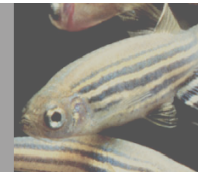
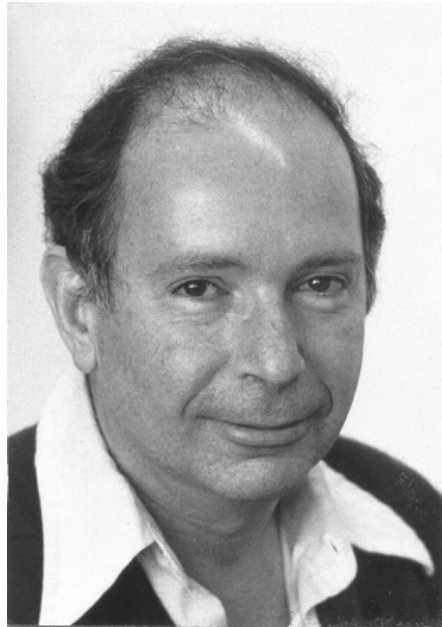


Zebradánió fejlődésgenetika gyakorlat - 2011.05.09



(http://zfin.org/zf_info/movies/movies.html)

Miért éppen zebrahal?

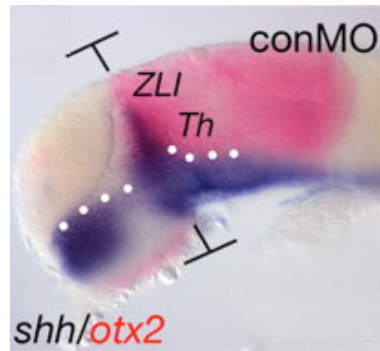


(George Streisinger - 1927-1984)

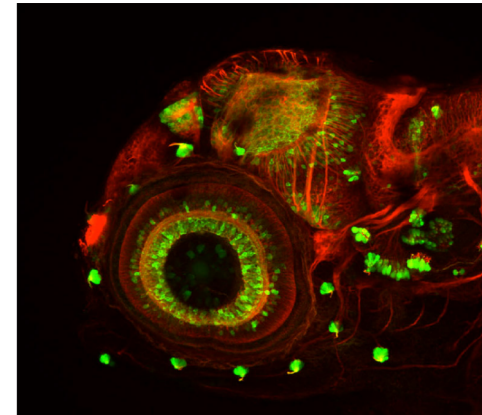
*“A trópusi, édesvízi zebrahalat, a *Brachydanio rerio*-t, számos előnyös tulajdonsága miatt választottuk: a generációs ideje mindössze 3-4 hónap; a felnőtt nőstények heti rendszerességgel több száz ikrát raknak, amelyek gyorsan és szinkronban fejlődnek az anyán kívül; a hal kicsi (3 cm), szívós és könnyen tartható. A 7 napos, szabadon úszó halak mindössze néhány milliméter hosszúak, de már a kifejlett egyedek számos morfológiai és viselkedési bélyegét mutatják. Mindez lehetővé teszi a mutációk nagy léptékű szűrését. Mivel a normális fejlődés 25 és 31°C fok között zajlik, lehetőség nyílik hőmérséklet-érzékeny mutációk izolálására is.”*

Nature (1981) **291**: 293-296.

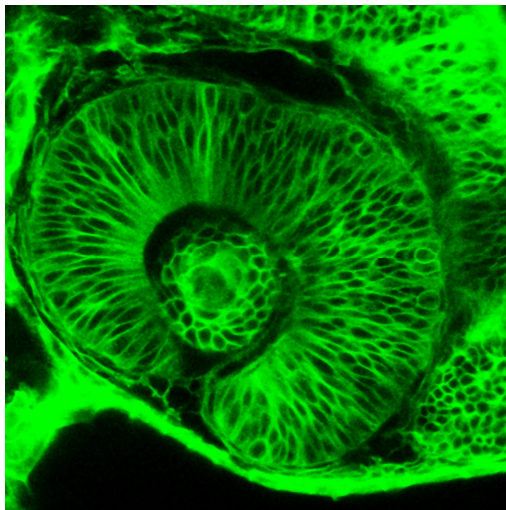
Az átlátszóság a modell egyik nagy előnye



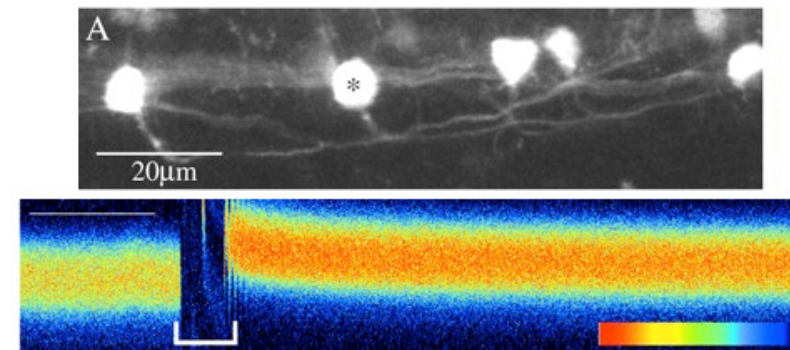
In situ hibridizáció



Fluoreszcens immunfestés

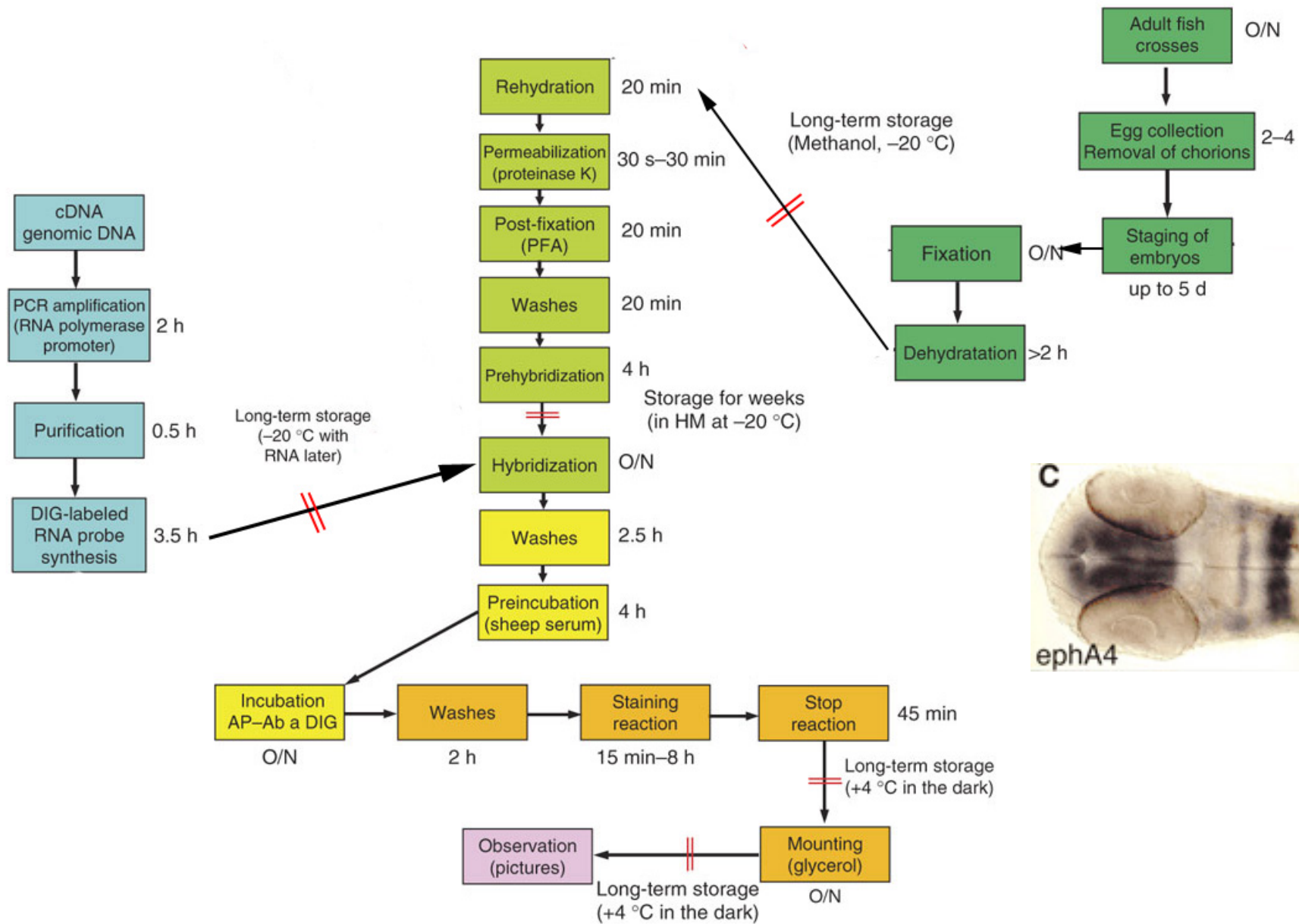


In vivo morfogenezis
vizsgálat transzgénikus állatokban



Idegsejt-aktivitás detektálása *in vivo*
 Ca^{2+} szenzitív festékekkel

In situ hibridizáció



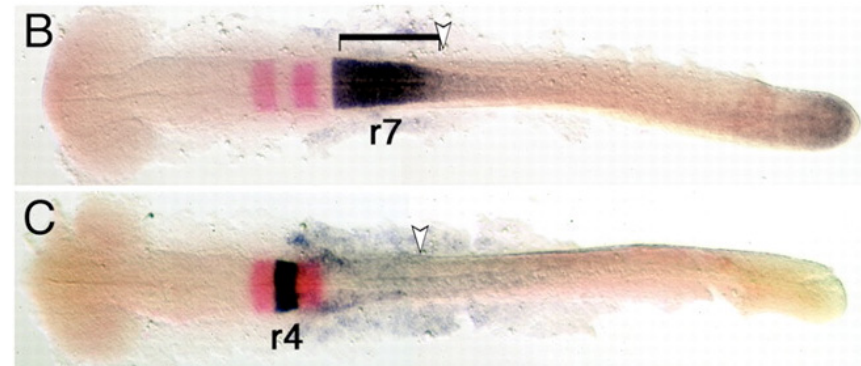
In situ hibridizáció variációk



- két színű (“two color”) *in situ*:

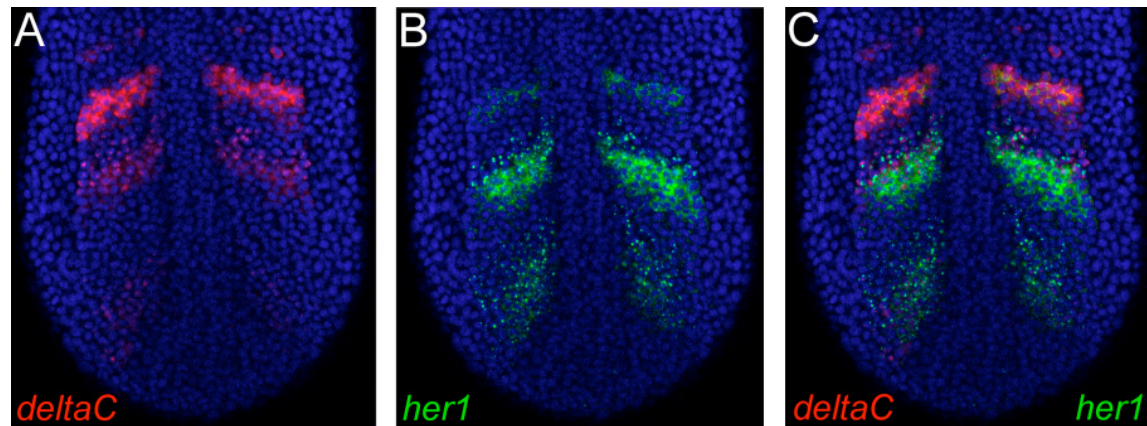
- párhuzamos: anti-DIG-AP és anti-fluorescein-POD különböző színű szubsztrátokkal

- szekvenciális: 1. anti-DIG-AP- + szubsztrát 1 (fekete)
2. enzim inaktiválás
3. anti-fluor-AP + szubsztrát 2 (piros)



-fluoreszcens *in situ*:

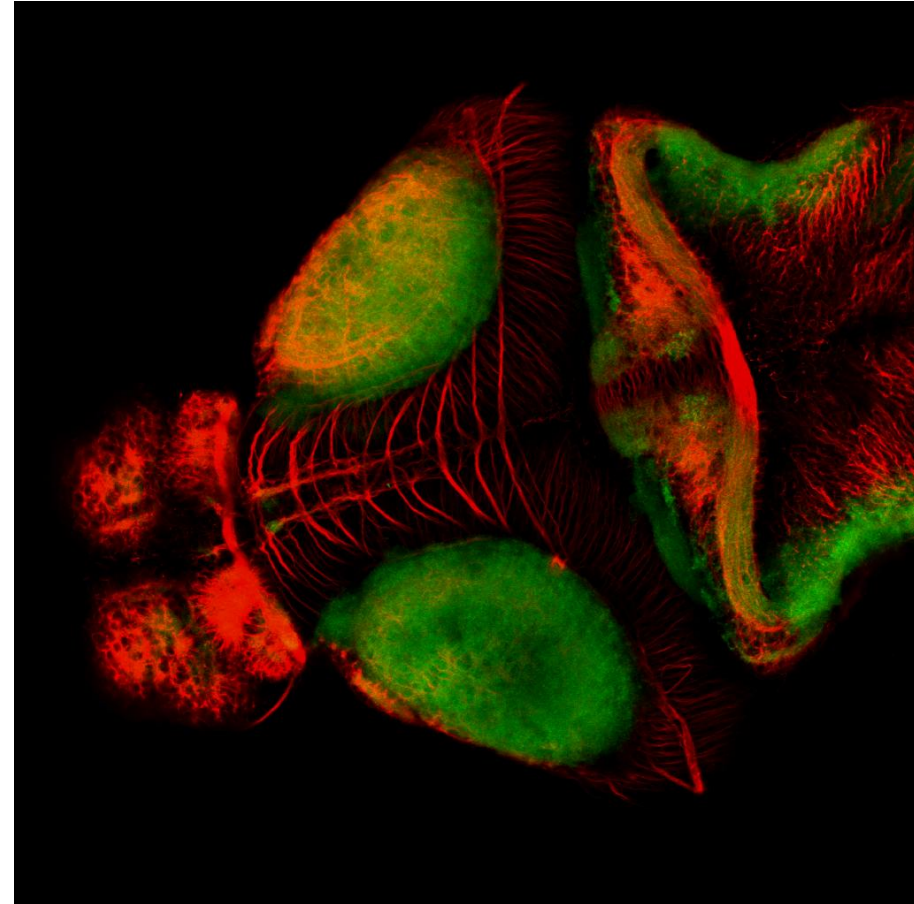
-lásd szekvenciális két színű, de különleges ellenanyagokkal



Ellenanyag festések



- a folyamat logikája hasonlít az *in situ* hibridizációhozhoz, de antiszensz RNS-el történő hibridizáció helyett egyből ellenanyaggal (elsődleges) inkubáljuk, majd másnap mosások után a másodlagos ellenanyaggal mérjük össze

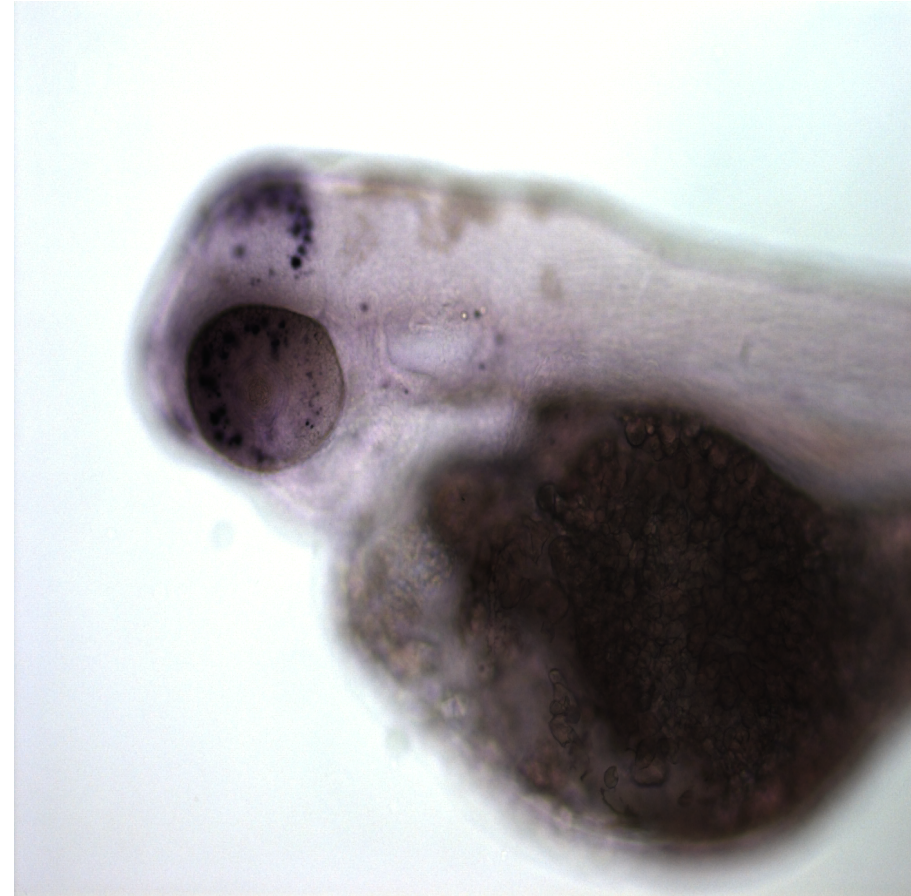


(5 napos hallárva tectuma dorzális nézetben, anti-tubulin, anti-SV2 festés)

Sejthalál detektálása TUNEL festéssel



-azt használjuk ki, hogy az apoptotikus sejtekben szétőredezett a DNS
- terminális dioxy-transzferáz reakcióval DIG-el jelölt dUTP-t kapcsolunk a DNS darabok végre, majd anti-DIG-AP ellenanyaggal detektáljuk



(2 napos *silent heart* mutáns hallárva TUNEL)



Microinjection in Zebrafish to Analyze Gene Function

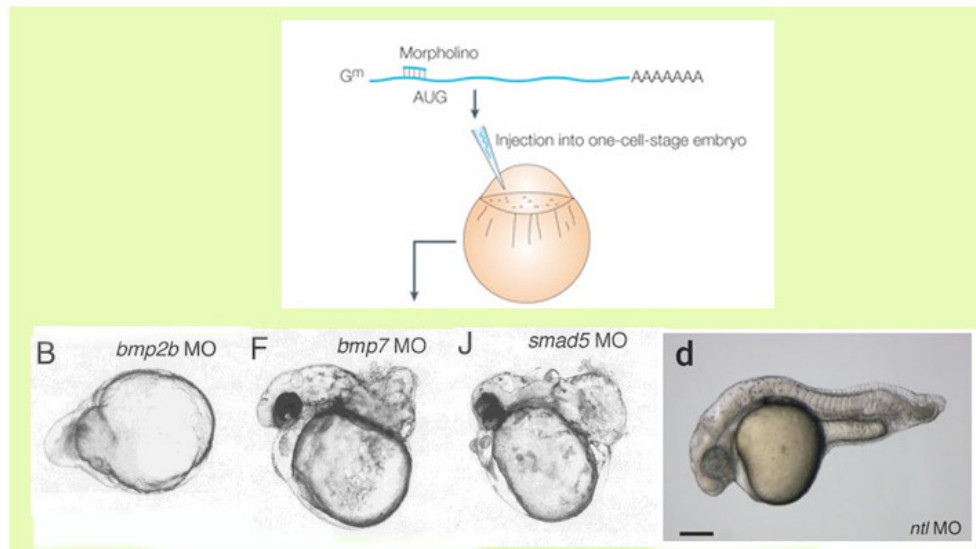
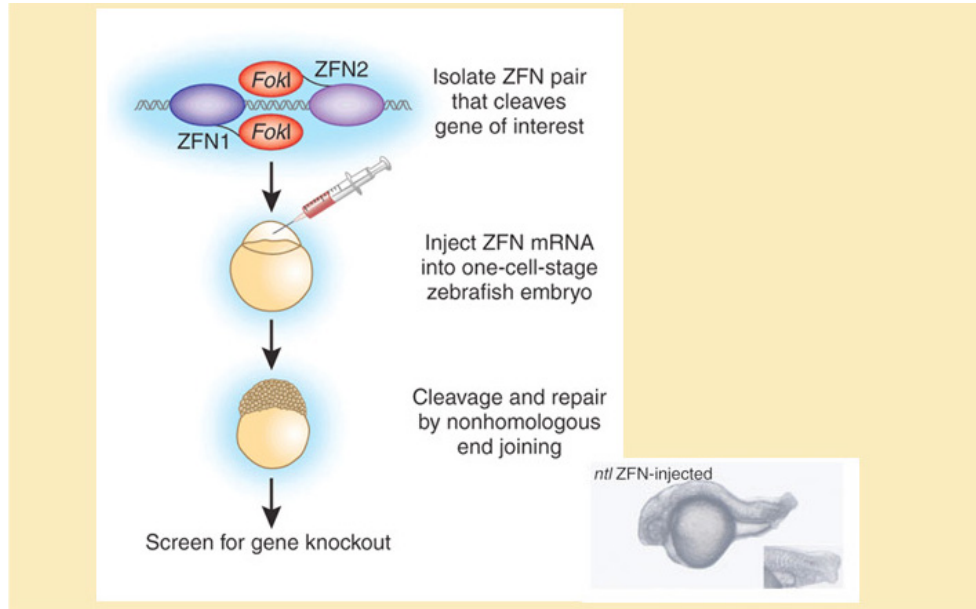
Jonathan N. Rosen^{1,2},
Michael F. Sweeney¹, and John D. Mably^{1,2}

¹Department of Cardiology, Children's Hospital Boston

²Department of Genetics, Harvard Medical School

(Eredeti videó elérhető itt: <http://www.jove.com/details.php?id=1115>)

Loss-of-function fenotípusok előállítása: morpholinok és a Zn-finger technológia

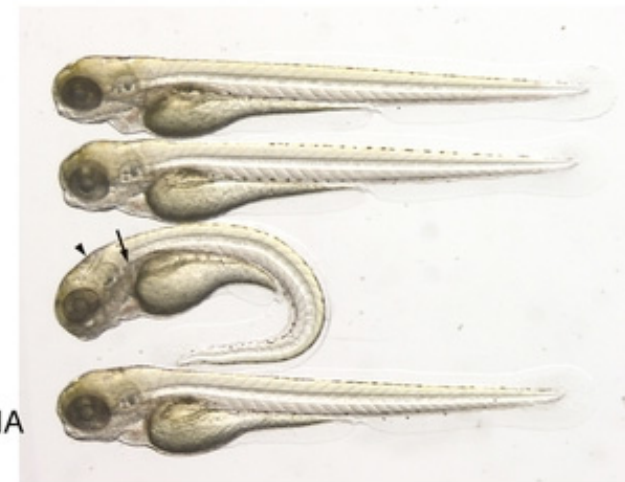


Control

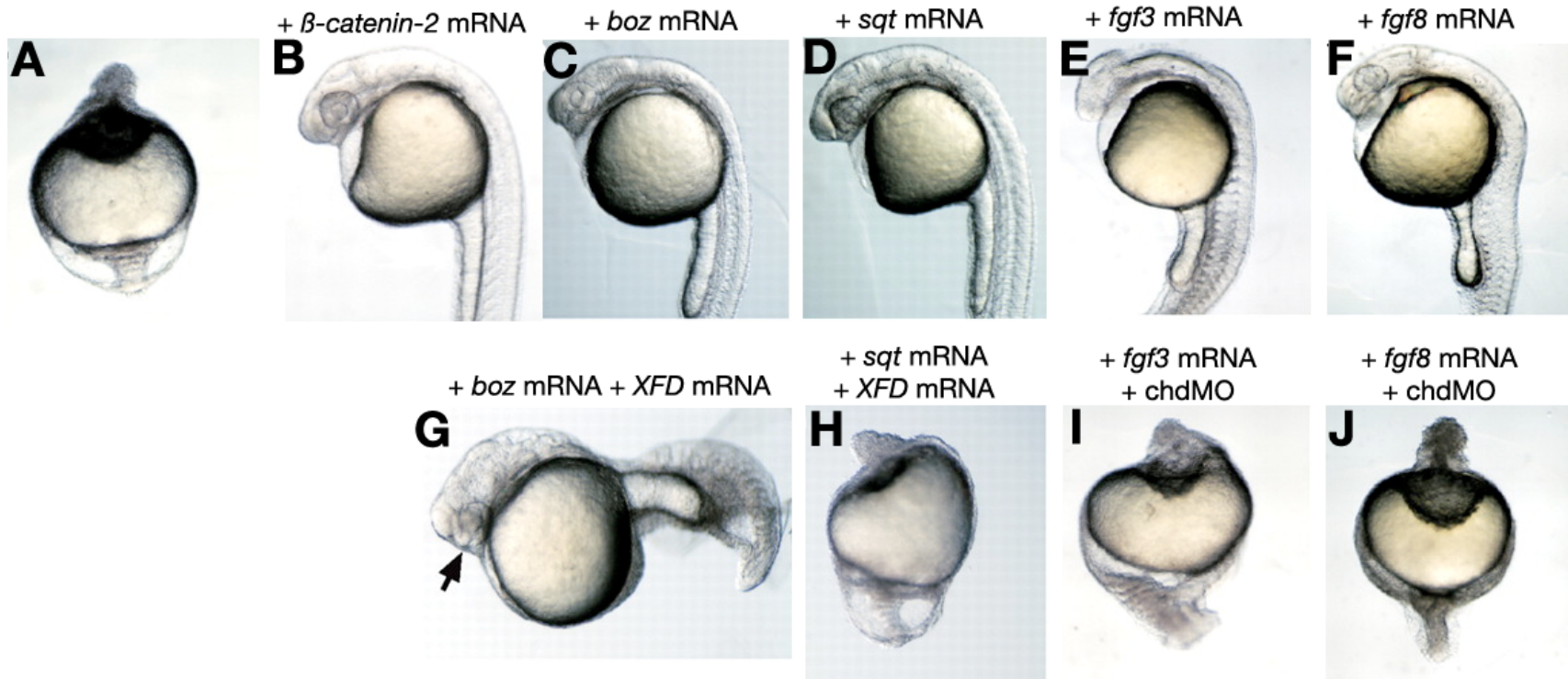
mRNA

MO

MO + mRNA



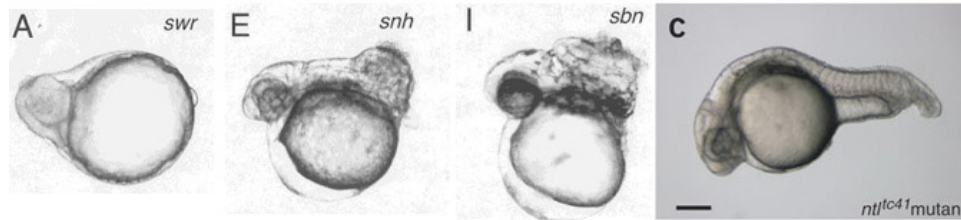
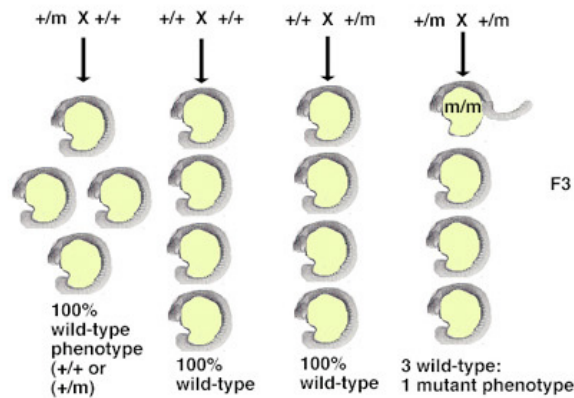
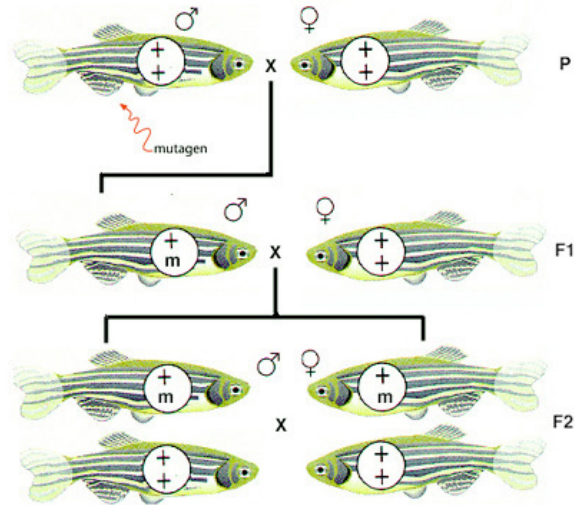
Fenotípus menekítés és episztázis-analízis injektálás segítségével



Genetikai screenek: ENU alapú mutagenézis



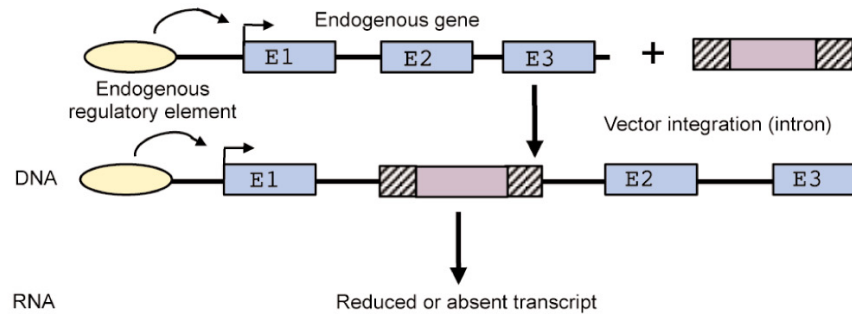
Zebrafish Mutagenesis Strategy



Genetikai screenek: inszerción alapú mutagenézis

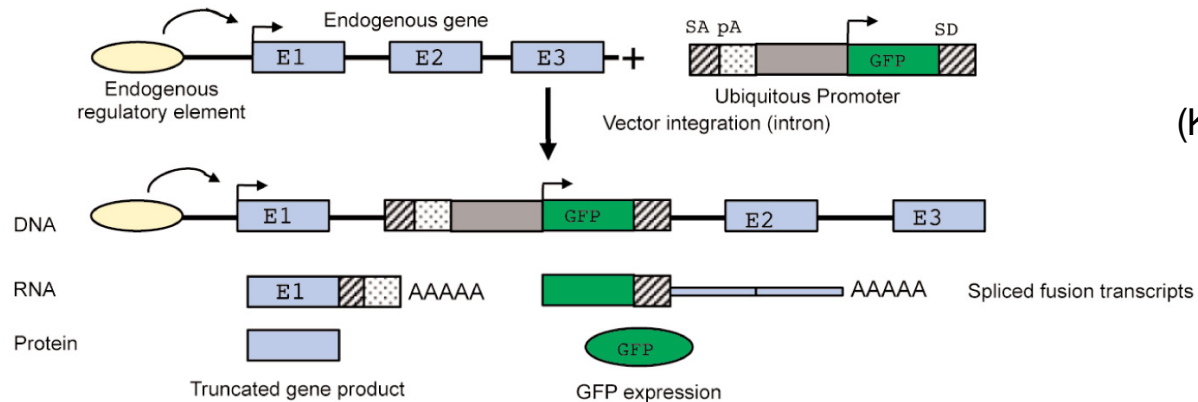


(b) Retroviral Insertional Mutagenesis in Zebrafish



(Nancy Hopkins)

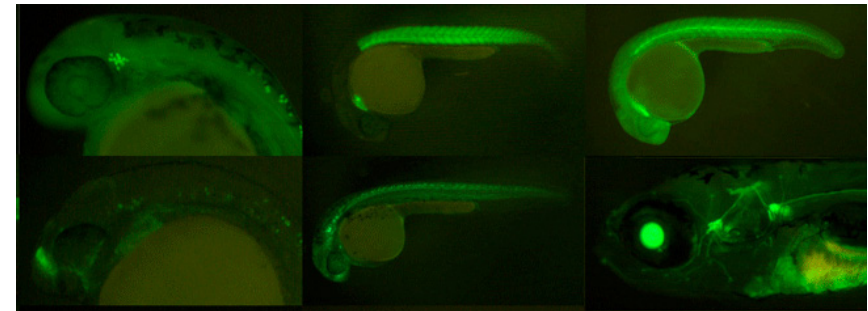
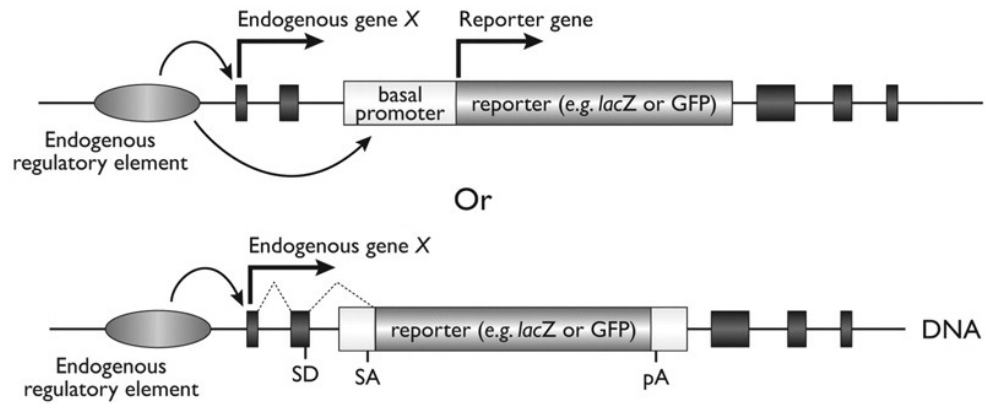
(d) Transposon Insertional Mutagenesis in Zebrafish



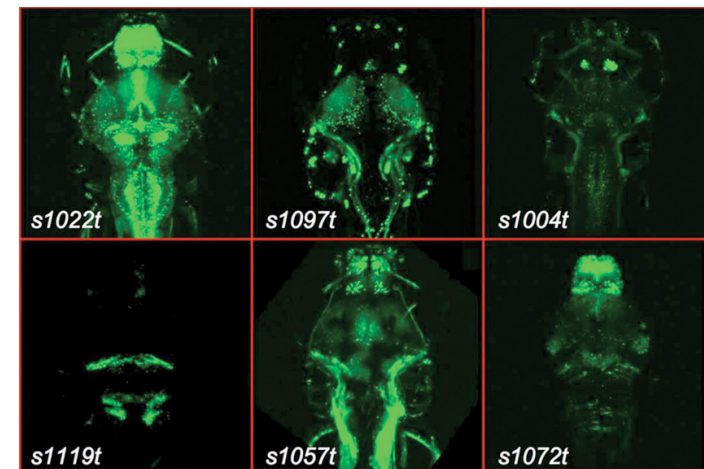
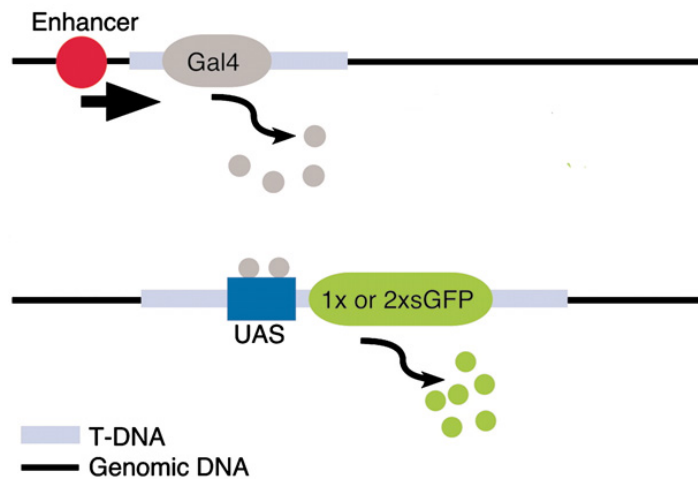
(Koichi Kawakami)

(Sivasubbu et al. (2007) *Genome Biol*)

Enhancer- és géncsapdák

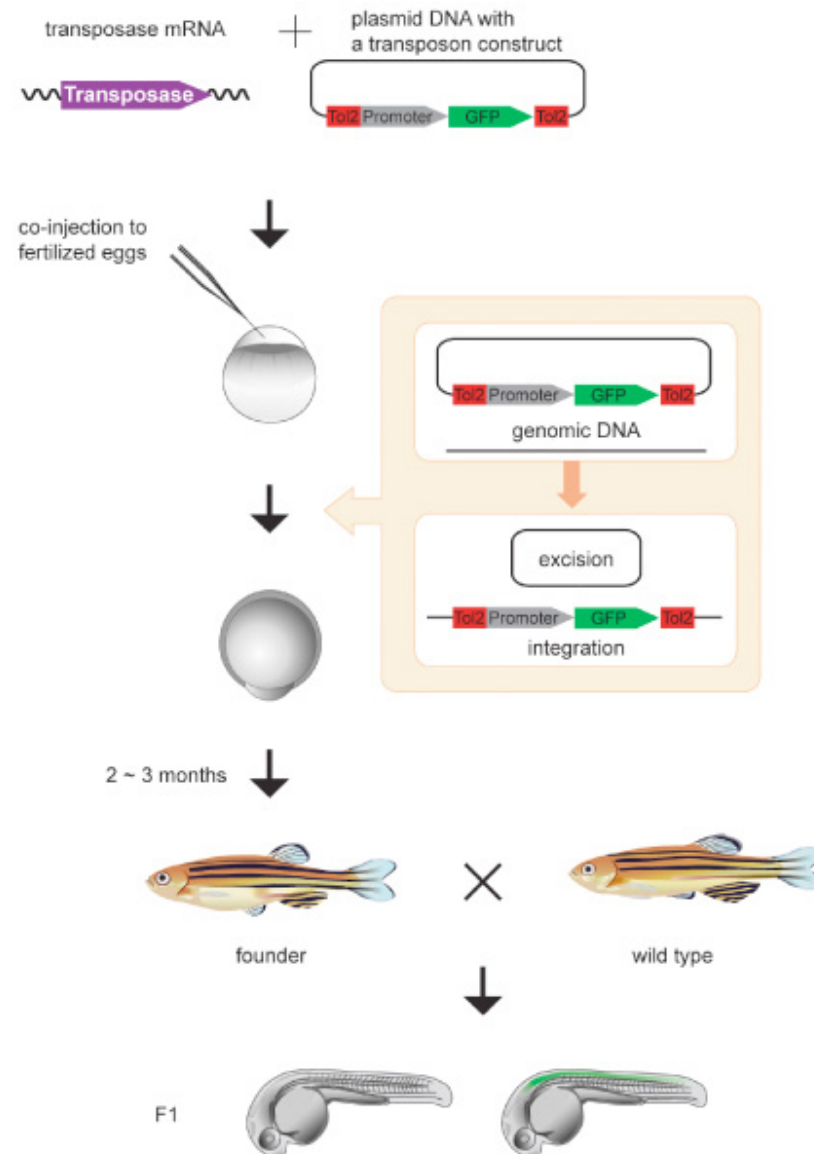


(Koichi Kawakami és Tom Becker)

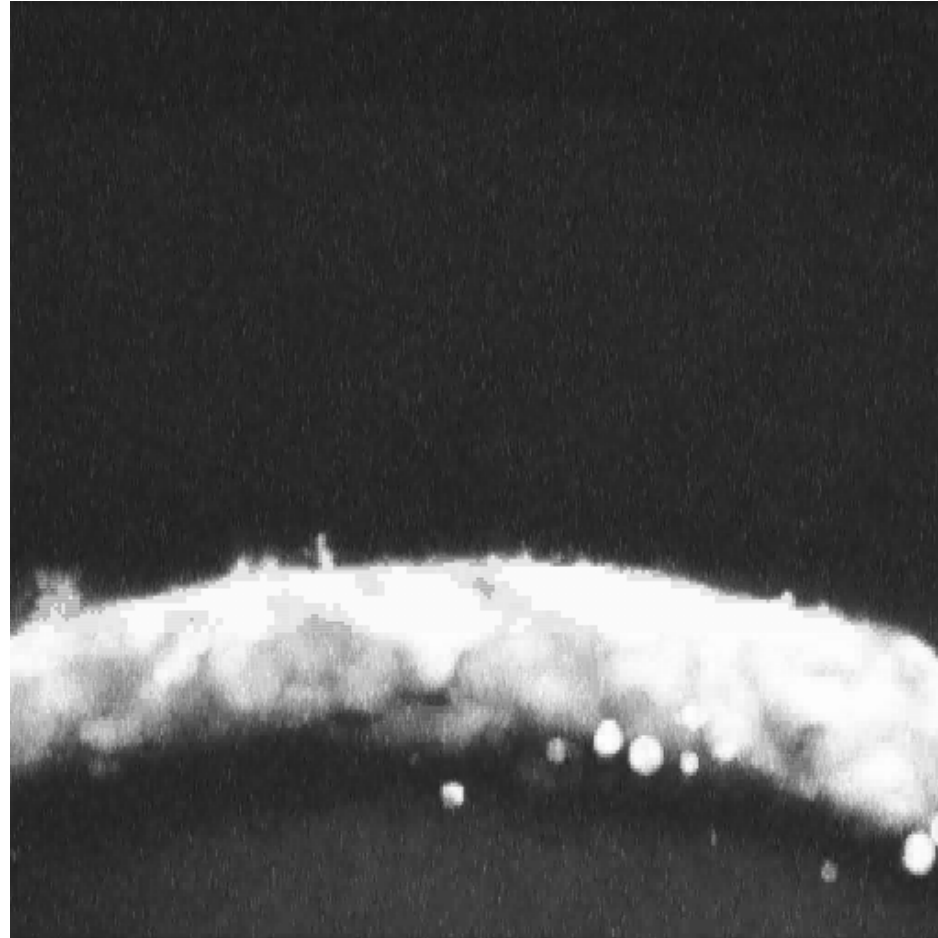


(Hervig Baier)

Transzpozon alapú transzgenezis



In vivo timelapse



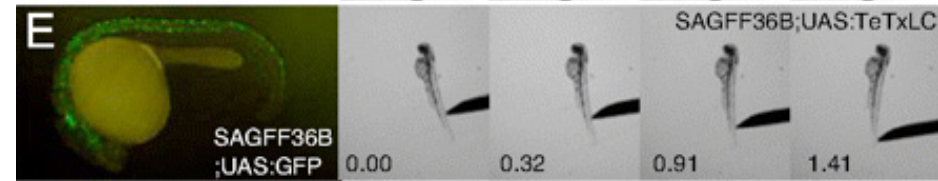
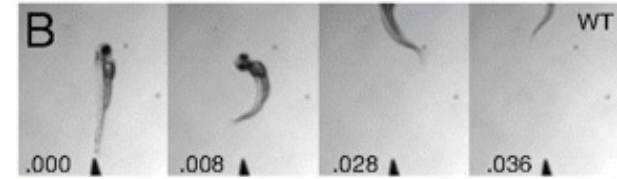
- a *fli:eGFP* vonal segítségével követhető az érhálózat kialakulása

(Jesus Torres-Vasquez)

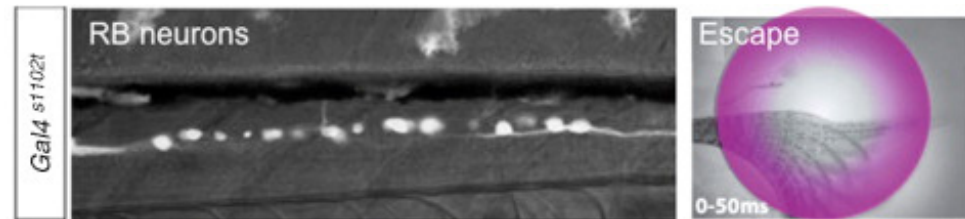
Gal4-el meghajtható manipulációs driverek



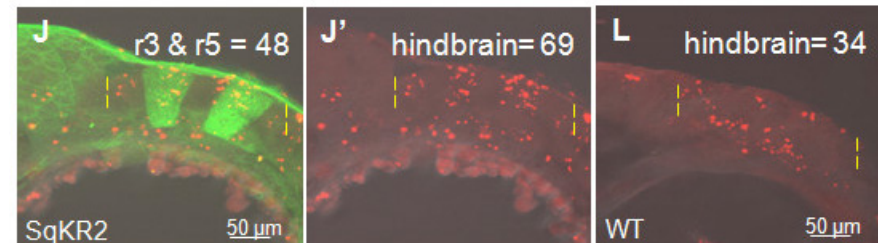
- **UAS:Ttx**: az idegsejtekben kifejeződő tetanusz toxin lebénítja ezeket a sejteket



- **UAS:iGluR(M439C)**: UV fény hatására aktiválódó Na⁺ csatorna, amelynek aktiválása idegsejtekben depolarizációt okoz



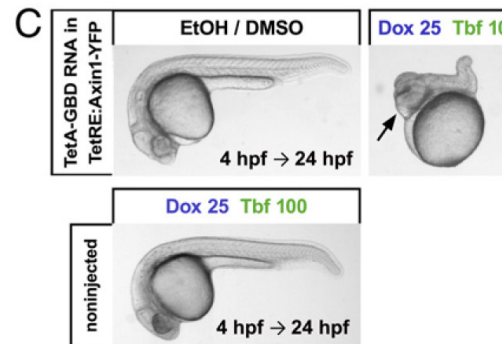
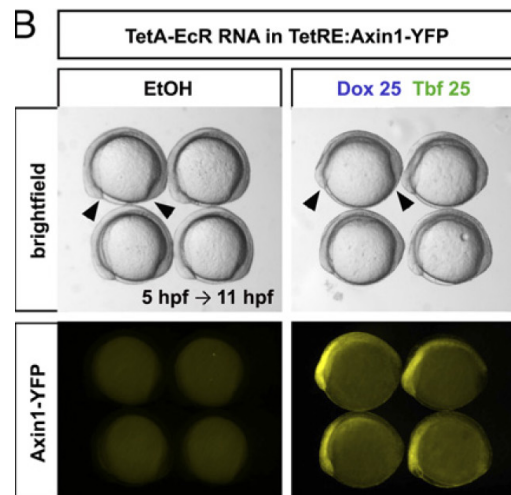
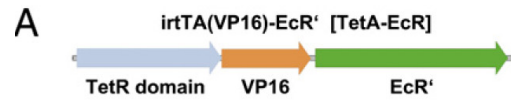
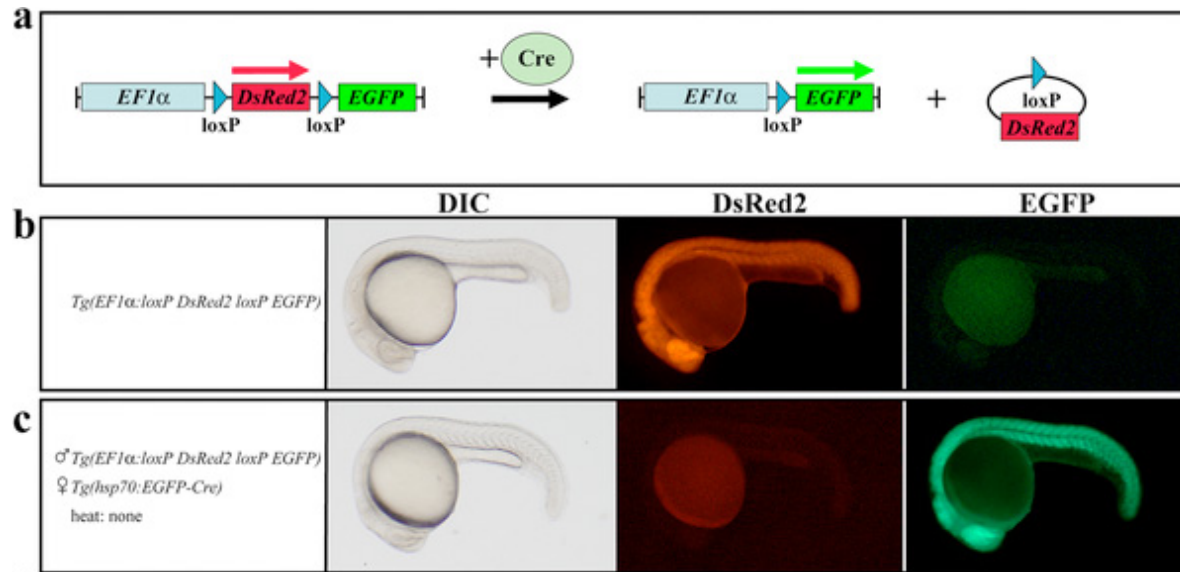
- **UAS:KillerRed**: erős zöld fény hatására citotoxikussá válik



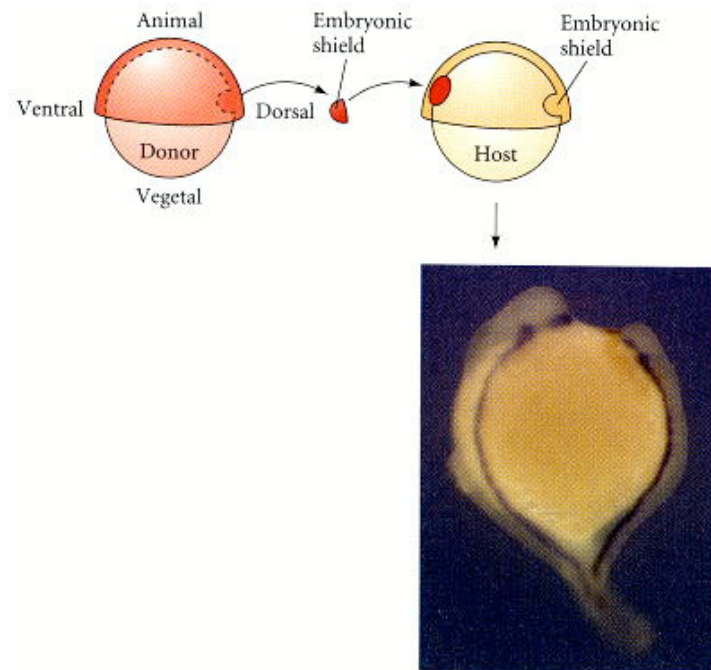
- **UAS:nitroreductase**: metrodinazolból (Mtz) egy citotoxikus reagent hoz létre, ami elpusztítja a sejteket



CreERT és TetON rendszerek



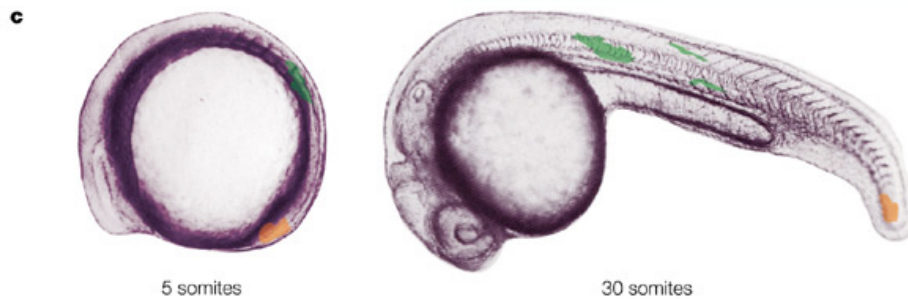
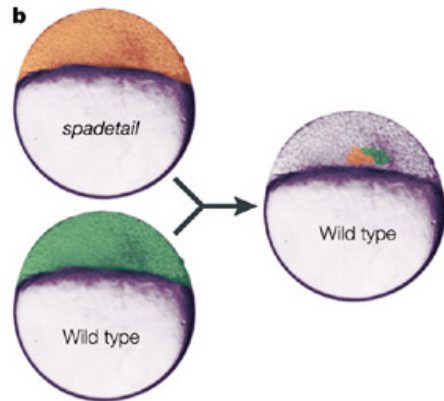
Embrió-manipulációk: organizátor transzplantáció



- a klasszikus Speeman-Mangold kísérlethez hasonlóan nagyobb szövetdarabok átültetése valósítható meg

(Gilbert - Developmental Biology)

Embrió-manipulációk: sejt transzplantáció



Nature Reviews | **Genetics**

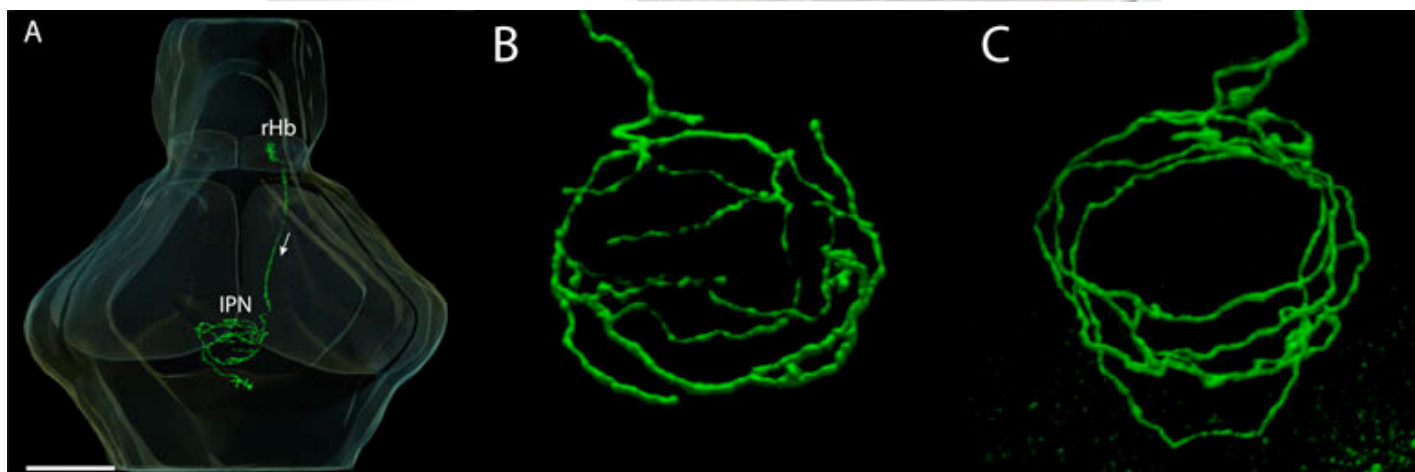
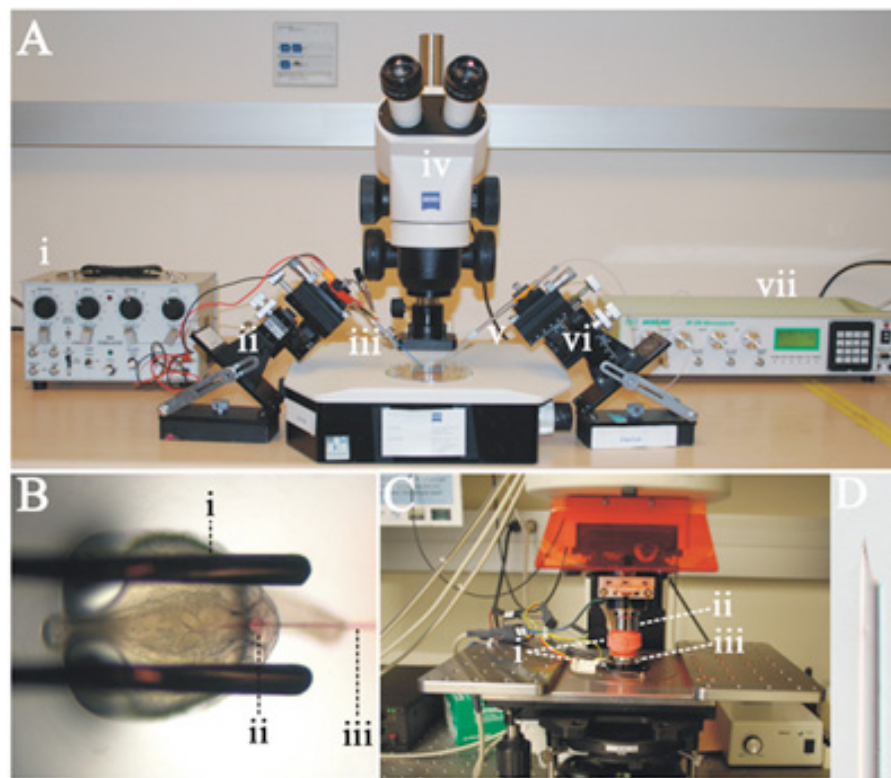
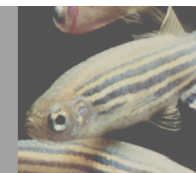
(Grunwald és Eisen, 2002)

- vad típus -> vad típus
- vad típus -> mutáns
- mutáns -> vad típus

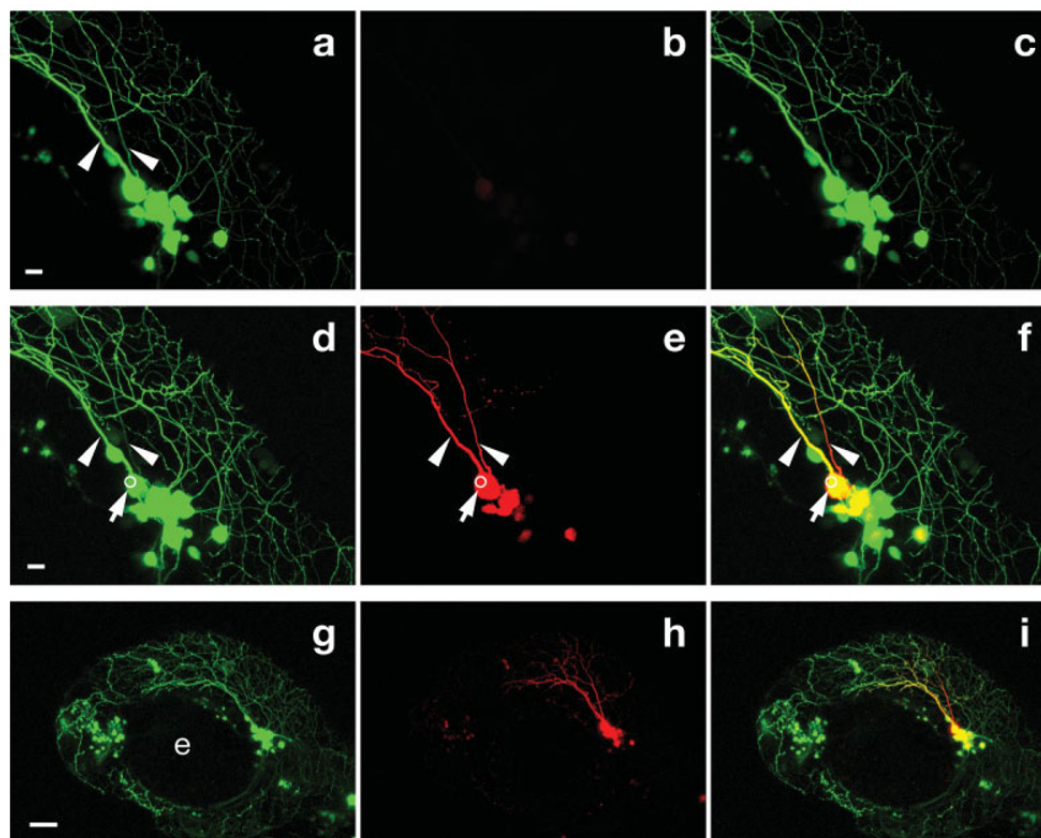
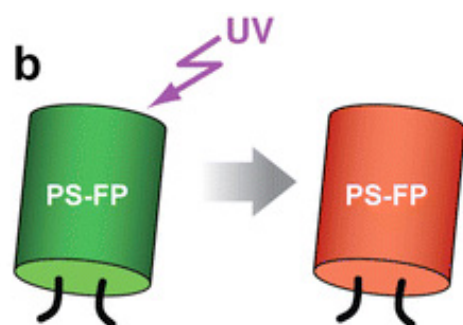
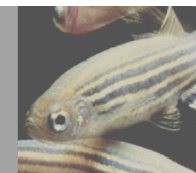
- ha a mutáció **sejtautonóm**, a mutáns sejtek a körülöttük levő sejtek genotípusától függetlenül mutatják a fenotípust (pl. jelátviteli útvonal sejtben belüli komponense)

- **nem sejtautonóm** mutációk esetében a vad típusú sejtek mutáns közegben mutánsként viselkednek, míg a mutáns sejtek vad típusú közegben normálisan fejlődnek (pl. szekretált ligandok)

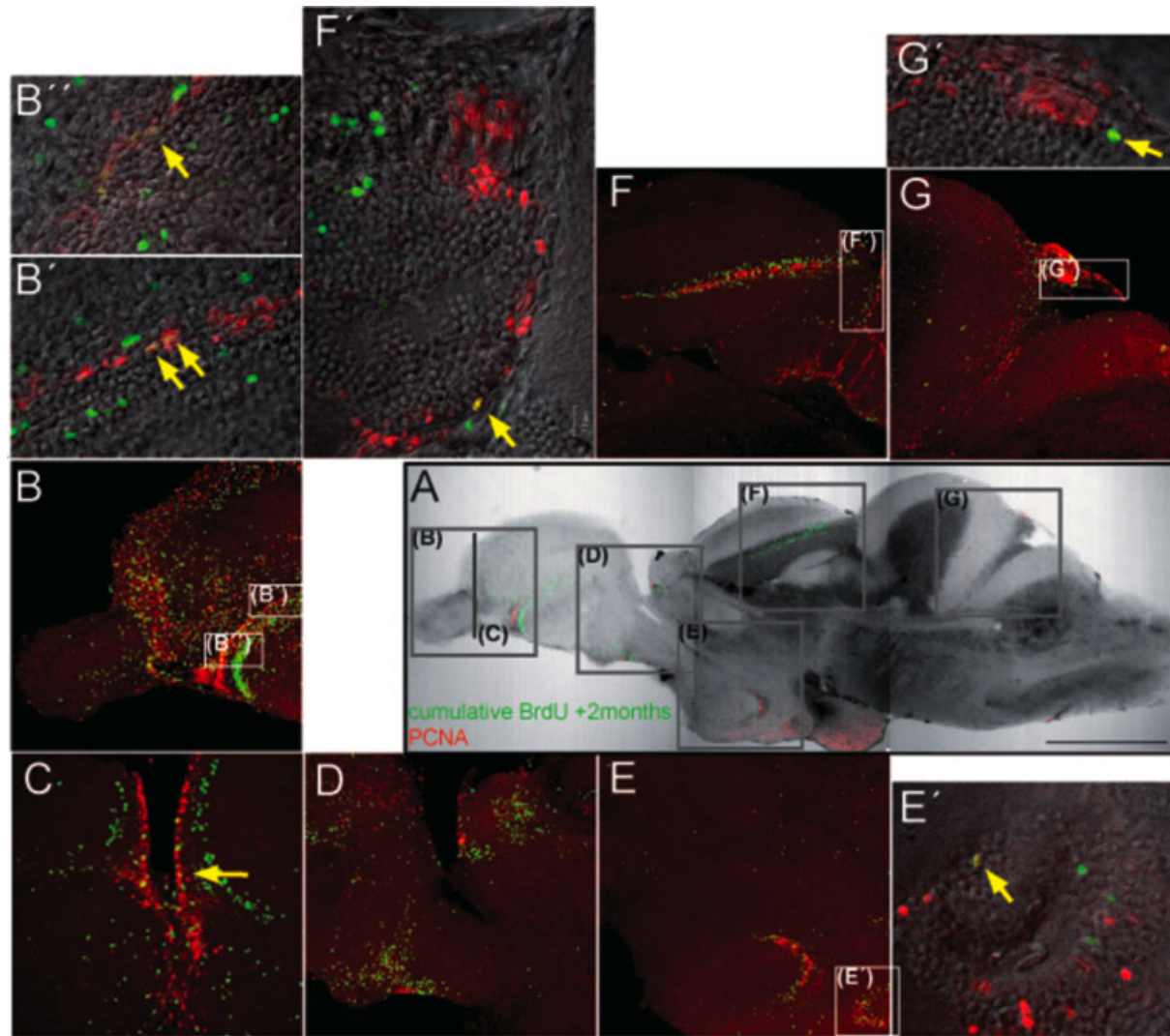
Embrió-manipulációk: elektroporáció



Kaede: sejtkövetés fotokonverzióval

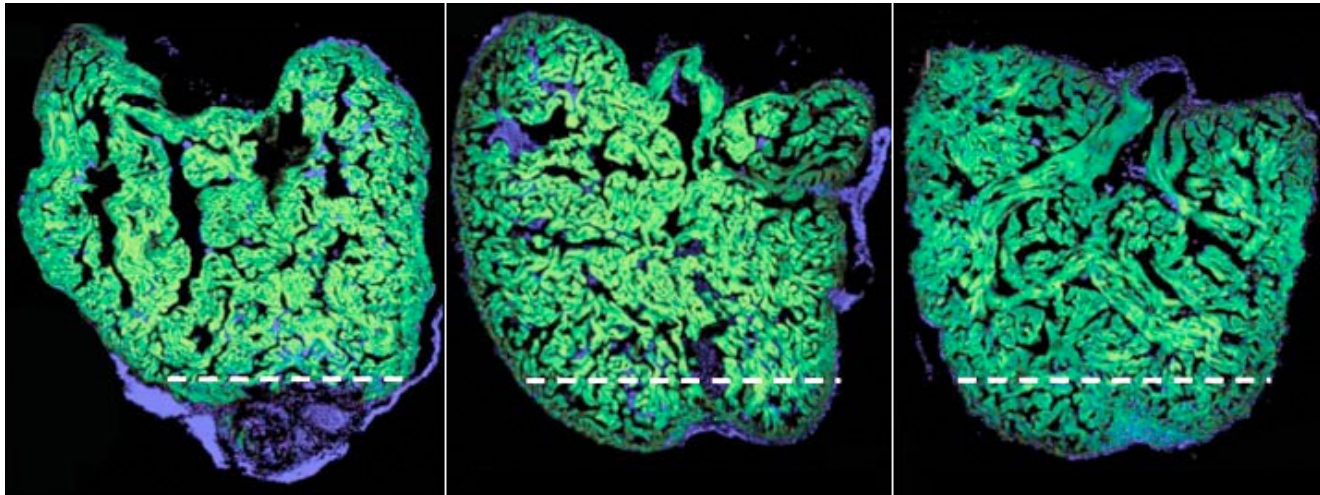


Őssejtek vizsgálata: BrdU jelölés

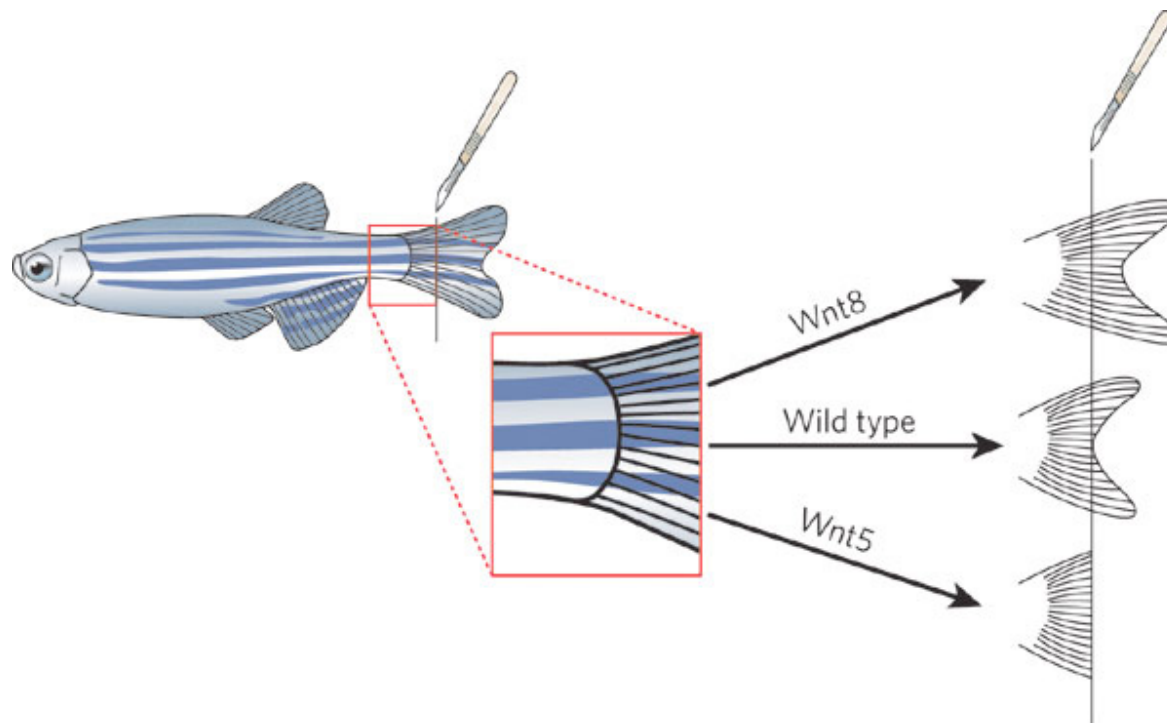


(Chapouton et al., 2007)

Regeneráció

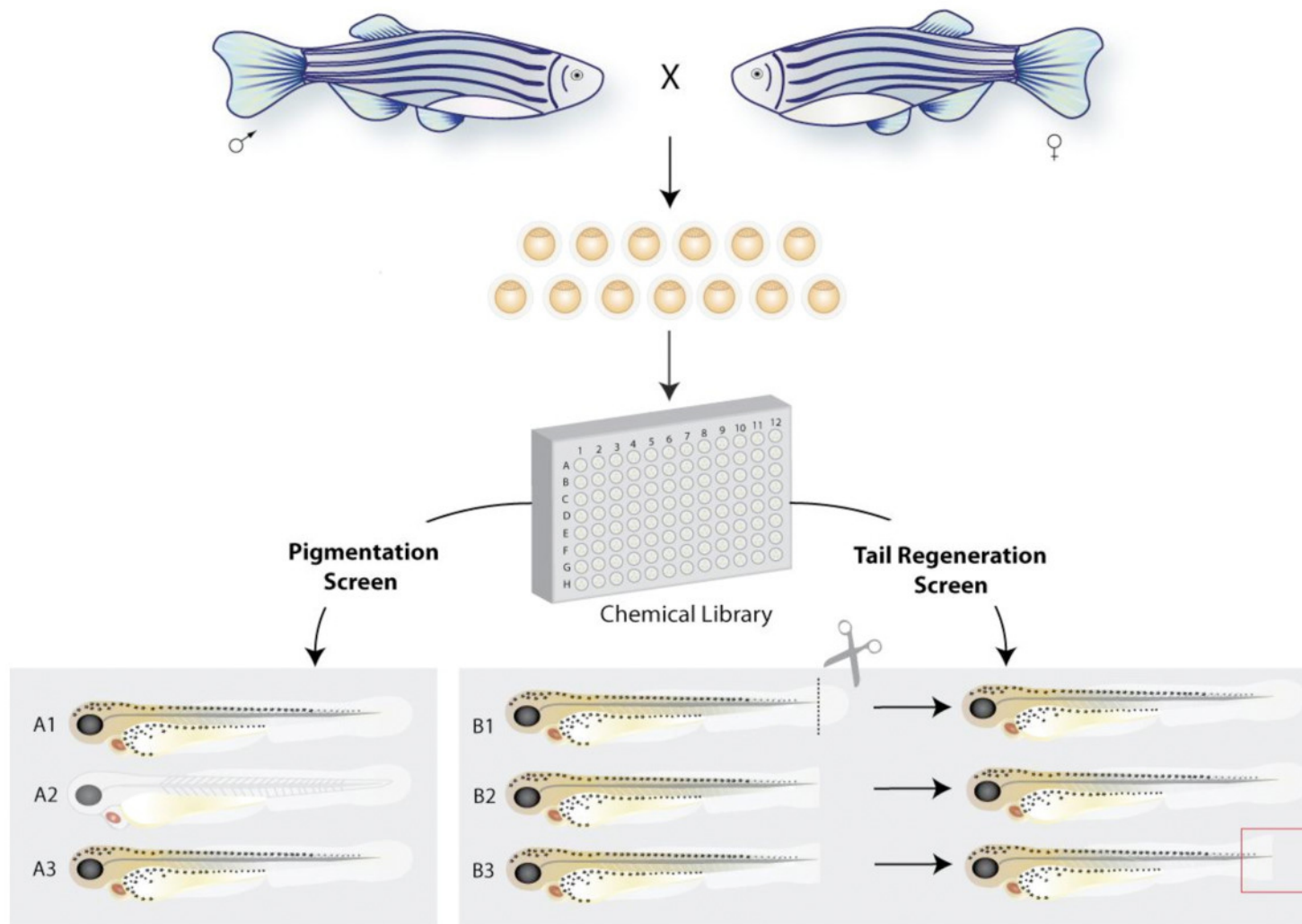
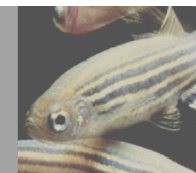


(Kenneth Poss)



(Gilbert Weidinger)

Kis molekula screen-ek:



- fejlődés bizonyos aspektusait befolyásoló anyagok

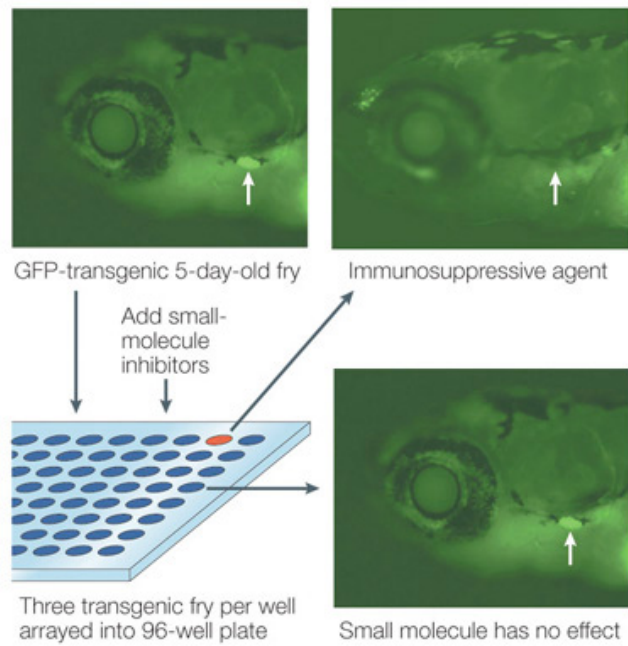
- regenerációt befolyásoló molekulák

Kis molekula screen-ek: riporter-expresszió és viselkedés

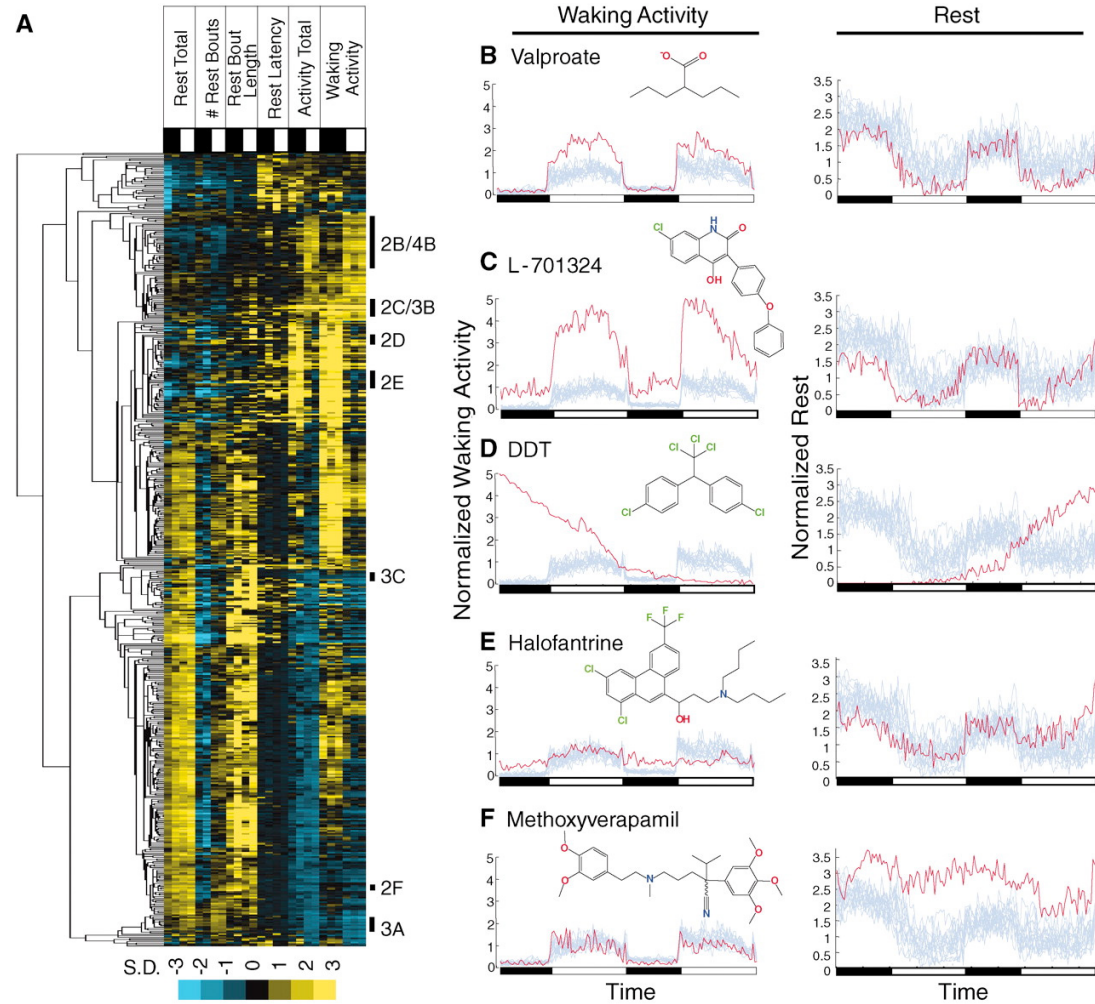


- transzgénikus állatok

- viselkedés elemzés:

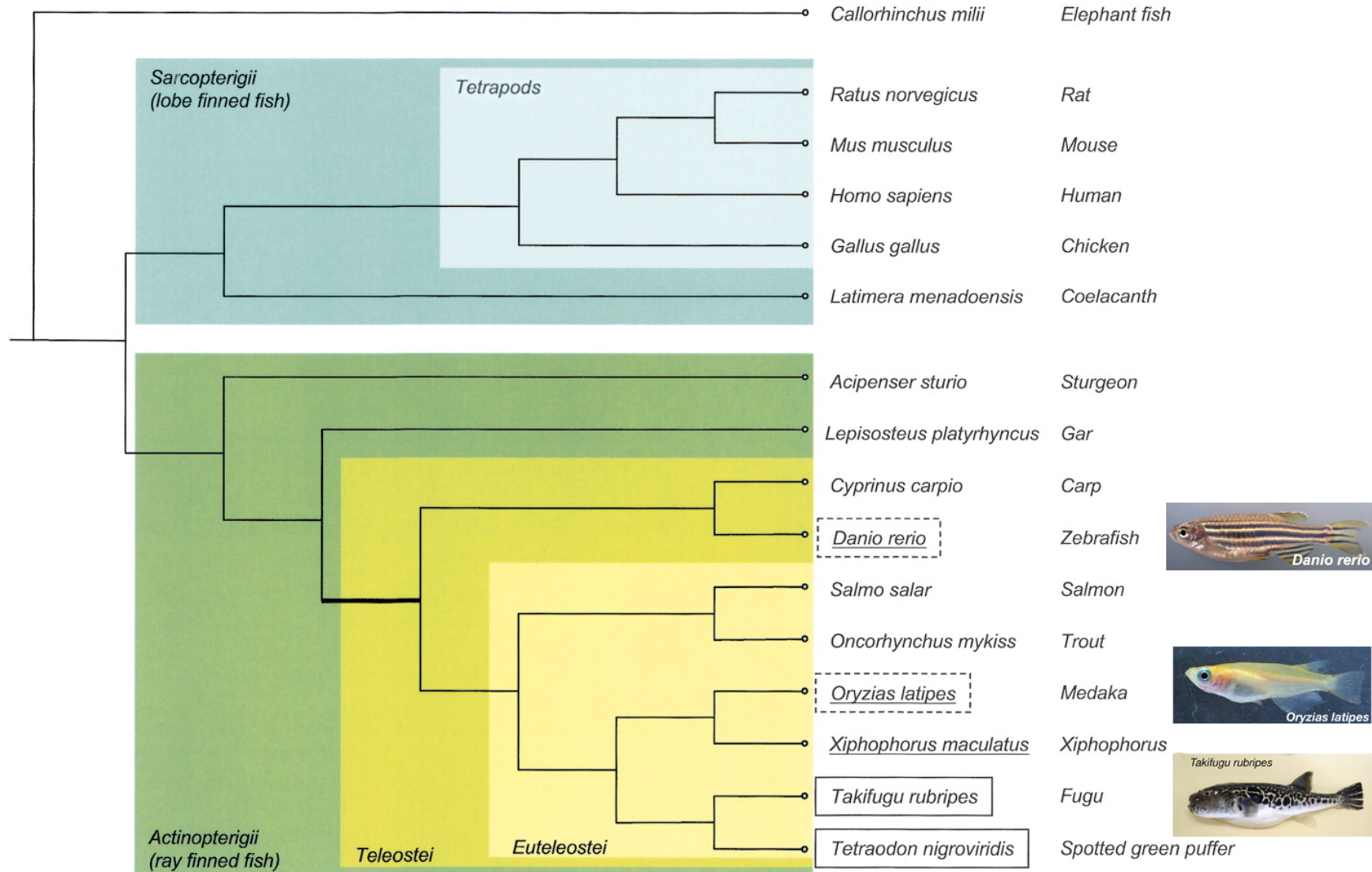


Nature Reviews | Immunology



(Alex Schier)

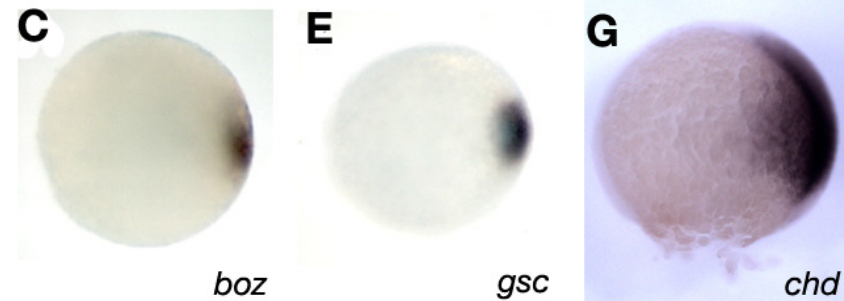
A gerinces fajok fele hal, így evolúciós vizsgálatok is könnyebben végezhetőek



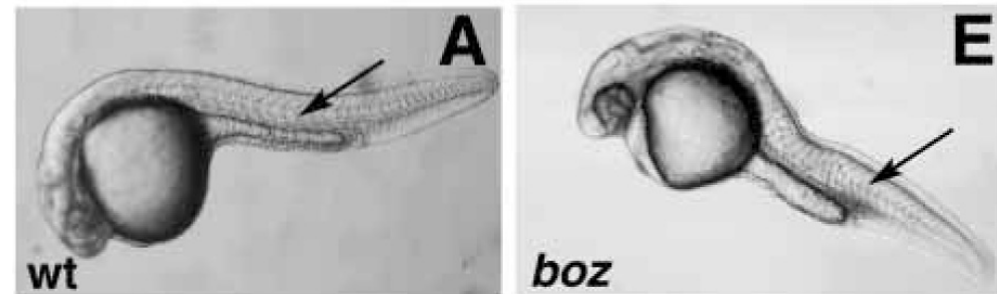
Gyakorlati anyag



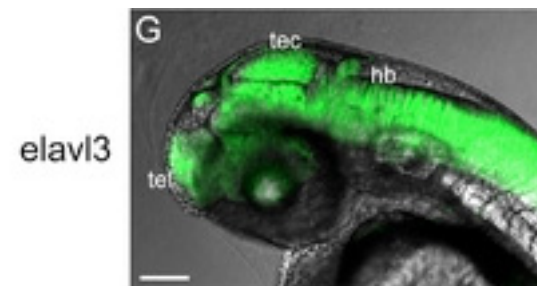
1. - *In situ* hibridizáció korai dorsalis markerekkel (1.-3. nap)



2. - A *bozozok/dharma* mutáns fenotipikus vizsgálata (1. nap)



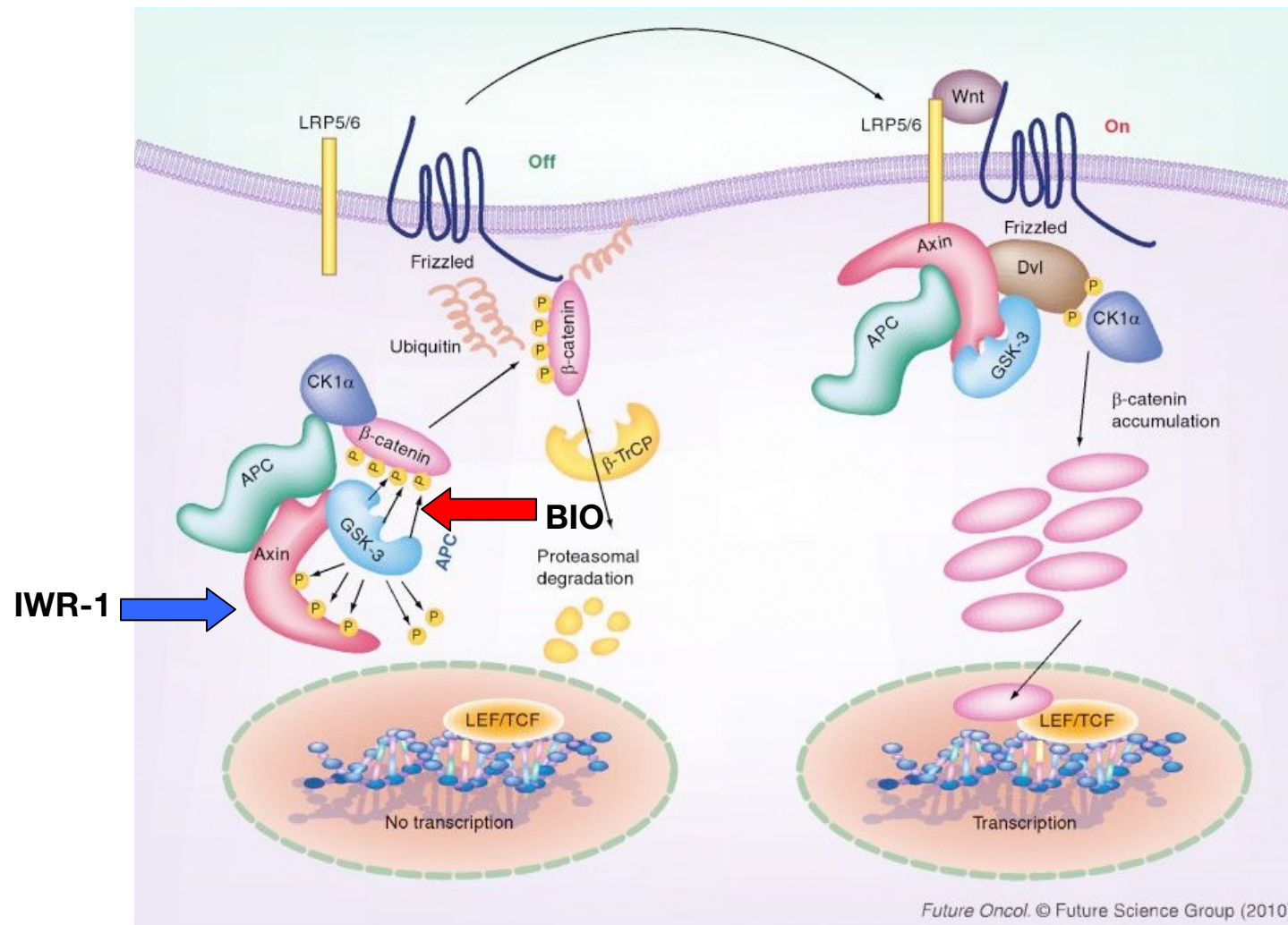
3. - A pán-neuronális *elva3:GFP* transzgenikus vonal megfigyelése (1. nap)



Gyakorlati anyag



4. - A Wnt-jelátvitel agonista BIO és antagonistája IWR-1 hatásának vizsgálata egy transzgenikus Wnt-riporter vonalban (*7xtcf:eGFP*) (1. nap)



Gyakorlati anyag



5. - A BMP-jelátvitel antagonistája Dorsomorphin (DM) hatásának vizsgálata vad típusú embriókon (2.-3. nap)

