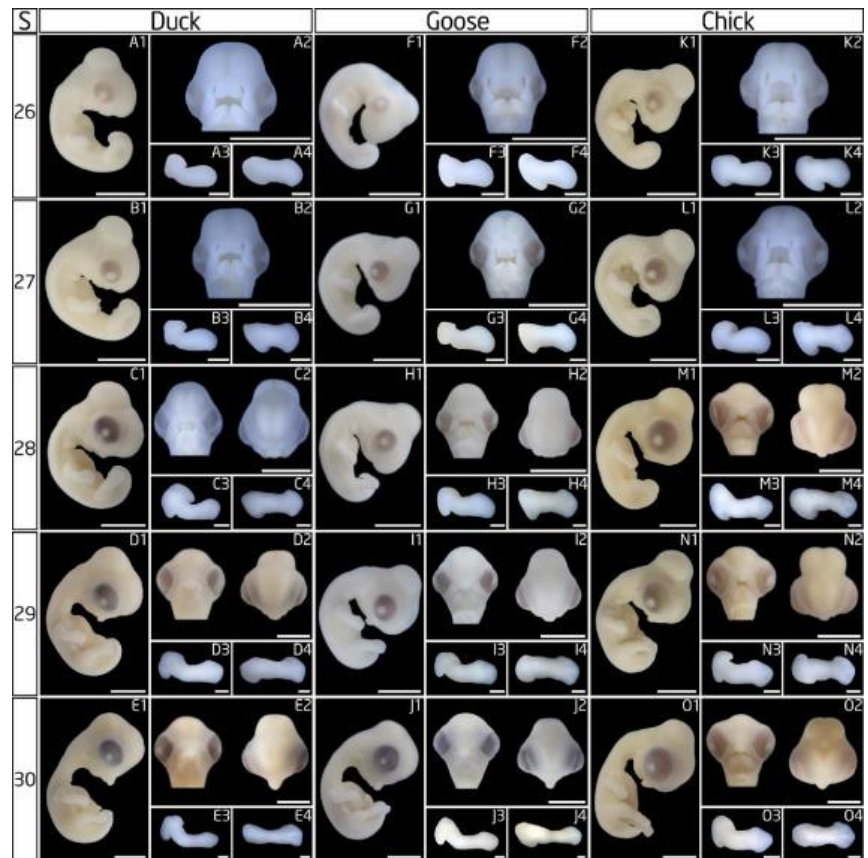
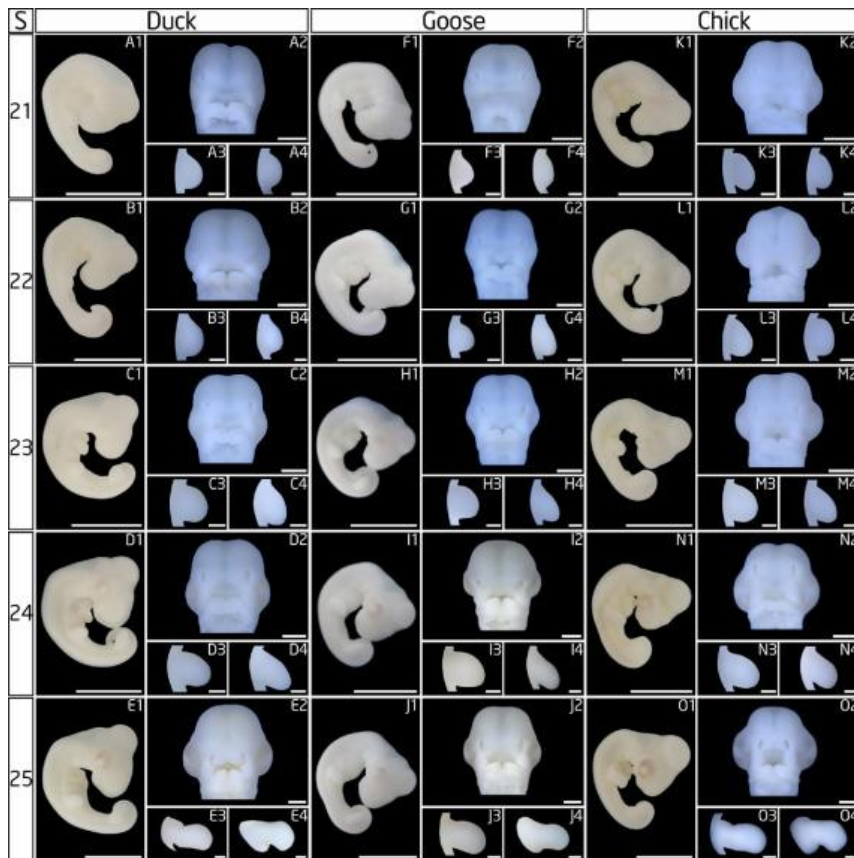
DEVELOPMENTAL
DYNAMICS

WWW.INTERSCIENCE.WILEY.COM/DEVELOPMENTALDYNAMICS

WILEY

Vývojová biologie I

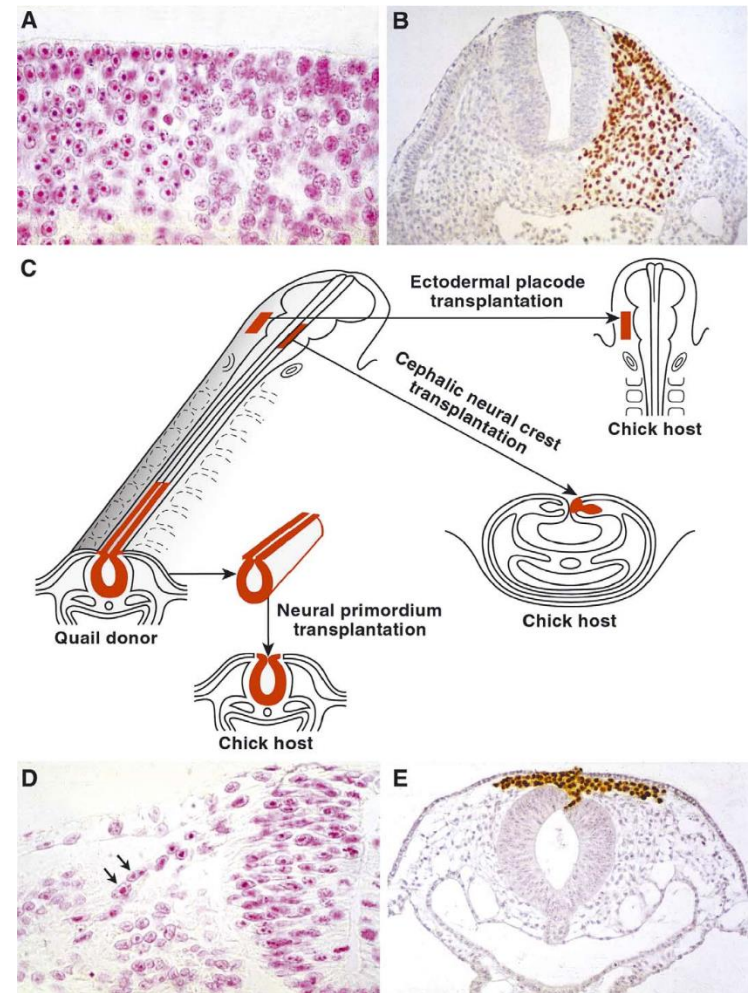
- popis morfologických rozdílů během embryonálního vývoje různých druhů



Shanshan et al., 2019

Vývojová biologie II

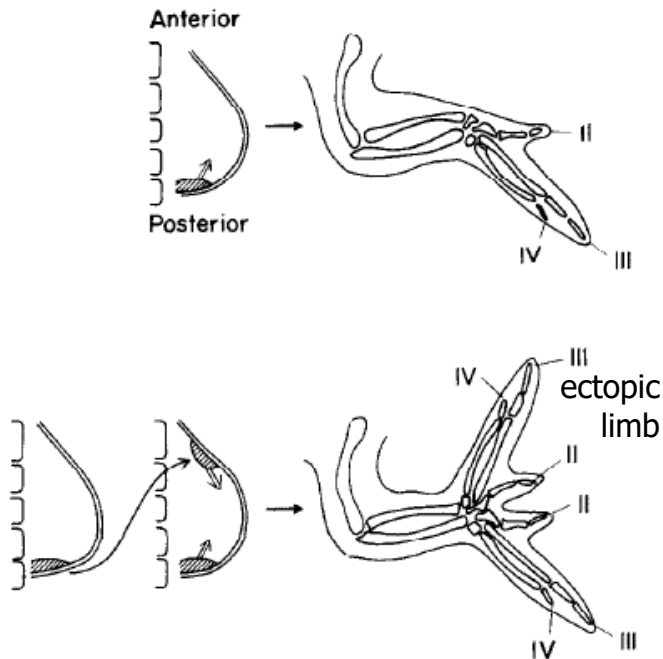
- Tvorba chimér (transplantací části křepelčí neurální lišty na stejné místo stejně starého kuřecího embrya) jako nástroj sledování osudu buněk



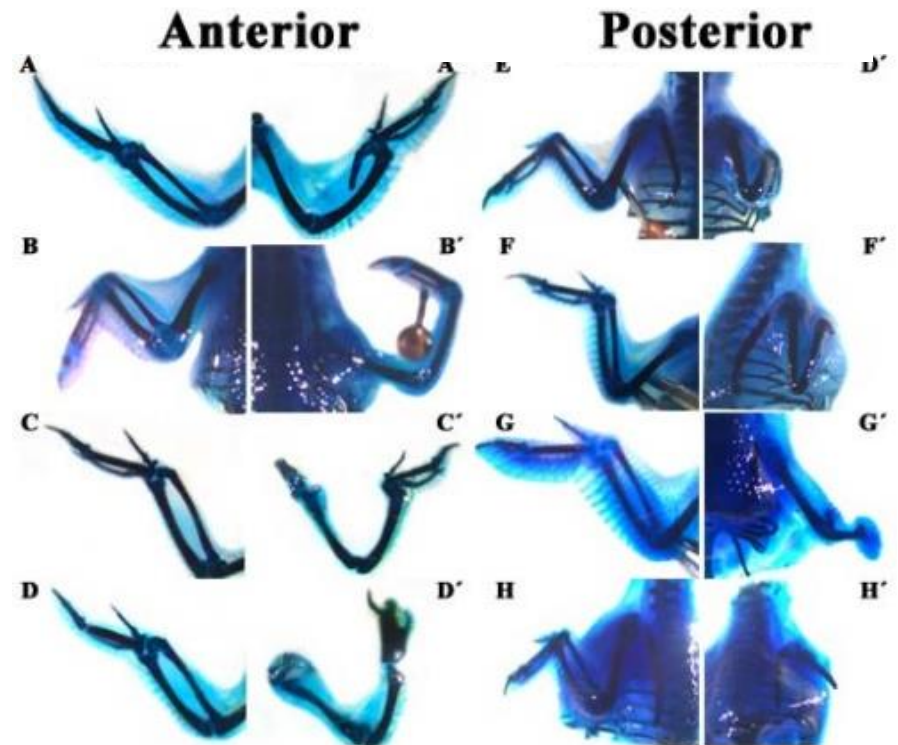
Le Douarin et al,
2004/1969

Vývojová biologie III

- Využití kuřecího modelu pro studium vývoje a formování končetin a využití znalostí tohoto procesu pro studium účinku růstových faktorů či toxikologické studie



Riddle et al, 1993



Killinger, 2018

Další zástupci ptáků využívaných v laboratořích

- Křepelka japonská (*Coturnix japonica*)
- Křepelka polní (*Coturnix coturnix*)



Další informace a zajímavosti

- Databáze exprese genů ve vyvíjejícím se kuřecím embryu:
<http://geisha.arizona.edu/geisha/>
- Roslin Institut
<https://www.ed.ac.uk/roslin/national-avian-research-facility>



"Roslin Green" Cytoplasmic eGFP reporter chicks.
Image from Macdonald et al. 2012, PNAS.

Myš domácí (*Mus musculus* var. *alba*)



Úvod

- Třída: savci (Mammalia)
 - Řád: hlodavci (Rodentia)
 - Čeleď: myšovití (Muridae)
- Pohlavní dimorfismus: samice drobnější, pohlavní otvor blíž análnímu otvoru (cca 5 mm), samci robustnější, pohlavní otvor od análního otvoru cca 15 mm



Výhody

vs.

Nevýhody

myši jako experimentálního modelu



Savec, nejpodobnější člověku (20 párů chromozomů, 99% genů stejných)

„Skladná“, snadný a levný chov

Krátká doba březosti, rychlé dosažení pohlavní zralosti

Možnost vytvoření transgenních myších modelů



Mnoho fyziologických odlišností

Nutnost zabít matku při odběru embryí

Rychlé stárnutí

Některé genetické modifikace embryonálně letální

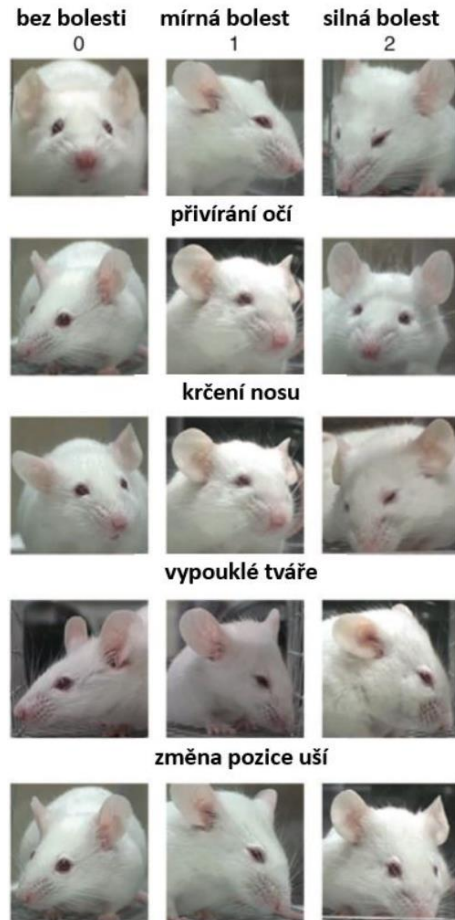
Způsob chovu a manipulace I

- Nenáročný, v klecích s podestýlkou, granule, čerstvá voda, světelný režim 12/12, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, enrichment, pravidelná výměna steliva a vody (1x týdně)
- Rozlišujeme:
 - **Otevřený (konvenční) chov:** pohyb zvířat, materiálu a pečujících osob volný, pouze se zvýšenými hygienickými opatřeními
 - **Bariérový chov:** prostor s chovem zvířat je oddělen od vnějšího prostředí bariérou, přes kterou prochází jak pracovníci, tak zvířata, veškerý materiál (potrava, podestýlka, apod.) se sterilizují, nutná zvýšená hygiena, zvířata jsou testována (~3 m.) na přítomnost patogenů (SPF – specified pathogen free)
 - **Izolátorový chov:** prostor pro zvířata je trvale oddělen bariérou jak od vnějšího prostředí, tak od chovatelů, typicky pro imunodeficientní myši, axenické (germ-free) a gnotobiotické myši (s definovaným složením střevní mikrobioty)

Způsob chovu a manipulace I

- **Isogenní = geneticky definované kmeny** (isogenicita=genetická totožnost všech jedinců)
 - **inbrední kmeny**: vznik příbuzenskou plemenitbou po více než 20 generací (bratr a sestra nebo rodič a potomek), geneticky identičtí jedinci
 - **koizogenní (=mutantní) kmeny**: od původního kmene se liší jen v jednom genu, ve kterém došlo k mutaci
 - **kongenní kmeny**: vznik křížením dvou kmenů a následným zpětným křížením, výskyt specifických genů jednoho kmene na pozadí kmene druhého
- **Neisogenní = geneticky nedefinované kmeny**
 - **outbrední linie**: geneticky heterogenní populace, vyhýbáme se příbuzenskému křížení, tak aby koeficient inbreedingu zůstal co nejnižší, vhodné pro behaviorální pokusy
- Nejčastěji využívané kmeny laboratorních myší: C57BL/6J (inbrední), BALB/c (produkce monoklonálních protilátek), C3H/HeJ, FVB/NJ

Způsob chovu a manipulace



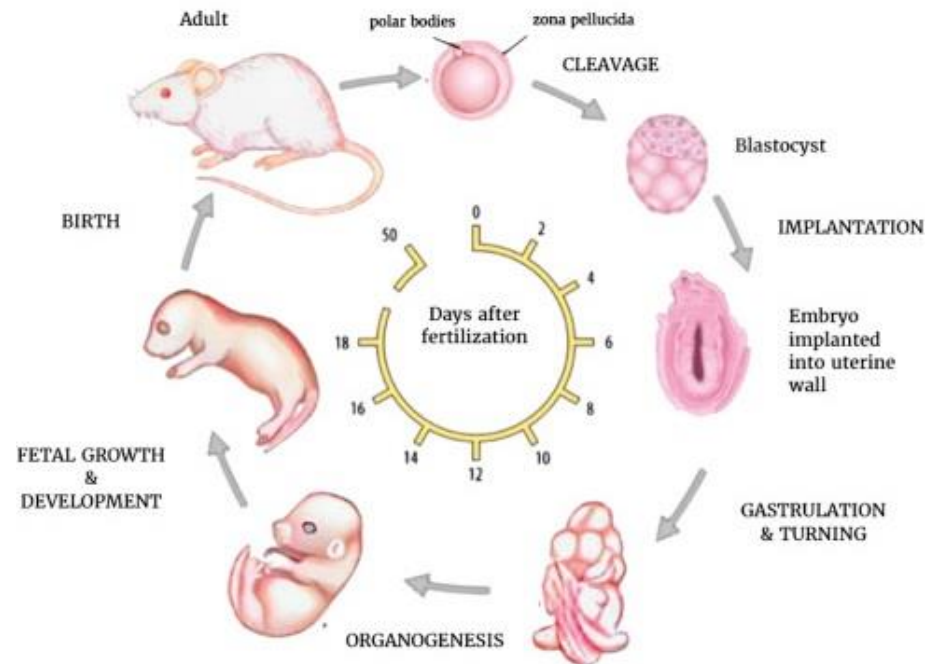
změna polohy hmatových vousů Langford et al., 2010



<https://www.youtube.com/watch?v=GseebUnPQEc>

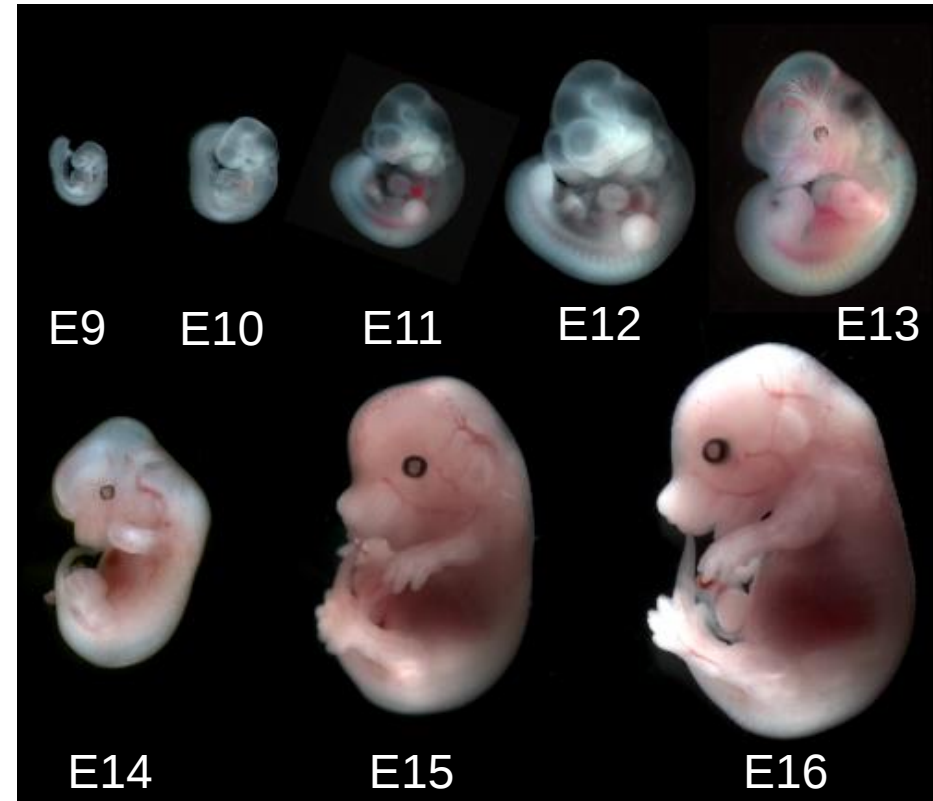
Životní cyklus I

- Gestace – 19-21 dní, odstav mláďat ve 3.-4. týdnu
- Pohlavní dospělost – 6-7 týdnů
- Generační doba – 2-3 měsíce
- Estrus – polyestrální, cyklus se opakuje každých 4-5 dní
- Samice dvojité děloha (uterus duplex)
- Počet mláďat ve vrhu 4-10
- Průměrná délka života – až 2 roky



Životní cyklus II - embryogeneze

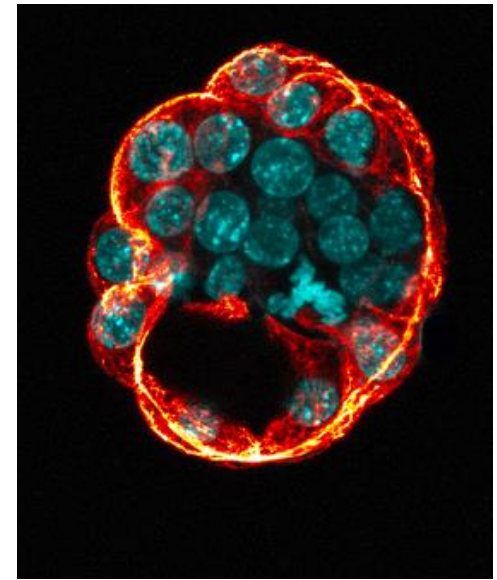
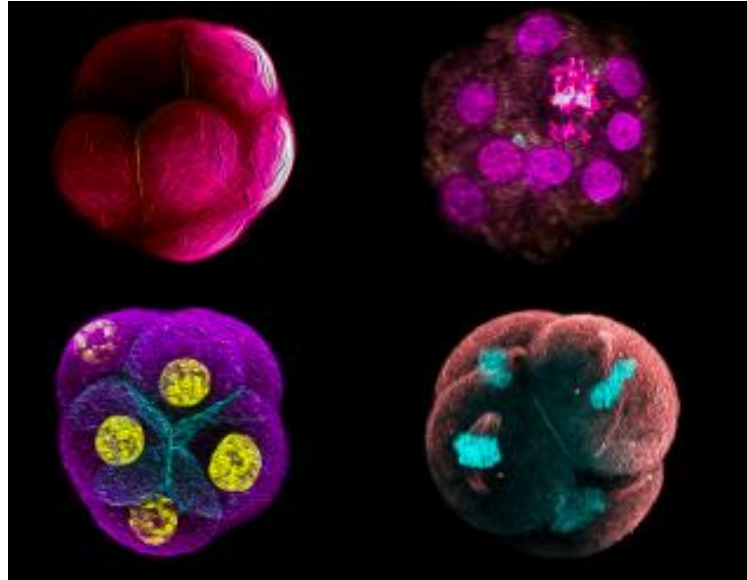
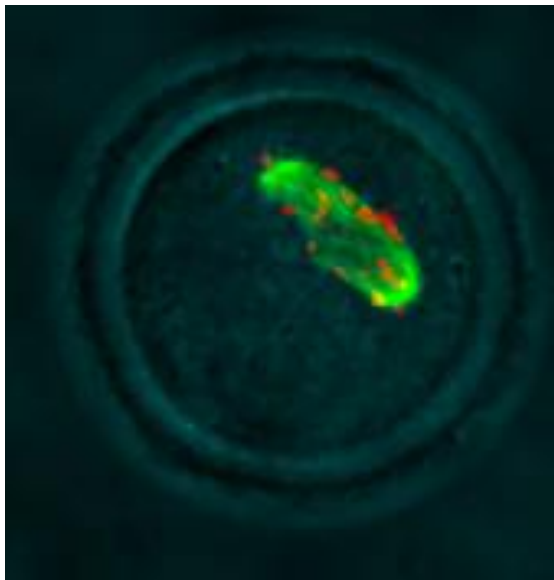
- E9: rozeznatelný hrudní končetinový pupen
- E10: rozeznatelný pánevní a ocasní končetinový pupen, z prvního faryngeálního oblouku vzniká mandibula
- E11: formování základů patrových plotének z výběžku maxily
- E12: lze rozeznat jednotlivé články prstů, ty stále spojeny, formování základů zubů
- E13: rozvětňování plic, apoptóza interdigitálních prostor (mezi prsty)
- E14: patrové ploténky se narovnávají a srůstají
- E15: otevírají se oční víčka
- E16: osifikace, oční víčka i nosní dutina se opět zavírají



Vývojová biologie

Studium preimplantačního vývoje oocytů

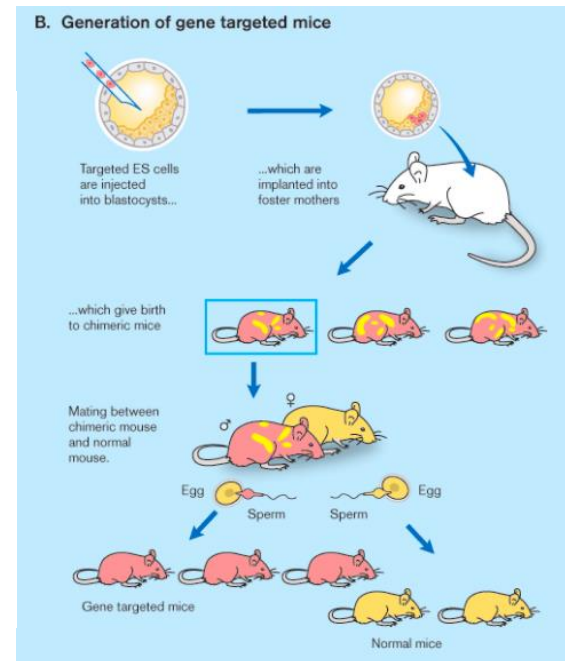
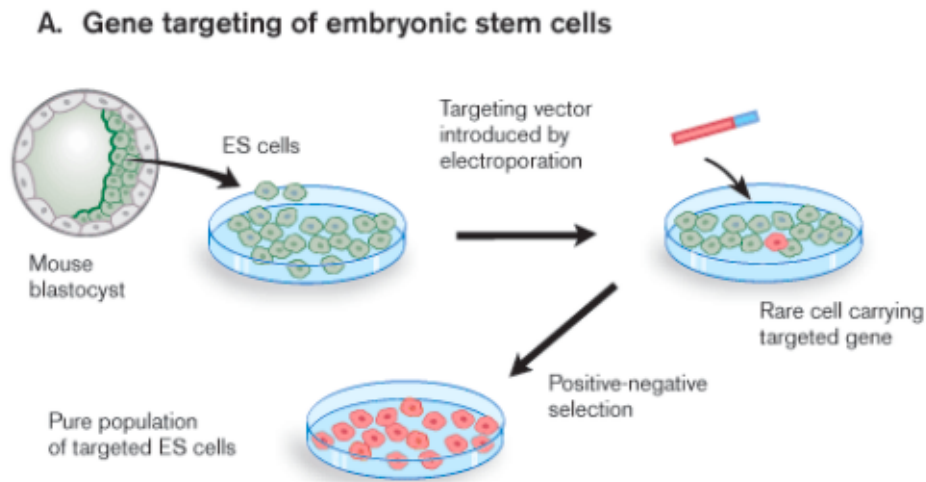
- Různá témata pokrývající jak samotný proces oplození, tak jednotlivé kroky rýhování buněk embrya



Vývojová biologie

Nobelova cena za fyziologii a medicínu (2007): Capecchi, Evans, Smithies

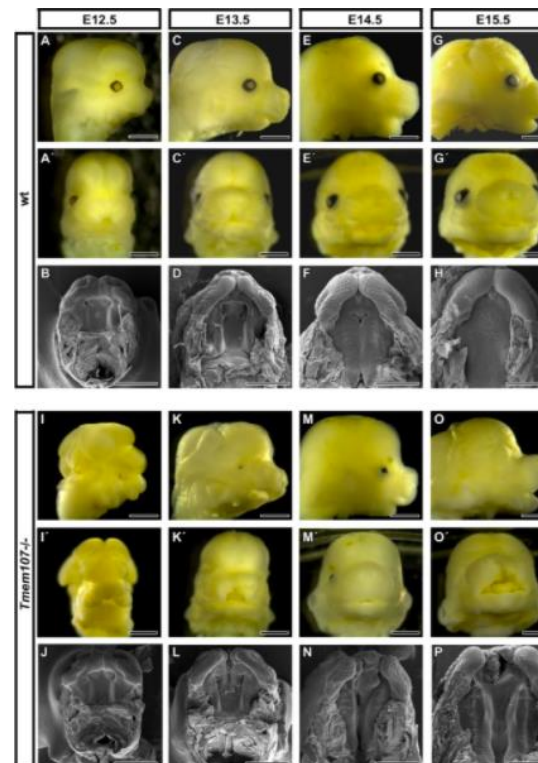
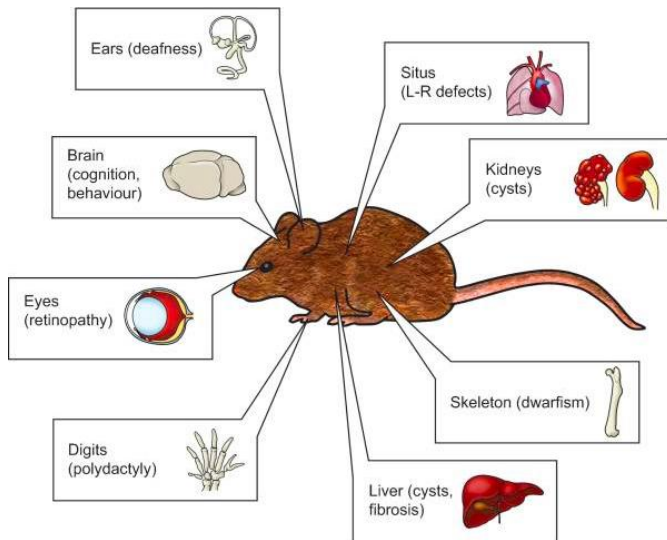
- objev principů vnesení genových modifikací do myšího modelového organismu s využitím embryonálních kmenových buněk



Vývojová biologie

Myší modely lidských vývojových onemocnění – ciliopatie

- Vývojové defekty způsobené chybnou činností cilií
- Pro studium podstaty těchto defektů a možné léčby vytvořeny transgenní myši nesoucí mutace v různých genech souvisejících s fyziologií cilií



Cela et al, 2018

Další informace a zajímavosti

<https://www.mousephenotype.org/>

<https://www.jax.org/>

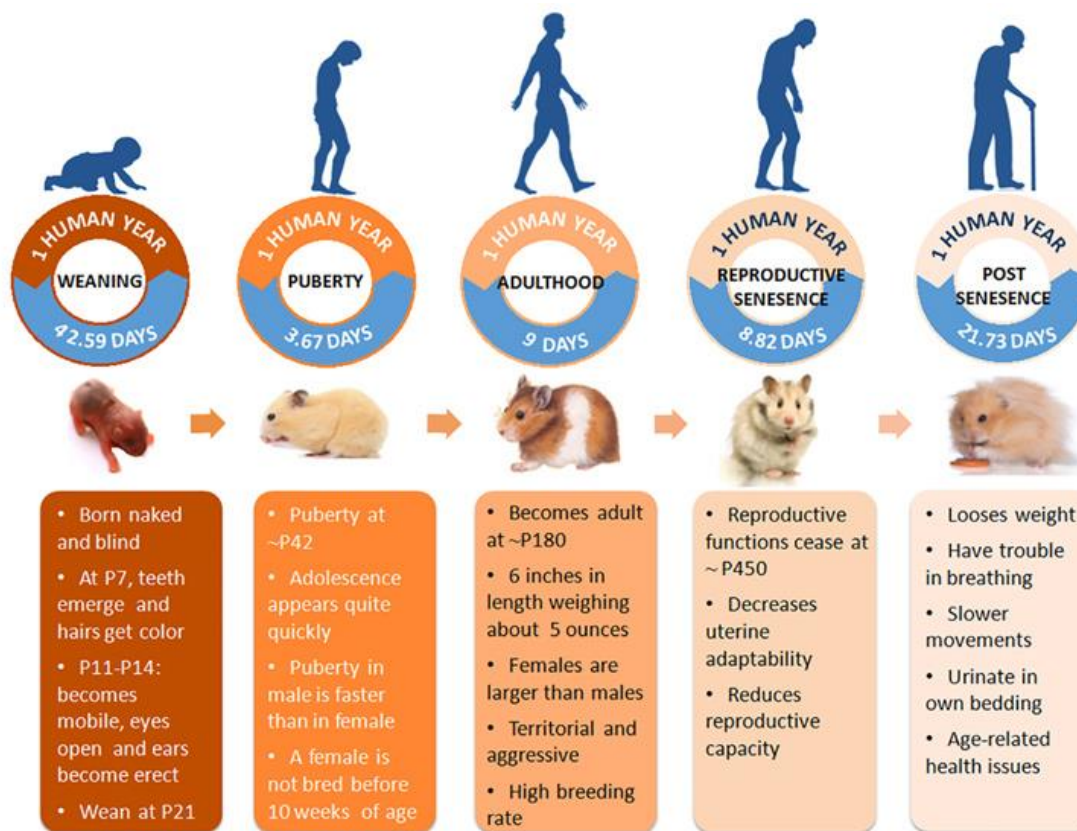
<https://www.phenogenomics.cz/>

– Příručka správné manipulace s laboratorními myšmi

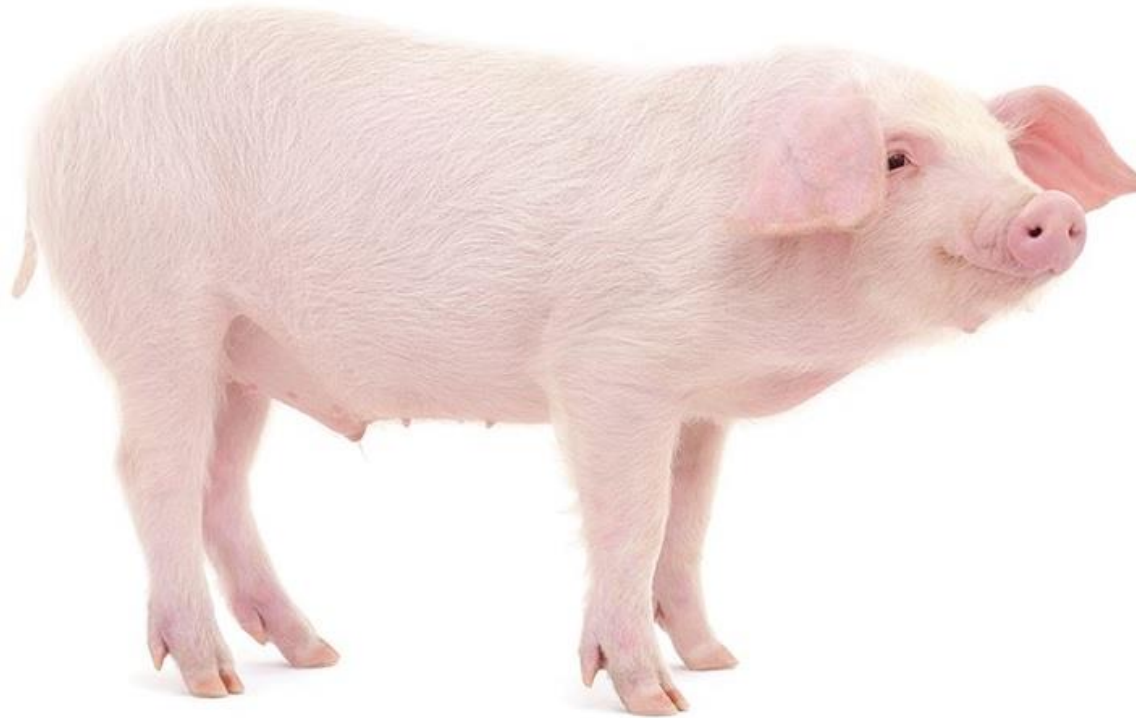
<http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Procedimentos%20experimentais/Handling-3.pdf>

Další zástupci hlodavců využívaných v laboratořích

- Křeček zlatý, syrský (*Mesocricetus auratus*)
- model pro studium reprodukční biologie

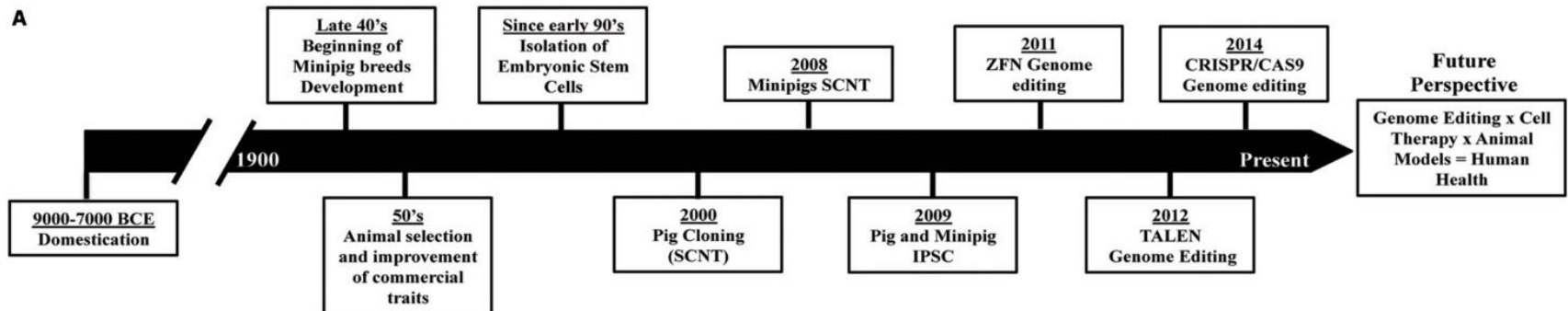


Prase domácí (*Sus scrofa* f. *domestica*)



Úvod

- Třída: savci (Mammalia)
 - Řád: sudokopytníci (Artiodactyla)
 - Čeď: prasatovití (Suidae)
- Domestikováno mezi 9.-7. tisíciletím př.n.l., primárně chováno na maso, jako experimentální zvíře využíváno od čtyřicátých let minulého století



Gutierrez et al, 2015

Úvod

- Model pro studium mnoha humánních chorob (včetně alkoholismu, melanomů, aterosklerózy, hypertenze apod.), chirurgických postupů a vývojových procesů

Type of investigation	Model	Reference
Heart physiology	Stent design, tissue engineering of blood vessels	Bedoya <i>et al.</i> , 2006; Gyöngyösi <i>et al.</i> , 2006
	Atherosclerosis	Türk and Laughlin, 2004; Türk <i>et al.</i> , 2005
	Myocardial infarction	Ambrose, 2006; Boluyt <i>et al.</i> , 2007
	Ex vivo heart model	Laske <i>et al.</i> , 2005
	Emergency procedures	Casas <i>et al.</i> , 2005; Geddes <i>et al.</i> , 2006
Reproductive function	Maternal–fetal interactions	Green <i>et al.</i> , 2006
	Embryo development	Sun and Nagai, 2003; Rohrer <i>et al.</i> , 2006
Transplantation	Sperm	Strzezek <i>et al.</i> , 2005; Lavitrano <i>et al.</i> , 2006
	Cell and organ transplants	Larsen and Rolin, 2004; Street <i>et al.</i> , 2004
Skin physiology	Xenotransplantation	Cooper <i>et al.</i> , 2002; Ibrahim <i>et al.</i> , 2006
	Percutaneous permeation	Simon and Maibach, 2000; Dalton <i>et al.</i> , 2006
	Contact dermatitis	Stuetz <i>et al.</i> , 2006
Brain	Skin culture model	Huang <i>et al.</i> , 2006
	Melanoma	Geffrotin <i>et al.</i> , 2004; Zhi-Qiang <i>et al.</i> , 2007
	Stroke	Imai <i>et al.</i> , 2006
	AIDS, dementia	Tambuyzer and Nouwen, 2005
	Drug-binding sites and interactions	Minuzzi, <i>et al.</i> , 2005
Gut physiology and nutrition	Gut structure and intestinal metabolism	Eubanks <i>et al.</i> , 2006; Qiu <i>et al.</i> , 2006
	Obesity	Brambilla and Cantafora, 2004
	Probiotics and gut physiology	Reid <i>et al.</i> , 2003; Domeneghini <i>et al.</i> , 2006
	Food allergies	Bailey <i>et al.</i> , 2005; McClain and Bannon, 2006
Biochemical	Response to injury	Schmitt and Snedecor, 2006
	Imaging techniques	Ellner <i>et al.</i> , 2004; Goldberg <i>et al.</i> , 2004
	Osteoporosis, bone density analysis	Teo <i>et al.</i> , 2006
Tissue engineering	Cartilage repair	Chang <i>et al.</i> , 2006
	Spinal fusion	Drespe <i>et al.</i> , 2005
	Organ-specific gene delivery	Kawashita <i>et al.</i> , 2005
	Cataract repair	Lassota <i>et al.</i> , 2006; van Kooten <i>et al.</i> , 2006
	Polymer scaffolds	Brown <i>et al.</i> , 2006; Moroni <i>et al.</i> , 2006
	Tooth development	Hu <i>et al.</i> , 2005
Respiratory function	Neonatal respiratory distress	Miller <i>et al.</i> , 2006
	Asthma	Turner <i>et al.</i> , 2002; Watremez <i>et al.</i> , 2003
Infectious disease	Therapeutics (vaccines, biotherapeutics, drug therapies)	González <i>et al.</i> , 2004; Cheetham <i>et al.</i> , 2006
	Developmental interactions	Hasslung <i>et al.</i> , 2005; Butler <i>et al.</i> , 2006
	Mucosal tissue responses	Elahi <i>et al.</i> , 2005; Dawson <i>et al.</i> , 2005;
		Pomeranz <i>et al.</i> , 2005; Dvorak <i>et al.</i> , 2006
	Host response	Houdebine, 2005

Kuzmuk and Schook, 2010

M U N I
S C I

Výhody

vs.

Nevýhody

prasete jako experimentálního modelu



Ze všech modelových organizmů
jednoznačně nejpodobnější člověku
(anatomicky i co do velikosti genomu)

Možnost vytvoření transgenních
modelů



Náročný a nákladný na chov

Nutnost zabít matku při odběru
embryí, dlouhá doba březosti
(115 dní)

Vývojová biologie

Příprava transgenních prasat

- díky podobnosti s člověkem velký předpoklad testování potenciální léčby (nejen) pro dědičně podmíněná onemocnění
- transgeneze též umožňuje upravit genom prasat tak, aby bylo možné je použít při xenotransplantacích (snaha o snížení rejekce xenograftu)



Vývojová biologie

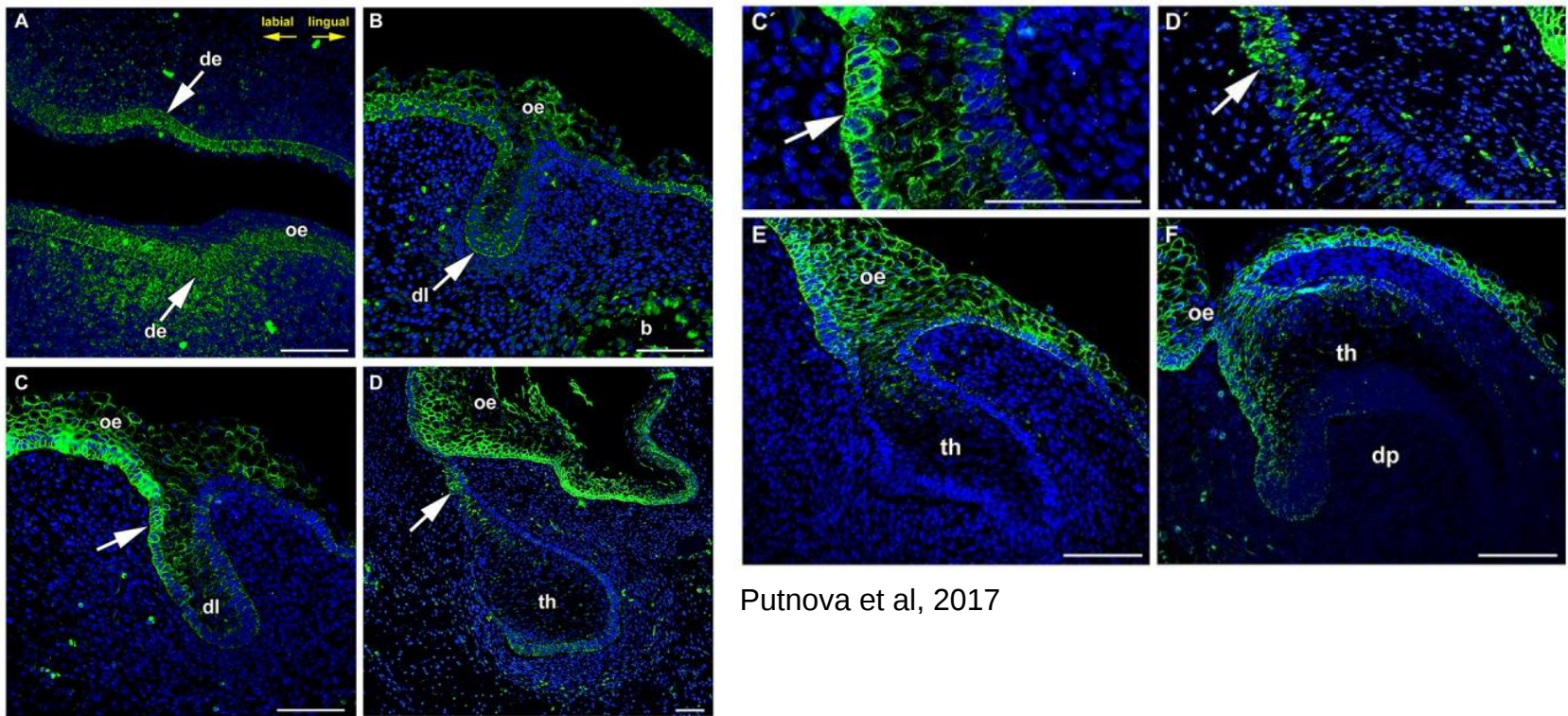
Centrum Pigmod (ÚŽFG AV ČR)

- příprava transgenních mini prasat nesoucích stejné mutace v genu HTT jako pacienti trpící Huntingtonovou chorobou
- výzkum traumatického poškození míchy u miniprasat
- studium unikátního zvířecího modelu – linie prasat MeLiM (Me lanoma-bearing Li bechov M inipig) s dědičně založeným melanomem



Vývojová biologie

- Studium dentice prasat – dvě generace zubů (stejně jako člověk) – velká podobnost



Putnova et al, 2017

Děkujeme Vám za pozornost

MUNI SCI

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A IMUNOLOGIE
ŽIVOČICHŮ (OFIŽ)



STUDIJNÍ PROGRAM:
EXPERIMENTÁLNÍ A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

SPECIALIZACE:
EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ŽIVOČICHŮ
A IMUNOLOGIE & BUNĚČNÁ BIOLOGIE