

Изучение динамики нейрональных клеток-предшественниц в заднем мозге *danio rerio*

Ferran Capell Pascual, Polina Krivykh, Júlia Urgel i Solas, Sylvia Dyballa, Cristina Pujades.
Школа молекулярной и теоретической биологии-2016

FUNDACIÓ PERE TARRÉS

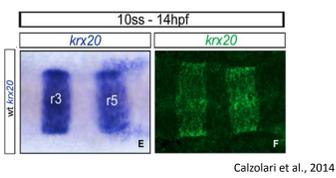
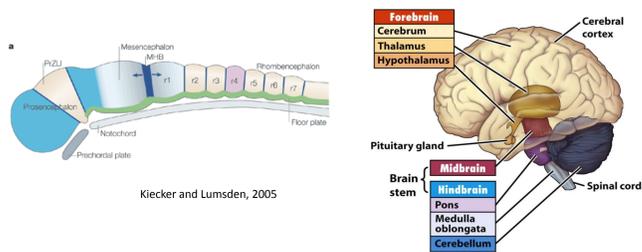


Введение

Задний мозг развивается из третьего пузыря при развитии мозга.

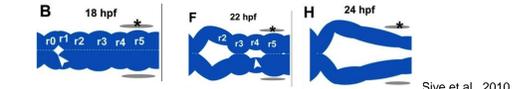
Ромбомеры как элементы экспрессии генов

Нейрогенез и морфогенез протекают параллельно.



На ранних стадиях развития задний мозг временно разделяется на метамеры, т.н. ромбомеры. Каждый ромбомер обладает собственной молекулярной идентичностью.

Нейрональные клетки-предшественники экспрессируют пронейрональные гены. Эти клетки-предшественники способны дифференцироваться и стать нейронами, которые составят нейронные связи.



Процессы спецификации и дифференциации клеток-предшественниц протекают параллельно с морфогенезом заднего мозга.

Он включает в себя Варролиев мост, спинной мозг и мозжечок. Все эти структуры вместе контролируют процессы вегетативной нервной системы.

На настоящий момент нам не до конца известно, как из клеток-предшественниц развиваются столь разнообразные нейроны и как они формируют нейронные связи. Задний мозг является консервативной структурой, имеющейся у всех позвоночных. Таким образом, задний мозг *danio rerio* является хорошей моделью, чтобы изучать этот вопрос: мы можем сочетать генетические методы исследования и методы *in vivo* визуализации.

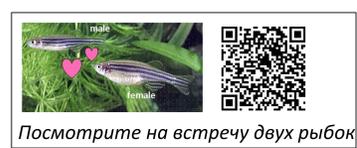
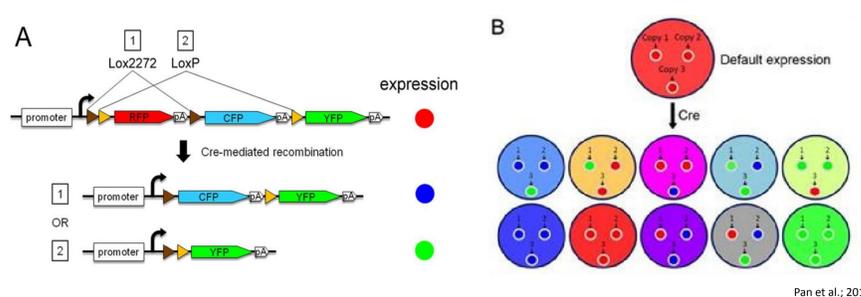
Проект 1. Клональные отношения и клеточное поведение нейрональных клеток-предшественниц

Введение и цели

Мы хотим понять, как происходят развиваются и ведут себя нейрональные клетки-предшественники в заднем мозге. Для этого мы используем метод Zebrabow, который позволяет пометить клетки-предшественники особым цветом. Поскольку это генетический метод, то и все дочерние клетки помеченной клетки будут окрашены в тот же цвет. Это позволяет исследовать клеточные линии, группы клеток-предшественниц (их симметричность /асимметричность и пространственное расположение в заднем мозге).

В трансгенной линии Zebrabow клетки могут экспрессировать разные цветные белки за счет рекомбинации кассет.

Чтобы создать двойную трансгенную линию мы скрестили линию Zebrabow с линией ubi:Cre-ERT2

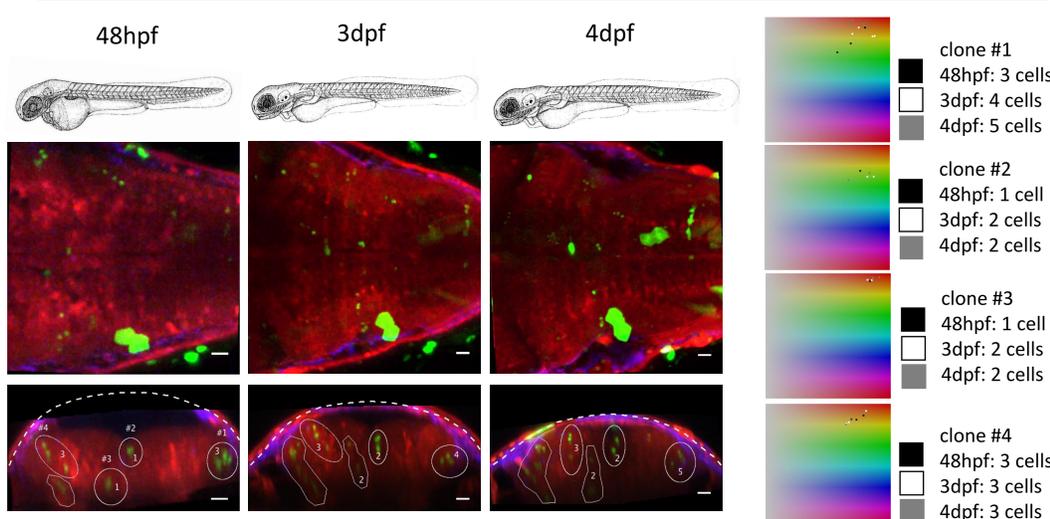
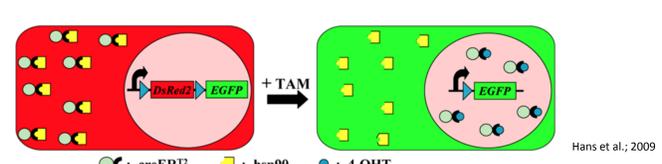


Мы вырастили эмбрионов до стадии 18hpf и инкубировали с тамоксифеном.

Рыба трансгенной линии Zebrabow имеет разноцветные кассеты, состоящие из кодирующих последовательностей для трех разных флюоресцентных белков: RFP, CFP, YFP.

С помощью конфокального микроскопа мы получили изображения всего заднего мозга

Рекомбинацию кассет можно контролировать, используя линию Cre-ERT2



Трансгенная линия ubi:CreERT2 состоит из кодирующего сиквенса для Cre-рекомбиназы, связанного с эстрогеновым рецептором под контролем промотора для убиквитина. Только при наличии лиганда (тамоксифен) этот сложный белок может быть перемещен в ядро.

Вывод: при поздней инкубации (18hpf) с 5µM тамоксифена на 3 часа при комнатной температуре мы можем добиться низкой частоты рекомбинаций. Т.е. мы приобретаем клонов с небольшим разнообразием окрашивания (см. картинки репрезентативных клонов). Более того, экспрессия белков была значительно слабее, чем в предыдущих экспериментах.

Проект 2. Генерация трансгенной линии рыб для контролируемой экспрессии генов.

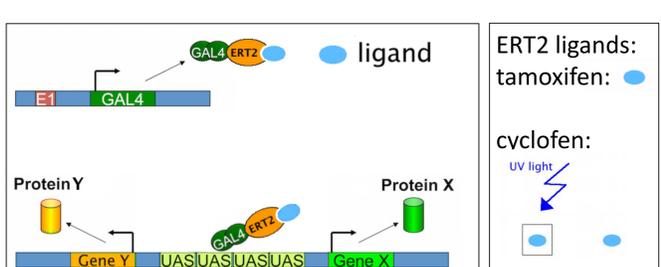
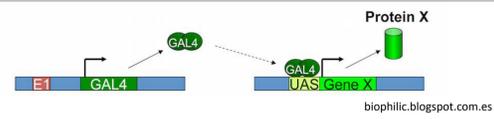
Введение и цели

Система GAL4-UAS - это гибкий инструмент, который позволяет контролировать экспрессию генов и изучать клеточное поведение. Хотя эта система изначально была обнаружена у дрожжей, она хорошо работает и в других организмах, поэтому мы можем модифицировать ее и использовать для наших целей. В этом проекте мы хотели создать стабильную трансгенную линию, т.н. линию Ubi-ERT2-GAL4 ACR (Gerety et al., 2013).

Трансактиватор GAL4 специфично связывается с UAS

Сложный белок ERT2-GAL4 перемещается в ядро только при наличии лиганда ERT2

Геномная интеграция достигается с помощью микроинъекций



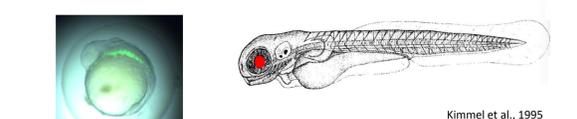
Мы впрыскиваем вектор вместе с Tol2 мРНК и GFP мРНК

Экспрессия GAL4 идет со специфического регуляторного элемента. Это может быть специфичный тканевый промотор или, например, промотор убиквитина.

Мы хотим интегрировать конструктор Ubi:ERT2-GAL4 в геном *danio rerio*



Активация транскрипции может быть контролирована по времени за счет инкубирования с лигандом (4-гидрокси-тамоксифен). Также мы можем контролировать транскрипцию во времени используя иммобилизованный тамоксифен: cyclofen-ОН. В дальнейшем, мы можем активировать экспрессию обоих генов через UAS.



Экспрессия GFP подтверждает успешность инъекции. В дальнейшем развитии рыбы красные глаза будут служить признаком успешной интеграции вектора.