

Τεχνικές για τη μελέτη της ανάπτυξης



Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Ορατό ηλεκτρομαγνητικό φάσμα 380 - 760nm

Μικροσκόπιο ανατομών (στερεοσκόπιο) dissecting microscope

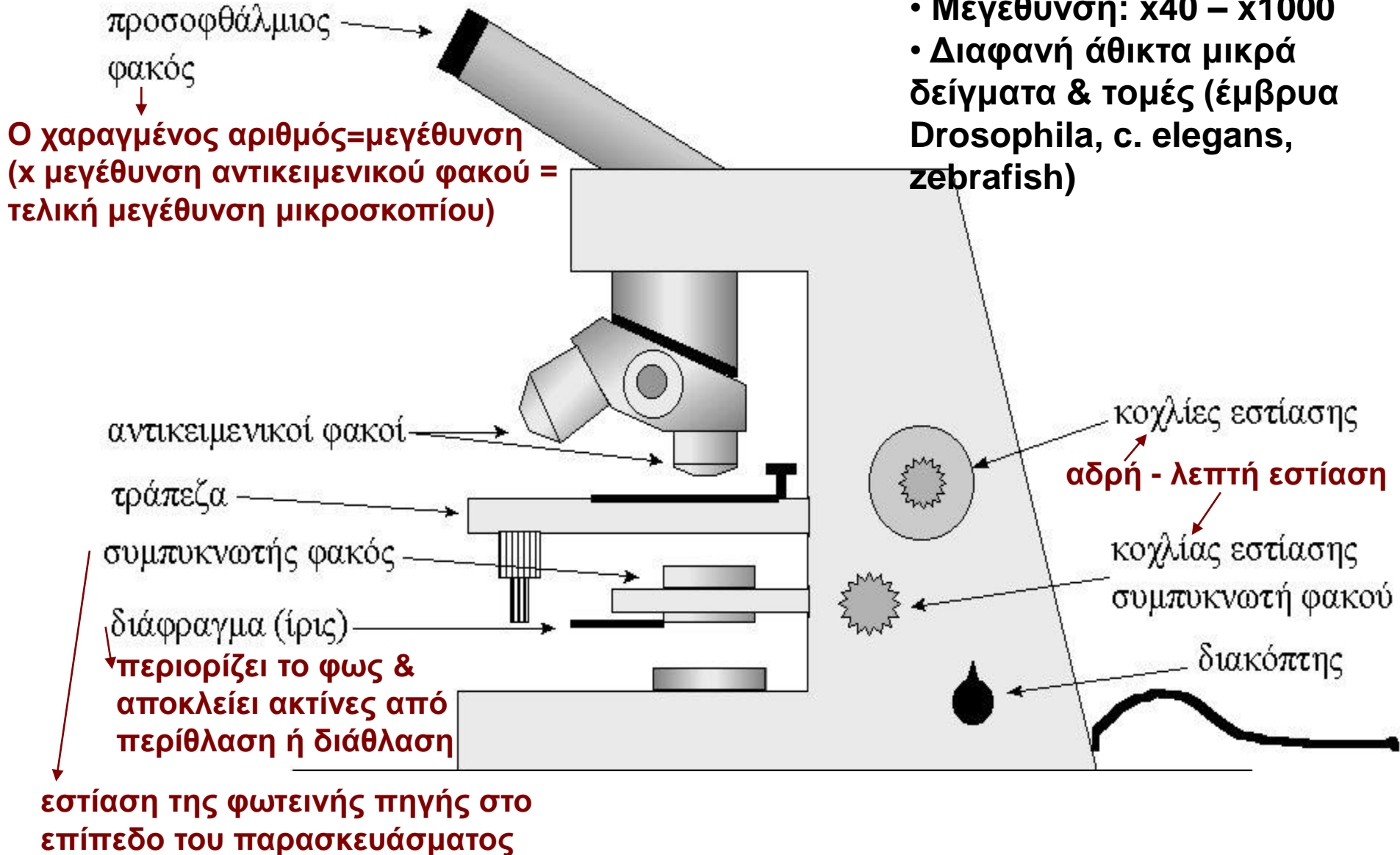


- Μεγέθυνση: x10 - x50
- 3D εικόνα, μικροχειρουργική, μικροένεση
- Προσπίπτων φωτισμός για αδιαφανή παρασκευάσματα, διερχόμενος για διαφανή

Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Σύνθετο μικροσκόπιο (compound microscope)

- Μεγέθυνση: $x40 - x1000$
- Διαφανή άθικτα μικρά δείγματα & τομές (έμβρυα *Drosophila*, *c. elegans*, zebrafish)



Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο



Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Μεγέθυνση οπτικού μικροσκοπίου $M = m_1 \times m_2$

m_1, m_2 : μεγεθύνσεις προσοφθάλμιου και αντικειμενικού φακού

μέγιστη χρήσιμη μεγέθυνση ~ διακριτική ικανότητα

$$d=0,61 \frac{\lambda}{A}$$

διακριτική ικανότητα

μήκος κύματος του φωτός (ή της ακτινοβολίας) ~500nm

αριθμητικό άνοιγμα (A) του φακού - εξαρτάται αποκλειστικά από την κατασκευή του (1,6 για έναν πολύ καλό φακό)

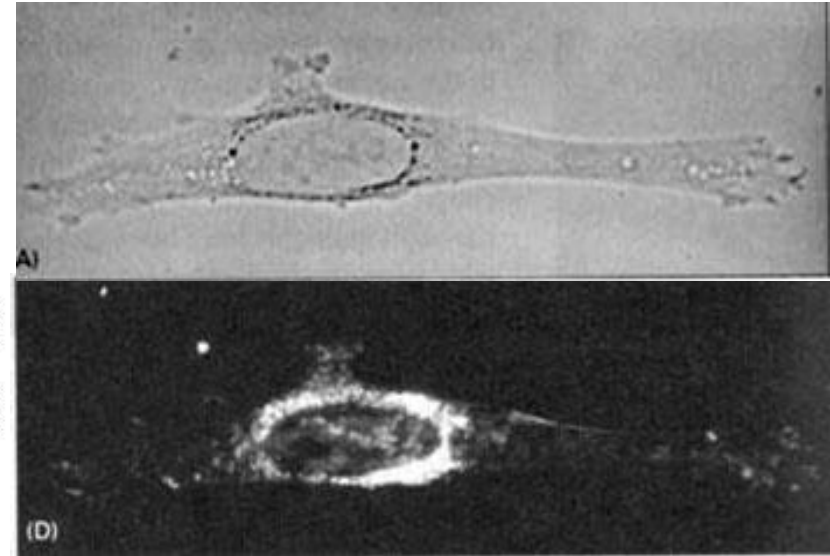
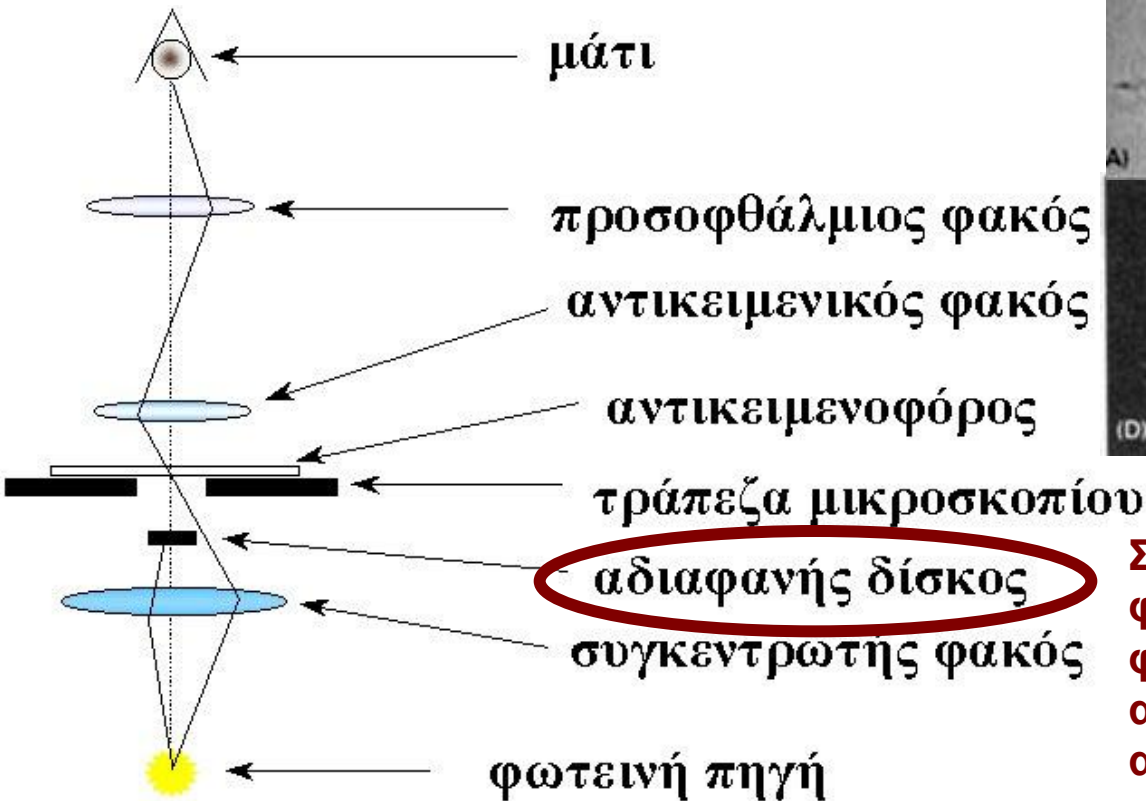
«Χρήσιμη μεγέθυνση" 1600X

Διακριτική ικανότητα: 0,2μm

Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Οπτικά συστήματα

Μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου (dark field)



Σκεπάζει το κέντρο του συγκεντρωτή φακού ώστε το παρασκεύασμα να φωτίζεται μόνο από πολύ πλάγιες ακτίνες που δεν εισέρχονται στον αντικειμενικό φακό παρά μόνο αν υποστούν διάθλαση μέσα στο παρασκεύασμα.

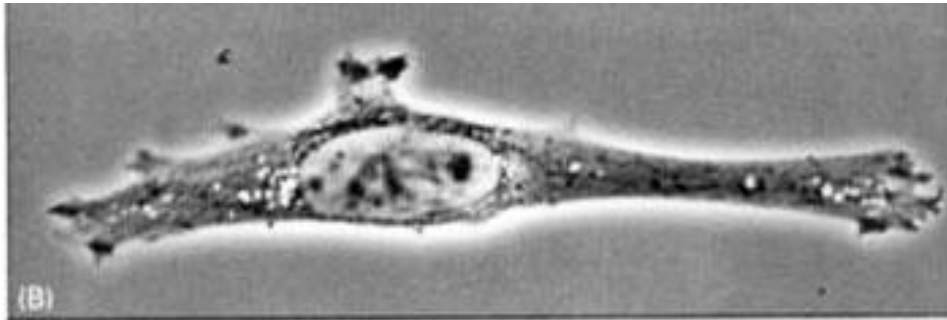
Εικόνα: φωτεινό αντικείμενο (από διάθλαση των ακτινών μέσα στο παρασκεύασμα) σε σκοτεινό πεδίο.

Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Οπτικά συστήματα

Μικροσκοπία αντίθεσης φάσης (phase contrast)

- Διαφορές στο δείκτη διάθλασης σε διαφορετικές περιοχές του κυττάρου
- Η μέθοδος καθιστά τα άχρωμα και διαφανή αντικείμενα ορατά στο μικροσκόπιο και το διαφανές αντικείμενο γίνεται φωτεινότερο ως προς το περιβάλλον του.
- Μικρά άθικτα δείγματα



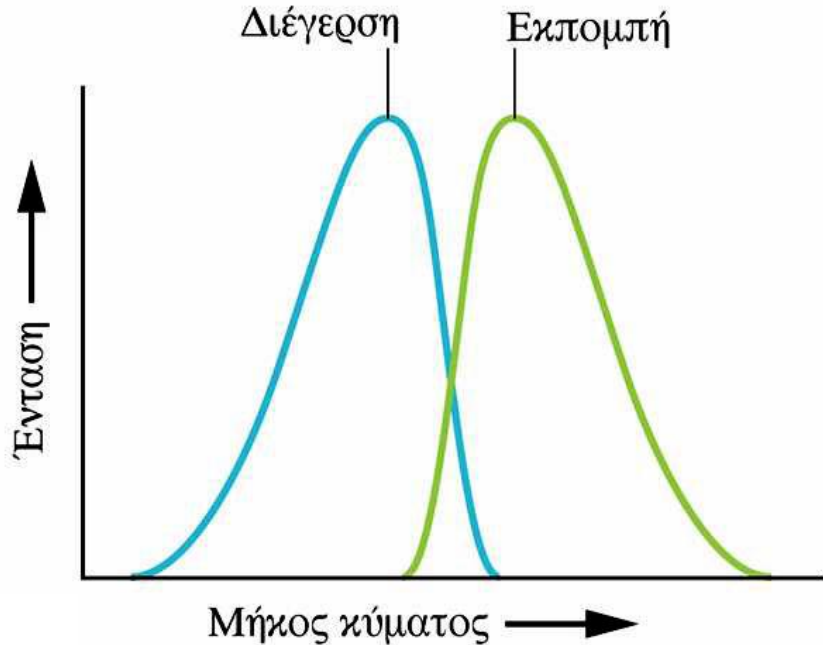
Μικροσκοπία Nomarski



Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Οπτικά συστήματα

Μικροσκοπία φθορισμού



Φάσματα διέγερσης και εκπομπής μιας φθορίζουσας ουσίας

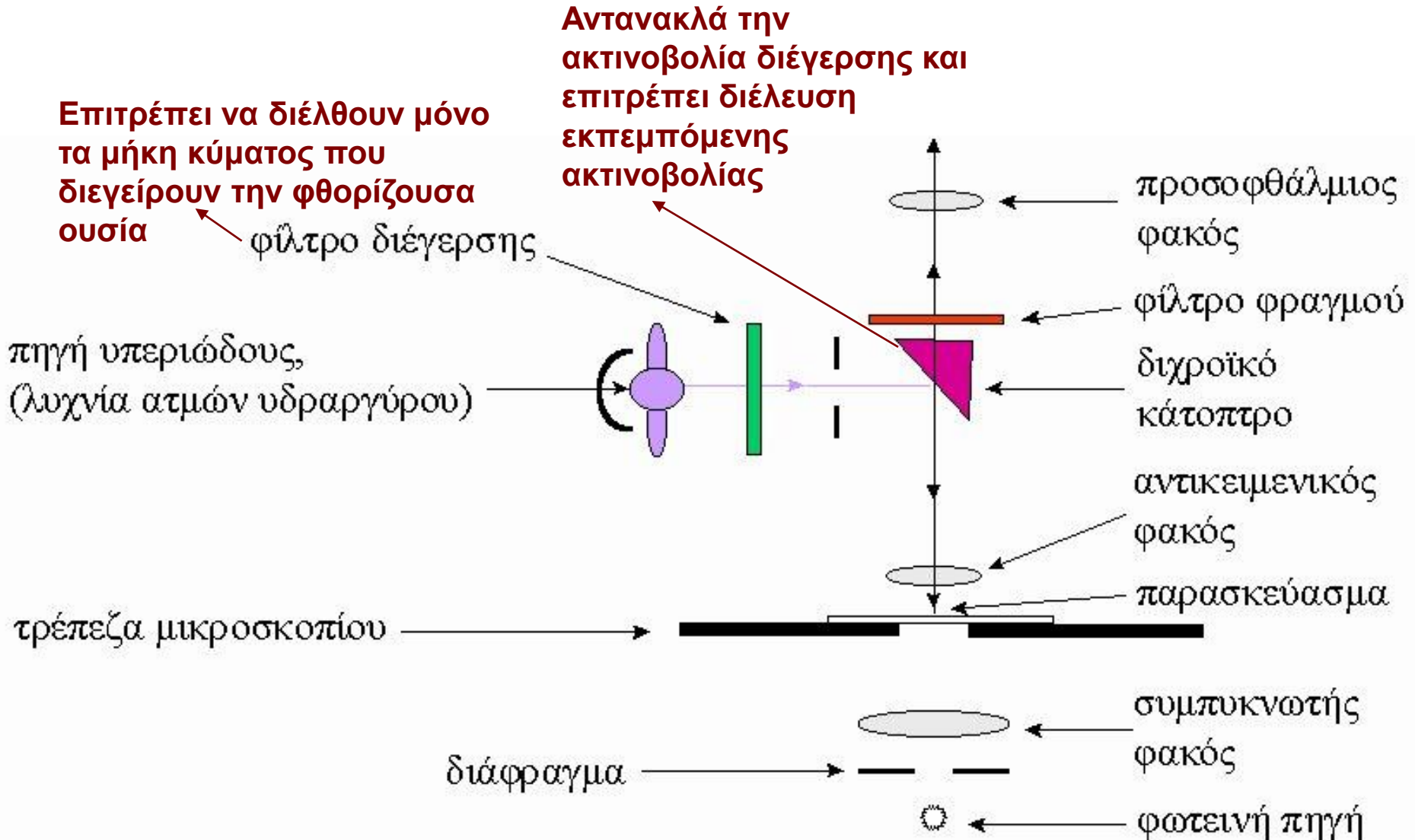
Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal scanning microscope)

Με λέιζερ (ένα μόνο μήκος κύματος), δημιουργία οπτικών τομών

Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Οπτικά συστήματα

Μικροσκοπία φθορισμού



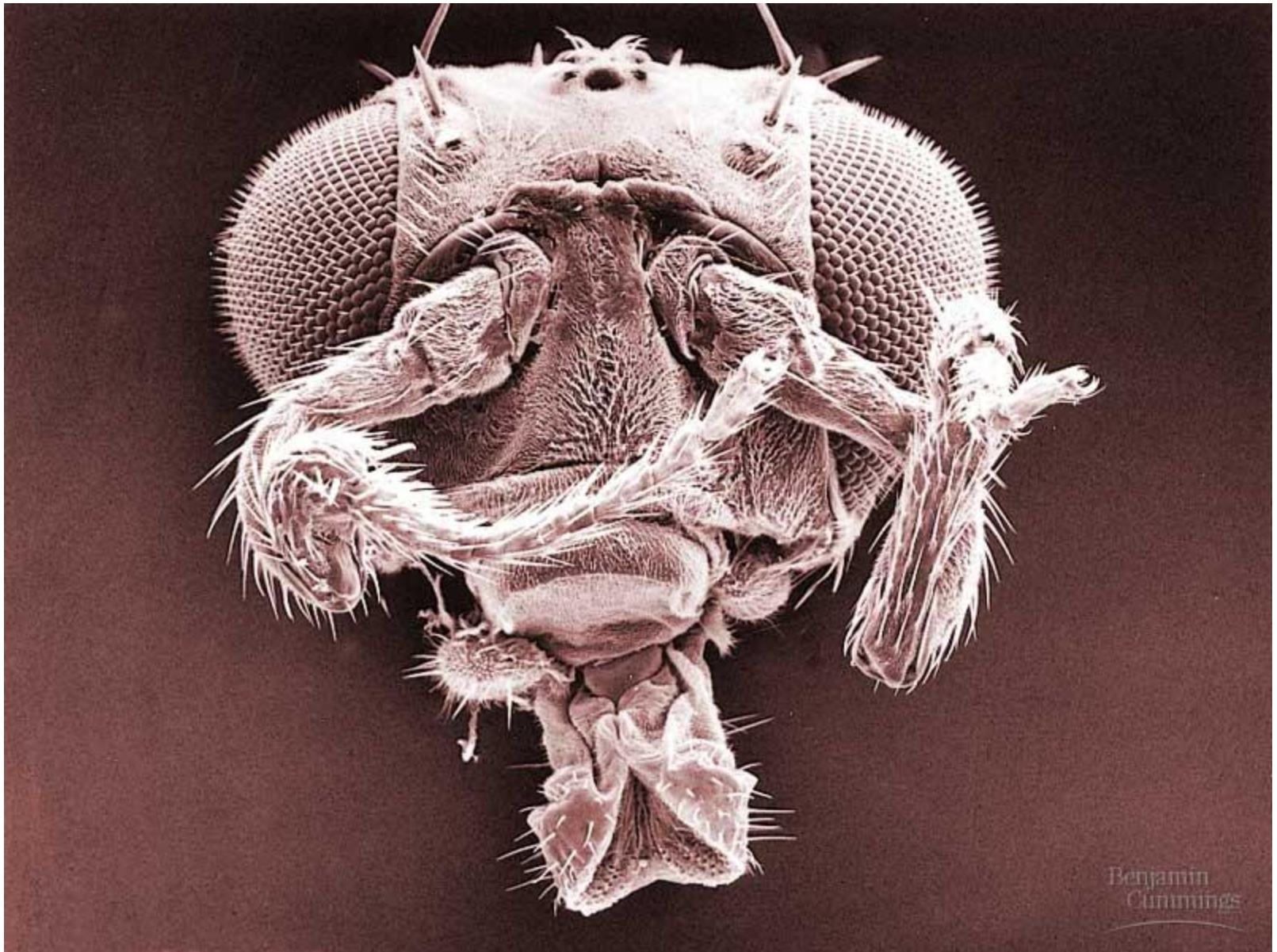
Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

«Φωτεινή πηγή» ηλεκτρονίων αντί ορατού ή υπεριώδους φωτός

Διακριτικό όριο $\sim 1\text{nm}$

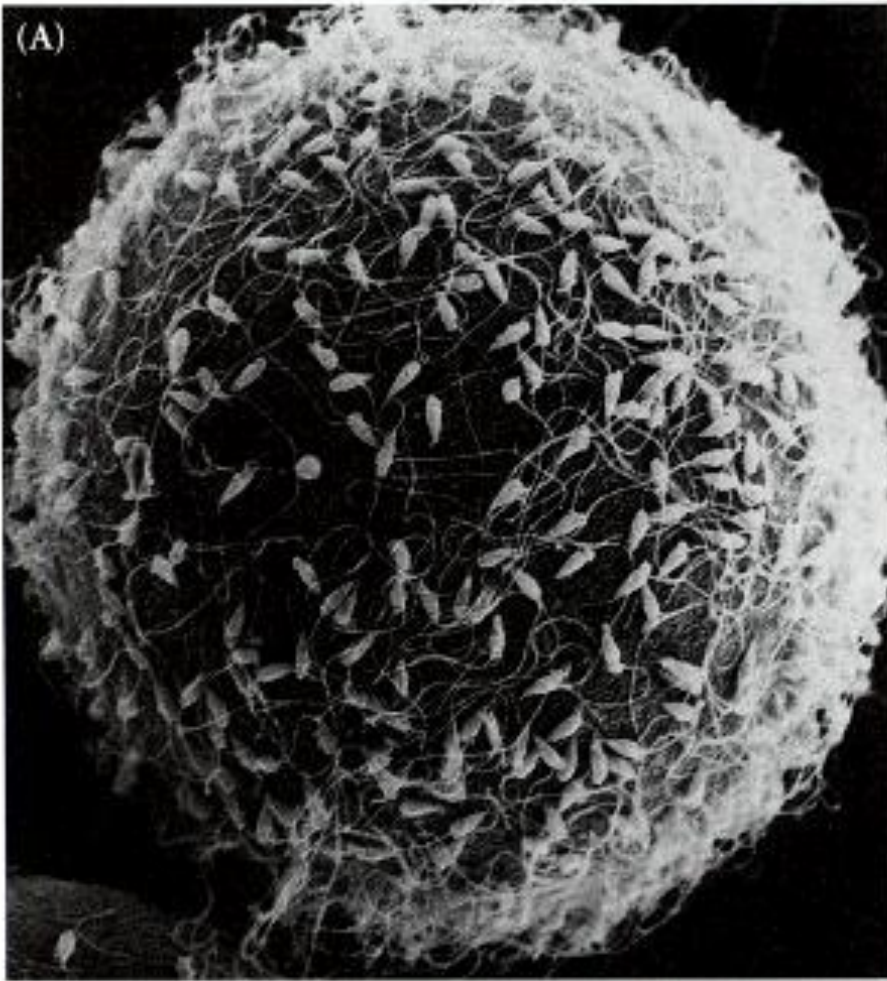
Σάρωσης και διέλευσης



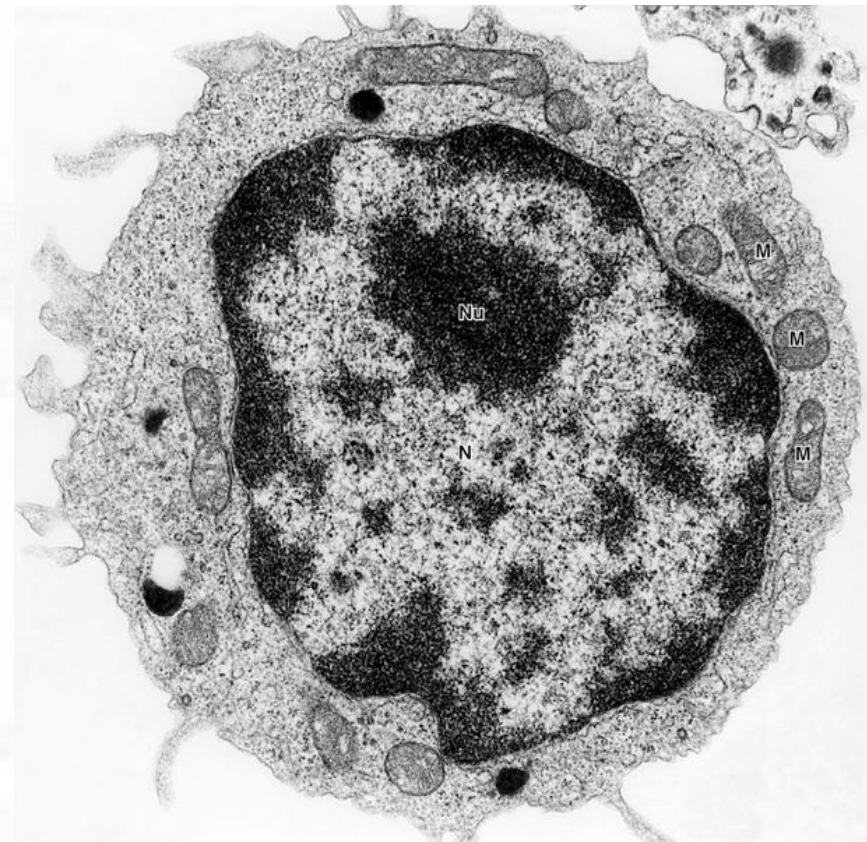


Benjamin
Cummings

Κεφάλι μύγας (σάρωσης)



Ωάριο & σπερματοζωάρια (σάρωσης)

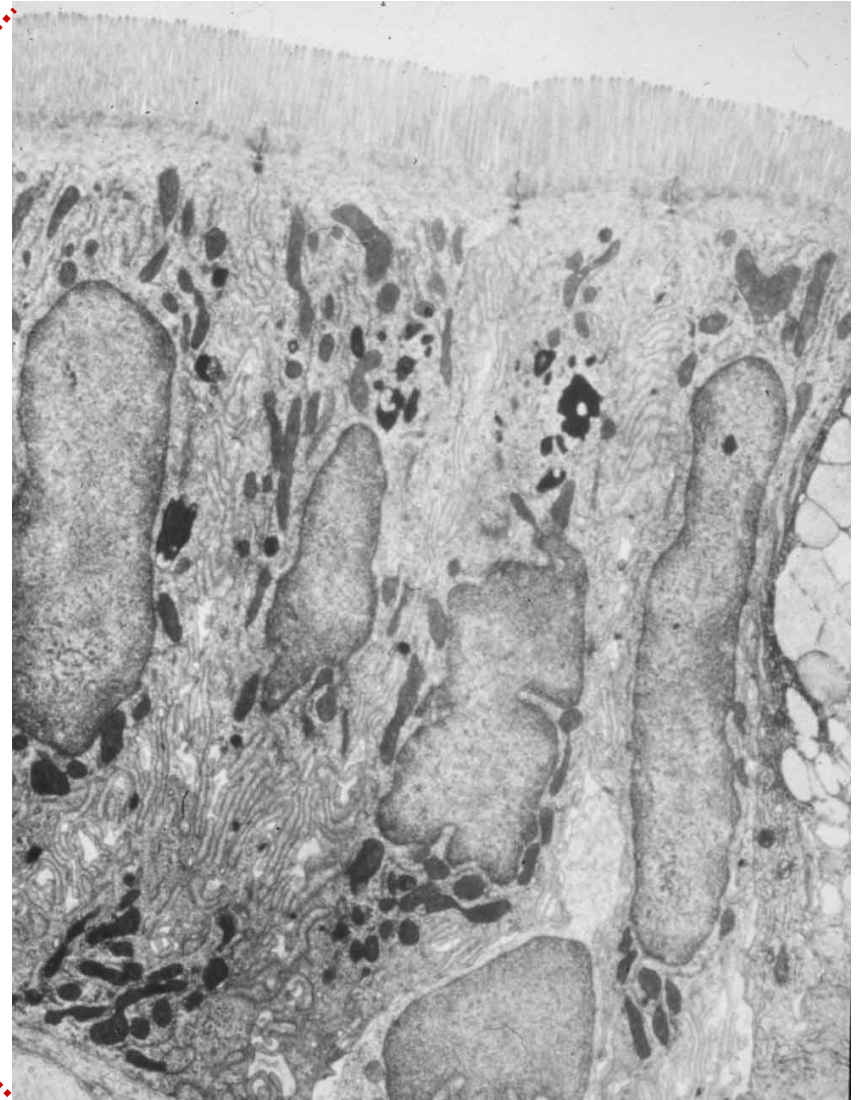
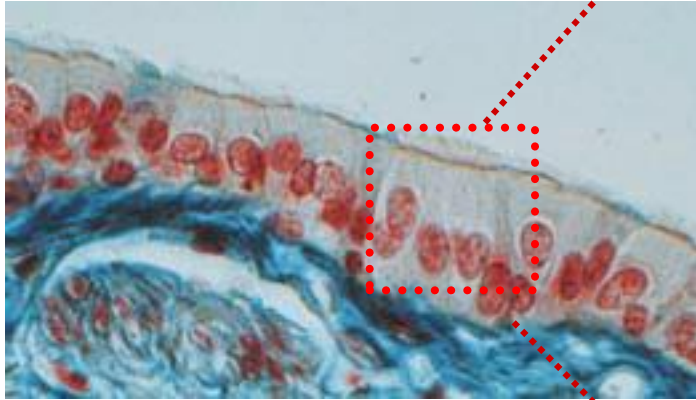


Λεμφοκύτταρο (διέλευσης)

Επιθηλιακά κύτταρα

Ηλεκτρονιογραφία

Φωτονιογραφία



Ιστολογικές μέθοδοι

Ιστολογικές τομές (histological sections)

• Για ιστολογική χρώση

Μονιμοποίηση δείγματος (fixation)

ώστε να γίνει ανθεκτικό μηχανικά με χημικά μονιμοποιητικά (fixatives) που προκαλούν ομοιοπολική σύνδεση μακρομορίων (cross-linking)

Π.χ. φορμαλίνη, γλουτεραλδευδη

• Για ανοσοιστοχημεία και υβριδοποίηση *in situ*

Εξισορρόπηση δείγματος σε διάλυμα σακχαρόζης (μονιμοποίηση) και ψύξη,

Τομές σε κρυοτόμο (cryostat)

Αφυδάτωση δείγματος (dehydration)

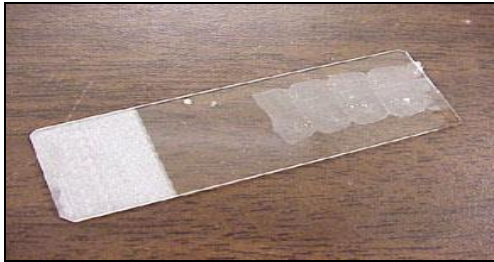
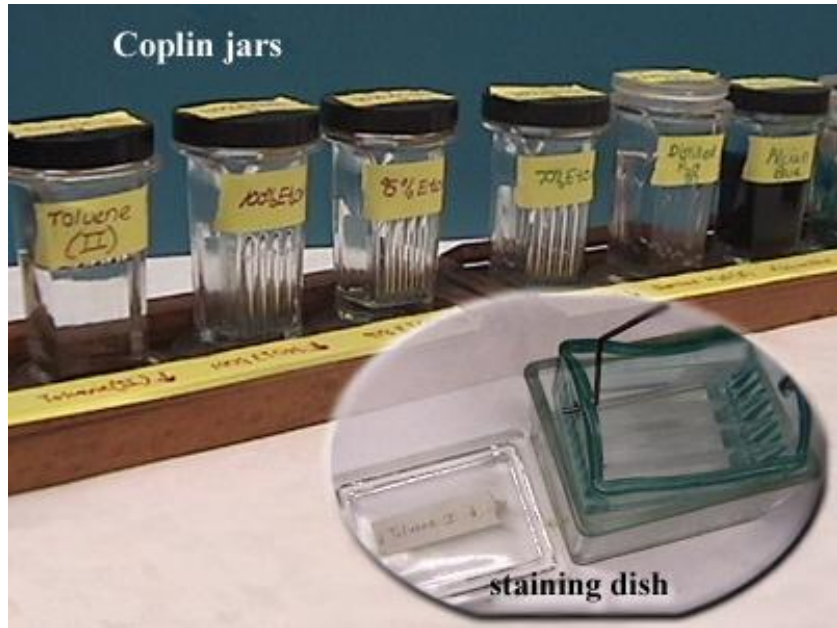
ώστε να γίνει διαπερατό για το επόμενο στάδιο συνήθως με διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης

Ξέπλυμα με διαλύτη που αναμιγνύεται με την παραφίνη, π.χ. ξυλένιο

Τοποθέτηση σε λιωμένη παραφίνη

μέχρι να εισχωρήσει, στερεοποίηση & τομές 5-10 μm σε μικροτόμο (microtome), τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρο

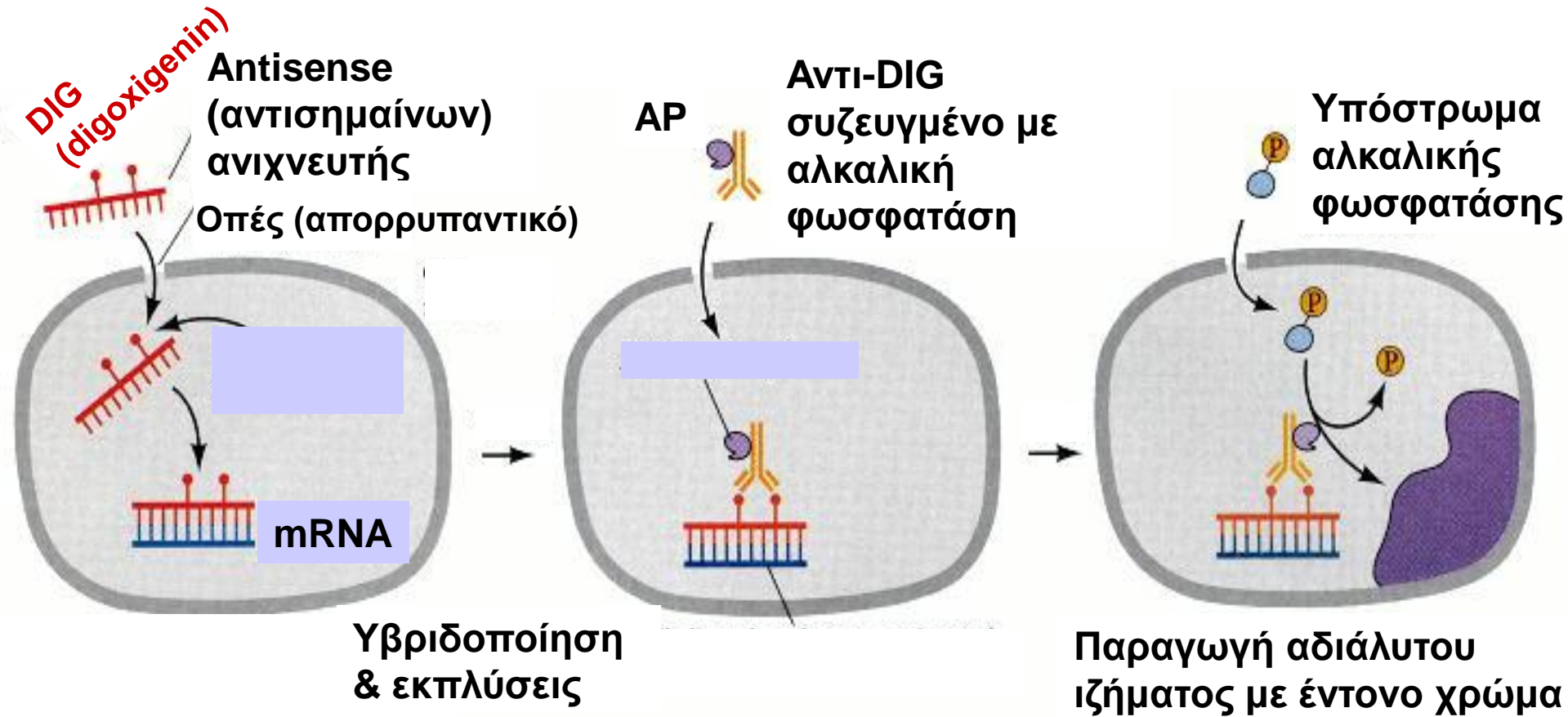




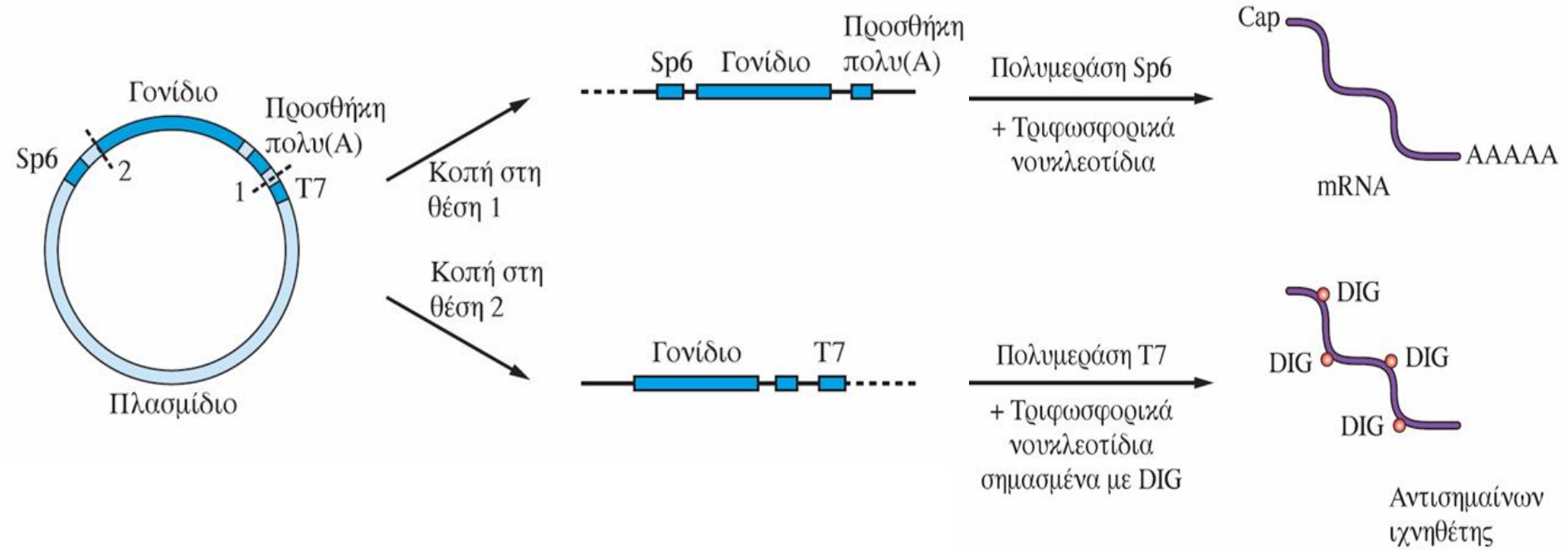
Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με μεθόδους *in situ*

Υβριδοποίηση *in situ* (άθικτα δείγματα whole mounts ή τομές)

Με ανιχνευτές σημασμένους με DIG



Σύνθεση mRNA *in vitro*



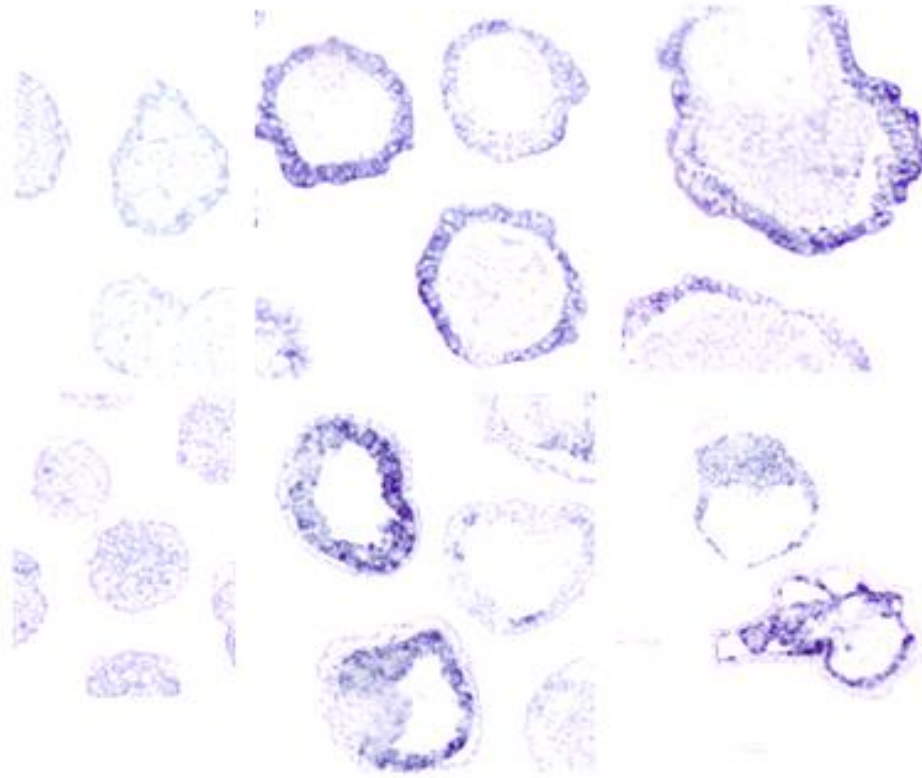
Day 4

Day 9

Day 11

Ihh

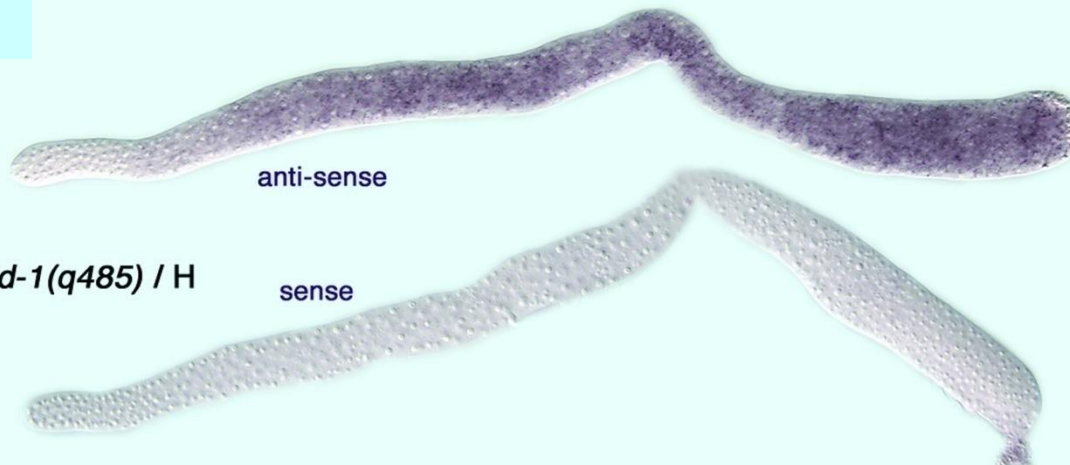
ptc



anti-sense

gld-1(q485) / H

sense

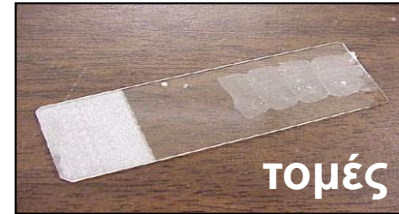


Με φθορίζοντες ανιχνευτές (Fluorescent *In Situ* Hybridization)

Συνήθως για ταυτοποίηση αλληλοεπικαλυπτόμενης έκφρασης γονιδίων

Με ραδιενεργούς ανιχνευτές

^{35}S
 ανιχνευτής $\xrightarrow{\text{υβριδοποίηση}}$



Εκπλύσεις & κάλυψη με φωτογραφικό γαλάκτωμα



Επώαση στο σκοτάδι για αρκετές μέρες



Διάσπαση ^{35}S

Απελευθέρωση σωματιδίων β

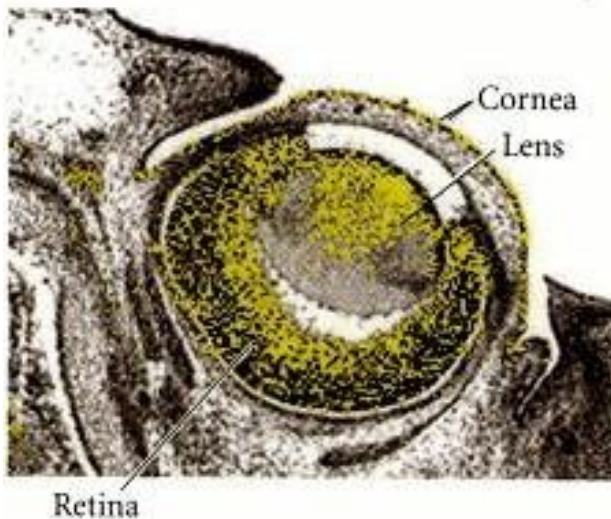
Ευαισθητοποίηση φωτ. γαλακτώματος



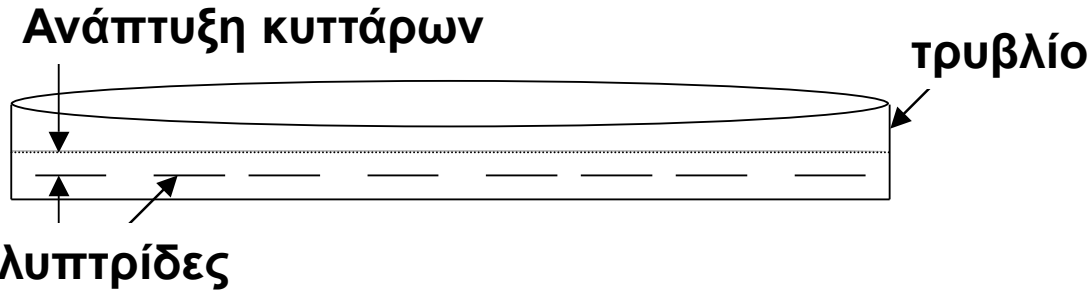
Επεξεργασία φωτ. γαλακτώματος και μετατροπή ευαισθητοποιημένων σημείων σε κόκκους αργύρου



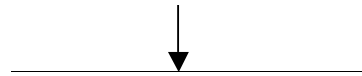
Παρατήρηση με μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου



Ανοσοϊστοχημεία (immunocytochemistry)



Μονιμοποίηση-επεξεργασία διαπερατότητας



Έκπλυση



Επώαση με 1^ο αντίσωμα



Έκπλυση



Επώαση με 2^ο αντίσωμα

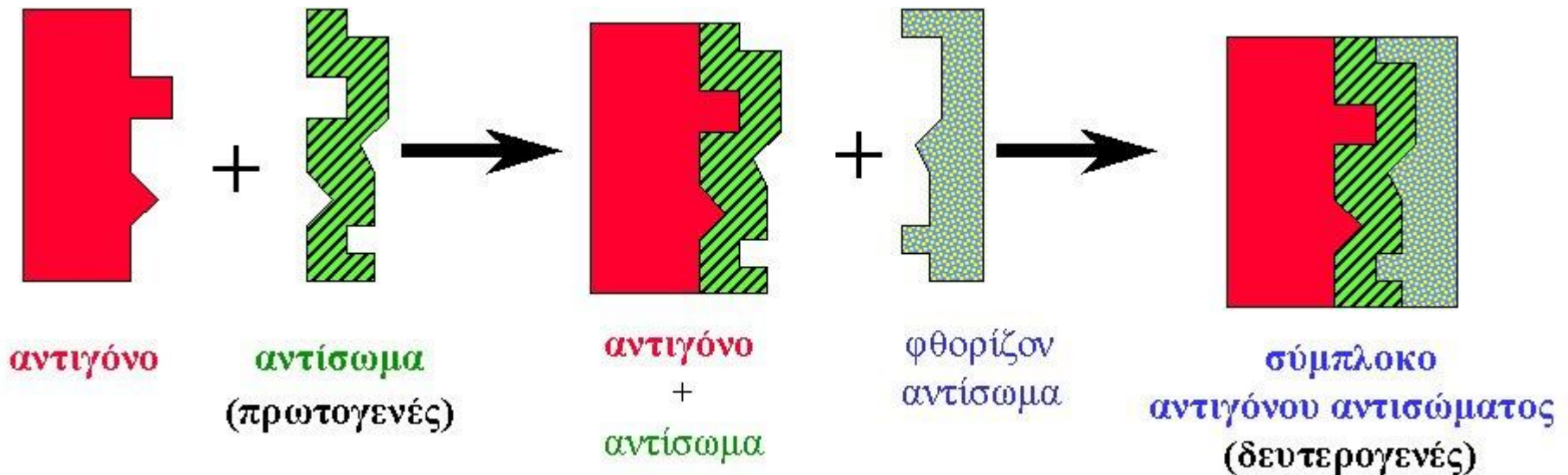
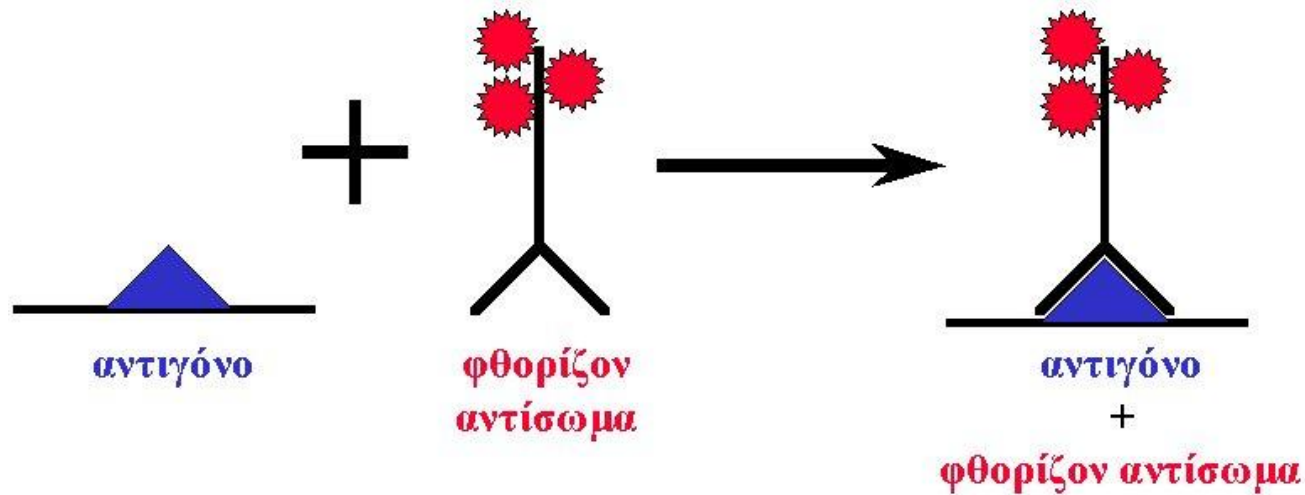
φθορίζον ή συζευγμένο με ένζυμο

Φωτονικό (οπτικό) μικροσκόπιο

Οπτικά συστήματα

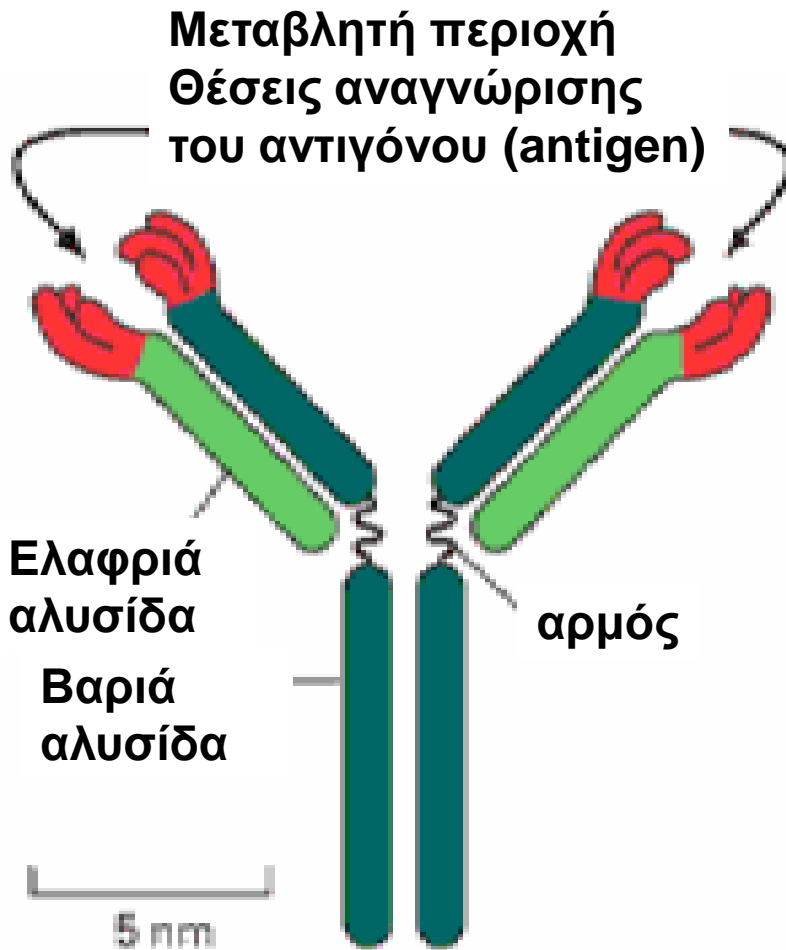
Μικροσκοπία φθορισμού

Φθορίζοντα αντισώματα



Ανοσοχημικές μέθοδοι

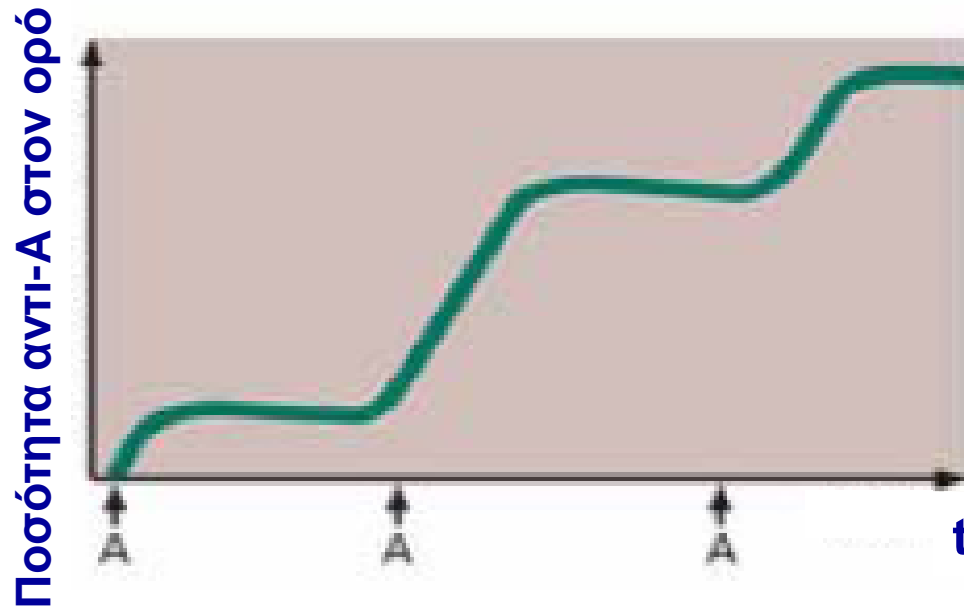
Δομή αντισώματος (antibody)



Ειδικότητα αντισώματος



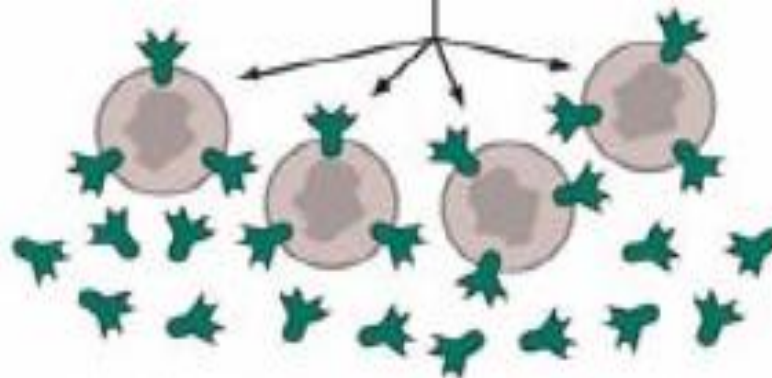
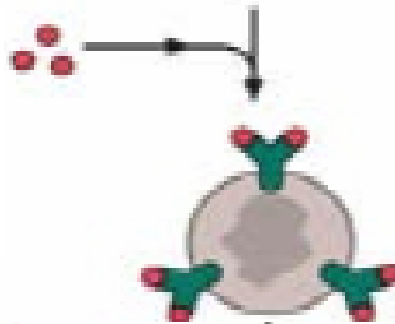
Παραγωγή αντισωμάτων



Ενεργοποίηση διαφορετικών λεμφοκυττάρων Β



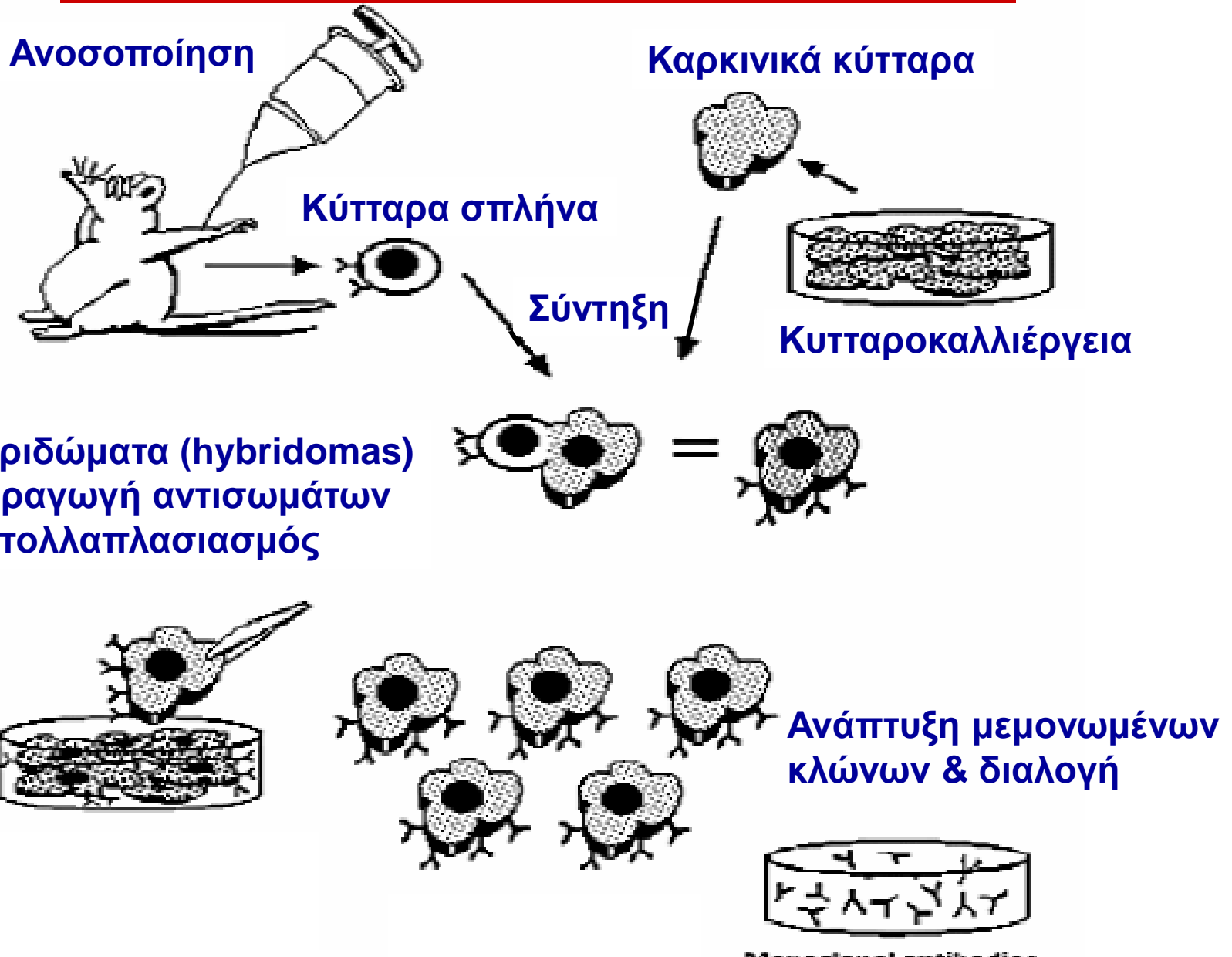
Σύνδεση αντιγόνου
στην επιφάνεια των
Β- κυττάρων



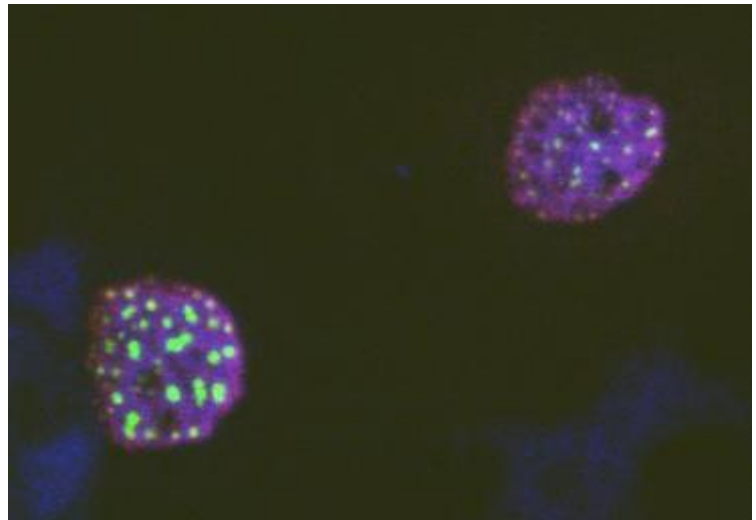
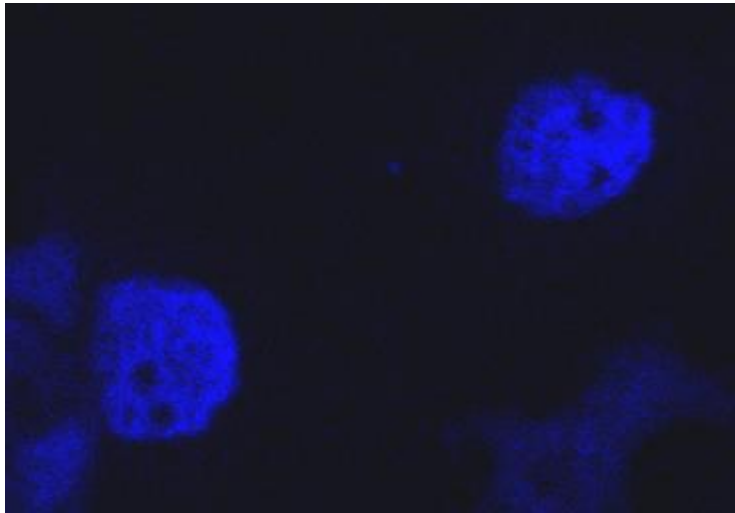
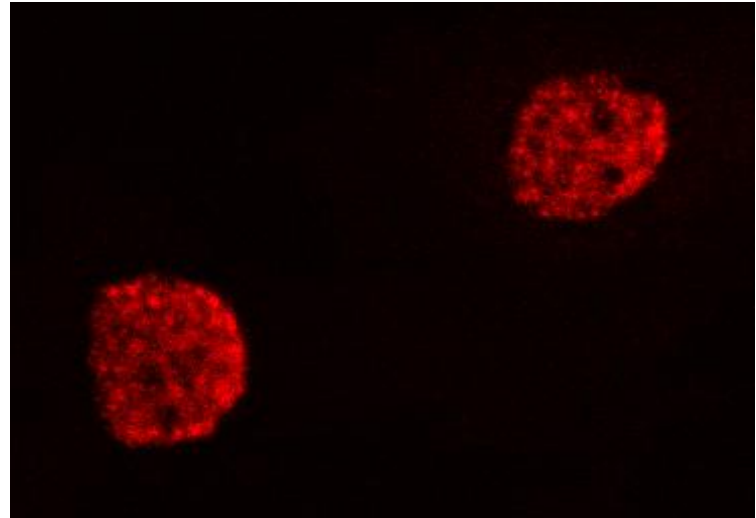
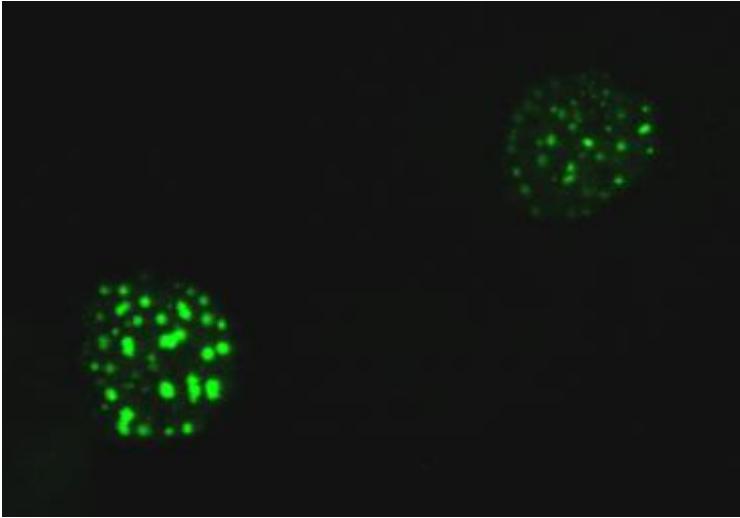
Παραγωγή και έκκριση
μεγάλων ποσοτήτων
αντισωμάτων

- Καθαρισμός αντισώματος με πρωτεΐνη A-G ή με στήλη συγγένειας με το αντιγόνο

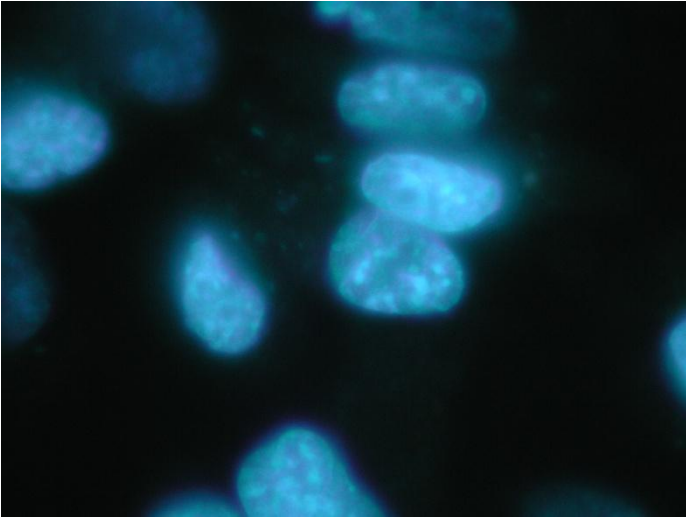
Παραγωγή μονοκλωνικών (monoclonal) αντισωμάτων



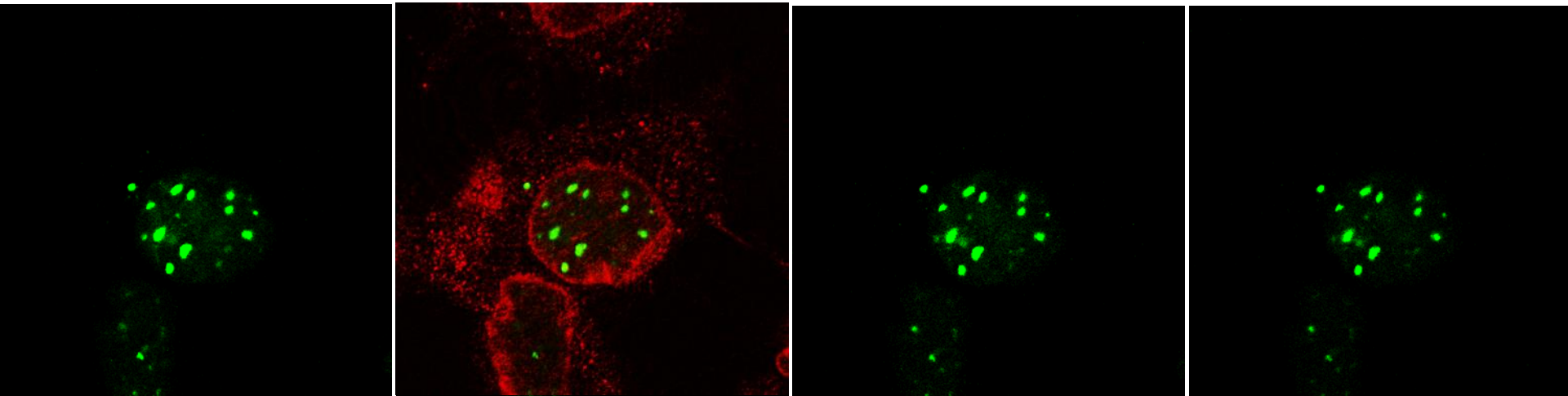
Ανίχνευση 3 πρωτεϊνών με φθορίζουσα μικροσκοπία



Χρώση πυρήνων με φθορίζουσα χρωστική & ανίχνευση με μικροσκοπία φθορισμού

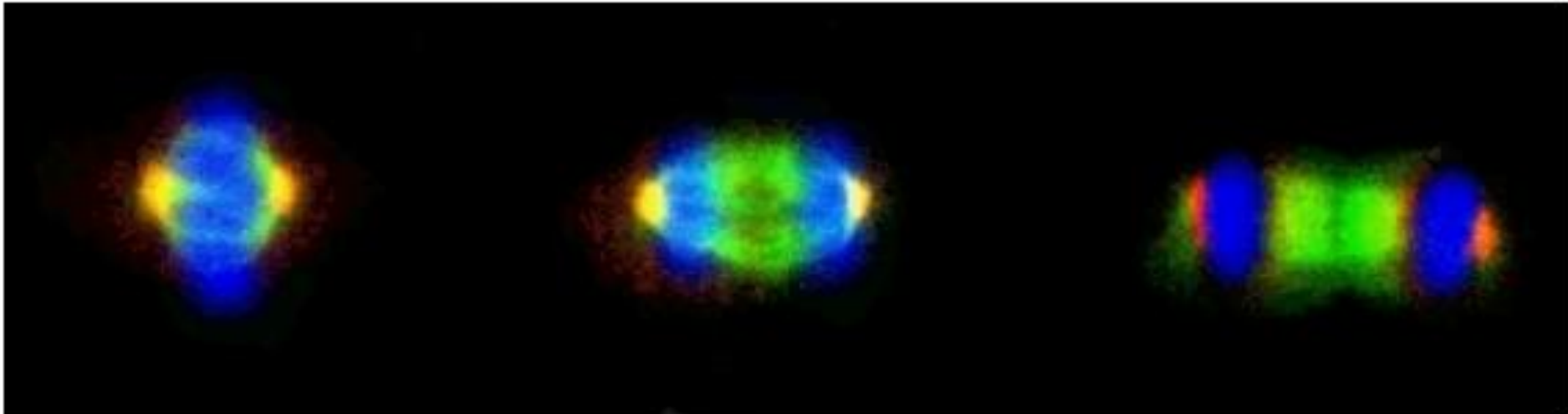


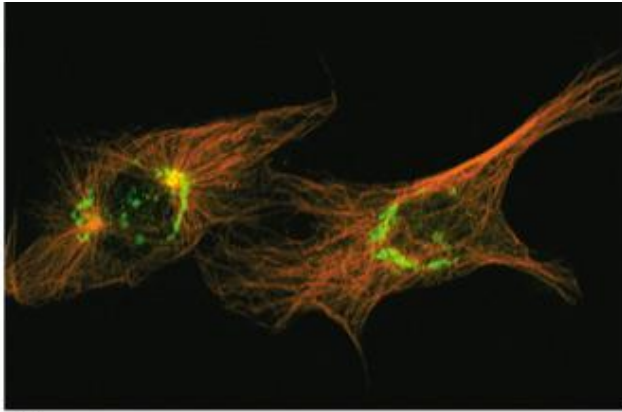
Διαδοχικές τομές ενός κυττάρου με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού



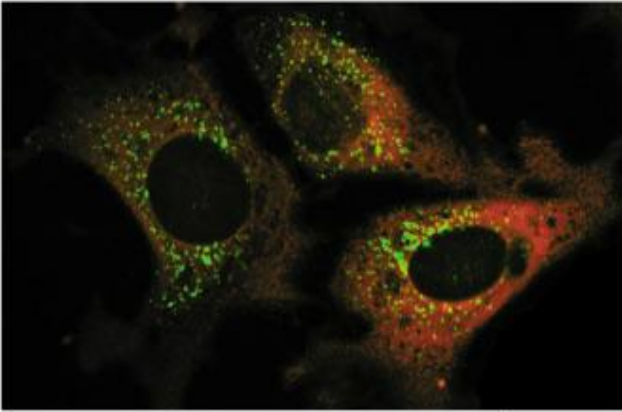
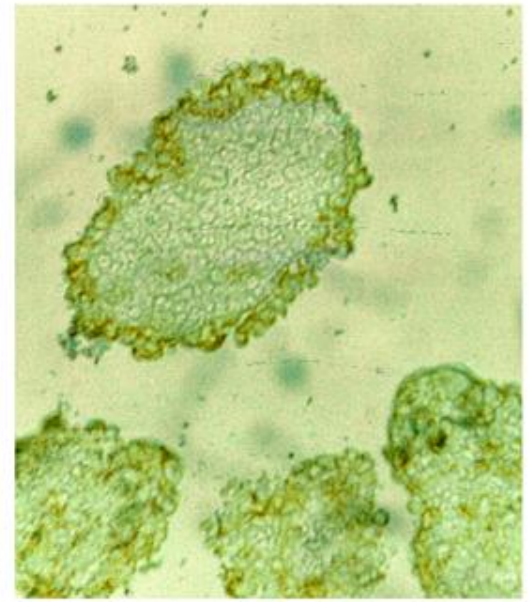
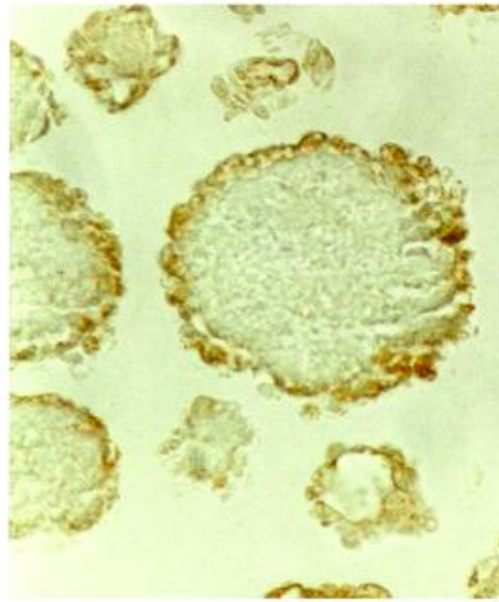
Μίτωση

- πράσινο: τουμπουλίνη (σωληνίνη)
- κόκκινο: γ τουμπουλίνη
- μπλε: DNA





(A)



(B)

10 μm

Μικροσωληνίσκοι: κόκκινο

Golgi: πράσινο

B: τεχνητός αποπολυμερισμός
μικροσωληνίσκων



μικροσωληνίσκοι

• Πώς θα ανιχνεύσω ταυτόχρονα 2 ενδογενείς πρωτεΐνες;

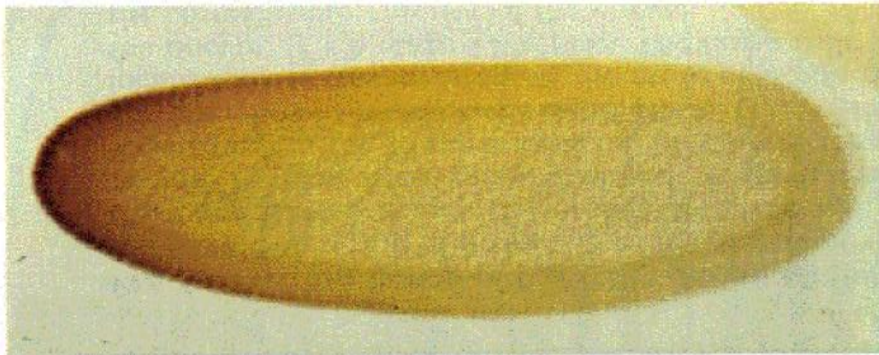
RNA in situ υβριδοποίηση και ανοσοεντοπισμός

A



RNA Bicoid

B

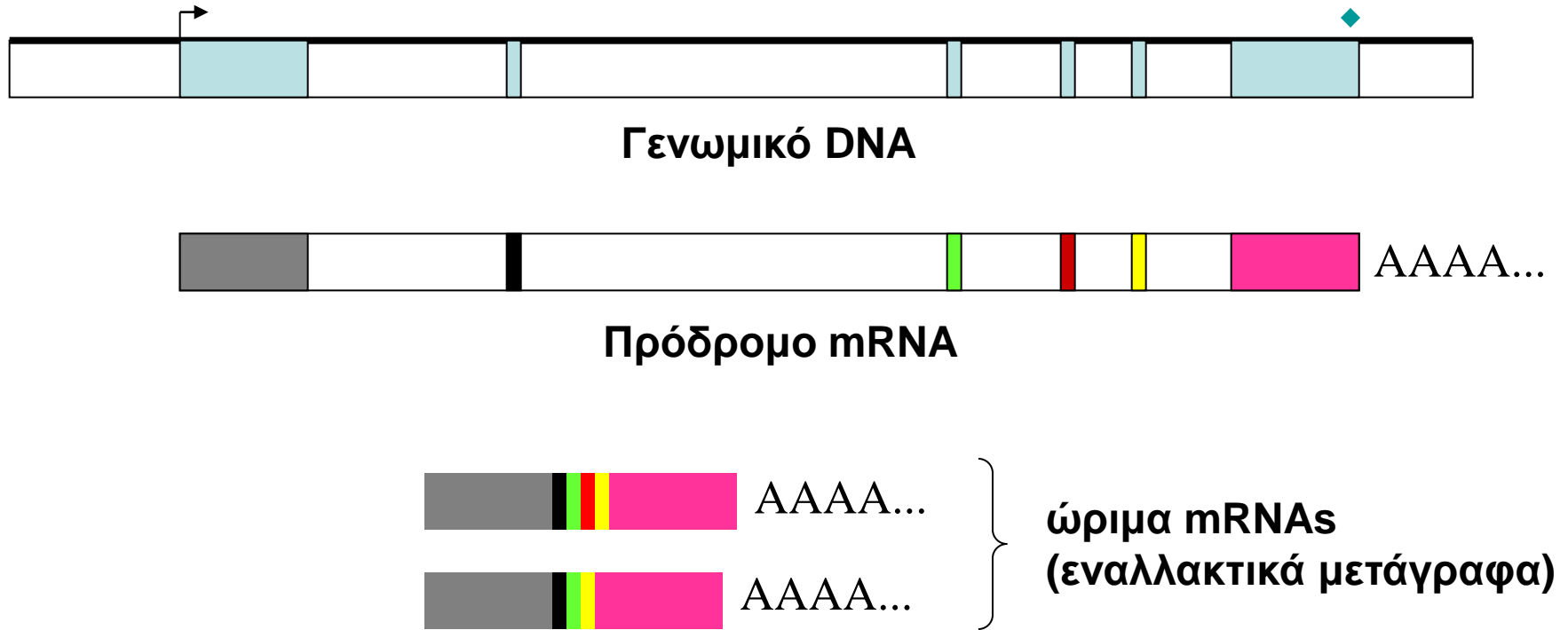


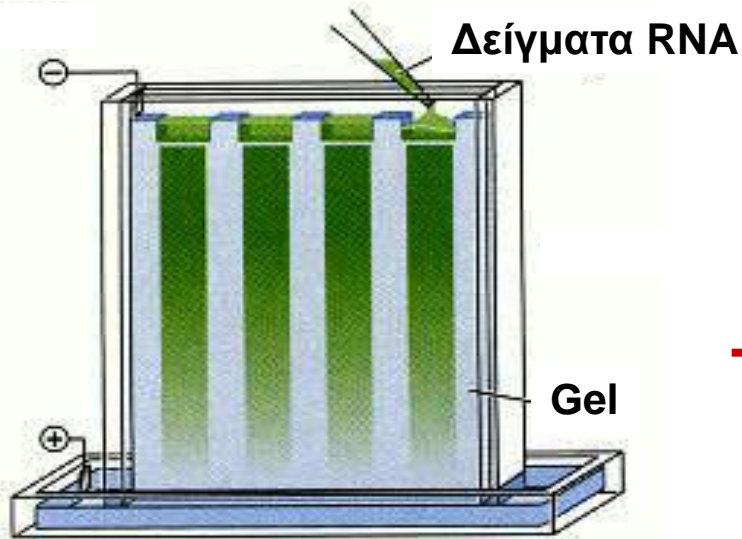
Πρωτεΐνη Bicoid

Βιοχημικές μέθοδοι για ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

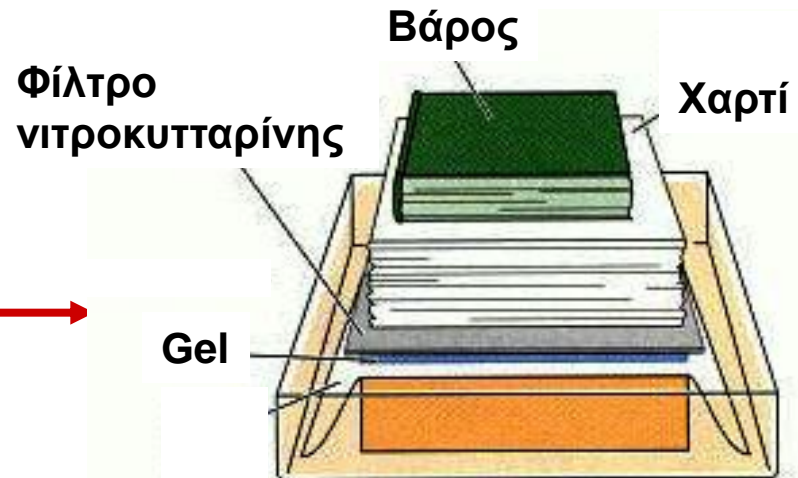
Ανίχνευση mRNA

1. Ανάλυση Northern (Northern blot)





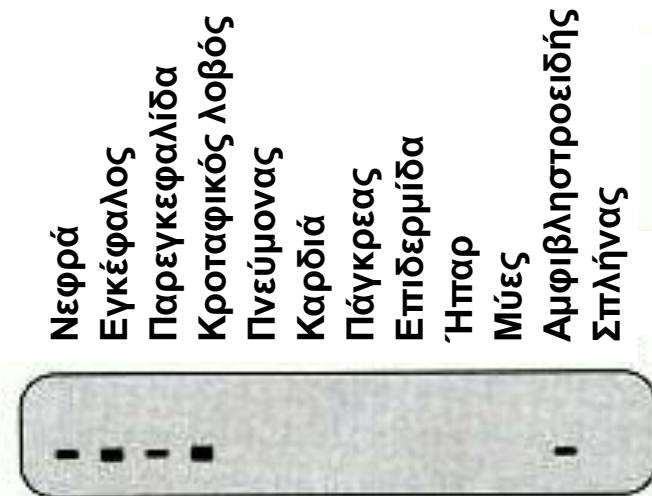
Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA σε πήκτωμα (gel) και διαχωρισμός τους βάσει μεγέθους



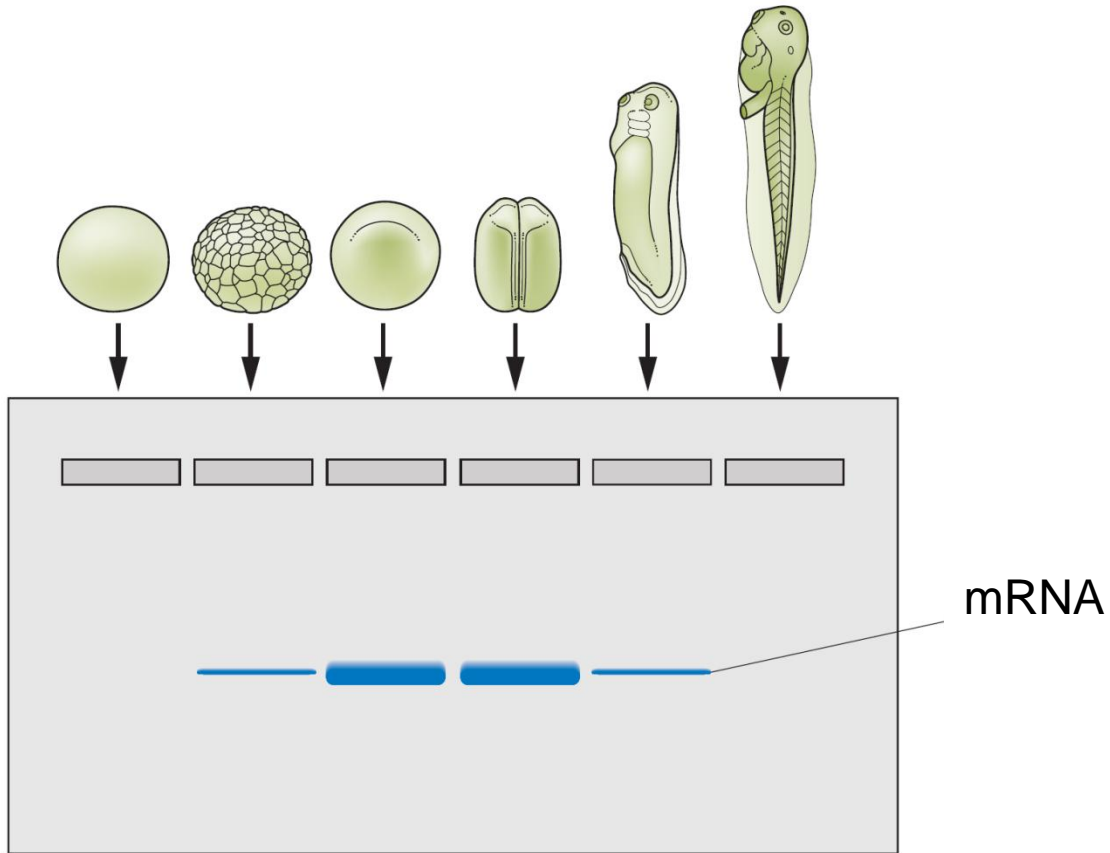
Μεταφορά του RNA από το gel στο φίλτρο



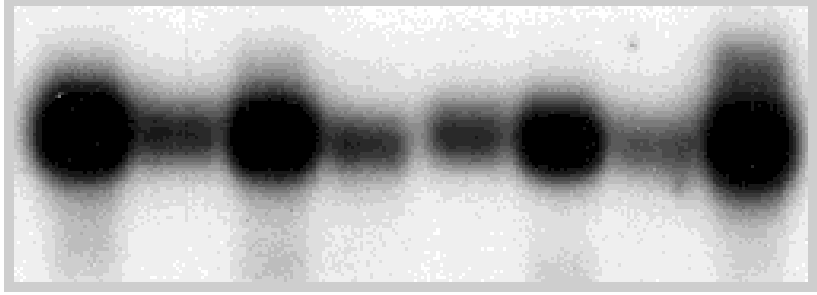
Προσθήκη μονόκλωνου ιχνηθετημένου ανιχνευτή που υβριδοποιείται με το συμπληρωματικό RNA



Αποτέλεσμα υβριδοποίησης

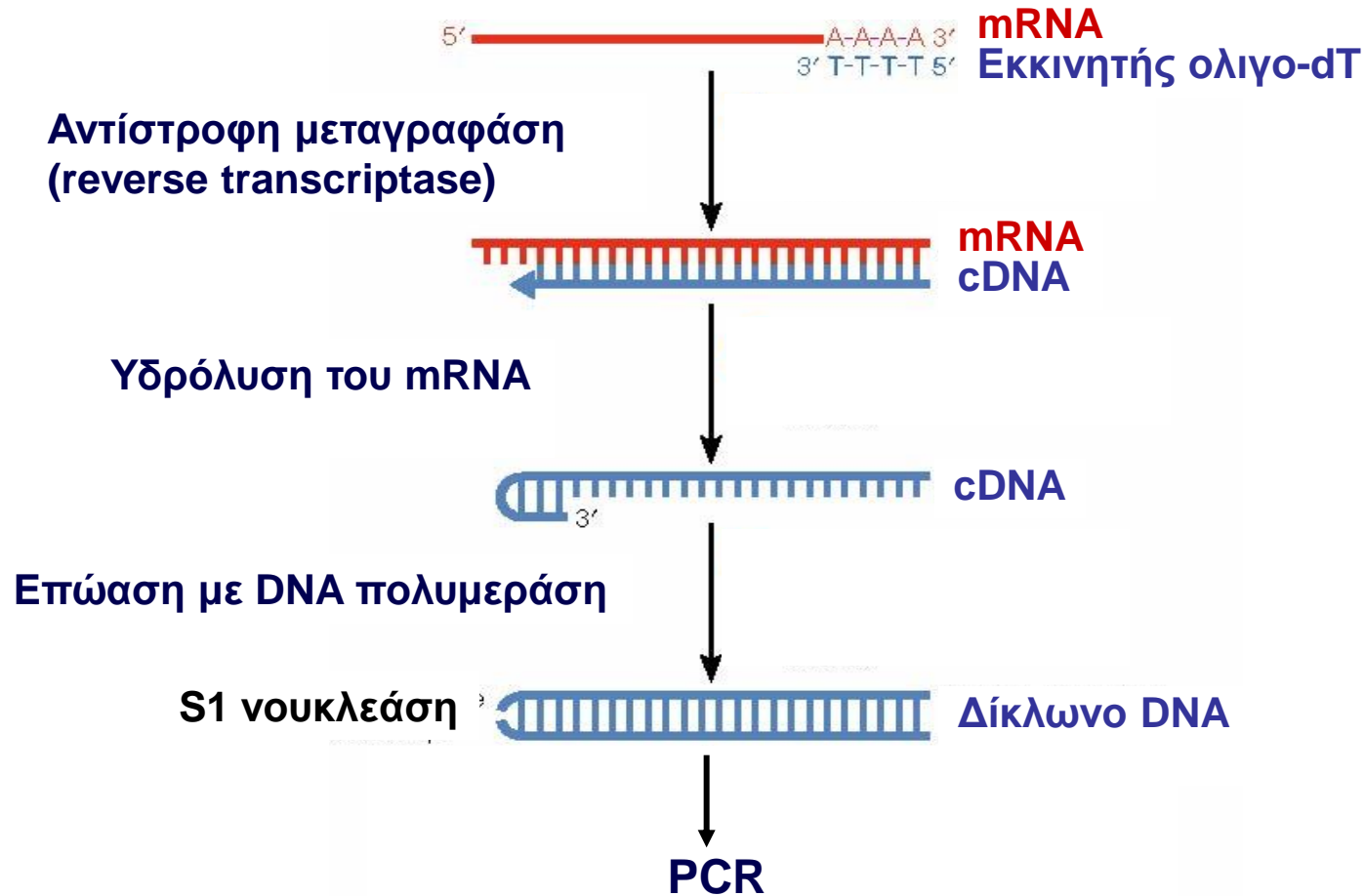


Ανίχνευση ενός γονιδιακού προϊόντος σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης

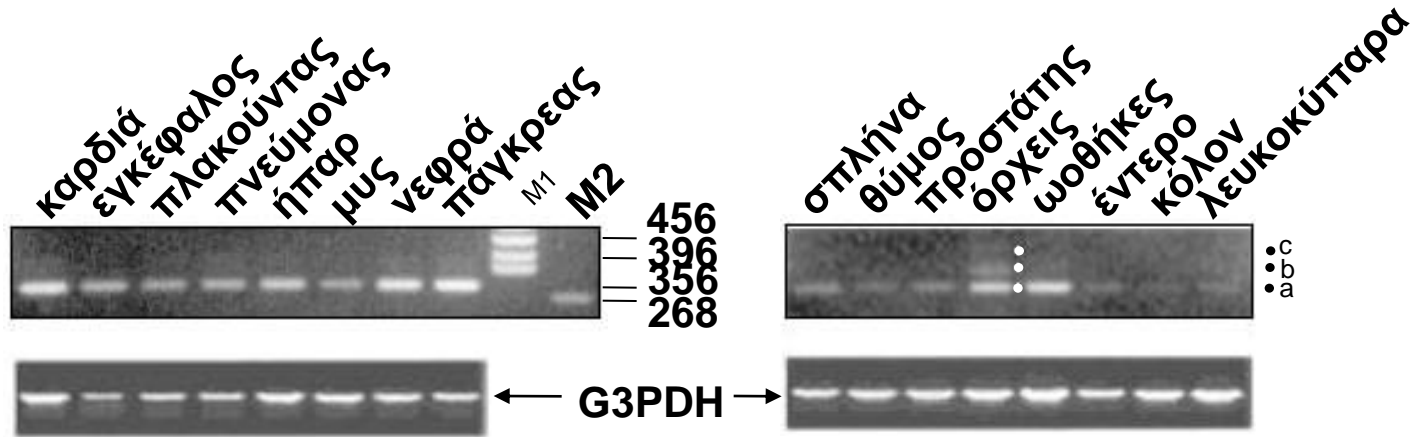


2. Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) – PCR (RT-PCR)

Ιστός π.χ. εγκέφαλος → Απομόνωση mRNAs

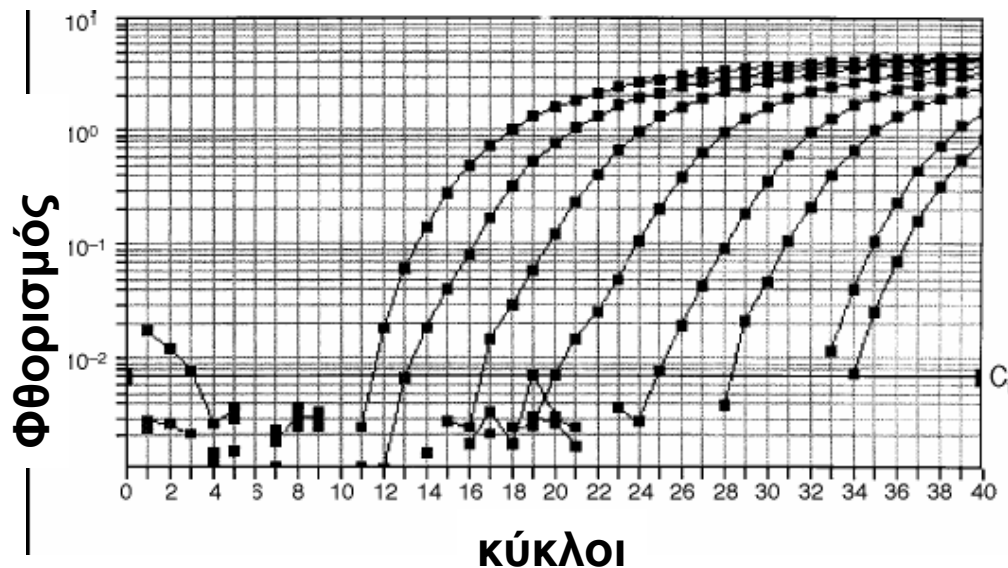


Πρότυπο έκφρασης και σχετική αφθονία ενός γονιδίου με RT-PCR

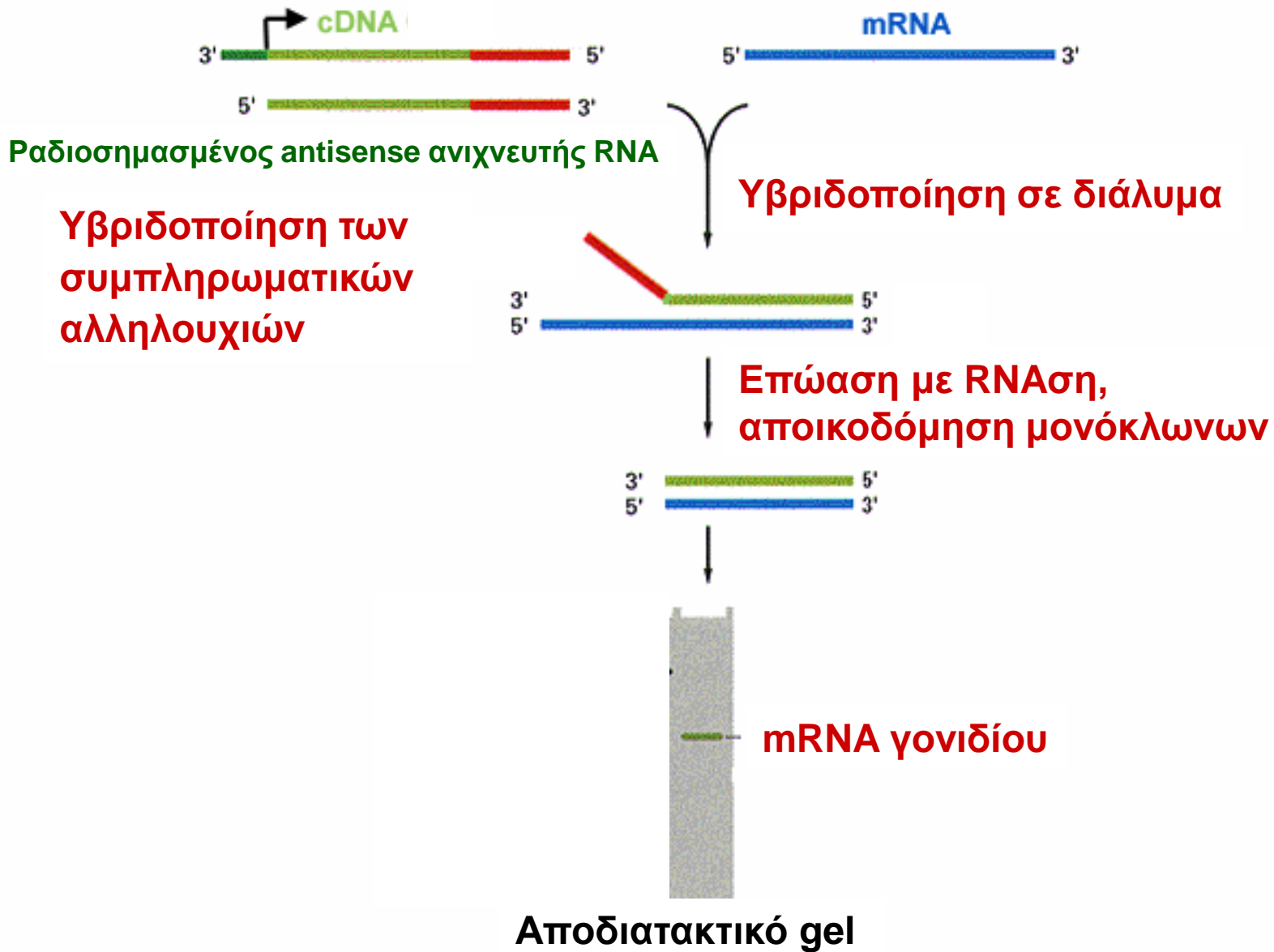


➤ PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

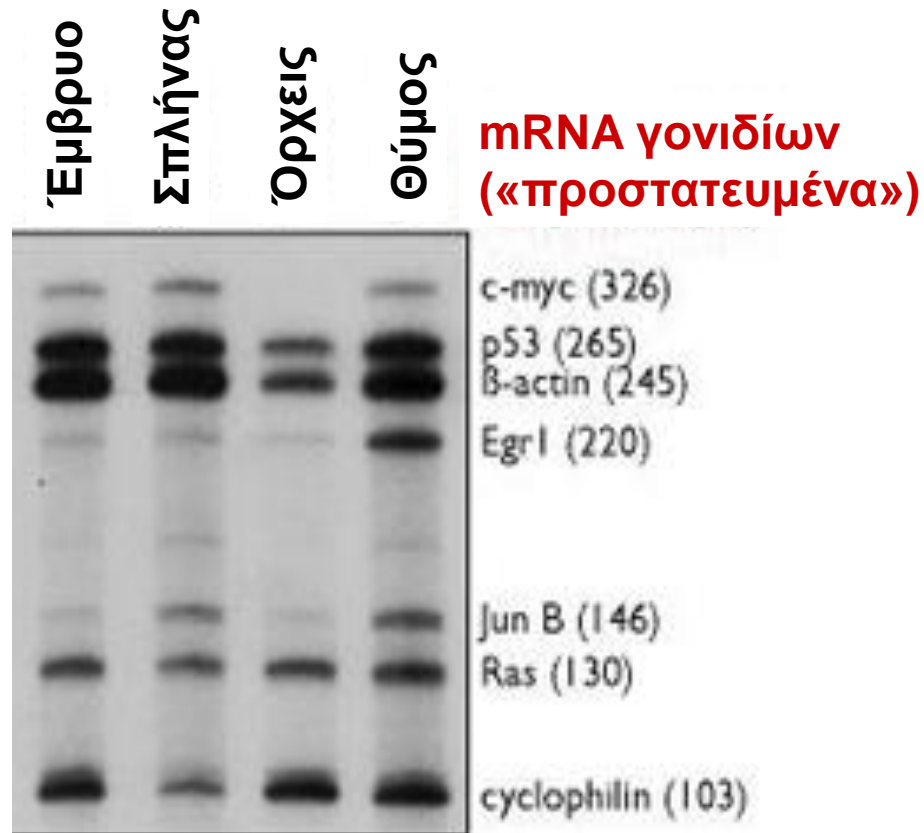
Καταγραφή του παραγόμενου προϊόντος σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης και συσχέτισμός με την αρχική αντιπροσώπευση του mRNA



3. Δοκιμή προστασίας από ριβονουκλεάση (RNase protection assay)



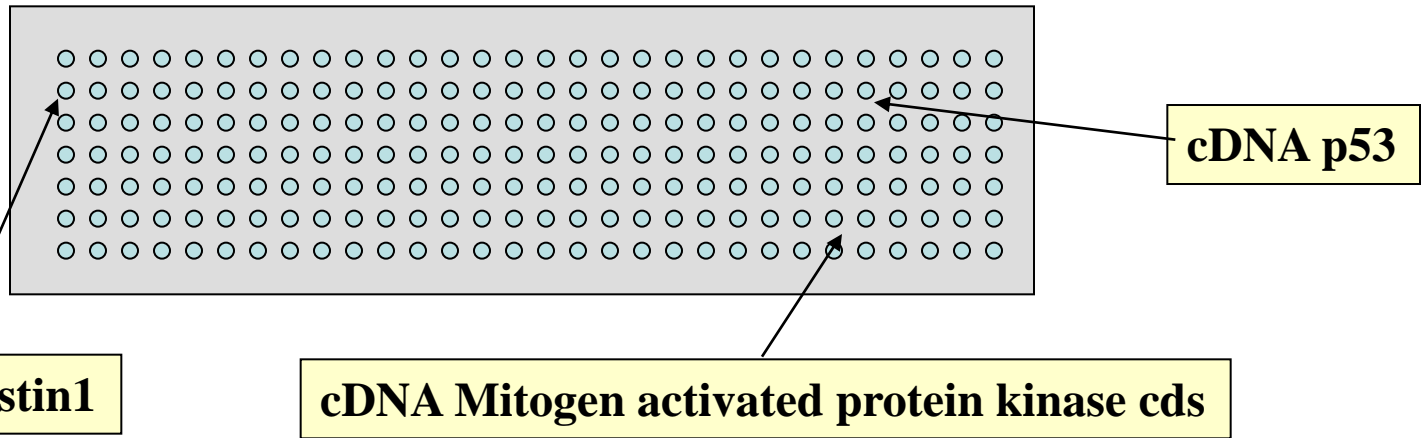
Μελέτη σχετικών επιπέδων έκφρασης 7 γονιδίων σε διάφορους ιστούς με RNase protection



4. Μικροσυστοιχίες (microarrays, chips)

Ταυτόχρονη μελέτη πολλών-διαφορετικών mRNAs

- Τι είναι μία συστοιχία;

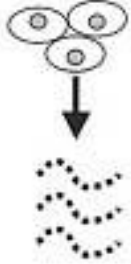


Ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (>1 για κάθε γονίδιο)

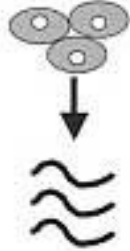


Απομόνωση RNA

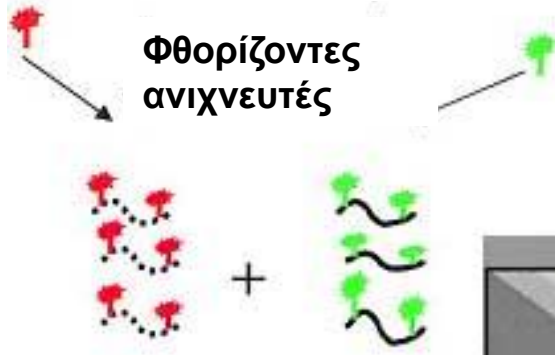
Δείγμα α



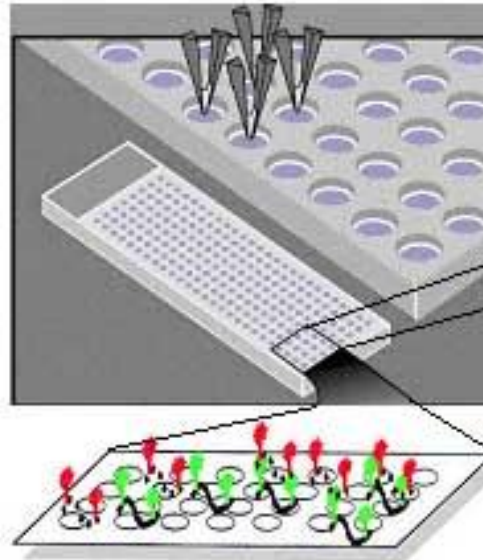
Δείγμα β



Δημιουργία cDNA Σήμανση του ανιχνευτή



Υβριδοποίηση με την συστοιχία

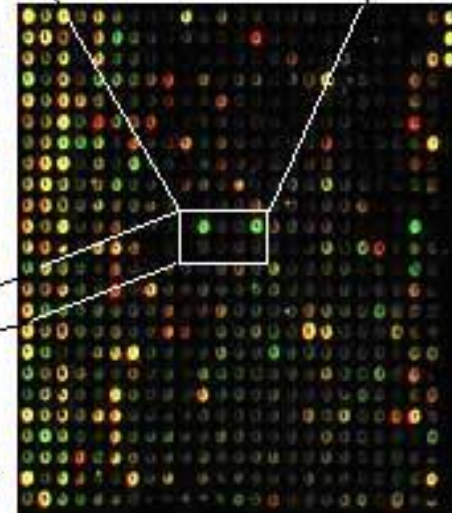
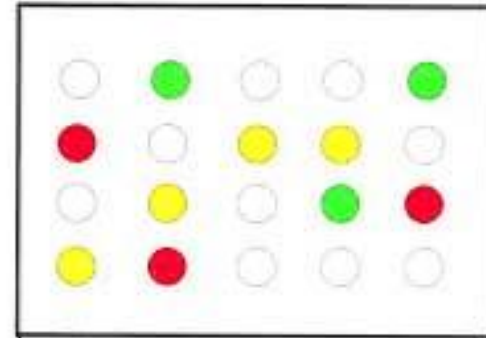


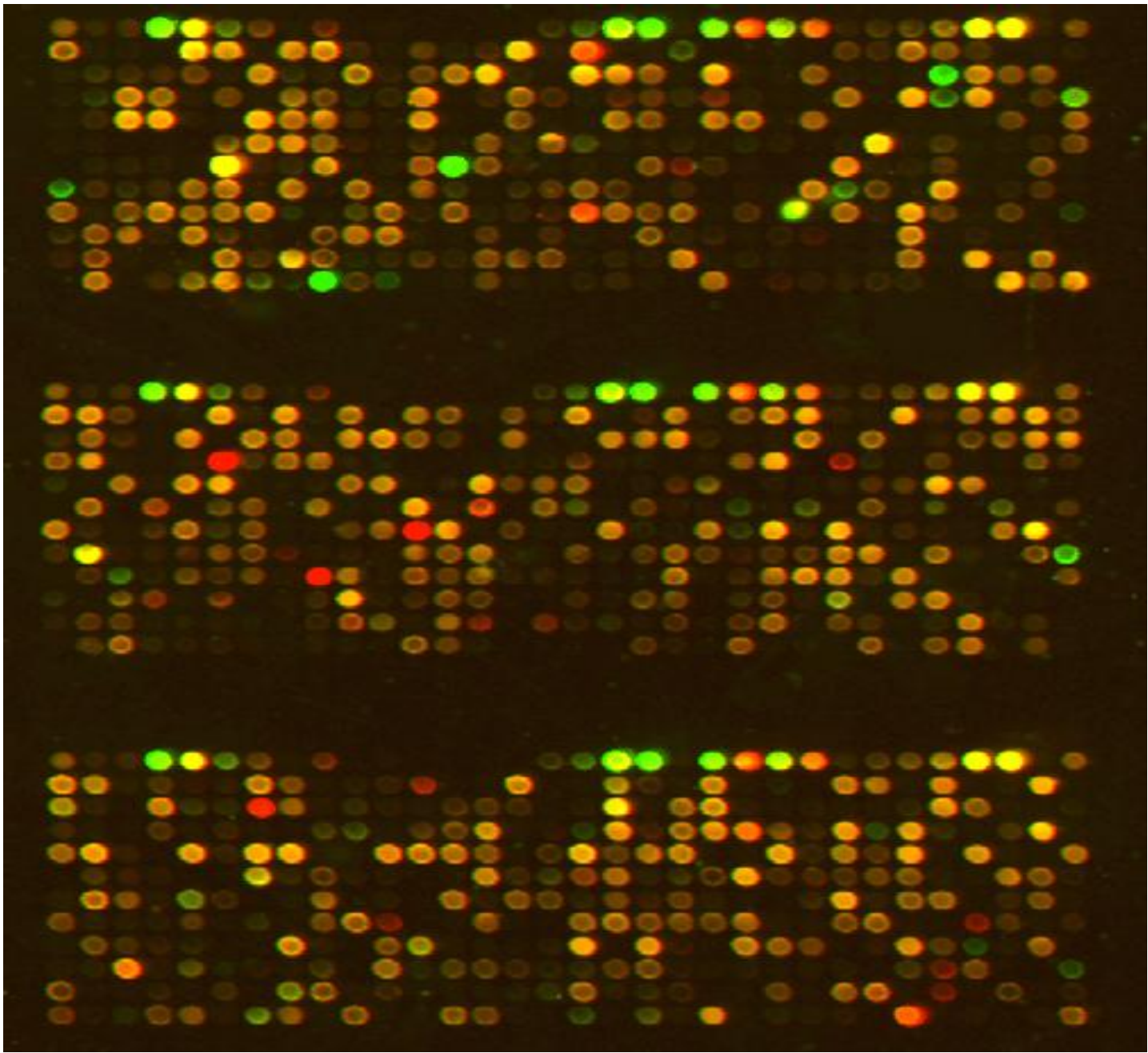
Απεικόνιση

● A > B

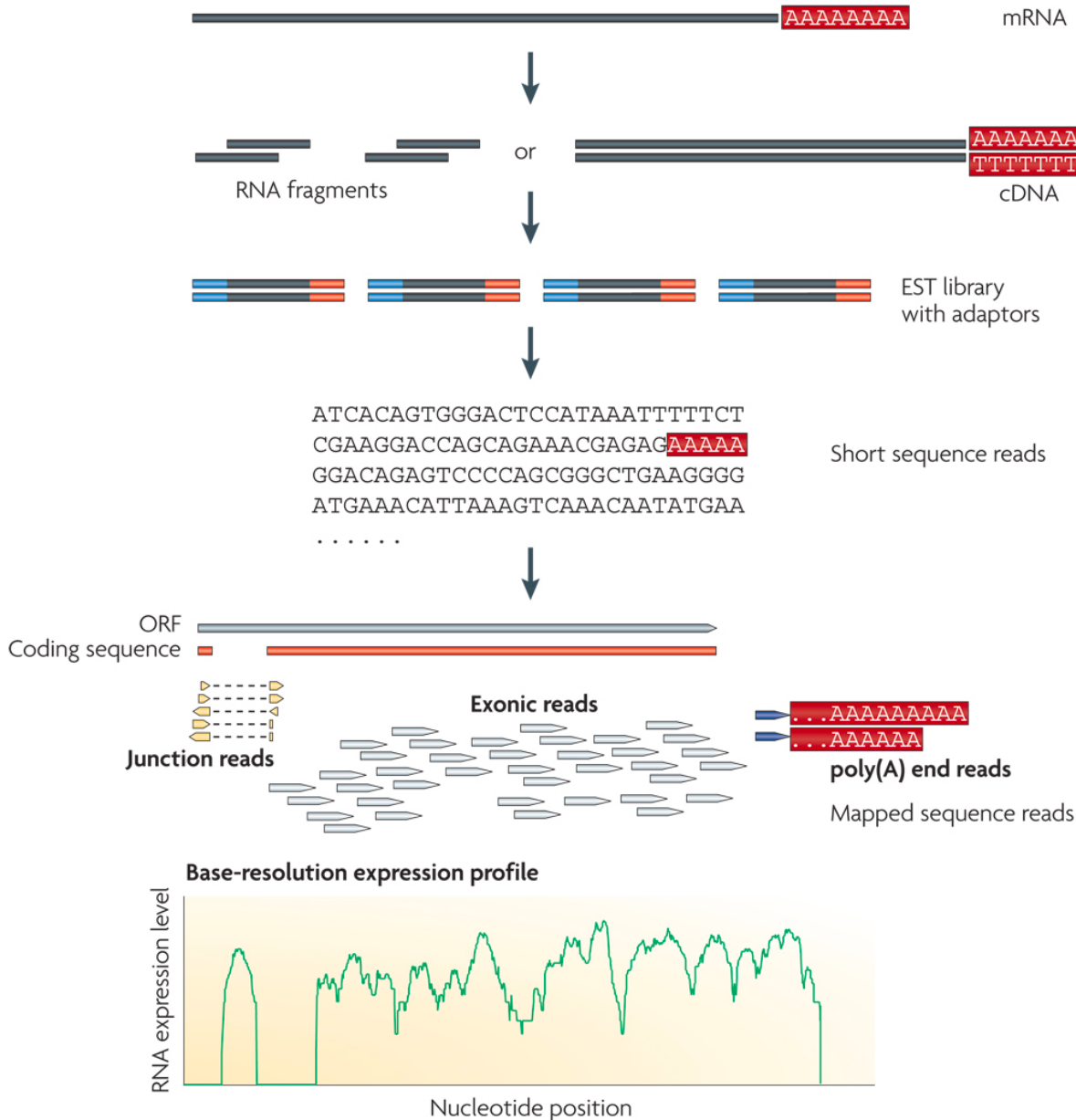
● B > A

● A = B





5. RNA sequencing



RNA (poly A+)

Βιβλιοθήκη τμημάτων cDNA με adaptors στα άκρα

Ενίσχυση (λόγω μικρής ποσότητας) με PCR

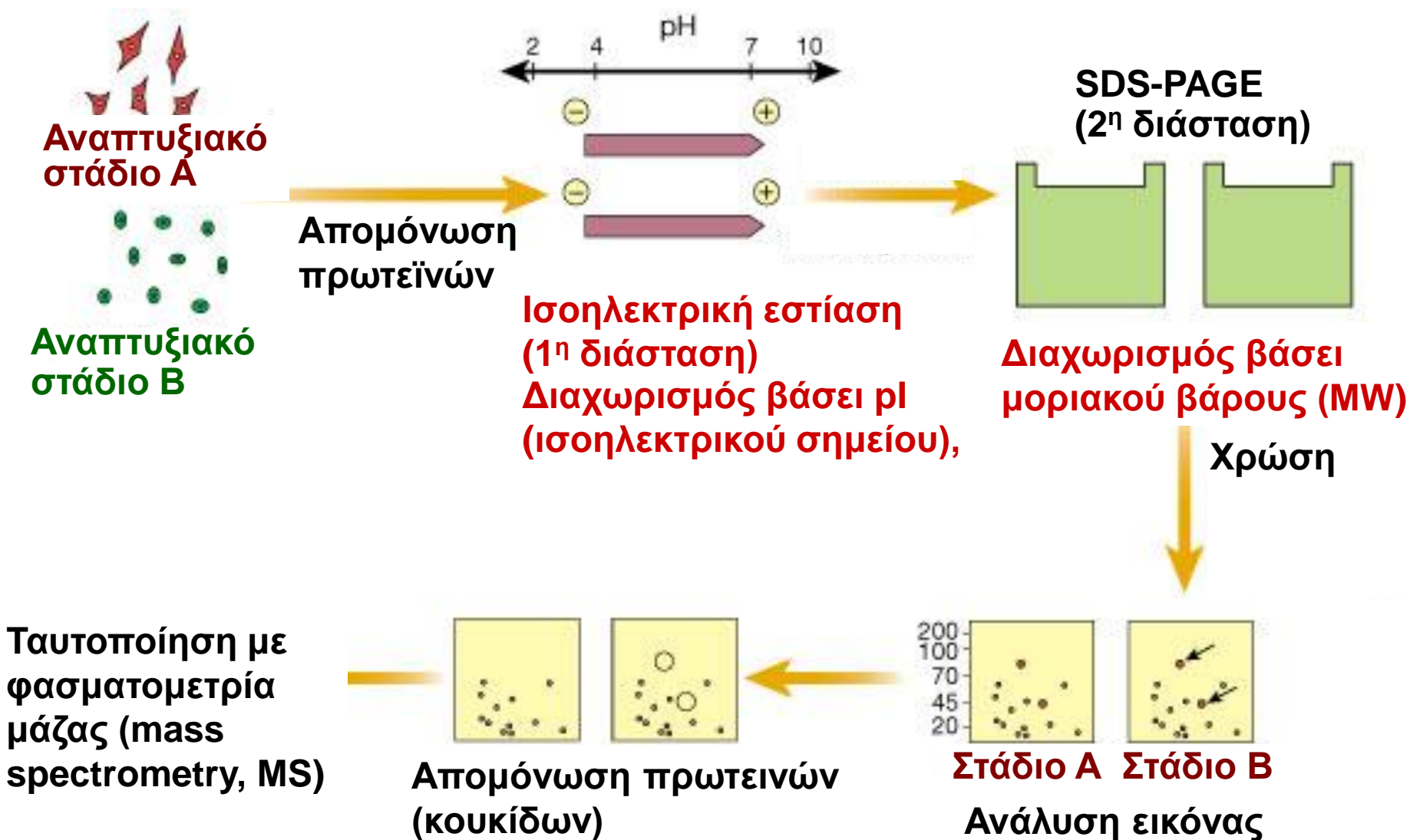
Αλληλούχηση από το ένα ή και τα δύο άκρα

Αλληλουχίες μήκους 30-400bp

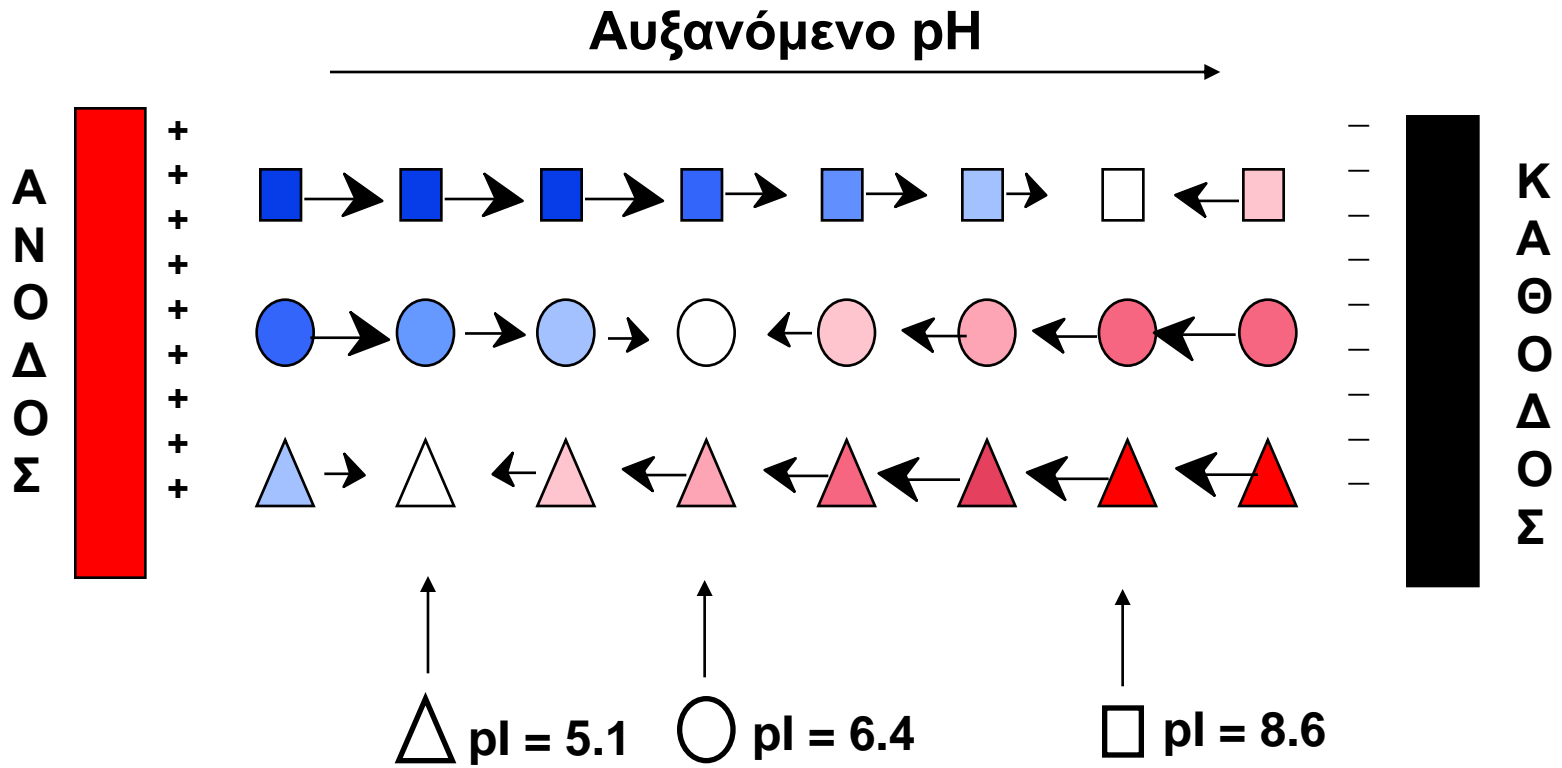
Βιοχημικές μέθοδοι για ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

Ανίχνευση πρωτεϊνών

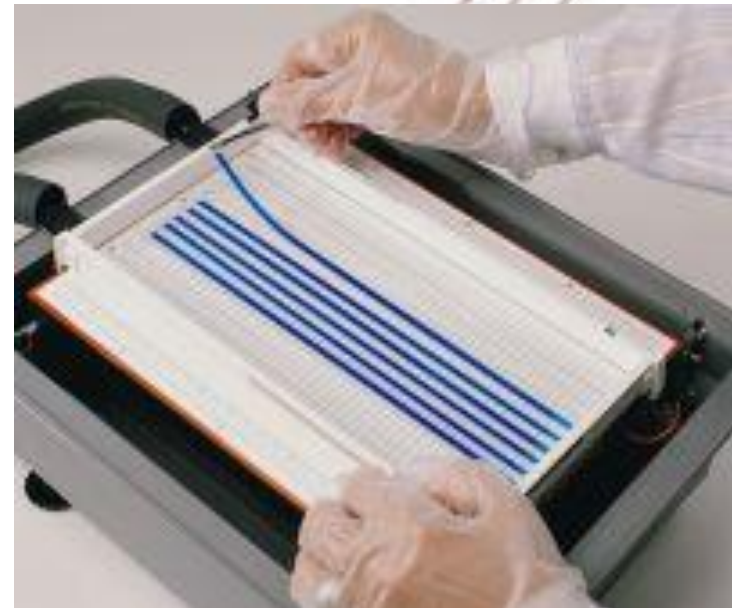
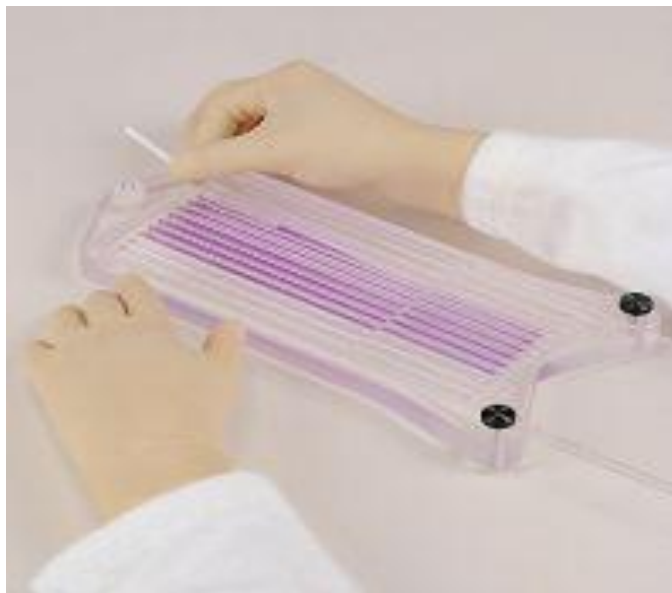
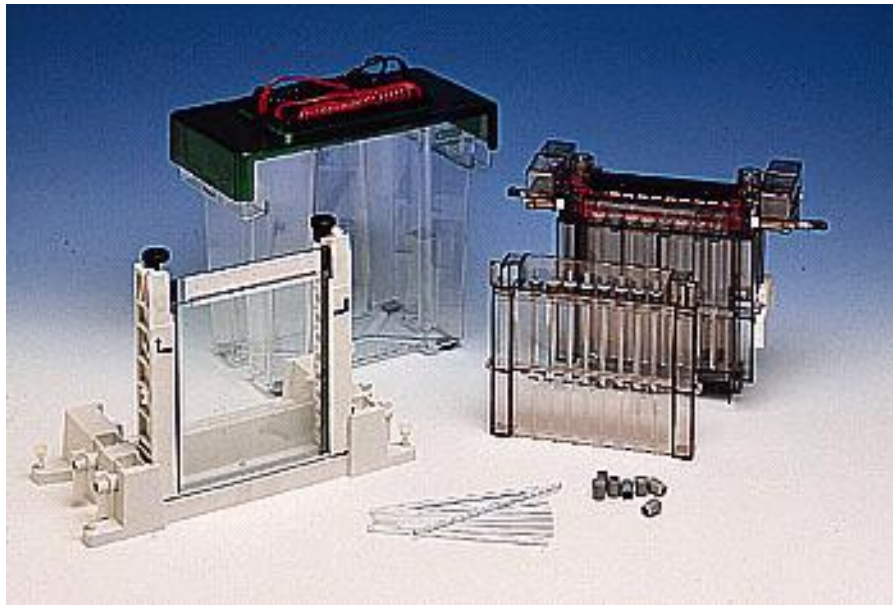
- Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D) - Πρωτεϊνωματική (proteomics)



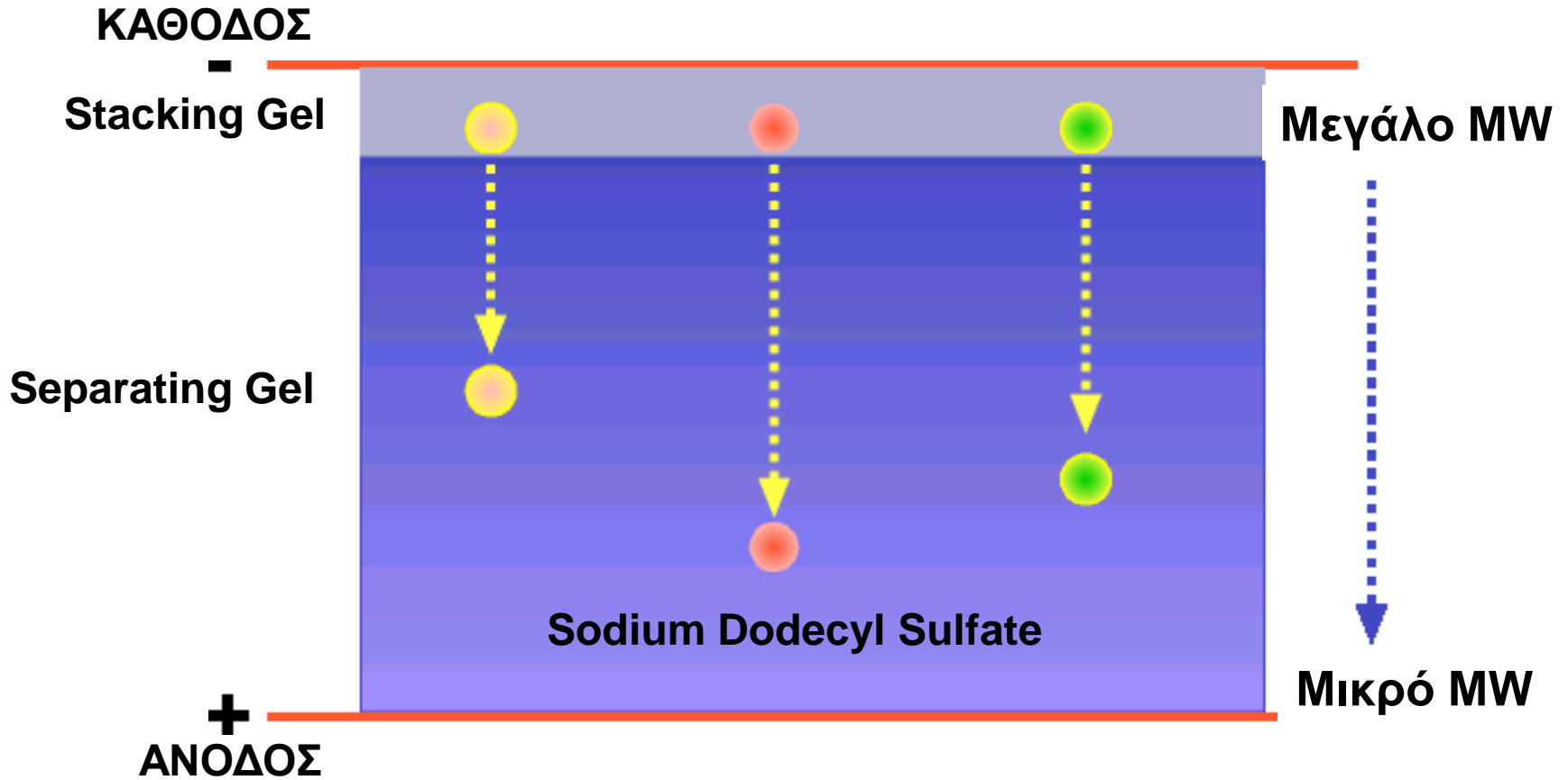
Ισοηλεκτρική εστίαση



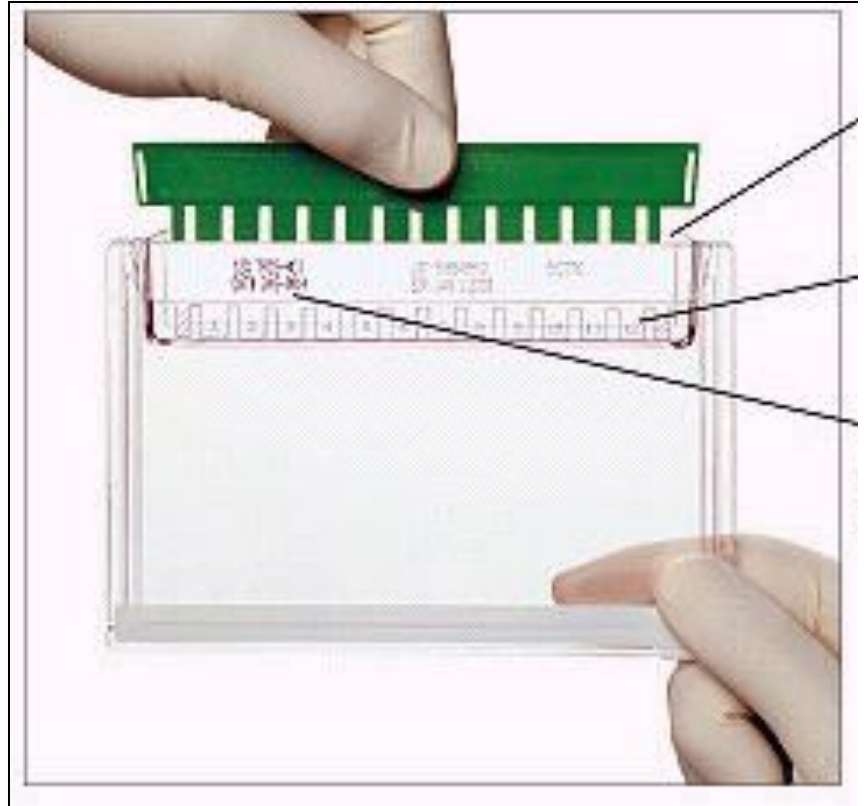
Συσκευή για ισοηλεκτρική εστίαση



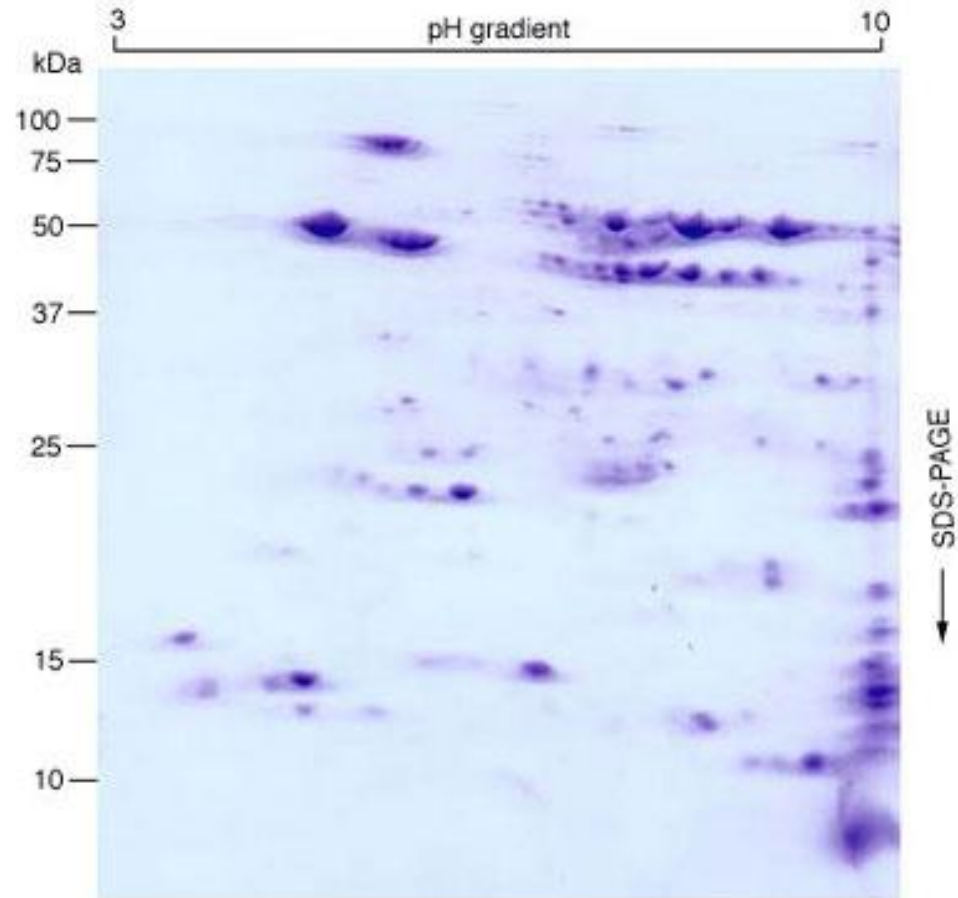
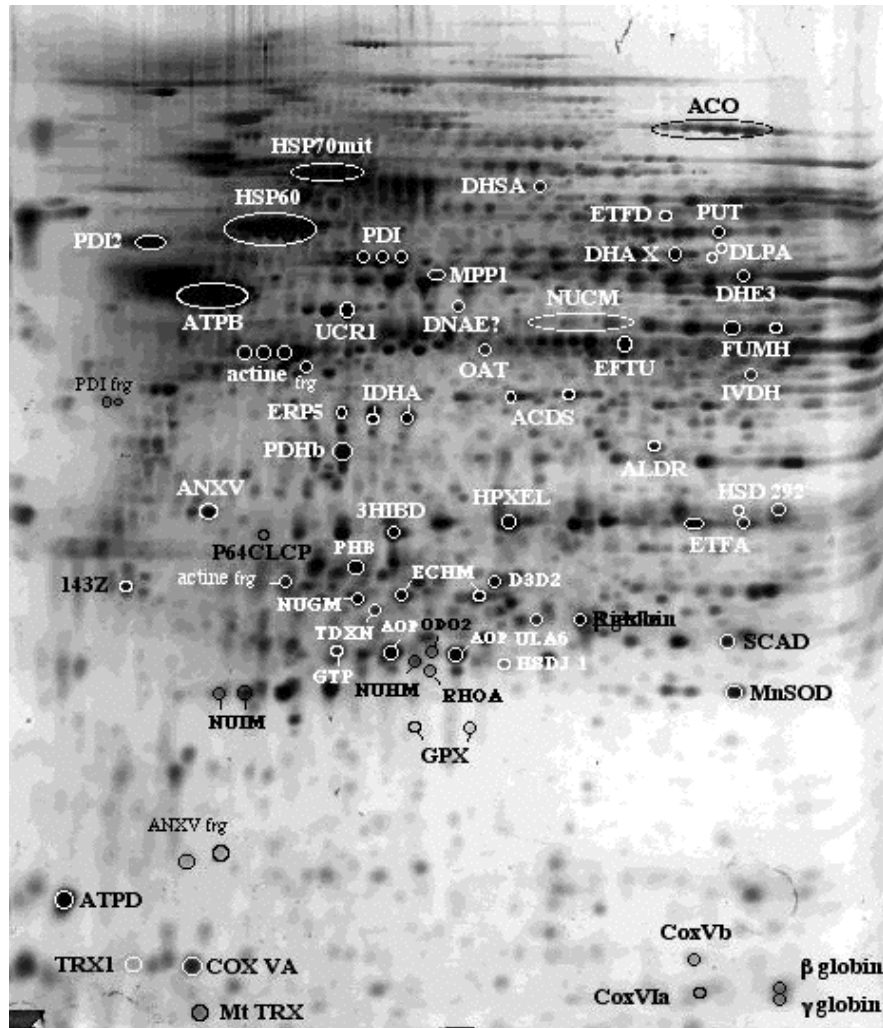
SDS-PAGE



Συσκευή για SDS-PAGE

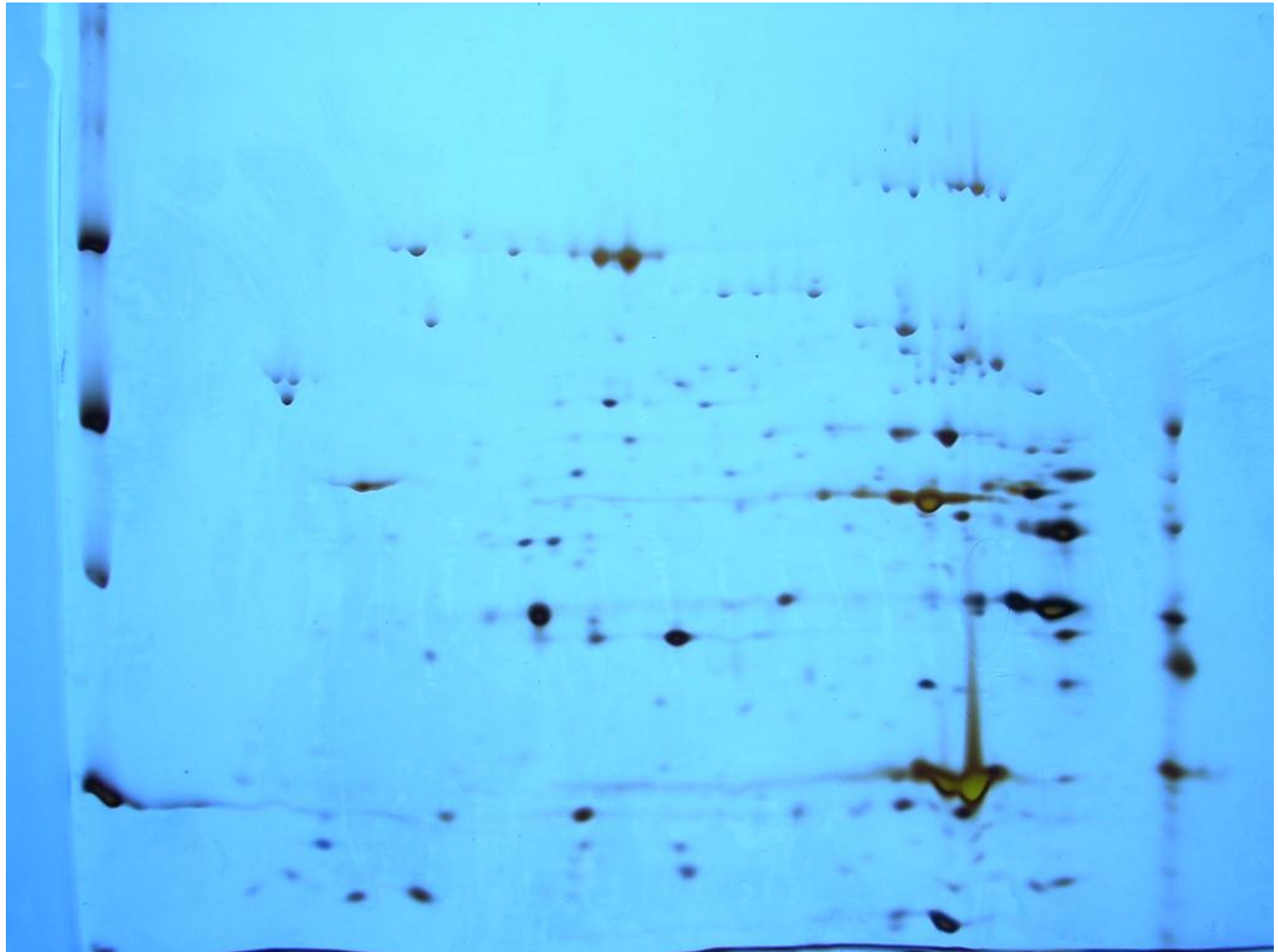


**Χρώση για ανίχνευση πρωτεϊνών: Coomassie (100 ng - 10 mg),
 Άργυρο (Silver, 1 ng -1 mg), Φθορίζουσες ουσίες (Fluorescent, >1 ng)**



Με Coomassie

**Μιτοχονδριακές πρωτεΐνες ανθρώπου
 (με άργυρο)**



Ανάλυση εικόνας

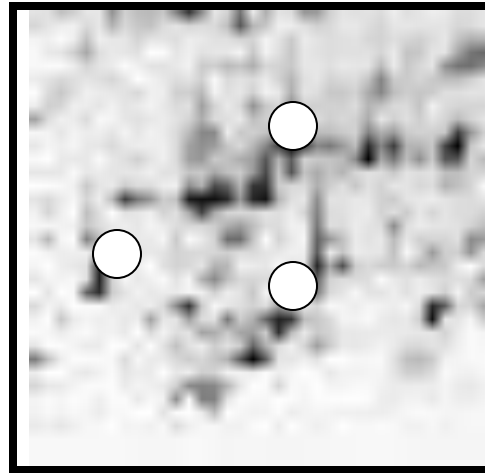
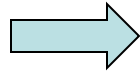


**Phosphorimager για
ραδιενεργά σημασμένα gels**



**Fluoroimager για σήμανση
με φθορίζουσες ουσίες**

Φασματομετρία μάζας

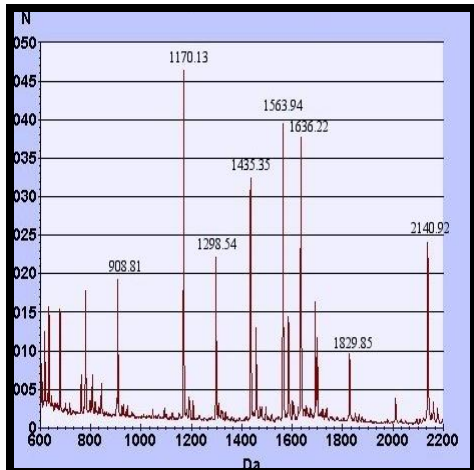
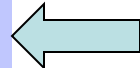


↓
ΠΕΠΤΙΔΙΑ

↓
**Διαχωρισμός με πρώτο κύκλο
φασματομετρίας και διάσπασή
τους με ιονικό βομβαρδισμό**

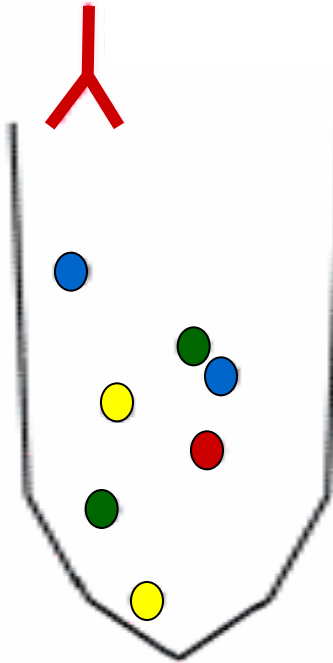
↓
**Διαχωρισμός θραυσμάτων με
δεύτερο κύκλο φασματομετρίας**

↓
**Ταυτοποίηση αμινοξικής
αλληλουχίας βάσει του προτύπου
θραυσμάτων κάθε πεπτιδίου**

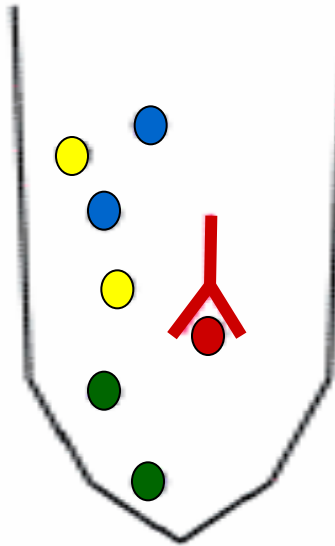


Ανοσοκατακρήμιση (Immunoprecipitation IP)

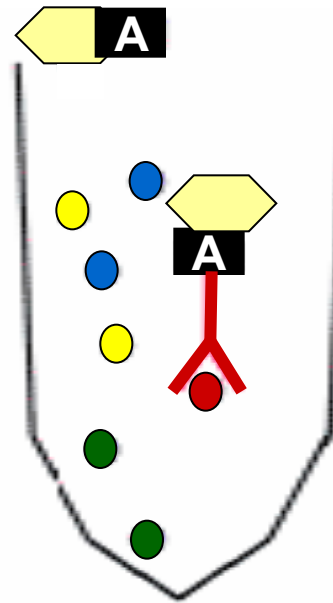
Προσθήκη αντισώματος που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη υπό μελέτη



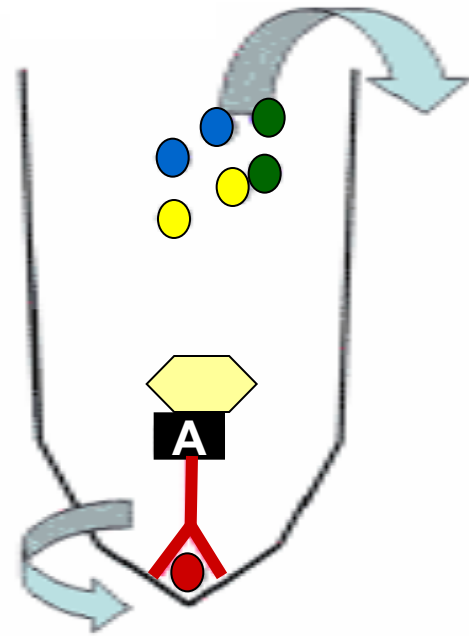
Σύνδεση αντισώματος



Προσθήκη πρωτεΐνης A ή G συζευγμένης με αγαρόζη



Φυγοκέντρηση, απομόνωση συμπλόκου, απομάκρυνση υπερκείμενου, εκπλύσεις

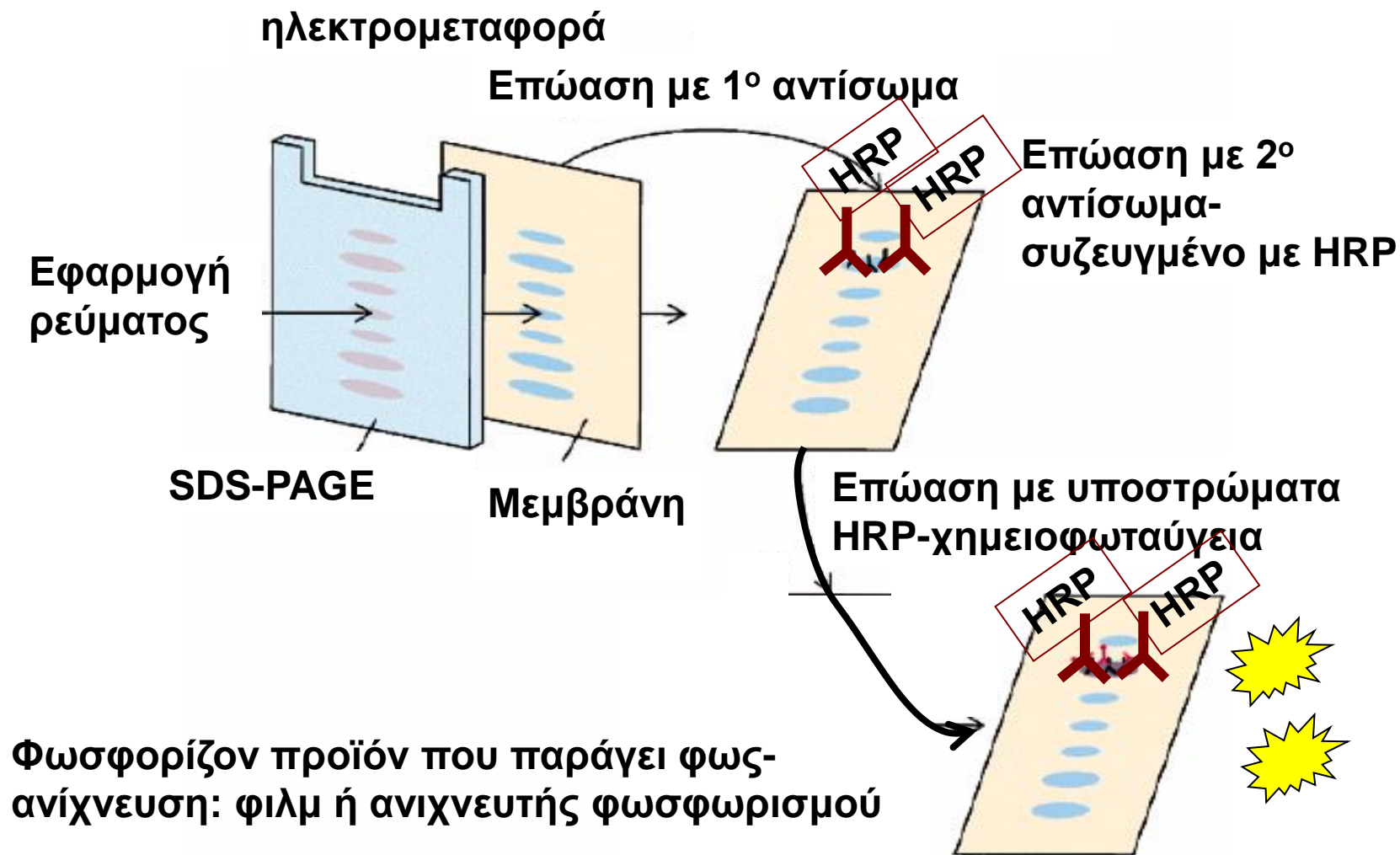


Βρασμός δείγματος και SDS-PAGE

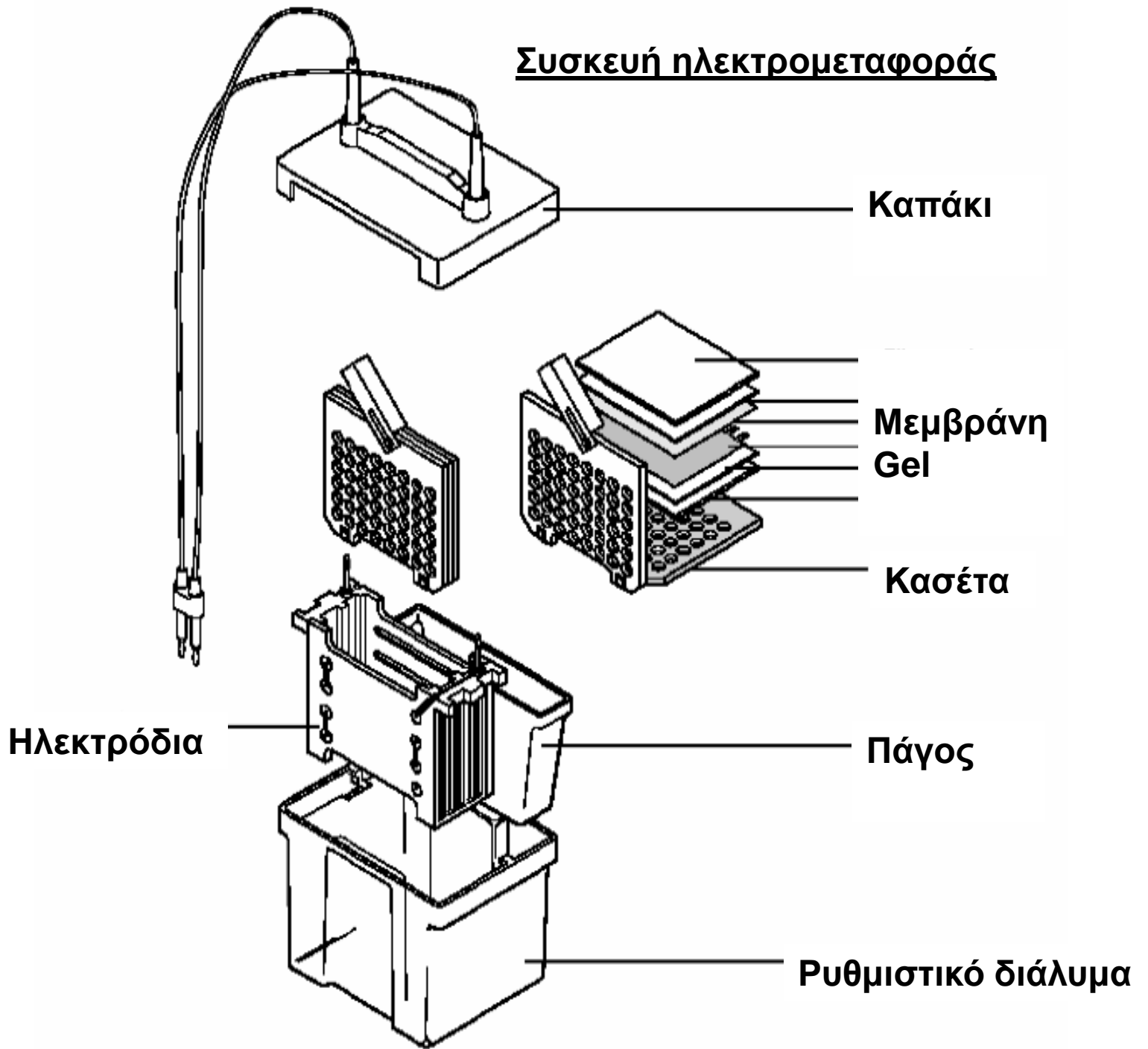
(& συν-ανοσοκατακρήμιση)

Ταυτοποίηση

•Με Western blot



Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς



Σε ποιους ιστούς/αναπτυξιακά στάδια εκφράζεται το υπό μελέτη γονίδιο;

Γονίδια αναφοράς (Reporter genes)

Υποκινητής **Γονίδιο αναφοράς** (lacZ, GFP, luciferase, CAT)

↓
Εισαγωγή σε έμβρυα (διαγονίδιο)

↓
Ανίχνευση

↙ ↘
Βιοχημικές μέθοδοι In situ μέθοδοι

Παρακολούθηση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου

Υποκινητής **Γονίδιο αναφοράς**

Γονίδιο αναφοράς

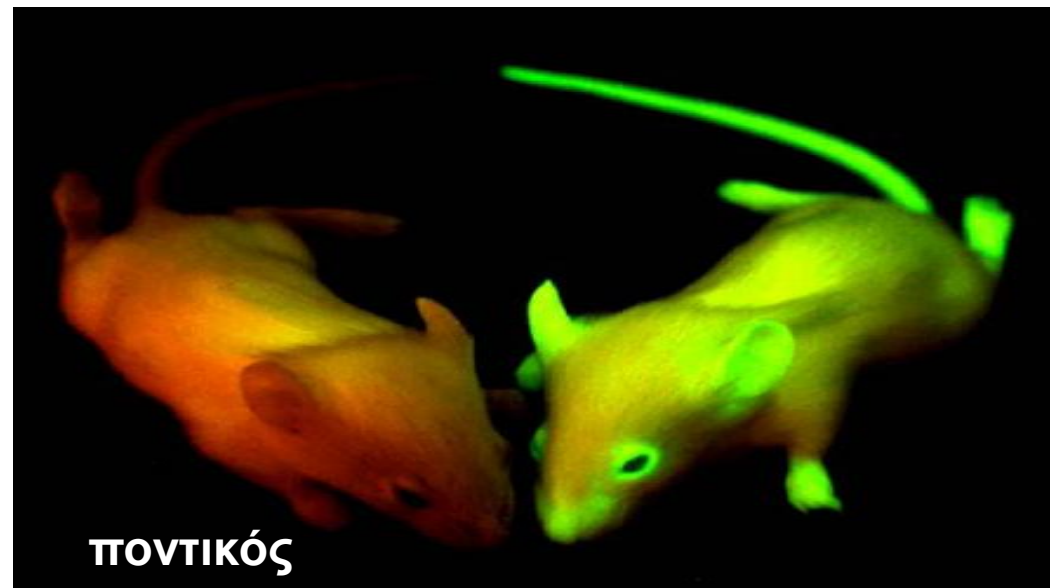
Γονίδιο αναφοράς

Γονίδιο αναφοράς

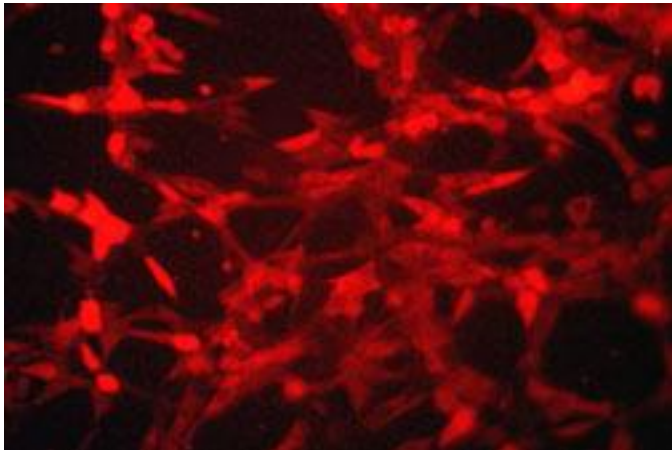
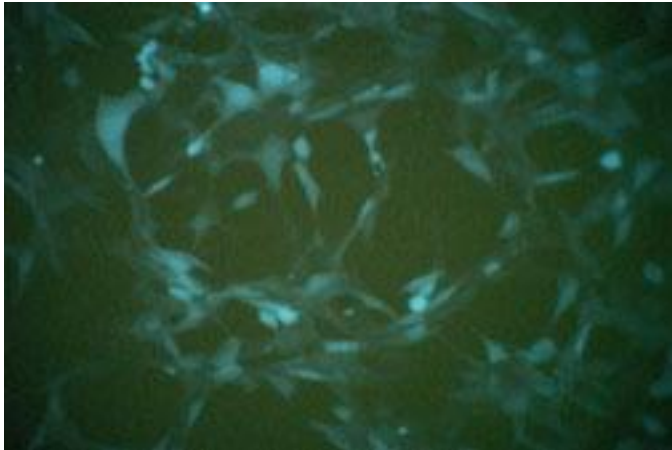
} Εισαγωγή τμημάτων της ρυθμιστικής περιοχής

•GFP (Green Fluorescent Protein)

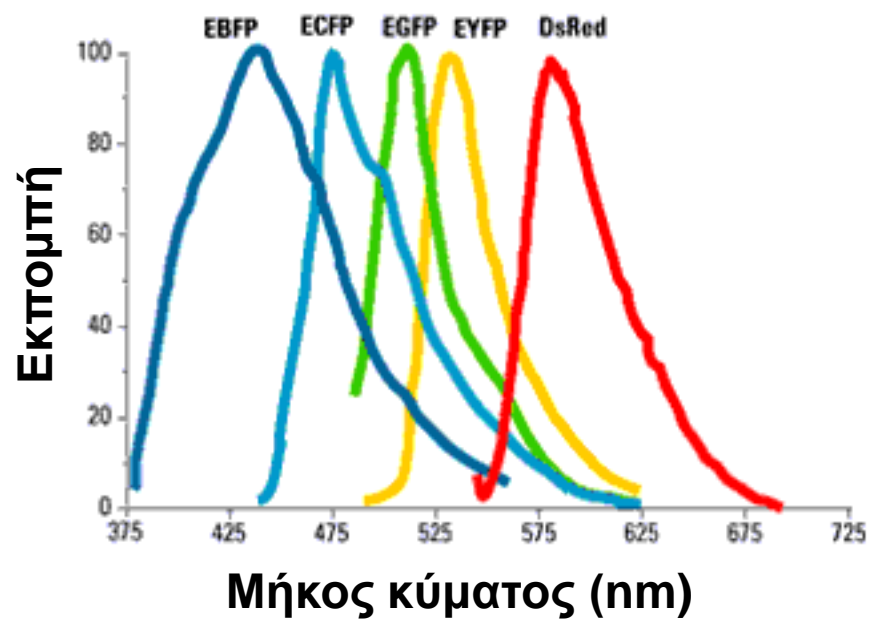
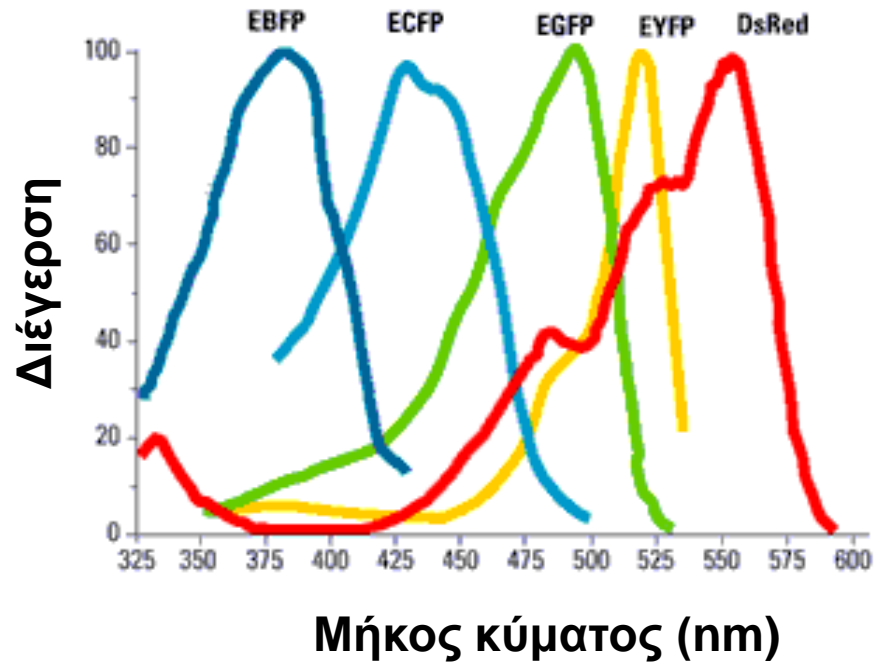
Δυνατή η ανίχνευση σε ζωντανά δείγματα *in vivo*



& μεταλλαγμένα παράγωγα



IacZ, GFP: παραμένουν ενεργές και σε σύντηξη με άλλες πρωτεΐνες



• **lacZ (β-γαλακτοσιδάση)**

Γονίδιο Z οπερονίου *lac* της *E.coli*

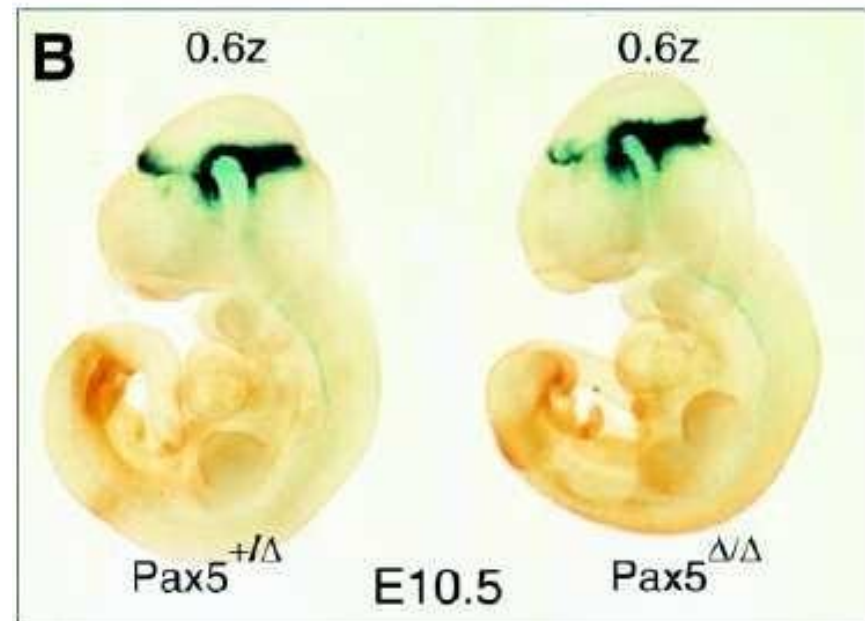
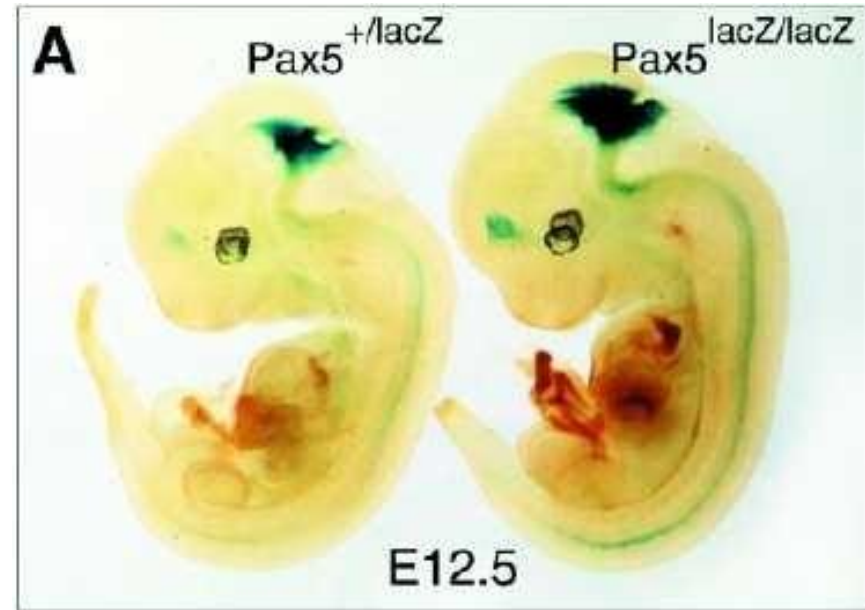
Υποκινητής Pax5

lacZ

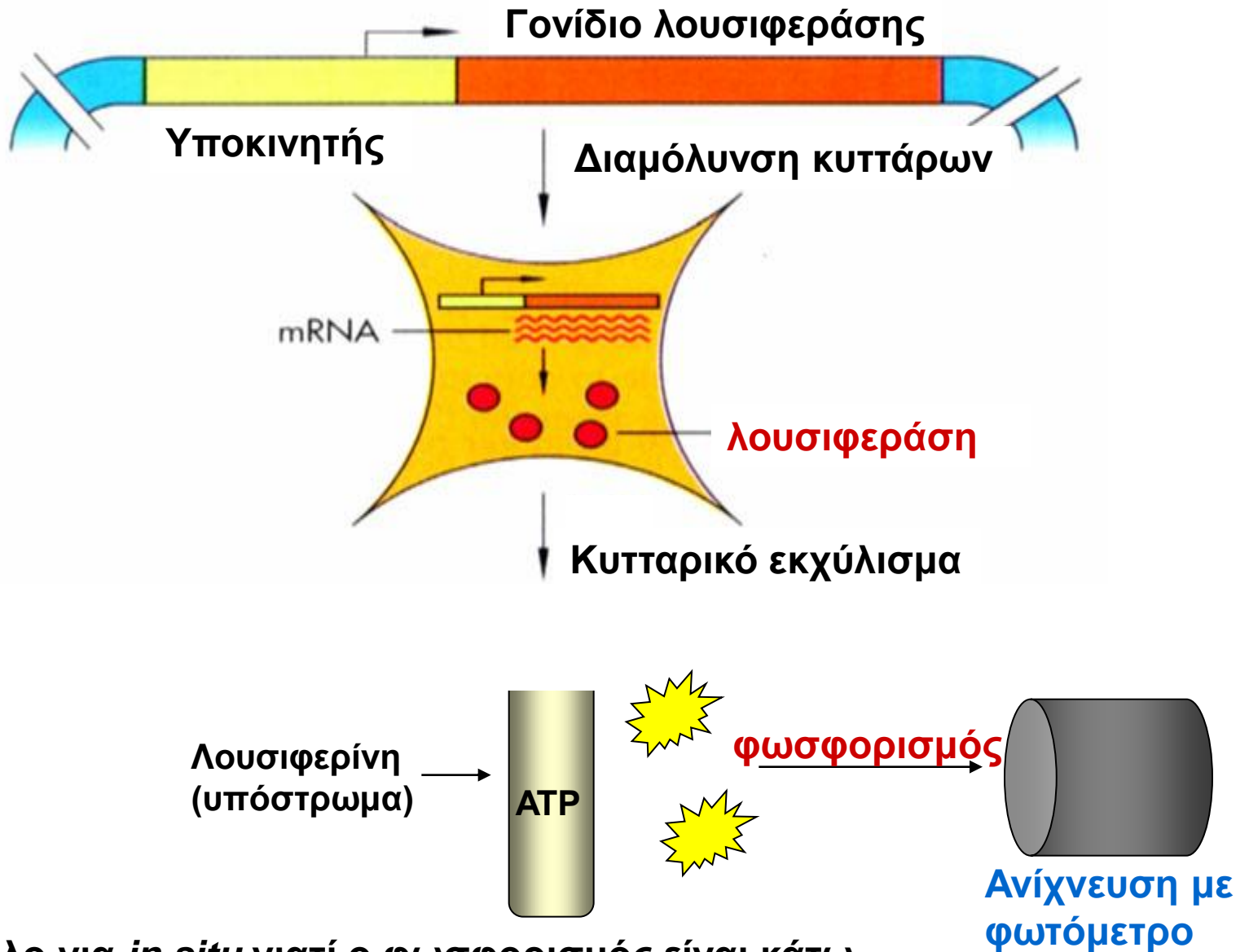
X-gal (υπόστρωμα)

↓ lacZ (ένζυμο)

Έγχρωμο προϊόν

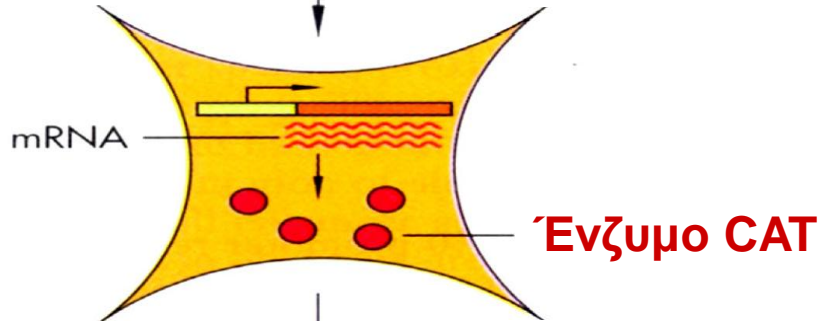
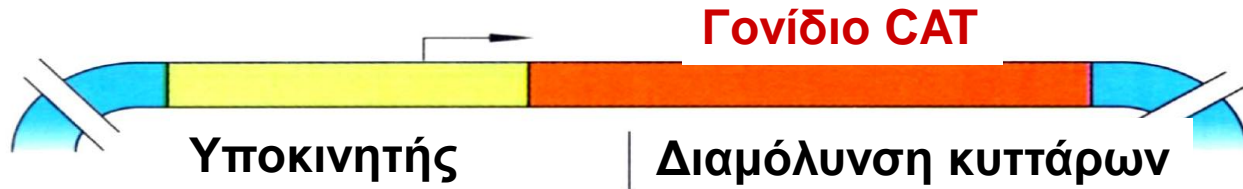


- **Λουσιφεράση (Luciferase)**



- Ακατάλληλο για *in situ* γιατί ο φωσφορισμός είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης φωτογραφικών μηχανών CCD

• **Ακετυλο-τρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης (CAT)**



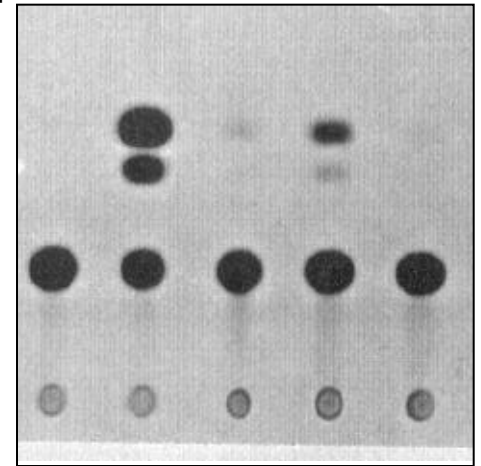
Κυτταρικό εκχύλισμα

Προσθήκη ^{14}C
χλωραμφαινικόλης
& ακετυλ-CoA

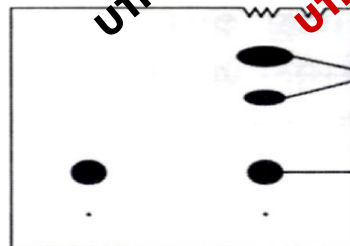


Ανενεργός
υποκινητής

Ενεργός
υποκινητής



Ανάλυση με
χρωματογραφία
λεπτής στοιβάδας &
αυτοραδιογραφία

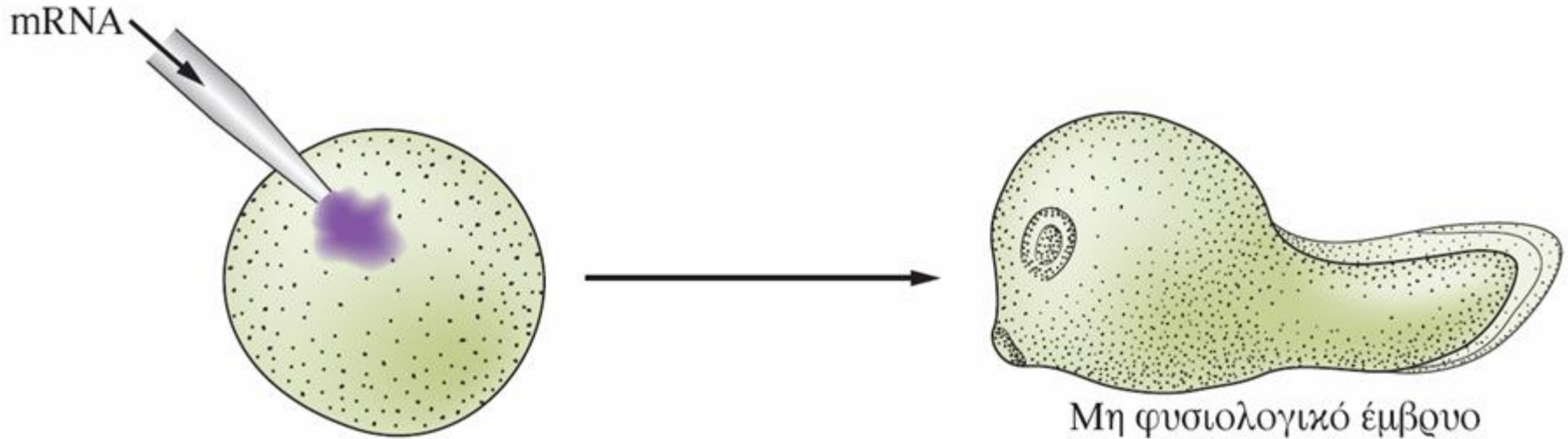


Ακετυλιωμένη χλωραμφαινικόλη

Χλωραμφαινικόλη

Ποιο είναι το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης μίας πρωτεΐνης στην ανάπτυξη του εμβρύου;

Χενοpus



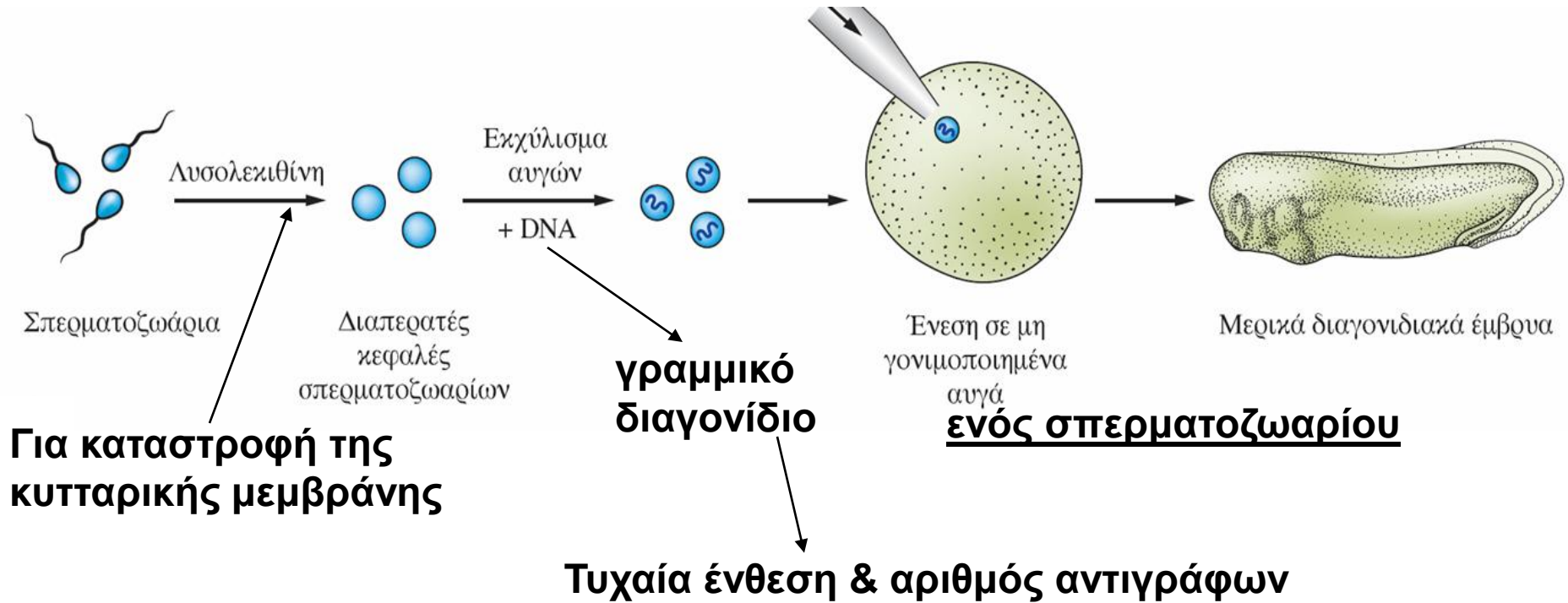
Ένεση mRNA στο ζυγωτό ή σε συγκεκριμένο βλαστομερίδιο
(Απλή ή ένεση υλικών σε έμβρυα Χενοpus)

* Κατάλληλο για μελέτη πρώιμων σταδίων λόγω αποικοδόμησης του mRNA (έως mid-blastula)

Αν επιθυμούμε την σταθερή έκφραση του γονιδιακού προϊόντος;

Διαγονιδιακά ζώα-*Xenopus* (Kroll & Amaya, 1996)

Το εξωγενές DNA δεν ενσωματώνεται στο ζυγωτικό γονιδίωμα

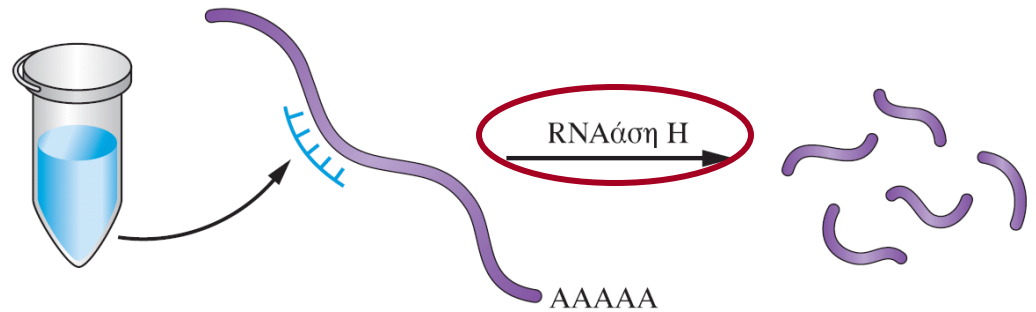
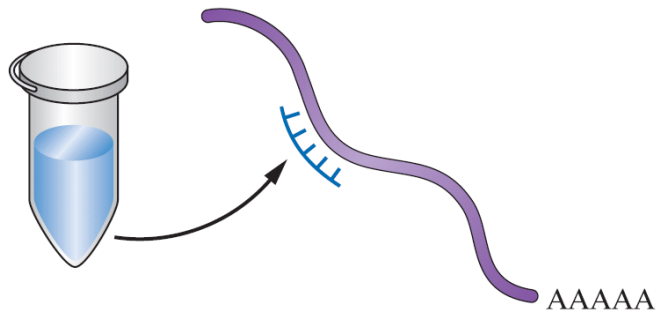


- Το διαγονίδιο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα πριν τη γονιμοποίηση και έτσι τα έμβρυα που σχηματίζονται δεν είναι χιμαιρικά

Αν επιθυμούμε την καταστολή ενός γονιδιακού προϊόντος;

Ένεση σε γονιμοποιημένα ωάρια

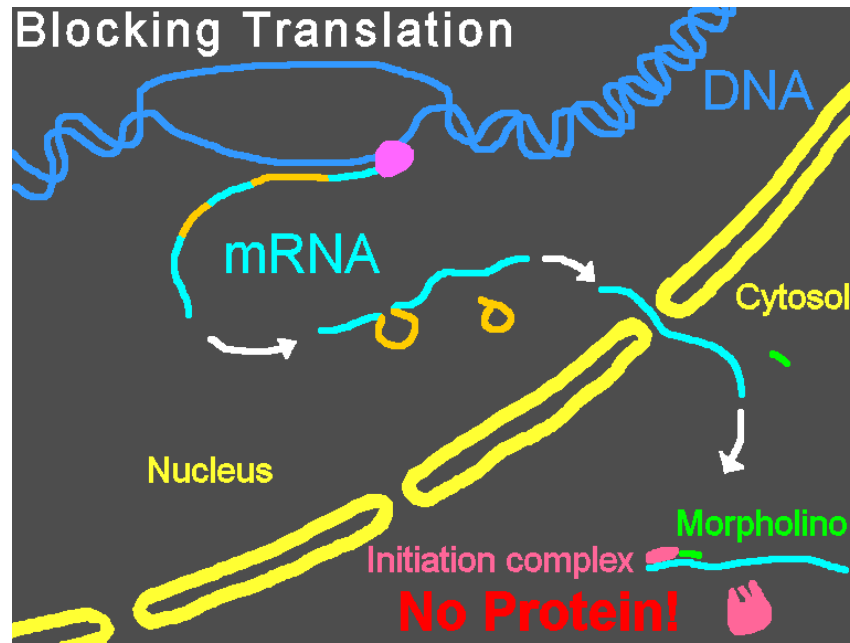
Ένεση σε ωοκύτταρο **Xenopus**

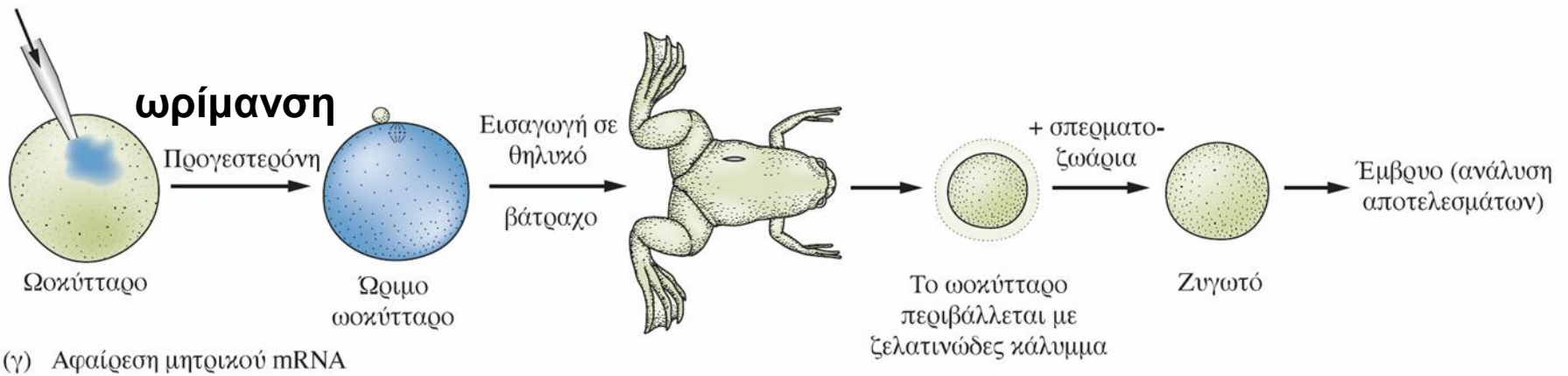
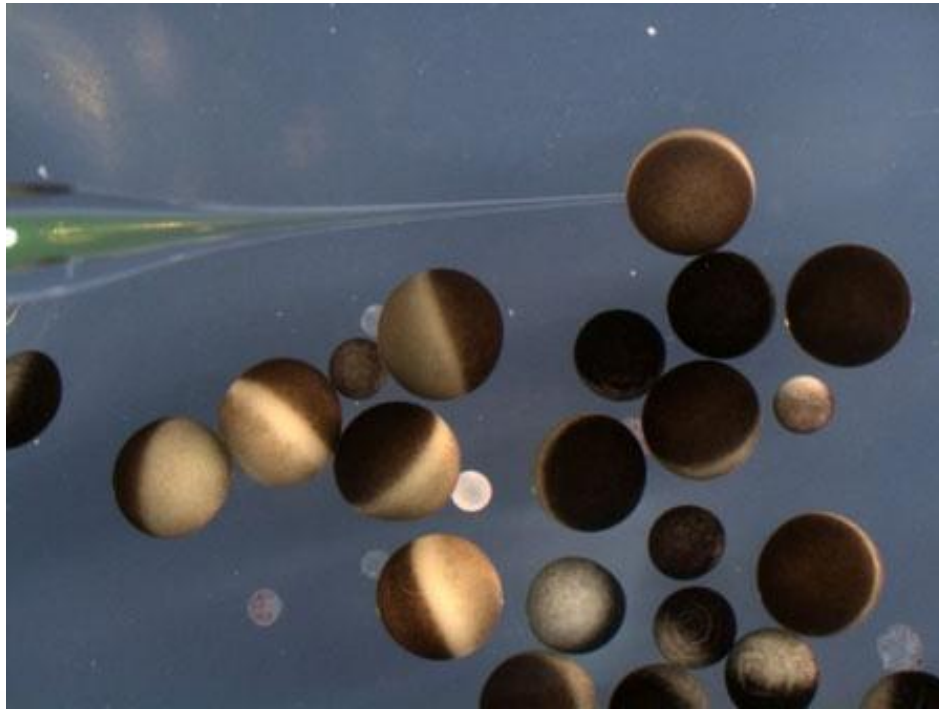


(α) Αντισημαίνον ολιγονουκλεοτίδιο μορφολίνης - εμποδίζει τη μετάφραση

(β) Αντισημαίνον δεσοξυ-ολιγονουκλεοτίδιο

Ανάλογα νουκλεοτιδίων





C. Wylie^{1,2}, M. Kofron¹, C. Payne¹, R. Anderson¹, M. Hosobuchi⁴, E. Joseph⁴ and J. Heasman^{1,3}

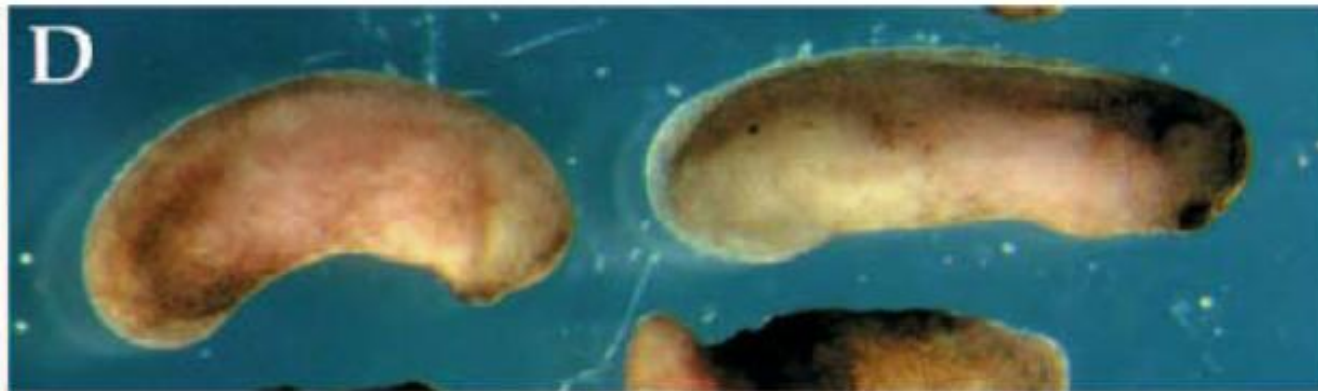
Maternal β -catenin establishes a 'dorsal signal' in early *Xenopus* embryos

Development 122, 2967-2996 (1996)

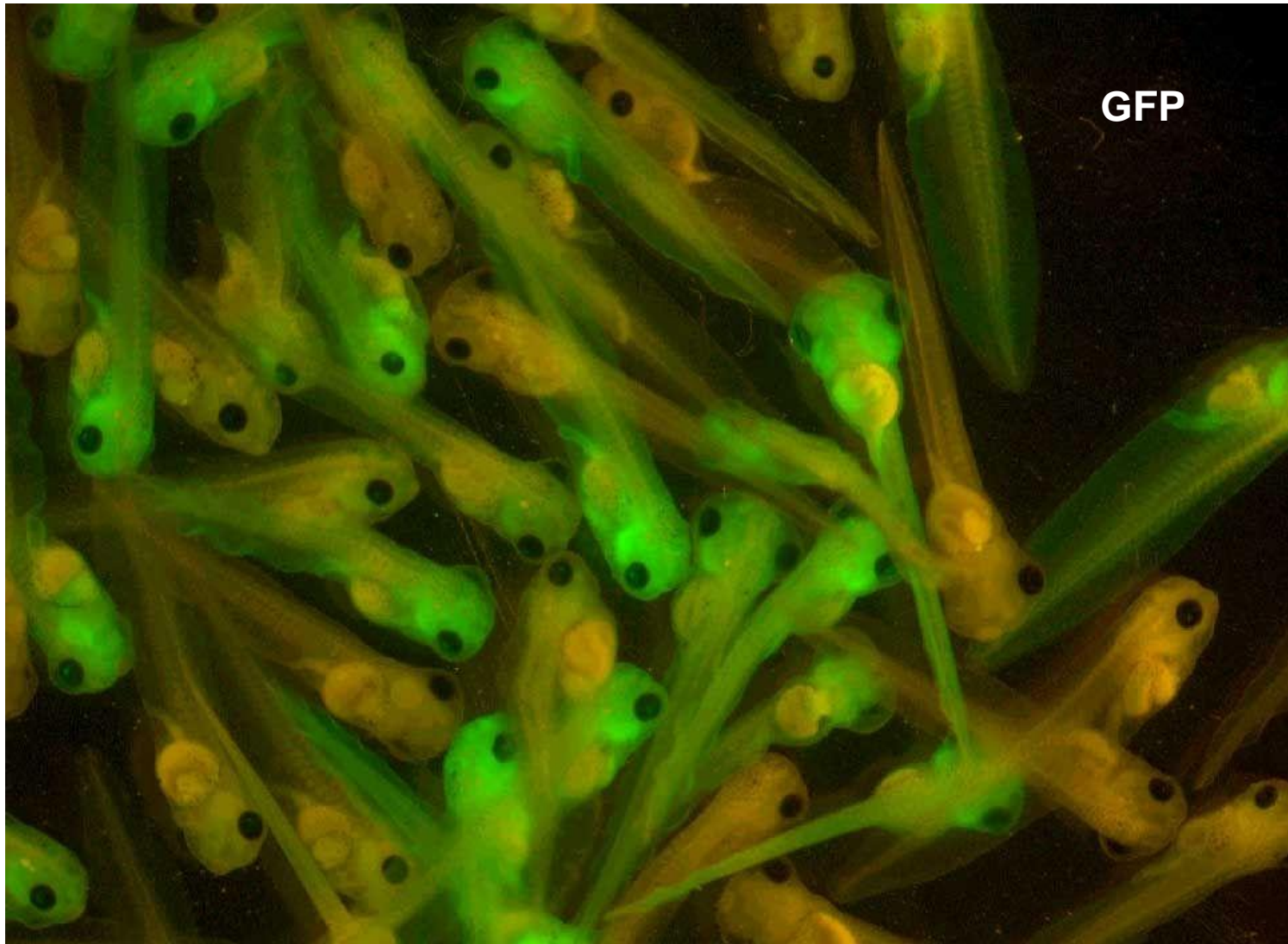
β -catenin depleted embryos



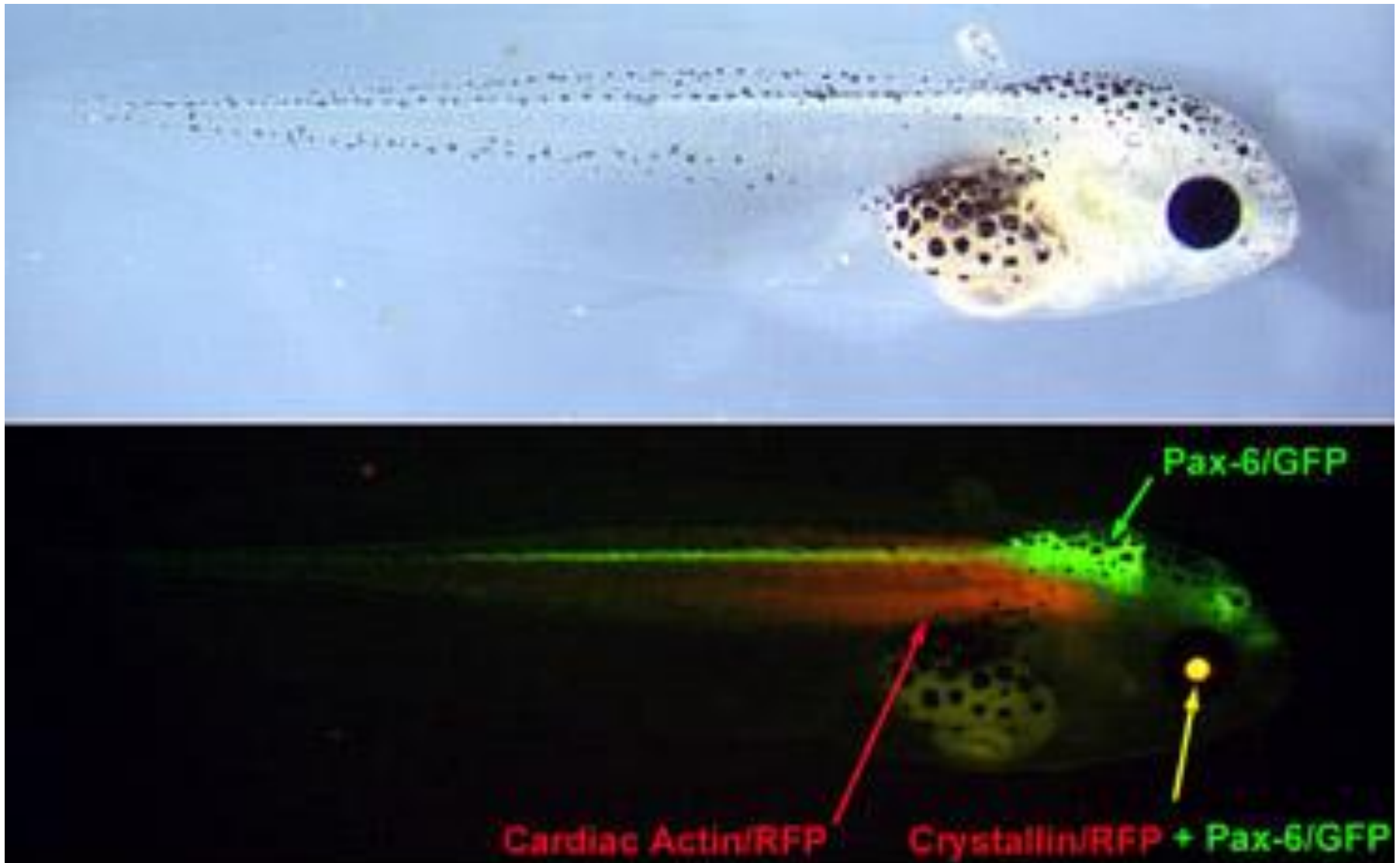
Rescue with injected β -catenin mRNA



Διαγονιδιακά ζώα-Χενopus



Διαγονιδιακοί γυρίνοι (πράσινοι) για γονίδιο που παράγει GFP (οι κίτρινοι δεν είναι διαγονιδιακοί). Η εικόνα είναι 4 μέρες μετά τη γονιμοποίηση και οι γυρίνοι είναι ~ 1cm.



Διαγονιδιακός γυρίνος *Xenopus tropicalis*: εκφράζει GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή Pax-6 (ΚΝΣ και μάτι), RFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή της καρδιακής ακτίνης (αναπτυσσόμενος μυς) και RFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή της γ-κρυσταλλίνης (στον φακό: κόκκινο+πράσινο=κίτρινο).

Έχει το γονίδιο X ρόλο στην ανάπτυξη?

Διαγονιδιακός Χενopus που υπερεκφράζει συστατικά (constitutively) τον Type I activin receptor (ALK4)



αναπτύσσει εκτοπικά ραχιαίο άξονα

Διαγονιδιακός Χεπορις που υπερεκφράζει το BMP4



control



**Σχηματίζει εκτοπικά
κοιλιακές δομές**



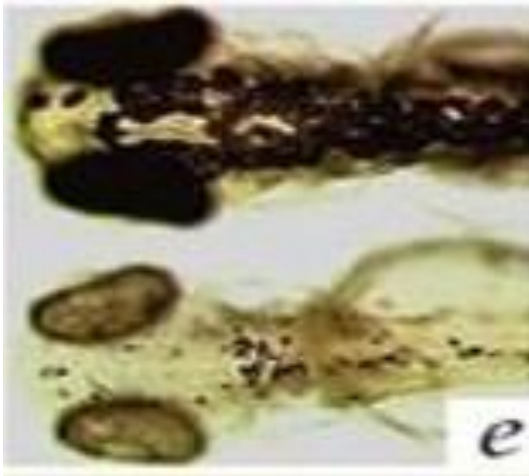
Ανάλυση συμπληρωματικότητας (complementation analysis)

Διασταυρώσεις ετερόζυγων ατόμων για να διαπιστωθεί αν μεταλλάγματα με παρόμοιους φαινοτύπους οφείλονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου

- Όλοι οι απόγονοι φυσιολογικοί αν είναι μεταλλαγές σε διαφορετικά γονίδια**
- 25% των απογόνων με παθολογικό φαινότυπο αν είναι αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου**

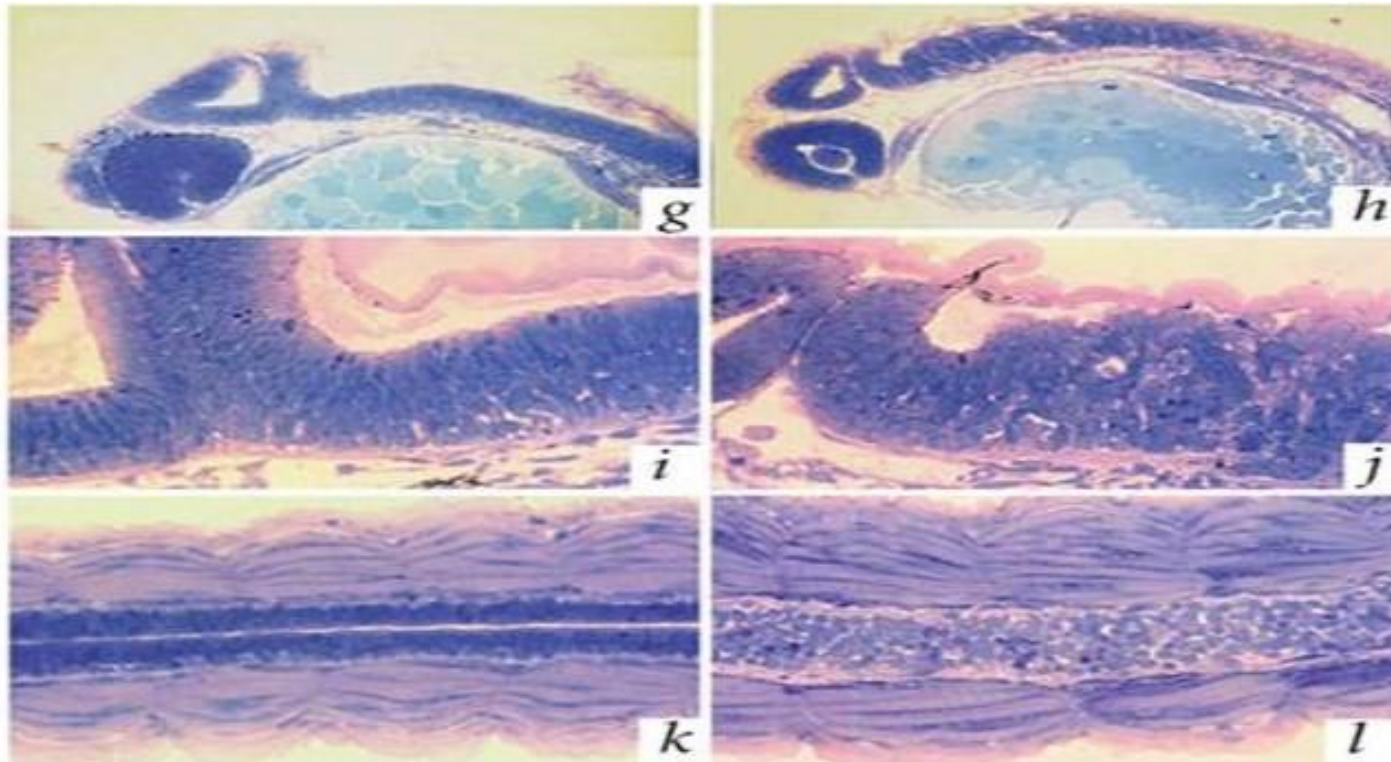


**Γενετική χαρτογράφηση και κλωνοποίηση βάσει θέσης
ή ανάλυση υποψηφίων γονιδίων**



Μη φυσιολογική ανάπτυξη του οπίσθιου τμήματος

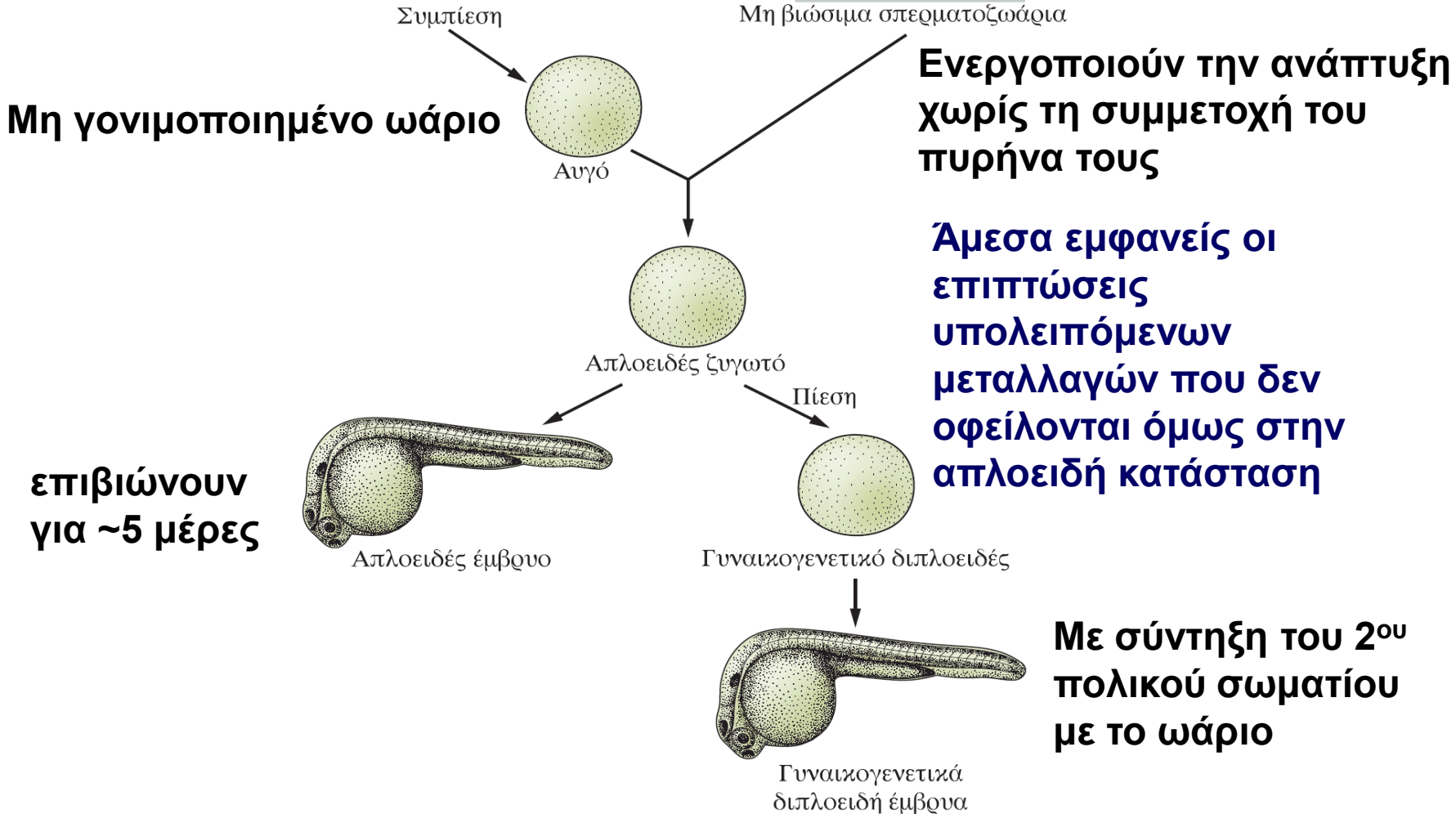
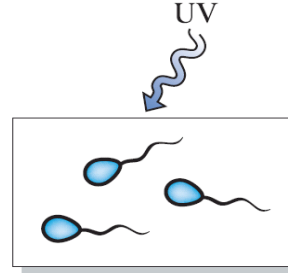
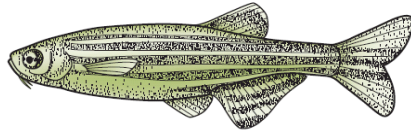
Μεταλλαγή που επηρεάζει χρωματισμό



Σοβαρές δομικές ανωμαλίες στον εγκέφαλο και το ΚΝΣ

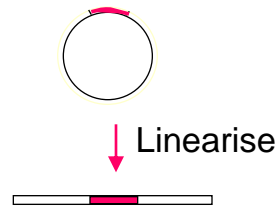
Μεταλλαξιγένεση

Ταυτοποίηση υπολειπόμενων μεταλλαγών με δημιουργία απλοειδών εμβρύων



Διαγονιδιακοί ποντικοί

μικροένεση DNA
στον προπυρήνα
γονιμοποιημένου
ωαρίου



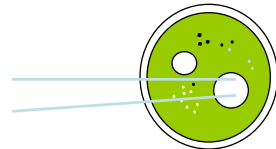
Superovulate Donor ♀



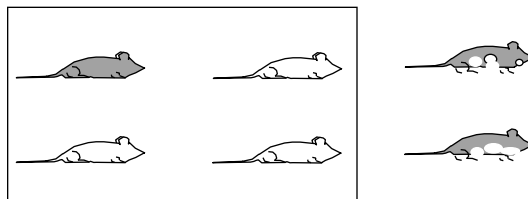
Harvest
Ova



Pronuclear
injection

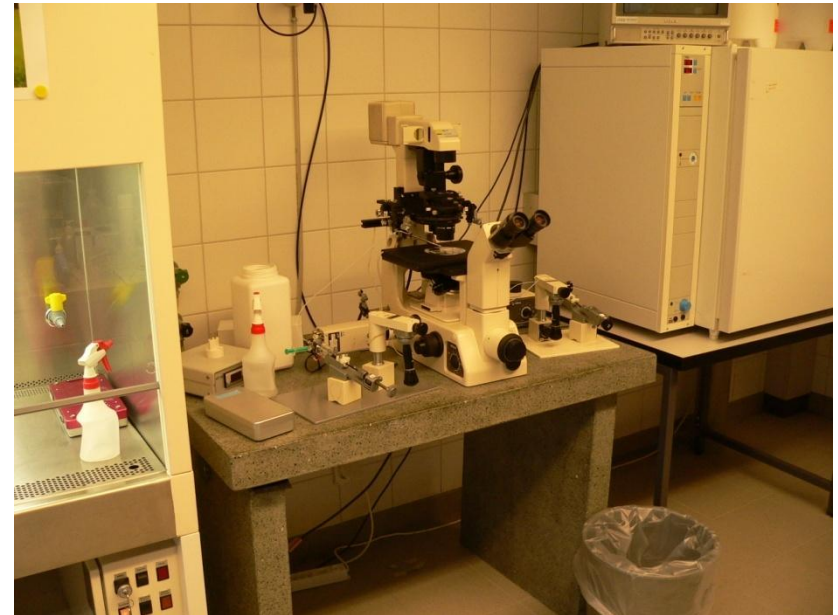


Μεταφορά σε ψευδοέγκυο
(έχει διεγερθεί ορμονικά)



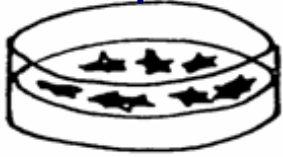
Transgenic

Εξοπλισμός για μικροενέσεις

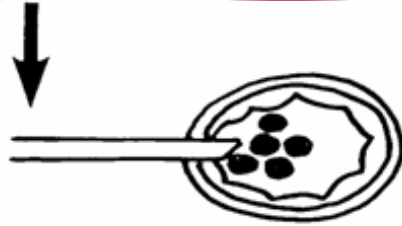


Κnockout ποντικοί

Εμβρυικά
βλαστοκύτταρα

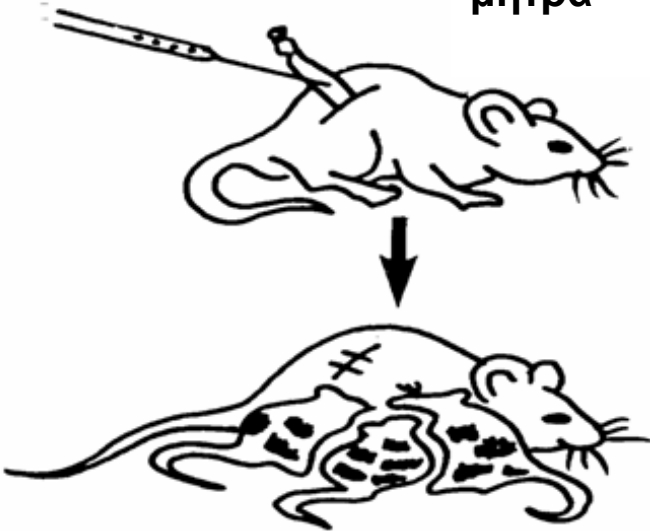


Διαμόλυνση ES κυττάρων
(ομόλογος ανασυνδυασμός)



Μικροένεση σε
βλαστοκύστη

Εμφύτευση στη
μήτρα



Χιμαιρικά άτομα



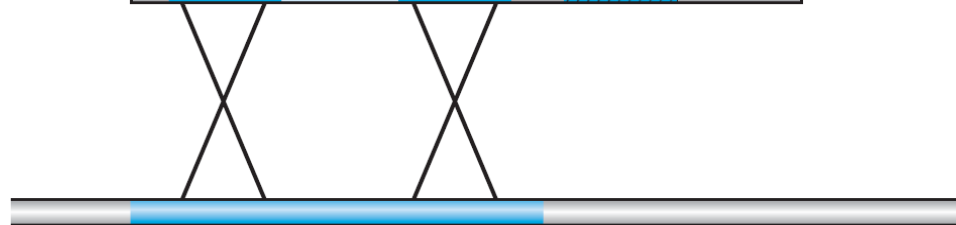
agouti	black
ES cells	C57BL/6
129/SvJ	βλαστοκύστη
(agouti)	(black)

χιμαιρικό



Ομόλογος ανασυνδυασμός

Φορέας γονιδιακής στόχευσης



Γονίδιο-στόχος



(α) Το γονίδιο διακόπτεται



Μη ομόλογη περιοχή



(β)

Για ταυτοποίηση ρυθμιστικών στοιχείων: ρυθμιστικές αλληλουχίες υπό μελέτη γονιδίου + γονίδιο αναφοράς

Για εκτοπική έκφραση γονιδίου & μελέτη επιπτώσεων στην πορεία ανάπτυξης: συγκεκριμένοι υποκινητές (π.χ. Ιστοειδικοί) + γονίδιο

Για καταστροφή συγκεκριμένης περιοχής εμβρύου: υποκινητής ειδικός για τα συγκεκριμένα κύτταρα + τοξίνη

Με χρήση κυττάρων ES

Στοχευμένη αδρανοποίηση (knockout)

Αντικατάσταση γονιδίου με παραλλαγή του

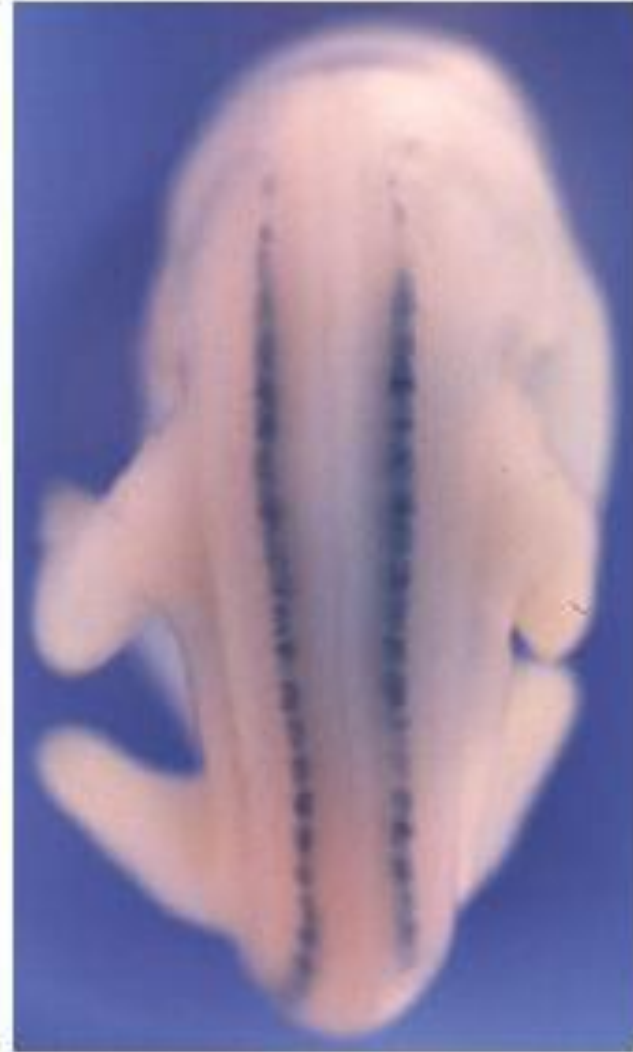
Μοντέλα για νοσήματα (μελέτη παθολογίας + θεραπευτικές προσεγγίσεις)

???

Χωρίς φαινότυπο

Ποικιλία φαινοτύπων ανάλογα με γενετικό υπόβαθρο

Θνησιγόνο σε πρώιμα στάδια



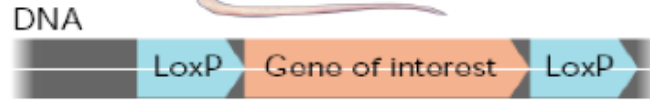
Διαγονιδιακό έμβρυο ποντικού στο οποίο το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης εκφράζεται στους πρόγονους των νευρικών κυττάρων υπό τον έλεγχο του υποκινητή της νευρογενίνης 1.



Διαγονιδιακό ποντίκι στο οποίο εκφράζεται η GFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV

Conditional knockout (κατά συνθήκη)

Transgenic mouse line 1

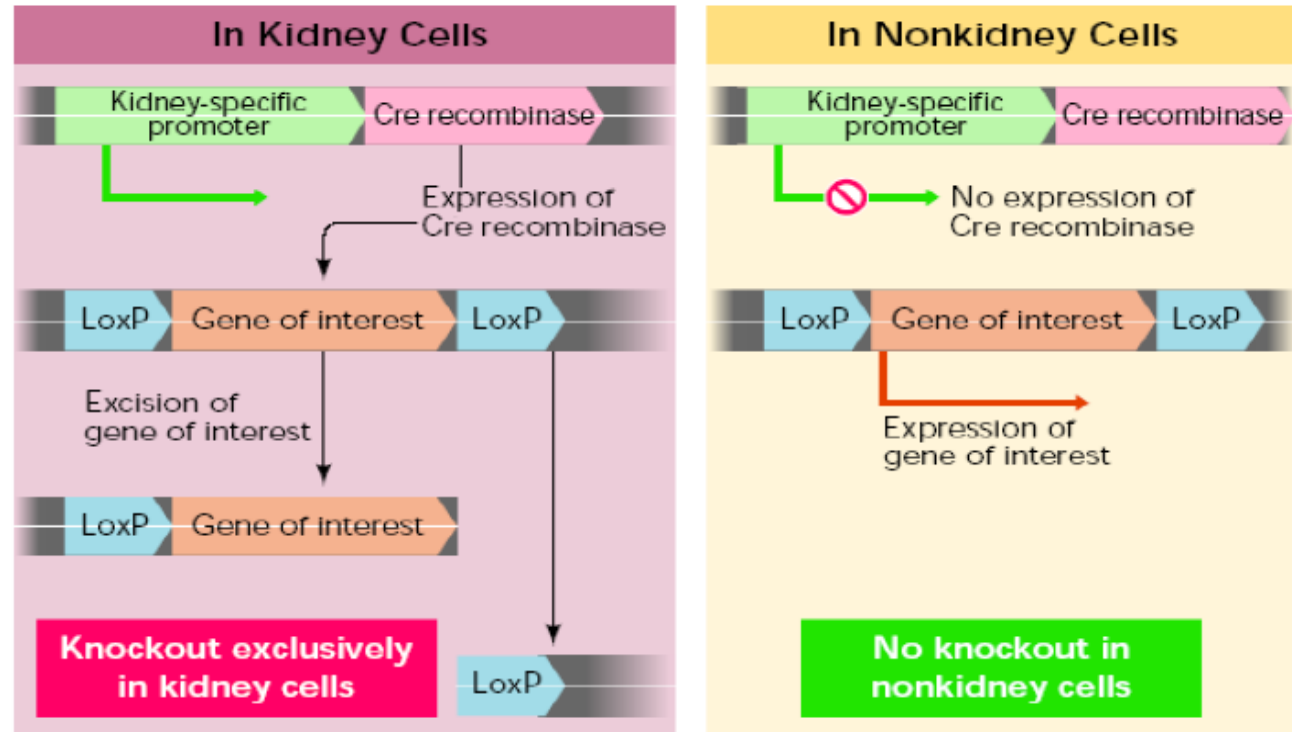


Transgenic mouse line 2



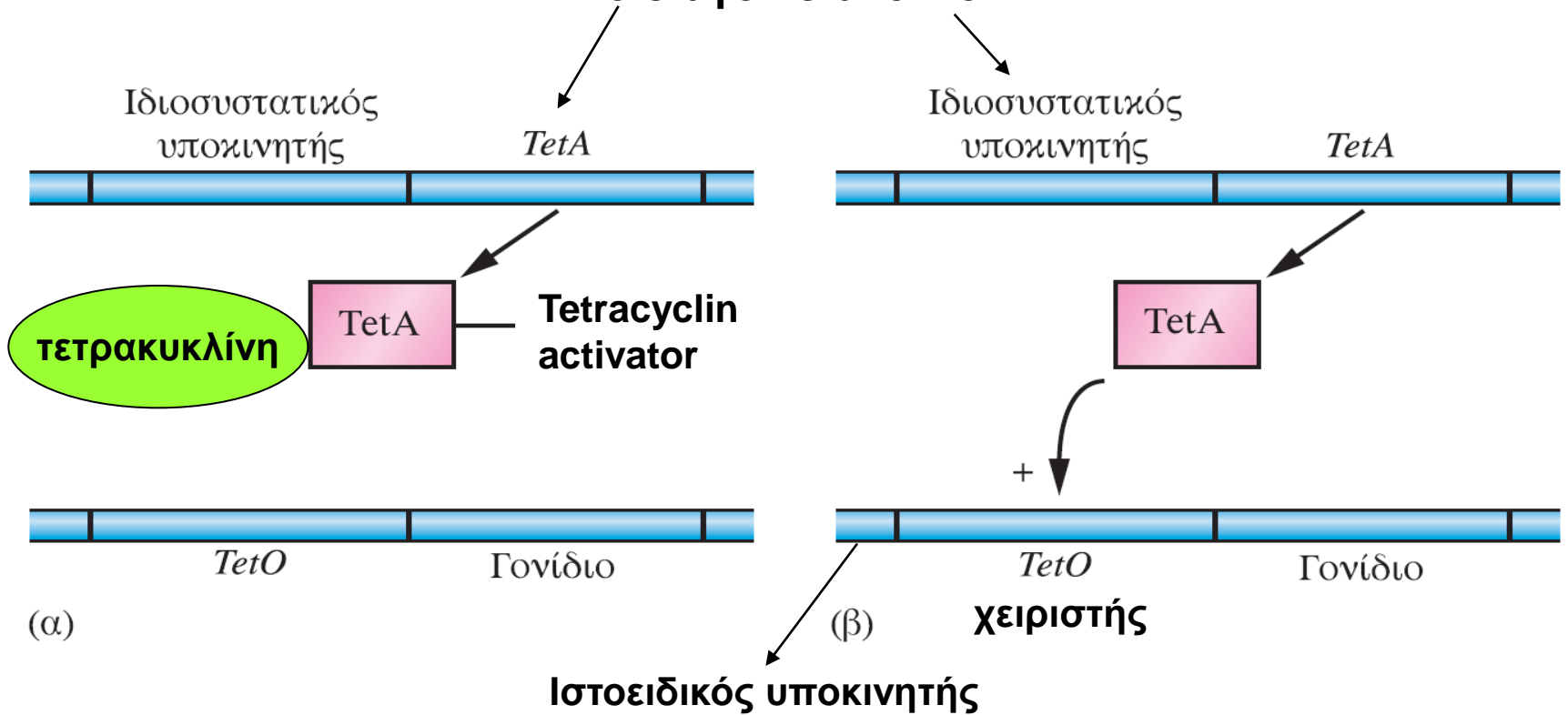
×

Ένθεση με ομόλογο
ανασυνδυασμό σε
κύτταρα ES



Επαγωγή συστήματα

Χρήση επαγωγίμου ιστοειδικού υποκινητή (σύστημα tet-off)
Διπλό διαγονιδιακό ποντίκι



Όταν γίνεται χορήγηση τετρακυκλίνης που συνδέεται με τον TetA παρεμποδίζοντας την σύνδεσή του με τον χειριστή TetO

Παρεμβολή μέσω RNA (RNA interference, RNAi)



Στην τροφή

Ο μηχανισμός του RNAi στον *C.elegans*



Με ένεση στη γονάδα



long dsRNA

RNAση
Dicer

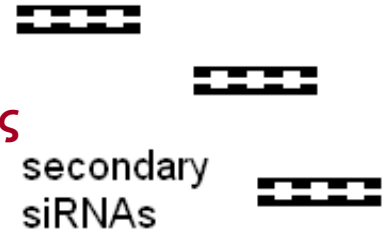
Διακυτταρική
μεταφορά

primary siRNAs



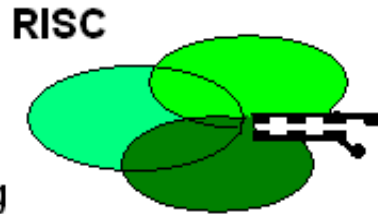
21-22 nts

Ενίσχυση
του σήματος



secondary
siRNAs

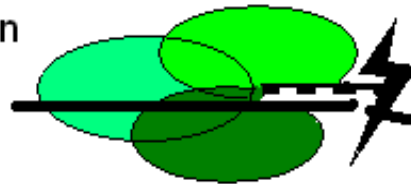
RISC
recruitment,
siRNA unwinding



RdRP
(RRF-1, RRF-3)



mRNA
degradation

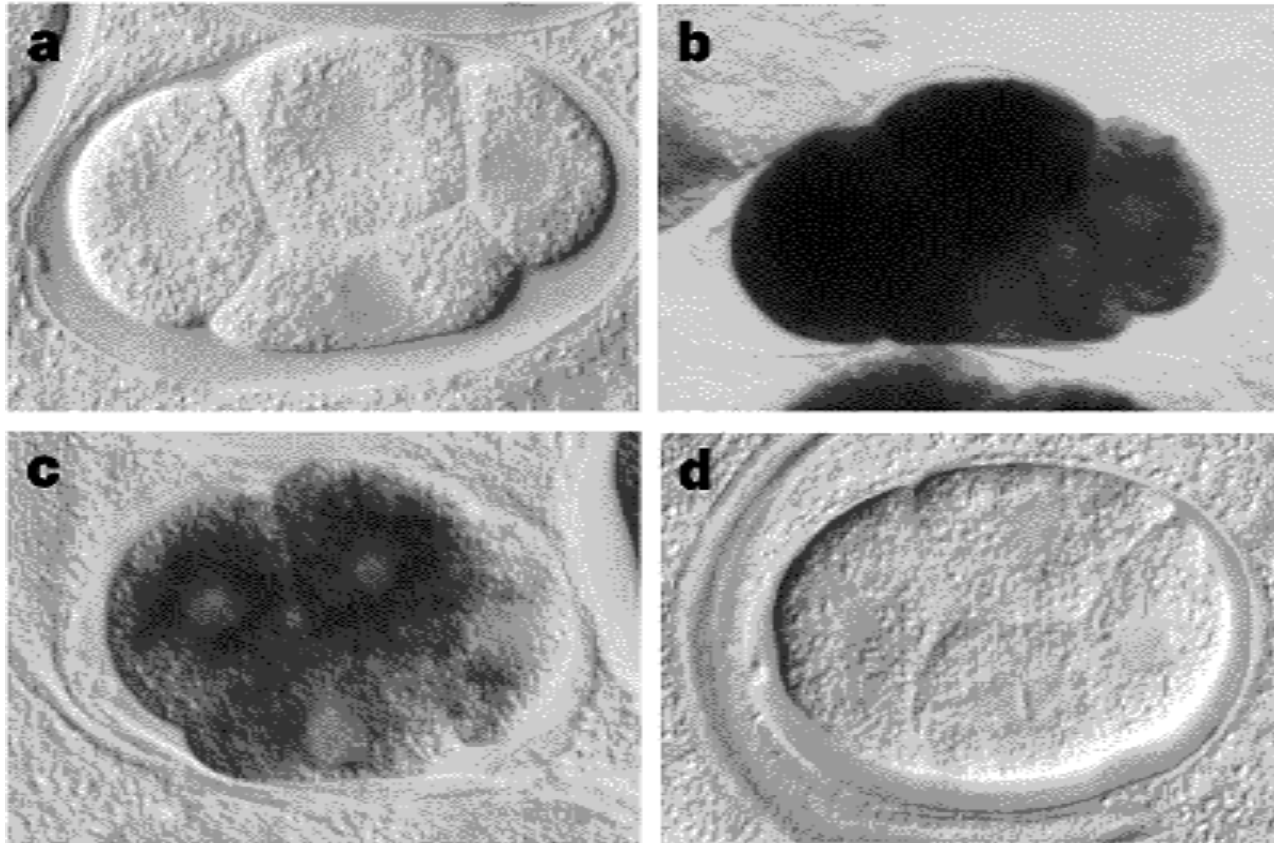


RNA dependent RNA polymerase

mRNA

Παροδικό knockout

Π.χ. επίδραση του RNAi για το γονίδιο *mex-3* στα επίπεδα του ενδογενούς mRNA



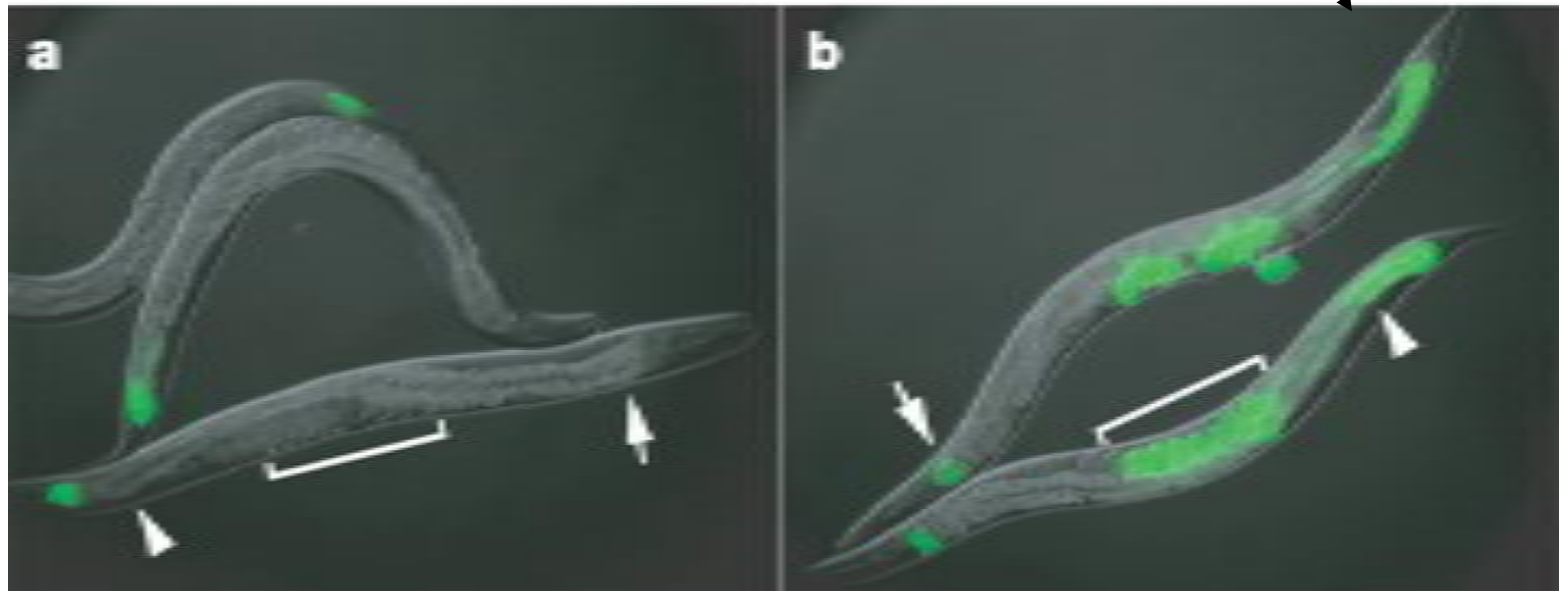
- a. Αρνητικός έλεγχος-χωρίς χρώση απουσία ανιχνευτή
- b. Φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου (δεν έγινε ένεση dsRNA)
- c. Ένεση με antisense RNA
- d. Ένεση με dsRNA

Πιο αποτελεσματικό

Fire et al., Nature 391, 806 (1998)

Διαγονιδιακός *C. elegans* που εκφράζει την GFP και στον οποίο εφαρμόστηκε RNAi με dsRNA

Αυτός έχει μεταλλάξεις σε γονίδια του μηχανισμού RNAi



**The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
"for their discovery of RNA interference - gene
silencing by double-stranded RNA"**



**Andrew Z. Fire
Stanford University School of
Medicine, Stanford, CA, USA
b. 1959**



**Craig C. Mello
University of Massachusetts Medical
School Worcester, MA, USA
b. 1960**

Εφαρμογή του RNAi σε επίπεδο γονιδιώματος (Genome-wide screens)

Διαθέσιμες 2 βιβλιοθήκες RNAi για τάισμα του *C. elegans* με ~17.000 και ~11.500 κλώνους αντίστοιχα (Μέσα σε βακτήρια που παράγουν dsRNA)

The screenshot shows the WormBase website interface. At the top, there are navigation tabs: Home, Genome, Blast / Blat, WormMart, Batch Sequences, Markers, Genetic Maps, Submit, Searches, and Site Map. Below the tabs, the text "WormBaseRelease WS166" is displayed. The main search area features a "Find:" label, a text input field with "Any Gene" selected, and a "Search" button. Below the search bar are three checkboxes: "Exact match", "Results as XML", and "Literature Search".

On the left side, there is a "Web Site Directory" section with links for "Release Notes New/Changed Genes, release notes", "General Searches WormBase Class Browser, Wormbase Query Language Search, AQL Search", "Sequences C. elegans Genome, C. briggsae Genome, Gene, Blast / Blat, e-PCR, Gene Ontology, Synteny Viewer, Cis-Elements (CisOrtho)", "Cells and Gene Expression Cell and Pedigree, Neurons, Expression Pattern, Expression profile", "Genetics, Strains, and Phenotypes Genetic Interval, Rearrangements, Clone, Allele, SNPs, Markers, and Strains, Strain Report, Phenotypes, RNAi", "Batch Queries WormMart [about...], Batch Genes, Batch Sequences", "Downloads and Data Mining Bulk Downloads, Linking to WormBase and Data Mining...", and "Community Worm Community Discussion Forum, WormBase Wiki, Mailing Lists".

On the right side, there is a "News and Notes" section with several bullet points:

- **November 22, 2006: nGASP update**
Expanded training data including repeat sequences, alignment orientation, and updated protein alignment files have been posted on the [nGASP website](#). The deadline for Phase I has been extended to Dec. 31, 2006.
- **November 11, 2006: New release of WormBase: WS166**
WormBase has been updated to the WS166 release of the database.
- **October 31, 2006: Introducing the Worm Community Forum**
WormBase and WormAtlas are pleased to introduce the [Worm Community Forum \(WCF\)](#). The WCF is an online forum for posting job openings and meeting announcements, discussing puzzling results, getting help with troublesome protocols, and discussing anything related to the world of worms. If you are interested in acting as a moderator for the WCF, please contact Thomas Burglin (thomas.burglin AT biosci.ki.se) or Todd Harris (harris@cshl.edu).
- **October 31, 2006: October additions to WormBook**
Two new chapters have been added to the Neurophysiological methods section of WormBook: "Culture of embryonic *C. elegans* cells for electrophysiological and pharmacological analyses" and "Electrophysiological recordings from the neuromuscular junction of *C. elegans*". Additionally, "Chemosensation in *C. elegans*" has just been published in the Neurobiology and behavior section of WormBook. To stay up-to-date, [sign up](#) for a monthly email containing information about new additions to WormBook.
- **October 31, 2006: New release of WormBase: WS165**
WormBase has been updated to the WS165 release of the database.
- **October 19, 2006: Announcing nGASP**
nGASP: the nematode genome annotation assessment project will be evaluating gene prediction software on the *C. elegans* genome. Interested parties are invited to explore the

[-] — Classes

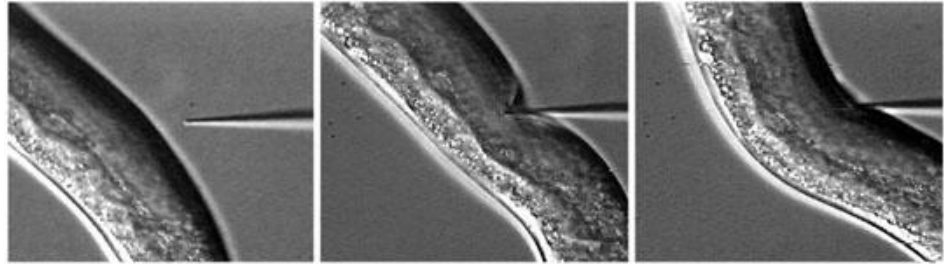
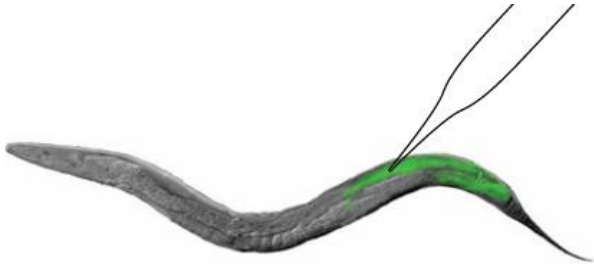
[-] — Abnormal

- [+] ← [s a] behavior_abnormal
- [+] ← [s a] development_abnormal
- [+] ← [s a] morphology_abnormal
- [+] ← [s a] physiology_abnormal
- [+] ← [s a] pigmentation_abnormal
- ← [s a] unclassified

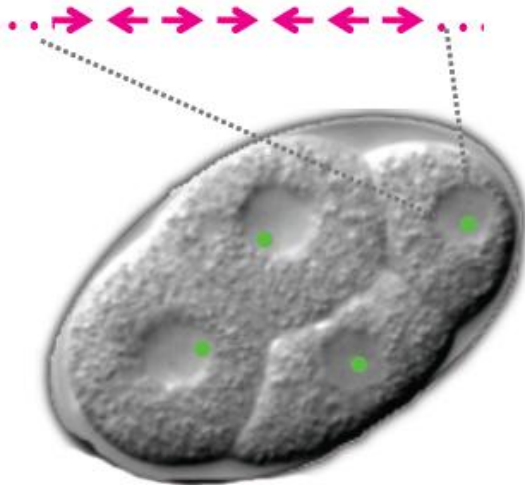
<http://www.wormbase.org/>

Διαγονιδιακοί *C. elegans*

Ένεση DNA στην γονάδα-εισέρχεται στην γαμετική σειρά σαν εξωχρωμοσωμικό DNA



Κάποιοι απόγονοι θα φέρουν το γονίδιο που έχει ενεθεί (μπορεί και σε πολλαπλά αντίγραφα)



Μπορεί να γίνει και ενσωμάτωση στο γονιδίωμα με X ή γ-ακτινοβολία ατόμων που έχουν το εξωχρωμοσωμικό DNA

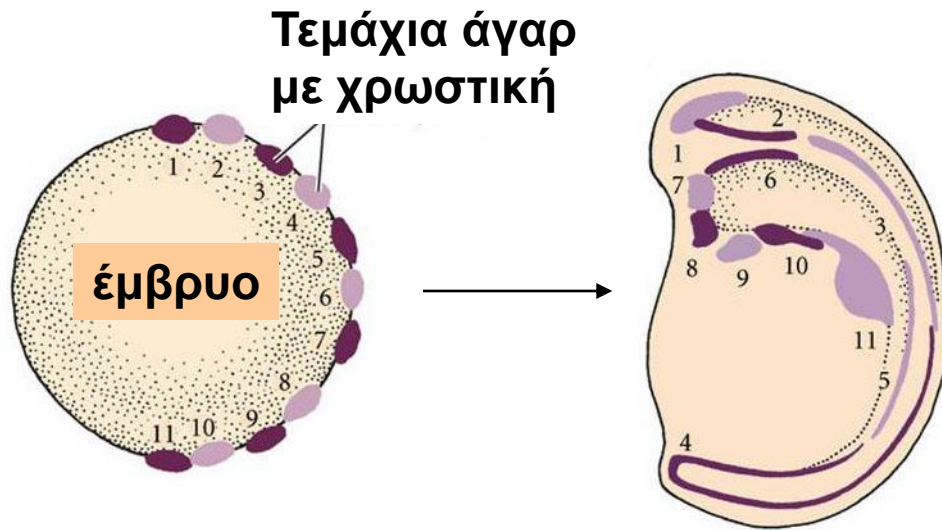
Μέθοδοι σήμανσης κυττάρων

Για παρακολούθηση της κυτταρικής γενεαλογίας (cell lineage)

Ζωτικές χρωστικές (vital dyes)

Δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα

Με επώαση ολόκληρων δειγμάτων σε διάλυμα χρωστικής ή με τοπική εφαρμογή



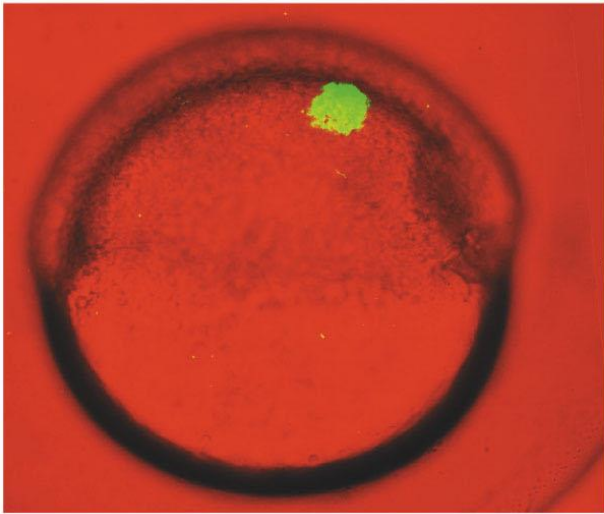
Μειονεκτήματα: δεν σημαίνονται κύτταρα στο εσωτερικό,
εξαπλώνονται & εξασθενούν

Nile blue, neutral red,
DiI, DiO (ενέσιμες, φθορίζουσες)

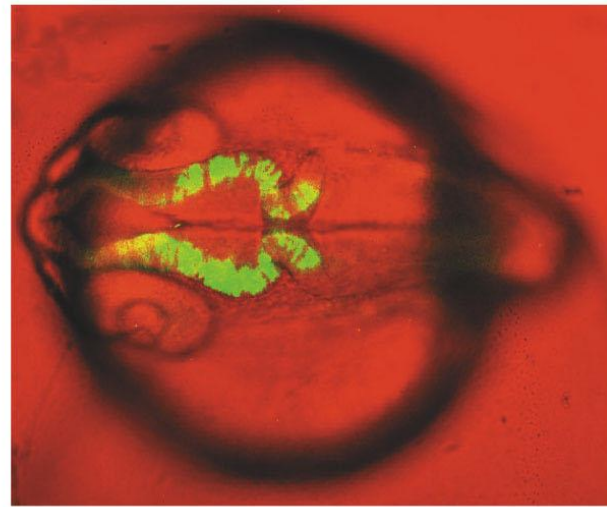
Φθορίζουσες δεξτράνες

Με μικροένεση σε κύτταρα, δεν διαχέεται (MW: ~10.000, FDA, RDA)

(A)



(B)



Γενετικοί δείκτες

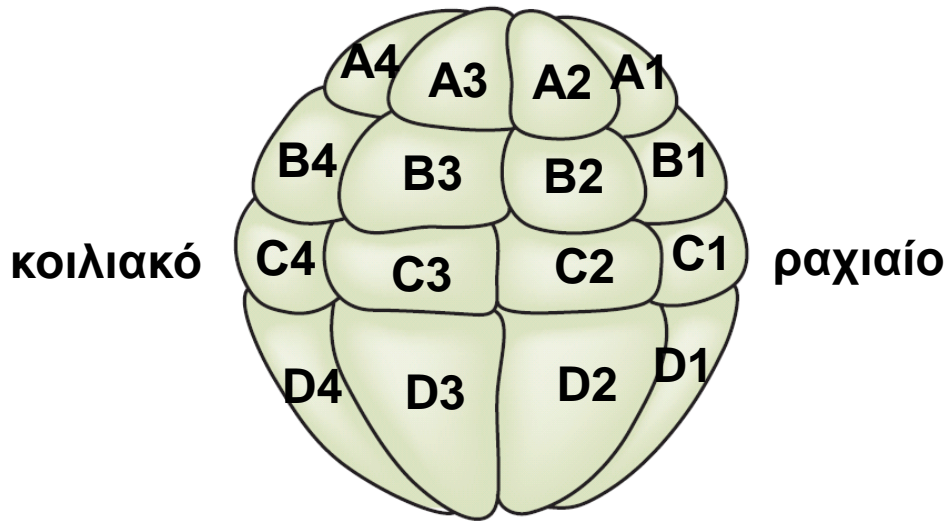
Ενσωματώνονται στο γονιδίωμα - διαγονιδιακοί οργανισμοί
Διαθέσιμοι με έκφραση σε όλους τους ιστούς / αναπτυξιακά στάδια
Π.χ. lacZ, myc
Ενσωμάτωση με ρετροϊούς

Χάρτες πεπρωμένου (fate maps)

Με ζωτικές χρωστικές (vital dyes) και φθορίζουσες δεξτράνες

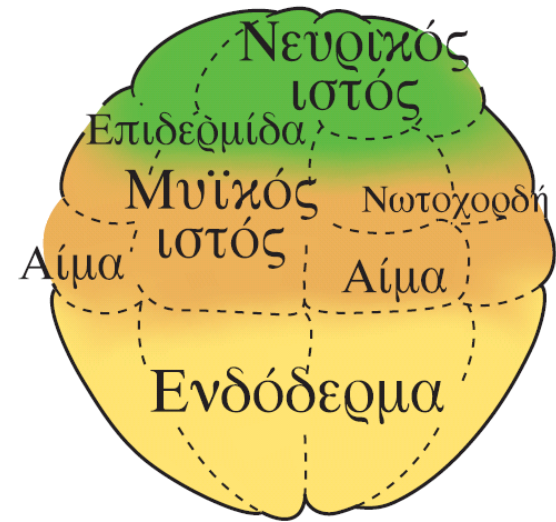
Χάρτης πεπρωμένου Χελορπυ

Ζωικός πόλος



Φυτικός πόλος

Ονοματολογία βλαστομεριδίων



Χάρτης πεπρωμένου

Πρώιμη κυτταρική γενεαλογία του *C. elegans*.

