

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Mgr. Michaela Bendová**

**Genová exprese v kuřecím embryu: mikromanipulační a vizualizační metody**

**Gene expression in chicken embryo: micromanipulation and visualization methods**

Disertační práce

Akademie věd České republiky  
Ústav molekulární genetiky, v. v. i.  
Oddělení molekulární virologie  
Školitel: RNDr. Michal Dvořák, CSc.

Praha, 2019



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. června 2019

Podpis



# Obsah

Obsah .....	5
Poděkování.....	9
Zkratky .....	11
Abstrakt.....	17
Abstract.....	19
1. Cíle.....	21
2. Teoretický úvod .....	23
2.1 Kuřecí model .....	23
2.1.1 Historie kuřecího modelu .....	23
2.1.2 Kuřecí genom .....	26
2.1.3 Experimentální chovy slepic v Čechách.....	28
2.1.4 Kuře a lidská onemocnění .....	28
2.2 Kuřecí embryo.....	29
2.2.1 Embryonální vývoj .....	30
2.2.2 Organogeneze s přispěním neurální lišty (NL).....	31
2.2.3 Embryonální oko .....	32
2.2.4 Indukce čočky.....	33
2.2.5 Retina.....	34
2.2.6 Kultivace kuřecího embrya.....	34
2.2.7 Embryonální tkáňové kultury .....	35
2.2.8 Použité zobrazovací metody v kuřecím embryu.....	36
2.3 Neurální lišta .....	37
2.3.1 Chiméry .....	39
2.3.2 Plasticita a multipotence buněk NL.....	41
2.3.3 Původ tkání odvozených od NL .....	42
2.3.4 Migrace buněk NL.....	43
2.3.5 Genová exprese v NL .....	44
2.3.6 Melanocyty .....	45

2.4 Elektroporace .....	45
2.4.1 Elektroporace <i>in ovo</i> .....	47
2.5 Proteiny Myb.....	47
2.5.1 Rodina Myb .....	48
2.5.2 Onkoprotein v-Myb .....	48
3. Materiál a metody .....	51
3.1 Experimentální materiál .....	51
3.2 Získávání embryí pro mikromanipulace a „time-lapse“ .....	51
3.3 Explantové kultury .....	52
3.4 Použité DNA konstrukty a retroviry.....	52
3.5 Tranzientní transfekce kuřecích embryonálních fibroblastů (CEF) .....	53
3.6 Kultury krevních prekurzorových buněk.....	53
3.7 Embrya a kultury buněk NL .....	53
3.8 Kultury primárních receptorových buněk.....	54
3.9 Reverzní transkripce a qPCR.....	54
3.10 Mikročipová analýza a analýza dat .....	55
3.11 Reportérová analýza .....	55
3.12 Elektroporace <i>in ovo</i> .....	55
3.13 Hybridizace celých embryí - whole mount in situ hybridization (WISH) .....	56
3.14 Kryořezy (mrazové řezy).....	57
3.15 Imunofluorescence.....	57
4. Výsledky .....	59
4.1 Mikromanipulace a vizualizace.....	59
4.1.1 Inkubace a příprava kuřecích embryí .....	59
4.1.2 Kultivace <i>ex ovo</i> a pozorování pomocí časosběrné techniky („time-lapse“) ....	61
4.1.3 Explantové kultury .....	62
4.1.4 Elektroporace.....	63
4.1.5 Kryořezy .....	68
4.1.6 Imunofluorescence.....	70
4.1.7 Hybridizace <i>in situ</i> na celém embryu (WISH) .....	71
4.2 Identifikace časných genů v NL (Starostova <i>et al.</i> , 2014) .....	73

4.2.1 Konstrukty mutant genu <i>v-myb</i> .....	73
4.2.2 Mutanty v-Myb-L3,4A přispívají k diferenciaci melanocytů .....	75
4.2.3 Mikročipová analýza .....	77
4.2.4 Gremlin 2.....	79
4.2.5 Další geny vykazující zvýšenou expresi.....	82
4.2.6 Geny se sníženou expresí .....	83
4.2.7 Shrnutí .....	83
4.3 Signalizace v regulaci indukce čočky (Antosova <i>et al.</i> , 2016) .....	84
4.3.1 Exprese Pax6 je redundantně závislá na Meis1 a Meis2.....	84
4.2.2 Elektroporace do vyvíjejícího se oka kuřecího embrya <i>in ovo</i> .....	86
4.2.3 Konstrukty SIMO a jejich funkce ve vyvíjejícím se oku kuřecího embrya .....	86
4.2.4 Shrnutí .....	93
4.5 Kuřecí embryonální retina jako model pro studium lokalizace snRNP.....	95
4.5.1 Zpracování embryonální retiny .....	95
5. Diskuze .....	100
5.1 Mikromanipulace a vizualizace.....	100
5.1.1 Nastavení elektroporace v našich experimentech.....	100
5.1.2 Vizualizace elektroporovaných embryí .....	101
5.2 Manipulace a vizualizace genové exprese v NL kuřecího embrya .....	102
5.3 Manipulace a vizualizace genové exprese v oku kuřecího embrya .....	104
5.3.1 Vizualizace exprese SIMO a EE v oku kuřecího embrya po elektroporaci ....	104
5.3.2 Kuřecí retinální model <i>ex vivo</i> a <i>in vitro</i> .....	104
5.4 Relevance kuřecího modelu pro studium lidských onemocnění .....	105
5.5 Budoucnost kuřecího modelu a uplatnění autorky.....	106
6. Závěry .....	108
7. Seznam literatury .....	110
8. Podíl autorky na uvedených projektech.....	133
9. Přílohy.....	135
Příloha 1: Text výňatku z Výroční zprávy Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů hospodářských zvířat a dalších živočichů využívaných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství za rok 2008 .....	135

Elektronická příloha 1: Kultivace kuřecího embrya <i>ex ovo</i> - časoběrná technika „time-lapse“ .....	136
Elektronická příloha 2: Explantové kultury - časoběrná technika „time-lapse“ .....	136



## Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat všem, kteří se podíleli na vzniku méj disertační práce. Především děkuji svému školiteli Michalu Dvořákovi za podporu a trpělivost, se kterou vedl moji práci. Všem ostatním členům Oddělení molekulární virologie děkuji za spolupráci a odborné konzultace, zejména Martě Dvořákové, Vítu Karafiátovi, Vladimíru Čermákovi a Janu Koslovi. Kateřině Trejbalové z Oddělení buněčné a virové genetiky děkuji za odborné konzultace a psychickou podporu. Dále děkuji Oddělení transkripční regulace, zejména Zbyňkovi Kozmikovi a Barboře Antošové, za podnětnou spolupráci. Za spolupráci také děkuji Zuzaně Cvačkové z Oddělení biologie RNA. Ostatním kolegům děkuji za pomoc a za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. V neposlední řadě děkuji za podporu své rodině.

Tato práce vznikla za finanční podpory Akademie věd České republiky z grantů RVO 378050 a KAN200520801, GAČR 15-23675S, grantu UK GAUK-16063, grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy LK11214 a LO1419, institucionální podpory Biotechnologického a biomedicínského centra AV a UK CZ.1.05/1.1.00/02.0109 a Tomáše Hlavničky, Romana Minárika, Miroslava Navrátila, Leoše Navrátila, Vladimíra Pečenky, Karla Rybáčka, Miroslava Sobotky, Josefa Soukala a Petra Streitberga.



## Zkratky

Název	Česky	Anglicky
4-OHT	4-hydroxytamoxifen	4-hydroxytamoxifen
5'-RACE	Technika přepisu 5'-konce mRNA	Rapid amplification of 5'-cDNA ends
5'-UTR	Nepřekládaná oblast na 5-konci	5'-untranslated region
µg	Mikrogram (jednotka)	Microgram (unit of measure)
µl	Mikrolitr (jednotka)	Microlitre (unit of measure)
µm	Mikrometr (jednotka)	Micrometre (unit of measure)
AD29	Mutace alaninu (A) za kyselinu asparagovou (D) v pozici 29	Alanin (A) to aspartic acid (D) mutation in position 29
ALV	Ptačí leukózní virus	Avian leukosis virus
AMV	Virus ptačí myeloblastózy	Avian myeloblastosis virus
AP	Alkalická fosfatáza	Alkaline phosphatase
atd.	A tak dále	
ATG	Start kodon v DNA	Start codon in DNA
BAC	Arteficiální bakteriální chromozom	Bacterial arteficial chromosome
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitrotetrazoliová modř	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium
BMP	Kostní morfogenetický protein	Bone morphogenetic protein
BMP4	Kostní morfogenetický protein 4	Bone morphogenetic protein 4
BMP5	Kostní morfogenetický protein 5	Bone morphogenetic protein 5
bp	Pár bází	Base pair
BSA	Albumin hovězího séra	Bovine serum albumine
C11orf34	Gen PLET1, transkript exprimovaný placentou	Placenta-Expressed Transcript 1 Protein
CAM	Kuřecí chorioalantoidní membrána	Chick chorioallantoic membrane
Cas9	Kaspáza 9	Caspase 9
cDNA	Komplementární DNA - DNA pocházející z přepisu mRNA	Complementary DNA
CEF	Kuřecí embryonální fibroblasty	Chicken embryonic fibroblasts
c-kit	Receptorová tyrosin-kináza	Receptor tyrosine kinase
C-konec	Konec peptidu s karboxylovou skupinou COOH	Carboxyl-terminus or COOH-terminus of peptid
c-Myb	Buněčný homolog virového onkogenu ptačí myeloblastózy	Avian myeloblastosis oncogene cellular homolog
CpG ostrůvek	Sekvence bohatá na CpG dinukleotid	CpG island
CRISPR	Segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice	Clustered regularly interspaced short palindromic repetitions
Cy3	Oranžová fluorescenční barva, cyanin	Orange fluorescent dye, cyanine

Da	Dalton (jednotka)	Dalton (unit of measure)
DAND3	Protein příbuzný Dan a Cerberus (také GREM2 nebo PRDC)	Protein related to Dan and Cerberus (also GREM2 or PRDC)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, modrá fluorescenční barva pro barvení buněčných jader	4',6-Diamidino-2-phenylindole, blue fluorescent dye for cell nucleus visualization
DBD	DNA-vazebná doména	DNA-binding domain
DDBJ	Japonská databáze sekvencí DNA	DNA Data Bank of Japan
DF1	Transformovaná buněčná linie kuřecích fibroblastů	Transformed chicken fibroblast cell line
DIG	Digoxigenin	Digoxigenin
DIG-UTP	Digoxigeninem značený uridintrifosfát	Digoxigenin-labelled uridine triphosphate
DMEM	Eagleovo médium modifikované Dulbecem	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	Deoxyribonucleic acid
DsRed	Červený fluorescenční protein z mořské sasanky <i>Discosoma</i>	Red fluorescent protein of sea anemones <i>Discosoma</i>
E1-E21	Stádia kuřecího embrya, den 1-21	Chick embryo stages, day 1-21
E26	Virus ptačí erytroblastózy	Avian erythroblastosis virus
EE	Ektodermový enhancer	Ectodermal enhancer
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová	Ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	Účinnější varianta zeleného fluorescenčního proteinu	Enhanced green fluorescent protein
EGR1	Protein časně růstové odpovědi 1	Early growth response protein 1
EMBL	Evropská laboratoř pro molekulární biologii, Heidelberg	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
EMT	Epitelo-mezenchymový přechod	Epithelial-mesenchymal transition
ER	Estrogenový receptor	Estrogene receptor
EST	Exprimovaná krátká sekvence	Expressed sequence tag
ETRB2	Endotelinový receptor B	Endothelin receptor B
Ets	Homolog onkogenu viru ptačí erytroblastózy E26	Avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
EVPL	Envoplakin	Envoplakin
FACS	Fluorescenční průtoková cytometrie	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetální telecí sérum	Fetal bovine serum
Fgf	Růstový faktor fibroblastů	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescenční barva, isothiokyanát fluoresceinu	Fluorescent dye, fluorescein isothiocyanate
FoxD3	Protein s motivem Forkhead D3	Forkhead Box protein D3
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Zelený fluorescenční protein	Green fluorescent protein

GREM2	Protein příbuzný Dan a Cerberus (také PRDC nebo DAND3)	Protein related to Dan and Cerberus (also PRDC or DAND3)
h	hodina (jednotka)	hour (unit of measure)
HA	Hemaglutinin	Hemagglutinin
HCl	Kyselina chlorovodíková	Hydrochloric acid
HD	Homeodoména	Homeodomain
HeLa	Lidská imortalizovaná buněčná linie	Human immortalized cell line
HH1-HH46	Stádia kuřecího vývoje <i>in ovo</i> (Hamburger a Hamilton, 1951, 1992)	Chick embryo <i>in ovo</i> staging (Hamburger and Hamilton, 1951, 1992)
HNK-1	Karbohydrátový epitop	Carbohydrate epitope
HOPX	Homeodoménový protein postrádající konzervované zbytky pro navázání DNA	Homeodomain-Only Protein
hPrp3	snRNP, součást podjednotky spliceozomu U4/U6	U4/U6-Associated RNA Splicing Factor 3, Small Nuclear Ribonucleoprotein
hPrp31	snRNP, součást podjednotky spliceozomu U4/U6	Pre-mRNA Processing Factor 31, U4/U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein
hPrp4	snRNP, součást podjednotky spliceozomu U4/U6	Pre-mRNA Processing Factor 4, U4/U6 Small Nuclear Ribonucleoprotein
IgY	Imunoglobulin Y	Immunoglobulin Y
ISH	Hybridizace <i>in situ</i>	<i>In situ</i> hybridisation
K buňky	Druh lymfocytů	Killer cells
kDa	Kilodalton (jednotka)	Kilodalton (unit of measure)
KRT19	Keratin 19	Keratin 19
L3,4A	Mutace leucinů (L) v pozicích 3 a 4 za alaniny (A)	Leucine (L) in positions 3 and 4 to alanine (A) mutation
LacZ	Gen pro $\beta$ -galaktosidázu	$\beta$ -galactosidase gene
LINE	Dlouhé rozptýlené jaderné elementy	Long interspread nucleotic element
log	Logaritmus	Logarithm
Maf	Homolog ptačího muskuloaponeurotického fibrosarkomu	Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
MAP-kináza	Proteinová kináza aktivovaná mitogeny	Mitogen-activated protein kinase
Meis1/2	Homolog myeloidního ekotropního integračního místa 1	Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog
mCherry	Červený fluorescenční protein odvozený od DsRed	Red fluorescent protein derived from DsRed
mg	Miligram (jednotka)	Milligram (unit of measure)

MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major histocompatibility complex
MIAME	Pravidla pro mikročipovou analýzu	Minimum Information About a Microarray Experiment
min	Minuta (jednotka)	Minute (unit of measure)
miRNA	MikroRNA	MicroRNA
Mitf	Transkripční faktor indukující melanocyty	Melanocyte inducing transcription factor
ml	Mililitr (jednotka)	Millilitre (unit of measure)
MLV	Reverzní transkriptáza	Reverse transcriptase
mM	Milimolární (jednotka)	Millimolar (unit of measure)
MoMLV	Virus myši leukémie	Moloney murine leukaemia virus
MRE	Element rozpoznávaný Myb	Myb recognition element
mRNA	Mediátorová RNA	Messenger RNA
ms	Milisekunda (jednotka)	Millisecond (unit of measure)
Msx1/2	Msh Homeobox ½	Msh Homeobox 1/2
Myb	Člen rodiny genů ptačí myeloblastózy	Member of avian myeloblastosis gene family
N118D	Mutace asparaginu (N) v pozici 118 za kyselinu asparagovou (D)	Asparagine (N) in position 118 to aspartic acid (D) mutation
NaCl	Chlorid sodný	Sodium chloride
např.	například	
ncRNA	nekódující RNA	non-coding RNA
NHGRI	Americký výzkumný ústav zabývající se lidským genomem, spadá pod NIH	National Human Genome Research Institute of NIH (National Institutes of Health)
NIH	Národní institut zdraví (USA)	National Institutes of Health (USA)
NK buňky	Druh lymfocytů	Natural killer cells
N-konec	Konec peptidu s navázanou aminovou (-NH <sub>2</sub> ) skupinou	Amino-terminus or NH <sub>2</sub> -terminus of peptid
NKX3-2	Homolog proteinu homeoboxu Bagpipe 1	Bagpipe Homeobox Protein Homolog 1
NL	Neurální lišta	Neural crest
nM	Nanomolární (jednotka)	Nanomolar (unit of measure)
NT	Neurální trubice	Neural tube
Obr.	Obrázek	
Pax3	Gen obsahující konzervovaný motiv „paired box“ 3	Paired box 3 gene
Pax6	Gen obsahující konzervovaný motiv „paired box“ 6	Paired box 6 gene
Pax7	Gen obsahující konzervovaný motiv „paired box“ 7	Paired box 7 gene

PBS	Fyziologický roztok pufovaný fosfátem	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerázová řetězová reakce	Polymerase chain reaction
PEST-like motiv	Peptidová sekvence bohatá na prolin (P), kyselinu glutamovou (E), serin (S) a treonin (T)	Peptide sequence rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S) and threonine (T)
PGC	Primordiální zárodečné buňky	Primordial germ cells
PRDC	Protein příbuzný Dan a Cerberus (také GREM2 nebo DAND3)	Protein related to Dan and Cerberus (also GREM2 or DAND3)
pre-mRNA	Primární transkript mRNA	Primary transcript of mRNA
qPCR	Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase	Quantitative real time polymerase chain reaction
REV	Virus retikuloendoteliózy	Reticuloendotheliosis virus
RNA	Ribonukleová kyselina	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference	RNA interference
RP	<i>Retinitis pigmentosa</i>	<i>Retinitis pigmentosa</i>
RPE	Retinální pigmentovaný epitel	Retinal pigmented epithelium
RSV	Virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
rtPCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	Real-time polymerase chain reaction
S1-S44	Somity 1-44	Somites 1-44
SCF	Růstový faktor kmenových buněk	Stem cell factor
SDS	Dodecylsírán sodný, detergent	Sodium dodecyl sulfate, detergent
SIMO	Enhancer ve vývoji oka	Enhancer in eye development
SINE	Krátké rozptýlené jaderné elementy	Short interspread nucleotic element
Six3	Gen obsahující homeobox sine oculis 3	Sine oculis homeobox homolog3
SLC2A9	Glukózový transportér 9 z rodiny rozpustných přenašečů 2	Solute Carrier Family 2 Member 9
SLC25A37	Mitochondriální transportér 25 z rodiny rozpustných přenašečů 37	Solute Carrier Family 25 Member 37
Slug	Transkripční faktor neurální lišty Slug (Snail 2)	Neural Crest Transcription Factor Slug (Snail2)
Snail2	Transkripční represor 2 z rodiny Snail (Slug)	Snail Family Transcriptional Repressor 2 (Slug)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus	Single nucleotide polymorphism
snRNP	Malé jaderné ribonukleoproteiny	Small nuclear ribonucleoprotein
Snu114	Proteinem U5 snRNP	U5 snRNP protein
Sox2	Gen obsahující oblast Y předurčující pohlaví (motiv 2)	(Sex determining region Y)-box 2 gene
Sox9	Gen obsahující oblast Y předurčující pohlaví (motiv 9)	(Sex determining region Y)-box 9 gene

Sox10	Gen obsahující oblast Y předurčující pohlaví (motiv 10)	(Sex determining region Y)-box 10 gene
TAAR1	Receptor asociovaný s trace-aminovými neuromodulátory	Trace Amine Associated Receptor 1
Taed	Transkripční enhancerový faktor	Transcriptional enhancer factor
TAG	Stop kodon v DNA	Stop codon in DNA
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TPS	Dočasná propustná struktura v buněčné membráně	Transient permeable structure
TX-100	Triton X-100, detergent	Triton X-100, detergent
tzv.	Takzvaný	
U	Jednotka	Unit
U2, U5, U4/U6	Ribonukleoproteinová částice spliceozomu	Ribonucleoprotein particle of spliceosome
U2B	Proteinem U2 snRNP	U2 sn RNP protein
ÚMG AV ČR, v. v. i.	Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, veřejná výzkumná instituce	Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, public research institution
vč.	včetně	
v-myb	Virový homolog onkogenu ptačí myeloblastózy	Avian myeloblastosis viral oncogene homolog
VNN1	Vanin 1	Vanin 1
v-src	Onkogen Rousova sarkomu	Rous sarcoma oncogene
WISH	Hybridizace <i>in situ</i> na celém embryu	Whole mount <i>in situ</i> hybridisation
Wnt	Receptorové ligandy z rodiny genů MMTV integračního místa 1 typu Wingless	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Wnt3a	Člen rodiny Wnt 3a	Wnt family member 3a
X-gal	Substrát $\beta$ -galaktosidázy, 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid	$\beta$ -galaktosidase substrate, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
YFP	Žlutý fluorescenční protein	Yellow fluorescent protein



## Abstrakt

Cílem této disertační práce bylo získat lepší vhled do principů vývoje buněčných struktur a orgánů v kuřecím embryu. K tomuto účelu byly zavedeny a k daným procedurám upraveny různé pokročilé metody manipulace a vizualizace *in vitro*, *ex vivo*, *ex ovo* a *in ovo*. Tyto specializované metody byly využity zejména ke studiu genové exprese ve vývoji neurální lišty a vývoji oka.

Během dlouhodobého výzkumu v naší laboratoři byl pozorován vliv onkoproteinu v-Myb na vývoj neurální lišty a jeho schopnost měnit přirozený buněčný osud. Studovali jsme vliv proteinu v-Myb na změny v diferenciaci buněk neurální lišty, zejména jejich vývoj do melanocytární linie, a jeho vliv na expresi genů v neurální liště. Středem našeho zájmu se stal protein Gremlin 2, označovaný také jako PRDC (protein related to Dan and Cerberus), jehož expresi v-Myb v neurální liště zvyšuje.

Zavedené postupy elektroporace neurální lišty *in ovo* byly upraveny pro transfekci buněk vyvíjejícího se oka a využity ke studiu genové regulace při indukci čočky. Výsledky získané na kuřecím modelu podpořily studii provedenou na myších embryích.

Technika elektroporace do embryonálního oka byla také upravena pro mikromanipulace s retinou *in ovo*, která byla dále zpracována metodami *ex vivo* a *in vitro* pro studii zabývající se lokalizací snRNP ve fotoreceptorových buňkách.



## Abstract

The aim of this work was to obtain better insight into the principles of cell structures and organs in the chicken embryo development. To reach this goal special methods of micromanipulations and visualization *in vitro*, *ex vivo*, *ex ovo* and *in ovo* were implemented and adjusted. These methods were used to study gene expression in neural crest development and eye development.

In the course of long term research in our laboratory we observed that oncoprotein v-Myb influences the development of the neural crest and has the capacity to change natural cell fate. We performed a series of experiments to investigate v-Myb protein influence on neural crest cells differentiation, especially melanocyte lineage development, and its influence on gene expression in the neural crest. Therefore we focused on Gremlin 2 (PRDC), the gene upregulated by v-Myb in the neural crest.

The established procedure of electroporation *in ovo* was adjusted to transfect cells of the developing eye and used to study gene expression during lens induction. The results obtained from chicken embryo experiments endorsed the study performed on mouse embryos.

Futhermore, the electroporation technique was slightly modified for manipulations of the neural retina in the developing eye *in ovo*. Thereafter, the retinas were processed *ex vivo* and *in vitro* to study snRNPs localization in photoreceptor cells.



## 1. Cíle

Cílem této práce bylo adaptovat pokročilé metody manipulace s kuřecími embryi a zobrazovací metody a využít je k výzkumu genů podílejících se na určení buněčného osudu buněk neurální lišty, zejména melanocytů. Dále měly být metody přizpůsobeny pro spolupráci na dalších projektech využívajících jako model kuřecí embryo, a to ke studiu vyvíjejícího se oka, porovnání výsledků provedených na kuřecích a myších embryích či sledování lokalizace proteinů ve fotoreceptorových buňkách.

Konkrétní cíle této práce:

- 1) Zavést metody práce s kuřecími embryi *ex ovo* a *in ovo* a s primárními kulturami *ex vivo* a *in vitro*, zavést zobrazovací metody a metody následné detekce změn (fluorescenční značení, WISH a další).
- 2) Sledovat působení proteinu v-Myb na diferenciaci vícepotentních buněk neurální lišty ve vyvíjejícím se kuřecím embryu a na změny genové exprese v neurální liště a identifikovat geny podílející se na časném vývoji buněk neurální lišty.
- 3) Studovat vliv proteinu v-Myb na expresi genu *grem2* a zkoumat funkci proteinu Gremlin 2 v kuřecí neurální liště a diferenciaci melanocytů.
- 4) Využít elektroporaci vyvíjejícího se oka ke studiu vlivu enhanceru SIMO a genů Meis1 a Meis2 na indukci čočky.
- 5) Účinně elektroporovat retinu u vyvíjejícího se oka kuřecího embrya *in ovo* a dále ji zpracovat *ex vivo* a *in vitro* za účelem sledování lokalizace snRNP ve fotoreceptorových buňkách.



## 2. Teoretický úvod

### 2.1 Kuřecí model

#### 2.1.1 Historie kuřecího modelu

Kuřecí model je v přírodních vědách využíváný od nepaměti, a ač je v současné době zastíněn především modelem myším, nelze mu upírat jeho význam. Možnost pozorovat embryo mimo tělo matky staví kuřecí model do pozice nenahraditelného nástroje embryologie, vývojové biologie, srovnávací anatomie a dalších. Slepičí vejce byla uměle inkubována již starověkými Egypťany. První popsání pozorování a manipulace s kuřecími embryi pocházejí od Aristotela ze 4. století př. n. l. V pozdější době bylo kuřecí embryo nástrojem pro objev blastodermu (Coiter, 1573), zárodečných listů (Pander, 1817; Von Baer, 1827), pochopení vzniku, vývoje a funkce krevního oběhu, funkce žil a tepen a vývoje srdce (W. Harvey, 1651), funkce kapilár (Malpighi, 1673) a dalších.

Od přelomu 19. a 20. století se s vývojem technických možností stal kuřecí model nenahraditelným pomocníkem dalších vědních odvětví. Goldman a Murphy přenesli lidský nádor na chorioalantoidní membránu kuřecího embrya a pozorovali schopnost nádoru navodit vaskularizaci (Murphy, 1913). Metoda CAM se dodnes využívá při studiu principů vaskularizace, invazivity nádorových buněk a metastazování, cervikálního a ovariálního karcinomu a dalších (Richardson a Singh, 2003; Tufan a Satiroglu-Tufan, 2005; Zhai *et al.*, 2007; Lokman *et al.*, 2012; Ribatti, 2017). Kuřecí embryo bylo použito jako model infekce a později přispělo k objevu virů, když se (Ellerman, 1908) pokusili přenést leukémii u kuřat s použitím bezbuněčného filtrátu obsahujícího virus. V roce 1911 Peyton Rous popsal na kuřatech schopnost viru způsobovat rakovinné bujení (Rous, 1911), jeho jméno nese virus Rousova sarkomu (RSV) a v roce 1966 získal za svůj objev Nobelovu cenu. Významnou osobností mezi vědci pracujícími s kuřecím modelem byla také Rita Levi-Montalcini. Na kuřecích embryích studovala růst nervů a za objev NGF dostala spolu se Stanleyem Cohenem v roce 1986 Nobelovu cenu (S. Cohen *et al.*, 1954). Všestrannost kuřecího modelu a nenáročnost přístupu ke kuřecímu embryu ve vejci jí umožnila pokračovat v práci i za druhé světové války v podmínkách domácí laboratoře na venkově. V roce 1989 pak byla udělena další Nobelova cena vědcům pracujícím s kuřecím modelem,

získali ji Harold Varmus a Michael Bishop za objev buněčného původu retrovirálních onkogenů (Stehelin *et al.*, 1976).

Kuřecí model přispěl také k rozvoji imunologie, virologie, onkologie a molekulární genetiky, položil základy retrovirologie a pomohl vyvrátit centrální dogma molekulární virologie objevem reverzní transkripce. Za tento objev a za porozumění interakcím mezi nádorovými viry a genetickým materiálem dostali Nobelovu cenu David Baltimore, Renato Dulbecco a Howard M. Temin v roce 1975 (Sambrook *et al.*, 1968; Temin a Mizutani, 1970; Baltimore *et al.*, 1971).

Na poli imunologie a retrovirologie se významně uplatnili i čeští vědci pracující s kuřecím modelem, zejména Milan Hašek a Jan Svoboda, jejichž výsledky dosahují světového významu. Hašek ve své laboratoři zavedl parabiózu, spojení krevních oběhů dvou kuřecích embryí. Využil toho, že ve vyvíjejícím se vejci se zpočátku krevní oběh nachází vně embrya hned pod skořápkou, udělal do dvou vajec malá okénka a zárodečné vaky resp. cévy obou jedinců spojil přes tkáň ze třetího embrya. Pozoroval, že takto vylíhnutá kuřata nevytvářejí navzájem protilátky proti antigenům druhého kuřete z tohoto spojení (Hašek, 1953a). Jeho experimenty s parabiózou vedly k jednoznačnému experimentálnímu průkazu fenoménu imunologické tolerance, avšak Hašek svá pozorování interpretoval v lysenkovském duchu jako „vegetativní hybridizaci živočichů“ (Hašek, 1953b). Za objev imunologické tolerance byla v roce 1960 udělena Nobelova cena Peteru Medawarovi (Billingham *et al.*, 1953) a Frankovi Macfarlanovi Burnetovi, jehož teorii o získané toleranci formulovanou v roce 1949 experimentálně potvrdil právě Medawar.

Jan Svoboda byl vynikající český retrovirolog, pedagog a popularizátor vědy (Hejnar, 2017; Weiss, 2018). Jeho práce celosvětového významu byla provedena převážně na kuřecím modelu. Mezi jeho nejvýznamnější objevy patří důkaz perzistence provirové DNA v buňkách infikovaných virem Rousova sarkomu (Svoboda, 1960; Svoboda, 2015). Významně se podílel na rozvoji molekulární genetiky u nás, identifikoval geny pro EGR1 a HOPX, klonoval v-src (jakožto první gen klonovaný v Československu), s pomocí experimentálně navozených nádorů pozoroval jejich metastazování či odhojování v definovaných liniích slepic a mnoho dalšího.

V dalších letech kuřecí model ustoupil zejména modelu myším, jehož možnosti prudce rostly ruku v ruce s úspěšnou transgenezí u myší. V poslední době ustoupil kuřecí model do pozadí také kvůli problematickému postupu ve vývoji transgenních linií kuřat nebo zvířat s vyřazením konkrétního genu, tzv. „genový knockout“. Jednou z hlavních překážek pro efektivní vytvoření transgeneze u kuřat je složitý přístup k časnému embryu.



Embryo je oploženo ve vaječniku slepice a nejčasnější stádium embrya dosažitelné ve sneseném vejci už sestává ze zhruba 50 tisíc buněk. Pokusy o vytvoření transgenních linií probíhají již od osmdesátých let různými metodami (Sang, 2004). Invazivní zásahy popírají hlavní výhodu kuřecího embryonálního modelu *in ovo*, nezávislost na matce, a také jsou velmi komplikované. Přesto byly složitými metodami pracujícími s oocytom hned po ovulaci vytvořeno několik transgenních linií (Love *et al.*, 1994; Sherman *et al.*, 1998; Sang, 2004). Jiná metoda využívala retrovirové vektory a pracovala s oplozenými čerstvě snesenými vejci. První úspěšné pokusy s rekombinantním ptačím leukózním virem (AVL) či vektorem odvozeným od viru retikuloendoteliózy (REV) vygenerovaly kohouty, kteří byli mozaikou buněk s integrovaným retrovirem a malé procento jejich potomků bylo transgenní (Salter *et al.*, 1987; Bosselman *et al.*, 1989; Salter a Crittenden, 1989; Mozdziak *et al.*, 2003a; Mozdziak *et al.*, 2003b; Rapp *et al.*, 2003). Vytvoření transgenní linie se stabilní integrací GFP se podařilo s využitím myšího leukemického viru MoMLV (Koo *et al.*, 2006). Retrovirová infekce a následná integrace se ukázala jako slibný model. Další zvýšení efektivity přinesly lentivirové vektory (McGrew *et al.*, 2004; Semple-Rowland a Berry, 2014), s jejichž pomocí byly vytvořeny linie nesoucí kromě protilátek také např. geny pro lidské defensiny, interferony nebo erythropoetin (Rapp *et al.*, 2003; T. Liu *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 2018; Oishi *et al.*, 2018), které jsou produkovány do vaječného bílku. V současné době jsou slibným nástrojem kuřecí transgeneze primordiální zárodečné buňky (PGC) (Schusser *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Collarini *et al.*, 2015). Kombinace výše zmíněných metod a jejich postupné zefektivňování, nové vhodné vektory, pokročilá metodika zpracování PGC a obecně vývoj nových technologií, jako je systém CRISPR/Cas9 (N. Gilbert *et al.*, 2003; Oishi *et al.*, 2018) a další, pomáhají zjednodušovat práci a posunují model kuřecí transgeneze k vyšší efektivitě.

Úspěchu v poslední době dosáhla také laboratoř Pavla Trefila ve Výzkumném ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv a.s. v Chotouni, kde ve spolupráci s Oddělením virové a buněčné genetiky ÚMG a Technickou univerzitou v Mnichově vyvinuli účinnou metodu tvorby transgenních kuřat využívající PGC. Metoda je založena na schopnosti geneticky modifikovaných PGC pokračovat ve vývoji i po transplantaci do varlat dospělých sterilních jedinců, projít kompletním procesem spermatogeneze a obnovit tak plodnost (Trefil *et al.*, 2017). Do genomu sterilizovaných kohoutů byl integrován gen pro fluorescenční protein mCherry. Potomstvo těchto kohoutů kromě červené fluorescence vykazuje růžový nádech i denním světle, což mu vyneslo přezdívku Robin podle

anglického názvu pro ptáka červenku. Metoda je reprodukovatelná, časově úsporná a k provedení pokusu stačí malé počty zvířat.

Nové metody transgeneze mají potenciál pro rutinní chov modifikovaných jedinců a dávají tak kuřecímu modelu šanci dostat se znovu do popředí zájmu vědců, a to nejen v základním výzkumu. Transgenní slepice je schopna produkovat obrovské množství různých látek do vaječného bílku, bývá proto nazývána „živoucím bioreaktorem“. Ve vejci imunizované slepice se hromadí protilátky, které lze snadno extrahovat ve velkém množství. Jedna slepice dokáže ve vhodných podmínkách vyprodukovat ročně srovnatelné množství IgY jako velký savec (koza, ovce), aniž by bylo nutné používat invazivní metody pro jejich získávání. Ptačí protilátky extrahované z vajec už v minulosti dokázaly nahradit protilátky savčí (Schade *et al.*, 2005). V roce 2015 oznámil časopis Nature, že americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv schválil první transgenní linii slepic, která smí produkovat lidský protein pro farmaceutické účely (Nature, doi:10.1038/nature.2015.18985). Jedná se o enzym sebelipáza alfa, komerční název Kanuma, kterou lze léčit jedince s poruchou odbourávání tuku (Frampton, 2016).

### 2.1.2 Kuřecí genom

Práci s kuřecím modelem do značné míry omezovala nedostatečná znalost sekvencí genů. Postupem času byly ustanoveny rozsáhlé knihovny cDNA, EST, arteficiálních chromozomů (BAC), markery na základě SNP, fyzické mapy a další nástroje, ale neustále stoupala potřeba komplexnější genomové informace.

V roce 2003 byla uspořádána první konference International Chick Meeting v Cambridge ve Velké Británii, která během dalších let značně pozvedla spolupráci kuřecích biologů. Zde byl veřejně oznámen počátek velkého projektu sekvenace kompletního kuřecího genomu. V březnu 2004 zveřejnil NHGRI první verzi kuřecího genomu v americké databázi GeneBank a později v evropské EMBL-Bank a japonské DDBJ (News release archives, NIH), v prosinci pak vyšel oficiální článek týkající se anotované sekvence v časopisu Nature (Wallis *et al.*, 2004).

Latinský název *Gallus gallus domesticus* shrnuje všechna plemena domácích slepic, jejichž původ se odvozuje především od jávského poddruhu *Gallus gallus bankiva* (kur bankivský) často s příměsí dalších poddruhů (Jiří Hejnar, ústní sdělení). Pro sekvenaci byl zvolen původní druh *Gallus gallus* (angl. red jungle fowl), který se v Asii dodnes vyskytuje i ve volné přírodě. Evoluční vývoj kuřecího genomu probíhá nezávisle na savcím zhruba

310 milionů let. Kuřecí karyotyp ( $2n=78$ ) sestává z 38 autozomů, 9 makrochromozomů a 31 mikrochromozomů, přičemž mikrochromozomy obsahují nejméně dvakrát více genů než makrochromozomy, a jednoho páru pohlavních chromozomů W a Z, přičemž pohlaví je určeno odlišně než u člověka, samice je heterogametické pohlaví WZ a samec homogametické ZZ (Burt, 2004). Genom byl osekvenován metodou “shotgun” doplněnou fosmidy a koncovými sekvencemi BAC (BAC-ends). Metoda “shotgun” využívá velké náhodně našťípané fragmenty, genom tedy musí být sekvenován několikrát, aby byly dostatečně velké přesahy pro následné poskládání sekvence ve správném směru a pořadí. V případě kuřecího genomu byla sekvence poskládána z 6,6násobného pokrytí.

Kuřecí genom má v haploidním stavu  $1,2 \times 10^9$  párů bazí (bp), což je kolem 40 % lidského nebo myšího genomu. Předpokládaný počet genů (20 – 23 tisíc) je však srovnatelný s počtem genů některých savců, kuřecí genom je tedy ve srovnání s lidským značně zhuštěný a kompaktní. V genomu se vyskytuje mnohem méně repetitivních sekvencí, pseudogenů a duplikací segmentů. V kuřecím genomu bylo identifikováno 571 genů pro ncRNA, struktura a rozložení těchto genů poukazuje na možnost, že se vyvíjely jiným způsobem než u člověka. Kuřecí genom obsahuje ve srovnání se savci velmi málo retropozonů LINE a žádné aktivní SINE. Ze srovnání kuřecí a lidské sekvence vyplývá, že minimálně 70 megabází je velmi pravděpodobně funkční v obou druzích (Wallis *et al.*, 2004).

Výsledky z rozsáhlé analýzy sekvence kuřecího genomu poukazují i na některé zajímavosti. Například jen dvě kuřecí proteinové rodiny chybí v lidském genomu. Podle očekávání u ptáků nenajdeme geny pro mléčné proteiny, vlasový keratin nebo sklovinu, oproti tomu jejich genom kóduje geny pro skořápku nebo peří. Překvapivě mají zhruba stejně genů pro čichové receptory jako člověk, ale člověk disponuje mnohem větší paletou receptorů chuťových (Wallis *et al.*, 2004).

S neustálým rozvojem na poli sekvenace se kuřecí sekvence dále zdokonaluje. V roce 2017 byla znovu sestavena a doplněna kombinací více sekvenačních metod včetně sekvenační technologie využívající jedné dlouhé molekuly, sekvenování za pomoci plazmidů BAC a fyzické mapy sestavené na základě vzdálenosti fragmentů (Warren *et al.*, 2017). Vedlejším projektem sekvenace celého genomu bylo vytvoření rozsáhlé mapy genetických variací domestikovaných slepic pro tři rozšířená plemena, broiler z Velké Británie, plemeno nosnic ze Švédska a Silkie Fowl (hedvábnička) z Číny. Vědci analyzovali kolem 2 milionů genetických variací, převážně SNP. Data jsou přístupná v databázi GenBank (Wong *et al.*, 2004).

### 2.1.3 Experimentální chovy slepic v Čechách

Detašované pracoviště ÚMG, v. v. i v Kolči spravuje unikátní chov inbredních slepic. Tento systém má dodnes široké využití pro studium nádorů, virů a imunitních odpovědí. V současné době jsou tyto slepice v laboratořích ÚMG využívány např. pro studium retrovirových receptorů, diverzifikace povrchových receptorů, adaptace virů či společné evoluce hostitele a viru. Základ tohoto chovu položil právě Milan Hašek v 60. letech 20. století, když do Čech přivezl inbrední slepice plemene White Leghorn z chovatelské stanice Northern Breeding Station, Reaseheath. Tyto slepice byly již po desítky generací inbredně kříženy za účelem segregace genů pro antigeny červených krvinek (Gilmour, 1959). Dalším přesně definovaným křížením, které probíhá už přes půl století, byly vytvořeny vysoce definované linie. Dnes genetický zdroj čítá 20 inbredních linií a 3 dobře definované linie outbrední, které systém doplňují. Například inbrední linie C je chována v 16 kongenních liniích se stejným genetickým pozadím a liší se pouze v haplotypech MHC. U inbredních linií jsou dobře definované i další znaky, jako rezistence a senzitivita k onemocněním ALV či Markovou chorobou, endogenní proviry, genetická dispozice pro barvu peří a další. Výroční zpráva Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů hospodářských zvířat a dalších živočichů využívaných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství za rok 2008 podrobně shrnuje současný stav geneticky definovaných linií slepic v ČR (viz Příloha 1).

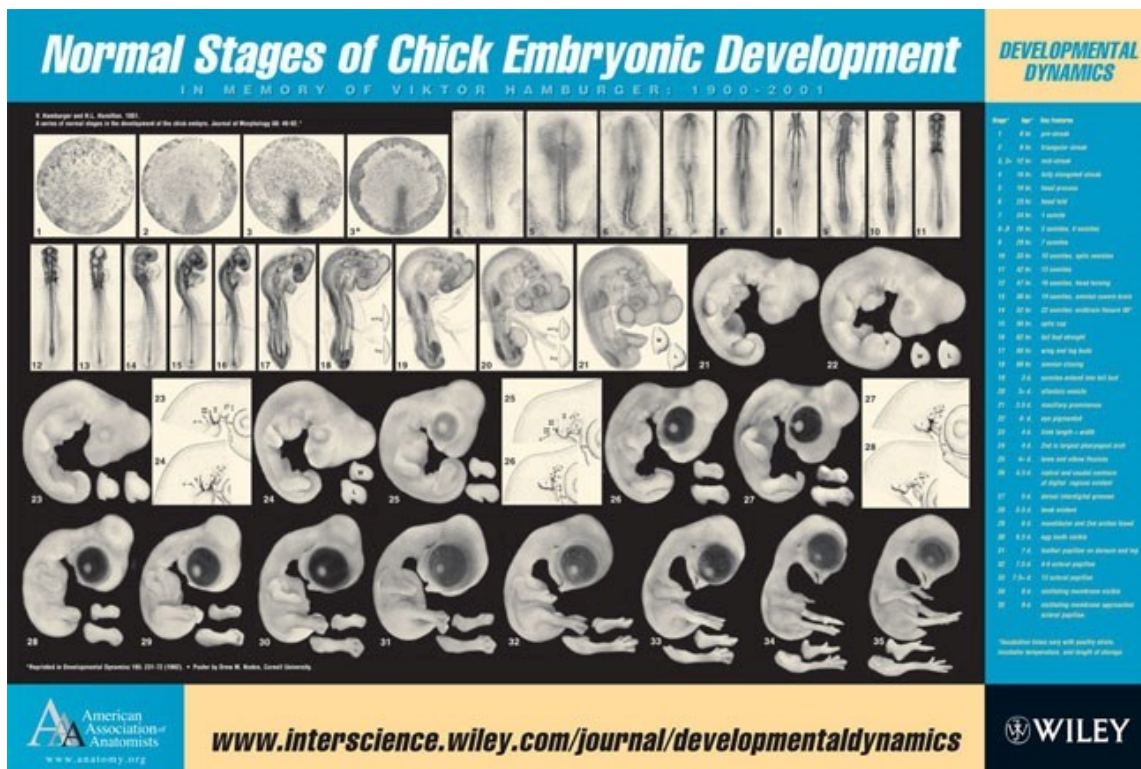
### 2.1.4 Kuře a lidská onemocnění

Některé zákonitosti jsou obecné a jiné druhově specifické. Mohlo by se zdát, že studie na ptačím modelu nemají dostatečnou vypovídací hodnotu při srovnání s člověkem, ale ze zkušenosti vyplývá, že mnohé principy jsou shodné a u některých takových je kuřecí model nenahraditelný. Jmenujme například využívání slepic jako přirozeného modelu lidského ovariálního karcinomu. Bylo zjištěno, že slepice vytvářejí s velmi vysokou incidencí kolem 60% přirozeně mezi 2-5 rokem věku rakovinu vaječníku histologicky i molekulárně velmi podobnou lidské (Hawkrigde, 2014). Kuřecí model se zdá být vhodným nástrojem i v případě lidské myeloidní leukémie, kde bylo prokázáno, že některé principy např. způsob pronikání nezralých monoblastů z kostní dřeně do periferní krve jsou stejné jak u kuřete, tak u člověka (Dvorakova *et al.*, 2013).

## 2.2 Kuřecí embryo

Kuřecí embryo je unikátní model hned v několika aspektech. Jeho největší výhodou je jeho nezávislost na matce. Embryo se vyvíjí rozprostřené na žloutkové kouli, žloutek se díky rozložení hustoty otáčí vždy tak, že embryo leží nahoře, takže je po otevření vejce dobře přístupné. Časné embryo je poměrně velké, mnohé struktury lze pozorovat pouhým okem. Cévy jsou během vývoje ve vejci rozprostřeny pod skořápkou, skořáčku je možné prosvítit a do vizualizovaných cév injikovat experimentální látky bez nutnosti zásahu do embrya. Prosvěcování vejce také umožňuje snadné ověření, jestli je embryo ve vejci živé. Embryo se líhne po 21 dnech vývoje a i nadále je nezávislé na matce. Jedna matka teoreticky dokáže zplodit stovky potomků ročně. Velkou nevýhodou kuřecího embrya je fakt, že jeho vývoj začíná už ve vaječniku a vejcovodu slepice, embryo ve sneseném vejci má již několik desítek tisíc buněk. Toto je také hlavní limitující faktor tvorby transgeneze u kuřat.

Nejběžněji používaný systém popisující stádia vývoje kuřecího embrya je tabulka stádií podle Hamburgera a Hamiltona (Hamburger a Hamilton, 1951; Hamburger a Hamilton, 1992). Vývoj embrya je rozdělen do 46 stádií HH1-HH46 (obrázek 1). Snesená vejce se v běžné praxi zchlazují na 12°C a takto se mohou přechovávat několik dní, což umožňuje pohodlnější časování experimentů. Stádia HH popisují vývoj podle počtu hodin inkubace po nasazení zchlazených vajec do 38°C. U každého stádia je popsán počet somitů a nově vznikající embryonální struktury. Jiné běžné označování stáří embrya je E pro počet dnů embryonálního vývoje, například E3 je třetí den embryonálního vývoje, E 4,5 jsou čtyři a půl dne vývoje atd.



Obr. 1 - Ukázka tabulky normálních stádií vývoje kuřecího embrya podle Hamburgera a Hamiltona. Vydáno jako plakát k výročí Viktora Hamburgera časopisem *Developmental Dynamics*.

### 2.2.1 Embryonální vývoj

Embryonální vývoj probíhá v závislosti na pohybu buněk, který je řízen jak vnitřní determinací, tak v závislosti na gradientech signálů mezi různými buňkami. Již ve 20. letech 20. století byly dráhy migrujících buněk vizualizovány a popsány v rozsáhlé studii založené na stereomikroskopických časosběrných “time-lapse” experimentech *in vivo* a *ex vivo*, které přinesly vzhled do celé řady procesů ve vyvíjejícím se kuřecím embryu (Graeper, 1929).

Vývoj kuřecího embrya po oplození probíhá již ve vejcovodu slepice ještě předtím, než je žloutek obalen bílkem a skořápkou. Po oplození se na zárodečném terčíku (angl. germinal disc) vytvoří blastoderm. Mezi blastodermem a žloutkem postupně vznikne subgerminální dutina. Zhruba ve stejné době se vytvoří jednovrstevná *area pellucida*, ze které se vyvine vlastní embryo, a *area opaca*. V místě, kde se obě oblasti stýkají, se nachází tenká vrstva buněk, tzv. marginální zóna. Blastoderm sestává v době snesení vejce ze zhruba 20000 buněk. Buňky na povrchu *area pellucida* tvoří epiblast a buňky, které migrovaly do subgerminální dutiny, začínají tvořit primární hypoblast, ke kterému se připojí buňky migrující z marginální zóny, a vytvoří sekundární hypoblast. Primární

a sekundární hypoblast je spojen v marginální zóně a mezi nimi vzniká prostor, který se nazývá *blastocoel*. Všechny tři zárodečné listy se budou vyvíjet pouze z epiblastu, zatímco z hypoblastu se vyvinou membrány a obaly vč. žloutkového vaku. Během gastrulace se vyvíjí primitivní proužek (angl. primitive streak). Primitivní proužek se nejprve prodlužuje směrem k budoucí hlavě a postupně zabere délku asi tři čtvrtin *arey pellucidy*, čímž vznikne osa embrya. Uprostřed primitivního proužku se vytvoří podélná prohlubeň, tzv. primitivní drážka (angl. primitive groove). Na anteriorním konci primitivního proužku vznikne Hensenův uzel, ztlustění s prohlubní uprostřed. Skrz Hensenův uzel a primitivní drážku můžou putovat buňky epiblastu do blastocoelu. Buňky, které se vydají na cestu, nejprve podstupují epitelo-mezenchymální přechod (EMT). Z buněk putujících skrz Hensenův uzel se vyvíjí prvostřevo, hlavový mezoderm a notochord. Buňky naputované skrz primitivní drážku dávají vzniknout většině endodermálních a mezodermálních tkání. Putující buňky postupně vytlačí hypoblast do anteriorní oblasti *arey pellucidy*, čímž vznikne srpkovitá zárodečná oblast (angl. germinal crescent), která obsahuje pohlavní zárodečné buňky. Tyto buňky později putují krevním řečištěm do gonád. Postupný tlak migrujících buněk posunuje středovou oblast epiblastu anteriorně a začnou se z něj tvořit hlavové struktury rostrálně od Hensenova uzlu. Zadní mozek a trup se pak vytvoří v úrovni Hensenova uzlu a kaudálně od něj. V další fázi gastrulace začne primitivní proužek postupně ustupovat. Hensenův uzel se posunuje posteriorně a zanechává za sebou dorzální osu embrya a notochord. Notochord začíná v úrovni budoucího středního mozku. Anteriorní část notochordu je tvořena buňkami naputovanými skrz Hensenův uzel, od 17. somitu pochází z mezodermálních buněk naputovaných skrz primitivní drážku. Tato část tvoří ocas. Z buněk Hensenova uzlu se nakonec vytvoří anální otvor. Toto směřování způsobuje, že hlavová část embrya je po několik dnů vyvinutější. Zatímco koncové části teprve procházejí gastrulací, v hlavové části už probíhá organogeneze. Zdrojem informací v této kapitole je publikace *Developmental biology* (S. F. Gilbert, 2000).

### **2.2.2 Organogeneze s přispěním neurální lišty (NL)**

Neurální trubice (NT) se postupně uzavírá již od stádia HH6-7 v hlavové části a uzavírání postupuje jako zip nebo ještě spíše jako zapínání na knoflíky (Pyrgaki *et al.*, 2010). Tvoří se nejprve body spojení a trubice se postupně uzavírá mezi nimi, a to až do stádia HH18, kdy je trubice úplně uzavřena (Van Straaten *et al.*, 1996). Po obou

stranách NT se vytvářejí somity (S1 až S44), což jsou segmentálně se opakující mezodermální útvary, které vznikají anterioposteriorně podél hlavní embryonální osy. Jejich tvorbě předchází oscilující genová exprese (Palmeirim *et al.*, 1997; Pourquie, 2004). Ze somitů se vyvíjí pokožka, kosterní svalstvo, chrupavky, šlachy a obratle. Somity také determinují cestu axonů míšních nervů migrujících buněk neurální lišty (Keynes a Stern, 1984; Kuan *et al.*, 2004).

Buňky NL přispívají i k vývoji srdce. Na úrovni 1. – 3. somitu putují do srdce a účastní se tvorby aortopulmonárního septa (Kirby *et al.*, 1983). Srdce vzniká jako jeden z prvních funkčních orgánů. Ve stádiu HH12 u embrya najdeme rovné trubicovité srdce, které již začíná tepat, dále prochází morfologickými a funkčními změnami a ve stádiu HH35 (E9) už embryo má plně funkční čtyřkomorové srdce (Al Naieb *et al.*, 2013). V okolí embrya se na žlutkovém vaku vytváří krevní ostrůvky, první místo, kde se objevují krevní buňky (Ferkowicz a Yoder, 2005) z nich se vyvine extraembryonální oběh, teprve později se vyvíjí intraembryonální krevní oběh, přičemž jako první se vyvíjí cévy spojené se srdcem.

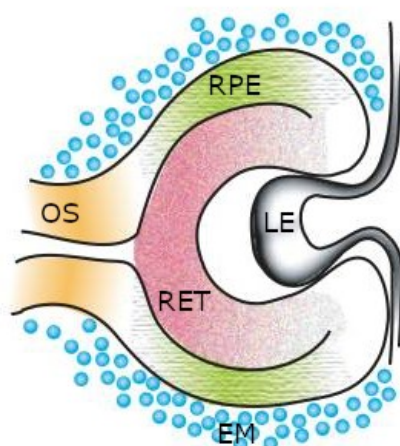
Spolu se srdcem se vyvíjí i intestinální trakt. Buňky NL přispívají také k jeho vývoji, migrují do předního střeva a vznikající trávicí trubice a diferencují v enterické neurony (Yntema a Hammond, 1954; Le Douarin a Teillet, 1973; Newgreen *et al.*, 1980).

Kuře se líhne po 21 dnech vývoje ve vejci, teprve krátce před vylíhnutím se zbytek žlutkového vaku vnoří do břišní dutiny, a dojde k jejímu uzavření. Zbytek žloutku slouží k jeho výživě v prvních dnech po vylíhnutí. Podrobný vývoj kuřecího embrya je popsán v knižní publikaci Atlas of Chick Development (Bellairs a Osmond, 2014).

### 2.2.3 Embryonální oko

Vývoj embryonálního oka u kuřete začíná v HH11, kdy se v základu zaškrtní optický váček. Optické váčky vyrůstají z předního mozku a jsou připojeny tzv. optickou stopkou. Ve stádiu HH12 jsou již optické váčky a stopky jednoznačně definovány. Ke vchlípení optického váčku dochází ve stádiu HH14. Vchlípí se i zevní vrstva ektodermu, která ho překrývá, a dojde k vytvoření tzv. optického pohárku a čočky (obrázek 2). V dalších stádiích se čočka odloučí od svrchního ektodermu a v optickém pohárku se vytvoří retina a pigmentovaný epitel (Hilfer, 1983). Retinální pigmentovaný epitel (RPE) je vrstva pigmentových buněk naputovaných z NL, jejich hlavním transkripčním faktorem je Mitf. Vývoj RPE a retiny je podrobně popsán v přehledném článku (Fuhrmann, 2010).





**Obr. 2 - Schéma vyvíjejícího se embryonálního oka**

LE- ektoderm čočky, RET- retina, RPE- retinální pigmentovaný epitel, OS- optická stopka, EM- extraokulární mezenchym. Obrázek převzat z článku (Fuhrmann, 2010) a upraven.

#### 2.2.4 Indukce čočky

Indukce čočky je komplexní proces probíhající v embryonálním vývoji, který představuje klasický model pro výzkum specifikace buňky, regulace genové exprese a role transkripčních faktorů v této regulaci (Cvekl a Ashery-Padan, 2014). Čočka se vyvíjí z multipotentního preplakoidálního ektodermu (Bailey *et al.*, 2006; Gunhaga, 2011), pro jehož buněčnou specifikaci jsou zásadní DNA-vazebné faktory Pax6, Six3 a Sox2, a z tranzientní populace buněk tzv. presumptivního ektodermu čočky. Pax6 je zásadním regulátorem ve vývoji čočky. Jeho funkce je silně závislá na hladině jeho exprese (Hill *et al.*, 1991), která podléhá komplexní regulaci. Role Pax6 je již poměrně dobře známá, mnohem méně prostudované jsou jeho „upstream“ regulační faktory a cis-regulační elementy, které řídí expresi Pax6 v ektodermu čočky. Prvním prokázaným regulátorem exprese Pax6 byl ektodermální enhancer (EE) asi 4kb „upstream“ od jeho promotoru (S. C. Williams *et al.*, 1998; Kammandel *et al.*, 1999). S EE interagují homeoproteiny Meis1 a Meis2, které jsou považovány za zásadní "upstream" regulátory genu Pax6 v morfogenezi čočky a Prep1 (Rowan *et al.*, 2010), který se také váže na EE a řídí expresi Pax6 a její časování. Přesto, že biochemické a transgenní reportérové studie prokázaly vazebná místa pro Meis1/2 a Prep1 v EE genu *pax6* i funkci Prep1 v expresi Pax6, myši, které postrádají geny Meis1 nebo Meis2 nebo EE, vykazují překvapivě mírný fenotyp u oka v plakoidálním stádiu vývoje čočky (Hisa *et al.*, 2004).

### 2.2.5 Retina

Retina se vyvíjí po vytvoření optického pohárku na vnitřní straně oka (obrázek 2). MAP-kinázová signalizace Fgf je hlavní dráhou ve vývoji retiny i RPE a je spjata s expresí Fgf1 a Fgf2, které jsou silně exprimovány v ektodermu čočky. Pokud je u kuřete povrchový ektoderm odstraněn, dochází ke změnám v expresi markerů a k poruchám ve vývoji oka (Fuhrmann, 2010). Dědičná onemocnění u člověka spojená s degenerací retiny jsou souhrnně nazývána *retinitis pigmentosa* (RP), onemocnění způsobuje šeroslepost a výpadky zorného pole, tzv tunelové vidění až úplnou slepotu (Hartong *et al.*, 2006). Mutace, které onemocnění způsobují, bývají nejčastější u genů exprimovaných ve fotoreceptorových buňkách. K autozomálně dominantním formám RP se vážou mutace v několika genech, které se přímo účastní sestřihu pre-mRNA (Ruzickova a Stanek, 2017). Produkty těchto genů jsou součástí spliceozomálních ribonukleoproteinů snRNP. Jedním z těchto proteinů je hPrp31. Mutace AD29 (Ala216Pro) v tomto genu je spojena s RP typu 11. Mutace destabilizuje proteinovou strukturu hPrp31, čímž zeslabuje interakci proteinu s vazebnými partnery snRNP a vede k jeho rychlé degradaci. Tato zjištění indikují, že mutace AD29 je přinejmenším částečnou příčinou onemocnění RP (Huranova *et al.*, 2009).

### 2.2.6 Kultivace kuřecího embrya

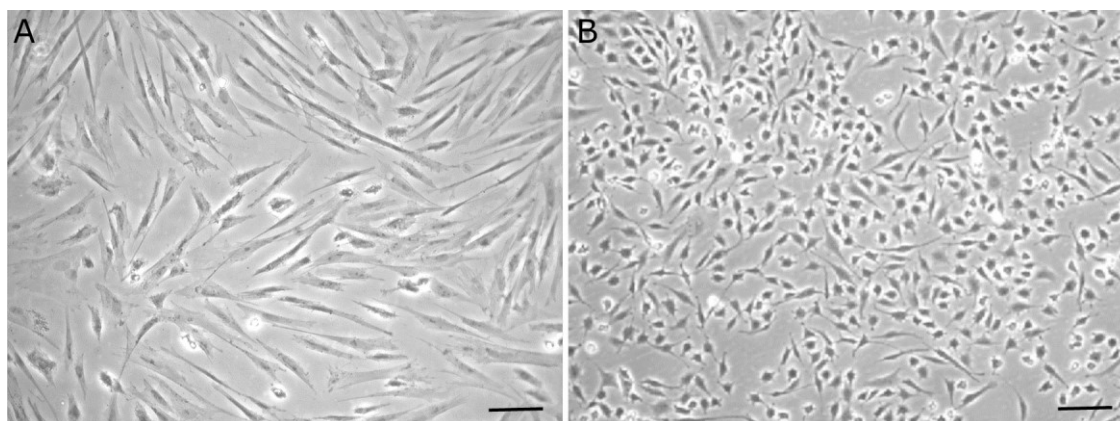
Existují různé modifikace metod, jak kultivovat kuřecí embryo po experimentálním zásahu, v podstatě jsou však jen tyto možnosti: kultivace ve skořápce, kultivace v náhradním obalu a kultivace na živné půdě. Náhradním obalem je nejčasněji průhledná skleněná (Dunn a Boone, 1977; Dunn *et al.*, 1981) nebo plastová miska přiměřené velikosti (Cloney a Franz-Odenaal, 2015), někdy je obsah vejce umístěn do náhradní skořápky (Borwompinyo *et al.*, 2005) kachní, husí i krůtí. Kultivace na živné půdě v Petriho misce (Auerbach *et al.*, 1974) usnadňuje pozorování embrya pod mikroskopem, což je u embrya ve skořápce technicky komplikované, ve vhodných podmínkách je embrya možné kultivovat do pozdních stádií, ale není možné je líhnout. Embrya zpracovaná *in ovo* a embrya přesunutá do náhradních obalů líhnout lze, vyšší úspěšnost líhnutí je obecně u embryí v jejich původní skořápce. Úspěšnost líhnutí ovlivňuje mnoho faktorů, v největší míře samozřejmě náročnost zásahu do embrya, dále způsob, jakým bylo vejce otevřeno, resp. umístění a velikost okénka ve skořápce, pozice vejce při inkubaci atd. Podle

zkušeností některých výzkumníků může mít vliv i výrobní značka fólie, kterou bylo okénko ve skořápce znovu uzavřeno (Borwompinyo *et al.*, 2005).

K vyjmutí mladého embrya z vejce se běžně používá kroužek vystřižený z filtračního papíru, který se přisaje na vitelinní membránu kolem embrya, embryo se i s filtračním papírem obstříhne a poměrně snadno vyndá pinzetami, opláchne a vysadí na vhodnou živnou půdu (Flamme *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 2001). Podrobnosti o metodách kultivace kuřecích embryí lze nalézt v odborných knižních publikacích (Packard *et al.*, 2000; Streit, 2008).

### 2.2.7 Embryonální tkáňové kultury

Nejběžnější buněčnou kulturou získávanou z kuřecího embrya jsou kuřecí embryonální fibroblasty (CEF) (obrázek 3A). Zdrojem kultury je tkáň embrya E8-10 zbaveného hlavy, končetin a vnitřností, rozvolněná trypsinem na jednotlivé buňky a sklizená po centrifugaci. Buňky v suspenzi jsou vysazovány do média s FBS a během několika hodin adherují. Takto připravené kultury lze mnohokrát pasážovat. Senescentní kultura sestává z velkých vakuolarizovaných buněk. V několika případech u těchto buněk byla popsána spontánní imortalizace, jednou z takto odvozených kultur je DF-1 (obrázek 3B) (Himly *et al.*, 1998).



**Obr. 3 - Buněčné kultury odvozené od kuřecího embrya**

(A) Mladá kultura kuřecích embryonálních fibroblastů. (B) Kultura imortalizovaných buněk DF1. Úsečka 50  $\mu\text{m}$ .

Buněčné kultury lze také získat z tkáňových explantů. Explantem může být v podstatě jakákoli část buněčné tkáně, našim hlavním zájmem byly explanty z neurální trubice (Kulesa a Fraser, 1998). Explant se vyřízne pod binokulární lupou tungstenovou jehlou, což je elektrolyticky nabroušený wolframový drátek, u něhož lze dosáhnout velmi vysoké ostrosti nutné pro jemné mikromanipulace. Podle toho, jaké buňky mají být kultivovány, je nutné načasovat kultivaci embryí. Kultury používané v této práci byly získávány většinou z posledních 4 až 6 somitů a části neurální destičky z embryí ve stádiu HH10-11. Okrajově se tato práce zabývá také explanty z retiny kuřecího embrya (Thangaraj *et al.*, 2015).

### 2.2.8 Použité zobrazovací metody v kuřecím embryu

V této práci jsou zpracovány různé zobrazovací metody. Na základě světelné mikroskopie funguje časosběrná metoda „time-lapse“ (obrázky 11 a 12, Elektronická příloha 1 a 2). Jedná se o snímky embrya nebo buněčné kultury zobrazené světelným mikroskopem či případně binokulární lupou. Stejně pole je snímáno ve stejném nastavení a ve stejných časových intervalech po delší časový úsek. Snímky jsou poté poskládány vhodným software a přehrány jako krátké video. Už ve 20. letech byla použita tato metoda ke zdokumentování vývoje kuřecího embrya (Graeper, 1929).

Nejvíce využívaným nástrojem vizualizace byl pro nás transientně exprimovaný fluorescenční protein, ve většině pokusů se jednalo o GFP, což je zkratka pro zelený fluorescenční protein izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*, který pod modrým světlem emituje zelenou fluorescenci. Jeho nukleotidová sekvence je dlouhá kolem 720 bp. Často je používán v plazmidech jako referenční protein. Dostupných fluorescenčních proteinů je ke stejnému účelu využívána celá paleta, hojně se využívají také červené fluorescenční proteiny, např. mCherry nebo DsRed a další.

Imunofluorescence v této práci využívá barvení buněk NL protilátkou anti-CD57 TB01 proti epitopu HNK-1 (obrázek 20). HNK-1 je karbohydrátový epitop syntetizovaný na glykoproteinech a glykolipidech a je nezbytný pro migraci. Protilátka proti HNK-1 byla poprvé použita ve studii na lidských NK a K buňkách (Abo a Balch, 1981). Velmi specificky barví také buňky NL u kuřecího embrya.

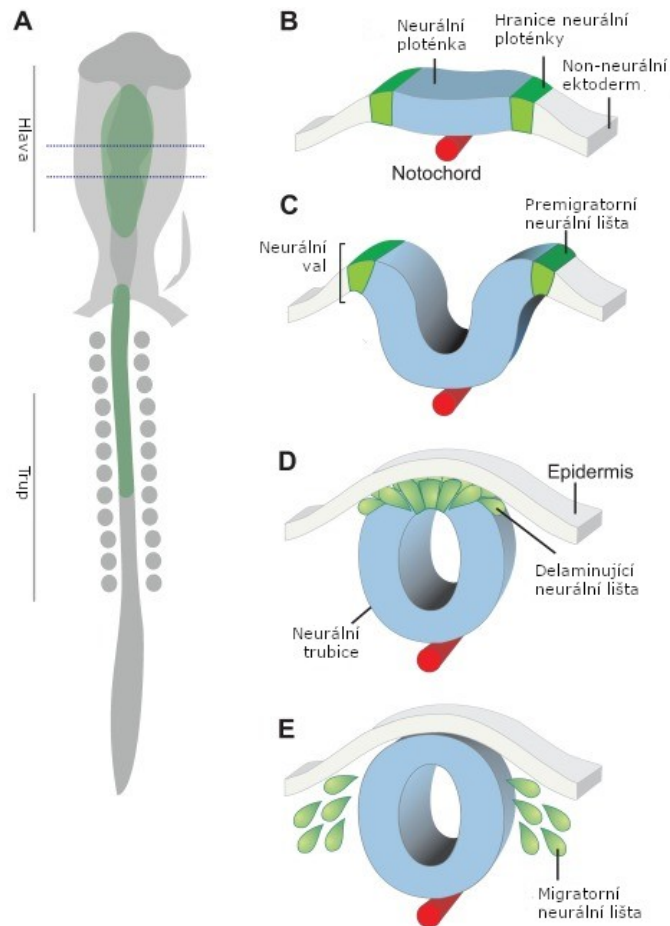
Vizualizaci exprese na úrovni RNA v celém embryu umožňuje metoda WISH (angl. whole-mount *in situ* hybridization) (Barrow, 2019). Navázáním značené RNA sondy na mRNA cílového genu dojde k hybridizaci a vznikne stabilní dvouřetězcová RNA. Sonda

je většinou značena fluorescenčním proteinem. Pro zesílení signálu je proti tomuto proteinu použita protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP). Alkalická fosfatáza změní barvu vhodného substrátu, takže vznikne okem viditelná silně stabilní barevná sloučenina. V našem případě bylo použito modrofialové barvení substrátem BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitrotetrazoliová modř). Existují i substráty jiné barvy a při vhodném navržení experimentu je možné dvojité barvení. Vizualizace exprese dvou genů je také možná kombinací fluorescence pro jeden gen a následné reakce AP se substrátem pro druhý gen.

Běžně používanou technikou pro detekci exprese plasmidů nesoucích reportérový gen je barvení X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), což je substrát  $\beta$ -galaktosidázy (Horwitz *et al.*, 1964). Enzym  $\beta$ -galaktosidáza katalyzuje hydrolýzu  $\beta$ -galaktosidů na monosacharidy zrušením glykosidické vazby, v případě X-gal za vzniku stabilní sytě modrofialové barvy. V našich experimentech byla tato metoda využita pro detekci genové exprese v čočce.

### 2.3 Neurální lišta

Neurální lišta (NL) je tranzientní dynamická struktura ektodermálního původu vyskytující se u obratlovců. Před 150 lety ji popsal Wilhelm His (His, 1868), a to na základě pozorování v kuřecím embryu. Neurální lišta se začíná vyvíjet velmi časně v embryu na rozhraní neurálních a epidermálních částí neurálního valu, buňky valu postupně mění svou vnitřní strukturu a získávají klínovitý tvar, čímž dochází k prohnutí okrajů neurální ploténky a valy se postupně uzavírají, vytvářejí neurální trubici a buňky NL se hromadí v její dorzální části (Colas a Schoenwolf, 2001).



#### Obr. 4 - Neurální lišta

Schématické znázornění kuřecího embrya ve stádiu HH10 (A). Schématické řezy postupně se uzavírající neurální lišty (B, C, D, E). Převzato z přehledného článku (Simoes-Costa a Bronner, 2015).

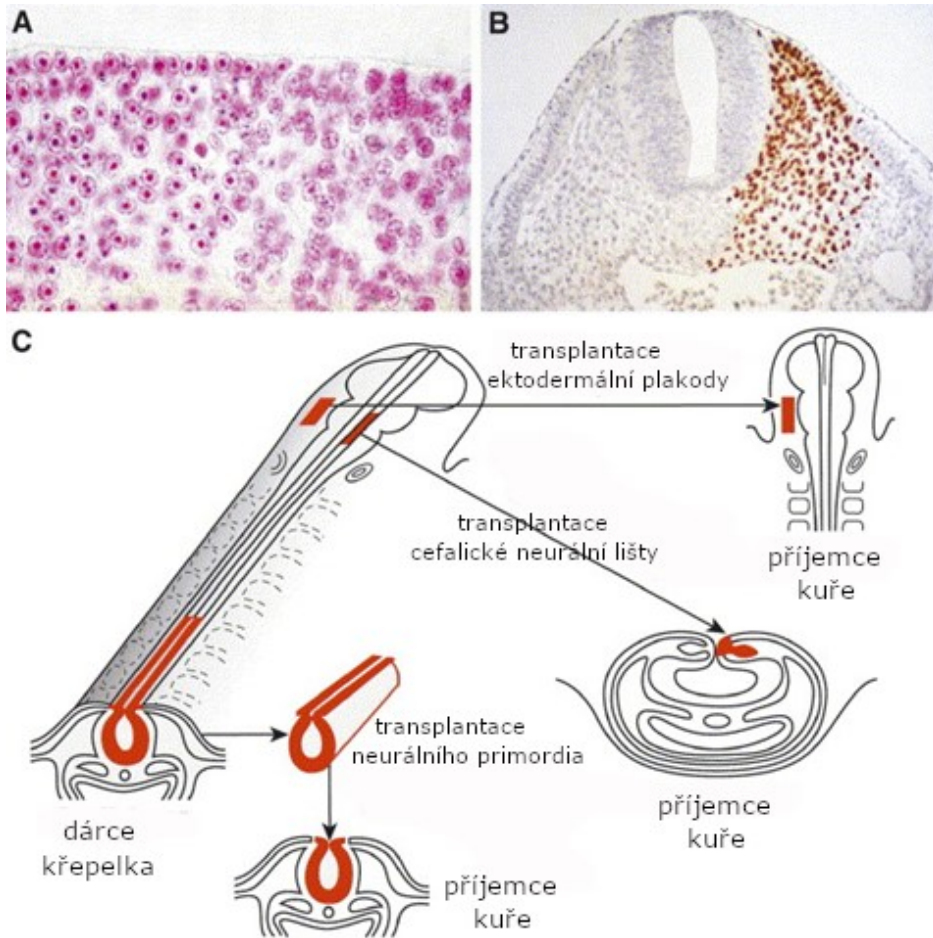
Obecně se předpokládalo, že neurální trubice se uzavírá od střední části neurální ploténky jako zip, z pozorování konfokálním mikroskopem v hlavové části myšího embrya ale vyplývá, že buňky přicházející do kontaktu dramaticky mění tvar a tvoří dlouhé protruze, které podél trubice vytvářejí můstky, a celý proces tak spíše připomíná zapínání na knoflíky (Pyrgaki *et al.*, 2010).

Multipotentní buňky neurální lišty projdou EMT, delaminují a v závislosti na buněčném osudu migrují po předem určených drahách do cílových míst v embryonálním těle, kde diferencují a účastní se vývoje různých tkání. Výjimečnost této struktury vedla některé vědce k tomu, že ji nazvali čtvrtým zárodečným listem (Hall, 2000). NL představuje heterogenní populaci, v níž různé skupiny buněk disponují různým stupněm multipotence a plasticity (Dupin *et al.*, 2000; Le Douarin *et al.*, 2004; Dupin *et al.*, 2007), a tak se stává mimořádným modelem pro studium buněčného osudu, migrace a diferenciace. Jejich další vlastnosti je činí zajímavými i pro onkologické studie. Buňky

NL ve svém vývoji procházejí stejnými fázemi jako metastazující buňky – podstoupí EMT, invadují do tkáně a migrují na velké vzdálenosti (Hanahan a Weinberg, 2011). Principy vzniku a růstu některých nádorů částečně rekapituluje vývoj NL tak, jak by pravděpodobně probíhal za nedostatečně kontrolovaných podmínek (Thiery *et al.*, 2009; Duband, 2010; Kerosuo a Bronner-Fraser, 2012; Lim a Thiery, 2012; Theveneau a Mayor, 2012).

### 2.3.1 Chiméry

Na konci šedesátých let 20. století začala Nicole M. Le Douarin experimentovat s transplantací tkáně křepelčího embrya do embrya kuřecího (Le Douarin, 1969; Le Douarin, 1973; Ayer-Le Lievre a Le Douarin, 1982; Le Douarin *et al.*, 2008). Distribuce heterochromatinu v interfázním jádře křepelčích buněk umožňuje odlišit křepelčí tkáň od kuřecí s pomocí snadného Feulgenova barvení (Le Douarin, 1969). Křepelčí štěpy (angl. graft) jsou také snadno identifikovatelné v kuřecím embryu pomocí barvení s protilátkou QPCN proti křepelčímu jadernému antigenu (Carlson a Carlson, Univerzita v Michiganu). Chiméry vytvořené z embryí v odpovídajícím stádiu prochází normálním embryonálním vývojem, lze transplantovat různé části a je i možné takové jedince líhnout.



### Obr. 5 - Chiméra křepelka-kuře

Feulgenovo barvení zvýrazňuje u křepelčích buněk heterochromatin asociovaný s jadérkem (A), barvení příčného řezu chimérou monoklonální protilátkou proti jadernému křepelčímu antigenu (B), příklady možných transplantací tkáně z křepelčího embrya do kuřecího embrya v odpovídajícím stádiu vývoje (C). Převzato ze souhrnného článku (Le Douarin, 2004). Dospělá chiméra křepelka-kuře (dole). Bílé peří je původem kuřecí, tmavé je z křepelky (Le Douarin, 2018).

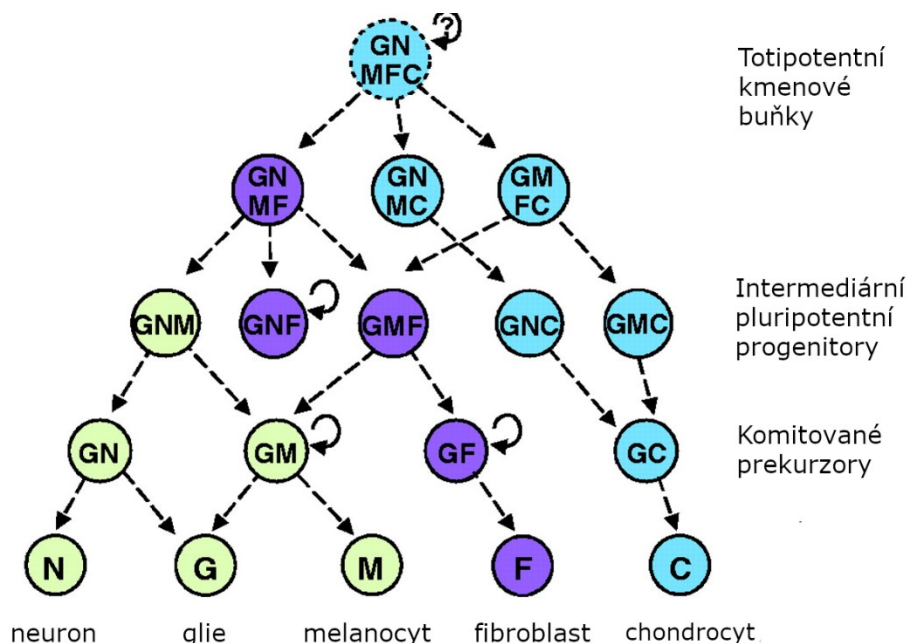


Chiméry se vyvíjejí normálně 5 až 7 týdnů po vylíhnutí, potom se u nich vyvine těžký neurologický syndrom postihující dárcovské tkáně a v pokročilém stádiu dochází k autoimunitnímu ataku hostitelského nervového systému (Kinutani *et al.*, 1986).

Chiméry se staly vynikajícím modelem k poznávání původu a buněčného osudu neurální lišty, díky nim byl objasněn původ mnoha typů buněk a tkání odvozených od NL (Le Douarin, 2004; Le Douarin, 2018).

### **2.3.2 Plasticita a multipotence buněk NL**

Buňky NL diferencují do mnoha buněčných typů včetně periferních neuronů a glií, kraniofaciální kostní tkáně, melanocytů, hladkosvalových buněk, endokrinních buněk, chondrocytů, buněk kostní tkáně, adipocytů dalších (C. Kalcheim, Le Douarin, N. M., 1999; Dupin *et al.*, 2006; Hall, 2008; Le Douarin a Dupin, 2012; Theveneau a Mayor, 2012; Fu *et al.*, 2019). Segregující prekurzory postupně diferencují a ztrácejí svou totipotenci, stávají se komitovanými prekurzory a nakonec diferencují do finální tkáně (obrázek 6). Prekurzory chondrocytů *in vivo* pocházejí pouze z cefalické NL a osidlují faciální oblast (Le Douarin, 2004). Studie *in vitro* popsaly ještě větší potenciál NL buněk, v některých studiích se podařilo vypěstovat chondrocyty i z NL z oblasti trupu a jejich schopnost sebeobnovy (A. M. Cohen a Konigsberg, 1975; Stemple a Anderson, 1992; Dupin *et al.*, 2007) a donedávna se vedla diskuze, zda jsou skutečně buňky NL multipotentní i *in vivo*. Tuto diskuzi ukončila studie, která sledováním jediné buňky *in vivo* na komplexním pozadí geneticky modifikovaných myších embryí, u kterých je možné exprimovat barevné markery v cílených tkáních, prokázala multipotenci většiny buněk NL ve stavu před počátkem migrace i během ní (Baggiolini *et al.*, 2015; Bronner, 2015).



**Obr. 6 – Prekurzory neurální lišty**

Světle modrá: Mesektodermální chondrogenní prekurzory se vyskytují pouze v kraniální NL. Fialová: Prekurzory myofibroblastů (nejsou chondrogenní) vznikají z kraniální NL *in vivo* a *in vitro* a z NL v oblasti trupu *in vitro*. Bílá: Prekurzory neuronů, glií a melanocytů jsou běžné jak v kraniální NL, tak v NL v oblasti trupu. Kruhová šipka: buňky nadané schopností sebeobnovy, kruhová šipka s otazníkem: buňky hypoteticky nadané schopností sebeobnovy. Převzato z (Le Douarin *et al.*, 2004) a upraveno.

### 2.3.3 Původ tkání odvozených od NL

Díky ptačím chimérám byl podrobně zmapován osud buněk postupně migrujících z NL. Z buněk kraniální NL vzniká epitel krevních kapilár, pojiva, kosti a pokožka v hlavové části, branchiální oblouky, plena předního mozku, buňky putující z 1. až 3. somitu tvoří části srdce (Kirby *et al.*, 1985; Kontges a Lumsden, 1996; Etchevers *et al.*, 2001). Mesenchymální deriváty vč. kostní a pojivové tkáně pocházejí pouze z kraniální NL od středního mezimozku po S4 (Le Douarin, 2018). Kostra hlavy u ptáků je trojího původu, pochází z NL, cefalického paraxiálního mezodermu a anteriorního mezodermu rostrálních somitů. Všechny obličejové kosti a chrupavky a část lebky jsou odvozené od NL. Posteriovní a okcipitální kostra je povětšinou ektodermálního původu (Couly *et al.*, 1993). Z dalších oblastí NL se vyvíjejí součásti PNS, a to senzorické, sympatické, parasympatické (ciliární ganglia) a střevní ganglia. Tkáně sympatických a parasympatických střevních ganglií pochází z tzv. vagální oblasti NL od 1. do 7. somitu korespondující s oblastí bloudivého nervu, která zásobuje buňkami NL celé střevo a později dává vzniknout dvěma střevním plexům (Le Douarin a Teillet, 1971). Ze stejné oblasti NL vycházejí i pre- a post-gangliové neurony střevního nervového systému. Buňky NL jsou

schopny migrovat podél axonů. Tyto buňky mohou diferencovat v melanocyty (Adameyko *et al.*, 2009) nebo tvoří část střevních neuronů (Espinosa-Medina *et al.*, 2017). Endokrinní buňky (buňky dřeně nadledvin) vznikají z NL v oblasti trupu mezi 18 a 24 somitem. Po celé délce dává NL vzniknout pigmentovým buňkám (Le Douarin a Dupin, 2016; Le Douarin a Dupin, 2018). Z buněk NL dále vznikají méně známé struktury jako karotidové tělísko a buňky ultimobranchiálního tělíska, které produkují kalcitonin (Le Douarin a Le Lievre, 1970; Le Douarin a Teillet, 1971; Le Douarin *et al.*, 1972; Pearse *et al.*, 1973; Le Douarin *et al.*, 1974; Polak *et al.*, 1974; Le Douarin, 2018).

### 2.3.4 Migrace buněk NL

NL v oblasti trupu putuje dvěma hlavními směry (Kelsh *et al.*, 2009; Kuo a Erickson, 2010). Dorzolaterální cesta je převážně cestou melanocytů, ventrálně putující buňky tvoří PNS v trupu. Buněčné typy vznikající podél axiální osy se mění v závislosti na místě, ze kterého pocházejí (Ayer-Le Lievre a Le Douarin, 1982). Už v šedesátých letech bylo díky transplantačním pokusům zjištěno, že z NL oblasti trupu migrují buňky dvěma hlavními směry. Jedna dráha vede ventrálně a dává vzniknout spinálním a sympatickým gangliím, druhá vede dorzolaterálně a po ní putují budoucí melanocyty. Buňky přispívají ke tkáním odvozeným od NL v oblasti trupu postupně od nejvíce ventrálních k dorzálním, přičemž buňky, které NL opustí jako první, přispívají k těm nejvíce ventrálním (Weston a Butler, 1966).

V tzv. první vlně migrace putují buňky z rostrální poloviny somitů, kde je pro ně okolní mezenchym prostupný, ventrální cestou skrz sklerotom a diferencují v neurony a glie. Budoucí pigmentové buňky putují z NL po celé její délce v tzv. druhé vlně migrace, během první vlny se zdržují v dorzomediální části somitů. Poté, co delaminují buňky první vlny, zhruba ve stádiu, kdy embryo dosáhne 18 somitů, se změní genová exprese v ektodermu v dorzální části neurální trubice, a ten se stane propustným pro buňky NL. Tyto buňky pak migrují dorzolaterálně mezi ektodermem a somity do vyvíjející se pokožky po celé délce neurální trubice, osidlují celý povrch těla a diferencují na kožní melanocyty (C. Kalcheim a Teillet, 1989; Erickson a Goins, 1995).

Ne všechny buňky NL mohou diferencovat ve všechny typy tkání. Jejich možnosti jsou závislé na části těla, ze které pocházejí, tyto části lze rozdělit na oblast kraniální, oblast vagální, oblast trupu a oblast sakrální (Le Douarin *et al.*, 1993). Podle studie (Catala *et al.*,

2000) je např. vývojový potenciál nejvíce kaudální části NL omezen pouze na melanocyty a glie.

Cílem našeho zájmu byla zejména migrace v oblasti trupu. Migrace v oblasti trupu je detailně zpracována v recentní studii s využitím barvení protilátkou proti HNK-1 v různých stádiích (Giovannone *et al.*, 2015).

### 2.3.5 Genová exprese v NL

Vývoj NL podléhá rozsáhlé regulační síti. Hlavními signálními dráhami indukujícími vývoj NL jsou signální molekuly Wnt, BMP, Fgf, kyselina retinová a Notch, které jsou produkovány ektodermem, neurálním epitelem a okolním mezodermem (Milet a Monsoro-Burq, 2012; Prasad *et al.*, 2012). Na rozhraní neurální ploténky dochází k expresi genů, z nichž některé podléhají těmto dráhám a souhrnně se nazývají specififikátory rozhraní neurální ploténky (angl. neural plate border specifiers) a řídí expresi markerů neurální lišty. Mezi tyto geny patří např. Pax3 a Msx1/2 (Bang *et al.*, 1999). Populace prekurzorů NL exprimuje charakteristickou skupinu transkripčních faktorů, jako jsou *snail2 (slug)*, *sox10*, *foxD3* a *sox9*, které jsou nazývány genovými specififikátory neurální lišty (angl. neural crest specifiers) a podléhají regulaci výše jmenovaných signálních drah (Cheung *et al.*, 2005; Theveneau a Mayor, 2012; McKeown *et al.*, 2013).

Specifikaci jednotlivých typů tkání provází nesmírně spleť a komplexní genová regulace, existuje mnoho přehledných článků zabývajících se genovou expresí v NL, např. (Le Douarin *et al.*, 1994; Meulemans a Bronner-Fraser, 2004; Kelsh, 2006; Mort *et al.*, 2015; Simoes-Costa a Bronner, 2015) a další.

Nejzajímavějším aspektem regulace NL vzhledem k naší práci byl vývoj melanocytární linie, který je ovlivněn primárně signálními dráhami Wnt/BMP. *In vitro* studie prokázaly vliv BMP-4 na zvýšení počtu gliálních a neurálních buněk na úkor melanocytů, naopak vliv Wnt 3a měl opačný efekt, čímž bylo prokázáno, že v ptačích embryích působí tyto dráhy antagonisticky. Exprese BMP-4 v dorzální neurální trubici je přítomna po celou dobu migrace buněk z NL, kromě časového úseku, v němž migrují prekurzory melanocytů (Jin *et al.*, 2001; A. J. Thomas a Erickson, 2008). Melanocyty jsou definovány expresí transkripčních faktorů Sox10 a Pax3/7 a jejich diferenciace je řízena signálními drahami Wnt, endotelinu a c-Kit (Simoes-Costa a Bronner, 2015). Specifikačním markerem melanocytů je Mitf (Hou a Pavan, 2008). Migrující melanocyty nesou receptor ETRB2 pro endotelin-3, který je v této době exprimován epiteliálním

ektodermem a ten se tak stává pro ně propustným (Lecoin *et al.*, 1998). Naopak důležitým genem reprimujícím melanogenezi v kuřecím embryu je *foxD3* (Kos *et al.*, 2001).

### 2.3.6 Melanocyty

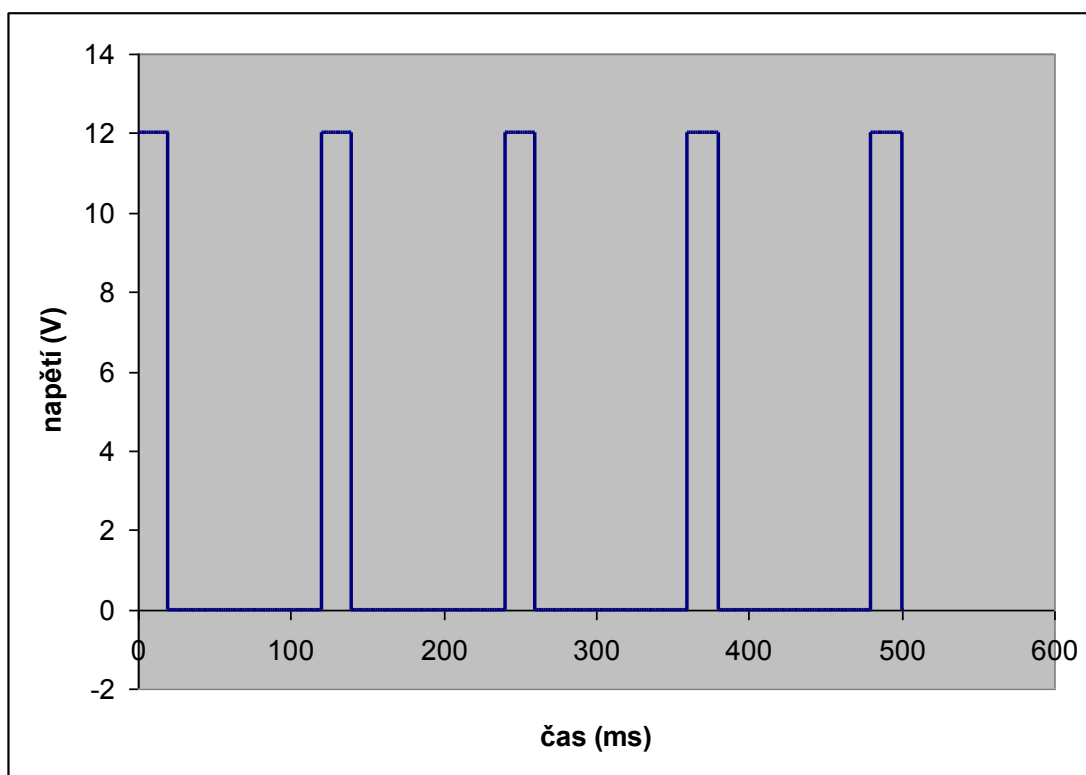
Předmětem studia zásadní části této práce byly právě melanocyty odvezené z NL (obrázek 23). Progenitory melanocytů vznikají po celé délce neurální osy. Z NL pocházejí všechny melanocyty kromě pigmentované retiny a některých pigmentovaných neuronů. Melanocyty pocházející z buněk NL se nacházejí zejména v kůži, ale u některých druhů slepic také v peritoneálním epitelu a dále ve vnitřním uchu, kde hrají důležitou roli ve funkci sluchu (C. Kalchheim, Le Douarin, N. M., 1999). Odchylky od správného vývoje melanocytů se projevují jako neurokristopatie a zahrnují například Waardenburgův syndrom, kožní melanom či neurofibromatózu (Bolande, 1997). Znalost molekulárních mechanismů účastnících se určení buněčného osudu melanocytů a dalšího vývoje NL včetně těchto patologických odchylek je zatím značně omezená.

## 2.4 Elektroporace

Elektroporace je účinná metoda transfekce buněk. Umožňuje vstup do buněk molekulám se záporným nábojem, nejčastěji DNA. Elektrické pole vytvoří v buněčné membráně dočasné póry, kterými proud mezi elektrodami vnese nabitě molekuly do buňky ve směru určeném postavením elektrod. Při vhodném nastavení se póry v membráně po odeznění účinků elektrického pole opět uzavřou (Funahashi *et al.*, 1999). Elektroporací lze do buněk vnášet celou škálu molekul bez následného poškození buněk a bez použití jakýchkoli toxických látek.

Vliv elektrického pole vygenerovaného vysokým napětím na buňky byl pozorován už v 60. letech (Sale a Hamilton, 1968). Elektroporace jako taková se začala používat a rozvíjet v Japonsku v 80. a 90. letech (Nakamura a Funahashi, 2013). Zpočátku bylo její využití omezeno na transformaci bakterií a cílené zabíjení či fúzí buněk, protože obecně vysoké napětí eukaryotické buňky zabíjí. Přesto byla postupně vypracována metodika pro elektroporaci chemických látek do tkáně, příkladem je vpravení DNA plazmidu do suspenze myších buněk (Neumann *et al.*, 1982) nebo léčba hepatocelulárního karcinomu u potkanů (Okino a Mohri, 1987). Zásadní pro využití elektroporace u tkání je tzv. „square wave“, u níž nenabývá elektrický proud intenzitu postupně jako vlna, ale

mění se skokově mezi danými hodnotami minima a maxima. Příklad elektroporačního programu využívajícího „square wave“ je uveden v grafu na obrázku 7.



**Obr. 7 - Průběh elektroporačního programu využívajícího „square wave“**

Graf elektroporačního programu, který má 5 pulzů o napětí 12 V, přičemž jeden puls trvá 20 ms s intervalem 100 ms.

Buněčná membrána je v normálním stavu nepropustná pro hydrofilní molekuly, pro transfer mezi cytoplazmou a vnějším prostředím slouží paleta specializovaných kanálů. Vlastní proces tvorby pórů v buněčné membráně způsobený elektrickým polem je závislý na nárůstu transmembránového potenciálu, díky němuž dochází ke tvorbě dočasných propustných struktur tzv. TPS. Po ukončení elektrického pulsu dojde v řádu vteřin či minut k vyrovnání potenciálu a membrány se znovu stanou nepropustnými (Rols, 2006). Pro různé typy buněk je vhodný různě silný puls, záleží i na jeho délce, počtu opakování a délce intervalu mezi jednotlivými pulsy. Délka existence TPS je závislá nejen na elektrickém poli, ale i na teplotě (Weaver, 1995) nebo na velikosti, tvaru a orientaci buňky (Valic *et al.*, 2003; Pucihar *et al.*, 2006). Molekul, které lze do buněk vpravit, je mnoho typů. Malé terapeutické molekuly, často jsou to léky proti rakovině, vstupují prostou difuzí, větší nabitě molekuly jako je DNA pak vstupují složitějším procesem interakcí s destabilizovanou membránou (Escoffre *et al.*, 2008).

### 2.4.1 Elektroporace *in ovo*

Kuřecí embryo *in ovo* je vhodný materiál pro elektroporaci. Vejce lze snadno otevřít, aniž by se embryo porušilo, a je možná následná inkubace, a to až do vylíhnutí. Embryo je velmi dobře přístupné, protože leží v zárodečném terčíku rozprostřeném na žloutkové kouli, která se díky rozložení hustoty žloutku při inkubaci vždy otáčí terčíkem vzhůru. Elektroporace *in ovo*, neviróvá metoda pro misexpresi genů, se ukázala jako velmi praktická a účinná (Funahashi *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000; Vilquin *et al.*, 2001; Katahira a Nakamura, 2003; Krull, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Hirst a Marcelle, 2015). Nově uzpůsobená metoda umožňovala vnést a exprimovat gen nebo naopak vnést prostředky k jeho „up-“, či „down-regulaci“ v jasně prostorově definované oblasti v embryu ve vejci v jakémkoli stupni vývoje (Stern, 2005; Hirst a Marcelle, 2015).

Fluorescenční proteiny GFP, eGFP, mCherry, DsRed, YFP a další pomáhají k vizualizaci elektroporované buňky či tkáně a jsou nesený různými plazmidy vhodné zkonstruovanými pro elektroporaci (Yaneza *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2003; Scaal *et al.*, 2004). Výměna promotoru v takovém plazmidu za tkáňově specifický umožní sledovat definovanou podskupinu buněk, případně lze expresi vloženého genu časovat vložím inducibilního elementu např. spouštěného tamoxifenem.

Kromě DNA, proteinů a protilátek se dnes běžně elektroporují *in ovo* další molekuly, většinou takové, které mohou interferovat s genetickou informací buňky: miRNA, siRNA, morfolina či technologie RNAi nebo CRISPR a další (Kos *et al.*, 2003; Pekarík *et al.*, 2003; Chesnutt a Niswander, 2004; Dai *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2006; Eisen a Smith, 2008; Luo *et al.*, 2012; Andermatt a Stoeckli, 2014; Andermatt *et al.*, 2014; Veron *et al.*, 2015; Gandhi *et al.*, 2017; Morin *et al.*, 2017; Moulton, 2017; R. M. Williams *et al.*, 2018; Gammill *et al.*, 2019).

## 2.5 Proteiny Myb

Kapitola byla adaptována z prvoautorského článku autorky (Starostova *et al.*, 2014). Dlouhodobý výzkum v naší laboratoři ukázal, že transkripční regulátory c-Myb a v-Myb (obrázek 8) mají na buňky podobný vliv, jaký je u nich znám v případě buněk krevních. Jsou schopny ovlivňovat komitment a diferenciaci krevních progenitorových a prekursorových buněk, které pomocí aktivace signalizační dráhy SCF/c-kit směřují

do melanocytární linie (Karafiat *et al.*, 2007). Navíc v-Myb transformuje nezralé melanocyty, umožňuje jim růst bez kontaktu s tuhou podložkou a dlouhodobou proliferaci. Oba proteiny také ovlivňují tvorbu buněk NL spuštěním EMT (Karafiat *et al.*, 2005).

### 2.5.1 Rodina Myb

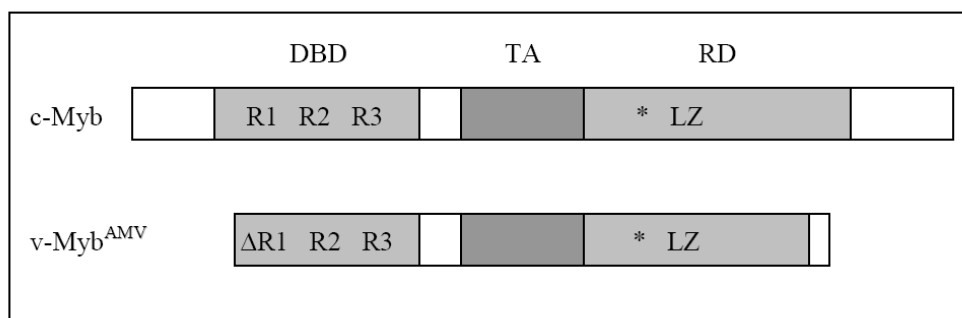
Proteiny sekvenčně příbuzné Myb, zejména proteiny obsahující Myb-doménu (DNA-vazebnou doménu), byly identifikovány v mnoha typech buněk napříč eukaryotickými říšemi. Byly prokázány u rostlin, u kvasinek, bezobratlých i obratlovců včetně člověka (Graf, 1992; Ramachandran *et al.*, 1994; Schiefelbein, 1994). U obratlovců jsou do proteinové rodiny Myb zahrnovány tři sekvenčně a funkčně částečně odlišné členy: c-Myb, A-Myb a B-Myb (Nomura *et al.*, 1988). Všechny tyto proteiny jsou významnými regulátory genové exprese. Jsou lokalizovány v jádře a specificky se vážou na DNA. Mají významnou funkci v buněčné proliferaci a diferenciaci. Jejich nejvíce konzervovanou částí je výše zmíněná DNA-vazebná doména, která je společným prvkem celé proteinové rodiny. Myb proteiny představují již více než třicet let předmět studia mnoha laboratoří po celém světě.

### 2.5.2 Onkoprotein v-Myb

Onkogen *v-myb* (obrázek 8) kóduje transkripční faktor, který je odvozen od buněčného kuřecího protoonkogeny *c-myb* (obrázek 8) (Klempnauer *et al.*, 1982; Klempnauer a Bishop, 1983; Klempnauer *et al.*, 1983). c-Myb je silně exprimován ve většině hematopoetických progenitorových buněk a je esenciální pro vývoj hemopoetického systému. Důležitost role c-Myb byla pozorována u myších embryí s experimentálně inaktivovaným genem *c-myb*. Embrya umírala v patnáctém dnu vývoje na selhání definitivní krvetvorby (Mucenski *et al.*, 1991). Protein c-Myb se uplatňuje i ve vývoji kraniální NL (Betancur *et al.*, 2014). Onkoprotein v-Myb má molekulovou hmotnost 48000 Da. Kódující sekvence *v-myb* je dlouhá 1168 bp, oproti *c-myb* je zkrácena jak na N-konci, tak na C-konci, a obsahuje 11 bodových mutací. Zejména velká delece C-koncové oblasti onkoproteinu v-Myb, která obsahuje mnoho regulačních míst, způsobuje, že se v-Myb vymyká některým buněčným regulačním mechanismům a získává tak oproti c-Myb odlišné vlastnosti vedoucí k nádorové transformaci myeloidních buněk (Lipsick a Wang, 1999). Nadexprese c-Myb může vést k transformaci krevních buněk,



a to pouze *in vitro*, zatímco nadexprese onkogenních forem (v-Myb AMV a v-Myb E26) transformuje krevní buňky *in vivo* i *in vitro*. Buňky transformované v-Myb AMV mají charakter monoblastů, nezralých prekurzorových buněk makrofágové linie. Onkoprotein v-Myb je často využívaným nástrojem pro studium funkcí c-Myb a principů leukemogeneze. Vliv v-Myb na vývoj buněk NL byl studován *in vitro* v naší laboratoři (Karafiat *et al.*, 2005; Karafiat *et al.*, 2007).



**Obr. 8 - Schéma proteinů c-Myb a v-Myb**

DBD – DNA vazebná doména, TA – transaktivační doména, RD – regulační doména, R1, R2, R3 – repetice v DNA vazebné doméně, \* - PEST-like motiv, LZ – leucinový zip; u v-Myb chybí část repetice R1 a RD (převzato z diplomové práce autorky)



### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Experimentální materiál

K pokusům byla používána vejce Brown Leghorn z detašovaného pracoviště ÚMG v Kolči. Vejce byla zchlazena na 12°C a nasazována podle vhodného časového rozvrhu po ohřátí do pokojové teploty. Po dobu experimentu byla vejce inkubována v podélné poloze v 38°C v 70-80% vlhkosti a byla pravidelně otáčena. Tato vejce byla využívána zejména pro elektroporaci *in ovo*, z embryí z těchto vajec byly také získávány buněčné kultury embryonálních fibroblastů (CEF) a embrya pro explantové kultury, mikromanipulace a WISH.

#### 3.2 Získávání embryí pro mikromanipulace a „time-lapse“

Po vhodné dobu inkubované vejce bylo očištěno 70% etanolem, pinzetou bylo proraženo na tupém konci, kde se nachází vzduchová komůrka, a injekční stříkačkou s jehlou bylo odsáto asi 5 ml tekutého bílku. Potom byl malými špičatými nůžkami určenými pro oční operace vystřižen do skořápky otvor oválného tvaru v přibližné velikosti 2x3 cm nad místem, kde se nachází embryo. Pokud embryo odpovídalo vývojovému stádiu, byl odsát zbývající bílek, odstraněna větší část skořápky a embryo zachyceno do kroužku z filtračního papíru, vystřiženo ze žloutkové koule, umístěno na kultivační misku s živným médiem a překryto PBS. Živné médium (100 ml) bylo připraveno z 30 ml bílku, 35 ml 2x média DMEM s glutaminem a antibiotiky a 35 ml 1,5% agaru (Sigma) rozpuštěného a zchlazeného přibližně na 40°C. Živné médium bylo ještě před úplným vychladnutím rozděleno na Petriho misky o průměru 3 cm (4ml/misku) a misky zchlazeny. Embrya vysazená na takto připravené misky bylo možno dále kultivovat až 2 dny.

„Time-lapse“: Kuřecí embryo ve stádiu HH10 bylo vyjmuto z vejce a uloženo na misku s agarovým médiem podle postupu výše. Embryo bylo snímáno pod binokulární lupou umístěnou ve speciálně upraveném boxu „hypoxic chamber“ od firmy Coy Laboratory Products s regulovatelným obsahem plynů a s regulovatelnou teplotou na kameru DFC480 Leica každé 3 min po dobu zhruba 15 hodin. Video bylo přehráno rychlostí 12 snímků za sekundu (viz Elektronická příloha 1 a obrázek 11). Explantové kultury byly snímány každých 5 min v běžných kultivačních podmínkách (viz kapitola 3.3) a video přehráno rychlostí 8 snímků za vteřinu (viz Elektronická příloha 2 a obrázek 12).

### 3.3 Explantové kultury

Embrya pro explantové kultury byla inkubována po dobu 33-38 h do stádia HH10-11, kdy má embryo 10-12 somitů. Po zpracování výše popsaným způsobem byly z embrya pod binokulární lupou tenkým elektrolyticky naostřeným wolframovým drátkem vyříznuty neurální valy a pomocí pipety odloženy do ledového média s koňským sérem. Po získání dostatečného množství explantů byly opláchnuty a inkubovány v proteináze K, která rozvolnila jednotlivé struktury jako např. zbytky somitů, a takto očištěné neurální valy byly vysazeny na kolagenem potažou misku s malým množstvím média tak, aby neplavaly. Po uchycení na podklad za cca 2-4 h bylo doplněno médium. Explanty byly inkubovány po dobu nutnou pro vyputování daného typu buněk (do 18 h pouze prekurzory neurálních buněk, po dobu až 3 dnů směs melanocytů, glií a neuronů). Potom byla masa explantu mechanicky pod mikroskopem odstraněna wolframovou kličkou a dále byly inkubovány jen vyputované buňky. Pokud bylo třeba buňky infikovat, bylo přidáno médium obsahující koncentrované virové částice hned při vysazování explantů na misky.

### 3.4 Použité DNA konstrukty a retroviry

Mutanty genu *v-myb* použité pro výzkum proteinu Gremlin 2 byly vytvořeny z mutant leucinového zipu *v-myb L3,4A* (Bartůněk et al., 1997) nahrazením stop kodonu TAG fúzní sekvencí kódující dva hemagglutininové epitopy (HA) a myší estrogenový receptor obsahující G525R mutaci (Karafiát et al., 2007). Varianta v-Myb-N118D, která nerozpoznává MRE, byla vytvořena již dříve (Karafiát et al., 2007). Pro indukci proteinů *v-myb-L3,4A-HAER* byl použit 200nM 4-hydroxytamoxifen (Sigma). Retrovirové vektory nesoucí alely v-Myb připravené dle popsaného postupu byly transfekovány do kuřecích embryonálních fibroblastů (CEF) (Bartůněk et al., 1997). Dále byly vytvořeny expresní vektory pro Gremlin 2, pSFCV-gremlin-2 a RCAS-gremlin-2, a transfekovány do CEF. cDNA pro Gremlin 2 byla připravena, jak je popsáno dále, a vložena do vektoru pBS pomocí štěpení endonukleázou EcoRV. pBS-gremlin-2 byl štěpen endonukleázami ClaI a NotI pro sestrojení RCAS-gremlin-2 a ECL136 a ClaI pro sestrojení pSFCV-gremlin-2. Zásobní retrovirus nesoucí v-Myb a Gremlin 2 byl získáván z média CEF produkujících virus a koncentrován na filtrech Omega 300 K (Pall Gelman) tak, aby bylo dosaženo koncentrace 10<sup>6</sup>/ml částic (Karafiát et al., 2007). Vektor p-gremlin-2-prom byl vytvořen vložением PCR produktu z genomové DNA z putativní promotorové oblasti Gremlin 2 (-540 až +215 od místa počátku transkripce) mezi místy pro endonukleázy KpnI

a BglII na vektoru pGL3-Basic (Promega). Přesnost sekvence byla ověřena sekvenací. pcDNA3-v-myb a pcDNA3-v-myb-L3,4A-N118D byly vytvořeny umístěním příslušných cDNA mezi místa pro endonukleázy HindII a XbaI na vektoru pcDNA3 (Invitrogen). Konstrukty odvozené od Meis1/2, EE a SIMO byly zkonstruovány, jak je uvedeno v článku (Antosova *et al.*, 2016).

### **3.5 Tranzientní transfekce kuřecích embryonálních fibroblastů (CEF)**

Semikonfluentní kultura fibroblastů byla připravena z 10denních kuřecích embryí Brown Leghorn transfekovaných zásobními retroviry v-myb-L3,4A-HAER nebo v-myb-L3,4A-N118D-HAER a vektorem nesoucím MRE s luciferázovým reportérem. K transfekci byl použit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) dle návodu výrobce. Do kultur byl přidán 200nM 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) v etanolu a ponechán přes noc, ke kontrolním kulturám byl přidán samotný etanol. Luciferáza byla vyhodnocena s použitím luminometru Berthold FB12. Proteiny v-myb-L3,4A-HAER byl detekovány analýzou „Western blot“ s využitím protilátky AKR-006 (Cell Biolabs), která rozeznává HA epitop.

### **3.6 Kultury krevních prekurzorových buněk**

Kultury krevních prekurzorových buněk byly připraveny z kostní dřeně odebrané *ex-vivo* z 6denních kuřecích embryí Brown Leghorn. Buňky byly kultivovány popsanou metodou (Dvorakova *et al.*, 2001). Druhý den byly neadherentní buňky odebrány a infikovány retrovirem v-myb-L3,4A-HAER. Kultury byly udržovány 14 dní s 200nM 4-OHT nebo bez něj. Současně byly vedeny neinfikované kultury neadherentních buněk kostní dřeně s 200nM 4-OHT jako kontrola.

### **3.7 Embrya a kultury buněk NL**

Metody přípravy buněčných kultur a preparace embryí byly převzaty z předchozích prací (Karafiat *et al.*, 2005; Karafiat *et al.*, 2007). Vajíčka Brown Leghorn z líhni Ústavu molekulární genetiky byla inkubována do stádií HH10-11. Buňky NL byly získány z explantů embryonálních neurálních trubic. Neurální trubice byly explantovány na misky potažené kolagenem (kolagen typ I, Sigma, 1mg/ml) v médiu obsahujícím retrovirové částice. Po třech dnech byly explanty odstraněny a pro další kultivaci a analýzu byly ponechány pouze buňky vypuštěné z explantů. Proteiny v-myb-HAER byly po odstranění

explantů aktivovány přidáním 200nM 4-OHT (Sigma) do média. Buňky byly sklizeny po dalších 4 h. S použitím Tri Reagent RT (Molecular Research Center, Inc.) byla izolována celková RNA dle návodu výrobce. Protilátka anti-CD57 TB01 pro epitop HNK-1 získaná jako dar od F. Malvasiho byla použita podle popsaného postupu (Karafiát et al., 2005).

### 3.8 Kultury primárních receptorových buněk

Retina byla vyizolována z kuřecích embryí ve stádiu E8 a vložena do vychlazeného PBS obsahujícího Penicilin/Streptomycin. Po centrifugaci (200g po dobu 5 min) byl přidán trypsin/EDTA (500 $\mu$ l) a retina byla 30 min inkubována na třepačce při teplotě 37°C. Poté byla směs resuspendována pipetou, aby došlo k oddělení jednotlivých buněk. Ty byly centrifugovány (200g, 5 min) a resuspendovány v médiu DMEM/F12 obsahujícím 10% FBS a Penicilin/Streptomycin.

### 3.9 Reverzní transkripce a qPCR

Pro reakci byla připravena cDNA z 0,2  $\mu$ g celkové RNA s použitím 200 U reverzní transkriptázy MLV bez RNázy H (Promega) v reakcích o objemu 20  $\mu$ l podle popsaného postupu (Cermak *et al.*, 2010). Kvantitativní PCR v reálném čase byla provedena v triplicátech v reakcích o objemu 15  $\mu$ l s použitím FastStart SYBR Green Master (Roche) a detekční systém pro analýzu PCR v reálném čase MiniOpticon (Bio-Rad). cDNA GREM2 byla amplifikována s primery GREM2s (CTCACCGCAGGATGATTTGGA) a GREM2a (CGCTCTTGAGGTACTIONTCCGTTTC). Pro KRT19 byly použity primery KRT19s (CAGTCCCAGCTCAGCATGAAAG) a KRT19a2 (GTCTCTTTTGTCTGGGAGATCCAG). Pro NKX3.2 primery NKX32s2 (CGGCACGCAGTGAGCGCC) a NKX32a (GGCGGATAGGGAGAGGCCGA). Pro VNN1 primery VNN1s (CCTGGGGAATTTGAGGTACTIONT) a VNN1a (CTCATCCTGTCTATGCTGACTG). Pro TAAR1 primery TAAR1s (CCTCCGTAGTGTCTTTTTACATC) a TAAR1a (CTCCAGCATATGAGAAATACTIONTCC). Analýza dat byla provedena v Microsoft Excel 2007 (Microsoft). Účinnosti amplifikace byly zjištěny ze směrnice přímek lineární regrese  $\log_2$ -transformovaných hodnot relativní fluorescence vynesných proti pořadí cyklů (účinnost =  $2^{\text{hodnota směrnice}}$ ). Hodnoty Ct byly normalizovány pomocí odpovídajících

hodnot pro referenční gen GAPDH, čímž byly získány hodnoty relativní genové exprese. Pro zjištění statistické významnosti rozdílů v genové expresi byly použity Studentovy t-testy.

### 3.10 Mikročipová analýza a analýza dat

Celková RNA ze tří nezávislých sběrů byla označena podle uživatelského návodu GeneChip 3' IVT Express Kit User Manual (Affymetrix, 2008–2009) a hybridizována na Affymetrix GeneChip Chicken Genome Arrays. Podrobný postup byl popsán již dříve (Cermak *et al.*, 2010). Data byla zpracována pomocí Partek Genomics Suite (Partek Inc.) s použitím normalizace algoritmem GC-RMA. Jako rozdílně exprimované byly vybrány geny, které změnily expresi alespoň dvakrát a jejich hodnota p-value byla nižší než 0,05. Data jsou prezentována ve formě tzv. "heatmap", grafu, ve kterém barevná škála představuje intenzitu signálu po normalizaci, vytvořeném v Microsoft Excel 2007. Data z analýzy byla uložena v databázi GEO (GEO ID: GSE39346). Všechna data jsou v souladu s pravidly MIAME.

### 3.11 Reportérová analýza

Buňky HD11 na 48-jamkové destičce byly transfekovány směsí vektorů p-gremlin-2-prom, pcDNA3 s nebo bez v-Myb cDNA a pCMV- $\beta$ -Gal, pro transfekci byl použit polyetylenimin: 1  $\mu$ l (1 mg/ml) lineární PEI 25 kDa (Polysciences Inc.) bylo rozpuštěno v 24  $\mu$ l DMEM a smícháno a 360 ng DNA v 25  $\mu$ l DMEM, inkubováno 15–30 min v pokojové teplotě a rozděleno do 3 jamek. Po 48 hodinách byly buňky lyzovány v pufru luc-lysis (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% TX-100, 10% glycerol, směs inhibitorů proteázy (Roche), 2 mM EDTA). Luciferázová aktivita byla měřena Luciferase Assay System (Promega) a luminometrem FB 12 (Berthold Detection Systems). Jako vnitřní standard byla použita  $\beta$ -galaktosidázová aktivita produkovaná plazmidem pCMV- $\beta$ -Gal. Všechny pokusy byly provedeny v triplicátech a hodnoty luciferázové aktivity byly upraveny dělením odpovídající hodnotou  $\beta$ -galaktosidázové aktivity.

### 3.12 Elektroporace *in ovo*

Elektroporace neurální trubice (obrázek 13): Vajíčka Brown Leghorn byla inkubována do stádia HH10-11. Do skořápky byly vystřiženy malé otvory a embrya byla

překryta PBS. Směs elektroporační barvy a DNA (Scaal *et al.*, 2004) byla injikována do neurální trubice. Elektroporační vektor pCLAG2-v-myb (Kosla, nepublikováno) byl vytvořen vložením cDNA v-Myb do vektoru pCLAG2 mezi místa pro endonukleázy KpnI a SacI (Marics *et al.*, 2002). Elektroporační vektor pCLAG2-gremlin-2 byl vytvořen vložením cDNA Gremlin 2 do vektoru pCLAG2 mezi místa pro endonukleázy EcoRI a HindIII. Embrya byla elektroporována elektrodami Genetrodes, 3mm, ve tvaru L (BTX Harvard Apparatus) a elektroporátorem ECM830 (BTX Harvard Apparatus) generujícím tzv. square wave, elektrický puls s okamžitou změnou hodnot, elektroporační program 5 pulsů o 15 V, délka pulsu 20 ms, interval mezi pulsy 100 ms.

Elektroporace presumptivního ektodermu čočky (obrázek 16): Myší wt SIMO enhancer vložený do elektroporačního vektoru s hsp68-lacZ a konstrukty nesoucí minimální enhancery EE a SIMO (Antosova *et al.*, 2016) byly elektroporovány do embryí Brown Leghorn inkubovaných do stádia HH10-11. Směs DNA byla vstříknuta vně vyvíjejícího se pravého optického pohárku za těchto elektroporačních podmínek: 5 pulsů o 12 V, délka pulsu 20 ms, interval mezi pulsy 100 ms. Embrya byla sklížena ve stádiu HH20-21, 15 min fixována v 2% formaldehydu a předána k barvení X-gal.

Elektroporace retiny (obrázek 17): Kuřecí embrya byla elektroporována *in ovo* ve stádiu E3. Elektroporační směs s plazmidy GFP-RCAS nebo GFP-AD29-RCAS nebo GFP-WT31-RCAS byla do embryonálního oka vstříknuta skelněnou mikrojehlou tak, aby byl zaplněn prostor mezi čočkou a retinou. Nastavením elektrod bylo zajištěno, aby vzniklé elektrické pole vneslo směs do permeabilizované vrstvy buněk retiny. Pokus proběhl při stejném elektroporačním nastavení jako u elektroporace čočky.

### **3.13 Hybridizace celých embryí - whole mount in situ hybridization (WISH)**

Jako templát pro vytvoření sondy na Gremlin 2 byl použit PCR produkt z cDNA z časných buněk NL infikovaných v-Myb (Karafiat *et al.*, 2007) amplifikovaný pomocí primerů GREM2s (CTCACCGCAGGATGATTTGGA) a GREM2a (CGCTCTTGAGGTACTIONTCCGTTTC) a vložený do vektoru pBluescript II SK+ do místa pro endonukleázu EcoRV. Templátem pro sondu na v-Myb byl konstrukt pcDNA3-v-myb. RNA sondy byly vytvořeny s pomocí T7 RNA polymerázy z templátů linearizovaných endonukleázou EcoRI. WISH byla provedena podle protokolu Whole Mount In Situ Hybridization Protocol for mRNA Detection (Streit a Stern, 2001; Acloque *et al.*, 2008)



s těmito změnami: v hybridizačním roztoku bylo místo ovčího séra použito kozí, místo TX-100 bylo použito 1% SDS, nebyl použit blokovací prášek ani EDTA.

### **3.14 Kryořezy (mrazové řezy)**

Embrya v různém stádiu vývoje byla vyjmuta z vejce, opláchnuta v K-fosfátovém pufru a inkubována postupně po 30 min v 7,5%, 15% a 30% sacharóze v K-fosfátovém pufru v pokojové teplotě. Poté byla ponechána přes noc nebo do usednutí na dno v 30% sacharóze ve 4°C. Dále byla 30 min zvolna otáčena při pokojové teplotě v O.C.T. (Tissue-Tek® O.C.T.™ od firmy Sakura) 2:1 s 30 % sacharózou. Zamrazována byla do O.C.T. na měděném můstku postaveném v tekutém dusíku ve speciálních plastových formách nebo formách poskládaných z hliníkové fólie. Takto zpracovaná embrya bylo možno dlouhodobě uchovávat v -80°C zabalené v hliníkové fólii. Řezy byly pořizovány na přístrojích Leica CM 1950 a Leica CM 3050 S.

### **3.15 Imunofluorescence**

Kryořezy byly fixovány v 3% paraformaldehydu, blokovány 30 min v 2% BSA, 5 min permeabilizovány TX100 a znovu blokovány 1 h v 2% BSA. Mezi jednotlivými kroky byla skla odmyvána v PBS. Primární protilátka HNK-1 byla ponechána na řezech přes noc a sekundární protilátka konjugovaná s fluorescenční barvou Cy3 2 h. Sekundární protilátka byla na sklech ponechána ve tmě. Do posledního odmytí sekundární protilátky bylo přidáno DAPI v konečné koncentraci 0,1 µg/ml. Po promytí byl na preparát kápnut montovací roztok 10% Mowiol (Sigma-Aldrich). Fluorescence byla vybudena a pozorována pomocí filtrů pro GFP, Cy3 a DAPI na mikroskopu Leica DMIRB a snímky sejmuty digitální kamerou DFC480 Leica a uloženy pomocí software od firmy Leica.

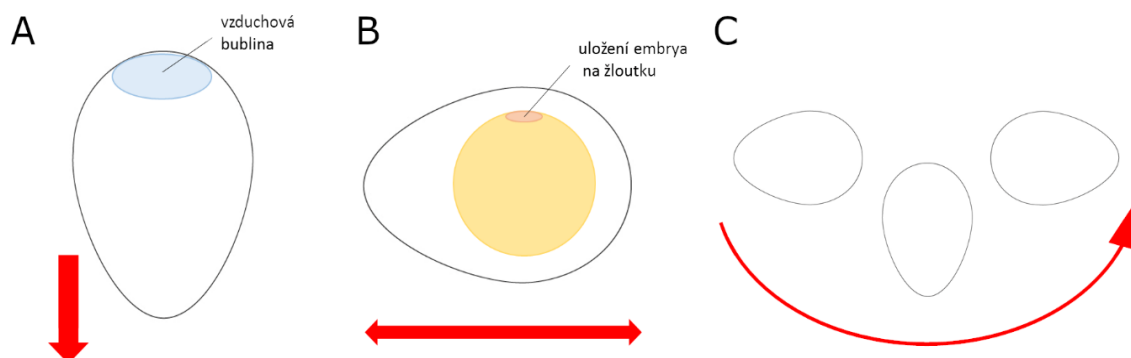


## 4. Výsledky

### 4.1 Mikromanipulace a vizualizace

#### 4.1.1 Inkubace a příprava kuřecích embryí

Použitá vejce pocházela od slepic Brown Leghorn. Vejce byla sbírána v den snesení a ukládána do 12°C a při této teplotě mohla být skladována bez snížení životaschopnosti až 10 dní. Vejce pro krátkodobou inkubaci byla nasazována do termostatu na 38°C s vlhkostí 70-80 %. Vejce byla skladována v platech špičkou dolů (obrázek 9A), k inkubaci byla nasazována do polohy „na bok“ tak, aby delší osa vejce byla vodorovně (obrázek 9B). Nasazená vejce byla každých 12 h otáčena, a to přes špičku (obrázek 9C). Při tomto postupu je zachována dobrá výměna plynů mezi vejcem a vnějším prostředím (vzduchová bublina se nachází na tupé špičce vejce a směřuje tedy vzhůru) a embryo je položeno na horní straně žloutku tak, aby k němu byl dobrý přístup pro manipulace.

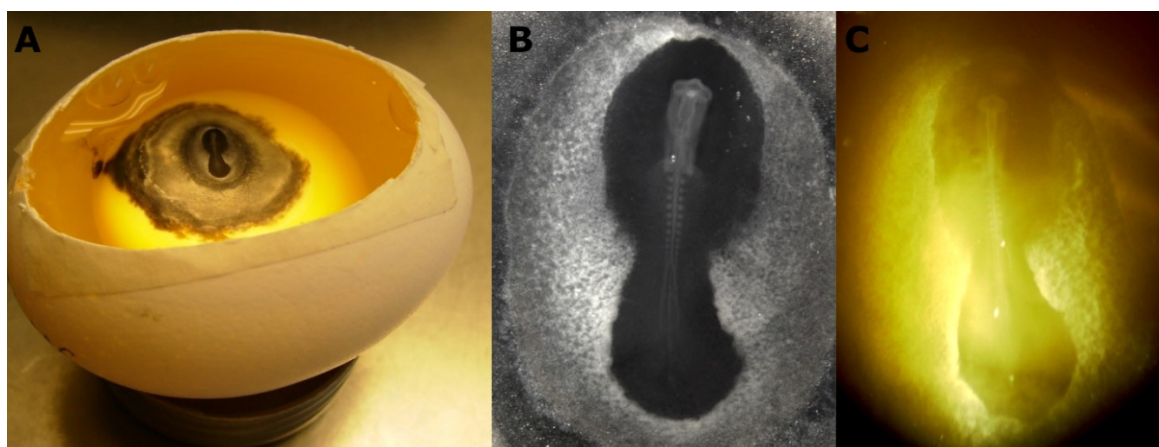


**Obr. 9 - Schéma skladování, nasazování a otáčení vajec**

Vejce se skladují špičkou dolů (A), nasazují se do polohy „na bok“, tak aby delší osa vejce byla vodorovně (B), a vždy po 12 h se otáčí přes špičku (C).

Embryo se díky nerovnoměrnému rozložení hustoty žloutku dostává vždy na vrch žloutkové koule. Všechna vejce díky tomu mohla být rutinně otevírána na stejném místě. Pokud embryo není po otevření skořápky na vrcholu žloutkové koule, což je nejčastěji způsobeno nedávným otočením vejce, embryo se během několika desítek minut samo otočí nebo je možné opatrně žloutkovou kouli otáčet pomocí pinzety. Před vytvořením otvoru byla vejce napíchnuta injekční jehlou o větším průměru v místě vzduchové bubliny a bylo odsáto malé množství bílku, při vynechání tohoto kroku by embryo zůstalo přilepené

na skořápce. K nařuknutí a otevření skořápky byly použity malé ostré nůžky (chirurgické oční nůžky), kterými je možné skořápku hladce odstříhnout, aniž se roztřepe okraj skořápky. Velikost otvoru byla přizpůsobena následné manipulaci, pro elektroporaci byl vhodný co nejmenší otvor, pokud byla embrya sklízena, byl vhodný naopak otvor co nejširší. Embrya kolem stadia HH10 se po otevření pro některé postupy podstříkují kaligrafickou tuší (angl. indian ink) z důvodu vizualizace (obrázky 10A a 10B). Na tmavém pozadí vyniknou v kontrastu světlejší struktury hlavové části a velmi dobře se zviditelní somity. Podstříknutí vyžaduje napíchnutí žloutkové koule v blízkosti embrya. Po takovém zásahu bylo často pozorováno snížení napětí ve žloutkové membráně, případně i vyhřeznutí žloutku a vzlínání tuše do okolí embrya. Takové embryo nebylo vhodné pro delší inkubaci. V našich experimentech nebyla tato metoda vizualizace využívána. Při ideálním nastavením světla z boku při pozorování binokulární lupou lze docílit kontrastu i na pozadí žloutku (obrázek 10C) a struktury tak dostatečně zviditelnit.



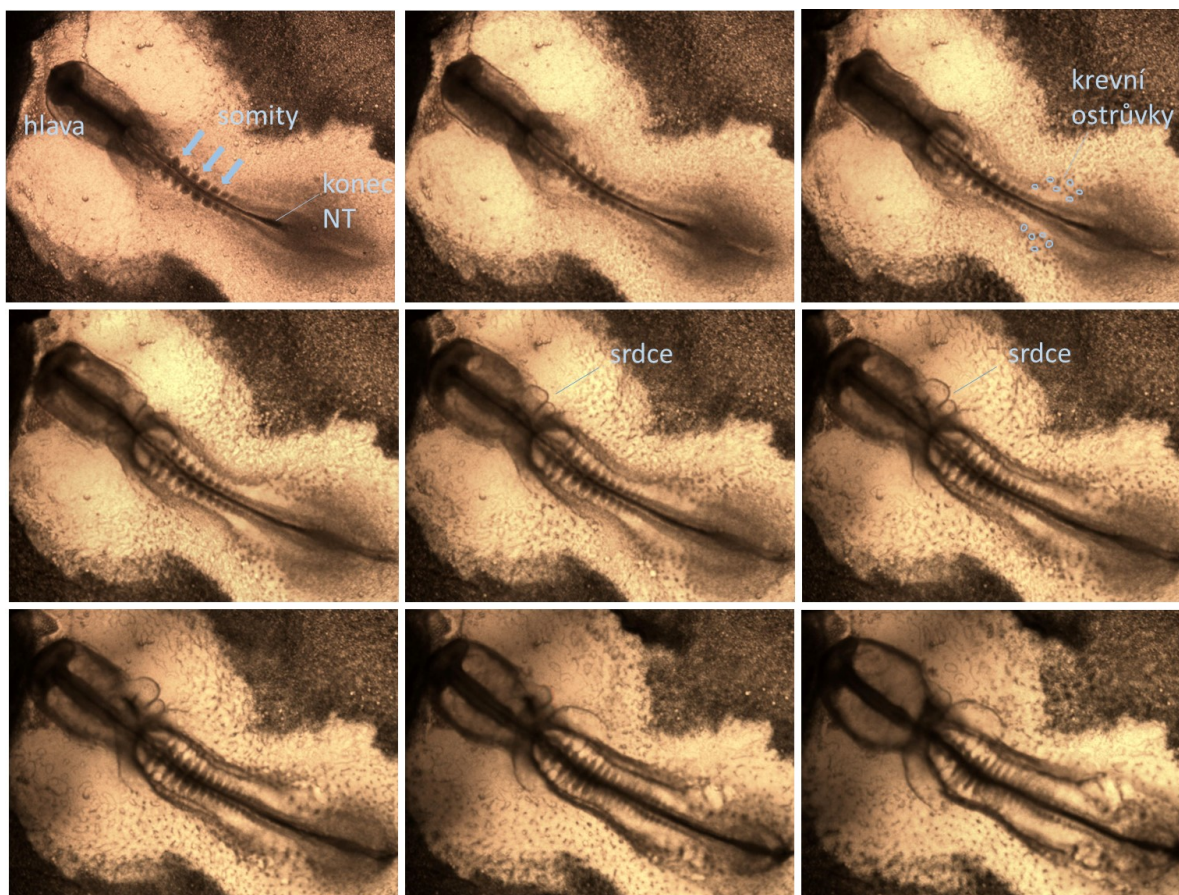
**Obr. 10 - Vizualizace embrya ve vejci ve stádiu HH10**

Embryo podstříknuté kaligrafickou tuší bez zvětšení (A), zvětšeno binokulární lupou (B). Embryo pod binokulární lupou nasvíceno bočním světlem, vizualizace pouze s využitím světla a stínu (C).

Pro další inkubaci byla vejce uzavřena papírovou lepicí páskou. Po manipulaci již vejce při inkubaci nebyla otáčena. Pokud bylo vejce nutné po manipulaci inkubovat dlouhodobě, byla uzavřena sklíčkem přilepeným parafínem, který dobře drží a nepropouští obsah vejce. Takto uzavřená vejce lze inkubovat i v automatické líhni.

#### 4.1.2 Kultivace *ex ovo* a pozorování pomocí časosběrné techniky („time-lapse“)

Embryo lze v raném stádiu vyjmout z vejce a přemístit na Petriho misku s vrstvou speciálního agarového média s obsahem bílku (viz kapitola 3.2). Na tomto podkladu a ve vhodné vlhkosti bylo možné embryo kultivovat zhruba 2 dny. Výhodou tohoto uspořádání je snadné pozorování embrya na ploché misce, kterou lze na rozdíl od objemného a nestabilního vejce pohodlně umístit pod lupu nebo mikroskop. Z tohoto uspořádání je pak možné snímat embryo pomocí časosběrné vizualizační metody „time-lapse“ (obrázky 11 a 12, Elektronická příloha 1 a 2), která byla používána již v první polovině 20. století (Graeper, 1929) a v podobném uspořádání se s moderními přístroji využívá dodnes. Metoda „time-lapse“ je založena na snímání experimentu v pravidelných intervalech za stejného nastavení po delší časový úsek. Snímky jsou poté s pomocí vhodného software sestaveny a přehrány jako video. Jako „time-lapse“ lze snímat embrya *ex vivo* (obrázek 11 a Elektronická příloha 1), explantové kultury (obrázek 12 a Elektronická příloha 2) a další experimenty. Účelem „time-lapse“ u kuřecího embrya bylo pozorovat jeho vývoj *ex vivo* v nastavení, které by umožnilo zaznamenat případné změny vyvolané vnesenými geny. U explantových kultur byla metoda zaváděna zejména za účelem pozorování migrace buněk NL z explantu a jejich případných změn.



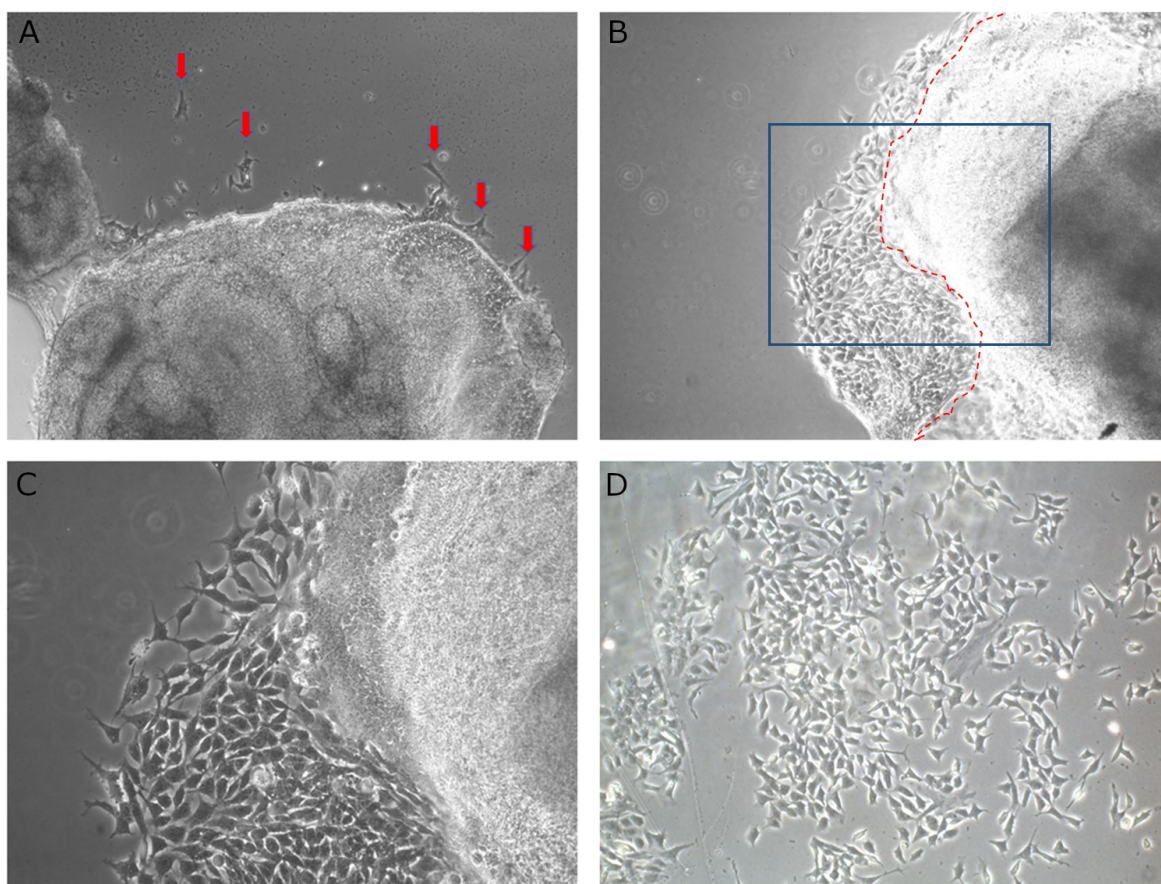
**Obr. 11 - Kultivace kuřecího embrya *ex vivo* (výběr ze snímků „time-lapse“)**

Vybrané snímky vždy v intervalu 1,5 h. NT – neurální trubice. Celé video s podrobným popisem v kapitole 9, Elektronická příloha 2).

### 4.1.3 Explantové kultury

Materiál pro naše experimenty týkající se časné exprese v NL byl získáván zejména z explantových kultur (obrázek 12). Embrya byla nejprve vyjmuta z vejce a zpracována stejně jako pro kultivaci *ex ovo*. Poté bylo embryo disektováno pod binokulární lupou. Explantovány byly části NT, a to posledních 6 somitů a část neurální ploténky z embryí HH10-11. Explanty byly vysazovány na misky pokryté vrstvou kolagenu do velmi malého množství média. Malý objem média je nutný pro uchycení explantů, plovoucí explanty se na podklad neuchycují. Správně vysazené explanty se uchytily během několika hodin a hned poté k nim bylo přidáno čerstvé médium. Buňky NL poté vyputovaly do kultury (obrázek 12, Elektronická příloha 2). Po mechanickém odstranění explantů (obrázek 12D) zůstala v kultuře směs buněk NL, poměr různých typů prekurzorů závisel na době, po kterou bylo buňkám umožněno putovat z explantu. Nejprve migrují prekurzory neuronů

a glií, teprve asi po 18 h začnou migrovat i prekurzory pigmentových buněk. Migrace explantových kultur byla zachycena na „time-lapse“ videích 2 - 5 (Elektronická příloha 2).



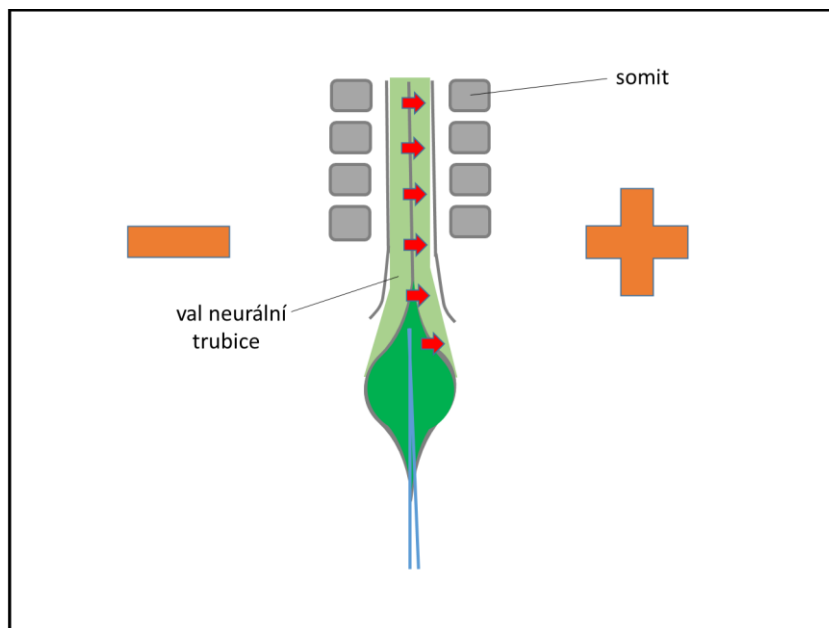
**Obr. 12 - Explantové kultury neurální trubice**

(A) Explant neurální trubice krátce po uchycení. Viditelné jsou první migrující buňky (označeno červenými šipkami). (B) Explant zhruba po 12 h migrace buněk. Hranice mezi masou explantu a putujícími buňkami je vyznačena červenou přerušovanou čarou. (C) Zvětšený výřez (modrý obdélník z obrázku B). (D) Kultura po mechanickém odstranění masy explantu.

#### 4.1.4 Elektroporace

Elektroporace do neurální trubice (obrázek 13) umožňuje manipulaci s genovou expresí a vizualizací v buňkách NT a NL. DNA fluorescenčních proteinů (nejčastěji GFP a mCherry) či agens, která interferují s genovou expresí (morfolina, siRNA atd.), se injikují do dutiny NT ve směsi s vizualizační barvou (20% Fast Green), a složkou regulující hustotu směsi (0,33% karboxymethylcelulóza), která zpomaluje vzlínání směsi z místa injikace před elektroporací. Vhodná koncentrace DNA v elektroporační směsi byla 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a vyšší, s vyšší koncentrací a čistotou elektroporované DNA stoupala účinnost elektroporace, což bylo zejména zjevné u kontrolního plazmidu pCGFPA. Po vstříknutí barevné elektroporační směsi se struktury kolem elektroporovaného místa zviditelní i když předtím

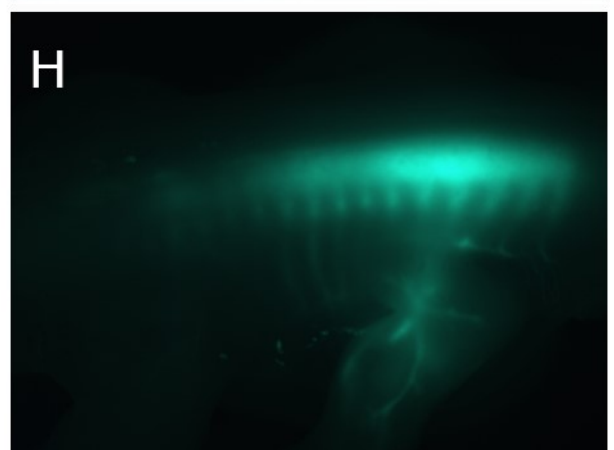
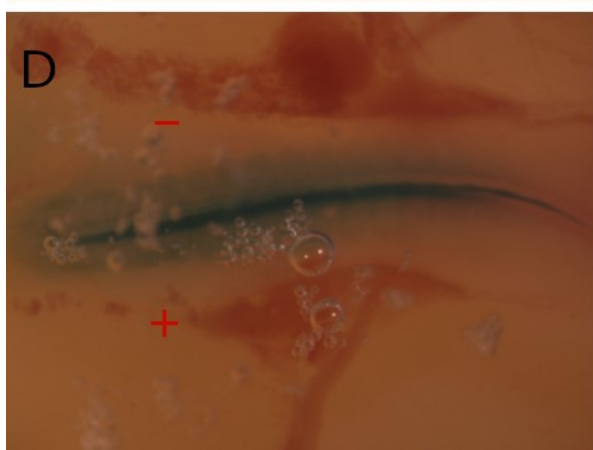
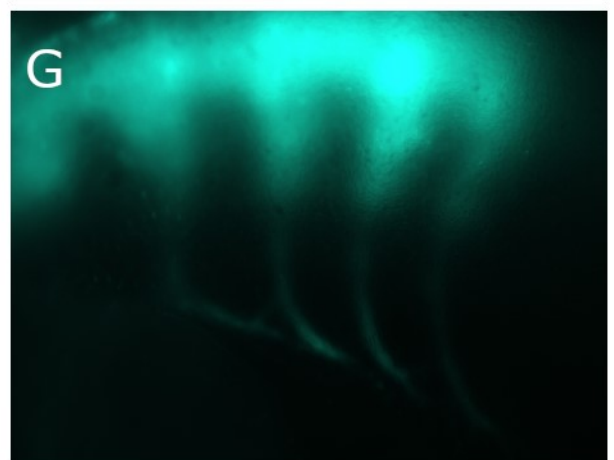
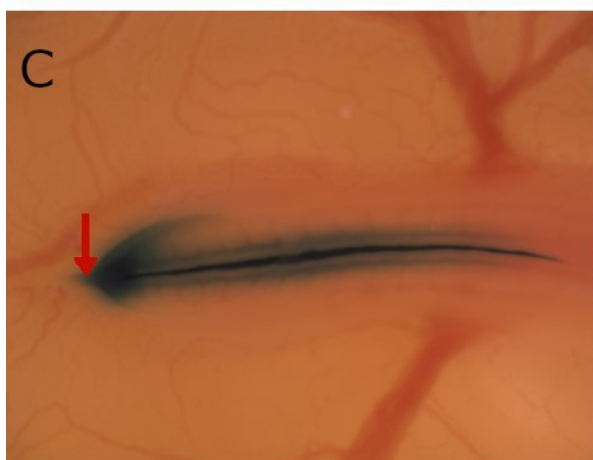
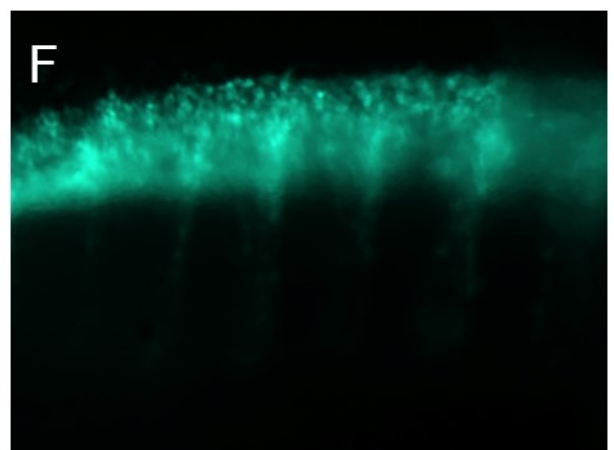
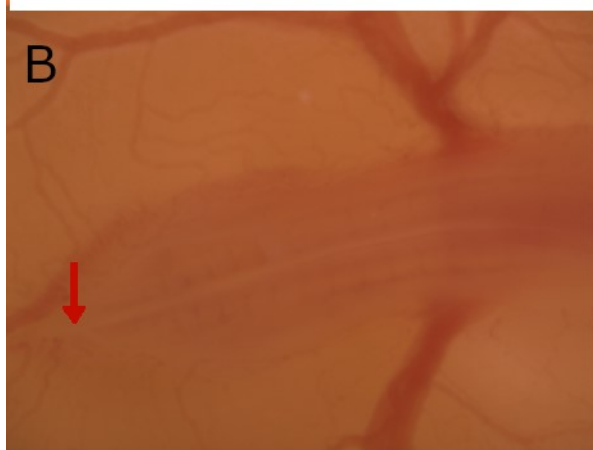
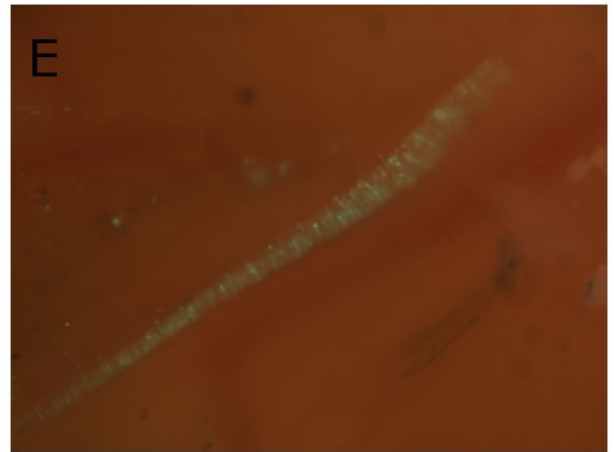
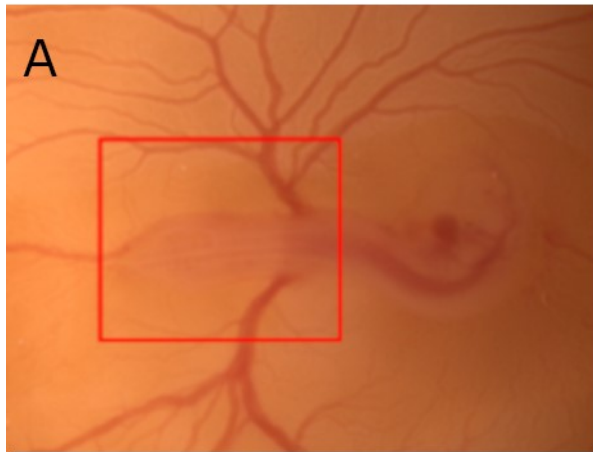
není embryo podstříknuto tuší (obrázek 14C), v případě účinné elektroporace lze dokonce pozorovat pomalý pohyb barevné směsi do tkáně NT. Z dutiny NT je směs vnesena do buněk podle polohy elektrod vždy od záporné elektrody ke kladné, čímž dochází k elektroporaci jedné poloviny NT (obrázek 14D). Druhá polovina zůstává neopůsobena a může posloužit jako kontrola. Oboustranně lze NT elektroporovat ve dvou elektroporačních krocích, přičemž je nutné mezi jednotlivými cykly vyměnit umístění elektrod a případně znovu injikovat směs do trubice. Tento postup ale není běžně používán a experimenty pracují s jednostrannou elektroporací. Po elektroporaci je možné embryo inkubovat až do vylíhnutí. Podle našich zkušeností je počet přeživších inkubovaných embryí při zvolení vhodného elektroporačního programu srovnatelný s počtem přeživších neelektroporovaných otevřených kontrol. Elektroporované buňky pokračují v embryu v normálním vývoji, putují do předurčených destinací a diferencují. Nejlépe vizualizované tkáně po elektroporaci pomocí GFP byla NT (obrázek 14E-H), nervy (obrázek 14F-H a obrázek 15A) a melanocyty ve vyvíjející se kůži (obrázky 15B a 15C).



**Obr. 13 - Schéma elektroporace neurální trubice**

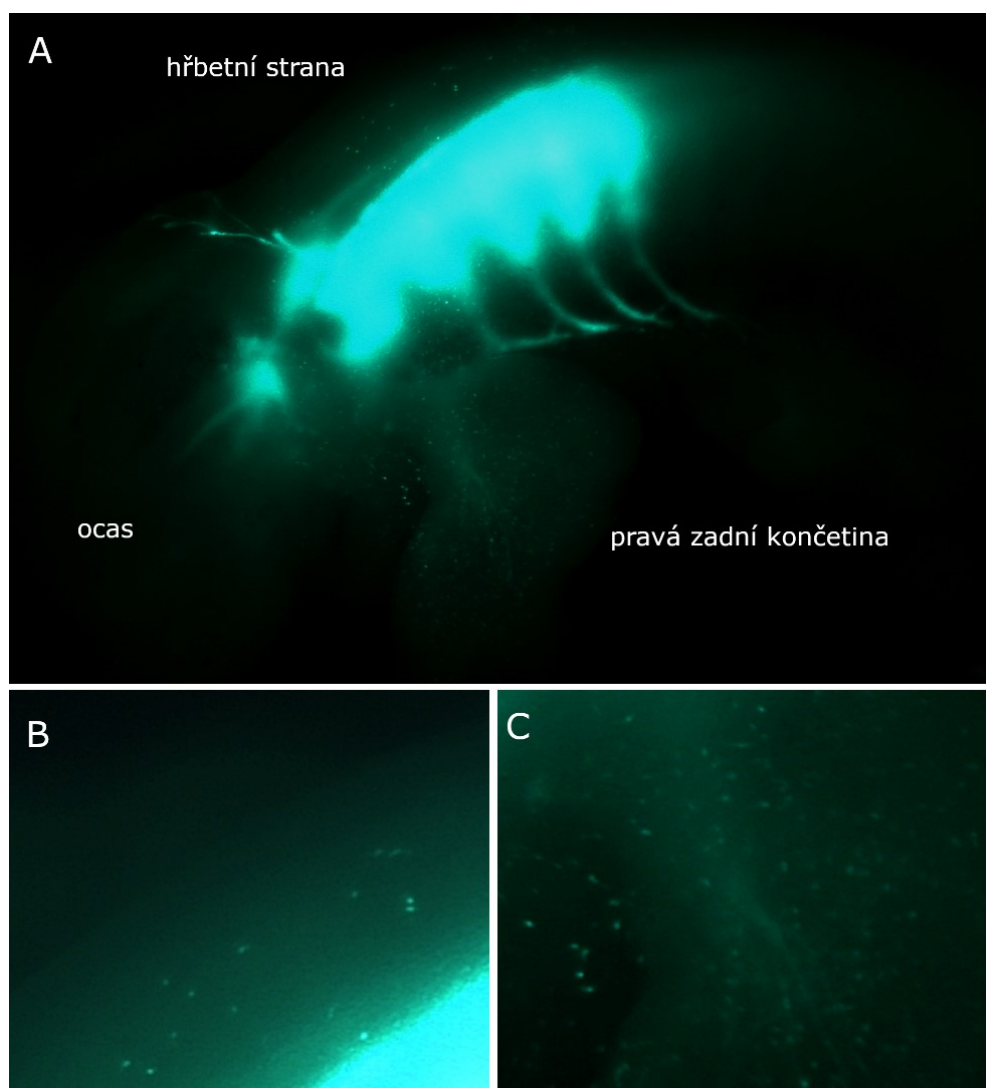
Kuřecí embryo bylo elektroporováno jednoho z valů neurální trubice. Elektroporační směs byla vstříknuta do neurální trubice její koncovou částí a elektrickým polem vnesena do tkáně NT a NL. Modře je znázorněna skleněná mikrojebla, zeleně vstříknutá elektroporační směs, plus a mínus označují umístění elektrod, červenými šipkami je naznačen směr putování DNA do tkáně.





#### Obr. 14 - Elektroporace kontrolním plazmidem

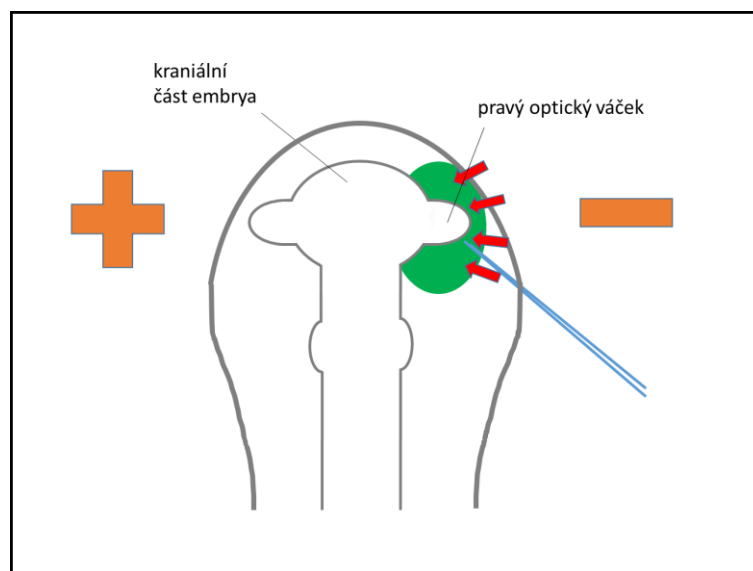
(A) Celkový pohled na 3denní kuřecí embryo *in ovo*. Červený obdélník znázorňuje oblast přibližnou na obrázcích B, C a D. (B) Ocasová část trupu 3denního embrya. Červená šipka ukazuje na obrázcích B a C na místo vpichu. (C) NT po vstříknutí barevné směsi s DNA, použitý plazmid pCLGFPA (Scaal *et al.*, 2004). (D) Stejně embryo po elektroporaci. Červená znaménka plus a minus označují umístění elektrod při elektroporaci, plus = umístění katody, minus = umístění anody. Elektroporovaná směs je viditelná uvnitř tkáně jednoho z valů neurální trubice ve směru elektrického pole. (E) Exprese GFP 12 h po elektroporaci. (F) Stejně embryo 2 dny po elektroporaci. GFP v tkáni neurální trubice a buněk putujících zejména ventrálním směrem. (G) Stejně embryo 3 dny po elektroporaci. GFP je stále exprimováno, viditelné jsou nervy vyrůstající z neurální trubice. (H) Stejně embryo 4 dny po elektroporaci. Nervy v pozdějším stádiu tvoří ganglia v končetině.



#### Obr. 15 - Dorzálně migrující buňky neurální lišty po elektroporaci

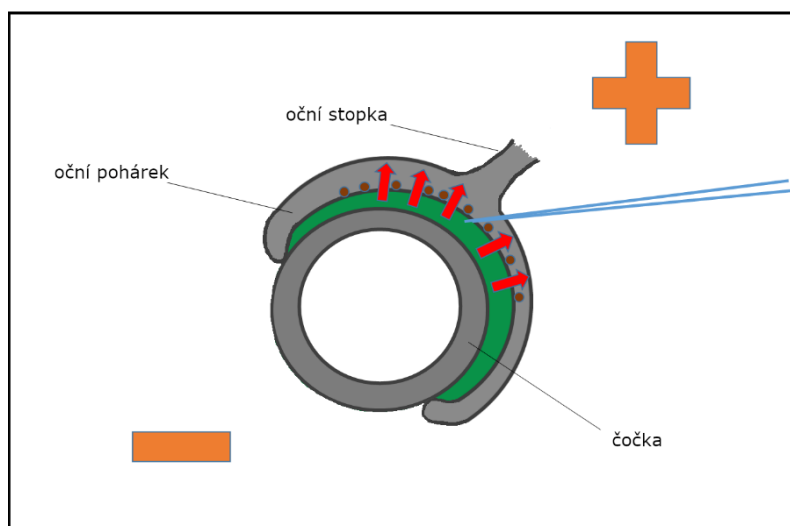
Při správném zaostření a delší expozici lze zachytit budoucí melanocyty exprimující GFP, které po elektroporaci putují z NL dorzálním směrem v druhé vlně migrace a osidlují vyvíjející se kůži. Přesvětlená oblast ve středu embrya (A) je elektroporovaná polovina neurální trubice exprimující GFP, ze které vyrůstají nervy. (B, C) Výřezy obrázku A z hřbetní části (B) a z pravé zadní končetiny (C) s dobře pozorovatelnými melanocyty na povrchu embrya. Embryo E5,5 elektroporované pCLGFPA ve stádiu HH11.

Technika byla pro další projekty přizpůsobena k elektroporaci embryonálního oka, konkrétně presumpčního ektodermu čočky (obrázek 16) a retiny (obrázek 17). Elektroporace kraniální části embrya vyžadovala pro ideální přežívání zpracovaných embryí mírné snížení napětí.



**Obr. 16 - Schéma elektroporace presumpčního ektodermu čočky**

Kuřecí embryo bylo elektroporováno do presumpčního ektodermu čočky. Elektroporační směs byla injikována vně pravého optického váčku a elektrickým polem vnesena do tkáně, ze které se vyvine čočka. Modře je znázorněna skleněná mikrojebla, zeleně vstříknutá elektroporační směs, plus a mínus označují umístění elektrod, červenými šipkami je naznačen směr putování DNA do tkáně.

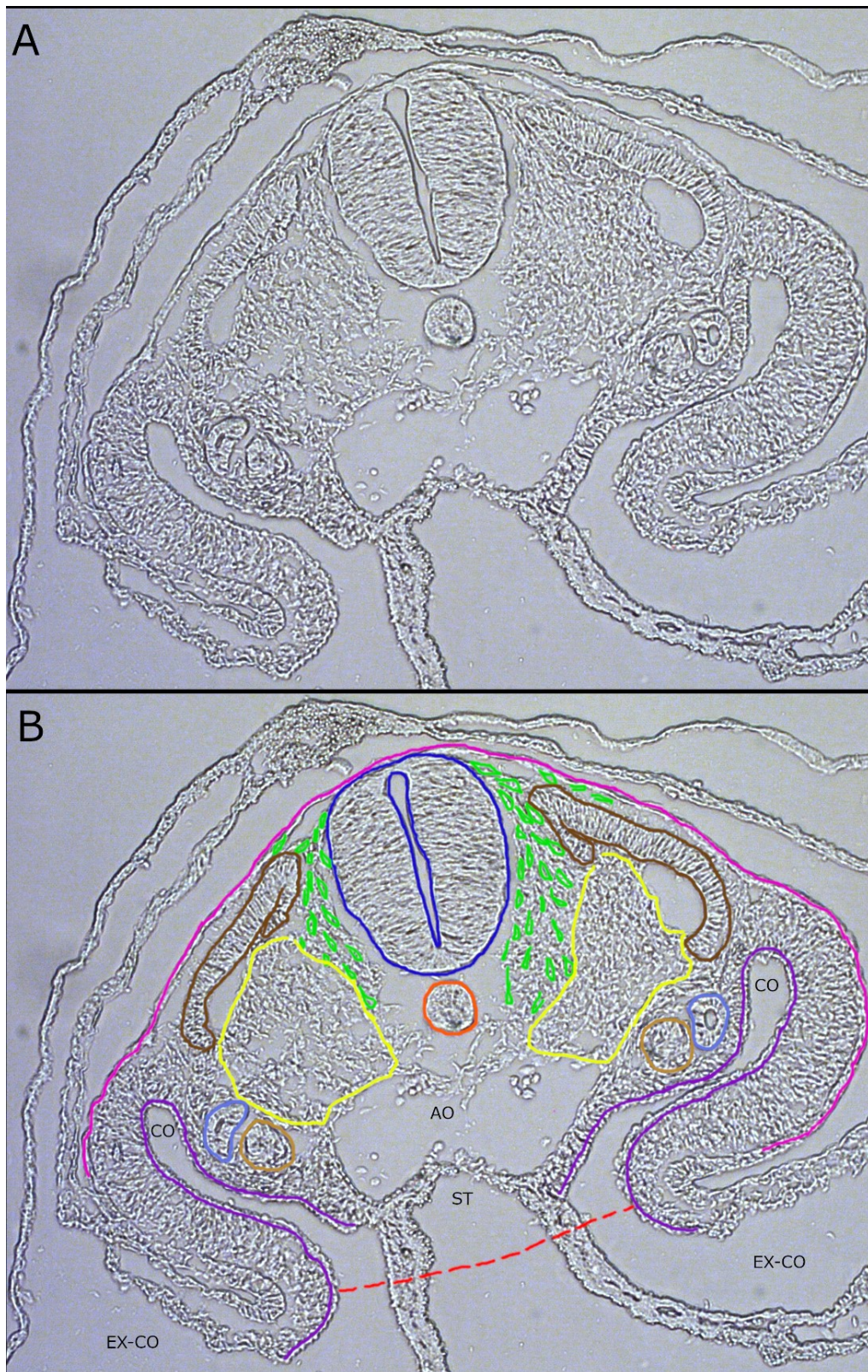


**Obr. 17 - Schéma elektroporace retiny**

Kuřecí embryonální oko bylo ve stádiu E4 elektroporováno tak, aby byla zasažena retina. Elektroporační směs byla vstříknuta do prostoru mezi retinou a čočkou a elektrickým polem vnesena do tkáně. Modře je znázorněna skleněná mikrojebla, zeleně vstříknutá elektroporační směs, plus a mínus označují umístění elektrod, červenými šipkami je naznačen směr putování DNA do tkáně, hnědé puntíky znázorňují umístění retiny.

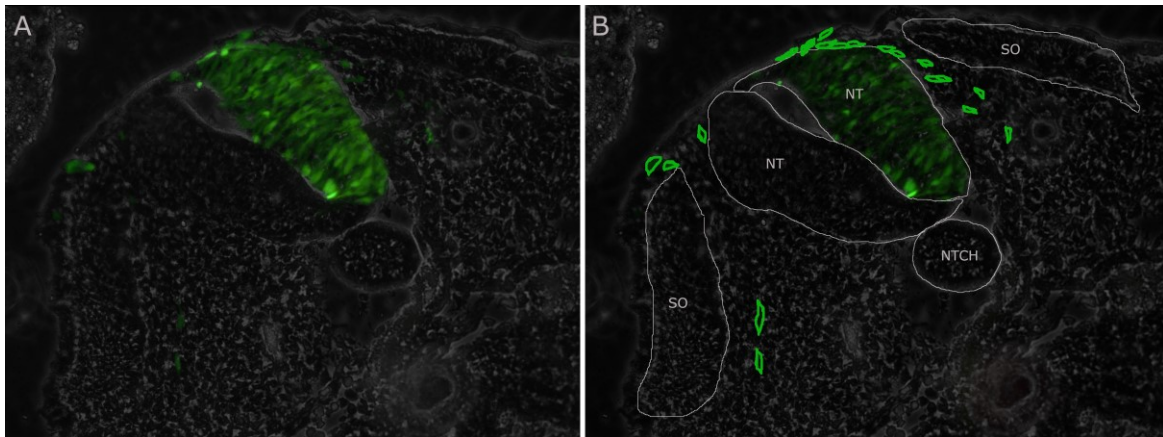
#### 4.1.5 Kryorezy

Kryorezy, mrazové řezy, byly pořízeny na kryotomech Leica. Proti parafinovým řezům mají výhodu, že se po zpracování nemusí fixovat, jen je nutné vzorky před řezáním inkubovat v rostoucí koncentraci sacharózy, která slouží jako kryoprotektivum, a hluboce zamrazit v tekutém dusíku ve vhodném médiu, v našem případě médiu Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound od firmy Sakura. Z takto připravených vzorků je pak možné pořídit řezy o ideální tloušťce 6 až 10  $\mu\text{m}$ , což je zhruba tloušťka jedné vrstvy buněk (rozměry eukaryotických buněk se uvádí mezi 10 a 30  $\mu\text{m}$ ). Řezy se pokládají na sklíčka se speciálně upraveným povrchem, na který snadno přilnou a permanentně drží díky elektrostatické síle, pro naše vzorky byla použita skla Superfrost Plus™ Adhesion Microscope Slides od Thermo Fisher Scientific. Řezy bylo možné ihned pozorovat pod mikroskopem nebo dále barvit. U takto tenkých řezů nebylo nutné buňky permeabilizovat, protože téměř žádná buňka nezůstala intaktní. U silnějších řezů byla aplikována jen krátká permeabilizace kolem 5 min. Nezpracovaná skla bylo možné dlouhodobě skladovat v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Různé zpracování kryorezů kuřecím embryem je znázorněno na obrázcích 18, 19 a 20.



**Obr. 18 - Příčný řez embryem (světlé pole)**

(A) Mrazový řez 10  $\mu\text{m}$  dvoudenním kuřecím embryem ve světlém poli. (B) Stejné embryo s barevně vyznačenými tělními strukturami: epidermis (růžová), neurální trubice (modrá), dermo-myotom (hnědá), buňky neurální lišty (zelená), sklerotom (žlutá), notochord (oranžová), glomerulus (světle hnědá), trubice vyvíjející se ledviny (šedomodrá), vrstva mezodermu (fialová), přerušovaná červená čára – místo srůstu tělních záhybů, AO – oblast, kde se vyvine aorta, ST – oblast, kde se vyvine střevo, CO – embryonální coelom, EX-CO – extra-embryonální coelom, neoznačené povrchové vrstvy = amnion.

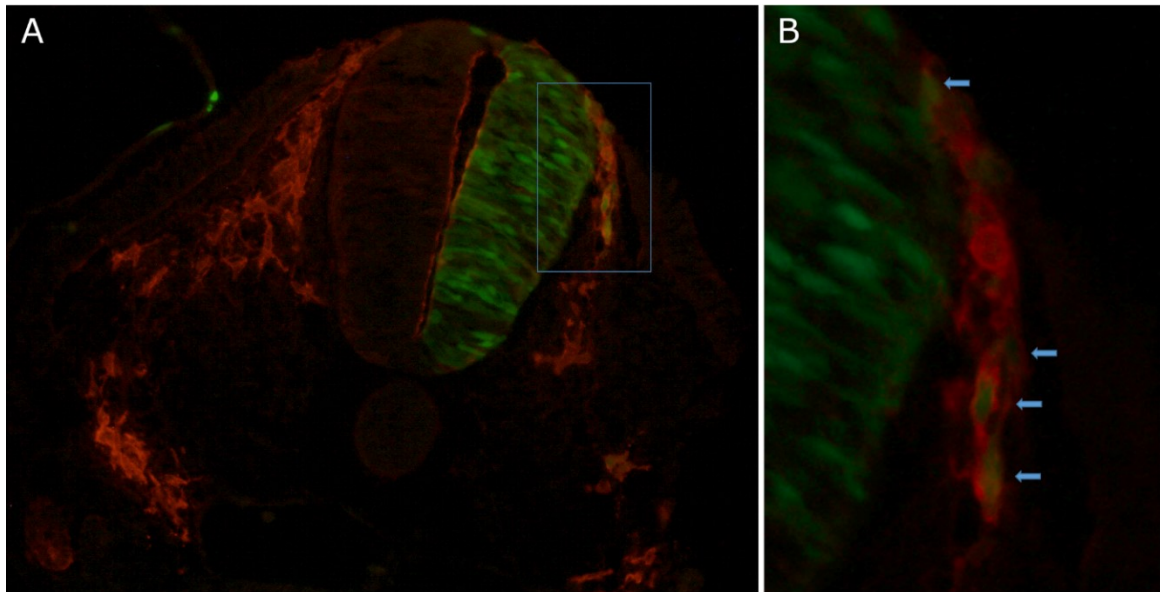


**Obr. 19 – Příčný řez embryem (fluorescence GFP)**

Kryořez kuřecím embryem E2,5 po elektroporaci pCGFP. Zelená fluorescence GFP v neurální trubici (A). Obrázek B je kopií obrázku A se zvýrazněnými tělními struktury embrya (šedě), NT – neurální trubice, SO - somit, NTCH – notochord. Zeleně jsou zvýrazněny buňky neurální lišty migrující z neurální trubice, které zároveň exprimují GFP (B).

**4.1.6 Imunofluorescence**

Buňky NL v okamžiku, kdy delaminují z neurální trubice, začnou ve velkém množství produkovat epitop HNK-1, který lze specificky barvit protilátkou (obrázek 20). Protilátka HNK-1 byla původně vyvinuta za jiným účelem a vyskytuje se i v dalších typech buněk, v kuřecím embryu se však tyto další cíle HNK-1 nevyskytují tak, aby narušovali specifitu barvení. Podle studie (Maxwell *et al.*, 1988), která využívala především metodu FACS, existují v populaci NL buňky, které HNK-1 exprimují jen velmi krátce po delaminaci anebo vůbec. Přes tyto výjimky je HNK-1 dobrý marker buněk NL a pro vizualizaci buněk NL v kuřecím embryu jsme ho využívali i v naší laboratoři. V našich experimentech jsme použili protilátku, kterou jsme obdrželi jako dar od Fabia Malavasiho z Imunogenetické laboratoře v Turíně, existují však i běžně dostupné komerční verze.



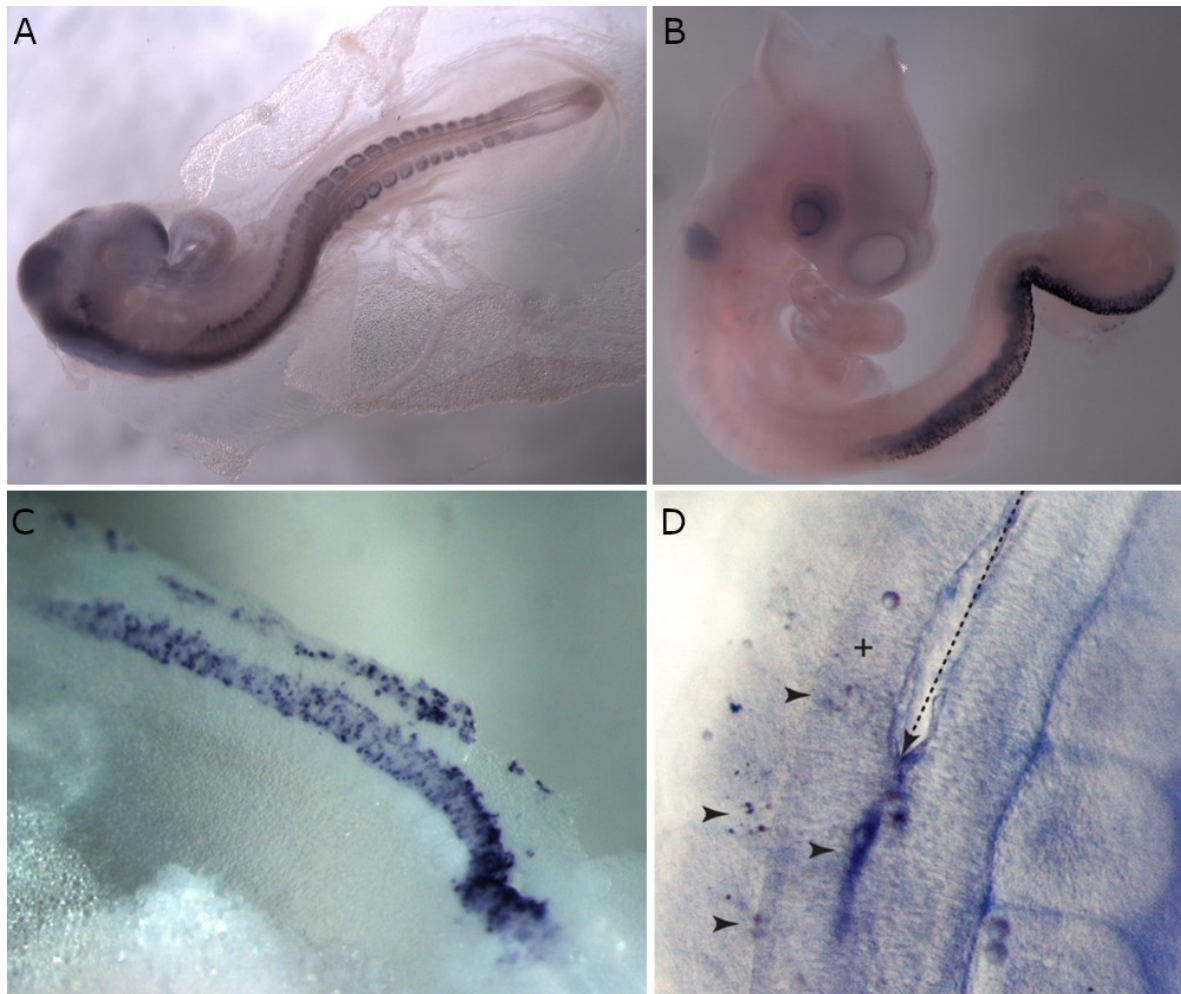
**Obr. 20 - Imunofluorescence HNK-1 na kryožezech**

Příčný mrazový řez trupem embrya elektroporovaného do NT plazmidem pCGFPA ve stádiu HH10, sklizeno a zamrazeno 1 den po elektroporaci (A). Modrý obdélník vyznačuje oblast zvětšenou na obrázku B. Modré šipky ukazují na buňky neurální lišty migrující z neurální trubice, které zároveň exprimují GFP po elektroporaci (B). GFP zelená fluorescence, HNK-1 oranžová fluorescence.

**4.1.7 Hybridizace *in situ* na celém embryu (WISH)**

Metoda hybridizace *in situ* na celém embryu (WISH) patří mezi náročnější metody, u kterých je třeba se vypořádat s mnoha úskalími. Je třeba navrhnout sekvenci pro hybridizační sondu, syntetizovat RNA z ribonukleotidů se značením vhodně zvoleným proteinem, dále vhodnou protilátku proti danému proteinu konjugovanou s enzymem, který je schopen změnit barvu svého substrátu, tak aby došlo k finální vizualizaci. V našem případě byla použita směs ribonukleotidů obsahující část DIG-UTP (uridintrifosfát značený digoxigeninem) a protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s alkalickou fosfatázou (AP). Substrátem fosfatázy byla směs BCIP/NBT, která po reakci získá stabilní okem viditelnou sytě modrofialovou barvu. Až do ukončení fáze hybridizace je třeba celý experiment striktně udržovat v prostředí bez RNázy, hybridizovanou dvouřetězcovou RNA už však RNáza nedegraduje. Metoda WISH umožňuje i detekci dvou genů zároveň, kdy se využívá dvou rozdílně značených sond (DIG a FITC) a postupného barvení nejprve protilátkou konjugovanou s AP proti DIG a barvení běžným substrátem pro modrofialovou reakci, potom barvení protilátkou konjugovanou s AP proti FITC a barvení substrátem s červenou reakcí (Psychoyos a Finnell, 2008). V našem nastavení se bohužel testovaný červený substrát, kterých na trhu není velký výběr, neosvědčil ani při běžně zpracovávané WISH pro jeden gen, a tak bylo od dvojitých pokusů upuštěno. Výsledek reakce velmi

záleží na síle exprese cílového genu v embryu. Detekce přirozené exprese mRNA Gremlin 2 i jeho mírně zvýšené exprese po elektroporaci konstruktem v-Myb byla poměrně nesnadná, zatímco detekce mRNA v-Myb, c-Myb a Gremlin 2 silně exprimovaných po elektroporaci byla nesrovnatelně účinnější. Ukázka výsledků metody WISH z naší laboratoře je zpracována na obrázku 21.



**Obr. 21 - Hybridizace *in situ* na celém embryu (WISH)**

(A) Ukázka WISH na kuřecím embryu ve stádiu E2,5 pro přirozeně exprimovaný gen Pax3, který se vyskytuje v somitech. Sondy laskavě poskytla Eliška Krejčí z Anatomického ústavu 1. LF UK. (B) Detekce exprese v-myb po elektroporaci v-myb, stádium E3. (C) Detekce exprese grem2 po elektroporaci grem2, výřez elektroporované části, stádium E2,5. (D) Detekce exprese grem2 po elektroporaci v-myb, výřez elektroporované části, stádium E3, přerušovaná šipka označuje místo vpichu elektroporační mikrojetly, malé šipky označují buňky pozitivní na grem2.



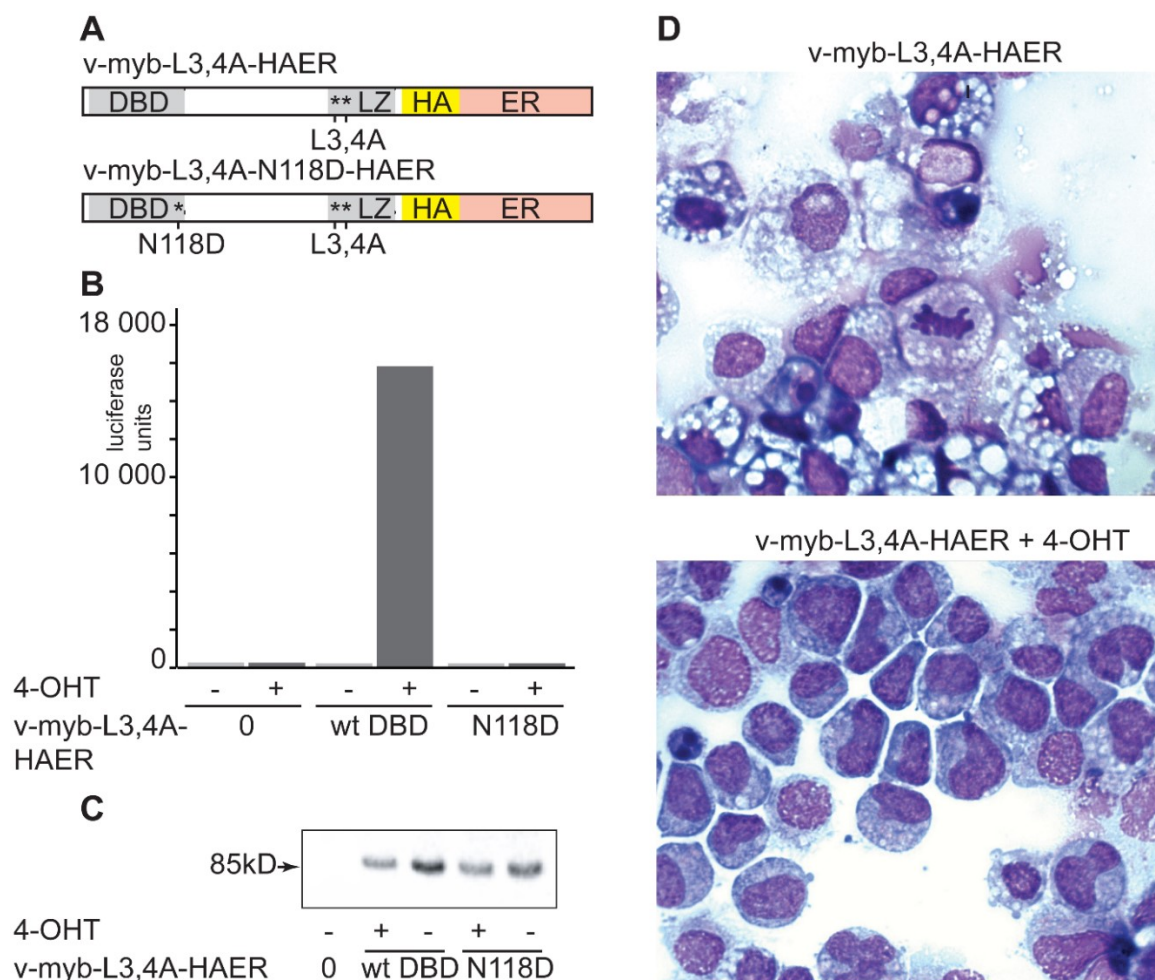
## 4.2 Identifikace časných genů v NL (Starostova *et al.*, 2014)

Jedním ze zásadních předmětů studia v laboratoři Oddělení molekulární virologie byl onkoprotein v-Myb, který je schopen směřovat buňky NL do melanocytární linie. V návaznosti na předchozí výzkumy vznikl projekt, který se zabýval identifikací časných genů v NL s využitím mutant proteinu c-Myb a v-Myb (obrázek 8). Pro identifikaci časných genů ovlivňovaných v-Myb byl využit fakt, že schopnost proteinu v-Myb směřovat buňky NL do melanocytární linie je striktně závislá na specifickém navázání proteinu na DNA element rozpoznávaný Myb (MRE). Byly zkonstruovány alely v-Myb, jimiž kódovaný protein se váže na DNA pouze v přítomnosti 4-OHT (4-hydroxytamoxifen). Analýza transkribované RNA byla provedena po 4 hodinách po aktivaci proteinu v-Myb. Jako jeden z velmi časných dějů navozených tímto experimentem bylo pozorováno zvýšení transkripce antagonisty BMP Gremlinu 2 a snížení transkripce mRNA kódujících několik epiteliálních genů včetně KRT19.

### 4.2.1 Konstrukty mutant genu *v-myb*

Mutanty genu *v-myb* byly zkonstruovány tak, aby bylo možné přesně řídit jejich aktivaci v čase. K tomuto účelu byla využita indukce mutanty estrogenového receptoru tamoxifenem. První experimenty byly provedeny s konstruktem divokého typu genu *v-myb* v retrovirovém vektoru, na jehož C-konci byly připojeny dva hemagglutininové epitopy a myší doména pro estrogenový receptor obsahující mutaci G525R. Tento konstrukt však vykazoval poměrně vysokou aktivitu i předtím, než byl spuštěn tamoxifenem. K tomuto jevu docházelo proto, že ER doména protein stabilizuje a v buňce se tak vyskytuje příliš vysoká koncentrace proteinu. Z tohoto důvodu byly sestrojeny mutanty se slabší aktivitou, které se aktivovaly striktně po přidání tamoxifenu (obrázek 22A). Mutanta *v-myb*-L3,4A-HAER si zachovává schopnost transaktivace i buněčnou specificitu (obrázek 22B), její biologická aktivita je však slabší než u divokého typu proteinu v-Myb (Bartunek *et al.*, 1997). Aktivita mutanty *v-myb*-L3,4A-N118D-HAER je velmi podobná *v-myb*-L3,4A-HAER, obsahuje však mutaci v DNA vazebné doméně. Tato mutace úplně ruší schopnost specifického rozeznání MRE (Ogata *et al.*, 1994). V buňkách infikovaných retrovirovou variantou *v-myb*-L3,4A-HAER nebo *v-myb*-N118D-HAER byl fúzní protein v-Myb syntetizován ve srovnatelném množství (obrázek 22C). Konstrukty byly transfekovány do CEF, virus z konstruktů byl tkáňovými kulturami produkován do média.

Finální zásobní roztok byl koncentrován na filtrech tak, aby obsahoval  $10^6$ /ml virových částic (Karafiat *et al.*, 2007). Infekce potom bylo dosaženo přidáním malého objemu zásobního média s virusem do již připravených kultur v čerstvém médiu.

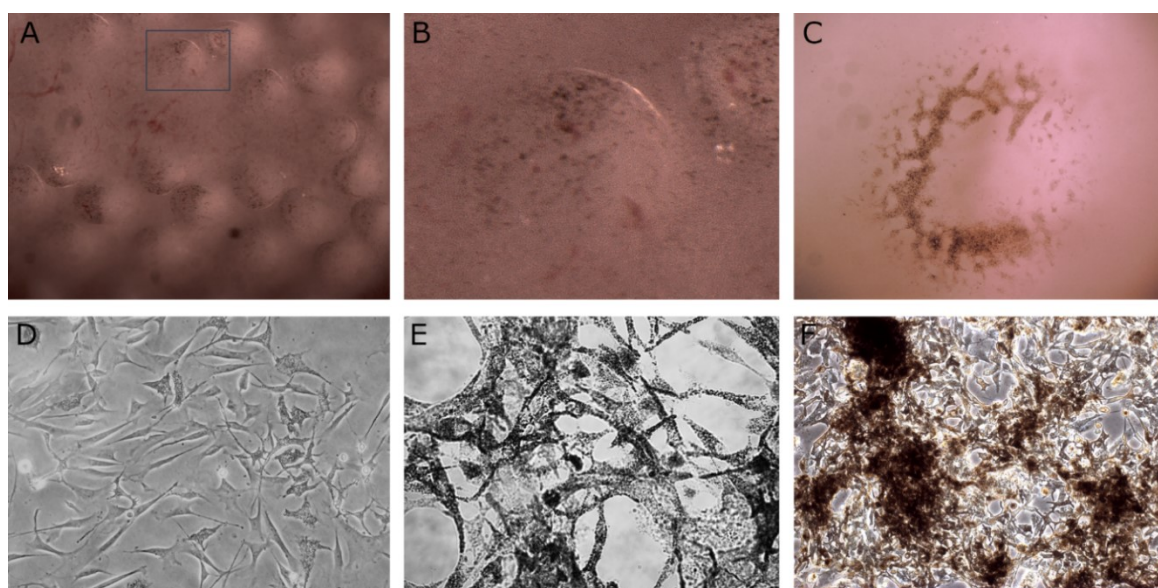


**Obr. 22 - Konstrukty mutant v-Myb, schéma a aktivita**

(A) Schématické znázornění konstruktů mutant v-myb-L3,4A-HAER a v-myb-L3,4A-N118D-HAER. DBD = DNA vazebná doména, \* = mutace L3,4A a N118D, LZ = leucinový zip, HA = 2 hemagglutininové epitopy, ER = myší estrogenový receptor s mutací G525R. (B) Transkripční aktivita proteinů v-myb-L3,4A-HAER a v-myb-L3,4A-HAER závislá na 4-OHT v tranzientně transfekovaných CEF nesoucích luciferázový Myb-responzivní reportér. (C) Detekce fúzních proteinů v-Myb ve stabilně transfekovaných CEF. Fúzní proteiny o velikosti 85kDA byly detekovány anti-HA protilátkou. Na gel bylo vždy nanášeno stejné celkové množství proteinu. (D) Suspenzní kultura buněk z kuřecí kostní dřeně 14 dní po infekci retrovirem v-myb-L3,4A-HAER. V nepřítomnosti 4-OHT se hromadí převážně makrofágy (horní panel), zatímco po aktivaci 4-OHT převládají nezralé transformované monoblasty (spodní panel).

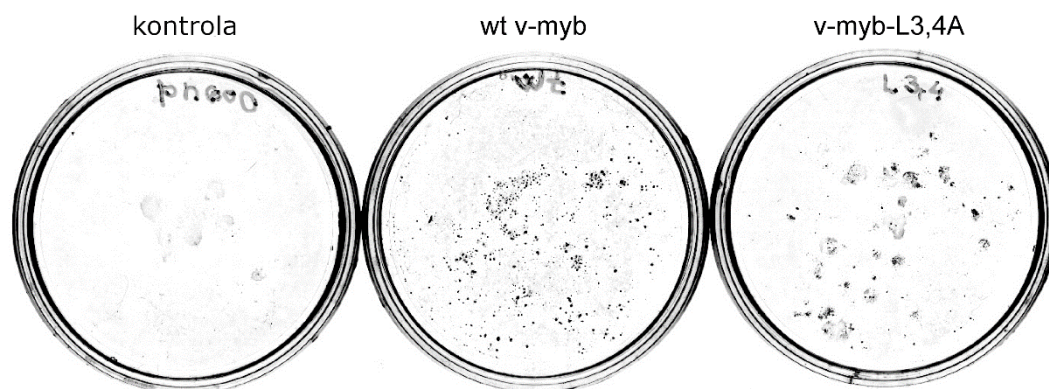
#### 4.2.2 Mutanty v-Myb-L3,4A přispívají k diferenciaci melanocytů

Předběžná pozorování na buňkách NL infikovaných různými variantami v-Myb potvrdila jeho vliv na vývoj melanocytů. Buňky použité pro tyto experimenty byly získány z infikovaných explantových kultur. Po mechanickém odstranění explantů po 3 dnech kultivace zůstala v kultuře směs buněk NL z obou vln migrace, neurony a glie i melanocyty. Ukázka přirozeného vývoje melanocytů *in vivo* a *in vitro* a vývoje ovlivněného v-Myb je znázorněna na obrázcích 23 a 24.



#### Obr. 23 - Melanocyty

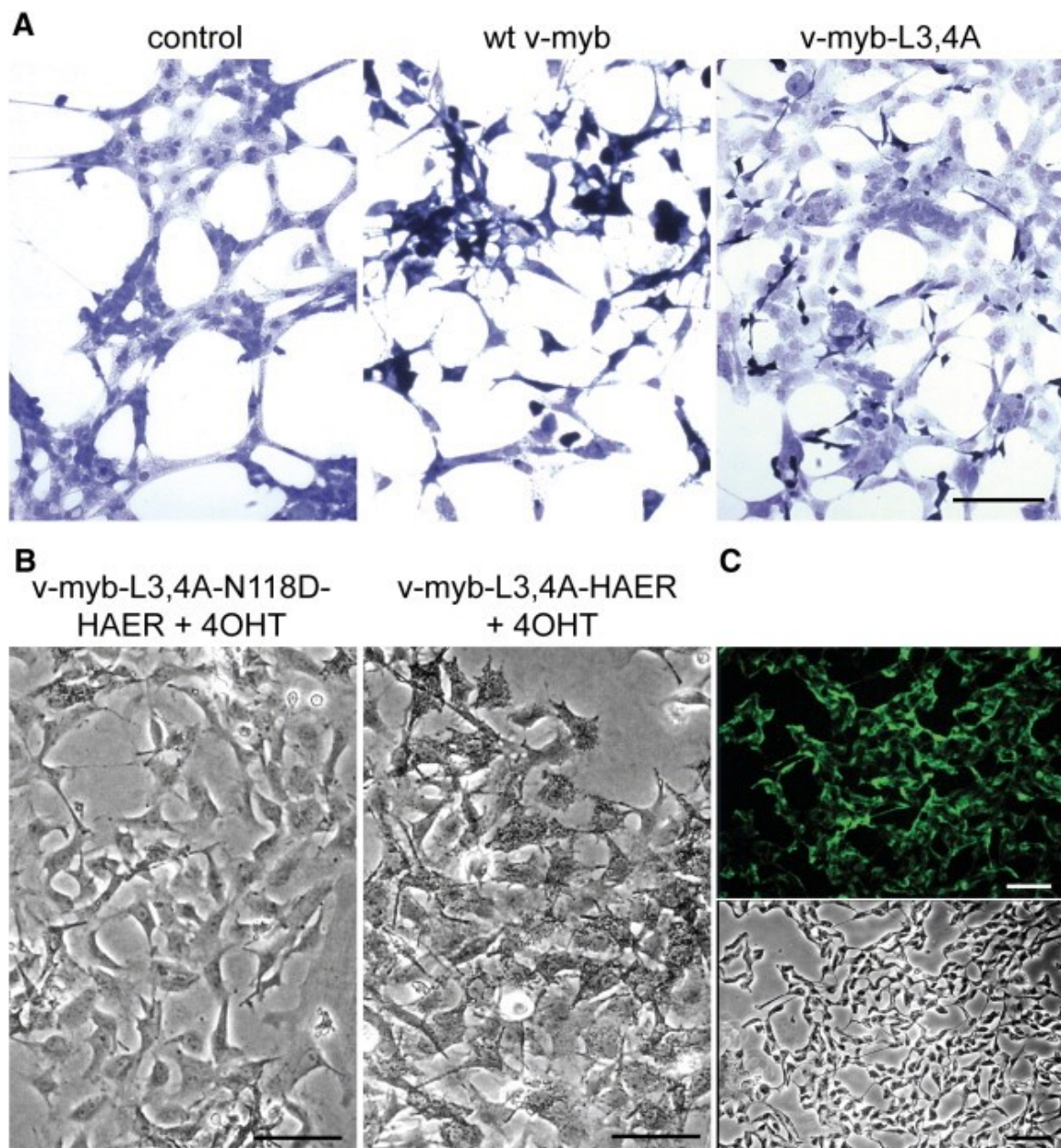
(A) Základy peří ve vyvíjející se kůži kuřecího embrya s viditelnými ostrůvky pigmentu, který vytvářejí melanocyty pocházející z neurální lišty. (B) Zvětšený výřez jednoho pupenu vyvíjejícího se pera, na obrázku A označený obdélníkem. (C) Kolonie buněk vyputovaných z jednoho explantu v kultuře buněk neurální lišty infikované v-Myb a zvětšené pod binokulární lupou, melaninová granula produkovaná melanocyty jsou viditelná ve světlém poli. (D) Přirozená kultura buněk neurální lišty získaná z explantu neurální trubice, poměr melanocytů je mnohem menší než v případě působení v-Myb. (E) Granula melaninu viditelná ve světlém poli v kultuře melanocytů. (F) Melanocyty a meloblasty v kultuře buněk neurální lišty infikované v-Myb po delší kultivaci.



**Obr. 24 - Vliv proteinu v-Myb na vývoj buněk NL**

Makroskopický pohled na explantovou kulturu buněk NL. Viditelné tmavé skvrny způsobují granula melaninu v pigmentových buňkách. Zleva: Buňky v kultuře infikované retrovirovým vektorem pNeo0 bez přítomnosti v-Myb, buňky infikované pNeo-v-myb v přítomnosti divokého typu v-Myb, buňky infikované pNeo-v-myb-L3,4A v přítomnosti mutovaného proteinu v-Myb po delší kultivaci.

Nejprve bylo třeba se ujistit, že mutace L3,4A nenarušuje schopnost proteinu v-Myb směřovat buňky NL do melanocytární linie. Buňky byly tedy infikovány variantami divokého wt-v-myb a mutovaného L3,4A-v-myb virového vektoru, které produkují nefúzní proteiny. Na obrázku 25A je ukázáno, že mutanta L3,4A i nadále aktivuje diferenciaci melanocytů podobně jako wt-v-myb, ale ztrácí schopnost je transformovat, takže se v kultuře nevytváří hrozny kulatých nezralých buněk jako je tomu u divokého typu (obrázek 25A). Mutanta v-myb-L3,4A-HAER vykazovala vliv na diferenciaci melanocytů, podobně jako tomu bylo v případě myeloidních buněk. Mutanta v-myb-L3,4A-N118D-HAER žádný takový vliv nevykazuje (obrázek 25B). V podstatě všechny buňky v těchto kulturách exprimovaly epitop HNK-1, který je charakteristický pro časně buňky NL (obrázek 25C).



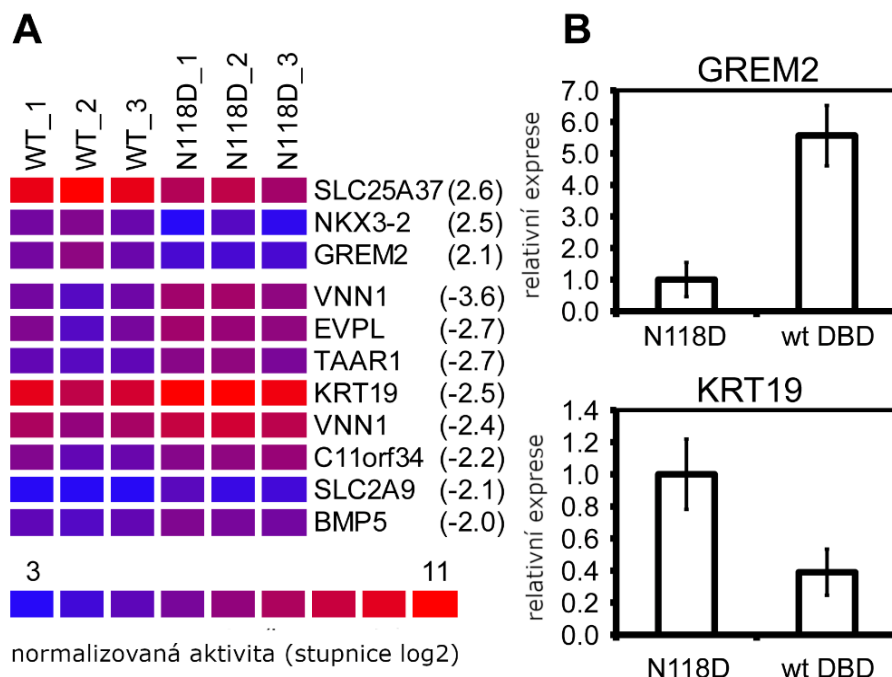
**Obr. 25 - Mutanty v-Myb aktivují diferenciaci buněk NL na melanocyty nezávisle na MRE**

(A) Buňky neurální lišty v kultuře po infekci prázdným kontrolním retrovirem (nalevo), retrovirem nesoucím wt-v-Myb (uprostřed) a mutantu L3,4A (napravo). Tmavé buňky jsou pigmentové buňky obsahující melanin. (B) Po přidání 200 nM 4-OHT se v kultuře infikované v-myb-L3,4A-HAER hromadí pigmentové buňky (pravý panel), zatímco v kultuře infikované v-myb-L3,4A-N118D-HAER se téměř nevyskytují. Úsečka 50  $\mu$ m. (C) Reprezentativní ukázka kultury buněk NL po reakci s protilátkou proti epitopu HNK-1 (horní panel). Stejný obraz ve fázovém kontrastu (spodní panel), úsečka 50  $\mu$ m (Starostova *et al.*, 2014).

#### 4.2.3 Mikročipová analýza

Kultury buněk NL byly infikovány retroviry v-myb-L3,4A-HAER a v-myb-L3,4A-N118D-HAER. Po 80 hodinách od infekce byl do kultur přidán tamoxifen.

Po 4 h v přítomnosti tamoxifenu byla z buněk z obou kultur izolována RNA a předána na analýzu profilu genové exprese. Každá kultura obsahovala buňky získané z explantů neurálních trubíc z přibližně 12 embryí. Vzhledem k relativně malému množství buněk NL v kulturách bylo nutná trojitá opakování experimentu pro získání dostatečného množství materiálu na jednu mikročipovou analýzu, tzn., že jeden vzorek byl získán z přibližně 36 40 embryí, což samo o sobě eliminuje variabilitu v expresi, kterou by bylo možné očekávat u jednotlivých embryí. Celkem byly připraveny tři nezávislé vzorky RNA pro v-myb-L3,4A-HAER + 4-OHT a tři nezávislé vzorky RNA pro v-myb-L3,4AN118D-HAER + 4-OHT. Genová exprese byla analyzována na čípech Affymetrix GeneChip Chicken Genome Arrays. Za signifikantní byly považovány jen změny, které dosáhly více než dvojnásobek průměrného rozdílu v normalizované intenzitě a hodnotu p-value měly 0.05 nebo nižší. Ze srovnání vyplynuly 3 geny se zvýšenou expresí (SLC25A37, NKX3-2 a GREM2) a 7 genů se sníženou expresí (VNN1, EVPL, TAAR1, KRT19, C11orf34, SLC2A9 a BMP5), které splňovaly výše zmíněná kritéria (obrázek 26A). Pro ověření těchto výsledků byla na stejné sadě mRNA provedena analýza PCR v reálném čase pro geny GREM2, NKX3.2, KRT19, VNN1 a TAAR1 (obrázek 26B).

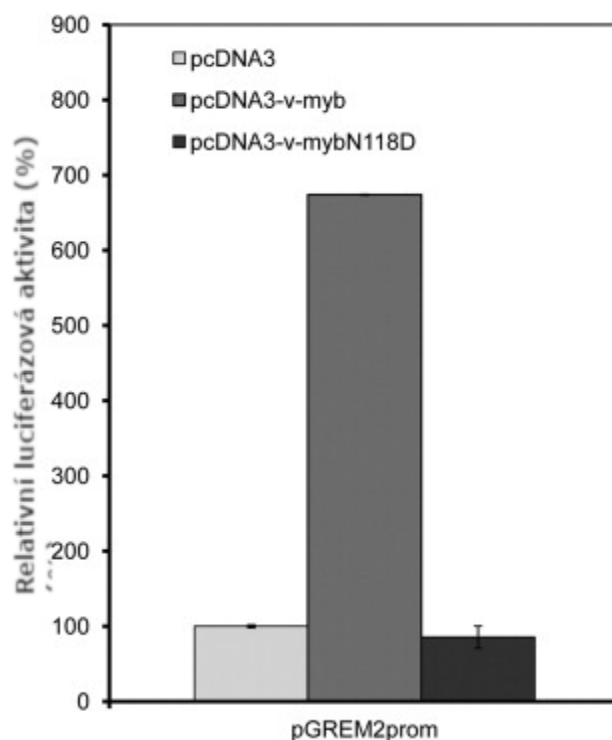


**Obr. 26 - Profil genové exprese buněk NL infikovaných konstrukty v-myb-HAER a aktivovaných 4-OHT**

(A) Buňky NL nesoucí alelu v-myb-L3,4A-HAER divokého typu (WT) nebo v-myb-L3,4A-N118D-HAER (N118D) byly sklizeny 4 h po aktivaci 4-OHT a analyzovány na čípech Affymetrix GeneChip Chicken Genome Arrays. Barvy reprezentují hladiny genové exprese podle detekované intenzity signálu z mikročipové analýzy (vynesené hodnoty jsou zlogaritmovány). Čísla v závorkách indikují, kolikrát je větší rozdíl normalizované intenzity mezi vzorky wt a N118D. (B) Analýza qPCR hladin exprese indikovaných genů ve stejné sadě vzorků potvrzuje výsledky z čipů. Hodnoty relativní exprese byly normalizovány, takže vzorek N118D se rovná 1,0 pro každý gen.

#### 4.2.4 Gremlin 2

Nejprve bylo nutné zodpovědět, zda gen *gremlin 2* obsahuje promotor citlivý na transaktivaci proteinem v-Myb. Z experimentů 5'-RACE byly získány produkty DNA pokrývající sekvenci více než 2,5 kb „up-stream“ od iniciačního kodónu ATG *gremlinu 2*, ze které lze vyvodit, že blízké ostrůvky CpG nemají promotorovou funkci a že promotor je obsažen v oblasti 5'-UTR transkriptu GREM2 (Čermák, nepublikováno). Putativní začátek transkripce byl lokalizován 3,8 kb „up-stream“ od iniciačního kodónu ATG. V blízkosti byla také nalezena dvě MRE (-500 a +130 bp). Pro účely další analýzy byl zkonstruován reportérový plazmid nesoucí sekvenci putativního promotorového místa a jeho okolních sekvencí (-540 až +215) „up-stream“ od kódující sekvence pro luciferázu. Tento plazmid (p-gremlin-2-prom) byl použit pro tranzientní transkripční pokusy. Putativní promotor Gremlinu 2 spouští expresi reportérového genu a vykazuje signifikantní závislost na v-Myb divokého typu, zatímco pro mutantu N118D žádnou závislost nevykazuje (obrázek 27).

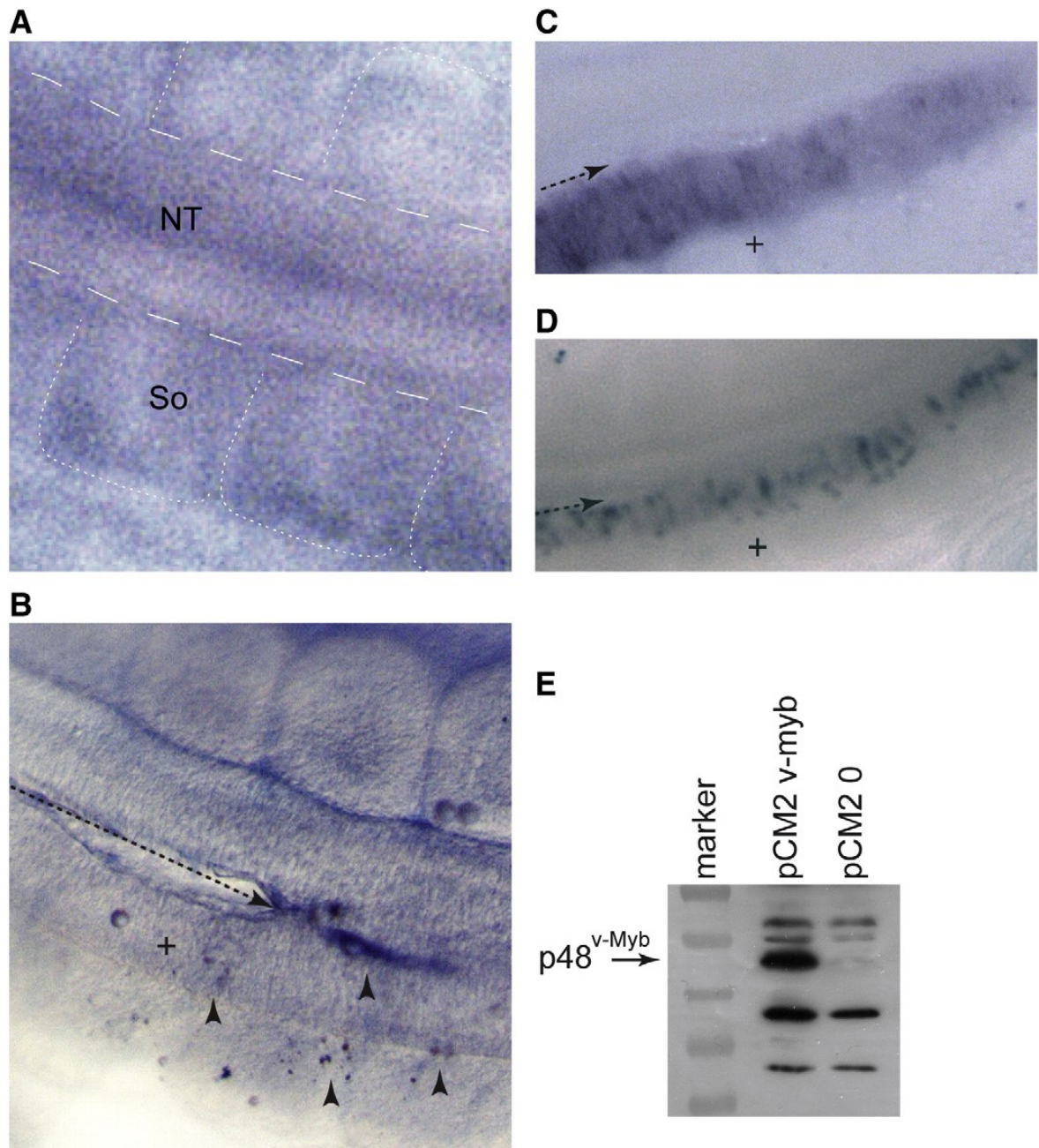


**Obr. 27 - Aktivace transkripce reportérového genu**

K aktivaci transkripce luciferázového reportérového genu pod kontrolou fragmentu potenciálního promotoru Gremlinu 2 (konstrukt pGREM2prom) dochází v případě wt-v-myb, zatímco v případě mutanty N118D k aktivaci nedochází. Alely wt-v-myb a N118D-v-myb byly exprimovány z vektoru pCDNA3. Prázdný vektor pCDNA3 byl použit jako kontrola.

Další experimenty měly prokázat, zda v-Myb aktivuje transkripci Gremlinu 2 v neurálních buňkách v oblasti trupu kuřecího embrya. Embrya ve stádiu HH10–11 byla elektroporována vektorem pCLAG2-v-myb a po 24 a 48 h analyzována technikou *in situ* hybridizace na celém embryu (WISH). Endogenní mRNA Gremlinu 2 byla spíše nedetekovatelná (obrázek 28A), snadno detekovatelná byla mRNA Gremlinu 2 produkovaná z elektroporovaného expresního vektoru pGR2 (obrázek 28C). Dále byl do kuřecích embryí ve stádiu HH10-11 elektroporován vektor pCLAG2-v-myb, WISH byla provedena po 24 h. V místě vpichu byla detekovatelná mRNA Gremlinu 2 a dále v malých klastrech buněk pravděpodobně putujících laterálně z elektroporované části neurální trubice (obrázek 28B). Z těchto pokusů vyplývá možnost, že v-Myb aktivuje transkripci *gremlinu 2* také *in ovo*. Syntéza mRNA a proteinu v-Myb ve tkáních elektroporovaných vektorem pCLAG2-v-myb byla ukázána v paralelních experimentech (obrázky 28D a 28E).





**Obr. 28 - Detekce buněk syntetizujících mRNA Gremlinu 2 v kuřecím embryu**

(A) S využitím techniky WISH byla ukázána absence mRNA Gremlinu 2 v neurální tkáni v oblasti trupu u kuřecího embrya ve stádiu HH21 — dorzální pohled (NT — neurální trubice, So, somit). (B) Detekce mRNA Gremlinu 2 v kuřecím embryu elektroporovaném expresním vektorem pCLAG2-v-myb (stádia HH10–11), analyzováno 24 h po elektroporaci — dorzální pohled. Malé šipky ukazují na oblast pozitivní na Gremlin 2 a na pozitivní migrující buňky. (C) Detekce mRNA Gremlinu 2 v neurální trubici kuřecího embrya s využitím techniky WISH (stádia HH10–11) elektroporované expresním vektorem pCLAG2-gremlin-2, analyzováno 24 h po elektroporaci — dorzální pohled. (D) Detekce mRNA v-Myb po elektroporaci vektorem pCLAG2-v-myb. Experiment proveden stejně jako u (C). (E) Analýza „Western blot“ proteinu v-Myb v části neurální trubice elektroporované pCLAG2-v-myb. Jako kontroly byla použita embrya elektroporovaná vektorem pCLAG2-0, který nenes v-myb, analýza „Western blot“ byla provedena, jak je popsáno jinde (Karafiat *et al.*, 2005). Šipka s přerušovanou čarou představuje jehlu, kterou byla provedena injekce expresního vektoru. Znaménko plus (+) označuje elektroporovanou stranu neurální trubice.

Další otázkou bylo, zda Gremlin 2 může zprostředkovat vliv proteinu v-Myb i v buňkách NL. Gremlin 2 (nebo také PRDC, DAND3) je jedním z antagonistů BMP z rodiny Cerberus/DAN. Tento vysoce konzervovaný protein o velikosti 17 kDa byl poprvé objeven na myších (Minabe-Saegusa *et al.*, 1998). Konzervovanost jeho proteinové sekvence je mezi člověkem a kuřetem více než 83%. Gremlin 2 pracuje ve spojení se signalizačními drahami wnt/ $\beta$ -catenin a BMP (Im *et al.*, 2007; Klapholz-Brown *et al.*, 2007; Zuniga *et al.*, 2011). Některé studie předpokládají jeho roli v dorzoventrálním formování faciální kostry u rybičky *Danio rerio* (Zuniga *et al.*, 2011), v inhibici osteoblastické diferenciaci v myších (Ideno *et al.*, 2009) a v regulaci neurogeneze v plakodě kuřecích embryí (Kriebitz *et al.*, 2009). V současnosti není mnoho známo o jeho roli v NL. Jakožto antagonist BMP by Gremlin 2 mohl navyšovat množství melanogenních buněk v kulturách kuřecí NL skrze inhibici BMP-4. Protein BMP-4 podporuje vývoj glií a neuronů na úkor melanocytů *in vitro* (Jin *et al.*, 2001). Aby bylo možno prokázat, zda samotný Gremlin 2 dokáže aktivovat genetický program diferenciaci pigmentových buněk a zda dokáže nahradit transkripční regulaci v-Myb v melanogenezi buněk NL, byl sestaven retrovirový expresní vektor nesoucí celodélkový transkript cDNA Gremlinu 2 a exprimován v kulturách buněk NL *in vitro*. Bylo provedeno několik nezávislých pokusů, ale neprokázaly žádnou signifikantní změnu v akceleraci diferenciaci melanocytů. Retrovirový vektor nesoucí Gremlin 2 byl také elektroporován do neurálních valů kuřecích embryí ve stádiu HH10–11 a vizualizovány buňky exprimující Gremlin 2 (obrázek 28C). Z pokusů vyplynulo, že je nepravděpodobné, že by Gremlin 2 sám spouštěl komitment melanogenní linie buněk a diferenciaci v NL, nicméně pravděpodobně přispívá k regulační mašinérii formování melanocytů jako antagonist BMP.

#### 4.2.5 Další geny vykazující zvýšenou expresi

Mezi dalšími geny vykazujícími zvýšení exprese více než dvakrát byly SLC25A37 a NKX3-2 (obrázek 26A). Protein SLC25A37 je transportér železa ve vnitřní mitochondriální membráně a NKX3-2 gen homeoboxu, který se pravděpodobně účastní kosterního vývoje. V současné době neexistuje žádná studie, která by je uváděla do souvislosti s vývojem NL.

#### 4.2.6 Geny se sníženou expresí

KRT 19: Proteiny Myb indukují EMT v kuřecím neuroepitelu a napomáhají formování migrujících buněk NL. Pro EMT je charakteristická ztráta buněčné adheze a apikálně-bazální polarita, zvýšení exprese mezenchymálních genů, reorganizace cytoskeletu, nárůst motility a zvýšená odolnost k apoptóze. Při EMT dochází ke snížení exprese genů KRT8, KRT18 a KRT19, které kódují epiteliální cytokeratiny (Tomaskovic-Crook a Crook, 2011).

BMP5: Podle souhrnu analýz WISH z databáze Geisha (<http://geisha.arizona.edu/geisha/>) je mRNA proteinu BMP 5 exprimována v kuřecím embryu v různých stádiích vývoje v ledvinách, játrech, mezenchymu končetin, neurální trubici a dalších tkáních. BMP5 je nezbytný pro vývoj ledvin. Bylo prokázáno, že *in vitro* zmírňuje v proximálních tubulárních buňkách proces EMT navozený TGF- $\beta$  (Bramlage *et al.*, 2011). Na základě těchto pozorování je možné usuzovat, že KRT19 a BMP5 mohou fungovat podobným způsobem i v buňkách NL a snížení exprese těchto genů může přispívat k progresi EMT v buněčných kulturách odvozených od NL infikovaných proteinem v-Myb.

#### 4.2.7 Shrnutí

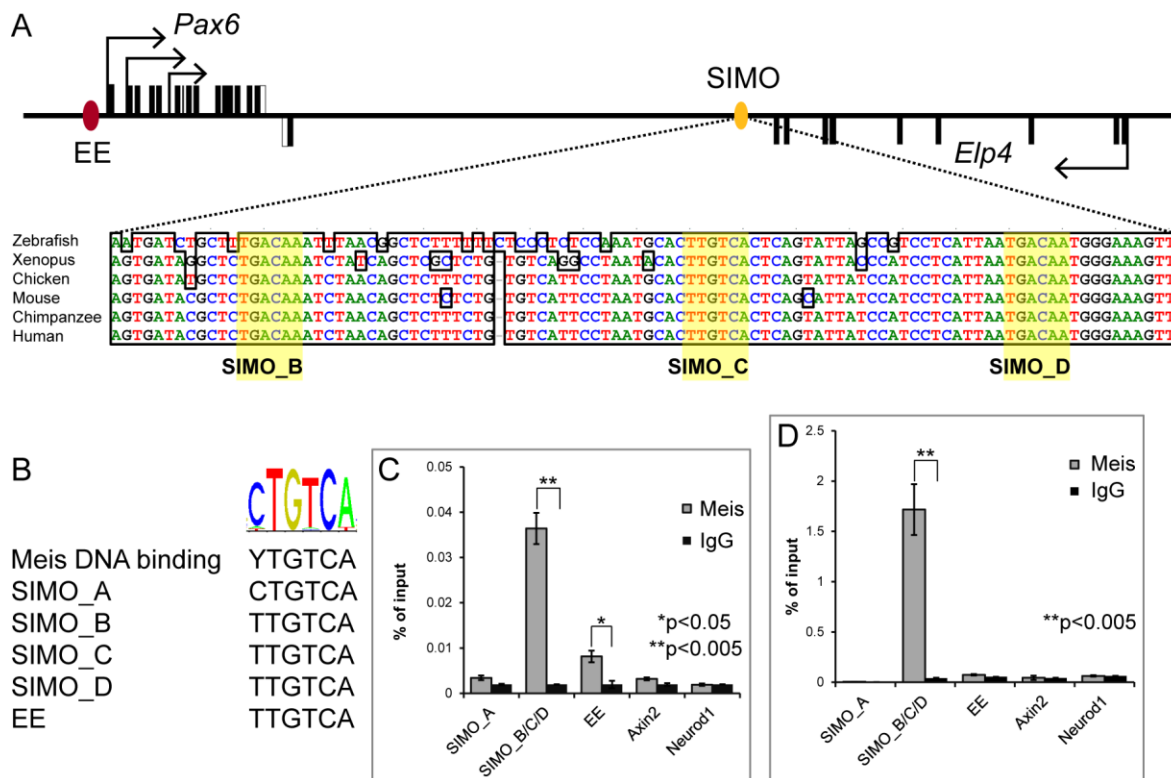
S využitím výše zmíněných postupů a kultur multipotentních buněk kuřecí NL bylo možno identifikovat geny modulované aktivitou proteinu v-Myb v časném stádiu regulace. Experimentální strategie byla nastavena tak, aby byly zachyceny jen geny, které jsou závislé na specifickém navázání v-Myb a zároveň jsou aktivovány nebo reprimovány do 4 h po aktivaci v-myb-HAER. Studie poukázala na 3 geny se zvýšenou expresí (SLC25A37, NKX3-2 a GREM2) a 7 genů se sníženou expresí (VNN1, EVPL, TAAR1, KRT19, C11orf34, SLC2A9 a BMP5) (obrázek 26A). Antagonista BMP-4 Gremlin 2 byl analyzován detailněji, vzhledem k jeho možné roli ve formování melanocytů. Z výsledků lze vyvodit, že Gremlin 2 je cílovým genem v-Myb, ale nedokáže v-Myb nahradit ve funkci při tvorbě melanocytů, protože Gremlin 2 sám nedokáže přepnout buňky NL do melanocytární linie.

### 4.3 Signalizace v regulaci indukce čočky (Antosova *et al.*, 2016)

Metody mikromanipulace s kuřecími embryi umožňují přesně místně a časově řízeným způsobem vnášet geny do embrya a následně vizualizovat a sledovat jejich expresi v daném orgánu. V případě následující studie se jedná o metody „gain-of-function“ a „loss of-function“ s využitím LacZ jako reportérového genu. Buněčnou strukturou manipulovanou s využitím metody elektroporace *in ovo* v této studii bylo vyvíjející se oko a čočka. Výsledky z kuřecího embrya byly využity k doplnění studie na myším modelu.

#### 4.3.1 Exprese Pax6 je redundantně závislá na Meis1 a Meis2

Hypotéza pro tuto studii byla založena na pozorování, že myši deficientní v genu *meis1* vykazují v pozdějších stádiích jen mírné změny ve vývoji čočky (Hisa *et al.*, 2004). Vzhledem k tomu, že Meis 1 a Meis2 vykazují podobný expresní vzorec, existuje možnost, že jeden protein zastupuje druhý, jsou tedy geneticky redundantní. Pro ověření této hypotézy byla s pomocí Cre-Lox rekombinace sestrojena alela *meis2* a zkoumán vliv kombinovaného vyřazení obou proteinů Meis1 a Meis2 a potvrdilo se, že samotný Meis2 není esenciální pro vývoj čočky, zatímco Meis1/2 jsou pro správný vývoj redundantně nezbytné. S využitím metody chromatinové precipitace bylo prokázáno, že homeoproteiny Meis se vážou kromě EE i na SIMO, vzdálený ultrakonzervovaný enhancer genu *pax6*. Dále genová reportérová analýza *in vivo* prokázala specifickou aktivitu enhanceru SIMO v čočce, která je závislá na přítomnosti tří vazebných míst pro Meis. Tato místa jsou konzervována od člověka až po zebřičku (*Danio rerio*) (obrázek 29A).



**Obr. 29 - Proteiny Meis se vážou na element SIMO genu *pax6* in vivo**

(A) Schéma lokusu *pax6*, černá polička na horní straně osy znázorňují exony, černá polička na spodní straně osy znázorňují následující gen *elp4*. Ektodermový enhancer (EE) je označen červeným oválem, enhancer SIMO je označen žlutým oválem. Detail ukazuje vysoce konzervovanou část SIMO napříč živočišnými druhy. SIMO obsahuje pět předpokládaných vazebných míst pro Meis, tři z nich, SIMO\_B, SIMO\_C a SIMO\_D, byla nalezena ve vysoce konzervované části SIMO (označeno žlutě). (B) Nukleotidové složení vybraných předpokládaných míst nalezených v SIMO a jejich srovnání s konsezním vazebným místem pro Meis a vazebným místem pro Meis nalezeným v EE. (C, D) Výsledky chromatinové imunoprecipitace fragmentů DNA navázaných na Meis provedené se směsí specifických protilátek proti Meis1 a Meis2 na chromatinu získaném z celých embryí ve stádiu E10,5 (C) nebo z epiteliálních buněk čočky z  $\alpha$ TN4 myši (D). Výsledky prokázaly jednoznačné navýšení na enhanceru SIMO (C, D). Chybové úsečky vyznačují hodnoty standardních odchylek, \*p a \*\*p oproti kontrole zpracované Studentovým *t*-testem (Antosova *et al.*, 2016).

Delece v oblasti SIMO použité v experimentech *in vivo* poukázaly na vzájemnou redundanci Meis a EE a umožnily hlouběji porozumět funkci SIMO ve vývoji čočky (obrázek 29B). V případě souběžné delece SIMO a EE *in vivo* vůbec nedocházelo k tvorbě čočky, což dále potvrdilo důležitost těchto dvou strukturálně obdobných enhancerů pro regulaci *Pax6* v indukci čočky. Tato práce prokázala existenci dvou nezávislých a částečně redundantních enhancerů závislých na Meis, čímž poukázala na neočekávanou robustnost regulačního systému ve vývoji čočky.

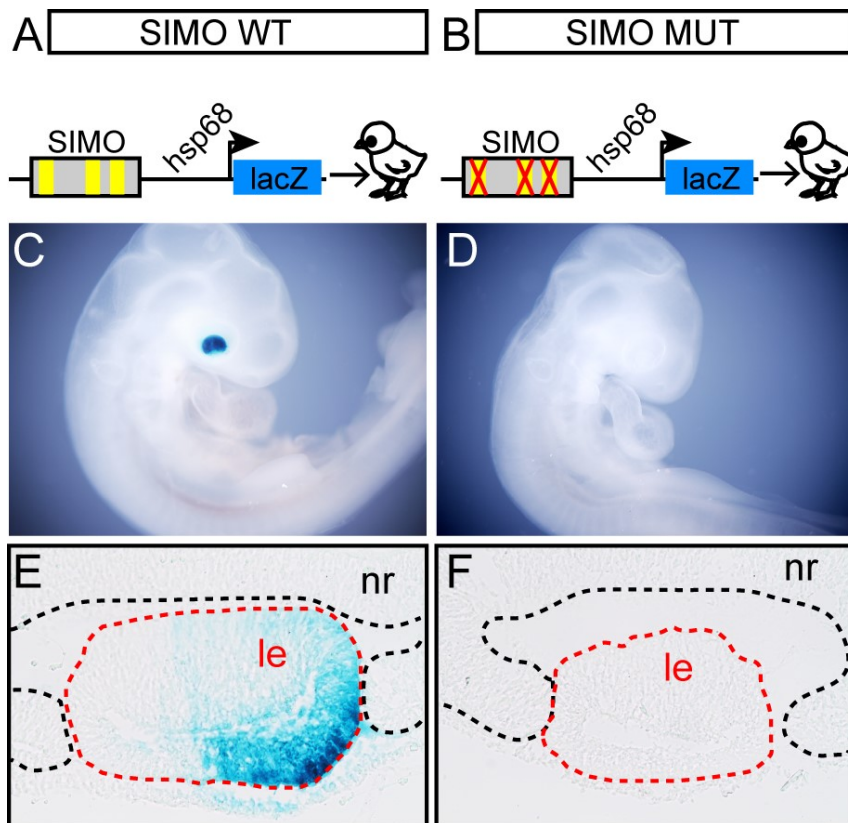
#### 4.2.2 Elektroporace do vyvíjejícího se oka kuřecího embrya *in ovo*

Kuřecí embrya byla elektroporována do očního váčku ve stádiu HH10-11 tak, aby elektrické pole zahrnovalo vyvíjející se optický váček a nastavení elektrod odpovídalo směru požadované introdukce konstruktů do tkáně (obrázek 16). Embrya byla po elektroporaci dále inkubována do E3, v této době již je u nemanipulovaných embryí kompletně vytvořena čočka, pak byla sbírána jako „whole-mount“, fixována a barvena pomocí  $\beta$ -galaktosidázy

#### 4.2.3 Konstrukty SIMO a jejich funkce ve vyvíjejícím se oku kuřecího embrya

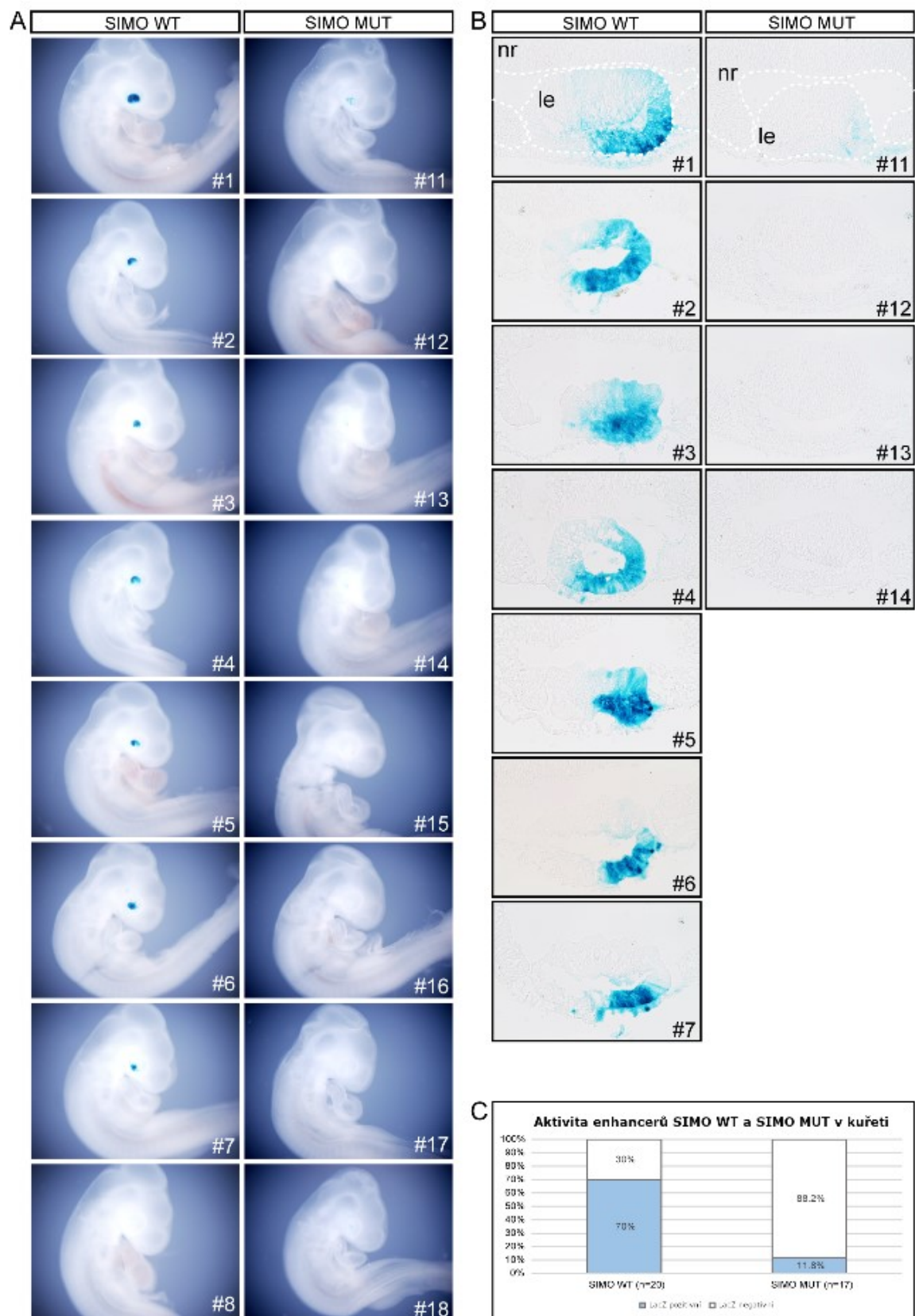
Konstrukty DNA obsahující buď enhancer SIMO divokého typu (SIMO WT) nebo enhancer simultánně mutovaný v konzervovaných vazebných místech pro Meis SIMO\_B, SIMO\_C a SIMO\_D (SIMO MUT) byly elektroporovány *in ovo* do oblasti vyvíjejícího se oka kuřecího embrya ve stádiu HH 10-11. Elektroporovaná embrya byla sklizena ve stádiu HH 20-21 a testována na  $\beta$ -galaktosidázovou aktivitu. U SIMO divokého typu byla pozorována dostatečná exprese reportérového genu LacZ ve vyvíjející se čočce (obrázek 30C a 30E, obrázek 31), zatímco u konstruktů SIMO s mutací ve všech třech vazebných místech pro Meis k expresi reportérového genu nedocházelo (obrázek 30D a 30F, obrázek 31). Dalším cílem bylo stanovit, jak přispívají jednotlivá vazebná místa pro Meis k aktivitě enhanceru SIMO. Mutace pouze ve vazebném místě SIMO\_B měla za následek snížení exprese reportérového genu v čočce oproti divokému SIMO\_WT, mutace současně v místech SIMO\_B a SIMO\_C vedla k úplné ztrátě specifické exprese reportérového genu v čočce (obrázek 32A). Tato data poukazují na další efekt těchto tří vazebných míst pro Meis na aktivitu enhanceru SIMO. Sekvence vazebných míst pro Meis (TGACAA v SIMO\_B, SIMO\_C a SIMO\_D) v enhanceru SIMO divokého typu se přesně neshoduje s motivem optimální sekvence vazebného místa pro Meis TGACAG (<http://jaspar.genereg.net/>), z čehož vyplývá, že mohou představovat místa se střední afinitou. Za účelem vyhodnocení funkčního významu těchto neoptimálních vazebných míst pro Meis v čočce byly sestrojeny reportérové konstrukty exprimující LacZ pod kontrolou minimálního promotoru *hsp68* fúzaného s nejvíce konzervativní oblastí myšského enhanceru SIMO (dále označovaný jako minSIMO) obsahující buď optimalizovaná vazebná místa pro Meis nebo divoký typ. Jak je ukázáno na obrázku 32, záměna vazebné sekvence pro Meis divokého typu v SIMO\_B, SIMO\_C a SIMO\_D za optimální vazebnou sekvenci vedla ke zvýšení hladiny exprese ve vyvíjející se čočce. Tato data jsou v souladu

s klíčovou funkcí proteinů Meis v regulaci SIMO a naznačují, že silná, ale zároveň omezená aktivita enhanceru SIMO závisí na společném vlivu těchto tří vazebných míst pro Meis se slabší afinitou. Nedávná studie modelového enhanceru ukazuje, že specifita enhanceru závisí na kombinaci neoptimálních rozpoznávaných motivů, čímž je žádoucím způsobem snižována afinita. Záměna vazebných míst s nižší afinitou za motiv přesně odpovídající konsenzu má za následek robustní, ale ektopickou genovou expresi (Farley *et al.*, 2015). Pro získání hlubšího vhledu do stavby enhanceru byla s využitím databáze JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) prohledána nejvíce evolučně konzervovaná oblast SIMO (oblast minSIMO) a nalezena konsenzní vazebná místa pro další transkripční faktory. Byla identifikována místa pro Six3, Ets/Tea, Maf a transkripční faktory obsahující homeodoménu (obrázek 32C). Místně-specifickou mutagenezí SIMO byly vneseny dvounukleotidové změny do konzervovaných úseků konsenzního vazebného místa (LOGOs v databázi JASPAR). Dále byla provedena mutageneze evolučně konzervovaných úseků GCTC přítomných v SIMO všech analyzovaných druhů (obrázek 29A). Reportérové genové konstrukty exprimující LacZ pod kontrolou minimálního promotoru *hsp68* fúzaným buď s enhancerem divokého typu nebo s enhancery mutovanými ve vazebných místech pro každý s nalezených transkripčních faktorů byly vneseny do oka kuřecího embrya ve stádiu HH10-11 elektroporací *in ovo*. Kromě mutací ve vazebných místech pro Meis SIMO\_B a SIMO\_C (obrázek 32A) nevedla žádná z mutací k úplnému zrušení aktivity reportérového genu specifického pro čočku. K výraznějšímu snížení exprese reportérového genu došlo v případě mutace vazebného místa pro Six3 (obrázek 32C), z čehož lze usuzovat, že Six3 má podobný vliv na funkci enhanceru SIMO jako na funkci EE (W. Liu *et al.*, 2006). Mutace ve vazebných místech homeodomén HD1 a HD2 vedla k mírnému poklesu aktivity reportéru, což neplatilo pro mutaci v HD3 (obrázek 32C). V souhrnu výsledky experimentů na kuřecím embryu demonstrují důležitost transkripčního faktoru Meis pro aktivitu enhanceru SIMO.

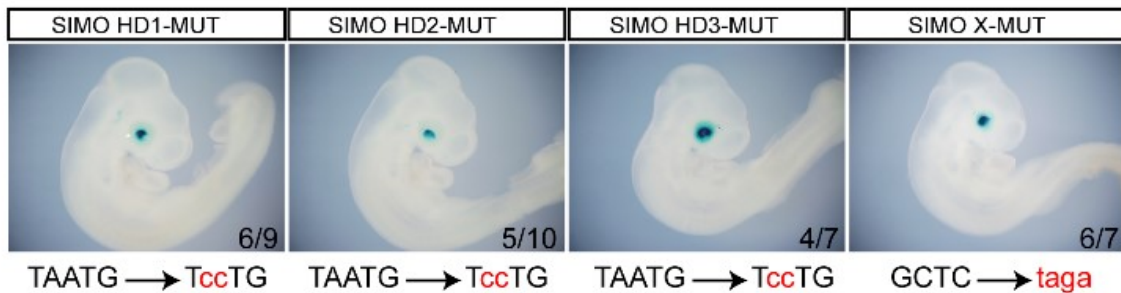
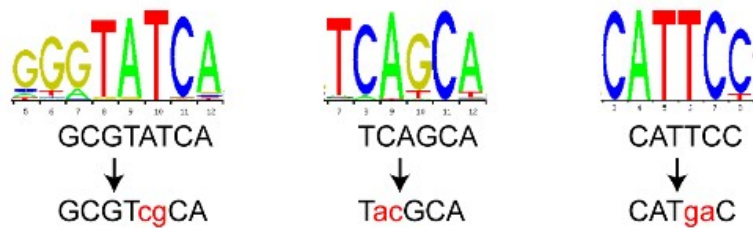
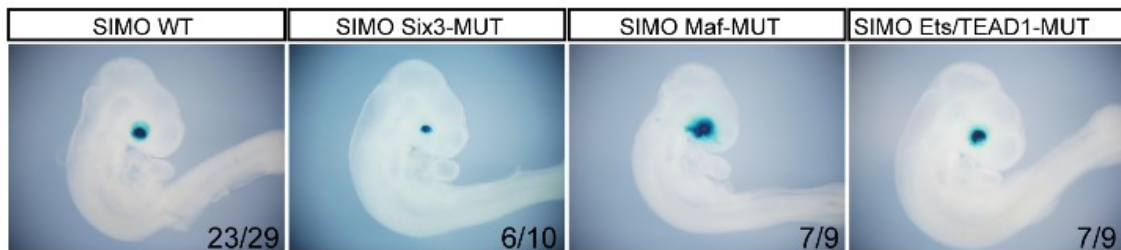
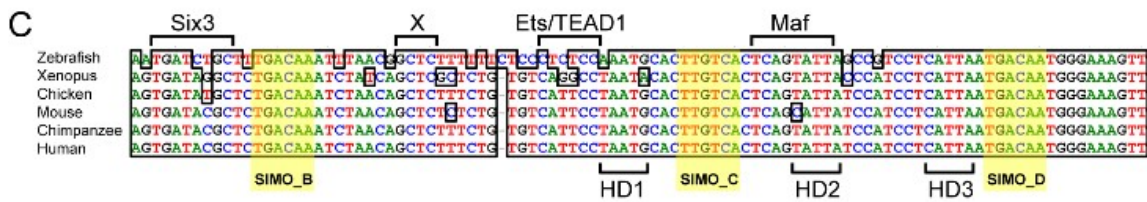
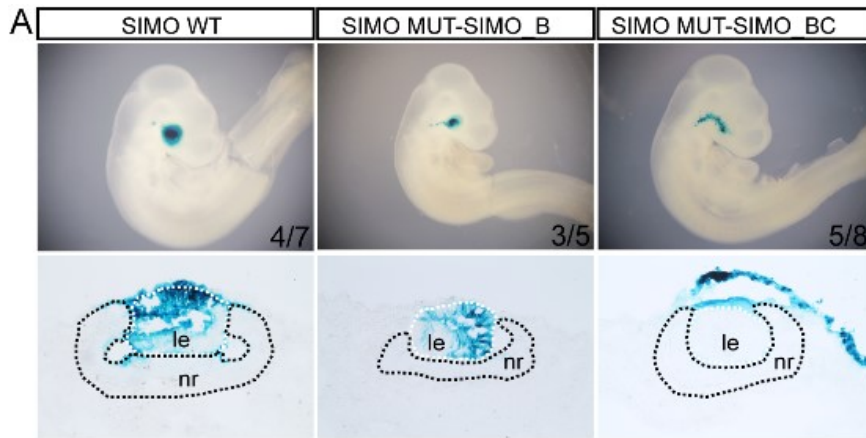


**Obr. 30 - Genová reportérová analýza SIMO divokého typu a mutovaného enhanceru v kuřeti**  
 (A, B) Schématické zobrazení konstruktů reportéru, který byl použit po elektroporaci kuřecích embryí *in ovo*. Konstrukt nese divoký nebo mutovaný element SIMO „upstream“ od minimálního promotoru *hsp68* a otevřený čtecí rámec  $\beta$ -galaktosidázy. V mutovaném SIMO byla vazebná místa pro Meis zrušena vnesením specifických jednobodových mutací, které mění rozpoznávací sekvenci Meis TGACAG/A na TcACAG/A. (C±F) Zobrazení „whole-mount“ kuřecích embryí nebo histologických řezů oka z embryí ve stádiu HH21-22 po galaktosidázovém barvení elektroporované buď (C, E) divokým typem nebo (D, F) mutovaným fragmentem SIMO. Pozitivní barvení X-gal koreluje s aktivitou reportérových konstruktů. Zatímco fragment SIMO divokého typu podporuje expresi konstruktů v čočce, mutovaný fragment SIMO nikoliv (Antosova *et al.*, 2016).



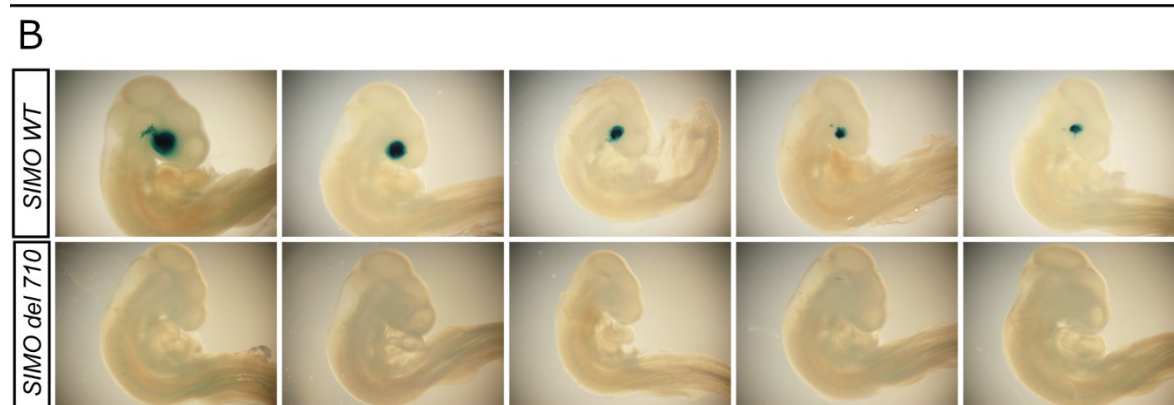
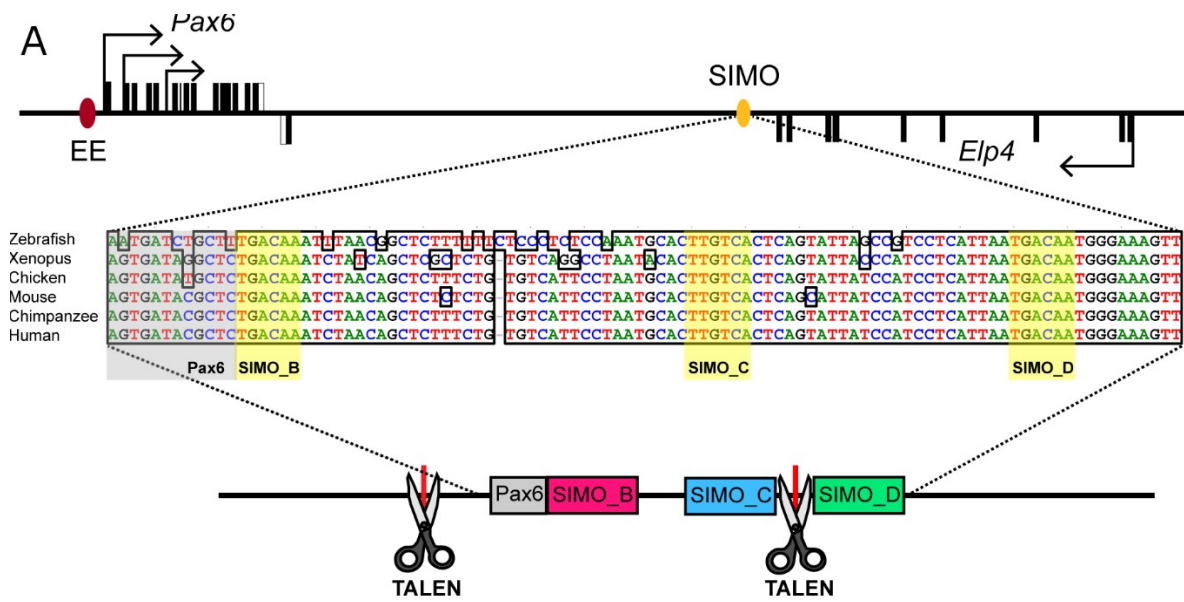


**Obr. 31 - Přehled aktivity enhanceru SIMO divokého typu a mutovaných enhancerů v kuřeti**  
 (A) Přehled „whole-mount“ kuřecích embryí barvených X-gal elektroporovanými divokými nebo mutovanými fragmenty SIMO. (B) Histologické řezy okem zobrazených embryí. (C) Kvantifikace pozitivního a negativního barvení X-gal (lacZ) v elektroporovaných kuřecích embryích (Antosova *et al.*, 2016).



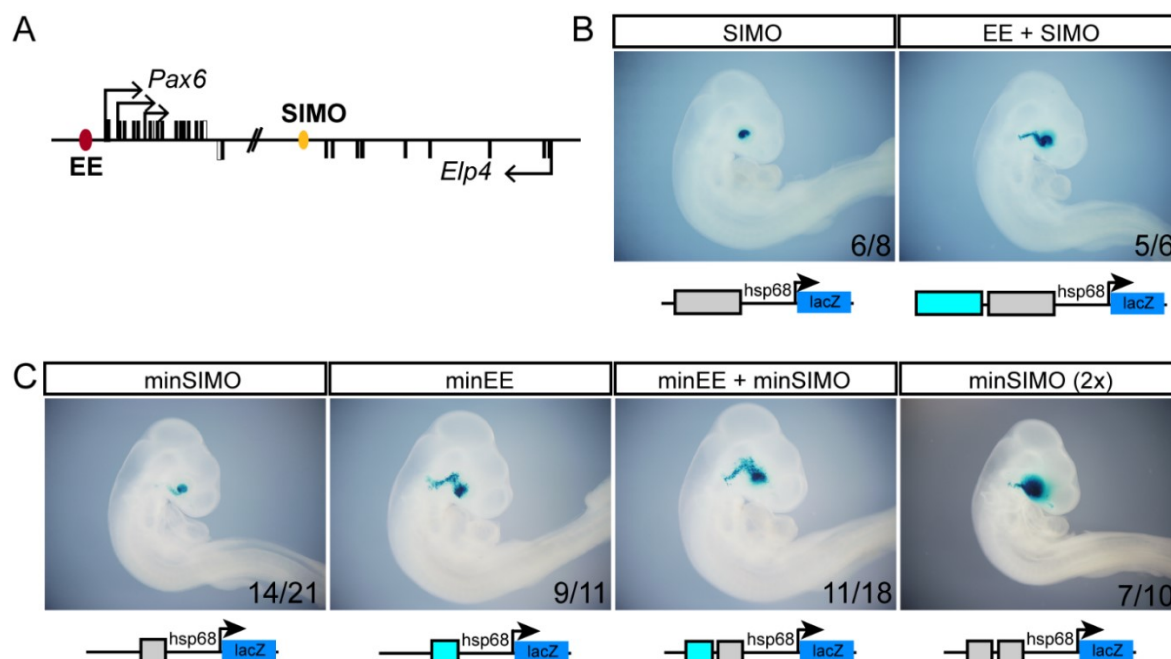
**Obr. 32 - Charakterizace mutant enhanceru SIMO pomocí reportérové genové analýzy v kuřeti**

(A-C) Kuřecí embrya „whole-mount“ barvená X-gal (stádium HH20-21) vykazují expresi reportérového genu lacZ pod kontrolou minimálního promotoru *hsp68* fúzaného s divokým nebo mutovaným myším elementem SIMO elektroporovaným do oblastí vyvíjejícího se oka kuřecího embrya ve stádiu HH10-11. V každém panelu je vyznačen počet embryí vykazujících expresi. (A) Přispění jednotlivých vazebných míst pro Meis k aktivitě enhanceru SIMO. Reportérové genové konstrukty nesoucí SIMO divokého typu SIMO (SIMO WT), SIMO s mutací v jediném vazebném místě pro Meis (SIMO MUT-SIMO\_B) nebo ve dvou vazebných místech pro Meis (SIMO MUT-SIMO\_BC) byly použity pro elektroporaci *in ovo*. Barvení X-gal kuřecí embrya „whole-mount“ demonstrují efekt mutovaných vazebných míst pro Meis na reportérový gen. Mrazové řezy oblastí oka zobrazují pokles exprese lacZ u jediného mutovaného vazebného místa pro Meis (SIMO\_B) a úplnou ztrátu exprese specifické pro čočku v případě současné mutace dvou vazebných míst pro Meis (SIMO\_BC). (B) Optimalitovaná vazebná místa pro Meis zvyšují aktivitu enhanceru SIMO. Konstrukty s reportérovým genem nesoucí minimální SIMO divokého typu (minSIMO WT) nebo minimální SIMO, v němž jsou přirozená vazebná místa pro Meis TGACAA zaměněna za optimalizovanou vazebnou sekvenci TGACAG (minSIMO optimalMeis) byla elektroporována *in ovo*. Barvení X-gal celých embryí ukazuje, že přítomnost optimalizovaných vazebných míst pro Meis v SIMO mírně zvýšila expresi reportérového genu. (C) Efekt vybraných mutací v potenciálních vazebných místech pro další transkripční faktory na enhancer SIMO. Konstrukty DNA obsahující SIMO divokého typu (SIMO WT) nebo enhancer nesoucí mutace v dalších nalezených vazebných místech byly elektroporovány *in ovo*. Schématická zobrazení vazebných motivů transkripčních faktorů byla získána z databáze JASPAR. Mutované nukleotidy ve vazebných místech pro jednotlivé transkripční faktory jsou zvýrazněny malými červenými písmeny, nr = retina (angl. neural retina), le = čočky (angl. lens) (Antosova *et al.*, 2016).



**Obr. 33 - Tvorba a charakterizace myši nesoucích delecí SIMO**

(A) Schématické znázornění lokusu *pax6* s vyznačenými exony *pax6* (černá políčka na horní straně osy) anásledující gen *Elp4* (černá políčka na spodní straně osy). Ektodermální enhancer (EE) je vyznačen červeným oválem, enhancer SIMO je vyznačen žlutým oválem. Pozice rozpoznávací sekvence pro TALEN je znázorněna ve vztahu autoregulačnímu elementu Pax6 (Bhatia *et al.*, 2013) na šedém pozadí a vazebná místa pro Meis1/2 SIMO\_B, SIMO\_C a SIMO\_D (všechna na žlutém pozadí). (B) Zobrazení celých kuřecích embryí barvených  $\beta$ -galaktosidázou ve stádiu HH21-22 elektroporovaná divokým nebo mutantním SIMO nesoucím mutaci nalezenou v myši linii #710. Pozitivní barvení X-gal odpovídá aktivitě reportérových konstruktů (Antosova *et al.*, 2016).

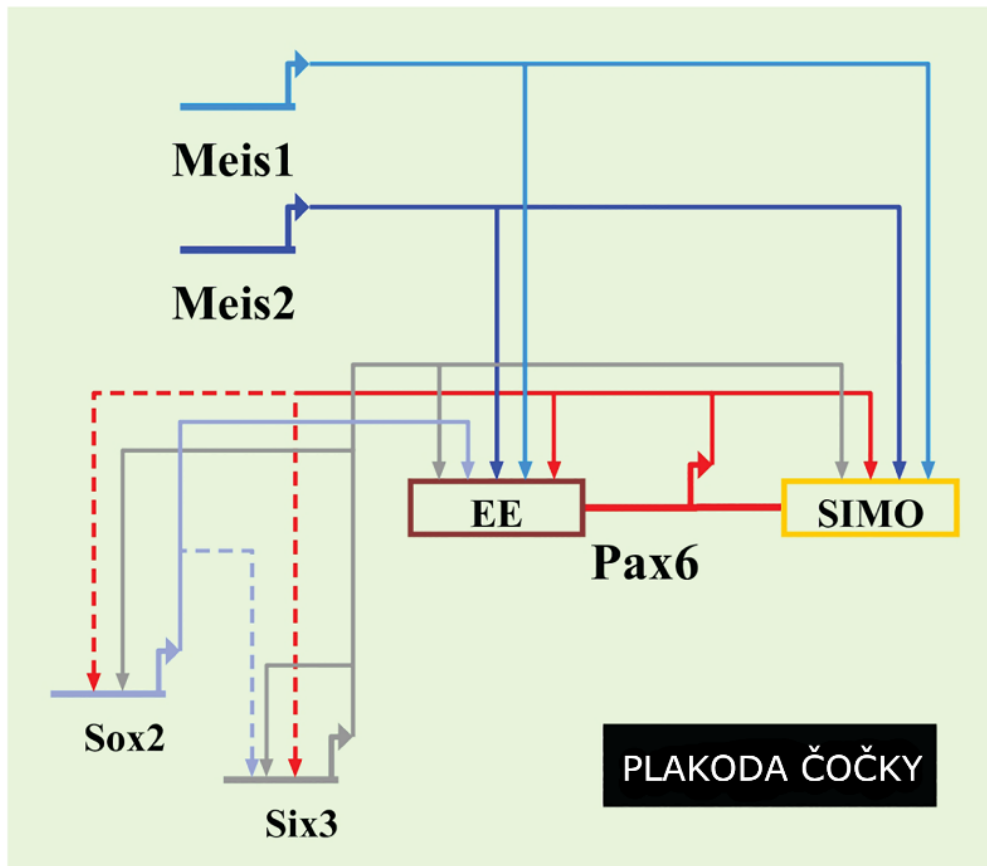


**Obr. 34 - U EE a SIMO byla pozorována aditivní enhancerová aktivita specifická pro čočku**  
 (A) Schématické zobrazení lokusu *pax6*, znázorňující exony *pax6* (černá políčka na horní straně osy) a následující gen *Elp4* gene (černá políčka na spodní straně osy). Ektodermální enhancer (EE) je vyznačen červeným oválem, enhancer SIMO je vyznačen žlutým oválem. (B,C) Reportérové genové konstrukty (zobrazeny schématicky) nesoucí jen SIMO nebo jen EE nebo kombinaci obou enhancerů byly použity pro elektroporaci s cílem pozorovat vliv těchto enhancerů genu *pax6* na sílu a specifitu exprese. Kombinace EE a SIMO (EE + SIMO, minEE + minSIMO) zajišťuje v porovnání se samotným SIMO nebo samotným EE silnou expresi reportérového genu. Minimální EE (minEE) zajišťuje silnější expresi reportérového genu než minimální SIMO (minSIMO) a dvě následující kopie enhanceru SIMO za sebou (minSIMO 2x) vykazují nejsilnější expresi z variant enhancerů testovaných v tomto experimentu. Poměr embryí vykazujících expresi je vyznačen (Antosova *et al.*, 2016).

#### 4.2.4 Shrnutí

Tato práce prokazuje zásadní vliv Meis1 a Meis2 na časný vývoj savčího oka a poukazuje na očividnou robustnost regulačního mechanismu, v němž dva „stínové enhancery“ s podobnou molekulární stavbou udržují potřebné hladiny genu *pax6*, jehož působení během indukce čočky je velmi citlivé na jeho množství v buňce. Donedávna nebylo možné studovat kombinované působení proteinů Meis1/2 na indukci čočky a expresi Pax6 *in vivo*, protože nebyla k dispozici vhodná „knock-out“ alela *Meis2*. Pro tuto práci byla úspěšně zkonstruována a díky ní bylo možné studovat simultánní vyřazení Meis1 a Meis2 v presumptivním ektodermu čočky, které vyústilo v selhání tvorby plakody čočky a značné snížení exprese Pax6 a Six3 v oblastech předpokládaného vzniku čočky. Na rozdíl od těchto genů zůstala exprese Sox2 v *Meis1/Meis2*-mutovaném ektodermu nezměněna.

Exprese Meis2 byla detekována v časných fázích vývoje čočky. Je velmi pravděpodobné, že Meis1 a Meis2 plní svou redundantní funkci pouze ve specifických vývojových stádiích a procesech. Výsledky ukazují, že Meis1 i Meis2 jsou exprimovány v časném vývoji oka a jsou pro něj zásadně důležité.



**Obr. 35 - Současný model transkripční regulační sítě řídící proces indukce savčí čočky**  
Přímé interakce jsou vyznačeny plnými čarami, přerušované čáry vyznačují možné interakce vyvozené z experimentů využívající metody „gain-of-function“ a „loss-of-function“ (Antosova *et al.*, 2016).

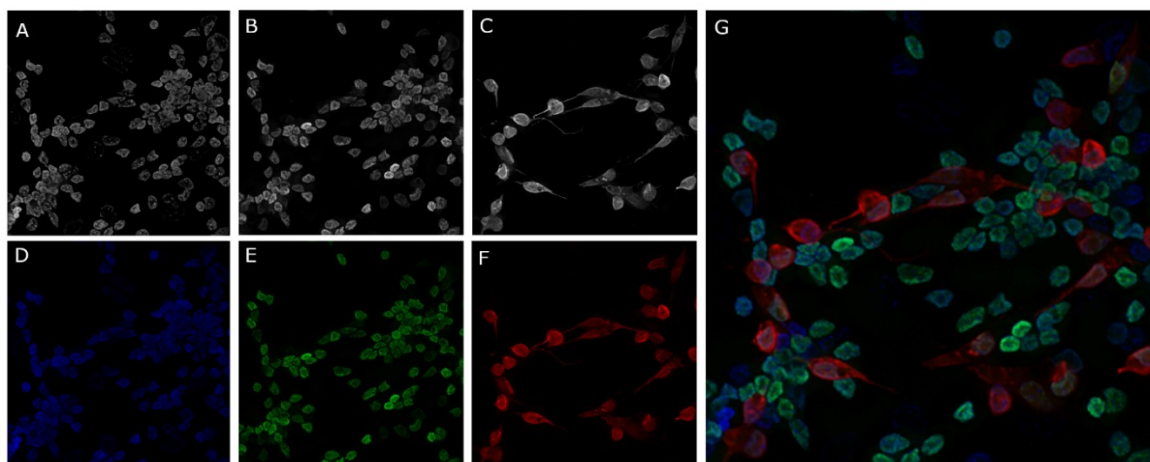
## 4.5 Kuřecí embryonální retina jako model pro studium lokalizace snRNP

Metodika elektroporace do kuřecího embryonálního oka byla upravena pro rozšíření studie týkající se mutací genu hPrp31 u lidského onemocnění *retinitis pigmentosa* (Huranova *et al.*, 2009). Studie byla provedena na buněčných kulturách HeLA a další pokusy na izolovaných kuřecích fotoreceptorech a vyvíjející se retině měly posloužit pro rozšíření studie na relevantnější model. Cílem experimentální práce autorky bylo zajistit vhodný materiál a dále ho zpracovat a kultivovat.

### 4.5.1 Zpracování embryonální retiny

Podle tabulky vývojových stádií (Hamburger a Hamilton, 1951) začíná vývoj oka u kuřecího embrya ve stádiu HH9 vytvořením optického váčku. Plakoda čočky je přítomna ve stádiu HH14 a oční pohárek je plně vyvinut ve stádiu HH15, což odpovídá zhruba E2-2,5. Kuřecí embrya byla elektroporována převážně ve stádiu E3 nebo mírně starší. U embryí v E4 je již vyvinuta RPE. Do vyvíjejícího se oka byla vstříknuta elektroporační směs tak, že vyplňovala prostor mezi čočkou a retinou. Nastavení vlastní elektroporace je schematicky zobrazeno na obrázku 17.

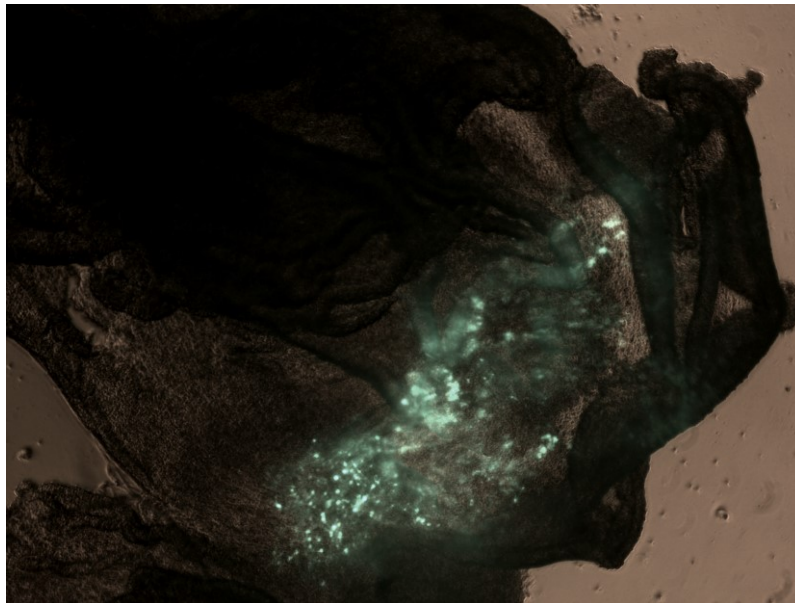
V retině se vyskytují fotoreceptorové buňky, které lze vizualizovat na základě jejich genové exprese různými protilátkami. Na uvedeném příkladu je využito barvení fotoreceptorových buněk a čípků (obrázek 36).



**Obr. 36 - Vizualizace různých typů buněk v primární retinální kultuře**

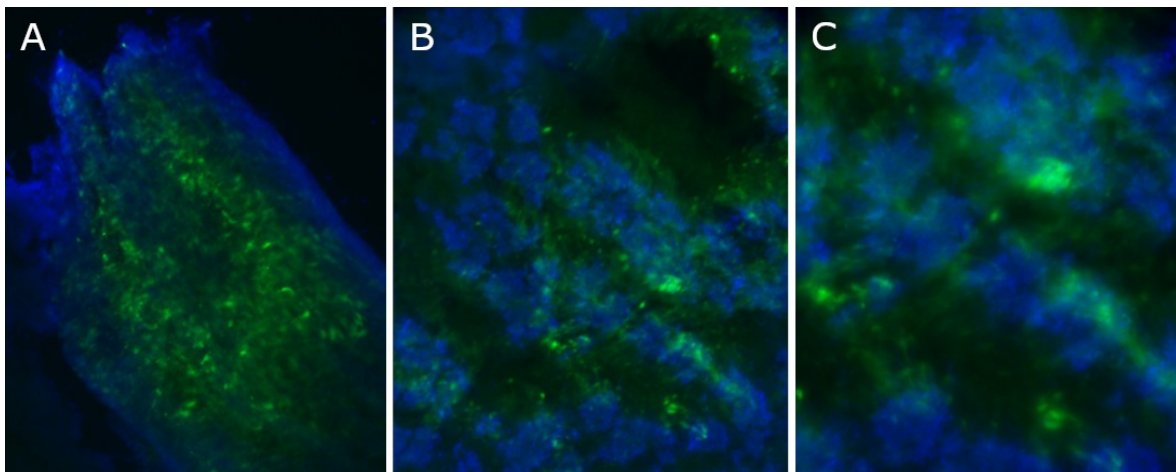
Primární buňky v kultuře byly barveny (A, D) DAPI pro vizualizaci jader a s pomocí protilátek proti (B, E) CRX za účelem vizualizace fotoreceptorových buněk a proti (C, F) visininu za účelem vizualizace čípků. (G) Překryv fluorescenčních snímků. Zpracovala Zuzana Cvačková.

Kuřecí embrya byla elektroporována buď kontrolním plazmidem GFP-RCAS nebo konstrukty GFP-AD29-RCAS a GFP-WT31-RCAS. Elektroporovaná embrya byla sklížena ve stádiu E8, tzn. 4 až 5 dní po elektroporaci a získané retiny byly buď zpracovány vcelku jako tzv. „flat-mount“ (obrázky 37, 38 a 39) nebo dále zpracovány na primární fotoreceptorové kultury (obrázky 40 a 41).



**Obr. 37 - Kuřecí embryonální retina**

Retina exprimující GFP po elektroporaci GFP-RCAS izolovaná z kuřecího embrya ve stádiu E8.

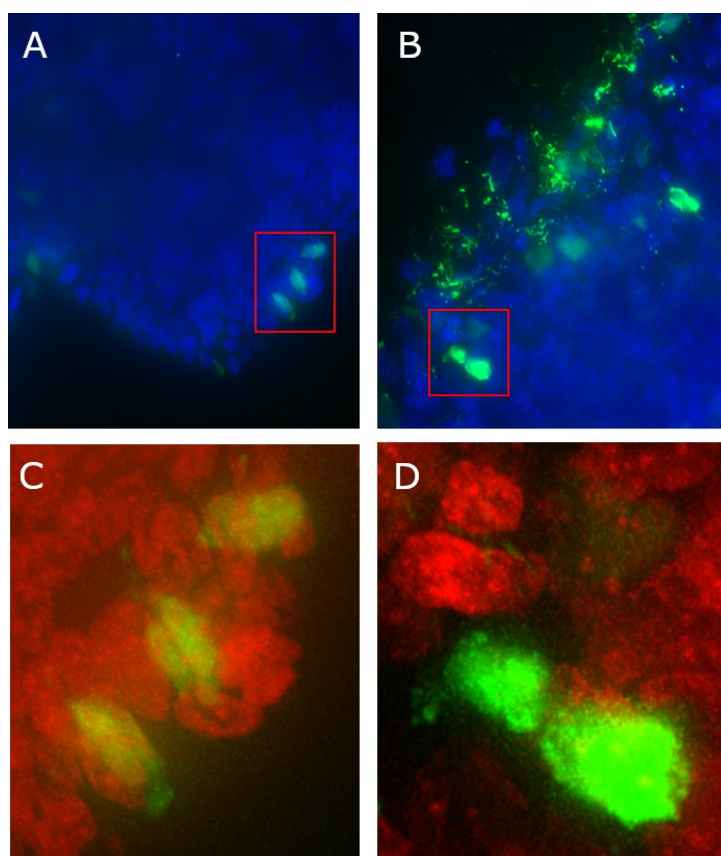


**Obr. 38 - Retina „flat-mount“**

Retina elektroporovaná kontrolním plazmidem GFP-RCAS zpracovaná jako „flat-mount“. (A) Retinální „flat-mount“, fluorescenční binokulární lupa. Stejná retina pod fluorescenčním mikroskopem, zvětšení 10x (B) a 20x (C). Modře DAPI, zeleně GFP.



Elektroporovaná retina byla dále zpracována na mrazové řezy a zachycena na snímcích z fluorescenčního mikroskopu (obrázek 39).

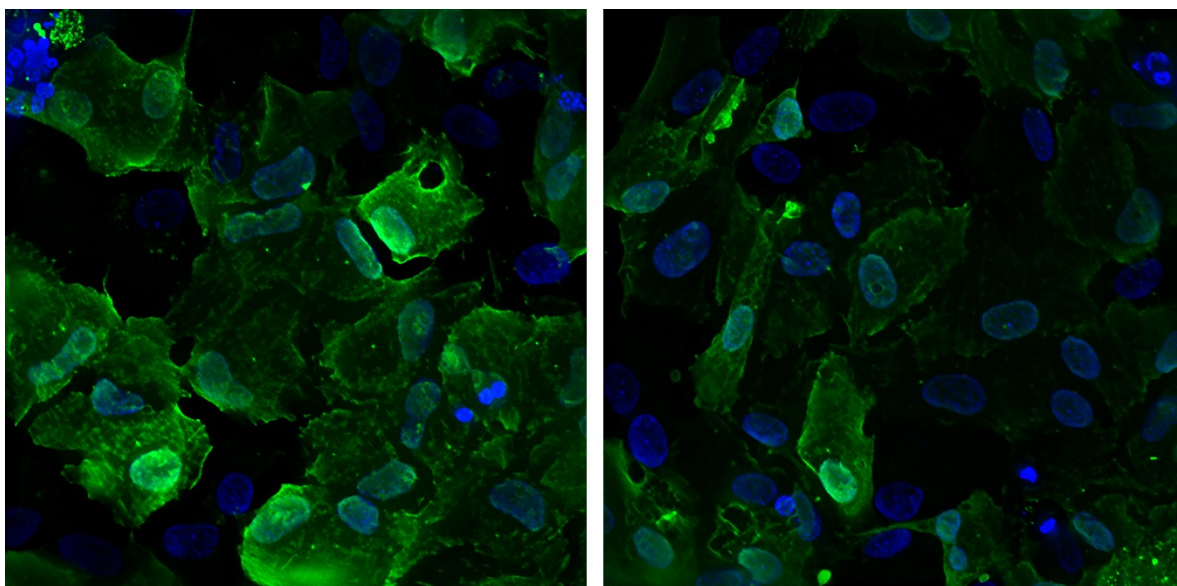


**Obr. 39 - Kryorezy elektroporovanou retinou**

Ukázka mrazových řezů 20  $\mu\text{m}$  retinou elektroporovanou plazmidem GFP-RCAS. (A, B) Dva různé řezy retinou. Modře DAPI, zeleně GFP. Červené obdélníky vyznačují oblast zvětšenou na obrázcích C a D. Zde je DAPI zachyceno červeně. Výřezu na obrázku A odpovídá obrázek C a výřezu na obrázku B odpovídá obrázek D. Řezy a snímky zpracovala Zuzana Cvačková.

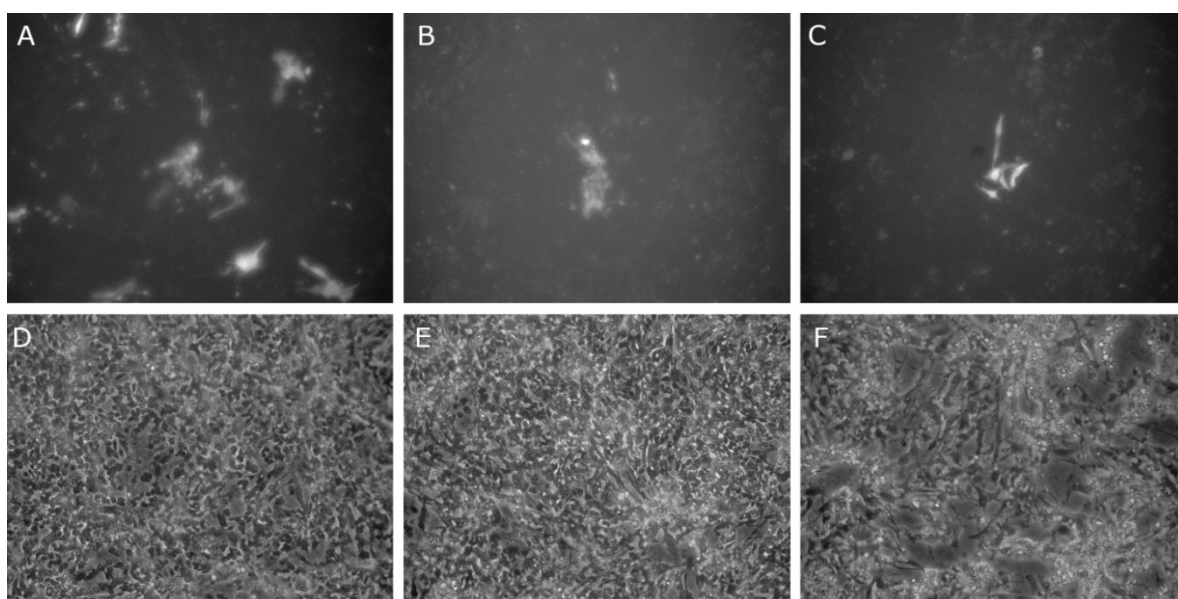
Tkáňové kultury byly získány, jak je uvedeno v kapitole 3.15, a dále kultivovány *in vitro*. Primární retinální buňky byly infikovány kontrolním plazmidem (obrázky 40 a 41) a mutovanou a nemutovanou verzí hPrp31, AD29 a WT31 (obrázek 41). Cílem pokusu bylo pozorovat buňky ve vyvíjející se retině *in vivo* a lokalizaci elektroporovaných proteinů.

Z výsledků imunoprecipitační analýzy (provedla Z. Cvačková) vyplývá, že divoký typ hPrp31 v primárních kuřecích kulturách váže další komponenty ribonukleoproteinové částice U4/U6 di-snRNP, proteiny hPrp3 a hPrp4, zatímco mutovaná verze tuto schopnost ztrácí (obrázek 42).



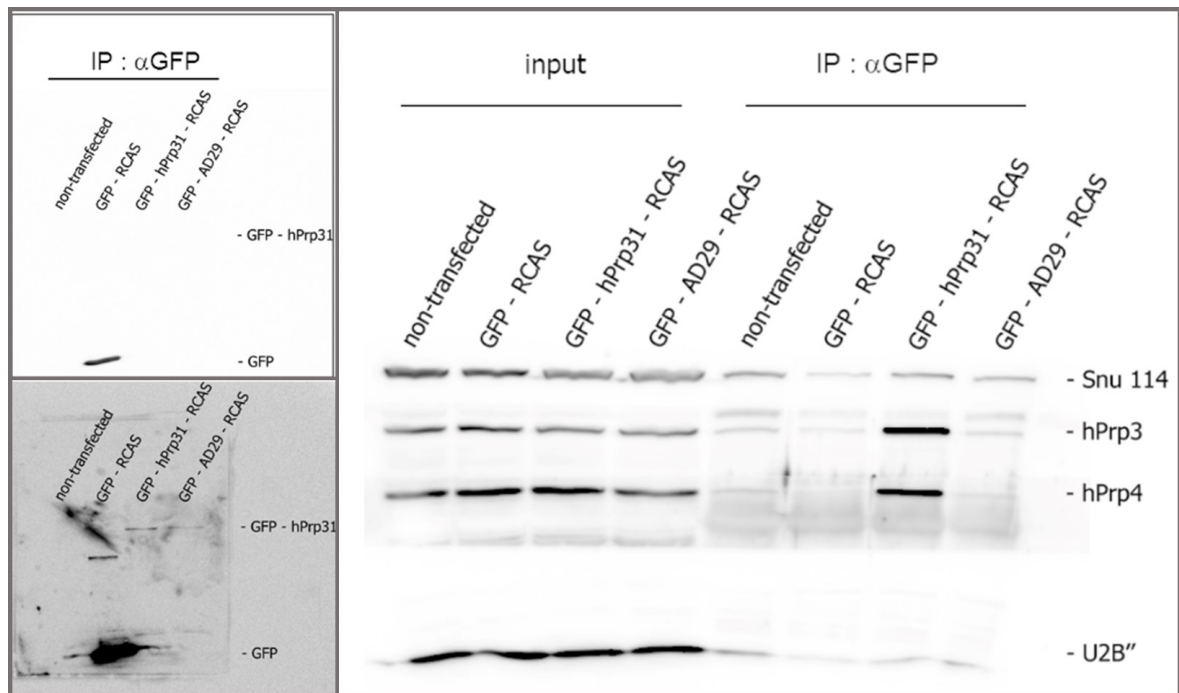
**Obr. 40 - Primární kultura fotoreceptorových buněk**

Primární fotoreceptorové buňky získané z retin kuřecích embryí a infikované plazmidem GFP-RCAS (obě pole). Modře DAPI, zeleně GFP. Snímky zpracovala Zuzana Cvačková.



**Obr. 41 - Primární kultury fotoreceptorových buněk po infekci různými plazmidy**

Kultury primárních fotoreceptorových buněk získaných z kuřecích embryonálních retin 7 dní po izolaci a infekci. V horní řadě jsou fluorescenční snímky kultur (A, B, C), ve spodní řadě odpovídající snímky kultur ve světelném poli (D, E, F). Kultury byly infikovány plazmidy GFP-RCAS (A, D), GFP-AD29-RCAS (B, E) a GFP-WT31-RCAS (C, F).



**Obr. 42 – V embryonálních kuřecích fibroblastech se váže hPrp3 a hPrp4 na hPrp31**

U buněk transfekovaných kontrolním plazmidem GFP-RCAS je detekovatelná vysoká hladina exprese GFP (vlevo nahoře i vlevo dole). V menší míře je detekovatelná i exprese GFP z vektorů GFP-hPrp31-RCAS a GFP-hPrp31-RCAS (vlevo dole). Z výsledků imunoprecipitační analýzy vyplývá, že v buňkách transfekovaných GFP-hPrp31-RCAS se váže hPrp3 a hPrp4 na hPrp31, zatímco v kulturách infikovaných plazmidem GFP-AD29-RCAS s mutovaným hPrp31 tomu tak není (vpravo). Snu114 je proteinem U5 snRNP a U2B" je proteinem U2 snRNP. Imunoprecipitaci provedla Z. Cvačková.

## 5. Diskuze

Kuřecí model byl po celou historii moderního člověka důležitým nástrojem vědy, napomohl mnoha klíčovými objevům v mnoha vědních oblastech. Kuřecí embryo je jedinečný nástroj jak pro pozorování přirozeného vývoje, tak pro nejrůznější manipulace. Už jeho podstata, vývoj mimo tělo matky, snadný přístup, dostatečná velikost a přehlednost, finanční dostupnost a snadná kultivace, předurčuje jeho využití ve výzkumu. Pokusy na kuřecím embryu shrnuté v této práci se dotýkají oblastí molekulární, vývojové a evoluční biologie, genetiky a virologie.

### 5.1 Mikromanipulace a vizualizace

Práce je nejpodrobněji zpracována po stránce metodické, což souvisí už se samotnou podstatou hlavního cíle, jímž bylo obsáhnout, přizpůsobit a zdokonalit metodiku zpracování a vizualizace kuřecího embrya jako nástroje pro genové manipulace. Hlavní technikou zpracovanou k tomuto účelu byla elektroporace *in ovo*, což je metoda nesmírně variabilní a přizpůsobitelná, a tak s jejím uchopením přišla spolupráce na poměrně rozmanitá témata. Jedno je všechny spojovalo – všestranná využitelnost kuřecího embryonálního modelu.

#### 5.1.1 Nastavení elektroporace v našich experimentech

Prvním krokem k úspěšné elektroporaci je vhodné načasování inkubace embryí. Velmi časná embrya jsou mnohem citlivější na jakýkoli zásah do vejce, což negativně ovlivňuje jejich přežití po manipulaci. Pro naše nastavení bylo ideálním stádiem pro elektroporaci do NT stádium HH10-11. V této době už je vyvinuto asi 10 somitů a probíhá putování buněk NL, ale například ještě nezačala migrace budoucích melanocytů. K expresi elektroporovaného genu dochází během několika hodin a mezi zasažené buňky po elektroporaci v tomto stádiu budou patřit prekurzory všech buněčných typů účastnících se vývoje NL v oblasti trupu. Pro elektroporaci presumptivního ektodermu čočky se vzhledem k procesu vývoje oka u kuřecího embrya také ukázala být nejvhodnější stádia HH10-11. V této době ještě není vytvořena čočka, ale buňky v oblasti očního váčku jsou již předurčeny se v čočku vyvinout, a zároveň embrya po elektroporaci v tomto stádiu dobře přežívají. Časování embryí pro elektroporaci retiny muselo být samozřejmě také

přizpůsobeno průběhu vývoje oka. V tomto případě byla elektroporace vedena do již vyvinuté retiny u embryí převážně ve stádiu E3, kdy retina je již vyvinuta, ale není ještě zastíněna vrstvou RPE. Starší embrya přežívala velmi dobře.

Dalším krokem k úspěšné elektroporaci je nastavení elektroporačního programu a elektrického pole. Podle našich zkušeností platí, že čím vyšší je napětí, tím účinnější je elektroporace, ale zároveň se s vyšším napětím snižuje přežití elektroporovaných embryí. Programy uvedené v kapitole 3.11 se ukázaly jako nejvyváženější s ohledem na poměr účinnosti a přežívání. Elektrické pole lze měnit délkou či tvarem elektrod nebo jejich postavením vůči embryu. Pro všechna nastavení našich experimentů se nejlépe osvědčily zlacené platinové drátkové elektrody ve tvaru písmene L a délce 3 mm, případně kombinaci 3 mm a 1,5 mm elektrody pro elektroporaci oka. Elektrické pole lze upravit i postavením elektrod. Pro elektroporaci NT i elektroporaci oka jsme využívali rovnoběžné postavení elektrod. Při postavení jedné elektrody špičkou k embryu lze vytvořit trojúhelníkové pole a zamířit tak puls přesněji do tkáně, výsledky jsou pak ale méně konzistentní a embrya takový zásah hůře přežívají, puls ze špičky elektrody je zřejmě „ostřejší“ než puls rozložený po celé délce L elektrody. Toto pozorování se projevovalo zejména při elektroporaci kraniální části embrya.

### 5.1.2 Vizualizace elektroporovaných embryí

Stejnou mírou jako vlastní postupy introdukce genu do kuřecího embrya k úspěšné interpretaci manipulace přispívá její následná vizualizace. Experimenty zahrnuté v této práci využívaly fluorescenci elektroporovaných kontrolních proteinů na celých embryích, buněčných kulturách a kryořezech, imunofluorescenci na kryořezech,  $\beta$ -galaktosidázové barvení, WISH a samozřejmě světelnou mikroskopii ke sledování melanocytů, růstu a prospívání kultur a embryí, řezů,  $\beta$ -galaktosidázového barvení a WISH atd.

Vizualizace s využitím elektroporačních plazmidů nesoucích kromě cílového genu i geny pro fluorescenční proteiny je snadná a elegantní metoda. Její relevanci lze napadnout v případě, že každý gen je v plazmidu zaklonován pod samostatný promotor, takže za daných podmínek není viditelná fluorescence přímým důkazem exprese cílového proteinu, spíše jen ukazatelem místa úspěšné elektroporace. V konkrétním případě po elektroporaci v-Myb a Gremlin 2 byla proto exprese dále ověřena na úrovni RNA kontrolní WISH a na úrovni proteinu analýzou Western blot z lyzátu z vypreparované elektroporované tkáně.

Metoda WISH se projevila jako problematická v případě nízké exprese (např. u *Grem2*), kde její specificita v našich podmínkách téměř hraničila s přirozeným pozadím, které se často liší u jednotlivých embryí. Nakonec se podařilo expresi zachytit ve všech plánovaných experimentech díky mnoha opakováním, změnou výrobce některých chemikálií a zlepšením čistoty a koncentrace sond.

## 5.2 Manipulace a vizualizace genové exprese v NL kuřecího embrya

Prvoautorský článek autorky se zabývá časnou genovou expresí v NL. Pro studium NL je kuřecí embryo klasickým modelem (Stern, 2005; Dupin *et al.*, 2006; Bronner-Fraser a Garcia-Castro, 2008). NL je unikátní struktura, jak z pohledu vývoje embrya, tak vzhledem k rozmanitosti prekurzorových buněk a typů tkání, které se z nich vyvíjí, což ji činí vynikajícím modelem pro studium buněčného osudu. Předchozí pokusy nám vložily do rukou nástroj ke zkoumání časné genové exprese v buňkách NL. Tímto nástrojem byl onkoprotein *v-Myb* a jeho schopnost měnit osud buněk NL a směřovat je do melanocytární linie. Vliv proteinů *c-Myb* i *v-Myb* na buněčný cyklus a jejich onkogenní vlastnosti jsou známy a dlouhodobě studovány (Klempnauer *et al.*, 1984; George a Ness, 2014). V naší laboratoři byl pozorován jejich vliv i na buňky NL *in vitro*, *c-Myb* a *v-Myb* směřují buňky NL do melanocytární linie a ovlivňují EMT, *v-Myb* navíc transformuje nezralé melanocyty (Karafiat *et al.*, 2005; Karafiat *et al.*, 2007). V rozsáhlém souboru studií, které už byly v souvislosti s vývojem NL zpracovány, se jen málo z nich dotýká nejčasnějších regulačních procesů, pravděpodobně proto, že není snadné nalézt experimentální nástroje, které se účastní exprese právě na rozcestí při rozhodování o buněčném osudu. Transkripční faktor *v-Myb* takové rozcestí navozuje *in vitro* a díky retrovirovému konstruktu *v-myb-HAER* lze syntetizovat protein v buňkách v neaktivní formě a časovat jeho spuštění tamoxifenem, čímž nám umožňuje zkoumat děje v buňce v námi zvoleném čase, a to i velmi krátce po spuštění jeho exprese. Takto navozené procesy *in vitro* jsou sice poměrně arteficiální a neočekáváme tedy, že přesně kopírují principy přepínání vývoje linií prekurzorových buněk v NL *in vivo*, nicméně považujeme tento přístup za relevantní pro sledování důležitých dějů v genové expresi v definovaném experimentálním nastavení, které nám dovoluje zkoumat opravdu časné děje a pozorovat změny v buněčném osudu. Kultury NL použité pro naše experimenty se normálně vyvíjejí v neurony, glie a melanocyty. Pod tlakem *v-Myb* se téměř všechny buňky mění v melanocyty, které jsou

později immortalizovány a výsledkem je kultura melanoblastů, často ve shlucích, které ztrácejí schopnost kontaktní inhibice.

Úskalím našeho přístupu bylo pracné provedení z důvodu malého množství materiálu, které se dalo získat z jednoho pokusu s explantovými kulturami. Nicméně sbírání materiálu z kultur z více embryí snižovalo možnost, že naše výsledky budou zkresleny přirozeným rozdílem exprese u jednotlivých embryí, a tak byla takto získaná směsná RNA z několika stejně zpracovaných kultur vlastně vhodnějším materiálem, než vzorky z jednotlivých embryí.

Výsledky čipové analýzy předkládají geny, které díky striktním podmínkám nastavení experimentu představují geny přímo podléhající regulaci v-Myb. Výsledky nepřinesly žádné překvapivě vysoké rozdíly v expresi po krátkém působení v-Myb. Geny, jejichž exprese byla signifikantně změněna, nejsou v rozporu s naší hypotézou, že se účastní procesů souvisejících se změnou osudu buněk NL v melanocyty. Podle dostupných zdrojů v literatuře se některé z nich (Krt19 a BMP5) účastní EMT (Bramlage *et al.*, 2011; Tomaskovic-Crook a Crook, 2011) nebo, v případě Gremlin 2, podléhají regulaci BMP, která je pro směřování buněk NL zásadní (Prasad *et al.*, 2019). U ostatních z těchto genů prozatím nebyla souvislost s vývojem NL prokázána.

Nejzajímavějším genem z našeho seznamu byl Gremlin 2, jehož exprese byla navýšena nejvíce. Gremlin 2 je antagonistou BMP. BMP-4 podporuje *in vitro* vývoj glií a neuronů na úkor melanocytů (Jin *et al.*, 2001), z čehož lze hypoteticky vyvodit, že inhibicí BMP-4 by mohl Gremlin 2 posunout rovnováhu ve prospěch melanocytů. Potvrdili jsme, že tento gen je skutečně cílovým genem v-Myb. Otestovali jsme jeho schopnost směřovat buňky NL do melanocytární linie, ale signifikantní vliv jsme nepozorovali. Gremlin 2 tedy pravděpodobně není schopen sám o sobě změnit osud buněk NL. Toto zjištění není nijak překvapující vzhledem ke komplexnosti systému genové regulace v NL.

Naše snaha nahlédnout do časného procesu změny buněčného osudu sice nepřinesla výsledky zásadního významu, ale splnila svůj účel a za nového využití dostupných nástrojů pro sledování časné exprese v NL nám umožnila nahlédnout do zásadního kroku v buněčné diferenciaci.

### 5.3 Manipulace a vizualizace genové exprese v oku kuřecího embrya

Kuřecí model byl zvolen jako relevantní materiál u dalších dvou tematicky velmi odlišných projektů, které v tomto případě spojovalo vyvíjející se oko. V prvním z projektů byla kuřecí retina použita jako materiál pro *in vivo* a *ex vivo* rozšíření studie lidského onemocnění Retinitis pigmentosa týkající se lokalizace proteinů ve fotoreceptorových buňkách provedené *in vitro*. V další studii byl presumpivní ektoderm čočky elektroporován za účelem pozorování exprese Meis1 a Meis2 a vlivu jejích změn na vývoj čočky (Antosova *et al.*, 2016). Autorka v obou případech navrhla a provedla zpracování pokusů na kuřecím modelu.

#### 5.3.1 Vizualizace exprese SIMO a EE v oku kuřecího embrya po elektroporaci

Zpracování kuřecího modelu muselo být přizpůsobeno následné detekci změn. Konstrukty SIMO a Meis nesly jako reportérový gen  $\beta$ -galaktosidázu a embrya byla barvena pomocí X-gal. Tato metoda umožňuje rychlou a snadnou vizualizaci díky sytě modrofialovému produktu, který v místě exprese vzniká. Kuřecí embryonální oko se prokázalo jako funkční model, exprese z divokého typu myšího fragmentu SIMO byla po elektroporaci spolehlivě spouštěna, zatímco k expresi z fragmentu s mutovanými místy pro Meis téměř nedocházelo (obrázky 30, 31 a 33). Zavedená metoda umožnila víceméně rutinně otestovat celou řadu různě mutovaných fragmentů SIMO a ektodermového enhanceru a pozorovat vliv mutací na schopnost navázání Meis a vyvolání exprese (obrázek 32). Výsledky z kuřecího embrya tak nejen přispěly ke srovnání s embryi myšími, ale dobře zpracovatelný model elektroporace kuřecího oka navíc umožnil snadné ověření dalších hypotéz a celkové prohloubení studie.

#### 5.3.2 Kuřecí retinální model *ex vivo* a *in vitro*

Metody elektroporace kuřecí retiny, následného zpracování a kultivace byly úspěšně zavedeny do praxe. Projekt se však potýkal s problémem slabé exprese cílových genů v kulturách.

V případě kuřecí retiny byla vizualizace závislá na fluorescenčních proteinech exprimovaných z retrovirového plazmidu. Intenzita fluorescence se lišila u kontrolního plazmidu a plazmidů nesoucích cílové geny. Retrovirové plazmidy mají výhodu, že jsou schopny efektivně proinfikovat celou kulturu, jejich účinnost je velmi vysoká (až 100%)



a je stabilní. Jako jedna z možností, jak tento problém vyřešit, se nabízí ko-elektroporace plazmidů nesoucích pouze fluorescenční protein a druhého retrovirového plazmidu nesoucího pouze cílový gen. V tomto případě však nelze hladinu exprese posuzovat dle síly signálu fluorescenčního proteinu a je třeba komplikovat pokus dalším ověřováním exprese v buňkách (např. analýzou Western blott). Navíc pokud bychom využili např. pro elektroporaci osvědčený pCGFPA, který obsahuje dva promotory a lze do něj vložit kromě GFP ještě další gen, dosáhli bychom pouze transientní transfekce a ztratili tak výhodu retrovirového plazmidu. Další možností je naklonovat fúzní protein sestávající z cílového genu a fluorescenčního proteinu, toto řešení však není vhodné pro účely našeho experimentu vzhledem k předchozím zkušenostem se změnou aktivity proteinu po fúzi, jako tomu bylo u konstruktů v-Myb-HAER (Bartunek *et al.*, 1997) či možnosti změny terciální struktury proteinu nebo jeho lokalizaci po fúzi, čímž by se stal pro naše pokusy, které měly vyústit právě v pozorování lokalizace mutovaných proteinů, nepoužitelným.

Je zde i možnost, že kuřecí buňky nejsou vhodným prostředím pro expresi lidského proteinu hPrp31, ale nejsou známy publikace, které by se zabývaly omezeními exprese lidského proteinu v kuřeti, naopak existují články popisující expresi lidských proteinů v kuřeti a vzniká stále více transgenních slepic produkujících lidské proteiny (A. J. Harvey *et al.*, 2002; Rapp *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2015; T. Liu *et al.*, 2015; Herron *et al.*, 2018; Ching *et al.*, 2018; Oishi *et al.*, 2018). Za účelem potvrzení či vyvrácení této možnosti v našem experimentálním nastavení nebyly provedeny žádné pokusy.

Nicméně náš model byl funkční a ztráta schopnosti navázat další proteiny spliceozomu u mutace AD29 oproti divokému typu proteinu hPrp31 byla v našich kulturách dobře prokazatelná.

#### **5.4 Relevance kuřecího modelu pro studium lidských onemocnění**

Naše výsledky jsou součástí základního výzkumu, který by měl v širších souvislostech přispět k zlepšení vyhlídek člověka, zkvalitnění a prodloužení života, a tudíž zejména k léčbě různých onemocnění.

Hlavní námitkou proti kuřeti coby modelu molekulárních mechanismů u člověka je fakt, že kuře není savec. Kuře je však ideálním kompromisem- jedná se o model nesavčí, ale stejně jako savci patříci mezi *amniota*. Odlišný model přináší výhodu srovnání, často i zjednodušení zkoumaných buněčných mechanismů.

Kuře se jako model pro lidská onemocnění v minulosti osvědčilo už mnohokrát, v teoretickém úvodu práce je připomínán například model lidského ovarialního karcinomu (Hawkrigde, 2014), model vstupu nezralých leukemických buněk z kostní dřeně do krevního řečiště (Dvorakova *et al.*, 2013) či využití chorialantoidní membrány kuřecího embrya pro analýzu CAM (Murphy, 1913), která se běžně využívá i dnes.

## 5.5 Budoucnost kuřecího modelu a uplatnění autorky

V minulých letech byl postupně kuřecí model upozaděn jinými zvířecími modely, zejména modelem myším. Největším průlomem v molekulární genetice a vývojové biologii bylo vytvoření genových „knock-out“ jedinců u vyšších obratlovců, jmenovitě právě u myši. U kuřete byly podobné manipulace velmi obtížné a neúčinné, zatímco u myši se tato technika zdokonaluje už po několik desetiletí. S prvními metodami vyřazení funkce genu u myši přišli vědci už v 80. letech (Robertson *et al.*, 1986), v 90. letech se dále zdokonalovaly (Koller *et al.*, 1989; K. R. Thomas *et al.*, 1992) a dnes je dostupných kolem 4000 genových „knock-out“ myši. Tyto techniky využívají velmi časně embryo nebo neoplozené vajíčko, které se u slepice před snesením vejce nachází v těle matky a je paradoxně velmi obtížně dostupné. Techniky, které se k podobným pokusům u slepic používaly, nevedly k rutinnímu využití takto vzniklých „knock-out“ jedinců a v podstatě popírají výše zmíněné výhody kuřecího modelu. Dnes ale dochází ke zlomu, nové metody překonávají tyto překážky i u kuřecího modelu (Trefil *et al.*, 2017) a je pravděpodobné, že v blízké budoucnosti bude „knock-out“ v kuřeti stejně běžný jako u myši. S novými vyhlídkami kuřecího modelu rostou i možnosti využití znalostí, zkušeností a dovedností autorky a její uplatnění v dalším relevantním výzkumu. Metodika předložená v této práci je vynikajícím nástrojem právě pro toho rozvíjející se odvětví kuřecí genetiky.



## 6. Závěry

1) Techniky mikromanipulací s kuřecím embryem a následné vizualizace byly úspěšně zavedeny a prokázaly se jako funkční a hodnotné nejen pro naši laboratoř, ale v řadě projektů dalších oddělení Ústavu molekulární genetiky.

2) Protein v-Myb ovlivňuje časnou genovou expresi buněk NL v kuřecím embryu *in vitro* a *ex vivo*. Časné geny, jejichž exprese se v závislosti na působení v-Myb změnila nejzřetelněji, jsou Gremlin 2, SLC25A37, NKX3-2, Krt19 a BMP5. V literatuře lze najít souvislost mezi funkcí Krt19 a BMP5 a procesy probíhajícími při EMT, kterou buňky NL procházejí, a je tedy možné, že skrze změny v jejich expresi může v-Myb ovlivňovat vývoj buněk NL.

3) Gremlin 2 je jedním z antagonistů BMP z rodiny Cerberus/DAN a je tedy možné, že se může podílet na navyšování množství melanogenních buněk v kulturách kuřecí NL skrze inhibici BMP-4. Pokusy s jeho nadexpresí však neprokázaly žádnou signifikantní změnu v diferenciaci melanocytů v kulturách buněk NL ani v neurálních valech kuřecího embrya *in vivo*. Nezdá se pravděpodobné, že by Gremlin 2 sám spouštěl komitment melanogenní linie buněk a diferenciaci v NL.

4) Elektroporace vyvíjejícího se kuřecího oka přinesla hodnotné výsledky při studiu vlivu enhanceru SIMO a genů Meis1 Meis2 na indukci čočky. Tyto pokusy značně přispěly k rozšíření studie provedené na myším modelu.

5) Podařilo se účinně elektroporovat retinu u vyvíjejícího se oka kuřecího embrya *in ovo* a dále ji zpracovat *ex vivo* a *in vitro* za účelem sledování lokalizace snRNP ve fotoreceptorových buňkách a prokázat ztrátu schopnosti proteinu hPrp31 s mutací AD29 navázat další proteiny spliceozomu.



## 7. Seznam literatury

- Abo, T., Balch, C. M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol*, 127(3), 1024-1029.
- Acloque, H., Wilkinson, D. G., Nieto, M. A. (2008). In situ hybridization analysis of chick embryos in whole-mount and tissue sections. *Methods Cell Biol*, 87, 169-185. doi:10.1016/S0091-679X(08)00209-4
- Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J. B., Pereira, J. A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., Usoskin, D., Suter, U., Birchmeier, C., Ernfors, P. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*, 139(2), 366-379. doi:10.1016/j.cell.2009.07.049
- Al Naieb, S., Happel, C. M., Yelbuz, T. M. (2013). A detailed atlas of chick heart development in vivo. *Ann Anat*, 195(4), 324-341. doi:10.1016/j.aanat.2012.10.011
- Andermatt, I., Stoeckli, E. T. (2014). RNAi-based gene silencing in chicken brain development. *Methods Mol Biol*, 1082, 253-266. doi:10.1007/978-1-62703-655-9\_17
- Andermatt, I., Wilson, N., Stoeckli, E. T. (2014). In ovo electroporation of miRNA-based-plasmids to investigate gene function in the developing neural tube. *Methods Mol Biol*, 1101, 353-368. doi:10.1007/978-1-62703-721-1\_17
- Antosova, B., Smolikova, J., Klimova, L., Lachova, J., Bendova, M., Kozmikova, I., Machon, O., Kozmik, Z. (2016). The Gene Regulatory Network of Lens Induction Is Wired through Meis-Dependent Shadow Enhancers of Pax6. *PLoS Genet*, 12(12), e1006441. doi:10.1371/journal.pgen.1006441
- Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Folkman, J. (1974). A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol*, 41(2), 391-394.
- Ayer-Le Lievre, C. S., Le Douarin, N. M. (1982). The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras. *Dev Biol*, 94(2), 291-310.
- Baggiolini, A., Varum, S., Mateos, J. M., Bettosini, D., John, N., Bonalli, M., Ziegler, U., Dimou, L., Clevers, H., Furrer, R., Sommer, L. (2015). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell*, 16(3), 314-322. doi:10.1016/j.stem.2015.02.017

- Bailey, A. P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., Streit, A. (2006). Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev Cell*, 11(4), 505-517. doi:10.1016/j.devcel.2006.08.009
- Baltimore, D., Smoler, D., Manly, K. F., Bromfeld, E. (1971). The RNA tumour virus DNA polymerase: study of the endogenous and exogenous reactions. In: strategy of the viral genome. *Ciba Found Symp*, 317-324.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Goulding, M. D., Kintner, C. (1999). Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Dev Biol*, 212(2), 366-380. doi:10.1006/dbio.1999.9319
- Barrow, J. R. (2019). Examining Gene Expression Patterns Through Whole-Mount In Situ Hybridization. *Methods Mol Biol*, 1965, 281-295. doi:10.1007/978-1-4939-9182-2\_19
- Bartunek, P., Karafiat, V., Dvorakova, M., Zahorova, V., Mandikova, S., Zenke, M., Dvorak, M. (1997). The Myb leucine zipper is essential for leukemogenicity of the v-Myb protein. *Oncogene*, 15(24), 2939-2949. doi:10.1038/sj.onc.1201457
- Bellaïrs, R., Osmond, M. (2014). *Atlas of Chick Development* (3rd edition ed.): Academic Press
- Betancur, P., Simoes-Costa, M., Sauka-Spengler, T., Bronner, M. E. (2014). Expression and function of transcription factor cMyb during cranial neural crest development. *Mech Dev*, 132, 38-43. doi:10.1016/j.mod.2014.01.005
- Bhatia, S., Bengani, H., Fish, M., Brown, A., Divizia, M. T., de Marco, R., Damante, G., Grainger, R., van Heyningen, V., Kleinjan, D. A. (2013). Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes aniridia. *Am J Hum Genet*, 93(6), 1126-1134. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.028
- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172(4379), 603-606.
- Bolande, R. P. (1997). Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med*, 17(1), 1-25.
- Borwompinyo, S., Brake, J., Mozdziak, P. E., Petite, J. N. (2005). Culture of chicken embryos in surrogate eggshells. *Poult Sci*, 84(9), 1477-1482. doi:10.1093/ps/84.9.1477

- Bosselman, R. A., Hsu, R. Y., Boggs, T., Hu, S., Bruszewski, J., Ou, S., Kozar, L., Martin, F., Green, C., Jacobsen, F., et al. (1989). Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*, *243*(4890), 533-535.
- Bramlage, C. P., Muller, G. A., Tampe, B., Bevanda, J., Maatouk, I., Koziolok, M., Lange, K., Ahrens, K., Schmid, H., Cohen, C. D., Bramlage, P., Kretzler, M., Strutz, F. (2011). The role of bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) in human nephrosclerosis. *J Nephrol*, *24*(5), 647-655. doi:10.5301/JN.2011.6330
- Bronner-Fraser, M., Garcia-Castro, M. (2008). Manipulations of neural crest cells or their migratory pathways. *Methods Cell Biol*, *87*, 75-96. doi:10.1016/S0091-679X(08)00204-5
- Bronner, M. (2015). Confetti clarifies controversy: neural crest stem cells are multipotent. *Cell Stem Cell*, *16*(3), 217-218. doi:10.1016/j.stem.2015.02.016
- Burt, D. W. (2004). The chicken genome and the developmental biologist. *Mech Dev*, *121*(9), 1129-1135. doi:10.1016/j.mod.2004.04.020
- Cao, D., Wu, H., Li, Q., Sun, Y., Liu, T., Fei, J., Zhao, Y., Wu, S., Hu, X., Li, N. (2015). Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS One*, *10*(2), e0118626. doi:10.1371/journal.pone.0118626
- Catala, M., Ziller, C., Lapointe, F., Le Douarin, N. M. (2000). The developmental potentials of the caudalmost part of the neural crest are restricted to melanocytes and glia. *Mech Dev*, *95*(1-2), 77-87.
- Cermak, V., Kosla, J., Plachy, J., Trejbalova, K., Hejnar, J., Dvorak, M. (2010). The transcription factor EGR1 regulates metastatic potential of v-src transformed sarcoma cells. *Cell Mol Life Sci*, *67*(20), 3557-3568. doi:10.1007/s00018-010-0395-6
- Cloney, K., Franz-Odenaal, T. A. (2015). Optimized ex-ovo culturing of chick embryos to advanced stages of development. *J Vis Exp*(95), 52129. doi:10.3791/52129
- Cohen, A. M., Konigsberg, I. R. (1975). A clonal approach to the problem of neural crest determination. *Dev Biol*, *46*(2), 262-280.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., Hamburger, V. (1954). A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *40*(10), 1014-1018. doi:10.1073/pnas.40.10.1014
- Coiter, V. (1573). *Externarum Et Internarum Principalium Humani Corporis Partium Tabulae, Atque Anatomicae Exercitationes Observationesque Varias*.



- Colas, J. F., Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn*, 221(2), 117-145. doi:10.1002/dvdy.1144
- Collarini, E., Leighton, P., Pedersen, D., Harriman, B., Jacob, R., Mettler-Izquierdo, S., Yi, H., van de Lavoie, M. C., Etches, R. J. (2015). Inserting random and site-specific changes into the genome of chickens. *Poult Sci*, 94(4), 799-803. doi:10.3382/ps.2014-4372
- Couly, G. F., Coltey, P. M., Le Douarin, N. M. (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*, 117(2), 409-429.
- Cvekl, A., Ashery-Padan, R. (2014). The cellular and molecular mechanisms of vertebrate lens development. *Development*, 141(23), 4432-4447. doi:10.1242/dev.107953
- Dai, F., Yusuf, F., Farjah, G. H., Brand-Saberi, B. (2005). RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis. *Dev Biol*, 285(1), 80-90. doi:10.1016/j.ydbio.2005.06.005
- Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., Halley, P. A., Sang, H. M., Storey, K. G., Placzek, M., Tickle, C., Nair, V. K., Wilson, S. A. (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev Biol*, 294(2), 554-563. doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.020
- Duband, J. L. (2010). Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell Adh Migr*, 4(3), 458-482. doi:10.4161/cam.4.3.12501
- Dunn, B. E., Boone, M. A. (1977). Growth and mineral content of cultured chick embryos. *Poult Sci*, 56(2), 662-672. doi:10.3382/ps.0560662
- Dunn, B. E., Fitzharris, T. P., Barnett, B. D. (1981). Effects of varying chamber construction and embryo pre-incubation age on survival and growth of chick embryos in shell-less culture. *Anat Rec*, 199(1), 33-43. doi:10.1002/ar.1091990105
- Dupin, E., Calloni, G., Real, C., Goncalves-Trentin, A., Le Douarin, N. M. (2007). Neural crest progenitors and stem cells. *C R Biol*, 330(6-7), 521-529. doi:10.1016/j.crv.2007.04.004
- Dupin, E., Creuzet, S., Le Douarin, N. M. (2006). The contribution of the neural crest to the vertebrate body. *Adv Exp Med Biol*, 589, 96-119. doi:10.1007/978-0-387-46954-6\_6

- Dupin, E., Glavieux, C., Vaigot, P., Le Douarin, N. M. (2000). Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 7882-7887.
- Dvorakova, M., Karafiat, V., Pajer, P., Kluzakova, E., Jarkovska, K., Pekova, S., Krutilkova, L., Dvorak, M. (2013). DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment. *Oncogene*, 32(44), 5201-5209. doi:10.1038/onc.2012.553
- Dvorakova, M., Kralova, J., Karafiat, V., Bartunek, P., Dvorak, M. (2001). An ex vivo model to study v-Myb-induced leukemogenicity. *Blood Cells Mol Dis*, 27(2), 437-445. doi:10.1006/bcmd.2001.0402
- Eisen, J. S., Smith, J. C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135(10), 1735-1743. doi:10.1242/dev.001115
- Ellerman, C., Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.*(46), 595-609.
- Erickson, C. A., Goins, T. L. (1995). Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development*, 121(3), 915-924.
- Escoffre, J. M., Debin, A., Reynes, J. P., Drocourt, D., Tiraby, G., Hellaudais, L., Teissie, J., Golzio, M. (2008). Long-lasting in vivo gene silencing by electrotransfer of shRNA expressing plasmid. *Technol Cancer Res Treat*, 7(2), 109-116. doi:10.1177/153303460800700203
- Espinosa-Medina, I., Jevans, B., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Enomoto, H., Muller, T., Birchmeier, C., Burns, A. J., Brunet, J. F. (2017). Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45), 11980-11985. doi:10.1073/pnas.1710308114
- Etchevers, H. C., Vincent, C., Le Douarin, N. M., Couly, G. F. (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*, 128(7), 1059-1068.
- Farley, E. K., Olson, K. M., Zhang, W., Brandt, A. J., Rokhsar, D. S., Levine, M. S. (2015). Suboptimization of developmental enhancers. *Science*, 350(6258), 325-328. doi:10.1126/science.aac6948
- Ferkowicz, M. J., Yoder, M. C. (2005). Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol*, 33(9), 1041-1047. doi:10.1016/j.exphem.2005.06.006

- Flamme, I., Schulze-Osthoff, K., Jacob, H. J. (1991). Mitogenic activity of chicken chorioallantoic fluid is temporally correlated to vascular growth in the chorioallantoic membrane and related to fibroblast growth factors. *Development*, *111*(3), 683-690.
- Frampton, J. E. (2016). Sebelipase Alfa: A Review in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. *Am J Cardiovasc Drugs*, *16*(6), 461-468. doi:10.1007/s40256-016-0203-2
- Fu, M., Xu, L., Chen, X., Han, W., Ruan, C., Li, J., Cai, C., Ye, M., Gao, P. (2019). Neural Crest Cells Differentiate Into Brown Adipocytes and Contribute to Periaortic Arch Adipose Tissue Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, ATVBAHA119312838. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312838
- Fuhrmann, S. (2010). Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol*, *93*, 61-84. doi:10.1016/B978-0-12-385044-7.00003-5
- Funahashi, J., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., Nakamura, H. (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev Growth Differ*, *41*(1), 59-72.
- Gammill, L. S., Jacques-Fricke, B., Roffers-Agarwal, J. (2019). Embryological and Genetic Manipulation of Chick Development. *Methods Mol Biol*, *1920*, 75-97. doi:10.1007/978-1-4939-9009-2\_6
- Gandhi, S., Piacentino, M. L., Vieceli, F. M., Bronner, M. E. (2017). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. *Dev Biol*, *432*(1), 86-97. doi:10.1016/j.ydbio.2017.08.036
- George, O. L., Ness, S. A. (2014). Situational awareness: regulation of the myb transcription factor in differentiation, the cell cycle and oncogenesis. *Cancers (Basel)*, *6*(4), 2049-2071. doi:10.3390/cancers6042049
- Gilbert, N., Boyle, S., Sutherland, H., de Las Heras, J., Allan, J., Jenuwein, T., Bickmore, W. A. (2003). Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO J*, *22*(20), 5540-5550. doi:10.1093/emboj/cdg520
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology* (6th ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Gilmour, D. G. (1959). Segregation of Genes Determining Red Cell Antigens at High Levels of Inbreeding in Chickens. *Genetics*, *44*(1), 14-33.

- Giovanzone, D., Ortega, B., Reyes, M., El-Ghali, N., Rabadi, M., Sao, S., de Bellard, M. E. (2015). Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. *Acta Histochem*, 117(3), 255-266. doi:10.1016/j.acthis.2015.03.002
- Graeper, L. (1929). Die Primitiventwicklung des Huhns nach stereokinematographischen Untersuchungen kontrolliert durch vitale Farbmarkierung und verglichen mit der Entwicklung anderer Wirbeltiere. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 116, 382–429.
- Graf, T. (1992). Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells. *Curr Opin Genet Dev*, 2(2), 249-255.
- Gunhaga, L. (2011). The lens: a classical model of embryonic induction providing new insights into cell determination in early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366(1568), 1193-1203. doi:10.1098/rstb.2010.0175
- Hall, B. K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev*, 2(1), 3-5.
- Hall, B. K. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*, 33(5), 781-793.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88(1), 49-92.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hartong, D. T., Berson, E. L., Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(9549), 1795-1809. doi:10.1016/S0140-6736(06)69740-7
- Harvey, A. J., Speksnijder, G., Baugh, L. R., Morris, J. A., Ivarie, R. (2002). Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat Biotechnol*, 20(4), 396-399. doi:10.1038/nbt0402-396
- Harvey, W. (1651). *Exercitationes de Generatione Animalium*. Londoni, Typis Du-Gardianis.
- Hasek, M. (1953a). [Parabiosis of birds during their embryonic development]. *Chechoslovatskaia Biol*, 2(1), 29-31.

- Hasek, M. (1953b). [Vegetative hybridization of animals by means of junction of the blood circulation during embryonic development]. *Chekhoslovatskaia Biol*, 2(5), 267-282.
- Hawkridge, A. M. (2014). The chicken model of spontaneous ovarian cancer. *Proteomics Clin Appl*, 8(9-10), 689-699. doi:10.1002/prca.201300135
- Hejnar, J. (2017). Jan Svoboda (1934-2017): sixty years with retroviruses. *Retrovirology*, 14(1), 32. doi:10.1186/s12977-017-0357-2
- Herron, L. R., Pridans, C., Turnbull, M. L., Smith, N., Lillico, S., Sherman, A., Gilhooley, H. J., Wear, M., Kurian, D., Papadakos, G., Digard, P., Hume, D. A., Gill, A. C., Sang, H. M. (2018). A chicken bioreactor for efficient production of functional cytokines. *BMC Biotechnol*, 18(1), 82. doi:10.1186/s12896-018-0495-1
- Hilfer, S. R. (1983). Development of the eye of the chick embryo. *Scan Electron Microsc(Pt 3)*, 1353-1369.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L., Ton, C. C., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D., van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*, 354(6354), 522-525. doi:10.1038/354522a0
- Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S., Vogt, P. K. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology*, 248(2), 295-304. doi:10.1006/viro.1998.9290
- Hirst, C. E., Marcelle, C. (2015). The avian embryo as a model system for skeletal myogenesis. *Results Probl Cell Differ*, 56, 99-122. doi:10.1007/978-3-662-44608-9\_5
- His, W. (1868). Die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei: Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes. *Liepzig*.
- Hisa, T., Spence, S. E., Rachel, R. A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J. M., Devor-Henneman, D. E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (2004). Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J*, 23(2), 450-459. doi:10.1038/sj.emboj.7600038
- Horwitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Tomson, A. J., Darooge, M. A., Fisher, B. E., Mauricio, J., Klundt, I. (1964). Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-Beta-D-Glycopyranosides. *J Med Chem*, 7, 574-575.

- Hou, L., Pavan, W. J. (2008). Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res*, 18(12), 1163-1176. doi:10.1038/cr.2008.303
- Huranova, M., Hnilicova, J., Fleischer, B., Cvackova, Z., Stanek, D. (2009). A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Hum Mol Genet*, 18(11), 2014-2023. doi:10.1093/hmg/ddp125
- Chapman, S. C., Collignon, J., Schoenwolf, G. C., Lumsden, A. (2001). Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn*, 220(3), 284-289. doi:10.1002/1097-0177(20010301)220:3<284::AID-DVDY1102>3.0.CO;2-5
- Chesnutt, C., Niswander, L. (2004). Plasmid-based short-hairpin RNA interference in the chicken embryo. *Genesis*, 39(2), 73-78. doi:10.1002/gene.20028
- Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A., Briscoe, J. (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Dev Cell*, 8(2), 179-192. doi:10.1016/j.devcel.2004.12.010
- Ching, K. H., Collarini, E. J., Abdiche, Y. N., Bedinger, D., Pedersen, D., Izquierdo, S., Harriman, R., Zhu, L., Etches, R. J., van de Lavoie, M. C., Harriman, W. D., Leighton, P. A. (2018). Chickens with humanized immunoglobulin genes generate antibodies with high affinity and broad epitope coverage to conserved targets. *MAbs*, 10(1), 71-80. doi:10.1080/19420862.2017.1386825
- Ideno, H., Takanabe, R., Shimada, A., Imaizumi, K., Araki, R., Abe, M., Nifuji, A. (2009). Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro. *Exp Cell Res*, 315(3), 474-484. doi:10.1016/j.yexcr.2008.11.019
- Im, J., Kim, H., Kim, S., Jho, E. H. (2007). Wnt/beta-catenin signaling regulates expression of PRDC, an antagonist of the BMP-4 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(1), 296-301. doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.205
- Jin, E. J., Erickson, C. A., Takada, S., Burrus, L. W. (2001). Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo. *Dev Biol*, 233(1), 22-37. doi:10.1006/dbio.2001.0222
- Kalcheim, C., Le Douarin, N. M. (1999). *The Neural Crest*. Cambridge University Press
- Kalcheim, C., Teillet, M. A. (1989). Consequences of somite manipulation on the pattern of dorsal root ganglion development. *Development*, 106(1), 85-93.

- Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S., Gruss, P. (1999). Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev Biol*, 205(1), 79-97. doi:10.1006/dbio.1998.9128
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Krejci, E., Kralova, J., Pajer, P., Snajdr, P., Mandikova, S., Bartunek, P., Grim, M., Dvorak, M. (2005). Transcription factor c-Myb is involved in the regulation of the epithelial-mesenchymal transition in the avian neural crest. *Cell Mol Life Sci*, 62(21), 2516-2525. doi:10.1007/s00018-005-5297-7
- Karafiat, V., Dvorakova, M., Pajer, P., Cermak, V., Dvorak, M. (2007). Melanocyte fate in neural crest is triggered by Myb proteins through activation of c-kit. *Cell Mol Life Sci*, 64(22), 2975-2984. doi:10.1007/s00018-007-7330-5
- Katahira, T., Nakamura, H. (2003). Gene silencing in chick embryos with a vector-based small interfering RNA system. *Dev Growth Differ*, 45(4), 361-367.
- Kelsh, R. N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*, 28(8), 788-798. doi:10.1002/bies.20445
- Kelsh, R. N., Harris, M. L., Colanesi, S., Erickson, C. A. (2009). Stripes and belly-spots -- a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol*, 20(1), 90-104. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.001
- Kerosuo, L., Bronner-Fraser, M. (2012). What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol*, 23(3), 320-332. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.010
- Keynes, R. J., Stern, C. D. (1984). Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature*, 310(5980), 786-789. doi:10.1038/310786a0
- Kinutani, M., Coltey, M., Le Douarin, N. M. (1986). Postnatal development of a demyelinating disease in avian spinal cord chimeras. *Cell*, 45(2), 307-314.
- Kirby, M. L., Gale, T. F., Stewart, D. E. (1983). Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*, 220(4601), 1059-1061. doi:10.1126/science.6844926
- Kirby, M. L., Turnage, K. L., 3rd, Hays, B. M. (1985). Characterization of conotruncal malformations following ablation of "cardiac" neural crest. *Anat Rec*, 213(1), 87-93. doi:10.1002/ar.1092130112
- Klapholz-Brown, Z., Walmsley, G. G., Nusse, Y. M., Nusse, R., Brown, P. O. (2007). Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests

mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments. *PLoS One*, 2(9), e945. doi:10.1371/journal.pone.0000945

Klempnauer, K. H., Bishop, J. M. (1983). Transduction of c-myb into avian myeloblastosis virus: locating points of recombination within the cellular gene. *J Virol*, 48(3), 565-572.

Klempnauer, K. H., Gonda, T. J., Bishop, J. M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 31(2 Pt 1), 453-463.

Klempnauer, K. H., Ramsay, G., Bishop, J. M., Moscovici, M. G., Moscovici, C., McGrath, J. P., Levinson, A. D. (1983). The product of the retroviral transforming gene v-myb is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene c-myb. *Cell*, 33(2), 345-355.

Klempnauer, K. H., Symonds, G., Evan, G. I., Bishop, J. M. (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and avian leukemia virus E26 and by chicken c-myb gene. *Cell*, 37(2), 537-547.

Koller, B. H., Hagemann, L. J., Doetschman, T., Hagaman, J. R., Huang, S., Williams, P. J., First, N. L., Maeda, N., Smithies, O. (1989). Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(22), 8927-8931. doi:10.1073/pnas.86.22.8927

Kontges, G., Lumsden, A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development*, 122(10), 3229-3242.

Koo, B. C., Kwon, M. S., Choi, B. R., Kim, J. H., Cho, S. K., Sohn, S. H., Cho, E. J., Lee, H. T., Chang, W., Jeon, I., Park, J. K., Park, J. B., Kim, T. (2006). Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J*, 20(13), 2251-2260. doi:10.1096/fj.06-5866com

Kos, R., Reedy, M. V., Johnson, R. L., Erickson, C. A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development*, 128(8), 1467-1479.

Kos, R., Tucker, R. P., Hall, R., Duong, T. D., Erickson, C. A. (2003). Methods for introducing morpholinos into the chicken embryo. *Dev Dyn*, 226(3), 470-477. doi:10.1002/dvdy.10254



- Kriebitz, N. N., Kiecker, C., McCormick, L., Lumsden, A., Graham, A., Bell, E. (2009). PRDC regulates placode neurogenesis in chick by modulating BMP signalling. *Dev Biol*, 336(2), 280-292. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.013
- Krull, C. E. (2004). A primer on using in ovo electroporation to analyze gene function. *Dev Dyn*, 229(3), 433-439. doi:10.1002/dvdy.10473
- Kuan, C. Y., Tannahill, D., Cook, G. M., Keynes, R. J. (2004). Somite polarity and segmental patterning of the peripheral nervous system. *Mech Dev*, 121(9), 1055-1068. doi:10.1016/j.mod.2004.05.001
- Kulesa, P. M., Fraser, S. E. (1998). Neural crest cell dynamics revealed by time-lapse video microscopy of whole embryo chick explant cultures. *Dev Biol*, 204(2), 327-344. doi:10.1006/dbio.1998.9082
- Kuo, B. R., Erickson, C. A. (2010). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adh Migr*, 4(4), 567-585.
- Kwon, M. S., Koo, B. C., Kim, D., Nam, Y. H., Cui, X. S., Kim, N. H., Kim, T. (2018). Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites. *PLoS One*, 13(5), e0194721. doi:10.1371/journal.pone.0194721
- Le Douarin, N. M. (1969). [Details of the interphase nucleus in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)]. *Bull Biol Fr Belg*, 103(3), 435-452.
- Le Douarin, N. M. (1973). A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol*, 30(1), 217-222.
- Le Douarin, N. M. (2004). The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. *Mech Dev*, 121(9), 1089-1102. doi:10.1016/j.mod.2004.06.003
- Le Douarin, N. M. (2018). A life in Science with the avian embryo. *Int J Dev Biol*, 62(1-2-3), 19-33. doi:10.1387/ijdb.170287NL
- Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G., Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, 131(19), 4637-4650. doi:10.1242/dev.01350
- Le Douarin, N. M., Dieterlen-Lievre, F., Creuzet, S., Teillet, M. A. (2008). Quail-chick transplantations. *Methods Cell Biol*, 87, 19-58. doi:10.1016/S0091-679X(08)00202-1

- Le Douarin, N. M., Dupin, E. (2012). The neural crest in vertebrate evolution. *Curr Opin Genet Dev*, 22(4), 381-389. doi:10.1016/j.gde.2012.06.001
- Le Douarin, N. M., Dupin, E. (2016). The Pluripotency of Neural Crest Cells and Their Role in Brain Development. *Curr Top Dev Biol*, 116, 659-678. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.10.008
- Le Douarin, N. M., Dupin, E. (2018). The "beginnings" of the neural crest. *Dev Biol*, 444 Suppl 1, S3-S13. doi:10.1016/j.ydbio.2018.07.019
- Le Douarin, N. M., Dupin, E., Ziller, C. (1994). Genetic and epigenetic control in neural crest development. *Curr Opin Genet Dev*, 4(5), 685-695.
- Le Douarin, N. M., Fontaine, J., Le Lievre, C. (1974). New studies on the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells--interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry*, 38(4), 297-305.
- Le Douarin, N. M., Le Lievre, C. (1970). [Demonstration of neural origin of calcitonin cells of ultimobranchial body of chick embryo]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 270(23), 2857-2860.
- Le Douarin, N. M., Le Lievre, C., Fontaine, J. (1972). [Experimental research on the embryologic origin of the carotid body in birds]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 275(4), 583-586.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. (1971). [Localization, by the method of interspecific grafts of the neural area from which adrenal cells arise in the bird embryo]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 272(3), 481-484.
- Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. (1973). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 30(1), 31-48.
- Le Douarin, N. M., Ziller, C., Couly, G. F. (1993). Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev Biol*, 159(1), 24-49. doi:10.1006/dbio.1993.1219
- Lecoin, L., Sakurai, T., Ngo, M. T., Abe, Y., Yanagisawa, M., Le Douarin, N. M. (1998). Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3024-3029.
- Lee, S. H., Gupta, M. K., Han, D. W., Han, S. Y., Uhm, S. J., Kim, T., Lee, H. T. (2007). Development of transgenic chickens expressing human parathormone under the

- control of a ubiquitous promoter by using a retrovirus vector system. *Poult Sci*, 86(10), 2221-2227. doi:10.1093/ps/86.10.2221
- Lim, J., Thiery, J. P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 139(19), 3471-3486. doi:10.1242/dev.071209
- Lipsick, J. S., Wang, D. M. (1999). Transformation by v-Myb. *Oncogene*, 18(19), 3047-3055. doi:10.1038/sj.onc.1202745
- Liu, T., Wu, H., Cao, D., Li, Q., Zhang, Y., Li, N., Hu, X. (2015). Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens. *PLoS One*, 10(5), e0127922. doi:10.1371/journal.pone.0127922
- Liu, W., Lagutin, O. V., Mende, M., Streit, A., Oliver, G. (2006). Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *EMBO J*, 25(22), 5383-5395. doi:10.1038/sj.emboj.7601398
- Lokman, N. A., Elder, A. S., Ricciardelli, C., Oehler, M. K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci*, 13(8), 9959-9970. doi:10.3390/ijms13089959
- Love, J., Gribbin, C., Mather, C., Sang, H. (1994). Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology (NY)*, 12(1), 60-63.
- Luo, J., Yan, X., Lin, J., Rolfs, A. (2012). Gene transfer into older chicken embryos by ex ovo electroporation. *J Vis Exp*(65). doi:10.3791/4078
- Malpighi, M. (1673). *Dissertatio Epistolica de Formatione Pulli in Ovo London: J Martyn.*
- Marics, I., Padilla, F., Guillemot, J. F., Scaal, M., Marcelle, C. (2002). FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. *Development*, 129(19), 4559-4569.
- Maxwell, G. D., Forbes, M. E., Christie, D. S. (1988). Analysis of the development of cellular subsets present in the neural crest using cell sorting and cell culture. *Neuron*, 1(7), 557-568.
- McGrew, M. J., Sherman, A., Ellard, F. M., Lillico, S. G., Gilhooley, H. J., Kingsman, A. J., Mitrophanous, K. A., Sang, H. (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 5(7), 728-733. doi:10.1038/sj.embor.7400171

- McKeown, S. J., Wallace, A. S., Anderson, R. B. (2013). Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. *Dev Biol*, 373(2), 244-257. doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.028
- Meulemans, D., Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell*, 7(3), 291-299. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.007
- Milet, C., Monsoro-Burq, A. H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol*, 366(1), 22-33. doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.013
- Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M., Noguchi, S. (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach. *Dev Growth Differ*, 40(3), 343-353.
- Morin, V., Veron, N., Marcelle, C. (2017). CRISPR/Cas9 in the Chicken Embryo. *Methods Mol Biol*, 1650, 113-123. doi:10.1007/978-1-4939-7216-6\_7
- Mort, R. L., Jackson, I. J., Patton, E. E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142(4), 620-632. doi:10.1242/dev.106567
- Moulton, J. D. (2017). Using Morpholinos to Control Gene Expression. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 68, 4 30 31-34 30 29. doi:10.1002/cpnc.21
- Mozdziak, P. E., Borwornpinyo, S., McCoy, D. W., Petite, J. N. (2003a). Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Dev Dyn*, 226(3), 439-445. doi:10.1002/dvdy.10234
- Mozdziak, P. E., Pophal, S., Borwornpinyo, S., Petite, J. N. (2003b). Transgenic chickens expressing beta-galactosidase hydrolyze lactose in the intestine. *J Nutr*, 133(10), 3076-3079. doi:10.1093/jn/133.10.3076
- Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A. B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. A., Pietryga, D. W., Scott, W. J., Jr., Potter, S. S. (1991). A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, 65(4), 677-689.
- Murphy, J. B. (1913). Transplantability of Tissues to the Embryo of Foreign Species : Its Bearing on Questions of Tissue Specificity and Tumor Immunity. *J Exp Med*, 17(4), 482-493. doi:10.1084/jem.17.4.482
- Nakamura, H., Funahashi, J. (2013). Electroporation: past, present and future. *Dev Growth Differ*, 55(1), 15-19. doi:10.1111/dgd.12012

- Nakamura, H., Katahira, T., Sato, T., Watanabe, Y., Funahashi, J. (2004). Gain- and loss-of-function in chick embryos by electroporation. *Mech Dev*, *121*(9), 1137-1143. doi:10.1016/j.mod.2004.05.013
- Nakamura, H., Watanabe, Y., Funahashi, J. (2000). Misexpression of genes in brain vesicles by in ovo electroporation. *Dev Growth Differ*, *42*(3), 199-201.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, *1*(7), 841-845.
- Newgreen, D. F., Jahnke, I., Allan, I. J., Gibbins, I. L. (1980). Differentiation of sympathetic and enteric neurons of the fowl embryo in grafts to the chorio-allantoic membrane. *Cell Tissue Res*, *208*(1), 1-19.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S., Ishizaki, R. (1988). Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res*, *16*(23), 11075-11089.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y. (1994). Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, *79*(4), 639-648.
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Tagami, T. (2018). Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Sci Rep*, *8*(1), 10203. doi:10.1038/s41598-018-28438-2
- Okino, M., Mohri, H. (1987). Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res*, *78*(12), 1319-1321.
- Packard, D. S., Jr., Cox, C., Poole, T. J. (2000). Improved techniques for avian embryo culture, somite cell culture, and microsurgery. *Methods Mol Biol*, *137*, 185-199. doi:10.1385/1-59259-066-7:185
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Pourquie, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell*, *91*(5), 639-648.
- Pander, C. H. (1817). Dissertatio inauguralis sistens historiam metamorphoseos quam ovum prioribus quinque diebus subit. *Wirceburgi: Typis Nitribitt*. doi:https://doi.org/10.5962/bhl.title.48488

- Pearse, A. G., Polak, J. M., Rost, F. W., Fontaine, J., Le Lievre, C., Le Douarin, N. (1973). Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system. *Histochemie*, 34(3), 191-203.
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S., Stoeckli, E. T. (2003). Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol*, 21(1), 93-96. doi:10.1038/nbt770
- Polak, J. M., Pearse, A. G., Le Lievre, C., Fontaine, J., Le Douarin, N. M. (1974). Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitonin-producing cells. *Histochemistry*, 40(3), 209-214.
- Pourquie, O. (2004). The chick embryo: a leading model in somitogenesis studies. *Mech Dev*, 121(9), 1069-1079. doi:10.1016/j.mod.2004.05.002
- Prasad, M. S., Charney, R. M., Garcia-Castro, M. I. (2019). Specification and formation of the neural crest: Perspectives on lineage segregation. *Genesis*, 57(1), e23276. doi:10.1002/dvg.23276
- Prasad, M. S., Sauka-Spengler, T., LaBonne, C. (2012). Induction of the neural crest state: control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Dev Biol*, 366(1), 10-21. doi:10.1016/j.ydbio.2012.03.014
- Psychoyos, D., Finnell, R. (2008). Double whole mount in situ hybridization of early chick embryos. *J Vis Exp*(20). doi:10.3791/904
- Pucihar, G., Kotnik, T., Valic, B., Miklavcic, D. (2006). Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Ann Biomed Eng*, 34(4), 642-652. doi:10.1007/s10439-005-9076-2
- Pyrgaki, C., Trainor, P., Hadjantonakis, A. K., Niswander, L. (2010). Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Dev Biol*, 344(2), 941-947. doi:10.1016/j.ydbio.2010.06.010
- Ramachandran, S., Hiratsuka, K., Chua, N. H. (1994). Transcription factors in plant growth and development. *Curr Opin Genet Dev*, 4(5), 642-646.
- Rapp, J. C., Harvey, A. J., Speksnijder, G. L., Hu, W., Ivarie, R. (2003). Biologically active human interferon alpha-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res*, 12(5), 569-575.
- Ribatti, D. (2017). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol*, 70, 97-101. doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.004

- Richardson, M., Singh, G. (2003). Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 3(2), 155-185.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323(6087), 445-448. doi:10.1038/323445a0
- Rols, M. P. (2006). Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim Biophys Acta*, 1758(3), 423-428. doi:10.1016/j.bbame.2006.01.005
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med*, 13(4), 397-411. doi:10.1084/jem.13.4.397
- Rowan, S., Siggers, T., Lachke, S. A., Yue, Y., Bulyk, M. L., Maas, R. L. (2010). Precise temporal control of the eye regulatory gene Pax6 via enhancer-binding site affinity. *Genes Dev*, 24(10), 980-985. doi:10.1101/gad.1890410
- Ruzickova, S., Stanek, D. (2017). Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol*, 14(5), 544-552. doi:10.1080/15476286.2016.1191735
- Sale, A. J., Hamilton, W. A. (1968). Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta*, 163(1), 37-43.
- Salter, D. W., Crittenden, L. B. (1989). Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germ line of the chicken. *Theor Appl Genet*, 77(4), 457-461. doi:10.1007/BF00274263
- Salter, D. W., Smith, E. J., Hughes, S. H., Wright, S. E., Crittenden, L. B. (1987). Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology*, 157(1), 236-240.
- Sambrook, J., Westphal, H., Srinivasan, P. R., Dulbecco, R. (1968). The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 60(4), 1288-1295. doi:10.1073/pnas.60.4.1288
- Sang, H. (2004). Prospects for transgenesis in the chick. *Mech Dev*, 121(9), 1179-1186. doi:10.1016/j.mod.2004.05.012
- Scaal, M., Gros, J., Lesbros, C., Marcelle, C. (2004). In ovo electroporation of avian somites. *Dev Dyn*, 229(3), 643-650. doi:10.1002/dvdy.10433

- Semple-Rowland, S. L., Berry, J. (2014). Use of lentiviral vectors to deliver and express bicistronic transgenes in developing chicken embryos. *Methods*, 66(3), 466-473. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.026
- Sheng, G., dos Reis, M., Stern, C. D. (2003). Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell*, 115(5), 603-613.
- Sherman, A., Dawson, A., Mather, C., Gilhooley, H., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D., Sang, H. (1998). Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol*, 16(11), 1050-1053. doi:10.1038/3497
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*, 33(2), 129-154.
- Schieffelbein, J. W. (1994). Cell fate and cell morphogenesis in higher plants. *Curr Opin Genet Dev*, 4(5), 647-651.
- Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Izquierdo, S. M., Fesler, J., Pedersen, D., Klasing, K. C., Kaspers, B., Harriman, W. D., van de Lavoie, M. C., Etches, R. J., Leighton, P. A. (2013). Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20170-20175. doi:10.1073/pnas.1317106110
- Simoës-Costa, M., Bronner, M. E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242-257. doi:10.1242/dev.105445
- Song, Y., Duraisamy, S., Ali, J., Kizhakkayil, J., Jacob, V. D., Mohammed, M. A., Eltigani, M. A., Amisetty, S., Shukla, M. K., Etches, R. J., de Lavoie, M. C. (2014). Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. *Biol Reprod*, 90(1), 15. doi:10.1095/biolreprod.113.113381
- Starostova, M., Cermak, V., Dvorakova, M., Karafiat, V., Kosla, J., Dvorak, M. (2014). The oncoprotein v-Myb activates transcription of Gremlin 2 during in vitro differentiation of the chicken neural crest to melanoblasts. *Gene*, 540(1), 122-129. doi:10.1016/j.gene.2014.02.031
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260(5547), 170-173.



- Stemple, D. L., Anderson, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71(6), 973-985.
- Stern, C. D. (2005). The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell*, 8(1), 9-17. doi:10.1016/j.devcel.2004.11.018
- Streit, A. (2008). EC culture: a method to culture early chick embryos. *Methods Mol Biol*, 461, 255-264. doi:10.1007/978-1-60327-483-8\_17
- Streit, A., Stern, C. D. (2001). Combined whole-mount in situ hybridization and immunohistochemistry in avian embryos. *Methods*, 23(4), 339-344. doi:10.1006/meth.2000.1146
- Svoboda, J. (1960). Presence of chicken tumour virus in the sarcoma of the adult rat inoculated after birth with Rous sarcoma tissue. *Nature*, 186, 980-981. doi:10.1038/186980b0
- Svoboda, J. (2015). Cell Association in Rous Sarcoma Virus (RSV) Rescue and Cell Infection. *Folia Biol (Praha)*, 61(5), 161-167.
- Temin, H. M., Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252), 1211-1213.
- Thangaraj, G., Christophel, J., Bachmann, G., Greif, A., Layer, P. G. (2015). PEDF counteracts DL-alpha-amino adipate toxicity and rescues gliotoxic damages in RPE-free chicken retinal explants. *Exp Eye Res*, 134, 111-122. doi:10.1016/j.exer.2015.02.010
- Theveneau, E., Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*, 366(1), 34-54. doi:10.1016/j.ydbio.2011.12.041
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thomas, A. J., Erickson, C. A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(6), 598-610. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x
- Thomas, K. R., Deng, C., Capecchi, M. R. (1992). High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol*, 12(7), 2919-2923. doi:10.1128/mcb.12.7.2919

- Tomaskovic-Crook, E., Crook, J. M. (2011). Human embryonic stem cell therapies for neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10(4), 440-448.
- Trefil, P., Aumann, D., Koslova, A., Mucksova, J., Benesova, B., Kalina, J., Wurmser, C., Fries, R., Elleder, D., Schusser, B., Hejnar, J. (2017). Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken. *Sci Rep*, 7(1), 14246. doi:10.1038/s41598-017-14475-w
- Tufan, A. C., Satiroglu-Tufan, N. L. (2005). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets*, 5(4), 249-266.
- Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissie, J., Rols, M. P., Miklavcic, D. (2003). Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur Biophys J*, 32(6), 519-528. doi:10.1007/s00249-003-0296-9
- Van Straaten, H. W., Janssen, H. C., Peeters, M. C., Copp, A. J., Hekking, J. W. (1996). Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic. *Dev Dyn*, 207(3), 309-318. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199611)207:3<309::AID-AJA8>3.0.CO;2-L
- Veron, N., Qu, Z., Kipen, P. A., Hirst, C. E., Marcelle, C. (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol*, 407(1), 68-74. doi:10.1016/j.ydbio.2015.08.007
- Vilquin, J. T., Kennel, P. F., Paturneau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Boissel, N., Delaere, P., Tremblay, J. P., Scherman, D., Fiszman, M. Y., Schwartz, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther*, 8(14), 1097-1107. doi:10.1038/sj.gt.3301484
- Von Baer, K. E. (1827). De ovi mammalium et hominis genesi. [On the Genesis of the Ovum Mammals and of Man]. *Isis*, 47(2 (Jun. 1956)), 117-153.
- Wallis, J. W., Aerts, J., Groenen, M. A., Crooijmans, R. P., Layman, D., Graves, T. A., Scheer, D. E., Kremitzki, C., Fedele, M. J., Mudd, N. K., Cardenas, M., Higginbotham, J., Carter, J., McGrane, R., Gaige, T., Mead, K., Walker, J., Albracht, D., Davito, J., Yang, S. P., Leong, S., Chinwalla, A., Sekhon, M., Wylie, K., Dodgson, J., Romanov, M. N., Cheng, H., de Jong, P. J., Osoegawa, K., Nefedov, M., Zhang, H., McPherson, J. D., Krzywinski, M., Schein, J., Hillier, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Warren, W. C. (2004). A physical map of the chicken genome. *Nature*, 432(7018), 761-764. doi:10.1038/nature03030
- Warren, W. C., Hillier, L. W., Tomlinson, C., Minx, P., Kremitzki, M., Graves, T., Markovic, C., Bouk, N., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Schneider, V., Mansour,

- T. A., Brown, C. T., Zimin, A., Hawken, R., Abrahamsen, M., Pyrkosz, A. B., Morisson, M., Fillon, V., Vignal, A., Chow, W., Howe, K., Fulton, J. E., Miller, M. M., Lovell, P., Mello, C. V., Wirthlin, M., Mason, A. S., Kuo, R., Burt, D. W., Dodgson, J. B., Cheng, H. H. (2017). A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. *G3 (Bethesda)*, 7(1), 109-117. doi:10.1534/g3.116.035923
- Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol Biol*, 55, 3-28. doi:10.1385/0-89603-328-7:3
- Weiss, R. A. (2018). Remembering Jan Svoboda: A Personal Reflection. *Viruses*, 10(4). doi:10.3390/v10040203
- Weston, J. A., Butler, S. L. (1966). Temporal factors affecting localization of neural crest cells in the chicken embryo. *Dev Biol*, 14(2), 246-266.
- Williams, R. M., Senanayake, U., Artibani, M., Taylor, G., Wells, D., Ahmed, A. A., Sauka-Spengler, T. (2018). Genome and epigenome engineering CRISPR toolkit for in vivo modulation of cis-regulatory interactions and gene expression in the chicken embryo. *Development*, 145(4). doi:10.1242/dev.160333
- Williams, S. C., Altmann, C. R., Chow, R. L., Hemmati-Brivanlou, A., Lang, R. A. (1998). A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech Dev*, 73(2), 225-229.
- Wong, G. K., Liu, B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., Zhang, Z., Meng, Q., Zhou, J., Li, D., Zhang, J., Ni, P., Li, S., Ran, L., Li, H., Zhang, J., Li, R., Li, S., Zheng, H., Lin, W., Li, G., Wang, X., Zhao, W., Li, J., Ye, C., Dai, M., Ruan, J., Zhou, Y., Li, Y., He, X., Zhang, Y., Wang, J., Huang, X., Tong, W., Chen, J., Ye, J., Chen, C., Wei, N., Li, G., Dong, L., Lan, F., Sun, Y., Zhang, Z., Yang, Z., Yu, Y., Huang, Y., He, D., Xi, Y., Wei, D., Qi, Q., Li, W., Shi, J., Wang, M., Xie, F., Wang, J., Zhang, X., Wang, P., Zhao, Y., Li, N., Yang, N., Dong, W., Hu, S., Zeng, C., Zheng, W., Hao, B., Hillier, L. W., Yang, S. P., Warren, W. C., Wilson, R. K., Brandstrom, M., Ellegren, H., Crooijmans, R. P., van der Poel, J. J., Bovenhuis, H., Groenen, M. A., Ovcharenko, I., Gordon, L., Stubbs, L., Lucas, S., Glavina, T., Aerts, A., Kaiser, P., Rothwell, L., Young, J. R., Rogers, S., Walker, B. A., van Hateren, A., Kaufman, J., Bumstead, N., Lamont, S. J., Zhou, H., Hocking, P. M., Morrice, D., de Koning, D. J., Law, A., Bartley, N., Burt, D. W., Hunt, H., Cheng, H. H., Gunnarsson, U., Wahlberg, P., Andersson, L., Kindlund, E., Tammi, M. T., Andersson, B., Webber, C., Ponting, C. P., Overton, I. M., Boardman, P. E., Tang, H., Hubbard, S. J., Wilson, S. A., Yu, J., Wang, J., Yang, H., International Chicken Polymorphism Map, C. (2004). A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*, 432(7018), 717-722. doi:10.1038/nature03156

- Yaneza, M., Gilthorpe, J. D., Lumsden, A., Tucker, A. S. (2002). No evidence for ventrally migrating neural tube cells from the mid- and hindbrain. *Dev Dyn*, 223(1), 163-167. doi:10.1002/dvdy.1241
- Yntema, C. L., Hammond, W. S. (1954). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*, 101(2), 515-541.
- Zhai, Y., Kuick, R., Nan, B., Ota, I., Weiss, S. J., Trimble, C. L., Fearon, E. R., Cho, K. R. (2007). Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res*, 67(21), 10163-10172. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2056
- Zuniga, E., Rippen, M., Alexander, C., Schilling, T. F., Crump, J. G. (2011). Gremlin 2 regulates distinct roles of BMP and Endothelin 1 signaling in dorsoventral patterning of the facial skeleton. *Development*, 138(23), 5147-5156. doi:10.1242/dev.067785

## 8. Podíl autorky na uvedených projektech

Na své prvoautorské práci (Starostová *et al.*, 2014) se autorka podílela jak experimentálně, tak při zpracování textů a obrázků. Experimentální část: tkáňové kultury CEF, explantové kultury, transfekce, infekce, izolace RNA, luciferázová analýza, elektroporace, WISH, klonování genu *grem2*. Ostatní genové konstrukty poskytli M. Dvořáková, V. Karafiát a J. Kosla. V. Čermák vyhodnotil mikročipovou analýzu a provedl rtPCR. M. Dvořák zpracoval část textu a obrazové části a zejména se podílel finální podobě článku. U ostatních prací poskytla autorka know-how týkající se kuřecího modelu a provedla experimentální činnost spojenou s kuřecím modelem - spoluautorská práce (Antošová *et al.*, 2016): kultivace embryí, vypracování postupu pro elektroporaci oka, elektroporace, sklízení. Barvení X-gal a zpracování obrázků provedla B. Antošová. Spolupráce na projektu s embryonální retinou: kultivace embryí, vypracování postupu pro elektroporaci retiny, elektroporace, extrakce retiny, kultivace tkáňových kultur retinálních buněk. Z. Cvačková zpracovala obrazovou část, provedla imunoprecipitační analýzu a podílela se na kultivaci buněk.



## 9. Přílohy

### **Příloha 1: Text výňatku z Výroční zprávy Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů hospodářských zvířat a dalších živočichů využívaných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství za rok 2008**

Geneticky definované linie kura:

Genetický zdroj 20 inbredních linií (CB,CC, CB.7, CB.R1, CC.R1, CC.R2, CC.13, CB.9, CB.15,CB.R4, CC.R4, CB.R5, CC.21, CB.ev17-, CC.ev17+, WA, M, L15B, H6, BLi) a 3 outbredních linií (BL, SH, P) spravuje Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i. Jde o vysoce definovaný genetický materiál, s detailně propracovanou metodikou chovu, s náročnou metodikou provádění genetické kontroly pro udržení genetické čistoty linií. V průběhu více než čtyřiceti let systematického chovu - který zahrnoval inbredizaci systémem bratr x sestra, vytváření kongenních linií mnohonásobnými zpětnými kříženími, testování a genetické definování linií – se podařilo vytvořit unikátní ve světě ojedinělý ucelený systém geneticky definovaných vysoce inbredních linií slepic, doplněný specializovanými outbredními liniemi s definovanými genetickými vlastnostmi.

Modelový systém zahrnuje v současnosti 6 základních vysoce inbredních linií – C, L15, H6, M, W, Bli, všechny s koeficientem inbreedingu  $F_x > 0.99$ . Linie C je chována v 16 kongenních liniích se společným genetickým pozadím a u každé linie je jeden privátní gen (haplotyp) – většinou z hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC). V několika případech jde o unikátní rekombinované haplotypy. Haplotyp MHC je u inbredních linií základním rozlišovacím znakem. Kromě haplotypu MHC je u inbredních linií definována řada vlastností jako rezistence a citlivost k virovým onemocněním z komplexu aviárních leukoz (ALV), Markově chorobě, erytrocytární antigeny, polymorfní proteiny, endogenní virové sekvence, genetická determinace barvy opeření atd. Geneticky dobře definované jsou i outbrední populace, které systém doplňují. Základní charakteristikou linie BL je genotyp C/E (receptory pro viry komplexu aviárních leukoz - ALV). Zcela unikátní je pak linie P, v jejímž genomu nejsou přítomny endogenní virové sekvence ALV. Všechny outbrední linie jsou autosexingové na bázi zbarvení jednodenních kuřat. Konstantní a definované inbrední a outbrední linie jsou využívány převážně v základním biomedicínském a zemědělském výzkumu, kde se uplatní zejména jako zdroj přesně definovaného genetického materiálu pro přípravu transgenních a jinak geneticky manipulovaných zvířat pro další využití ve specializovaném drůbežnictví. Linie jsou chovány na jediném místě na pracovišti ÚMG AV ČR v Kolči. Chov je konvenční,

ze zoohygienického hlediska přísně uzavřený. Jak je zřejmé ze stručného nástinu problematiky, udržování tohoto modelového systému, který je současně významným genetickým zdrojem zařazeným v Národním programu ochrany, je metodicky, personálně a zejména finančně velmi náročné. Obrat základních chovných jader – tedy genetický zdroj - představuje 80 % přímých nákladů na chov drůbeže v ÚMG. Zařazení modelového systému geneticky definovaných linií drůbeže do Národního programu ochrany genetických zdrojů, i když prozatím bez dotací na jejich udržování, posiluje perspektivu úspěšného chovu těchto linií, včetně minimalizace případného ohrožení v případě výskytu nebezpečných nákaz v jejich bezprostředním okolí.

### **Elektronická příloha 1: Kultivace kuřecího embrya *ex ovo* - časosběrná technika „time-lapse“**

Video 1 – **Ukázka vývoje kuřecího embrya *ex ovo***. Kuřecí embryo ve stádiu HH10 bylo snímáno každé 3 minuty, video bylo přehráno rychlostí 12 snímků za vteřinu. Na ploché misce se embryo neotočilo na pravý bok tak, jak se ve vejci přirozeně děje kolem stádia HH13, a vývoj předčasně končí zhruba ve stádiu HH15. Na záznamu je viditelné prodlužování embrya a vznik nových somitů, vývoj srdce a krevních ostrůvků (struktury jsou vyznačeny v textu práce na obrázku 11). Nepravidelné tepání srdce je důsledkem snímání v intervalech a nikoli v reálném čase.

### **Elektronická příloha 2: Explantové kultury - časosběrná technika „time-lapse“**

Video 2, video 3, video 4 a video 5 – **Ukázka migrace buněk neurální lišty ze 4 nezávislých explantů neurální trubice**. Buňky byly snímány hned po uchycení explantů každých 5 minut ve stejných podmínkách, v jakých běžně probíhá inkubace, a video pak přehráno rychlostí 8 snímků za vteřinu. Na videu je viditelná migrace buněk neurální lišty z explantu a postupné ubývání a změna tvaru explantu. Po vyputování buněk neurální lišty bývá zbytek tkáně explantu mechanicky odstraněn a dále je kultivována poměrně čistá kultura buněk neurální lišty.