

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie – vývojová biologie



Bc. Veronika Brežinová

Úlohy transkripčních faktorů Meis v embryonálním vývoji zebřičky *Danio rerio*

Role of transcription factors Meis during embryogenesis *Danio rerio*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Machoň, Ph.D.

Praha, 2020

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca a ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 5.8. 2020

Bc. Veronika Brežinová

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala môjmu školiteľovi RNDr. Ondřejovi Machoňovi, Ph.D za vedenie práce, trpezlivosť, cenné rady a pozitívny prístup počas jej celého vedenia. Ďakujem, Mgr. Petrovi Nicklovi za odovzdanie cenných vedomostí a praktických znalosti, za trpezlivosť a ochotu pomôcť s každým problémom. Taktiež ďakujem aj Mgr. Jaroslavovi Fábikovi za technickú a morálnu podporu a Mgr. Kataríne Kováčovej spoločne s Mgr. Viktoriou Psutkovou za pomoc pri experimentálnom riešení tejto práce. V neposlednom rade ďakujem všetkým členom Oddelenia vývojovej biológie z Ústavu experimentálnej medicíny Akadémie vied Českej republiky, kde táto práca v rokoch 2018-2020 vznikala.

Abstrakt

Meis transkripčné faktory patria do skupiny TALE (predĺženie troch aminokyselinových slučiek) homeodoménových proteínov. Meis2 proteíny pravdepodobne zohrávajú regulačnú funkciu v priebehu vývoja buniek neurálnej lišty a diferenciácie jej derivátov. V genóme zebričky sú kódované dvoma paralógnymi génmi *meis2a* a *meis2b*.

CRISPR/Cas9 technológia bola využitá k príprave mutantných línií pre oba paralógy *meis2a* a *meis2b*, za účelom študovania funkcie tohto transkripčného faktora. Súčasne ako kontrola boli použité špecifické Morfolína pre *meis2a* aj *meis2b*, ktoré znižujú expresiu týchto génov.

Kraniofaciálny a srdечný vývoj bol u mutantných rýb analyzovaný u línie *meis2a* pomocou RNA in situ hybridizácie, histologického farbenia chrupaviek a počítačovou tomografiou. Zatiaľ čo, po injekciách špecifických Morfolín sme pozorovali narušený kraniofaciálny vývoj aj vývoj srdca, u línie *meis2a* KO sme tieto typické zmeny neodhalili. Náš genetický prístup jasne nepreukázal, že samotný *meis2a* paralóg zohráva dôležitú úlohu v kraniofaciálnom vývoji a pri vývoji srdca. Pre podrobnejšiu analýzu sú potrebné ďalšie experimenty na líniách rýb s kombinovanými knock-outy *meis2a* aj *meis2b*.

Kľúčové slová

Mutagenéza CRISPR, *Danio rerio*, bunky neurálnej lišty, Meis2, transkripčný faktor

Abstract

Meis transcription factors belong to the group of TALE (three amino acids loop extension) homeodomain proteins. Meis2 proteins have a potential role in regulation of neural crest cells development and in differentiation of their derivatives. Zebrafish genome has two paralogues of *meis2* gene, *meis2a* and *meis2b*.

CRISPR/Cas9 technology was used to prepare mutant lines of both paralogues, *meis2a* and *meis2b*, for the purpose of study of function of Meis2 transcription factors. Specific morpholinos that reduce the expression of *meis2a* and *meis2b* were used as controls.

Craniofacial and cardiac development in mutant fish was analyzed in the *meis2a* line by RNA in situ hybridization, histological cartilage staining, and computed tomography. While we observed impaired craniofacial and cardiac development after injection of specific Morpholinos, we did not detect these similar changes in the *meis2a* KO line. Our genetic approach has clearly not shown that the *meis2a* paralogue itself plays an important role in craniofacial development and cardiac development. For more detailed analysis, further experiments on fish lines with combined *meis2a* and *meis2b* knock-outs are needed.

Key words

Mutagenesis CRISPR, *Danio rerio*, neural crest cells, Meis2, transcription factor

Zoznam použitých skratiek

| Skratka | Slovenský výklad | Anglický výklad |
|----------------|---|---|
| AMP | ampicilín | ampicillin |
| BMP | kostný morfogenetický proteín | bone morphogenic protein |
| bp | bázový pár | base pair |
| Cas | proteín asociovaný s CRISPR | CRISPR associated protein |
| CRISPR | segmenty nahromadených pravidelne rozmiestnených krátkych repetíc | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| crRNA | CRISPR RNA | CRISPR RNA |
| DIG | digoxigenín | digoxigenin |
| dpf | dní po fertilizácii | days after fertilization |
| DSB | dvojreťazcový zlom | double strand break |
| EMT | epitelovo mezenchymálna tranzícia | epithelial mesenchymal transition |
| ex. | exón | exon |
| FGF | fibroblastový rastový faktor | fibroblast growth factor |
| GRN | génová regulačná sieť | gene regulatory network |
| HD | homeodoména | homeodomain |
| HDR | priama homológna oprava | homology directed repair |
| HMA | test mobility heteroduplexov | heteroduplex mobility assay |
| hpf | hodiny po oplodnení | hours post fertilization |
| hth | homothorax | homothorax |
| ISH | in situ hybridizácia | in situ hybridization |
| KO | knock-out | knock-out |
| MEIS | myeloidový ektopický vírový integračný priestor | myeloid ecotropic interation site |
| MicroCT | počítačová tomografia | computer tomography |
| MO | Morfolíno | morpholinos |
| mpf | mesiace po oplodnení | months post fertilization |
| NCC | bunky neurálnej lišty | neural crest cells |
| NES | jadrový exportný signál | nuclear export signal |
| NHEJ | nehomológne spájanie koncov | non-homologous ends joining |
| NL | neurálna lišta | neural crest |
| NLS | jadrový lokalizačný signál | nuclear location signal |
| O/N | počas noci | over night |
| PA | faryngov obluk | pharyngeal arc |
| PAM | susedný motív protospaceru | protospacer adjacent motif |
| RA | retinová kyselina | retinoic acid |
| RE | reštrikčná endonukláza | restriction endonuclease |
| RT | izbová teplota | room temperature |
| sgRNA | jednovláknová navaďajúca RNA | single guide RNA |
| SSN | miestne špecifické nukleázy | site specific nuclease |
| TALE | predĺženie troch aminokoyselinových slučiek | three amino acids loop extension |
| TALEN | efektorové nukleázy podobné transkripčným aktivátorom | transcription activator-like effector nuclease |
| TF | transkripčný faktor | transcription factor |
| tracrRNA | trans aktivačná RNA | trans activating RNA |
| UTR | neprekladaná oblasť | untranslated area |
| vz. | vzorka | sample |
| ZFN | nukleázy zinkových prstov | zinc finger nuclease |
| ZFP | proteíny zinkových prstov | zinc finger protein |

OBSAH

| | | |
|--------|--|----|
| 1 | ÚVOD..... | 9 |
| 2 | LITERÁRNY PREHĽAD..... | 10 |
| 1.1. | Danio rerio | 10 |
| 1.1.1. | Reprodukcia a vývoj | 10 |
| 1.1.2. | Duplikácia genómu | 12 |
| 1.1.3. | Danio rerio ako modelový organizmus | 13 |
| 1.2. | Metódy pre analýzu génových funkcií u zebričky Danio rerio | 14 |
| 1.2.1. | Morfolína | 14 |
| 1.2.2. | Nukleázové modifikácie genómu..... | 17 |
| 1.3. | Neurálna lišta | 22 |
| 1.3.1. | Formovanie neurálnej lišty..... | 22 |
| 1.3.2. | Bunky neurálnej lišty | 24 |
| 1.3.3. | Regulácia buniek neurálnej lišty | 25 |
| 1.4. | Meis transkripčné faktory | 30 |
| 1.4.1. | Rodina Meis proteínov a ich štruktúra | 30 |
| 1.4.2. | Komplexy interakcie Meis proteínov | 31 |
| 1.4.3. | Funkcia Meis proteínov v embryu | 32 |
| 1.4.4. | Defekty v Meis génoch a ochorenia..... | 35 |
| 3 | CIELE PRÁCE | 38 |
| 4 | MATERIÁL..... | 39 |
| 4.1 | Reagenty a chemikálie | 39 |
| 4.1.1 | Kity..... | 40 |
| 4.1.2 | Primre, Morfolína (5' ->3') | 41 |
| 4.2 | Biologický materiál | 41 |
| 4.3 | Laboratórne vybavenie..... | 41 |
| 5 | METÓDY | 42 |
| 5.1 | Crispr/Cas9 systém | 42 |
| 5.1.1 | Dizajn sgRNA | 42 |
| 5.1.2 | Klonovanie a príprava sgRNA | 42 |
| 5.2 | Injikácie..... | 46 |
| 5.3 | Genotypovanie | 46 |
| 5.3.1 | Genotypovanie F0, F1 a F2 generácie..... | 47 |
| 5.4 | Fenotypová analýza..... | 48 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.4.1 | Farbenie Alcianovou modrou..... | 48 |
| 5.4.2 | <i>In situ</i> hybridizácia..... | 49 |
| 5.4.3 | Western blot | 51 |
| 5.4.4 | Počítačová tomografia (MicroCT) | 52 |
| 6 | VÝSLEDKY | 53 |
| 6.1 | Dizajn gRNA..... | 53 |
| 6.2 | Genotypovanie | 55 |
| 6.2.1 | Genotypovanie F0 generácie..... | 55 |
| 6.2.2 | Genotypovanie F1 generácie..... | 57 |
| 6.2.3 | Genotypovanie F2 generácie..... | 59 |
| 6.3 | Fenotypová analýza..... | 60 |
| 6.3.1 | Farbenie alcianovou modrou..... | 60 |
| 6.3.2 | <i>In situ</i> hybridizácia..... | 62 |
| 6.3.3 | Western blot | 65 |
| 6.3.4 | Zobrazovanie počítačovou tomografiou (MicroCT) | 66 |
| 7 | DISKUSIA..... | 69 |
| 7.1 | Príprava mutantnej línie <i>meis2a</i> a <i>meis2b</i> | 73 |
| 7.2 | Úloha Meis2a pri vývoj tvarových chrupaviek..... | 73 |
| 7.3 | Meis2a pravdepodobne zohráva zanedbateľnú úlohu pri vývoji srdca | 74 |
| 7.4 | Verifikácia prítomnosti proteínu Meis2a Western blotom..... | 75 |
| 7.5 | Počítačová tomografia (MicroCT) | 76 |
| 7.6 | Zhrnutie..... | 76 |
| 8 | ZÁVER | 77 |
| 9 | ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY | 78 |

1 ÚVOD

Táto diplomová práca je zameraná na štúdium úlohy transkripčného faktora Meis2 v embryonálnom vývoji zebričky *Danio rerio* a jeho úlohy v rámci formovania neurálnej lišty a diferenciácie buniek neurálnej lišty.

Bunky neurálnej lišty sú tvorené populáciou multi-potentných embryonálnych buniek, z ktorých sa formuje široká škála anatomických štruktúr. Neurálna lišta sa aj práve preto, označuje ako štvrtý zárodočný list (Hall, 2000), ktorý dáva vznik napríklad kraniofaciálnym chrupavkám a kostiam, gangliam enterického nervového systému, neurónom, melanocytom alebo sa podieľa na vzniku a formovaní srdečných buniek (Simões-Costa and Bronner, 2015). Vďaka jej ďalekosiahlej diverzifikácii sa bunky neurálnej lišty stali atraktívnym predmetom výskumu hlavne zo strany embryológov. Neurálna lišta a jej bunky sú unikátne pre rané embryonálne vývojové štádia u stavovcov. Princípy, na ktorých funguje neurulácia a vývoj neurálnej lišty sú do veľkej miery konzervované medzi jednotlivými modelovými organizmami. Defekty, ktoré môžu vzniknúť počas vývoja neurálnej lišty môžu mať dramatický dopad na veľké množstvo orgánových systémov. Neurokristopatia, patológia vo vývoji buniek neurálnej lišty zahŕňa syndrómy ako hyperpigmentáciu, viacnásobné kraniofaciálne poruchy a srdcové defekty (Bolande, 1997), a preto, je dôležité skúmanie a pochopenie mechanizmu, formovania a diverzifikácie neurálnej lišty.

Transkripčné faktory Meis patria do skupiny homeodoménových proteínov TALE (predĺženie troch aminokoyselinových slučiek) a sú schopné tvoriť heterodiméry alebo heterotriméry s ďalšími proteínmi, pravdepodobne cez priame proteín-proteínove interakcie (Jolma et al., 2015). V tejto práci sme sa zamerali na Meis2 transkripčné faktory, ktoré sú u zebričky prítomne ako dva homológny *meis2a* a *meis2b*. V predošlých štúdiách boli publikované výsledky, ktoré predpokladajú, že Meis2 zohráva dôležitú úlohu ako regulátor buniek neurálnej lišty počas embryonálneho vývoja myši, cez účasť na vývoji hlavovotvárových kostí a chrupaviek a taktiež na vývoji srdca (Machon et al., 2015). Preto, je táto práca zameraná na ďalšie študovanie a porovnanie funkcie Meis2 na modelovom organizme zebričky.

V experimentálnej časti práce, boli pripravené mutanté línie *meis2a* a *meis2b* za účelom študovania ich funkcie. Ako kontrola k experimentom na knock-down línach boli využité špecifické Morfolína na *meis2a* aj *meis2b*, ktoré znižujú expresiu spomenutých génov. Následne boli knock-down a knock-out embryá podrobené fenotypovým analýzám, za účelom študovania participácie Meis2 na analyzovaných štruktúrach.

2 LITERÁRNY PREHĽAD

1.1. *Danio rerio*

Danio rerio alebo hovorovo „zebrička,, je sladkovodná ryba, ktorá je jedným z najvýznamnejších modelových organizmov pre štúdium vývoja a genetiky u stavovcov. Tento organizmus má široké využitie aj pri štúdií ľudských ochorení alebo pri skriningoch terapeutických liečiv (Penberthy et al., 2002; Sumanas and Lin, 2004). Model zebričky umožňuje obzvlášť zaujímavú experimentálnu manipuláciu vďaka jej veľkosti a možnosti celoročného chovu v laboratórnych podmienkach.

Danio rerio patrí do čeľade kaprovitých rýb. Prirodzene sa vyskytuje v oblasti južnej, juhovýchodnej Ázie, s najvyššou druhovou diverzitou v severovýchodnej Indii, Bangladéši a Majanmarska. Zoskupuje sa v malých hejnách, najčastejšie v stojatých alebo pomaly tečúcich povodniach riek. *Danio rerio* zriedka prekračuje štandardnú dĺžku tela 40 mm, avšak domestikované kmene dosahujú až 50 mm. V prirodzenom prostredí sa dokáže prispôbiť širokej škále teplôt (od 6 °C po 38 °C). V laboratórnych chovoch je odporúčaná udržiavacia teplota 28,5 °C, pri ktorej zebričky výrazne zvyšujú rýchlosť rastu.

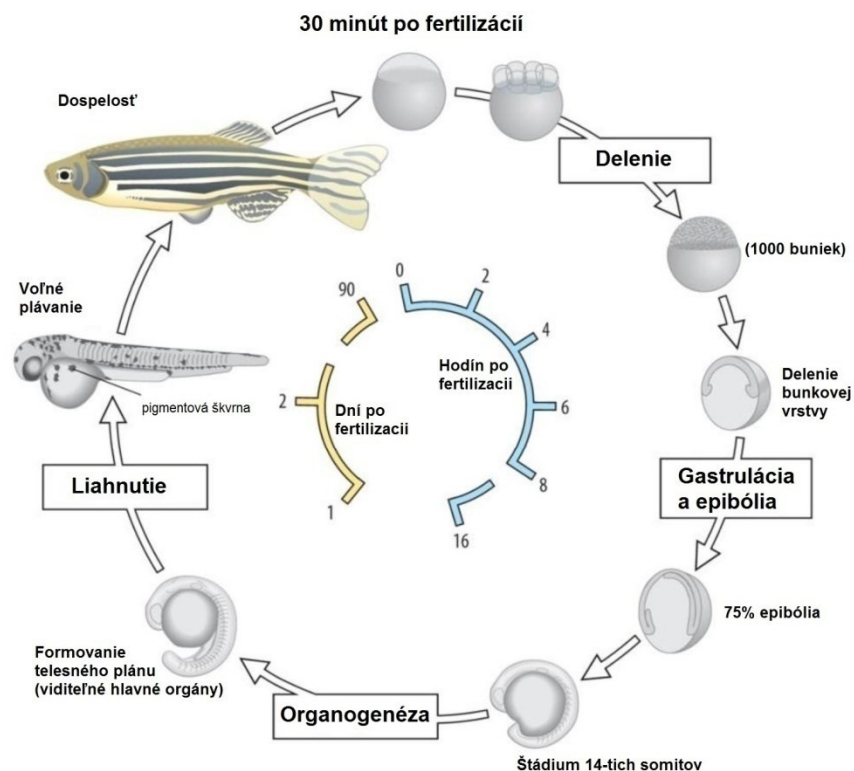
1.1.1. Reprodukcia a vývoj

Zebričky vykazujú zreteľný pohlavný dimorfizmus. Samec má štíhlejšie dlhšie telo a vyšší lesk zlatých pruhov, zatiaľ čo samice majú mohutnejšie zaoblenú brušnú časť a sú bez lesku. U *Dania* sa všetky gonády pôvodne vyvíjajú ako vaječníky, ktoré sa u samcov začínajú diferencovať na semenníky približne 5-7 týždňov po vyliahnutí. Reprodukčná zrelosť nesúvisí s vekom s jej vekom, ako by sa mohlo zdať, ale veľkosťou ryby, ktorú dosahuje približne pri 23 mm.

Čuchové vnemy hrajú dôležitú úlohu pri reprodukcií zebričky. Ovuľácia je u samíc spojená s vystavením sa samčím gonádálnym feromónom (Hurk and Lambert, 1983). Mladé samice sú schopné trenia každé 2-3 dni, pričom je možné získať aj niekoľko stoviek vajíčok z jedného jedinca. S vyšším vekom ryby dochádza k predlžovaniu týchto intervalov a zároveň k zníženiu počtu získaných pohlavných buniek. Okrem veku je celá rada faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať početnosť vajíčok, ako je kvalita a teplota vody, strava, hustota jedincov, vzájomná kompatibilita a podobne (Lawrence, 2007). Reprodukcia zebričiek je úzko spojená s fotoperiodou. Prvý vrchol aktivity dosahujú ihneď po osvetlení, ďalšie dva skoro popoludní a počas poslednej svetelnej hodiny (Plaut, 2000).

Danio rerio je známe pre svoj rýchly vývoj v laboratórnych podmienkach. Generačný čas je krátky, spravidla 3 až 4 mesiace, čo ho robí vhodným modelovým organizmom pre selekčné experimenty. K najrýchlejšiemu rastu dochádza práve počas prvých troch mesiacov, následne dochádza k jeho spomaľovaniu a zastavení zhruba v 18 mesiacoch (Obr. 1).

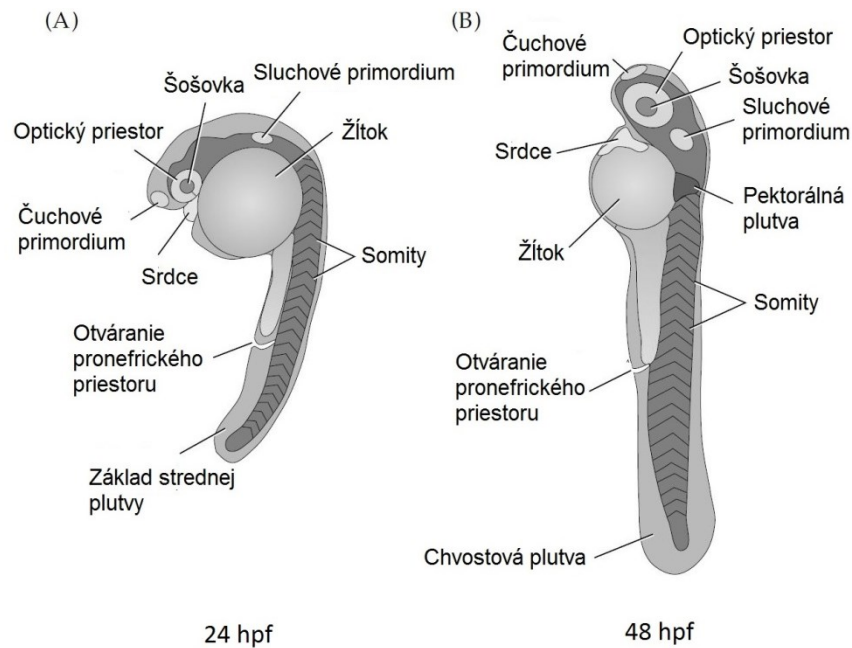
Vajcia zebričky sú veľké v priemere 0,7 mm a priesvitné. Aktivujú sa pri kontakte s vodou. Po vonkajšom oplodnení dochádza zhruba do 30 minút k prvému deleniu, ktoré pokračuje synchronne každých 15 minút (Obr. 1).



Obrázok 1: Schematické znázornenie embryonálnych vývojových štádií zebričky.

Cyklus začína mimotelovým oplodnením. Prvé delenie nastane do 30 minút od oplodnenia. Po vydelení viacerých buniek, dochádza k ich migrácii v procese gastrulácie. Embryá sa rýchlo vyvíjajú do štádia 14-somitov v 16 hpf. Telesný plán a všetky hlavné orgány sa vyvíjajú počas prvých 24 hodín. V štádiu 2dpf dochádza k vyliahnutiu larvy. Zebrička dosahuje dospelosť približne za 90 dní. Prevzaté a upravené podľa (Pennonen, 2017).

Embryogenéza u *Danio rerio* je obdobou skorého vývoja u vyšších stavovcov, avšak oproti stavovcom k nej dochádza podstatne rýchlejšie. Prekurzory všetkých hlavných orgánov sú vyvinuté do 36 hodín po fertilizácii (hpf). Embryo má po 24 hpf plnú sadu 30 párov somitov, bijúce srdce a začína tvorba pigmentu, formujú sa oči a pokožka. (Obr. 2).



Obrázok 2: Embryo zebričky 24 a 48 hodín po oplodnení.

(A) V štádiu 24 hpf má embryo plnú sadu somitov, bijúce srdce, začína tvorba pigmentu, oči, pokožky a je citlivé na dotyk. Vo faryngovom regióne sa začínajú vytvárať čeluste. V okolí chvostovej klenby možno identifikovať primordium chvostovej plutvy. (B) V 48 hpf dochádza k liahnutiu zebričky, je viditeľná pektoriálna plutva. Prevzaté a upravené podľa (Tyler, 2010).

Neurálna platňa sa objavuje do 10 hodín od začiatku vývoja, rovnako ako sa formujú prvé somity. Neurálna trubica sa začína formovať v štádiu 18 hpf, keď má embryo 18 somitov. Segmenty mozgu, neuroméry, môžu byť v tomto štádiu zreteľne identifikované. Je možné rozlíšiť 10 neuromér smerom od anterioru k posterioru, prvé tri odpovedajú telencefalonu, diencefalonu, mezencefalonu, posledných sedem rhombencefalonu. U embryí 24 hpf sa v regióne faryng začínajú formovať čeluste. (Tyler, 2010).

V optimálnych laboratórnych podmienkach dochádza k vyliahnutiu lariev v rozmedzí 2,5-3 dní po oplodnení (dpf, Obr. 1). Larvy vykazujú spontánnu aktivitu až od 5 dpf. Do tohto obdobia získavajú potravu výlučne zo žltkového vaku, ktorý je vyčerpaný približne v 7 dpf, po vytvorení tráviaceho ústrojenstva.

1.1.2. Duplikácia genómu

Zhruba pred 350 miliónmi rokmi došlo u viac ako 25 000 druhov stavovcov, vrátane zebričky, k duplikácii genómu. Genómová duplikácia vyústila k trom možným osudom duplikovaných génov. Jedna kópia duplikovaného génu môže získať novú adaptívnu funkciu, ktorá môže byť zachovaná v genofonde (neofunkcionalizácia), alebo môže byť deaktivovaná. Treťou možnosťou je subfunkcionalizácia, pri ktorej dôjde k rozdeleniu funkcií pôvodného génu do jeho jednotlivých kópií (Force et al., 1999).

1.1.3. Danio rerio ako modelový organizmus

Danio rerio má hneď niekoľko jedinečných vlastností, vďaka ktorým sa stal vhodným modelovým organizmom. Pre jeho veľkosť je možné udržiavať veľký počet jedincov v relatívne malom priestore, s čím súvisia aj nižšie náklady na jeho chov. Sexuálnu dospelosť dosahuje za 2 až 3 mesiace, vďaka čomu je možné získať požadované línie v krátkom čase. Samice sú za ideálnych podmienok veľmi plodné a týždenne môžu generovať veľké množstvo potomkov, čo je ideálna situácia u genetických skrínigov, ktoré vyžadujú veľký počet súrodencov. K oplodneniu a vývoju dochádza mimo tela samice, takže embryá sú ľahko prístupné k injekciám a ďalšej manipulácii. Vytvárajúce sa embryá sú do 24 hpf priehľadné, čo umožňuje sledovanie organogenézy spoločne so značenými expresiami génov.

Veľký pokrok pri identifikácii génov a genomických oblastí zapojených do rozvoja ľudských chorôb umožnila komplexná sekvenácia genómu zebričky Danio rerio v roku 2013. Howe et al. (2013) vo svojej práci porovnal získané sekvenčné dáta s genómom človeka. Porovnaním ľudským referenčným genómom preukázalo, že skoro 70 % ľudských génov má aspoň jeden zrejmy ortológ u zebričky (Howe et al., 2013).

V čase pred genómovým sekvenovaním bola zebrička často využívaným modelovým organizmom u „priamej genetiky“, založenej na náhodnej mutagenéze, ktorá mohla byť vyvolaná ionizujúcim žiarením alebo mutagénnymi chemikáliami. Tento spôsob skúmania je finančne aj časovo náročný skrz väčší rozsah získaných genotypov, ktoré sa vyhodnocujú cytogenetickými technikami, klonovaním do plazmidov alebo spätným krížením. Sekvenácia genómu, spoločne s vývojom molekulárnych nástrojov, napomohla k rozšíreniu genetických prístupov štúdia zebričky.

Najväčšia výhoda zebričky ako modelového systému spočíva v jej dobre preskúmanej genetike, v dostupnosti genetických a vývojových prístupov a ľahkej dostupnosti popísaných mutantných embryí a ďalších charakteristík na stránkach databázy <https://zfin.org/>.

1.2. Metódy pre analýzu génových funkcií u zebričky *Danio rerio*

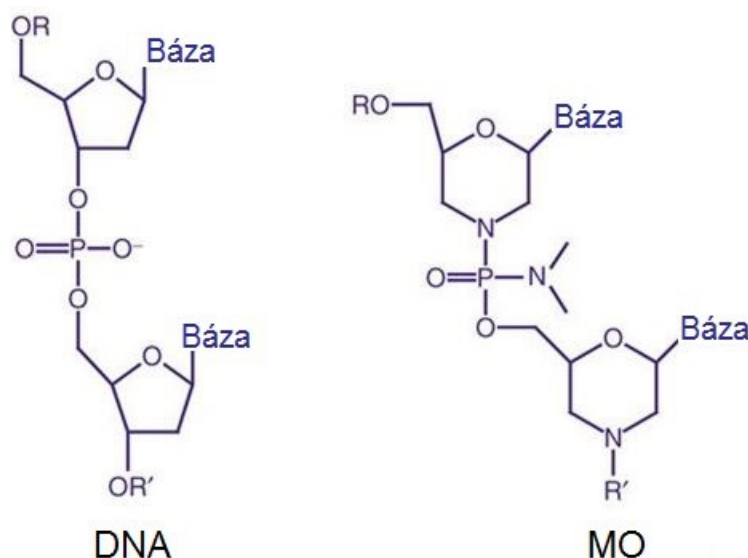
Priama genetika bola aktívnym výskumným odvetím počas uplynulých sto rokov a vďaka nej vzniklo veľké množstvo zbierok spontánnych a indukovaných mutantov u zebričky, ale aj iných druhov. Avšak, sekvenácia genómu odhaľuje množstvo ďalších génov, pre ktoré v súčasnosti neexistujú žiadne mutácie a ich funkcia je neznáma, preto je potrebné využitie reverzných genetických prístupov.

Štúdium funkcie špecifických génov vyžaduje mutagenézu pomocou aplikácie techník pre umlčanie génov, ako je napríklad injikácia Morfolín alebo vyradenie génov z funkcie prostredníctvom CRISPR/Cas9 technológie.

1.2.1. Morfolína

Morfolína (MO) boli pôvodne vyvinuté pre klinické a terapeutické účely, kde preukázali vážne nedostatky (Summerton and Weller, 1997). Do vývojovej biológie došlo k ich zavedeniu na začiatku roku 2000 (Heasman et al., 2000). Morfolínové oligonukleotidy sú najviac využívaným ani-sense knock down nástrojom u zebričky, u ktorej boli využité pre plošný skrining génových funkcií (Pickart et al., 2006) a verifikovanie mutantých fenotypov (Nasevicius and Ekker, 2000; Dutton et al., 2001). Okrem toho, boli využité na redukciiu maternálnej tak aj zygotickéj génovej funkcie (Ciruna et al., 2002).

Pre morfolínové oligonukleotidy je špecifická prítomnosť morfolínových kruhov, ktoré nahrádzajú zvyšky ribózy alebo deoxyribózy a taktiež prítomnosť neiónových fosfordiamidátových väzieb medzi týmito kruhmi (Obr. 3). Morfolína, napriek tomu, že napodobňujú skutočné nukleotidové sekvencie, sú extrémne odolné voči nukleázam. Zvyčajne sa používajú ako oligoméry 25 morfolínových báz, ktoré sa prostredníctvom párovania komplementárnych báz viažu na požadovanú sekvenciu RNA. Výsledkom komplementárneho párovania je molekula neutrálne nabitého fosfordiamidátu, ktorýmá vysokú väzbovú afinitu k RNA, čím vzniká sterickejá prekážka správneho spracovania RNA. (Bill et al., 2009).



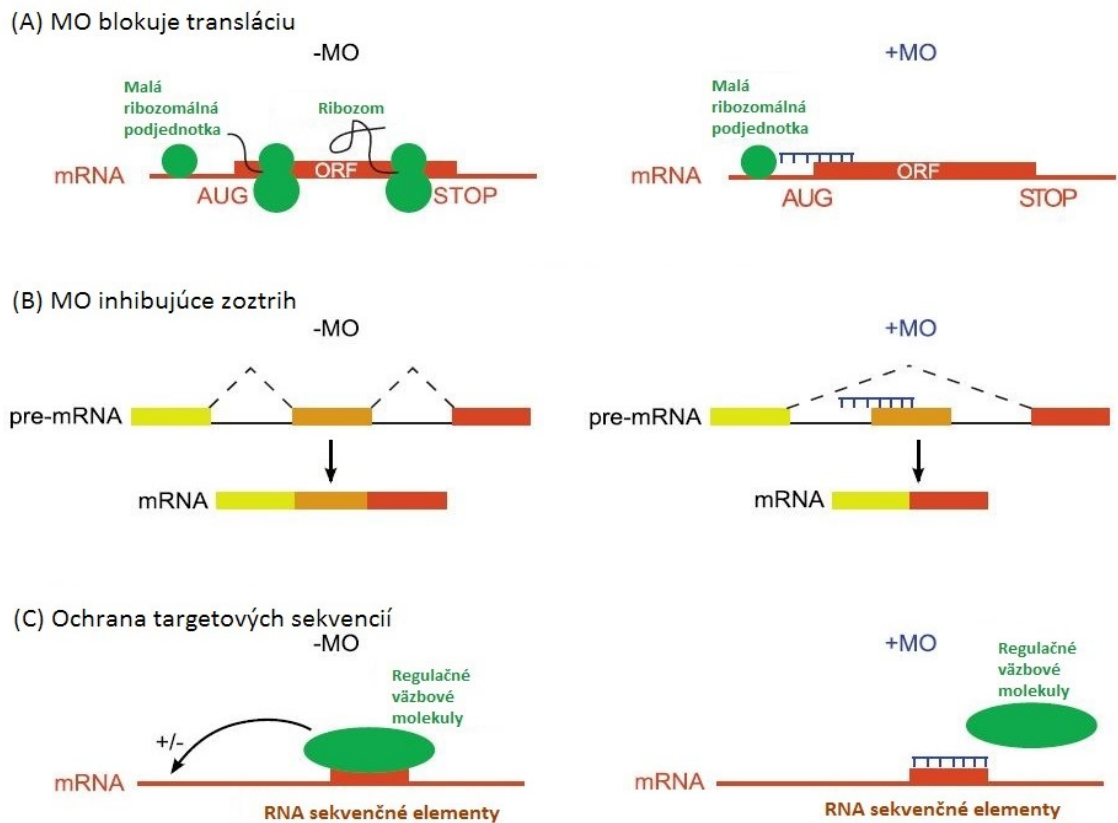
Obrázok 3: Porovnanie štruktúry DNA a morfolínových oligonukleotidov (MO).

Morfolínový oligomér obsahuje kostry morfolínových kruhov spojené fosfordiamidátovými väzbami. Ribózový prsteň sa otvára oxidáciou, znovu sa uzatvára pomocou amoniaku za vzniku substituovanej morfolínovej skupiny. Fosfordiesterové väzby sú medzi podjednotkami nahradené fosfordiamidátovými väzbami. *R* a *R'* znamenajú pokračovanie oligomérneho reťazca v smere 5' alebo 3'. Prevzaté a upravené podľa (Corey and Abrams, 2001).

Po naviazaní Morfolín môže dôjsť k zablokovaniu miesta začiatku translácie (Obr. 4(A)). Transláciu blokujúce MO sa viažu komplementárne na mRNA sekvenciu v 5' neprekladanej oblasti (UTR) blízko začiatku translácie, kde bránia naviazaniu malej ribozómálnej podjednotky, alebo sa viažu na sekvenciu prechádzajúcu štart kodónom mRNA (Summerton, 1999). Morfolína namierené proti kódujúcej oblasti nemajú žiadny účinok, pravdepodobne preto, že ribozómy sú ich schopné odstrániť z mRNA (Hardy et al., 2010). Translačné MO môžu inhibovať maternálnu aj zygotickú transláciu (Nasevicius and Ekker, 2000).

Okrem iného, Morfolína môžu ovplyvňovať aj maturáciu mRNA. MO blokujúce správny zostrih pre-mRNA pracujú na základe inhibície komponentov, ktoré sú potrebné k správne zostrihnutiu pre-mRNA. Nesprávne začlenenie intrónu, alebo preskočenie exónu často vedie k vzniku nezmyselných transkriptov a predčasnému ukončeniu transkripcie (Obr. 4(B)). Tento druh MO inhibujú zygotickú transláciu a môže byť využitý na štúdium špecifických izoform zostrihových variant. (Morcos, 2007).

Tretím možným mechanizmom funkcie MO je ochrana cieľových sekvencií, ktoré sú inak rozpoznávané malými regulačnými molekulami ako je napríklad miRNA alebo RNA väzbové proteíny (Obr. 4(C), Choi et al., 2007).



Obrázok 4: Mechanizmy funkcie Morfolín (MO).

Prírodný proces translácie v neprítomnosti MO (vľavo). Blokácia translácie mRNA po naviazaní MO do jej nekódujúceho miesta (5'UTR) a zabránenie nasadeniu malej ribozomálnej podjednotky (vpravo, A). Normálne zoztrihovanie pre-mRNA (vľavo). Hybridizácia MO s pre-mRNA spôsobuje preskočenie exónu (oranžová) počas zoztrihu, pretože nedochádza k jeho rozpoznaní (vpravo, B). Správne rozpoznanie sekvencie mRNA pomocou malých väzbových molekúl (vľavo). Blokovanie sekvencie mRNA MO nukleotidami a zamedzenie väzby malých väzbových molekúl (vpravo, C). Prevzaté a upravené podľa (Hardy et al., 2010).

Výsledný neutrálny náboj a relatívne malá veľkosť pomáha k difúznemu šíreniu injikovaných Morfolín v rámci embrya. MO sú zvyčajne injikované do žltka odkiaľ sa šíria do buniek, ktoré sú so žltkom prepojené do 8 bunkového štádia. Účinnosť MO je regulovaná väzobnou afinitou. V dôsledku mitotických aktivít dochádza k riedeniu MO v jednotlivých bunkových líniiach a poklesu ich účinnosti. MO sú mimoriadne účinné počas prvých 50 hpf, ale účinky boli pozorované aj pri 5 dpf (Bill et al., 2009). Kinetika a aktivita proteínov je ďalším faktorom, ktorý môže obmedziť účinnosť MO. Väčšina MO knock down experimentov je neúplná, a preto môže dôjsť k formovaniu malého množstva proteínov (Eisen and Smith, 2008).

Antisense oligonukleotidy poskytujú sľubný prístup k skúmaniu génovej funkcie in vivo, ale ich schopnosť ponúknuť jednoznačné fenotypové výsledky je diskutabilná. Okrem toho, MO môžu indukovať p53-závislu apoptózu (Pickart et al., 2006; Robu et al., 2007) a nepresné cielenie na špecifické bunkové typy vedúce k zmenám v génovej expresii, ktoré obmedzujú fenotypovú analýzu (Gerety and Wilkinson, 2011).

Kok et al. (2015) vo svojej štúdií využil nástroje pre špecifickú génovú manipuláciu u zebričky a indukoval mutácie vo viac ako 20 génoch. U polovice testovaných génov, u ktorých bola potvrdená špecifita MO rescue experimentom, nedošlo k získaniu publikovaných fenotypov u morfantov. Autori predpokladajú, že za týmito výsledkami stojí práve nešpecifické celenie Morfolín na požadovaný gén. Tieto pozorovania naznačujú, že účinky MO mimo ich cieľ sú omnoho rozšírenejšie, ako bolo doteraz uvádzané. Autori zároveň zdôrazňujú potrebu prehodnotiť používanie antisense technológie pre charakterizáciu gérovej funkcie u zebričky a kladú dôraz na využívanie cielenej mutagenézy. (Kok et al., 2015).

Génové manipulácie pomocou nukleáz sľubujú revolúciu vo vývojovej biológii, ale podľa Blum et al. (2015) by zákaz používania MO spôsobil veľkú škodu vo vývojovej biológii a v neposlednej rade výskumnej komunite vedcov zameraných na zebričky, kde je väčšina získaných dát založená na využívaní Morfolín.

1.2.2. Nukleázové modifikácie genómu

Pokroky v oblasti genómového inžinierstva umožňujú vytvárať modifikácie sekvencií DNA s vyššou účinnosťou a špecifitou, a to všetko vďaka programovateľným nukleázam celeným na požadované miesto. Spoločne s opravnými mechanizmami DNA sa tieto endonukleázy stali mocným molekulárnym nástrojom, ktorý môže indukovať miestne špecifické dvojreťazové zlomy (DSB) vo vybranom chromozomálnom lokuse.

Oprava DSB má nesmierne dôležitý význam pre zachovanie genómovej integrity. Homologická oprava (HDR) a nehomologické spájanie koncov (NHEJ) sa považujú za dve hlavné cesty, ktorými môže dôjsť k opravám DSB. HDR zaisťuje presnú opravu DNA pomocou nepoškodenej sesterskej chromatídy alebo homológnej templátovej DNA. Alternatívne môže byť HDR využitá na zavedenie templátu donorovej DNA, čo vedie k zavedeniu požadovaných sekvenčných modifikácií do vopred určeného miesta (knock in). Oproti tomu NHEJ je najpriamejšou cestou pre opravu DSB, pretože reťazce sú jednoducho spojené bez ohľadu na genetické sekvencie pred vznikom DSB, ale takéto opravy vedú k inaktiváciám (knock out) génu. Spájanie koncov pomocou mikrohomológie (MMEJ), je menej charakterizovaný opravný mechanizmus známy aj ako alternatívny NHEJ. Považuje sa za proces, ktorý je sprostredkovaný párovaním báz medzi mikrohomologickými sekvenciami veľkými približne 2–25 nukleotidov. (He et al., 2015).

Miestne špecifické nukleázy (SSN) - ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9 umožnili molekulárnym biológom špecificky a trvalo meniť genóm rastlín a ďalších organizmov. Tieto nukleázy boli použité na získanie širokej škály zmien v DNA, vrátane malých inzercií

a delécií, ale aj ku korekcii genómových mutácií (Christian et al., 2010; Mali et al., 2013; Shukla et al., 2009).

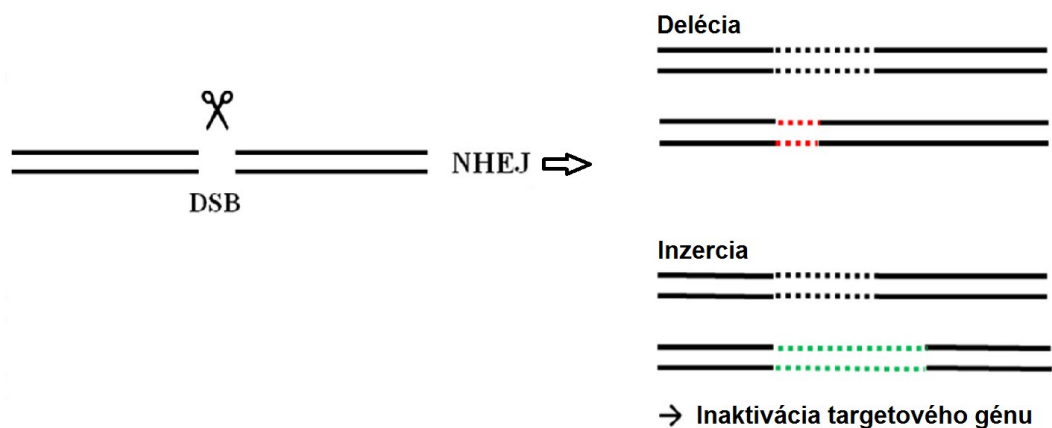
Nukleázy zinkových prstov (ZFN) boli prvými navrhnutými SSN (Kim et al., 1996) a spustil cielečné úpravy genómu. ZFN sa generujú sfúzovaním proteínov zinkových prstov (ZFP), patria do skupiny DNA väzbových motívov s nešpecifickou štiepnou doménou prereštrikčný enzým FokI.

Efaktorové nukleázy podobné transkripčným aktivátorom (TALEN) boli navrhnuté ako alternatíva k ZFN (Boch and Bonas, 2010). Ide o DNA väzbové domény odvodnené z rastlinnej patogénnej baktérie rodu *Xanthomonas*. (Govindan and Ramalingam, 2016).

2.1.1.1 Crispr/Cas9 systém

CRISPR/Cas9 systém, je adaptívny imunitný systém u množstva baktérií a archeí, ktorý poskytuje rezistenciu proti cudzím genetickým elementom ako sú vírusy a plazmidy. Ide o zhluk nahromadených pravidelne rozmiestnených krátkych palindromatických repetícií, kde je každá z týchto repetícií nasledovaná krátkymi segmentmi spacer DNA, ktorá bola inkorporovaná pri predchádzajúcom stretnutí s DNA elementmi. Pri opätovnom napadnutí rovnakým organizmom dôjde k rozpoznaniu invazívnej DNA a jej interferencii. (Horvath and Barrangou, 2010).

Ako jedna z posledných SSN, bol navrhnutý CRISPR /Cas9 mechanizmus, odvodený od bakteriálneho obranného systému, založený na RNA - navadzajúcich nukleázach (sgRNA) (Jinek et al., 2012). Komplex sgRNA a *Streptococcus pyogenes* Cas9 endonukleázy sa viaže na komplementárnu DNA sekvenciu, čo vedie k špecifickému štiepeniu DNA Cas9 endonukleázou. Zámenou 20 bp sgRNA sekvencie, dôjde k presmerovaniu na inú cieľovú DNA sekvenciu, ktorá má byť štepená (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013). K inaktivácii génov dochádza prostredníctvom malých inzercíí alebo delécií (indolov) zavedených počas opravy štiepenej DNA nehomologickým spájaním koncov (NHEJ, Obr. 5), čo spôsobuje posun čítacieho rámca a prítomnosť predčasných stop kodónov (Hwang et al., 2013).

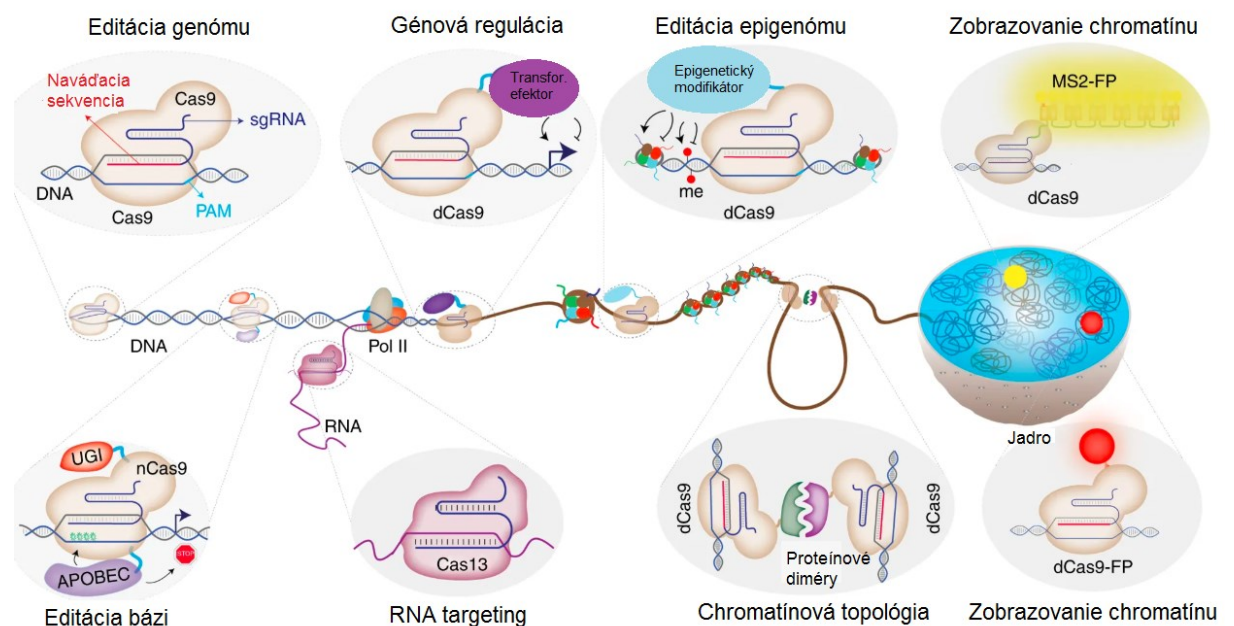


Obrázok 5: Editáciu genómu vedúca k inaktivácii génu.

K inaktivácii génu dochádza nehomologickým spájaním koncov (NHEJ) po vytvorení dvojreťazcových zlomov (DSB) DNA. Počas nehomologickej opravy DNA, môže dôjsť k zavedeniu delécie alebo inzercii a tým k posunu čítacieho rámca. Prevzaté a upravené podľa (Hryhorowicz et al., 2017).

CRISPR/Cas9 systém pozostáva z troch zložiek; Z Cas9 endonuklézy, ktorá pôsobí ako DNA senzor a spôsobuje dvojreťazcové prerušenie DNA. CrRNA (CRISPR RNA) je dlhá približne 20 až 50 nt a tracrRNA (transaktivujúca crRNA), ktorá pozostáva zo 75 až 171 nukleotidov (Obr. 6). CrRNA a tracrRNA sú malé RNA molekuly, ktoré sa spoločne podieľajú na navigácii Cas9 na špecifické cieľové miesto v genóme. TracrRNA, je dôležitá pri interferencii Cas9 s DNA. Baktérie a archea rozpoznávajú cudzorodú dna na základe získanej imunity po predchádzajúcej inkorporácii tejto DNA do malých segmentov nazývaných protospacer, ktoré sú následne integrované do CRISPR lokusov v hostiteľskom genóme. Protospacer sekvencie po inkorporácii do CRISPR lokusov vytvoria jedinečné spacer miesta obklopené dvoma opakujúcimi sa sekvenciami. Expresiou a transkripciou CRISPR dochádza k vzniku veľkého množstva crRNA. Práve inkorporácia spacer DNA umožňuje následne crRNA rozpoznávať invazívnu DNA. S prítomnosťou tracrRNA, ktorá sa viažena crRNA dochádza k vytvoreniu chimerickej sgRNA, ktorá naviguje Cas9 na invazívnu DNA. Invazívna DNA je potom štiepená na menšie kusy. Schopnosť systému zacieliť invazívnu DNA taktiež vyžaduje prítomnosť krátkych trojnukleotidových sekvencií, štandardne ide o NGG motív, kde N môže byť adenín, tymín, guanín alebo cytozín. Tento krátky motív sa nazýva susedný motív protospaceru (PAM). (Obr.6, Xu, 2013).

CRISPR/Cas9 sa stal vďaka jeho robustnosti a flexibilitě všestranným aplikačným nástrojom nielen pre možnosť úpravy genómu, ale aj možnosť mnohých ďalších genómových a chromatinových úprav vid'. Obr.7. Alternatívne možnosti použitia tohto systému sú možné kvôli programovateľnej targetovej kapacite katalyticky inaktívnej Cas9 (dCas9), ktorá neštípe DNA, ale stále je schopná byť navigovaná na cieľovú sekvenciu (Jinek et al., 2012). CRISPR-Cas9 má dve katalytické domény (HNH a RuvC), ktoré spolu pôsobia a sprostredkovávajú dvojreťazcové zlomy DNA (Nishimasu et al., 2014). Každá z týchto katalytických domén štípe jeden reťazec DNA, výsledkom čoho sú DSB. Bodová mutácia v ktorejkoľvek z týchto domén vedie k štiepeniu len jedného vlákna DNA, zatiaľ čo mutácie v oboch doménach vedú k úplnej strate aktivity štiepenia (Jinek et al., 2012).



Obrázok 7: Oblasť využitia technológií založených na CRISPR-Cas.

Nepoškodená Cas9 umožňuje editáciu genómu prostredníctvom svojej aktivity štiepenia DNA (A). Enzymy Cas9 s poškodenou katalytickou aktivitou boli využité na génovú reguláciu, kde Cas9 fúzuje s trans-efektorom a reguluje promotorovú aktivitu (B), na editáciu epigenómu, kde Cas9 fúzuje s epigenetickým modulátorom za účelom modifikácie histónov alebo DNA (C), nazobrazovanie chromatinu, kde Cas9 aktivovaná sgRNA viaže MS2 proteíny značené fluorescenčným proteínom (D). Okrem toho katalyticky inaktívna Cas9 bola využitá na editáciu bázy bez prerušenia dvojreťazca DNA pomocou nikázy Cas9 fúzovanou s APOBEC1 (deaminázový enzým) a inhibítorom Uracyl glykozylázy (UGI)), proteínový multikomplex je schopný konvertovať cytozín na tymín (E). CRISPR technológia umožňuje zacielenie RNA pomocou Cas13 (F), Chromatinový topologický prístup môže zmeniť vzdialenosť enhancera a promótora a môže dôjsť k presunu enhancera z umlčaného úseku regionu aktívneho chromatinu (G). Posledná je technika zobrazovania chromatinu a je založená na dCas9 fúzovanom s fluorescenčným proteínom, ktorý sa využíva na označenie cieľových lokusov (H). Prevzaté a upravené podľa(Adli, 2018).

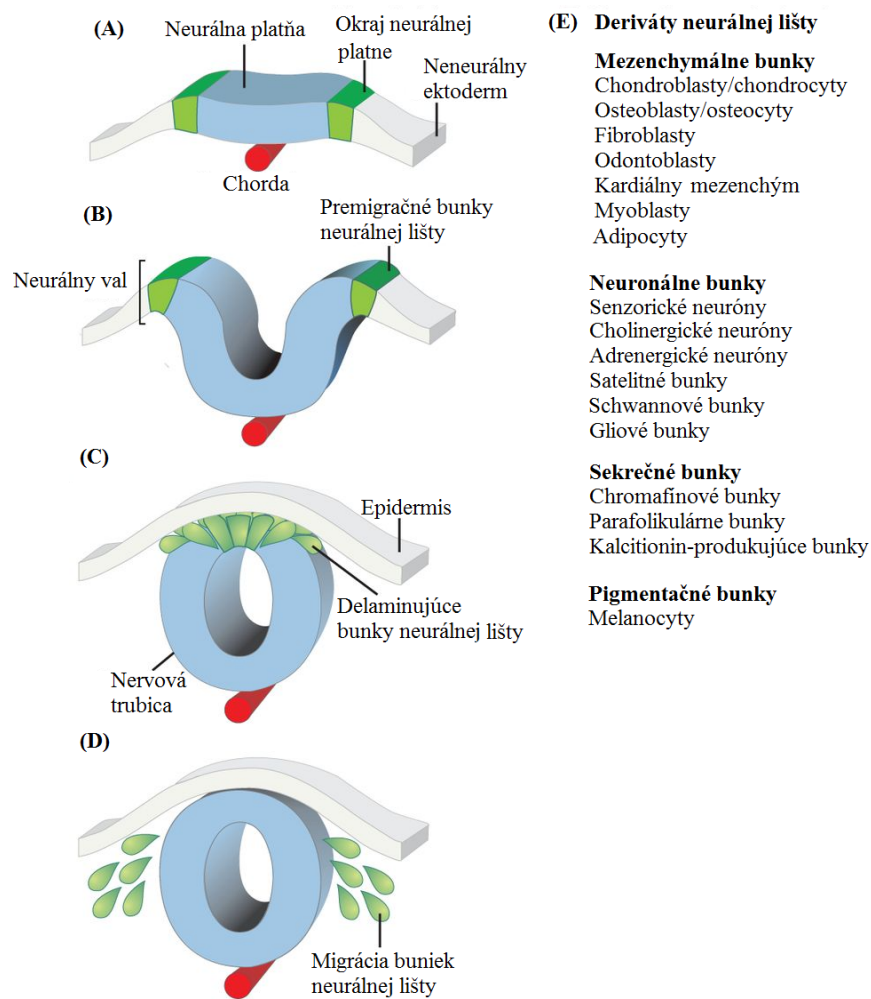
1.3. Neurálna lišta

Neurálna lišta (NL) bola prvýkrát popísaná v roku 1868 na modely kurat'a Wilhelmom Hisom ako skupina migrujúcich buniek z priestoru medzi neurálnou trubicou a budúcim epidermálnym ektodermom. Ide o populáciu multipotetných migrujúcich buniek, ktoré sú unikátne pre embrya stavovcov. K jej vzniku dochádza na laterálnom okraji neurálnej platne. Bunky neurálnej lišty migrujú cez embryo a dávajú vznik širokej škále bunkových typov ako napríklad periférnym a enterálnym neurónom a gliám, tvárovým chrupavkám a kostiam, hladkým svalom a pigmentovým bunkám. Bunky neurálnej lišty (NCC) sa stali predmetom veľkého záujmu zo strany embryológov práve vďaka ich ďalekosiahlym migračným schopnostiam a vývojovej plasticite, aj preto sú niekedy označované ako štvrtý zárodočný list (Hall, 2000). Štúdie, hneď na niekoľkých modelových organizmoch (myš, kura, *Xenopus*, zebrička) preukázali, že k aktivácii komplexných signálnych génov dochádza na hranici neurálnej platne v dôsledku reakcie na indukčné signály neurálnej lišty. (Huang and Saint-Jeannet, 2004).

1.3.1. Formovanie neurálnej lišty

Na konci gastrulácie dochádza k vzniku neurálnej lišty, ktorá je indukovaná viacstupňovým procesom, začínajúcim sa v štádiu gastruly a pokračujúcim až do uzavretia neurálnej trubice. Neurálna platňa obsahuje multi-progenitorové bunky, ktoré sú schopné dať vznik bunkám neurálnej lišty (Meulemans and Bronner-Fraser, 2002; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008), ale aj ektodermálnym plakoidom, epidermálnym bunkám alebo sensorickým neurónom centrálného nervového systému (Groves and LaBonne, 2014). Bunky neurálnej lišty sú indukované v ektodermálnej zárodočnej vrstve počas gastrulácie. Na začiatku sú lokalizované na okraji neurálnej platne (Obr. 8(A)). Počas neurulácie sa neurálne valy uzatvárajú, spojením neurálnych valov v dorzálnej stredovej línii dôjde k vzniku neurálnej trubice (Obr. 8(B,C)). Všeobecné princípy neurulácie a vývoja nervového hrebeňa sú do veľkej miery konzervované. Avšak, v rámci druhov existujú aj špecifické rozdiely. U rýb nie je neurálna platňa len striktne epiteliálna, stretávame sa tu s označením takzvanej „sekundárnej neurulácie“, ktorá je lokalizovaná do najviac posterionálneho neurálneho tkaniva, ktoré okrem iného obsahuje aj mezenchymálne bunky, podieľajúce sa na formovaní neurálnej trubice (Papan and Campos-Ortega, 1994).

Bunky neurálnej lišty následne podstupujú epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu (EMT), ktorá im umožní delaminovať z neuroepitelu a migrovať cez embryo (Obr. 8(C)), čo vedie k ich transformácií na migračnú multipotentnú progenitorovú bunkovú populáciu (Obr. 8(D)). Táto populácia buniek podstupuje zároveň najrozsiahlejšiu migráciu zo všetkých embryonálnych kmeňových buniek, často dochádza k migrácii na veľké vzdialenosti po vysoko stereotypných dráhach. Schopnosť segregácie a migrácie od neuroepitelu je jednou z jedinečných vlastností buniek neurálnej lišty. (Huang and Saint-Jeannet, 2004).



Obrázok 8: Vývoj neurálnej lišty a formovanie jej derivátov.

Vývoj neurálnej lišty začína v procese gastrulácie, kde dochádza k špecifikácii okrajov neurálnej platne (A). Počas uzatvárania neurálnych valov sú progenitory neurálnej lišty špecifikované na ich dorzálnu stranu (B). Po špecifikácii, bunky neurálnej lišty podstupujú epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu (EMT) a dochádza k ich delaminácii z neurálnej trubice (C). Migrujúce bunky neurálnej lišty migrujú po stereotypných dráhach do rôznych destinácií, kde dávajú vznik množstvu derivátov (D). Neurálna lišta má multipotentný charakter a je schopná dať vznik rôznym typom buniek vrátane buniek mezenchymálnych, neuronálnych, sekrečných a pigmentačných. Prevzaté a upravené podľa (Simões-Costa and Bronner, 2015).

1.3.2. Bunky neurálnej lišty

Medzi vlastnosti neurálnej lišty patrí schopnosť generovať mnohonásobné bunkové línie. Bunky neurálnej lišty sú lokalizované v dorzálnej časti uzatvárajúcich sa neurálnych valov a iniciujú expresiu génov neurálnej lišty ako *FoxD3* (Labosky and Kaestner, 1998) a *Sox10* (Southard-Smith et al., 1998), ktoré iniciujú ich špecifikáciu.

Telová osa je rozdelená na jednotlivé regióny smerom od anterioru k posterioru, čo sa odráža v subpopuláciách NCC, ktoré tvoria odlišné sady derivátov (Obr. 9).

Bunky hlavovej NL prúdia dorzolaterálne a dávajú vznik tvárovým chrupavkám, vrátane hornej a dolnej čeluste, jazyky, takisto aj gliám a niektorým neurónom senzorických hlavových ganglií (Couly et al., 1998, Obr. 9).

Tesne pod hlavou sa nachádzajú bunky vagovej NL, ktoré spoločne so sakrálnymi bunkami prúdia smerom do srdcového traktu a enterických ganglií čriev. Vagové bunky sú lokalizované blízko somitov 1-7 a bunky sakrálnej NL sú lokalizované posteriórne od somitu 28. (Creazzo et al., 1998, Obr. 9).

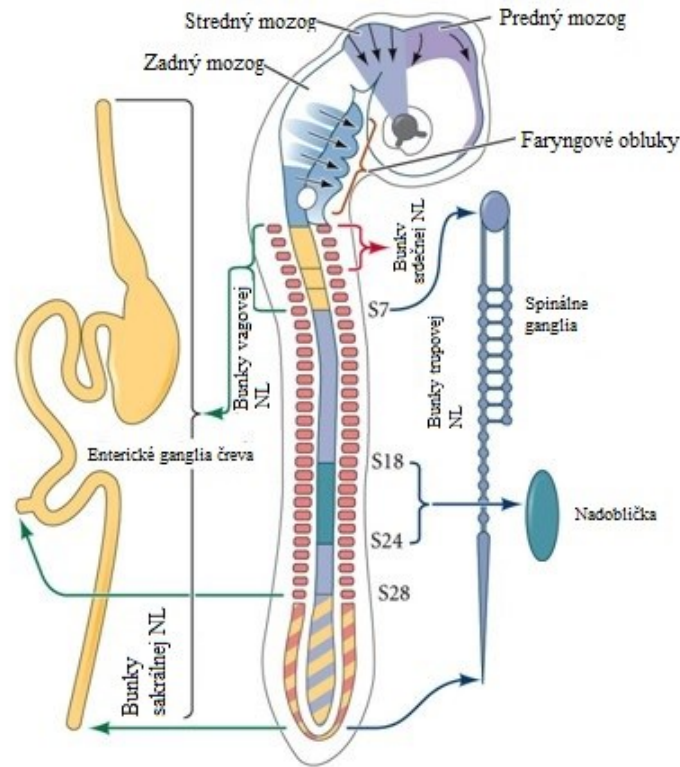
Medzi bunkami hlavovej a trupovej NL sú lokalizované bunky srdečnej NL, ktoré okupujú priestor somitov 1-3 a prekrývajú tak oblasť okupovanú bunkami vagovými (Kirby and Hutson, 2010). Tento typ buniek NL môže diferencovať do neurónov, melanocytov, chrupaviek a spojivových tkanív a tiež do 3,4 a 6 faryngového obluku. Okrem toho, srdečné NCC môžu vytvárať arteriálne spojivové tkanivo a podieľať sa na vytváraní septa, čím dochádza k oddelení pľúcnice a aorty (Le Lièvre and Le Douarin, 1975).

Bunky trupovej NL prúdia ventrolaterálne v segmentálnych štruktúrach cez somity smerom k spinálnym gangliám (Obr. 9). Bunky neurálnej lišty, ktoré neostávajú v sklerotómoch prúdia viac ventrálne a podieľajú sa na formovaní sympatických ganglií periférneho nervového systému, ktoré zahŕňajú senzorické neuróny (Le Douarin and Smith, 1988). Trupovo špecifické deriváty neparticipujú na vytváraní chrupaviek ani kardiovaskulárneho systému ako to bolo u predošlých bunkových populácií (Le Lièvre and Le Douarin, 1975).

Kožné pigmentové bunky a periférne glie pochádzajú zo všetkých axiálnych úrovni NCC. (Simões-Costa and Bronner, 2015).

Abnormálny vývoj neurálnej lišty, skrz účasť buniek neurálnej lišty na mnohopočetných migrujúcich bunkových líniach, môže mať dramatický dopad na mnoho orgánových systémov. Patológia známa ako neurokristopatie, porucha vývinu NCC (Bolande, 1997), zahŕňa Waardenburg - Shahov syndróm (hyperpigmentácia), frontonazálnu dysplaziu

(viacnásobné kraniofaciálne poruchy), DiGeorgeho syndróm (kraniofaciálne poruchy a srdcové defekty). Preto, je dôležité skúmanie a pochopenie mechanizmu, formovania a diverzifikácie neurálnej lišty.



Obrázok 9: Regióny neurálnej lišty u kurat'a.

Bunky hlavovej neurálnej lišty (NL) migrujú do faryngových oblukov a formujú kosti a chrupavky hlavy, taktiež glie a niektoré neuróny senzorických hlavových ganglií. Bunky vagovej NL (v blízkosti somitov 1-7) a bunky sakrálnej NL (posteriorne od somitu 28) prúdia smerom do srdcového traktu a enterických ganglií čriev. Bunky srdcovej NL migrujú zo somitov 1-3 a podieľajú sa na vytváraní septa, čím dochádza k oddelení pľúcneho výtoku a aorty. Bunky trupovej NL (od 6 somitu) formujú sympatické gangliá a periférny nervový systém, okrem toho sa časť z nich (somity 18-24) formuje dreň nadobličiek. Prevzaté a upravené podľa (Gilbert, 2003).

1.3.3. Regulácia buniek neurálnej lišty

Predpokladá sa, že vývoj neurálnej lišty je pod kontrolou skupiny transkripčných faktorov a epigenetických aspektov, ktoré sú usporiadané hierarchicky, v génových regulačných kaskádach. Najskôr dochádza k expresii génov, ktoré regulujú okraj neurálnej platne. Výsledkom je séria pozitívnych regulačných interakcií, ktoré ústia k vytvoreniu domény prekrývajúcej expresiu génov špecifických pre okraj neurálnej platne. Nakoniec, zohrávajú dôležitú úlohu inhibičné interakcie medzi neurálnymi a neneurálnymi transkripčnými faktormi, čím dochádza k presnejšiemu vymedzeniu týchto hraníc a tiež k vzniku progenitorovej domény, ktorá má regulačné schopnosti odlišné od neurálnej platni a neneurálneho ektodermu. Výstupom z týchto signálnych dráh je nastolenie regulačného stavu,

ktorý je schopný oddeliť bunky neurálnej lišty od ostatných ektodermálnych domén. (Simões-Costa and Bronner, 2015).

Za posledné desaťročie bolo vynaložené veľké úsilie na skúmanie signálnych molekúl zapojených do indukcie neurálnej lišty. Preukázala sa účasť najmenej štyroch signálnych dráh zapojených do tohto procesu. Medzi ne patria signálne kaskády kostných morfogenetických proteínov (BMP), WNT signálna kaskáda a signálna kaskáda fibroblastových rastových faktorov (FGF), novšie aj signálne dráhy Notch / Delta (Obr. 10). Prvý, z týchto regulačných krokov sa objavuje počas gastrulácie kedy dochádza k indukcii neurálnej platne, kedy FGF pôsobí v súlade s inhibítormi (noggin, chordin, follistatin) BMP a WNT signálnou kaskádou, čo ústi do aktivácie expresie neurálnych génov ako *Erni*, *Otx2* a *Sox1/3* (Streit et al., 2000). WNT a BMP signálne dráhy pochádzajú z laterálnych oblastí embrya, zatiaľ čo inhibítory týchto dráh sú sekretované zo stredných oblastí embrya, napríklad z domény neurálnej platne. Gradient aktivity WNT a BMP je ustanovený rovnováhou medzi ich aktivačnými a inhibičnými signálmi, to znamená, že bunky budúceho okraja neurálnej platne sú vytvárané v zónach so strednou aktivitou WNT a BMP (Groves and LaBonne, 2014). Delta pravdepodobne blokuje expresiu markerov neurálnej lišty, čo naznačuje, že Notch dráha hrá úlohu vo formácii neurálnej lišty, pravdepodobne cez down-reguláciu BMP4 v ektoderme, čo vedie k expanzii progenitorov neurálnej lišty (Glavic et al., 2004).

Niektoré cis-regulačné gény sa ukázali ako priame modulátory okraja neurálnej platne, ktoré sú aktivované počas skorej gastrulácie (Obr. 10). Niektoré gény, ktoré regulujú okraje neurálnej platne sú exprimované vo viacerých mediálnych doménach iné sú exprimované viac laterálne. Gén *Zic1* je exprimovaný v neurálnej platni a zohráva úlohu v neurálnej indukcii, zatiaľ čo *Tfap2a* je aktívny v prospektívnej epidermis (Li and Cornell, 2007). Expresia génov, ktoré špecifikujú okraj neurálnej platne ovplyvňuje ďalej osudy bunkových progenitorových populácií.

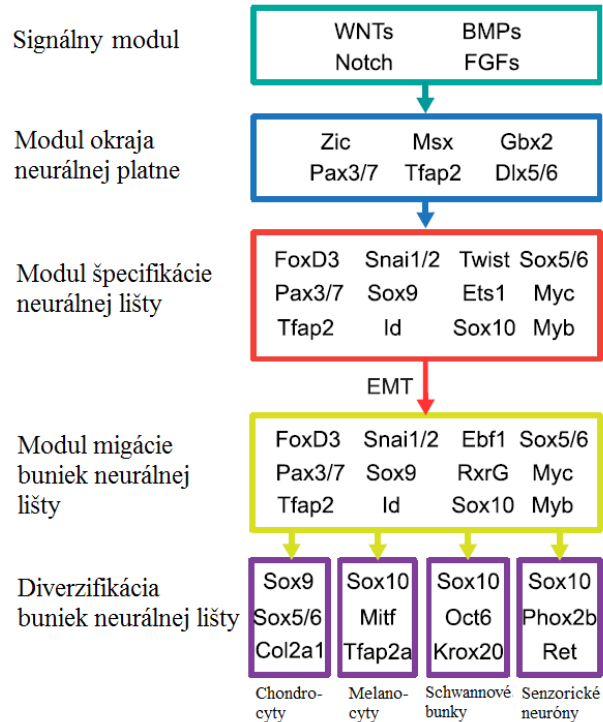
V procese, ktorý je známy ako špecifikácia neurálnej lišty dochádza ku kumulácii markerov ako *FoxD3*, *Snai1/2* and *Sox8/9/10*. Po tom ako je neurálna lišta špecifikovaná, dôjde k radikálnym génovo regulovaným zmenám, ktoré umožňujú ETM a iniciujú migráciu buniek spolu s ich diverzifikáciou.

Vývin neurálnej lišty z okrajov neurálnej platne je riadený spoločným pôsobením viacerých špecifikátorov (Obr. 10) a signálnych dráh. Ako prvé sú vo vznikajúcej neurálnej lište exprimované *FoxD3*, *Ets1* a *Snai1/2* (Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009). Expresia *FoxD3*, tak ako aj expresia *Ets1*, je regulovaná *Pax3/7* a *Msx1*, čo preukazuje ich dôležitosť počas ranných fáz špecifikácie neurálnej lišty (Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009). *Tfap2a*

pravdepodobne pôsobí ako dôležitý transkripčný faktor v neurálnej špecifikácii, reorganizujúci chromatinovú konformáciu a zabezpečuje tak prístup iných transkripčných regulátorov. Taktiež aj ďalšie gény exprimované v neurálnej platni, ako napríklad *Myb*, *Myc* a *Prdm1* sú zapojené do špecifikácie neurálnej lišty. (Simões-Costa and Bronner, 2015). V tejto fáze, premigračné bunky neurálnej lišty exprimujú celú sadu špecifikujúcich génov (*FoxD3*, *Snai2*, *Ets1*, *Sox8/9/10* a *Pax3/7*) ako aj niektoré gény modulujúce okraj neurálnej platne (*Tfap2*, *Msx1*, *Zic1*). Tento nastolený regulačný stav iniciuje delamináciu buniek neurálnej lišty cez ETM (Simões-Costa and Bronner, 2015).

Epitelovo-mezenchymálna tranzícia (ETM) je proces, pri ktorom dochádza k štruktúrnym zmenám v premigračných bunkách neurálnej lišty, ktoré sú kontrolované stovkami efektorových génov. ETM je dvojstupňový proces, ktorý v prvom rade vedie k delaminácii buniek NL z neurálnej trubice, v druhom rade sú tieto delaminujúce bunky zapojené do získania mezenchymálnych vlastností a migračnej morfológie. Do ETM sú zapojené signálne dráhy, ako je WNT signalizácia cez transkripciu a post-transkripčnú reguláciu *Snai1 / 2* (Yook et al., 2006). V procese ETM dochádza k porušeniu adhezívnych spojov, umožňujúcich segregáciu. Transkripčná regulácia kadherínov je centrálnym procesom v ETM, kde dochádza k prepínaniu medzi typom 1 kadherínu (ako napríklad *Ecad*, *Ncad*) a typom 2 kadherínu (*Cad7*, *Cad11*). Predpokladá sa, že niekoľko génov, ktoré špecifikujú NL sa podieľa aj na regulácii kadherínov počas ETM.

Po delaminácii, migrujúce NCC získavajú nový regulačný stav, exprimujú množstvo transkripčných faktorov dôležitých pre ich migráciu a iniciujú diferenciačné programy, ktoré vedu k odlišným derivátom (Obr. 10). Niektoré špecifikujúce gény NL, ako napríklad *FoxD3*, *Ets1* a *Sox8 / 9/10* ostávajú zachované v migrujúcich bunkách (Betancur et al., 2010). Migrujúce NCC sú nepretržite vystavované rôznym enviromentálnym signálom a tak sa diferencujú na širokú škálu derivátov. (Simões-Costa and Bronner, 2015).

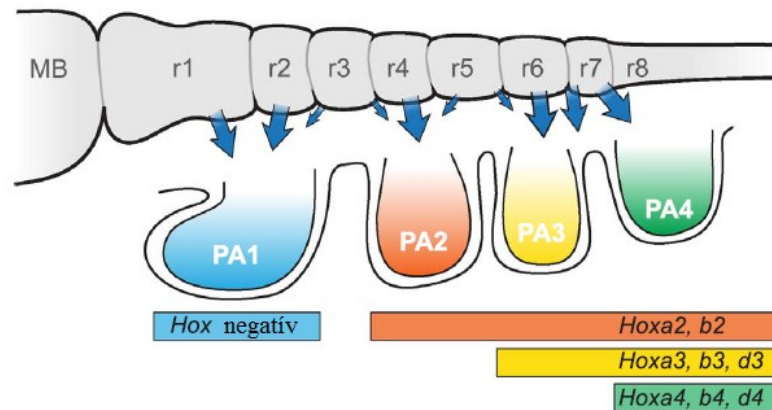


Obrázok 10: Génová regulačná sieť (GRN) pre formovanie buniek neurálnej lišty.

Náčrt GRN kontrolujúcej vývoj neurálnej lišty. K tvorbe embryonálneho ektodermu dochádza cez rôzne signály, ktoré indukujú expresiu špecifických génov, pre formovanie okraja neurálnej platne, čím dochádza k tvorbe jej hraníc. Tieto gény sa navzájom pozitívne regulujú a tiež vedú k špecifikácii neurálnej lišty prostredníctvom aktivácie špecifikátorov neurálnej lišty. Tento špecifikačný program vedie k aktivácii epitelo-mezenchymálnej tranzície (ETM), ktorá umožňuje migráciu buniek neurálnej lišty. Migrujúce bunky neurálnej lišty exprimujú súbor regulátorov ktoré im dávajú schopnosť pohybovať sa a iniciovať rôzne diferenciačné programy. Prevzaté a upravené podľa (Parker et al., 2018).

Vo vyvíjajúcom sa embryu, pôsobia opozitné gradienty hlavných signálnych dráh ako je dráha retinovej kyseliny (RA), FGF, WNT, ktoré iniciujú usporiadanie a uhniesenie génových exprimačných domén pozdĺž hlavovo-chvostovej osi v nervovom systéme (Deschamps and van Nes, 2005). Takéto usporiadanie spúšťa interakcie medzi transkripčnými faktormi, ktoré vytvárajú pásy génovej exprese a tie určujú budúce hranice rhombomér (Parker et al., 2016). *Hox* gény sa účastnína týchto kaskád, pretože poskytujú priame odpovede na RA signalizáciu, ktorá je zodpovedná za uhniesenie génových exprimačných domén, interagujú so segmentačnými génmi a tak ovplyvňujú formovanie rhombomér (Obr. 11) a zároveň sa podieľajú na auto a medzi-regulačných interakciách dôležitých pre udržanie segmentačnej exprese a špecifikácií ich identity. Kľúčovým rysom tohto procesu je vytvorenie línie s určitými kompartmentami alebo segmentami, každá s expresiou unikátnych *Hox* génov, čo ústi do formovania hlavovo-chvostovej osi, dôležitej pre formovanie regionálnych variácií v zadnom mozgu. Počas segmentácie zadného mozgu, delaminujúce bunky neurálnej lišty migrujú vo vyhradených prúdoch za účasti *Hox* génov a osídľujú jednotlivé faryngové oblúky. Špecifické rhomboméry prispievajú odlišne do jednotlivých

prúdov, napríklad najviac NCC, ktoré migrujú do prvého faryngového oblúku (PA1) vzniká z druhej mezoméry stredného mozgu, zatiaľ čo do PA2 prúdia bunky prevažne z rhomboméry 4 (Obr. 11). (Parker et al., 2018).



Obrázok 11: Schematické znázornenie expresie Hox génov a migrácie buniek neurálnej lišty (NCC) do faryngových oblúkov (myš).

Farby jednotlivých faryngových oblúkov (PA1-PA4) odrážajú ich hlavovo-chvostovú identitu, ktorá je špecifikovaná faryngovým Hox kódom. Tmavo modrými šípkami sú znázornené migračné prúdy NCC z rhombomér (r1-r8) do faryngových oblúkov. Vo faryngovom oblúku 1 (PA1) nie sú exprimované žiadne Hox gény (Hox negatív). Exprimácie jednotlivých Hox génov vo faryngových oblúkoch sú znázornené farebne. Prevzaté a upravené podľa (Parker et al., 2018).

1.4. Meis transkripčné faktory

Objav transkripčného faktora Meis (myeloidový ektopický vírový integračný priestor) je spojený s rakovinou a embryonálnym vývojom. Bol objavený ako homeoboxový (HOX) kofaktor u stavovcov aj bezstavovcov, počas experimentov na *D. melanogaster*, kde jeho mutácia spôsobila homeotickú transformáciu a u pacientov videla k urýchleniu progresu HOX-dependentnej leukémie (Moskow et al., 1995; Rieckhof et al., 1997). Štúdie v posledných rokoch odhalili nové molekulárne detaily o fungovaní Meis proteínov v rôznych vývojových prostrediach, avšak veľa z nich nebolo doteraz overených, tak ako nebol úplne preskúmaný ich význam u nádorov.

1.4.1. Rodina Meis proteínov a ich štruktúra

Meis gény kódujú transkripčné faktory, ktoré patria do samostatnej skupiny TALE (predĺženie troch aminokyselínových slučiek) homeodoménových (HD) proteínov a HD využívajú na väzbu s DNA. U TALE proteínov dochádza takmer vždy k predĺženiu motívom prolín-tyrosín-prolín (PYP) (Obr. 12, Mukherjee and Bürglin, 2007). Tieto motívy vytvárajú hydrofóny vak, ktorý umožňuje TALE homeodoménovým proteínom viazať sa na DNA (Saadaoui et al., 2011).

Meis gény patria do rodiny Meinox. Táto rodina génov je prítomná u zvierat ale aj u rastlín, kde sú známe už ako *meis* a *knox* gény. U stavovcov sa rodina Meinox ďalej delí na Meis a Prep rodinu. Cicavce majú tri homológy *Meis* génov (*Meis1*, *Meis2*, *Meis3*) a dva homológy *prep* génov (*Prep1* a *Prep2*). Avšak, u zebričky je týchto génov až päť (*meis1a*, *meis1b*, *meis2a*, *meis2b* a *meis3*) k čomu došlo v procese genómovej duplikácie počas evolúcie (Furutani-Seiki and Wittbrodt, 2004).

Všetky Meis proteíny sú si veľmi podobné, a preto je ich ťažké odlíšiť najmä pri ich overexpresii alebo u experimentov spoliehajúcich sa na detekciu prostredníctvom protilátok. U ľudí a myši je identita Meis1 a Meis2 transkripčných faktorov viac ako 85 %. (Schulte and Geerts, 2019).

Meis proteíny zdieľajú dva spoločné štruktúrne znaky, Meinox homológnu doménu, ktorá je tvorená dvoma alfa helixami, MH-A a MH-B a TALE-HD (Obr. 12.). Okrem toho, všetky Meinox proteíny obsahujú N- a C- domény, produkované alternatívnym splicingom (Obr. 12, Geerts et al., 2005). N-terminálny koniec pravdepodobne nemá žiadnu biochemickú aktivitu, zatiaľ čo C-terminálny koniec plní funkciu transkripčnej aktivačnej domény (Hyman-Walsh et

al., 2010). Meinox proteíny obsahujú aj jadrový exportný signál (NES) a jadrový lokalizačný systém (NLS) (Obr. 12, Kolb et al., 2018).



Obrázok 12: Štruktúra proteínov Meis.

Meinox doména pozostáva z dvoch homológnych alfa-helixov; MH-A a MH-B. Na MH-B doméne je lokalizovaný jadrový exportný signál (NES, znázornený modrou). NES je tvorený sekvenciou aminokyselín LLELEK, ktorá je vysoko konzervovaná a bola nájdená v MH-B doméne u stavovcov aj bezstavovcov v Meis aj Prep proteínoch. TALE (predĺženie troch aminokyselínových slučiek) homeodoména (HD) je taktiež evolučne konzervovaná v tejto rodine a na jej N-konci sa nachádza jadrový lokalizačný signál (NLS, znázornený červenou). Prevzaté a upravené podľa (Schulte and Geerts, 2019).

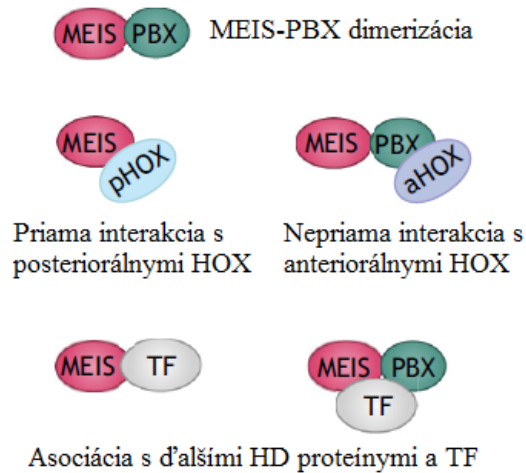
1.4.2. Komplexy interakcie Meis proteínov

Proteíny z rodiny Meinox sú schopné vytvárať heterodiméry s TALE proteínmi PBX1-PBX4, ktoré sú im štruktúrne podobné. K tvorbe heterodimérov dochádza v neprítomnosti DNA prostredníctvom homológne domény lokalizované na N-terminálnom konci (MH-A a MH-B u Meinox a PBC-A a PBC-B u PBX proteínov). (Knoepfler et al., 1997; Shanmugam et al., 1999). Zdá sa, že kooperácia medzi Meis/Prep a Pbx rodinami proteínov je dosiahnutá skrz priame protein-proteínove interakcie (Jolma et al., 2015).

Meis proteíny sa na DNA viažu zvyčajne vo forme vyšších komplexov ako Meis-Pbx heterodiméry, ale zároveň sú významnými kofaktormi posteriorných *Hox* génov na ktoré sa viažu priamymi interakciami. Na základe experimentov na modely zebričky sa predpokladá, že Meis proteíny, ktoré sa viažu na *Hox* proteíny prispievajú k rozvoju správnej segmentačnej identity, konkrétne u rhombomér 2 až 4 (Waskiewicz et al., 2001). Nepriama interakcia Meis je sprostredkovaná medzi Pbx a paralógnou skupinou Antp (Antennapedia) proteínov (Obr. 13, Shanmugam et al., 1999; Williams et al., 2005). Okrem *Hox* a *Pbx* sa na Meis viaže široké spektrum ďalších transkripčných proteínov, či už priamo alebo nepriamo cez *Pbx* proteíny a spoločne sa viažu na DNA (Obr. 13). Väzba Meis proteínu na rovnaké cieľové miesta DNA môže viesť k rôznym funkčným výstupom v závislosti od príspevku zloženia multimérneho transkripčného komplexu, ktorý sa vyskytuje okolo proteínov. Naviazaním Meis proteínov na DNA dochádza k regulácii génovej expzie a dynamiky chromatinovej organizácie.

Meis gény podliehajú rôznym splicingovým variantám, ktoré môžu viesť k odlišnej biologickej aktivite. U cicavcov dochádza k vzniku veľkého množstva zostrihových variant, za zmienku stoja varianty na 3'konci, ktoré vedú k rozdielnym zostrihom proteín kódujúcich exónov 11 a 12 čím dochádza k vzniku 4 štyroch rozdielných izoform proteínu s odlišnými

C-koncami. U zebričky dochádza k zostrihu 5 variant u génu *meis2a*, z toho sú štyri viarianty kódujúce proteín a u génu *meis2b* sú tieto viarianty tri, z toho dve kódujú proteín.



Obrázok 13: Schéma príkladov tvorby komplexov s Meis proteínmi.

Meis proteíny vytvárajú heterodiméry cez priame interakcie s PBX proteínmi, posteriornými HOX proteínmi (*pHOX*) a ďalšími transkripčnými faktormi. Nepriame interakcie sú sprostredkované medzi anteriornými HOX (*aHOX*) proteínmi skrz PBX, okrem toho sa *Meis* proteíny viažu cez PBX aj na ďalšie transkripčné faktory (TF). Prevzaté a upravené podľa (Schulte and Geerts, 2019).

1.4.3. Funkcia Meis proteínov v embryu

K expresii značného množstva *Meis* transkripčných faktorov dochádza počas embryogenézy. V procese gastrulácie sú u kuraťa a myši transkripty *Meis1* a *Meis2* prítomné v primitívnom pruhu a na laterálnom okraji mezodermy, kde prechádzajú do neurálnej trubice, oka, vnútorného ucha, stredného a zadného mozgu, proximálnych pupeňov končatín, somitov branchiálnych oblúkov, migrujúcich buniek neurálnej lišty a kardiovaskulárneho systému v neskorom somitovom štádiu (Coy and Borycki, 2010; Sánchez-Guardado et al., 2011). *Meis3* gén je exprimovaný v zadnom mozgu a pankrease, avšak sa zdá, že u embryí zebričky a *X.leavis* sa nenachádza v končatinách a sietnici (Manfroid et al., 2007). V súvislosti s touto širokou škálou výskytu *Meis* proteínov v rámci embryonálneho vývoja sa predpokladá, že *Meis* patrí medzi dôležité regulačné faktory rôznych vývojových procesov.

Expresia *Meis2* v bunkách neurálnej lišty bola preukázaná na *Meis2* deficientných embryách myši, ktoré vykazovali defekty v tkanivách derivovaných z neurálnej lišty, ako napríklad defekty pri formovaní srdca, ktoré viedli k nekompletnej separácii výtokového traktu. V predošlých štúdiách bol publikovaný komplex *Pbx1/Meis1* ako priamy regulátor *Pax3* v premigračných NCC u rhombomér, z ktorých sa diferencujú bunky srdečnej NL (Chang et al., 2008). Predpokladá sa, že absencia *Meis2* môže byť kompenzovaná *Meis1*. Deficit *Meis2* sa teda odráža len v oblastiach, ktoré sú pre jeho expresiu unikátne. Okrem toho

došlo u týchto mutantov aj k poruche vývoja kraniálnych nervov. Meis proteíny môžu počas ich expresie diverzifikovať, po tom čo dôjde k špecifikácii NCC a získať tak funkcie pri formovaní vnútorných ušných a ďalších chrupaviek. Dôležitosť Meis2 u neurálnej lišty bola potvrdená aj na myších kondicionálnych mutantoch *Meis2*. U kondicionálnych mutantov došlo k poruchám tvárovo-hlavového skeletu, ktoré viedli k anomáliám mandibuly, hyoidnej kosti alebo k poruchám vývoja vnútorných ušných chrupaviek, ale tiež aj k defektom srdca a kraniálnych nervov ako tomu bolo v predošlom modeli. Tieto získané dáta rozširujú znalosti o Meis/Pbx proteínoch, ktoré kontrolujú osudy NCC. Okrem, už známych funkcií v srdečných bunkách neurálnej lišty došlo k preukázaniu, že podobná transkripčná sieť pravdepodobne funguje aj pri kontrole diferenciácie kraniálnych NCC, zostáva tak objasniť aké sú cieľové gény Meis transkripčných faktorov. (Machon et al., 2015).

V zebričke boli identifikované ortológy génu *meis1* s 91 % aminokyselinovou zhodou s myším proteínom a v prípade Meis2a a Meis2b šlo o zhodu 88 % a 96 %. Experimentálne bolo potvrdené, že všetky tieto gény sú exprimované v brachiálnych oblúkoch zebričky v čase 48 hpf (Thisse and Thisse, 2005). Skrining založený na využití Morfolín u zebričiek odhalil dôležitosť *meis* génov počas kraniofaciálneho vývoja. Injekcia Morfolín blokujúcich transláciu *meis1* ukázala, že v porovnaní s kontrolami, 50 % *meis1* morfanov vykazovalo rôzne stupne sfúzovania chrupaviek viscerokrania. Zvyčajne došlo k sfúzovaniu chrupaviek, ktoré boli derivované z toho istého alebo susedného branchiálneho obluku. Morfanti *meis1* a *meis2a* majú podobný kraniofaciálny fenotyp, avšak nedošlo k preukázaniu priameho vplyvu na vývoj hlavových chrupaviek u génov *meis2b* a *meis3*. (Melvin et al., 2013).

Diferenciácia embryonálnych kmeňových buniek do kardiovaskulárnych typov buniek sa deje cez časovo naprogramované zmeny v chromatinovej štruktúre, ktoré sú pod vplyvom kardiovaskulárnych regulátorov, čo otvára možnosti ich identifikácie a štúdia. Na identifikáciu týchto regulátorov boli využité knock-down experimenty pomocou Morfolín na modeli zebričky. Medzi génmi identifikovanými bez známej funkcie v srdečnom vývoji bol aj transkripčný faktor Meis2, avšak predchádzajúce štúdie preukázali, že u myši a zebričky zohráva dôležitú úlohu práve Meis1 (Maves et al., 2009; Minehata et al., 2008; Stankunas et al., 2008). Napriek tomu, využitie Morfolín injikovaných do oplodnených vajíčok zebričky viedlo k defektnej srdečnej morfogénéze. Defekty bolo možné pozorovať v štádiu 19 hpf, keď došlo u *meis2b* morfantov k neschopnosti sfúzovať srdečnú trubicu, neskôr v 24 hpf došlo k defektu jej rotácie. Okrem toho, že srdečná trubica zostávala u morfantov *meis2b* lineárna a vykazovala trvalé defekty v správnom formovaní srdca, došlo aj k zníženiu srdečného tepu. In situ experimenty na embryách zebrafish ukázali, že *meis2b* je exprimovaný v srdečnej oblasti,

táto expresia veľmi úzko pripomína expresiu Gata4, známeho srdečného transkripčného faktoru. Okrem toho, bola pozorovaná expresia *meis2b* aj v oblasti vyvíjajúceho sa zadného mozgu a somitov. Tieto zistenia naznačujú, že *meis2b* hrá dôležitú úlohu pri formovaní normálnej srdečnej funkcie. (Paige et al., 2012).

Diverzifikácia a morfogenéza pravého a ľavého srdečného priestoru je stále málo pochopená a preskúmaná. U cicavcov je táto asymetria dôležitá pre správnu morfogenézu a vedenie krvi (Campione and Franco, 2016; Koshiba-Takeuchi et al., 2009). Experimenty na zebričke významne pomohli pochopiť mechanizmy, ktoré dávajú základ tejto stranovej rozmanitosti. Guerra et al. (2018) sa systematicky venoval tejto otázke cez knock-out experimenty a ďalšie prístupy. Prvýkrát popísal existenciu dvoch transkripčných kompartmentov v predsieni zebričky, ktoré sú zároveň analógom v pravej a ľavej predsieni u cicavcov. Prekvapivo, in situ hybridizácia ukázala asymetrickú expresiu *meis2b* v ľavom kompartmente srdca dospelaj zebričky. Úloha Meis2b TF pri kompartmentalizácii predsieni bola overená posunom čítacieho rámcu v *meis* doméne pomocou TALEN-ov. Tri týždne po fertilizácii došlo k významnému zvýšeniu pomeru povrchu predsieni ku komore u *meis2b*^{-/-} zebričiek, pričom dĺžka tela a veľkosť komory sa nezmenili. Na rozdiel od predošlej publikácie, ktorá využívala knock-down experimenty (Paige et al., 2012) neboli detegované žiadne morfogenetické defekty. V skratke, homeoboxový transkripčný faktor Meis2b pravdepodobne zohráva dôležitú úlohu pri vytváraní a udržiavaní ľavo-pravej asymetrie v predsieni zebričky a reguluje jej morfogenetický rast. U dospelaj zebričky je expresia *meis2b* lokalizovaná na ľavej strane predsieni kde kontroluje expresiu *pitx2c*. U mutantov *meis2b* je *pitx2c* výrazne down-regulovaný, čo naznačuje, že *meis2b* pôsobí proti smeru expesie myokardialného *pitx2c*. Regulátor Pitx2c je výlučne exprimovaný v ľavej predsieni myokardu u obojživelníkov a cicavcov, kde reguluje širokú škálu génov exprimujúcich sa v ľavej predsieni (Franco et al., 2014). Tieto údaje naznačujú, že ľavý predsieňový priestor zdieľa u zebričky evolučne konzerovaný pôvod spoločne s tetrapodmi, vrátane niekoľkých génov exprimovaných v tomto regióne. Dôležitým krokom v budúcich štúdiách bude identifikácia špecifických regulačných elementov expesie Meis2b a tiež identifikácia ďalších transkripčných faktorov srdečného mezodermu pre lepšie pochopenie bunkovej divezifikácie a jej kontroly. U myší je homológom Meis2b práve Meis1, ktorý tu zohráva úlohu pre reguláciu bunkového cyklu kardiomyoytov, pričom nedostatok Meis1 vedie k zvýšenej proliferácií týchto buniek (Mahmoud et al., 2013). Podobne u zebričiek s nedostatkom Meis2b dochádza k zvýšenej myokardiálnej proliferácií v predsieni. Týmito zisteniami sa

otvára ďalšia zaujímavá možnosť študovania spomínaných fenotypov bunkovej autonómie pod proliferačným regulačným vplyvom *Meis2b*. (Guerra et al., 2018).

Úloha *Meis* proteínov pri regulácii proliferácie progenitorových buniek je konzervovaná u stavovcov aj bezstavovcov, najmä počas vývoja očí. U *D.melanogaster*, mutantnej na *Homothorax* (*hth*), ortológ *Meis* proteínu u stavovcov, došlo k poškodeniu proliferácií očných progenitorových buniek (Bessa et al., 2002), zatiaľ čo u myši s vyradením génu *Meis1* došlo k miernym vývojovým defektom u šošovky a sietnici (Marcos et al., 2015). Ako už bolo spomínané, gény *Meis* zdieľajú vysoké percento sekvenčnej podobnosti, čo vedie k veľkej funkčnej redundancii. Stimulovaná delécia *Meis1* aj *Meis2* koexprimovaných v prezumpčívnom šošovkovom ektoderme vedie k väčším defektom ako mutácie v samostatnom géne (Antosova et al., 2016). U zebričky a kuraťa *meis1* (spoločne s *meis2* u vtákov) exprimuje cyklín D1 v embryonálnej sietnici (Bessa et al., 2008; Heine et al., 2008). Niekoľko štúdií objavilo regulačnú slučku medzi *Meis* proteínmi a Wnt signálnou dráhou, kanonickou aj nekanonickou, čo môže naznačovať ďalšie spôsoby regulácie proliferácie *Meis* proteínmi. Avšak, na preukázanie priamej regulácie génov bunkového cyklu pomocou proteínov *Meis* sú potrebné ďalšie výskumy. (Schulte and Geerts, 2019).

Blízke spojenie bolo objavené medzi *Meis* proteínmi a RA signalizáciou, prostredníctvom čoho sa *Meis* proteíny môžu podieľať na diferenciácii, štruktúrovaní a segmentácii embrya. RA aktivuje *Meis1* a *Meis2* expresiu vo vyvíjajúcich sa končatinách stavovcov (Freemantle et al., 2002; Mercader et al., 2000), na oplátku *Meis* proteíny inhibujú RA-degradujúci enzým *Cyp26b*, čím dochádza k tvorbe koncentračného gradientu vo vyvíjajúcich sa končatinách (Roselló-Díez et al., 2014). V skratke, tam kde RA pôsobí na regionalizáciu alebo štruktúrovanie, napríklad pri formovaní zadného mozgu alebo končatín, *Meis* proteíny fungujú ako kľúčové regulátory segmentácie a morfogenézy (Mercader et al., 2000).

Je zrejmé, že prítomnosť proteínov *Meis* je pre proliferáciu a udržanie nediferencovaných buniek v mnohých biologických kontextoch nesporná, tak ako je aj ich schopnosť indukovať bunkovú diferenciáciu alebo tvorbu štruktúr dobre preskúmaná, nevyplýva však z týchto štúdií žiadny zjednocujúci model.

1.4.4. Defekty v *Meis* génoch a ochorenia

Defekty v *Meis* génoch sú spojené s celou radou ochorení. Ľudské vrodené mutácie *MEIS* sa prejavujú vo vývojovej expresii členov rodiny *Meis* v srdci, mozgu a neurálnej lište (Schulte and Frank, 2014; Stankunas et al., 2008). Napríklad, mutácia v *MEIS1* predstavuje rizikový faktor pre syndróm nepokojných nôh (Hammerschlag et al., 2017; Lane et al., 2017).

Mutácie *MEIS1* boli spojené s predsieňovou fibriláciou, zatiaľ čo mutácie v *MEIS2* majú už komplexnejší charakter (Schulte and Geerts, 2019). Okrem toho, gény *MEIS* majú dôležité postavenie pri leukémiách a pri ostatných nádorových ochoreniach. *MEIS1*, bol poprvé objavený v dobe, kedy došlo k identifikácii jeho génového lokusu ako myeloidového ektopického vírového integračného priestoru pre akútnu myeloidovú leukémiu v myšacom modeli. Disregulácia Meis TF sa pokladá za kľúčový faktor progresu niekoľkých typov leukémie u ľudí. (Imamura et al., 2002; Kawagoe et al., 1999).

Relatívne nedávno došlo k popisu ľudských pacientov s de novo bodovou mutáciou v géne *MEIS2*. Títo pacienti trpeli mentálnym postihnutím, abnormálnym podnebí, vrodenými srdcovými vadami a dysmorfou tváre (Fujita et al., 2016; Srivastava et al., 2018; Verheije et al., 2019). Zároveň pacienti s mutáciou v *MEIS2* vykazujú zreteľný fenotyp tváre pozostávajúci z nízkej prednej línie vlasov, tenkého obočia, veľkej špičky nosu s antevertovými a hypoplastickými nosnými dierkami a hornou perou v tvare písmena M. Okrem toho, trpia aj poruchami autistického spektra a majú nízke IQ. Doposiaľ bolo popísaných 47 ľudí s mutáciou v *MEIS2*, u ktorých šlo vo väčšine prípadov o mikrodélacie. U štyroch pacientov sa ukázal *MEIS2* ako hlavný gén zodpovedný za fenotyp. U postihnutých s bodovou mutáciou dochádza takmer v polovici prípadov k poruchám srdca, pričom najbežnejšou poruchou sú septálne defekty (Fujita et al., 2016; Srivastava et al., 2018; Verheije et al., 2019). Meis2 pravdepodobne reguluje raný srdečný vývoj cez mir-134, mikro RNA, u ktorej bola preukázaná silná down-regulácia v srdečnom tkanive s vrodenými poruchami, zatiaľ čo jej up-regulácia redukuje proliferáciu kardiomyocytových progenitorových buniek (Wu et al., 2015). Len u troch pacientov, u ktorých boli sekvenáciou potvrdené mutácie v posune čítacieho rámca a bodové mutácie, nedošlo k rázštetu podnebia (Verheije et al., 2019). Je zaujímavé, že ani jedna zo študovaných mutácií v *MEIS2* nevedla k porušeniu N-terminálnej domény. Nedávne štúdie ukázali, že funkcia *MEIS2* je modulovaná mikro RNA, mir-204, ktorá pôsobí pri morofgenéze a diferenciácii oka (Wu et al., 2017). U pacientov doteraz neboli popísane žiadne chyby súvisiace s vývojom oka, avšak na úplne objasneniesú potrebné ďalšie štúdie. (Giliberti et al., 2020).

Sekvenčné celogénomové štúdie identifikovali *MEIS2* ako nový lokus zvyšujúci náchylnosť na glaukóm (Shiga et al., 2018). U pacientov s mutáciou *MEIS2*, nebol identifikovaný glaukóm ani vysoký vnútroočný tlak, avšak väčšina z nich sa stále nachádzala v pediatrickom veku, čo znamená, že ďalšie štúdie na objasnenie spätosti mutácie *MEIS2* a glaukómu budú nevyhnuté k posúdeniu toho, či sa frekvencia tohto ochorenia líši u pacientov s mutáciou *MEIS2* od frekvencie výskytu glaukómu u ľudí bez mutácie.

Veľké množstvo vedeckých prác preukázalo pronádorovú úlohu transkripčného faktoru Meis2 pri hematologických zhubných nádoroch ako je myeloidna leukémia a ostatných typoch rakoviny ako napríklad neuroblastóm alebo rakovina prostaty. Tiež bolo publikované, že Meis2 hrá úlohu pri kontrole bunkového cyklu. Odstránenie Meis2 v bunkách neuroblastomu vedie k mitotickým aberáciám, zatiaľ čo expresia ektopického *MEIS2* vedie k proliferáciám nádorových buniek (Zha et al., 2014).

MEIS2 sa na základe doposiaľ získaných vedeckých informácií môže radiť medzi gény zapojené sa do porúch neurologického vývoja a rakoviny (Agoston et al., 2012). Meis proteíny pravdepodobne stoja za širokým spektrom epigenetických modulácií chromatinu počas embryonálneho vývoja a taktiež u homeostázy kmeňových buniek u dospelých jedincov. Získané výsledky posilňujú zapojenie génu *MEIS2* pacientov s ochoreniami srdcového a nervového systému a *MEIS2* pravdepodobne určuje zreteľný tvárový fenotyp, čím sa stáva rozpoznateľnou poruchou neurologického vývoja pomocou takzvanej „reverznej fenotypizácie“. (Giliberti et al., 2020).

3 CIELE PRÁCE

- I. Príprava mutantnej línie *meis2a* a *meis2b* génov u zebričky pomocou CRISPR technológie.
- II. Popis fenotypových zmien v rybích embryách po CRISPR mutagenéze *meis2a* a *meis2b* a v morfantoch.
- III. Porovnanie fenotypových zmien u rýb po injekciách Morfolín a mutantných embryí po CRISPR mutagenéze.

4 MATERIÁL

4.1 Reagenty a chemikálie

1X NEBuffer™ 3.1, NEB

1X T4 DNA Ligačný Reakčný Pufor, NEB (kat.č. B0202S)

2X DreamTaq Master Mix, Thermo Fisher Scientific (kat.č. K1081)

4 % PFA, Paraformaldehyd, Sigma -Aldrich (kat.č. 30525-89-4)

10 X SDS pufr 25 (1 liter: 30.3 g Tris báza, 144,4 g Glycín, 10 g SDS)

10X SSC, Citronan sodný, Sigma-Aldrich (kat.č. 6132-04-3)

10X Transférový pufr (1 liter: 144 g Glycín, 30,3 g Tris-báza)

25mM MgCl₂, Chlorid horečnatý, Thermo Fisher Scientific

40 % Akrylamid/Bis Roztok, 29:1 (3.3 % C), Bio Rad (kat.č. 161-0146)

50X TAE (2M Tris Bázy, 1M Kyselina octová, 50mM EDTA)

Alcianová modrá roztok (80 % Etanol, 20 % Kyselina octová, 0,1 % Alcianová modrá)

Ampicilín, Roche (kat.č. 10835242001)

Anti-DIG alkalická fosfatáza, Roche (kat.č. 11093274910)

APS, Peroxosíran amónny 10 %, Thermo Fisher Scientific (kat.č. 17874)

BamHI restričná endonukleáza, NEB (kat.č. R0136)

Borax, Sigma-Aldrich (kat.č. HT1002)

BSA, Hovädzí sérový albumín, Sigma-Aldrich (kat.č. 9048-46-8)

BsmBI restričná endonukleáza, NEB (kat.č. R0580)

Citónová kyselina, Sigma-Aldrich (kat.č. 77-92-9)

Deionizovaná voda

Dlx1a próba značná DIG

EcoRI restričná endonukleáza, NEB (kat.č. R0101S)

EtOH, Absolútny etanol, Penta (kat.č. 64-17-5)

Femto HRP substrát, SuperSignal™, Thermo Fisher Scientific (kat.č. 34094)

Fenol, Merck (kat.č. 108-95-2)

Fenolová červeň, Sigma-Aldrich (kat.č. 143-74-8)

Formamid, Sigma-Aldrich (kat.č. 75-12-7)

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Marker

Ginzburg Ringer roztok (10ml: 110 µl 5M NaCl, 18 µl 1M KCl, 62,5µl 0,2M NaHCO₃)

Glycerol, Sigma-Aldrich (kat.č. 56-81-5)

Heparin, Sigma-Aldrich (kat.č. 9041-08-1)

Chloroform, Sigma-Aldrich (kat.č. 67-66-3)

Izopropanol, Penta (kat.č. 67-63-0)

KCl, Chlorid draselný, Serva (kat.č. 7447-40-7)

KOH, Hydroxid draselný, Sigma-Aldrich (kat.č. 1310-58-3)

LB, Luria-Bertaniovovo médium - 1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, deionizovanej H₂O

Levamisol, Sigma-Aldrich (kat.č. 16595-80-5)

Lugolov roztok (10 g KI a 5g I₂ vo vode)
MeOH, Metanol, Penta (kat. č. 67-56-1)
Mlieko, Sigma-Aldrich (kat.č. M7409)
Myl7 próba značená DIG
NaCl, Chlorid sodný, Serva (kat.č. 7647-14-5)
NBT/BCIP, Thermo Fisher Scientific (kat.č. 34042)
Octan sodný Sigma-Aldrich (kat.č. S2889)
Octová kyselina, Penta, (kat.č. 64-19-7)
Ovčie sérum, Merck (kat.č. S3772)
Page Ruller™ marker, Thermo Fisher Scientific (kat.č. 26620)
PBS - Pufor fosfátových solí (1liter: 80g NaCl, 2 g KCl, 14.4g Na₂HPO₄, 2.4g KH₂PO₄, deionizová H₂O pH 7,4)
PBST (1 % Triton 100 v 1X PBS)
PBT (0.1 % Tween v 1X PBS)
pGEM ®-T Easy Vektor, Promega (kat. č. A1360)
Ponceau, Serva (kat.č. 3342902)
Primárna protilátka anti-meis2 (králik) - domáca príprava
Pronáza, Roche (kat. č.10165921001)
Proteináza K a pufor, Roche (kat.č. 3115836001)
PTA, Fosfolfungová kyselina (1 % PTA vo vode)
pT7-gRNA, Addgene (plazmid č. 46759)
RIPA pufor (50mM Tris-báza, pH 7,5, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1 % NP40, 0,25 % deoxycholát sodný)
SDS, Dodecylsulfát sodný, Sigma-Aldrich (kat.č. L3771)
Sekundárna protilátka anti-králik IgG (Alexa Fluor® 594), Thermo Fisher Scientific (kat.č. A-21207)
T4 DNA ligáza, NEB (kat.č. M0202)
TBE pufor (1M Tris báza, 1M kyselina boritá, 0.02M EDTA)
TEMED, Fluka (kat.č. 87689)
Tris-Cl, Tris báza, Sigma-Aldrich (kat.č. 77-86-1)
tRNA, Roche (kat.č. 10109517001)
Tween 20, Sigma-Aldrich (kat.č. 9005-64-5)

Roztoky pre Izoláciu plazmidového vektora z tekutej bakteriálnej kultúry (Miniprep)

P1 roztok: 25mM TRIS, 10mM EDTA, 1 % glukóza

P2 rztok: 0,2M NaOH, 1 % SDS

P3 roztok: 5M Kyselina octová

4.1.1 Kity

QIAEX II ® Gel Extraction Kit, Qiagen (kat.č. 20021)

MEGAShortscript™ T7 Transcription Kit, Invitrogen (kat.č. AM1334)

4.1.2 Primre, Morfolína (5'→3')

M13 reverzný primer - CAGGAAACAGCTATGAC
meis2a MO - CCAGCTCATCGTACCTTTGCGCCAT
meis2b MO - CTTCGTACCGTTGAGCCATCAGCAT
Forward primer *meis2a* ex. 2 - CAA ACTGCACGACTTTTCCTC
Forward primer *meis2a* ex. 3 - GTG CATTGACATGGCTGAG
Forward primer *meis2a* ex. 8 - TCA CATATGCAAATGAAGCACC
Forward primer *meis2b* ex. 2 - TCCTGTTTAACTTCATGTGTGCT
Forward primer *meis2b* ex. 3 - CGCATGAAGGCCTAGTTATTG
Forward primer *meis2b* ex. 4 - TGG GTTGTGTTCTGACAAAC
Forward primer *meis2b* ex. 8 - GCT TTCACGCTGTTGTTTATC
Reverse primer *meis2a* ex. 2 - GTTAGCAGAAATCGAAGCGG
Reverse primer *meis2a* ex. 3 - TGCGGCTACTTAGAACTTCC
Reverse primer *meis2a* ex. 8 - CACTTGCAGCTCACTTGTATTC
Reverse primer *meis2b* ex. 2 - CACTGACTTGCACCTTTTCTGGA
Reverse primer *meis2a* ex. 3 - CTTTCAGCCAAGCATCCAC
Reverse primer *meis2a* ex. 4 - TCTGATAACACGCGGACTC
Reverse primer *meis2a* ex. 8 - CAA GCCAAATGGATGGGAG

4.2 Biologický materiál

Danio rerio - divoký typ, lúnia AB
Escherichia coli - TOP10 chemicky kompetentné baktérie

4.3 Laboratórne vybavenie

Blotovacia súprava (1660827EDU, Tetra and Blotting Module, Bio-Rad)
Micro CT (SKYSCAN 1272 High-Resolution, Bruker)
Mikroinjektor (5252000013, FemtoJet 4i Eppendorf,)
Mikroskop (Olympus SZX9) s kamerou (Olympus DP72)
PCR termocyklér (2070211, Biometra TAdvanced)
Spektrofotometer (Nanodrop 1000, Thermo scientific)
Súprava pre akryamidovú elektroforézu (165800EDU, Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad)

5 METÓDY

Mutantné línie u génov *meis2a* a *meis2b* boli pripravené využitím systému Crispr/Cas9. Metodika zahrnuje dizajn a prípravu sgRNA, ktorá bola následne injikovaná do jedno až dvojbunkového embrya zebričky *Danio Rerio*. Zhruba v 6. týždni boli embryá zebričky genotypované pomocou testu mobility heteroduplexov (HMA), prostredníctvom čoho sme získali heterozygotnú líniu F0. Takto získaná línia bola krížená s rybami divokého typu čím sme došli k zisku heterozygotnej generácie F1. Krížením heterozygotov sme získali mutantú generáciu homozygotov, u ktorej sme ďalej analyzovali fenotyp prostredníctvom farbenia Alcianovou modrou, in situ hybridizáciou, mikroCT a mutaných rýb bol využitý Western blot. Fenotypy mutaných línií boli porovnané so získanými fenotypmi morfantov.

5.1 Crispr/Cas9 systém

5.1.1 Dizajn sgRNA

Pre gény *meis2a* a *meis2b* boli navrhnuté sgRNA v exónoch 2, 3 a 8, ktorý je súčasťou DNA väzbovej homeodomény, u génu *meis2b* bol navrhnutý sgRNA aj v exóne 4. Regióny príslušných exónov boli analyzované niekoľkými online dostupnými predikčnými programami pre dizajn sgRNA ako napríklad Chopchop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) a CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). Na základe predikovanej efektivity a off-targetov boli vybrané vhodné sgRNA. Upravené podľa (Nickl, 2019).

5.1.2 Klonovanie a príprava sgRNA

5.1.2.1 Hybridizácia oligonukleotidov

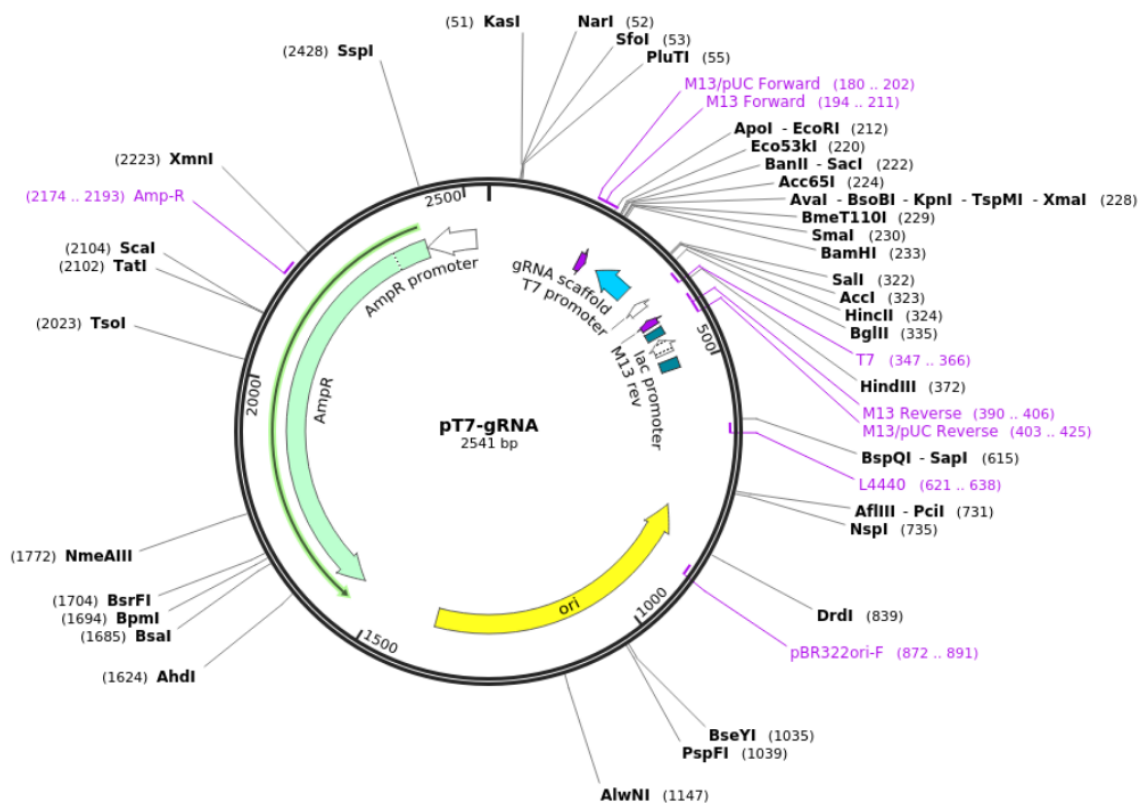
Oligonukleotidy pre navrhnutésgRNA boli hybridizované v PCR termocykleri. Zásobné roztoky oligonukleotidov boli nariadené na 25 μ M a z každého komplementárneho oligonukleotidu bolo odobraných 5 μ l roztoku tak, že výsledna reakčná zmes bola o objeme 10 μ l a obsahovala 5 μ l forward a 5 μ l reverse oligonukleotidov. Hybridizácia prebehla za podmienok uvedených v tabuľke (Tab. 1).

Tab. 1: Program pre hybridizáciu oligonukleotov gRNA.

| Teplota [°C] | Čas [min] |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 95 | 3 |
| Znižovanie teploty do 25 °C | Znižovanie teploty o 5 °C každú 1 min |
| 4 | ∞ |

5.1.2.2 Ligácia gRNA do vektora

Dvojvláknové oligonukleotidy gRNA boli ligované do vektora pT7 (Obr. 14), ktorý bol najskôr linearizovaný restriktívnou endonukázou (RE) BsmBI v reakcii uvedenej v Tab. 2. Takto pripravený restriktívny mix bol inkubovaný v termocykleri po dobu 1 hodiny pri 55 °C, aktivita RE bola zastavená pri 80 °C po dobu 20 min. Linearizovaný vektor pT7 bol purifikovaný prostredníctvom gélovej elektroforézy. K restriktívnej zmesi bolo po inkubácii pridaných 5 µl 6x nanášacieho farbiva, pripravená zmes bola nanosená na jamky agarozového gélu, bol použitý GeneRuler™ 100 bp Plus DNA marker. Restriktívna zmes s markerom bola nanosená na 1 % agarozový gél pripravený s 1 X TAE pufrom, separácia trvala 25 min pri 120 V. Bandy s rozštiepeným vektorom boli z gélu vyrezané a vektor bol izolovaný DNA extrakčným kitom *Qiaex II*® *Gel extraction Kit* (*Qiagen*). Do linearizovaného vektora boli ligované hybridizované oligonukleotidy gRNA, ligačná reakcia je uvedená v Tab. 3. Takto pripravená reakcia bola inkubovaná 1 hodinu pri izbovej teplote (RT) a uložená cez noc v chladničke pri 4 °C.



Obrázok 14: Schéma vektora pT7.

Prevzaté : <https://www.addgene.org/46759/>.

Tab. 2: Príprava reakčnej zmesi pre štiepenie vektoru pT7 restriktívnou endonukleázou BsmBI.

| Reagenty | Objem [μl] |
|------------------------|------------|
| 10x NEBuffer™ 3.1 | 3 |
| pT7 vektor (0,8 μg/μl) | 4 |
| BsmBI RE (10 000 U/ml) | 1 |
| Deionizovaná voda | 22 |
| Celkový objem: | 30 |

Tab. 3: Príprava ligačnej zmesi pre klonovanie oligonukleotidov do vektora pT7.

| Reagenty | Objem [μl] |
|----------------------------------|------------|
| 10x T4 DNA Ligačný reakčný pufor | 1 |
| T4 DNA ligáza | 1 |
| pT7 linearizovaný vektor | 2 |
| Hybridizované oligonukleotidy | 2 |
| Deionizovaná voda | 4 |
| Celkový objem: | 10 |

5.1.2.3 Transformácia do baktérií, izolácia inzertu

Ligačná zmes (celý objem) bola využitá na transformáciu do baktérií (lína TOP10) podľa protokolu 1.

Protokol 1: Transformácia do kompetitívnych baktérií TOP 10

1. Rozmrazenie kompetitívnych baktérií TOP10 na ľade.
2. Pridanie ligačnej zmesi k zhruba 120 μl suspenzie baktérií a jemné prepitetovanie.
3. Inkubácia na ľade po dobu 30 min.
4. Transformácia tepelným šokom na termobolku zahriatom na 42 °C po dobu 40 s.
5. Návrat zmesi späť na ľad a pridanie 200 μl LB média.
6. Inkubácia pri 37 °C po dobu 1 hodiny pri kontinuálnom miešaní (250 rpm).
7. Nanesenie suspenzie baktérií na Petriho misku s agarom a Ampicilínom (Amp), kultivácia pripravených misiek počas noci (O/N) pri 37 °C.
8. Príprava tekutej kultúry: k 2 ml LB média sú pridané 2 μl antibiotika (Amp, 50 ng/μl).
9. Prenesenie bakteriálnej kolónie pomocou špičky na pipety do pripravenej tekutej kultúry, kultivácia O/N s trepaním na 250 rpm.

Plazmidový vektor bol následne izolovaný z tekutej kultúry baktérií postupom uvedeným v protokole 2.

Protokol 2: Izolácia plazmidového vektora z tekutej bakteriálnej kultúry (Miniprep)

1. Prepipetovanie bakteriálnej kultúry do 2 ml mikroskúmaviek, centrifugácia 1 min na 13 000 rpm.
2. Odstránenie supernatantu a resuspendovanie peletu v 300 µl P1 roztoku, vortexovanie.
3. Pridanie 300 µl P2 roztoku, inkubácia 5 min pri RT
4. Pridanie 300 µl P3 roztoku, premiešanie v rukách, centrifugácia 10 min na 13 000 rpm pri 4 °C.
5. Odobranie supernatantu, k supernatantu sa pridá 500 µl izopropanolu, pretrepanie zmesi.
6. Centrifugácia na 13 000 rpm na dobu 5 min, opláchnutie peletu s 250 µl 80 % etanolu (EtOH) a premiešanie obratom.
7. Centrifugácia na 13 000 rpm na 2 min, odobranie EtOH, sušenie peletu na 50 °C
8. Pridanie 30 µl deionizovanej vody k vysušenému peletu, rozpúšťanie pri 37 °C na 30 min za stáleho miešania.

5.1.2.4 Verifikácia inzertu a transkripcia

Inzert kódujúci gRNA, ktorý bol zaligovaný do vektora pT7 bol verifikovaný Sangerovou sekvenáciou spoužitím M13 primeru. Reakčná zmes na sekvenáciu bola pripravená podľa požiadaviek externej spoločnosti *Eurofins Scientific* (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>), v ktorej boli vzorky sekvenované. Vzorky plazmidovej DNA, kde bola sekvenáciou potvrdená prítomnosť požadovaného inzertu, boli linearizované podľa reakcie v Tab. 4 a inkubované pri 37 °C počas 2 hodín. Následne boli tieto vzorky prečistené octanom sodným v pomere 1:10 (octan sodný : objem vzorky) s prídavkom 96 % EtOH v pomere 2,5:1 (EtOH : objem vzorky). Vzorky s overeným inzertom a prečistené octanom sodným boli transkribované do sekvencie sgRNA pomocou komerčného kitu *MEGAShortscript™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher)*. Transkribované sgRNA boli prečistené fenol-chloroformovou precipitáciou, pri ktorej sme najskôr ku vzorkám pridali 15 µl octanu amónneho a premiešali. Nasledovala fenol-chloroformová extrakcia, ku každej vzorke bolo pridaných 150 µl fenol-chloroformu, centrifugácia 4 min pri 4 °C na 14 000 rpm. Po centrifugácii bolo pridaných 150 µl chloroformu a nasledovala centrifugácia za rovnakých podmienok. RNA bola precipitovaná pridaním 300 µl EtOH a inkubovaná 15 min pri mínus 20 °C. Nasledovala centrifugácia na 4 min pri 4 °C na 14 000 rpm, odobranie supernatantu a rozpustenie peletu v 40 µl deionizovanej vody. Pripravené sgRNA boli skladované pri mínus 80 °C.

Tab. 4: Priprava reakčnej zmesi pre štiepenie plazmidovej DNA, pT7 vektora pomocou RE BamHI.

| Reagenty | Objem [µl] |
|--------------------------------------|------------|
| 10x NEBuffer™ 3.1 | 4 |
| DNA plazmid, pT7 vektor (1000 µg/µl) | 5 |
| BamHI RE (20 000 U/ml) | 2 |
| Deionizovaná voda | 29 |
| Celkový objem: | 40 |

5.2 Injikácie

Embryia zebričky boli injikovné do 1 až 2 bunkového štádia injikačnou zmesou o objeme zhruba 5 až 10 nl. Všetky navrhnuté sgRNA pre jeden gén boli injikované v injikačnej zmesi spoločne (vid'. Tab. 5), zatiaľ čo každý gén bol injikovaný zvlášť. Morfolína sme injikovali v reakčnej zmesi podľa Tab. 6 v konštantnom objeme. Upravené podľa (Nickl, 2019).

Tab. 5: Zloženie injikačnej zmesi pre injikáciu komplexu Cas9/sgRNA .

| Reagenty | Objem [μl] |
|------------------------|------------|
| Cas9 (500 ng/μl) | 5 |
| Mix sgRNA (1200 ng/μl) | 2 |
| KCL (1M) | 0,5 |
| 10X NEBuffer™ 3.1 | 1 |
| Fenolová černeň | 1 |
| Deionizovaná voda | 0,5 |
| Celkový objem: | 10 |

Tab. 6: Zloženie injikačnej zmesi pre injikáciu Morfolín.

| Reagenty | Objem [μl] |
|-----------------------|------------|
| Morfolino 1 mM | 1 |
| Fenolová červeň | 1 |
| Deionizovaná voda | 8 |
| Celkový objem: | 10 |

5.3 Genotypovanie

Po dosiahnutí dostatočnej veľkosti ryby (zhruba v 6 týždňoch) sme DNA získali z časti chvostu ryby. Nukleové kyseliny sme izolovali pomocou proteínázy K (Tab. 7) po dobu 1 hodiny na 55 °C a enzým inaktivovali po dobu 20 min na 85°C. DNA v lyzáte sme ďalej amplifikovali pomocou PCR, každý lokus (respektíve exón) bol amplifikovaný zvlášť podľa podmienok v Tab 8. a Tab. 9. Amplifikovanú časť DNA sme ďalej separovali na gély.

Tab. 7: Príprava proteínázy K k izolácii DNA z jednej vzorky.

| Reagenty | Objem [μl] |
|-----------------------|------------|
| Pufr proteínáza K | 2,5 |
| Proteínáza K | 1 |
| Deionizovaná voda | 21,1 |
| Celkový objem: | 25 |

Tab. 8: Reakčný mix pre amplifikáciu DNA.

| Reagenty | Objem [μl] |
|--|------------|
| 2X DreamTaq PCR Master Mix | 5 |
| DNA templát | 1,3 |
| Forward primer (<i>meis2a</i> alebo <i>meis2b</i>) | 0,25 |
| Reverse primer (<i>meis2a</i> alebo <i>meis2b</i>) | 0,25 |
| Deionizovaná voda | 3,3 |
| Celkový objem | 10 |

Tab. 9: PCR program pre amplifikáciu DNA. Opakovanie kroku 2 až 4 35x.

| Teplota | Čas [min] |
|----------|-----------|
| 1. 95 °C | 5:00 |
| 2. 95 °C | 1:00 |
| 3. 61 °C | 0:30 |
| 4. 72 °C | 0:30 |
| 5. 72 °C | 5:00 |
| 6. 4 °C | ∞ |

5.3.1 Genotypovanie F0, F1 a F2 generácie

Generáciu F0 sme genotypovali pomocou testu mobility heteroduplexov (HMA) na akrylamidovom gély (40 % akrylamid/bis-akrylamid, 29:1), v 1x TBE pufri, separácia bežala 1 hodinu na 80 V. Potenciálne heterozygotné ryby, ktoré poskytovali heteroduplex na elektroforéze, boli vybrané a křížené s rybami divokého typu.

F1 generáciu sme genotypovali na 2 % agarozóvom gély, po dobu 25 min pri 120 V. Vybrané heterozygotné ryby boli sekvenované v externej spoločnosti *Eurofins Scientific*. Pred sekvenáciou sme vybrané PCR produkty heterozygotov zaligovali do pGEM-T vektora (Tab. 10) s cieľom sekvenovať len jednu alelu potenciálne mutantnej vzorky, pre jej lepšie rozpoznanie. Po ligácii nasledovala transformácia do kompetitívnych baktérií TOP10 (Protokol 1) a izolácia DNA podľa protokolu 2. Izolovaná plazmidová DNA bola štiepená (Tab. 11) a zaslaná na sekvenáciu. Sekvencné dáta boli analyzované online odstupným nástrojom CRISPR-ID (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>). Heterozygotné ryby s mutáciou v čítacom rámci boli použité na kříženie homozygotnej línie, ktorú sme genotypovali za rovnakých podmienok ako generáciu F1.

Tab. 10: Príprava ligačná zmeis pre ligovanie do pGEM-T Vektora.

| Reagenty | Objem [μl] |
|-----------------------|------------|
| T4 DNA ligačný pufo | 1 |
| T4 DNA ligáza | 0,5 |
| pGEM-T Easy Vektor | 0,5 |
| PCR produkt | 2 |
| Deionizovaná voda | 6 |
| Celkový objem: | 10 |

Tab. 11: Príprava reakčnej zmesi pre štiepenie plazmidovej DNA, pGEM-T7 vektora pomocou REEcoRI.

| Reagenty | Objem [μl] |
|------------------------|------------|
| 10X NEBuffer™ 3.1 | 1 |
| EcoRI RE (20 000 U/ml) | 0,5 |
| Deionizovaná voda | 3,5 |
| DNA plazmid, pGEM-T | 5 |
| Celkový objem: | 10 |

5.4 Fenotypová analýza

U získaných mutantných línií a morfantov sme analyzovali fenotyp prostredníctvom štyroch prístupov. U morfantov a knock-out línií sme využili farbenie chrupaviek Alcianovou modrou (protokol 3) a in situ hybridizáciu (protokol 4), pre vizualizáciu expresie génov nášho záujmu. Prítomnosť proteínu sme u mutantných línií overili Western blotom (protokol 5) a ryby podrobili microCT, za účelom študovania morfológických zmien u mutantov.

5.4.1 Farbenie Alcianovou modrou

Protokol 3: Farbenie Alcianovou modrou

1. Fixácia embryí v 96 % EtOH po dobu 1 dňa.
2. Farbenie chrupaviek: inkubácia v Alcianovej modrej (0,1 %, 8 (EtOH) : 2 (kyselina octová)) počas noci za stáleho miešania.
3. Rehydratácia: EtOH v destilovanej vode, za stáleho miešania (60 rpm).
 - 100 % EtOH ... 15 min
 - 90 % EtOH ... 10 min
 - 70 % EtOH ... 10 min
 - 40 % EtOH... 10 min
 - 15 % EtOH ... 10 min
4. Premývanie: rýchly preplach 1x PBST a potom 10 min v destilovanej vode.

5. Depigmentácia embryí: inkubácia na ľade v 1 % KOH s 3 % H₂O₂ (8 : 2), pokiaľ nie sú embryá presvetlené.
6. Inkubácia s koncentrovaným boraxom pri RT 20 min.
7. Inkubácia so 65 % boraxom s 2 % Trypsínom podľa potreby.
8. Uskladnenie embryí: prevedenie skletov embryí cez koncentračnú radu glycerolov riedených s 1 % KOH za stáleho miešania na 60 rpm.
 - 25 % glycerol ... 10 min
 - 50 % glycerol ... 10 min
 - 75 % glycerol ... 10 min
 - 100 % glycerol- uschovanie

5.4.2 *In situ* hybridizácia

Protokol bol prevzatý a upravený podľa: <https://wiki.zfin.org/display/prot/Thisse+Lab+-+In+Situ+Hybridization+Protocol+-+2010+update>.

Protokol 4: In situ hybridizácia

1. Dechoronácia embryí zebričky pomocou Pronázy: prídanie 50 µl pronázy k embryám (24 hpf) inkubácia pri RT po dobu 5 min. Premytie embryí 3x E3 vodou. Inkubácia embryí pri 28,5 °C do požadovaného vývojového štádia.
2. Fixovanie embryí v 4 % paraformaldehyde (PFA) s 1x PBS, počas noci pri 4 °C.

Deň 1

3. Dehydratácia embryí:
 - PBS ...2 x 5 min
 - 25 % MeOH/PBS ...5 min
 - 50 % MeOH/PBS ...5 min
 - 75 % MeOH/PBS ...5 min
 - 100 % MeOH/PBS...5 min
4. Rehydratácia embryí:
 - 75 % MeOH/PBS ...5 min
 - 50 % MeOH/PBS ...5 min
 - 25 % MeOH/PBS ...5 min
 - PBS ...4 x 5 min
5. Depigmentácia embryí starších ako 24 hpf: roztok na depigmentáciu: 0,8 % KOH, 1 % H₂O₂, 0,1 % Tween, po dobu 20 min pri RT, premytie 3 x 5 min v PBT.
6. Natrávenie embryí proteinázou: prídanie 500 µl roztoku proteinázy K (Proteináza K v BPT, 1 : 1000) k embryám, inkubácia pri RT po dobu 10 min u 24 hpf a 40 min u 48 hpf.

7. Refixácia embryí: prídanie 800 μl % PFA k vzorkám, inkubácia 20 min pri RT, premytie vzoriek v PBT 5 x 5 min,
8. Prehybridizácia: Príprava Hybe⁺ podľa tabuľky 12. Hybe⁺ sa pripravuje odobratím cca 8 ml Hybe⁻, ku ktorému sa pridá 8 μl Heparínu a 400 μl tRNA. Prídanie 500 μl pripraveného Hybe⁺ku každej vzorke a zahrievanie na 70 °C po dobu 2 hodín bez miešania.

Tab. 12: Zloženie prehybridizačného roztoku Hybe⁺.

| Reagenty | Objem [ml] | Výsledný roztok |
|------------------------------|---------------|----------------------|
| Formamid | 25 | 50 % formamid |
| 20X SSC | 12,5 | 5x SSC |
| Heparín (100 ng/ml) | 0,5 | 50 $\mu\text{g/ml}$ |
| tRNA (10 mg/ml) | 0,5 | 500 $\mu\text{g/ml}$ |
| Tween 20 (20 %) | 0,25 | 0,1 % |
| Kyselina citónová (1M, pH 6) | 0,46 | pH 6 |
| H ₂ O | doplniť do 50 | |

*Hybe⁻ je Hybe⁺ bez tRNA a heparínu

9. Hybridizácia: Denaturácia próby v 50 μl Hybe⁺ na 80 °C, 5 min. Riedenie próby v pomere 1:250 v predhriatom Hybe⁺ na 70 °C. Prídanie 500 μl hybridizačného roztoku s próbou ku každej vzorke. Inkubácia počas noci na 70 °C.

Deň 2

10. Premývanie: odstránenie hybridizačného roztoku a premývanie.

- 1x rýchle premytie v Hybe⁻ 70°C
- 75 % Hybe⁻ /25 % 2X SSC ... 15 min/70°C
- 50 % Hybe⁻ /50 % 2X SSC ... 15 min/70°C
- 25 % Hybe⁻ /75 % 2X SSC ... 15 min/70°C
- 100 % 2X SSC ... 15 min/70°C
- 100 % 0,2X SSC ... 2 x 30 min/70°C
- 75 % 0,2X SSC/25 % PBT ... 10 min/RT
- 50 % 0,2X SSC/50 % PBT ... 10 min/RT
- 25 % 0,2X SSC/75 % PBT ... 10 min/RT
- PBT (PBS + Tween)

11. Blokovanie: prídanie 500 μl blokujúceho roztoku (Tab. 13) ku každej vzorke, inkubácia 3 hodiny pri RT.

Tab. 13: Zloženie blokujúceho roztoku.

| Reagenty | Objem [μl] |
|-----------------------|-------------------------|
| Ovčie sérum (50X) | 20 |
| BSA (100 mg/ml, 50X) | 20 |
| Levamisol (1M, 1000X) | 1 |
| PBT | 959 |
| Celkový objem: | 1000 |

12. Nariedenie ani-DIG Alkalickej fosfatázy v blokujúcom roztoku v pomere 1 : 4000, pridanie 500 μ l k vzorke, inkubácia O/N pri 4 °C.

Deň 3

13. Premývanie vzoriek: PBT 6 x 15 min.

14. Farbenie: Farbenie AP pufrom (Tab. 12), pridanie 1 ml AP pufru ku vzorkám 2 x 15 min, pri druhom premývaní prenesenie vzoriek na 12-jamkovú platňu. Po druhom premytí a odobratí pufru pridanie NBT/BCIP roztoku (50X), 600 μ l ku každej vzorke, inkubácia v tme pri RT. Kontrolovanie farbenia približne každých 15 min.

15. Stop roztok: premývanie v stop roztoku (1x PBS a 1 mM EDTA) 2 x 5 min. Pre odstránenie pozadia, rýchle premytie 4 % PFA, prenesenie vzoriek do metylcelulózy a uschovávanie v nej.

5.4.3 Western blot

Protokol 5: Western blotting

1. Príprava vzorky:

- a) Odobratie E3 vody, premytie v 500 μ l PBT, 1x 5 min.
- b) Odstránenie žltka 500 μ l Ginzburg Ringer roztoku, prepipetovanie zmesi kým nie je žltok odstránený.
- c) Centrifugácia 500 x g, 5 min na 4 °C, odstránenie supernatantu.
- d) Pridanie 50 μ l RIPA pufru s proteazovými inhibitormi
- e) Rozdrvenie embryí, inkubácia na ľade po dobu 30 min, vortexovanie každých 5 min.
- f) Centrifugácia po dobu 15 min na maximum pri 4 °C.
- g) Uskladnenie supernatantu v novej mikroskúmavke a uchovanie pri - 80 °C.

2. Príprava aparátúy, separačného gélu (12 %) pre western blot (WB) a zaostrovacieho gélu pre WB.

3. Nanesenie vzoriek (10 μ l) a Page Ruller markru (4 μ l). Akryamidová elektrofréza beží v 1X SDS pufri, na 80 V prvých 20 min, následne na 120 V po dobu 110 min.

4. Mokré blotovanie:

- a) Príprava membrány, chromatografického papiera a špongií: všetky komponenty blotovacej kazety sú namočené v transférovom pufri.
- b) Blotovacia kazeta: na jednu stranu uloženie špongie, následne 3 x chromatografický papier, gél, membrána, 3 x chromatografický papier, špongia, uzavretie blotovacej kazety.
- c) Príprava nádoby na WB, umiestnenie miešadla, chladiacich blokov, blotovacej kazety, naplnenie nádoby transferovým pufrom a uzavretie.
- d) Blotovanie beží na 0,36 A po dobu 1 hodiny.

5. Farbenie

- a) Premytie membrány 1 x v 1x PBT, vizualizácia bandov v Ponceau po dobu 5 min, vyrezanie časti membrány tam, kde sa nachádzajú proteíny nášho záujmu, premytie 3 x v 1x PBT.
- b) Blokovanie v 10 % mlieku s PBT po dobu 1 hodiny pri RT, premytie 3 x v 1x PBT.
- c) Inkubácia s primárnou protilátkou v 1 % mlieku v pomere 1 : 1000 po dobu 1 hodiny pri RT. Premytie 3 x v 1 x PBT 5 min pri RT.
- d) Inkubácia so sekundárnou protilátkou v 1 % mlieku v pomere 1 : 10 000 po dobu 1 hodiny pri RT.
- e) Vysušenie membrány filtračným papierom a inkubácia po dobu 10 min s femto HRP substrátom a zabalenie membrány do fólie.
- f) Vysušenie membrány filtračným papierom a skenovanie.

5.4.4 Počítačová tomografia (MicroCT)

Pre zobrazenie vnútornej morfológie u mutatívnych rýb a rýb divokého typu sme využili MicroCT. Vzorky vybraných rýb boli spracované v Českom centre pre fenogenomiku, Ústav molekulárnej genetiky. Vzorky boli fixované po dobu 5 dní v 4 % PFA, potom prenesené do 1 % kyseliny paraftalovej (PTA) na dobu 14 dní, kde boli kontrastované a nakoniec do 25 % Lugolovho roztoku na dobu 2 dní. Vzorky boli zafixované v agaróze a skenované vysoko rozlišujúcim *MicroCT SKYSCAN 1272*, (*Bruker*), scany boli rekonštruované v programe InstaRecon.

6 VÝSLEDKY

6.1 Dizajn gRNA

Pomocou online dostupných predikčných programov (vid'. kapitola 4.1.1) boli vybrané optimálne miesta pre štiepenie exónov pomocou Cas9 endonukleázy (Tab. 14). Všetky použité sekvencie boli nájdené v *Danio rerio* genóme a overené v genómovom prehliadači <https://www.ensembl.org/>. U génu *meis2a* boli navrhnuté tri sgRNA, z toho jedna v DNA väzbovej doméne, u génu *meis2b* boli navrhnuté štyri sgRNA z toho jedna v homeodoméne (Obr. 15). Sangerovým sekvenovaním bola overená prítomnosť navrhnutého inzertu v pT7 vektore, ktorý bol ďalej použitý v procese prípravy sgRNA (Obr. 16). Tiež boli navrhnuté oligonukleotidy kódujúce sgRNA (Tab. 15), ktoré boli zaklonované do pT7 vektora, transformované do baktérií, izolované a transkribované pomocou pT7 do sgRNA. Transkribované sgRNA boli overené na agarózovom gély (Obr. 17).

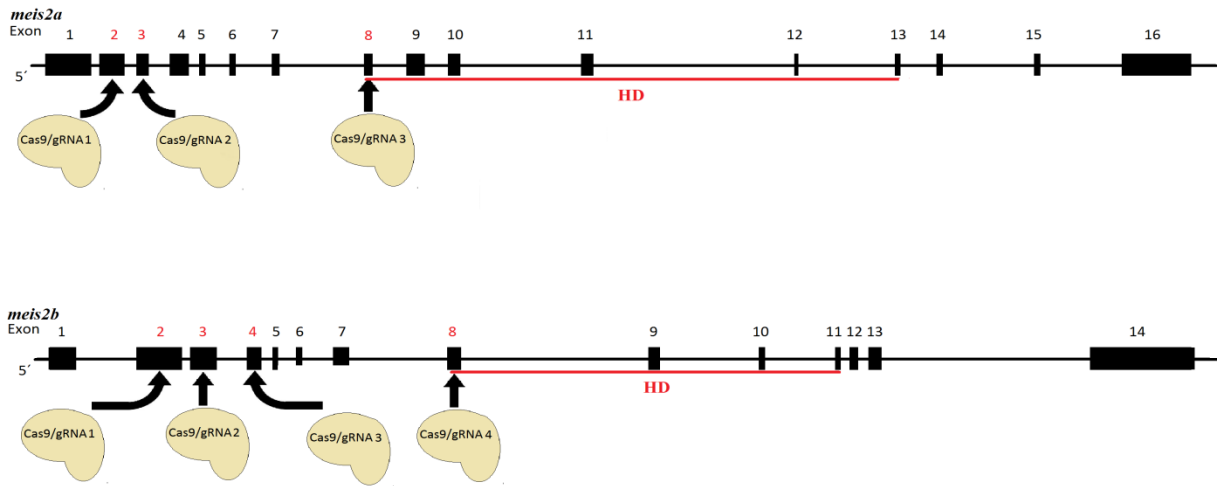
Navrhnuté sgRNA sú tvorené 20 ribonukleotidami (crRNA) a na 5' konci sa nachádza univerzálna downstream sekvencia (tracrRNA) nevyhnutná k správnej interakcii s Cas9 endonukleázou (Tab. 14).

Tab. 14: Targetujúce sekvencie sgRNA v génoch *meis2a* a *meis2b* a sekvencie sgRNA pre jednotlivé exóny. Červeným je znázornená PAM sekvencia, nevyhnutná k zacieleniu DNA.

| Exón | Targetujúca sekvencia sgRNA(5'→3') | sgRNA(5'→3') |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <i>meis2a</i> : exón 2 | TGGACGGGGTTCGGGATGTACGGG | UGGACGGGGUCGGGAUGUAC* |
| <i>meis2a</i> : exón 3 | GTCCTCGTTGAAGGAGTCCGAGG | GUCCUCGUUGAAGGAGUCCG* |
| <i>meis2a</i> : exón 8 | GTCGTCACCCGTGCCAGGCGAGG | GUCGUCACCCGUGCCAGGCG* |
| <i>meis2b</i> : exón 2 | GGGGTTCCGACGTCGATGTACGG | GGGGUCCGACGUCGAUGUA* |
| <i>meis2b</i> : exón 3 | CCGAGAGAGCCGGGAGTCGCTGG | CCGAGAGAGCCGGGAGUCGC* |
| <i>meis2b</i> : exón 4 | ATTATCCAGCTCTGGGTTAGAGG | AUUAUCCAGCUCUGGGUUAG* |
| <i>meis2b</i> : exón 8 | AACTGGGGATGAGGACGATCAGG | AACUGGGGAUGAGGACGAUC* |

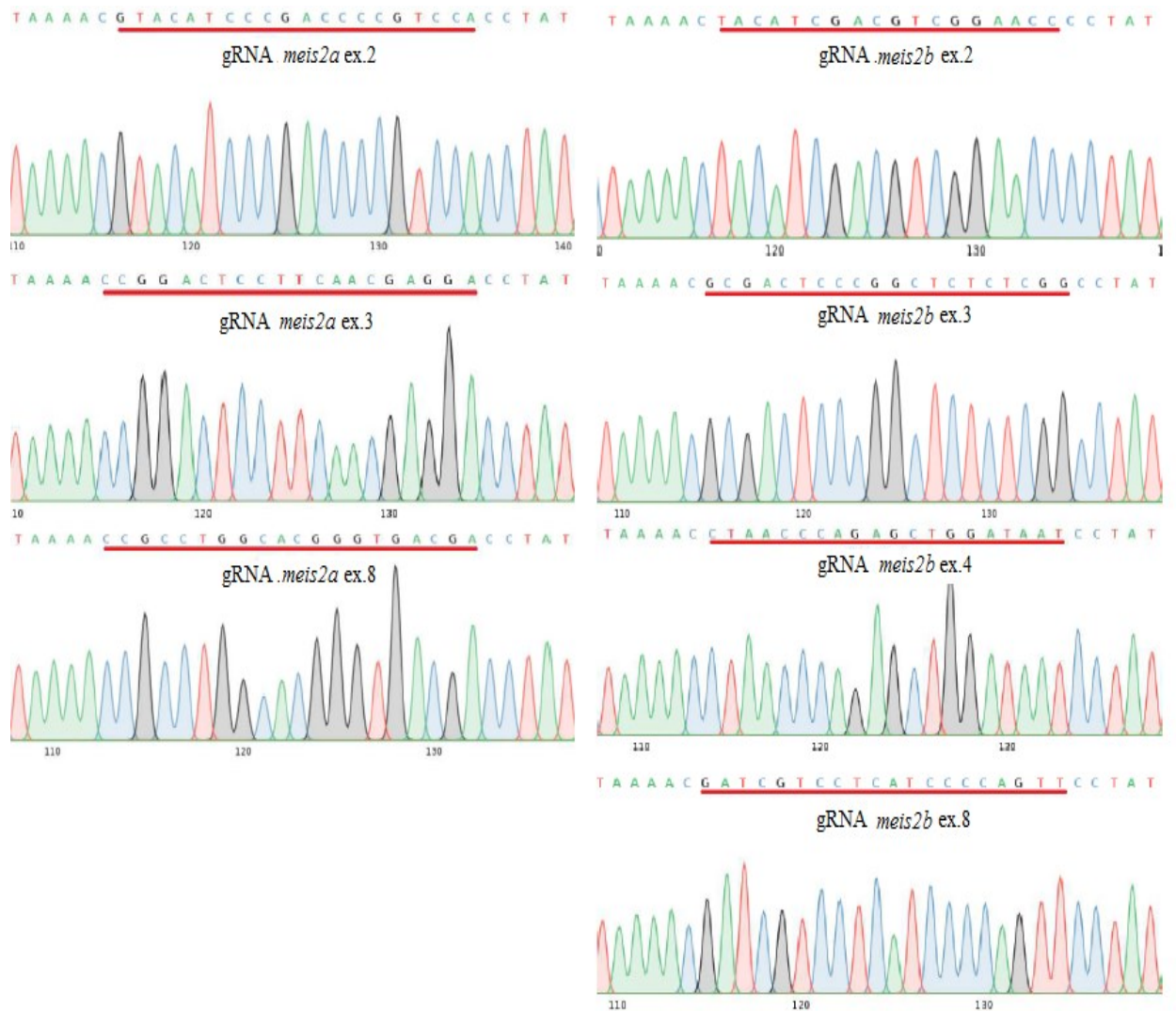
*tracrRNA-5'

AAATCTCGATCTTTATCGTTCAATTTTATCCGATCAGGCAATAGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGCCTAG



Obrázok 15: Grafické znázornenie lokalizácie navrhnutých sgRNA.

Pre gén *meis2a* boli navrhnuté sgRNA v exóne dva, tri a osem, ktorý je súčasťou homeodomény (HD). U génu *meis2b* boli navrhnuté štyri sgRNA v exónoch dva, tri, štyri a osem, ktorý je súčasťou homeodomény (HD). Exóny, v ktorých boli navrhnuté sgRNA sú prítomné vo všetkých zstrihových variantoch.

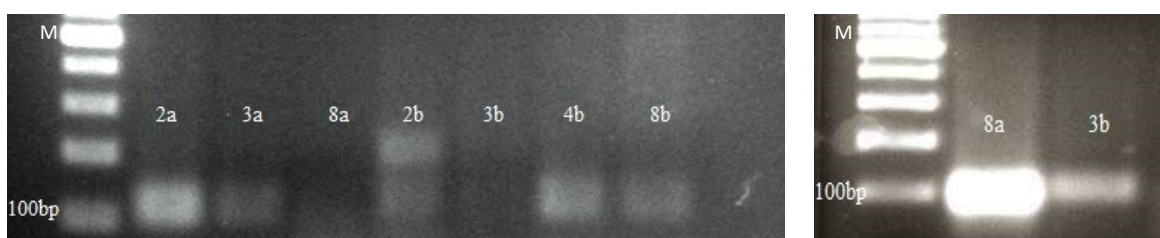


Obrázok 16: Chromatogram sekvenácie vektora pT7.

Po zaklonovaní inzeru do pT7 vektora bola sekvenáciou overená prítomnosť požadovaných inzerov, ktoré kódujú gRNA.

Tab. 15: Komplementárne oligonukleotidy kódujúce sgRNA pre meis2a a meis2b.

| Exón | Forward | Reverse |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| meis2a: exón 2 | TAGGTGGACGGGGTTCGGGATGTAC | AAACGTACATCCCCGACCCCGTCCA |
| meis2a: exón 3 | TAGGTCCTCGTTGAAGGAGTCCG | AAACCGGACTCCTTCAACGAGGA |
| meis2a: exón 8 | TAGGTCGTCACCCGTGCCAGGCG | AAACCGCCTGGCACGGGTGACGA |
| meis2b: exón 2 | TAGGGGTTCCGACGTCGATGTA | AAACTACATCGACGTCGGAACC |
| meis2b: exón 3 | TAGGCCGAGAGAGCCGGGAGTCGC | AAACGCGACTCCCGGCTCTCTCGG |
| meis2b: exón 4 | TAGGATTATCCAGCTCTGGGTTAG | AAACTAACCCAGAGCTGGATAAT |
| meis2b: exón 8 | TAGGAACTGGGGATGAGGACGATC | AAACGATCGTCCTCATCCCCAGTT |



Obrázok 17: Overenie transkribovaných sgRNA na agarózovom gély.

Úspešnosť transkripcie bola overená u všetkých sgRNA pre každý navrhnutý exón (meis2a exóny: 2a, 3a, 8a, meis2b exóny: 2b, 3b, 4b, 8b). (M) marker.

6.2 Genotypovanie

Do jedno alebo dvojbunkového štádia oocyty bol injikovaný mix všetkých navrhnutých sgRNA spoločne s Cas9. Mix sgRNA bol pre jednotlivé gény injikovaný zvlášť. V štádiu 5 dpf sme po každej injikácii urobili predbežný skrining úspešnosti injikácie. Pokiaľ sa vo vybraných dvanástich embryách preukázala prítomnosť heteroduplexov pomocou testu mobility heteroduplexov (HMA) aspoň u jedného embrya, injikáciu sme považovali za úspešnú. Po dosiahnutí dostatočnej veľkosti rýb (zhruba 6 týždňov) boli tieto ryby genotypované HMA (F0 generácia) a mutané ryby boli použité na získanie homozygotnej mutantnej línie (F2 generácia). Pre fenotypové analýzy sme použili embryá získané krížením už overených homozygotných mutantov a fixovali ich v požadovanom vývojovom štádiu.

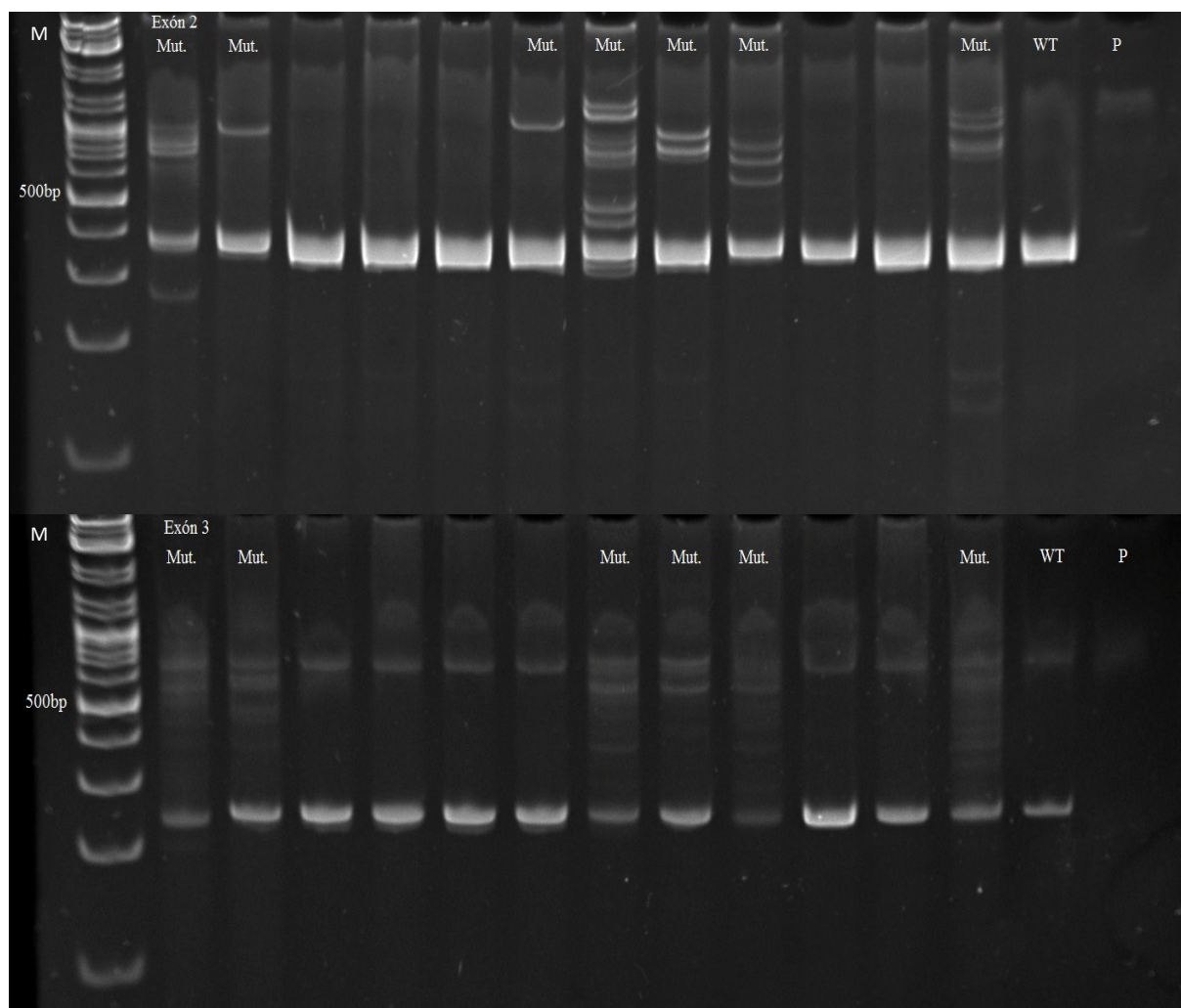
6.2.1 Genotypovanie F0 generácie

Embryá injikované CRISPR/Cas9 systémom (F0 generácia) boli genotypované pomocou testu mobility heteroduplexov (HMA). CRISPR/Cas9 systém vytvára malé inzercie alebo delécie v cieľovom géne (takzvané indly), ktoré vedú k vzniku heteroduplexov a tie sa zvyčajne nachádzajú pod rozlišovacou schopnosťou agarózovej gélovej elektroforézy. HMA dokáže identifikovať indle už nad 2 bp.

Úspešnosť injikácie systému bola pri oboch génoch viac ako 70 % (Tab.16). Mutantné ryby (mozaiky) získané genotypovaním prostredníctvom HMA (Obr. 18, 19) boli použité na ďalšie kríženie. U génu *meis2a* vykazoval najväčšiu efektivitu sgRNA navrhnutý v exóne 2 a 3 u génu *meis2b* boli sgRNA navrhnuté pre exóny 2 a 4 (Obr. 18, 19). U ďalších krížení sme pracovali výhradne s líniami mutantnými v exónoch 2.

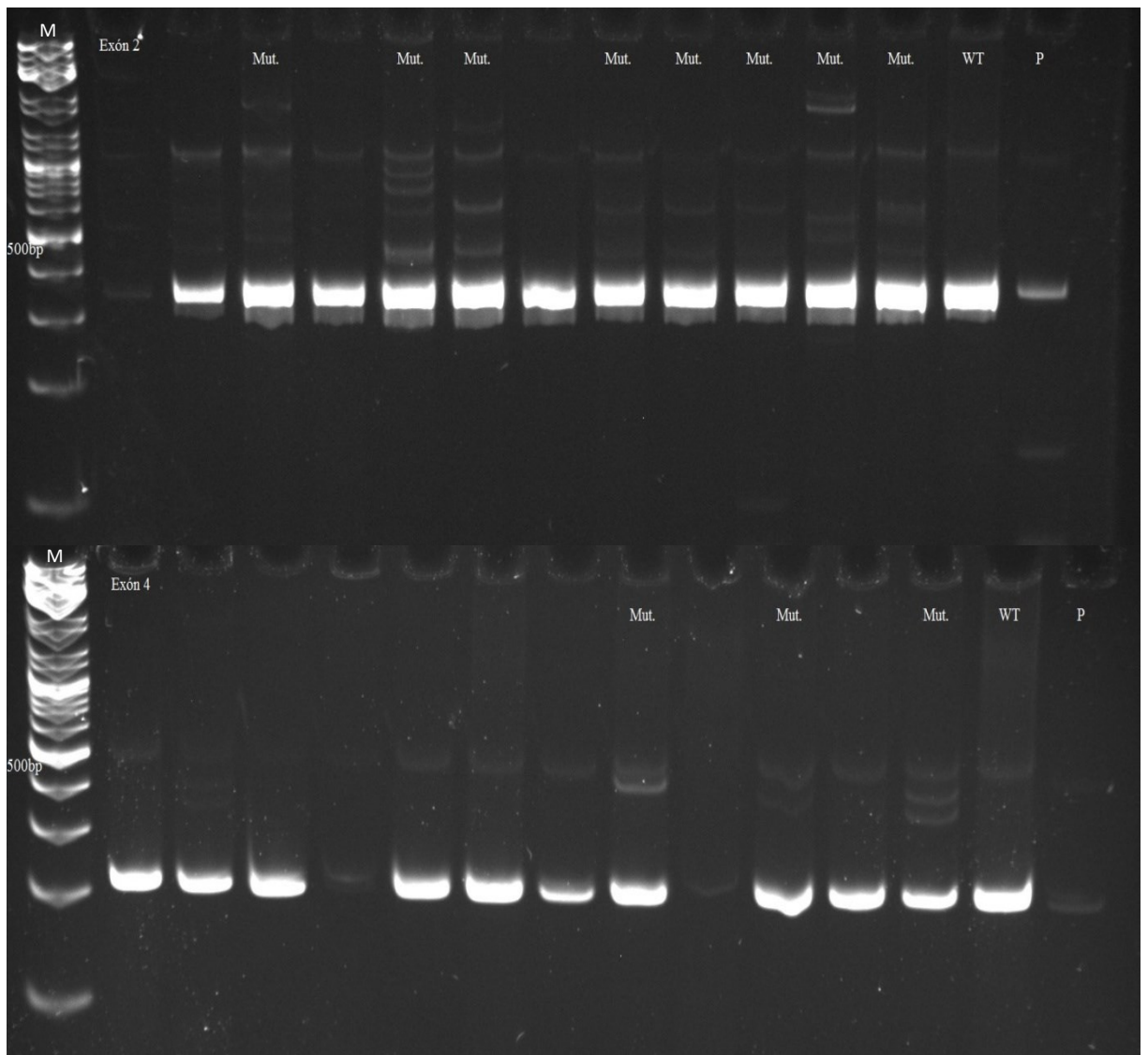
Tab. 16: Kvantifikácia genotypovania a úspešnosti injikácie F0 generácie a prenosu mutácií do F1 generácie. F1 generácia u *meis2b* génu nebola doposiaľ genotypovaná.

| Gén | Celkom F0 genotyp.rýb | F0 mutanti | Účinnosť [%] | Celkom F1 genotyp.rýb | F0 mutanti | Účinnosť [%] |
|---------------|-----------------------|------------|--------------|-----------------------|------------|--------------|
| <i>meis2a</i> | 48 | 34 | 70,8 | 98 | 34 | 34,7 |
| <i>meis2b</i> | 77 | 54 | 70,2 | - | - | - |



Obrázok 18: Genotypovanie F0 generácie u *meis2a* génu.

Heteroduplexy boli detegované u vzoriek označených ako mutanti (Mut.) u exónov 2 a 3. Ako kontrola bola použitá DNA ryby divokého typu (WT) a proteínáza K (P) v ktorej nebola izolovaná žiadna DNA. (M) marker.



Obrázok 19: Genotypovanie F0 generácie u *meis2b* génu.

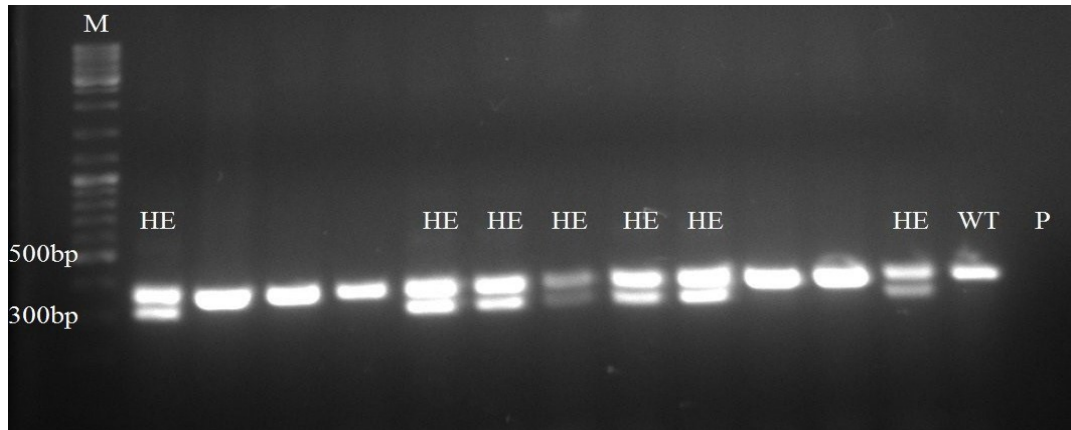
Heteroduplexy boli detegovné u vzoriek označených ako mutanti (*Mut.*) u exónov 2 a 4. Ako kontrola bola použitá DNA ryby divokého typu (*WT*) a proteináza K (*P*) v ktorej nebola izolovaná žiadna DNA. (*M*) marker.

6.2.2 Genotypovanie F1 generácie

Krížením F0 mutantov s rybami divokého typu sme získali F1 generáciu. F1 generáciu sme genotypovali agarózovou gélovou elektroforézou, ktorá nám pomohla odhaliť heterozygotné mutanté ryby už s väčším indlom (deléciou alebo inzerciou, Obr. 20). Efektivita mutagenézy a frekvencia prenosu potenciálnej mutácie na ďalšiu generáciu (F1) je zobrazená v tabuľke 16. V prípade génu *meis2a* bola efektivita prenosu 34,7 %. Generáciu F1 u génu *meis2b* sme doposiaľ negenotypovali z dôvodu nedostatočnej veľkosti rýb pre odobranie vzorky DNA v čase dokončovania tejto diplomovej práce.

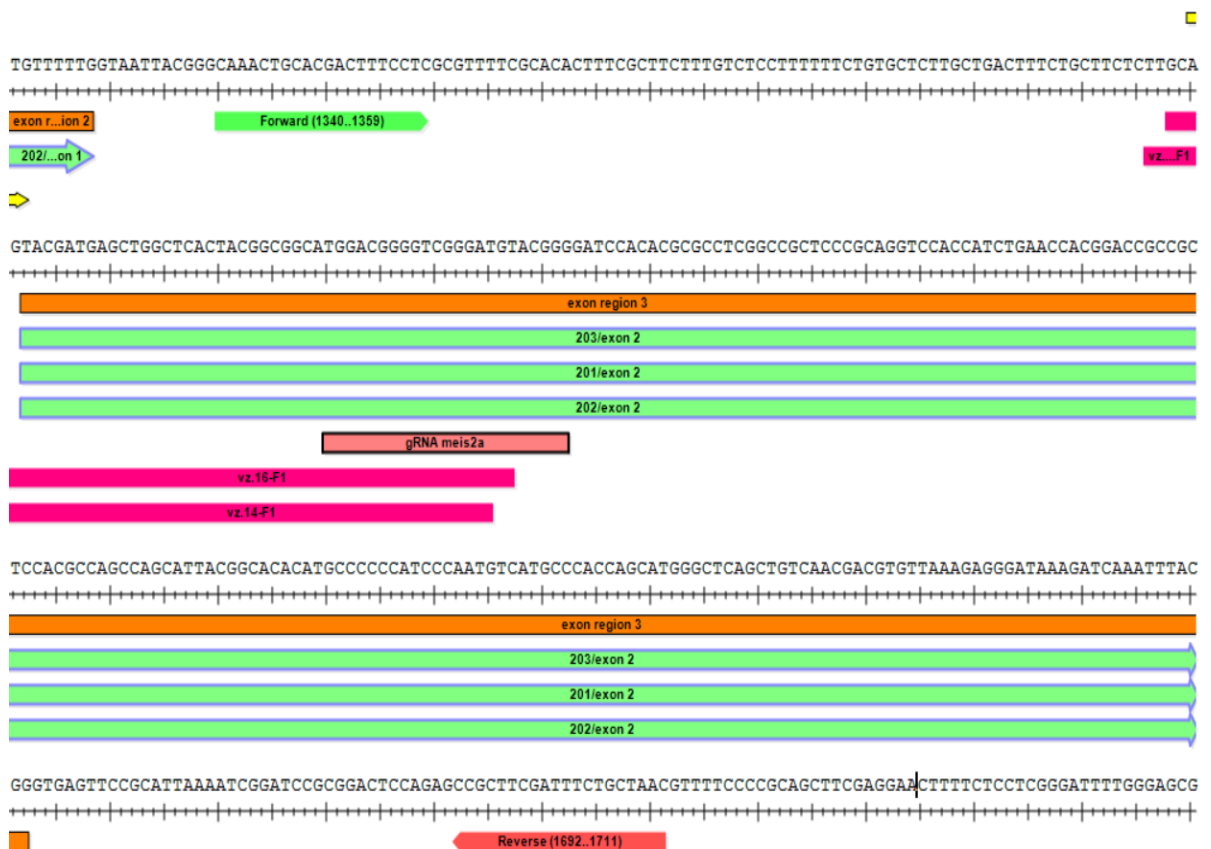
Niekoľko potenciálnych heterozygotných rýb F1 generácie sme sekvenovali a výsledky sekvenácie boli overené v online nástroji CRISP-ID. Zo šiestich sekvenovaných vzoriek rýb

došlo k preukázaniu delécie s posunom čítacieho rámca len u troch z nich. U týchto rýb sme sekvenáciou preukázali deléciu 50 bázových párov (Obr. 21, 22). Pre problémy s reprodukciou boli použité na generáciu ďalšej línie len dve z týchto rýb, ktoré boli opäť krížené s rybami divokého typu, kvôli získaniu diverzity v pohlaví a možnosti získať ďalšiu homozygotnú líniu.



Obrázok 20: Genotypovanie F1 generácie u meis2a.

Spodné bandy heterozygotov (HE) s deléciou, zodpovedajú 300 bp dlhým DNA fragmentom markera (M). Ako kontrola bola použitá DNA ryby divokého typu (WT) a proteináza K (P) v ktorej nebola izolovaná žiadna DNA.



Obrázok 21: Schematické návrhy primerov, sgRNA v exóne 2 u Danio rerio a označenie delécií.

Navrhnutý forward primer (zelená) a reverse primer (bledo ružová) v exóne 2. Označenie navrhnutej sgRNA (bledo ružová) a vzniknutých delécií (ružová).

A

```

wt CTGTGCTCTTGCTGACTTTCGTGCTTCCC-----TTACGGGGATCCACA
mut CTGTGCTCTTGCTGACTTTCGTGCTTCTCTTGCAGTACGATGAGCTGGCTCACTACGGCGGCATGGACGGGGTCGGGATGTACGGGGATCCACA
***** *-----*
                                     50bp del.
                                     meis2a/vz.14/ex2/F1

wt CTGTGCTC TTGCTGACTTTCGTGCTTCTCT-----GCGGGGATCCAC
mut CTGTGCTC TTGCTGACTTTCGTGCTTCTCTTGCAGTACGATGAGCTGGCTCACTACGGCGGCATGGACGGGGTCGGGATGTACGGGGATCCAC
***** *-----*
                                     50bp del.
                                     meis2a/vz.16/ex2/F1

```

B

```

wt MLMAQRVSSFTDQLEL.SLPTLFLLCNVKSCLTSCVLHMIKSLSDSVRRPCPLWWRDGSWSGSDVDVVRGPARASAPAAGSSSFESRAATTCQPT
mut MLMAQRVSSFTDQLEL.SLPTLFLLCNVKSCLTSCAAYDQISV.FSTKTLPTMVAGWMELGFRRCCTGTRTRLGPCRRFI.I.ITGRHHMPTNT

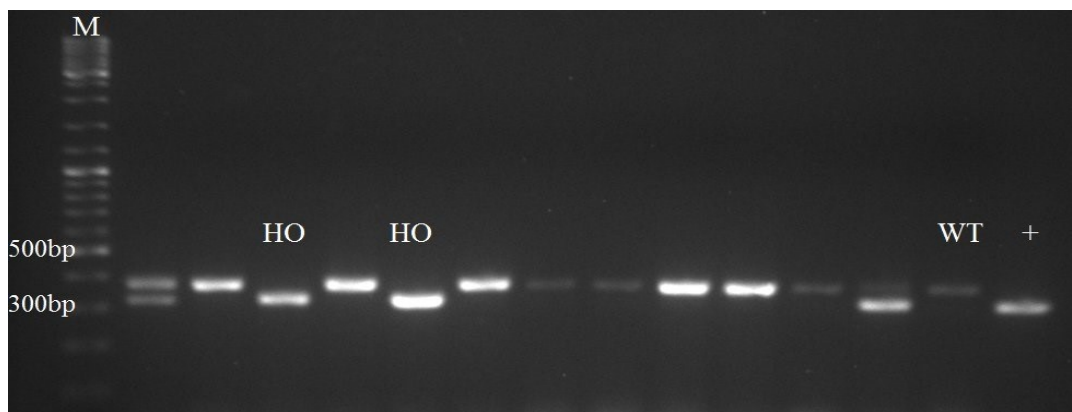
```

Obrázok 22: Výsledky sekvenácie rýb F1 generácie u génu meis2a v exóne 2.

(A) Sekvenácia preukázala deléciu 50 bp, ktorá vedie k zmene čítacieho rámca (B) v exóne 2 (ex.2) u oboch rýb (pracovný názov vzorka (vz.) 14 a 16).

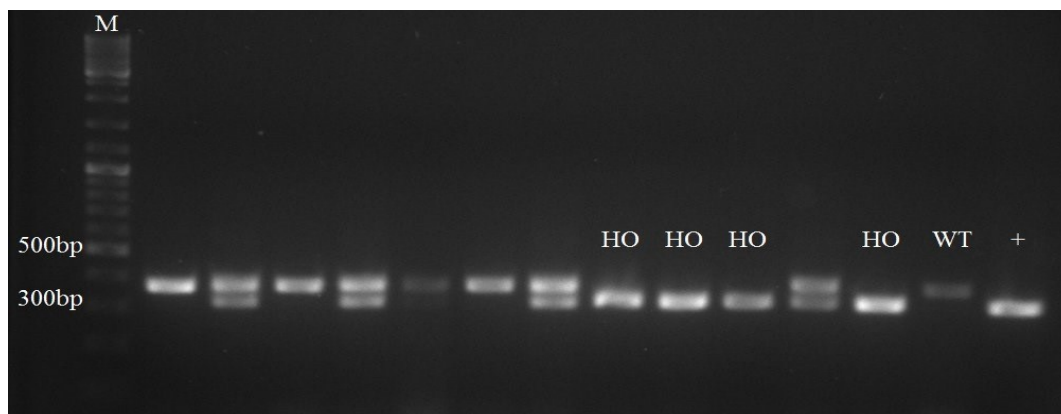
6.2.3 Genotypovanie F2 generácie

Generácia F2 bola získaná krížením heterozygotných rýb, ktoré boli overené sekvenáciou a genotypovaním na agarozóvom gély, rovnako ako generácia F1 (obr. 23, 24). Získané homozygotné ryby boli použité na fenotypové analýzy a na udržanie mutantnej homozygotnej línie.



Obrázok 23: Genotypovanie F2 generácie u meis2a, vzorka 14.

Bandy homozygotov (HO) s 50 bp deléciou, odpovedajú 300 bp dlhým DNA fragmentom markeru (M). Ako kontrola bola použitá DNA ryby divokého typu (WT) a ako pozitívna kontrola (+) bola použitá DNA už overenej homozygotnej ryby.



Obrázok 24: Genotypovanie F2 generácie u *meis2a*, vzorka 16.

Bandy homozygotov (HO) s 50 bp deléciou, odpovedajú 300 bp dlhým DNA fragmentom markeru (M). Ako kontrola bola použitá DNA ryby divokého typu (WT) a ako pozitívna kontrola (+) bola použitá DNA už overenej homozygotnej ryby.

6.3 Fenotypová analýza

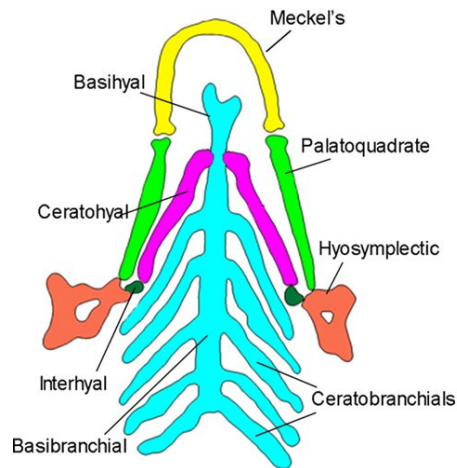
6.3.1 Farbenie alcianovou modrou

Farbenie Alcianovou modrou, ktorá saviaže na kyslé polysacharidy v chrupavkách, nám umožnilo študovať vývoj hlavovo-tvárových chrupaviek počas embryonálneho vývoja zebričky. Raný vývoj chrupaviek sme sledovali u embryí po CRISPR/Cas9 mutagenéze v géne *meis2a* a u morfantov s umlčanými expresiami *meis2a* a *meis2b* génov.

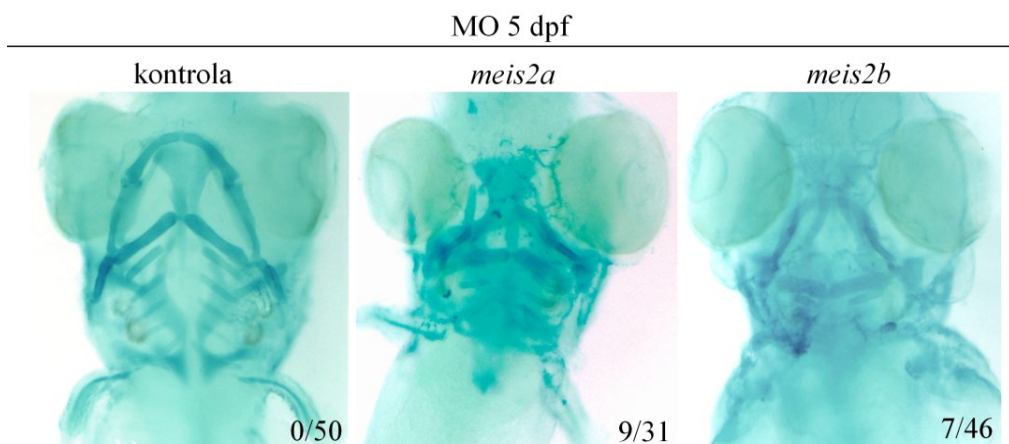
Ako kontrolu k indukovanej mutagenéze sme zvolili špecifické Morfolína pre *meis2a* a *meis2b*, ktoré znižujú expresiu Meis2 proteínov. Nami použité Morfolína blokujú proces translácie mRNA do aminokyselinovej sekvencie tým, že bránia nasadnutiu ribozómu. Knock-down experimenty s Morfolínami nám tiež umožňujú študovať dôležitosť jednotlivých Meis2 proteínov, a tak determinovať vzťah medzi TF Meis2a a Meis2b.

U morfantov zebričky sme pozorovali rozsiahle malformácie chrupaviek. K deformáciám došlo predovšetkým v mandibulárnych chrupavkách, kde sme pozorovali sfúzovanie Meckelovej chrupavky s palatoquadrate a taktiež deformácie ceratohyal a hyomandibulare. (Obr. 25, 26).

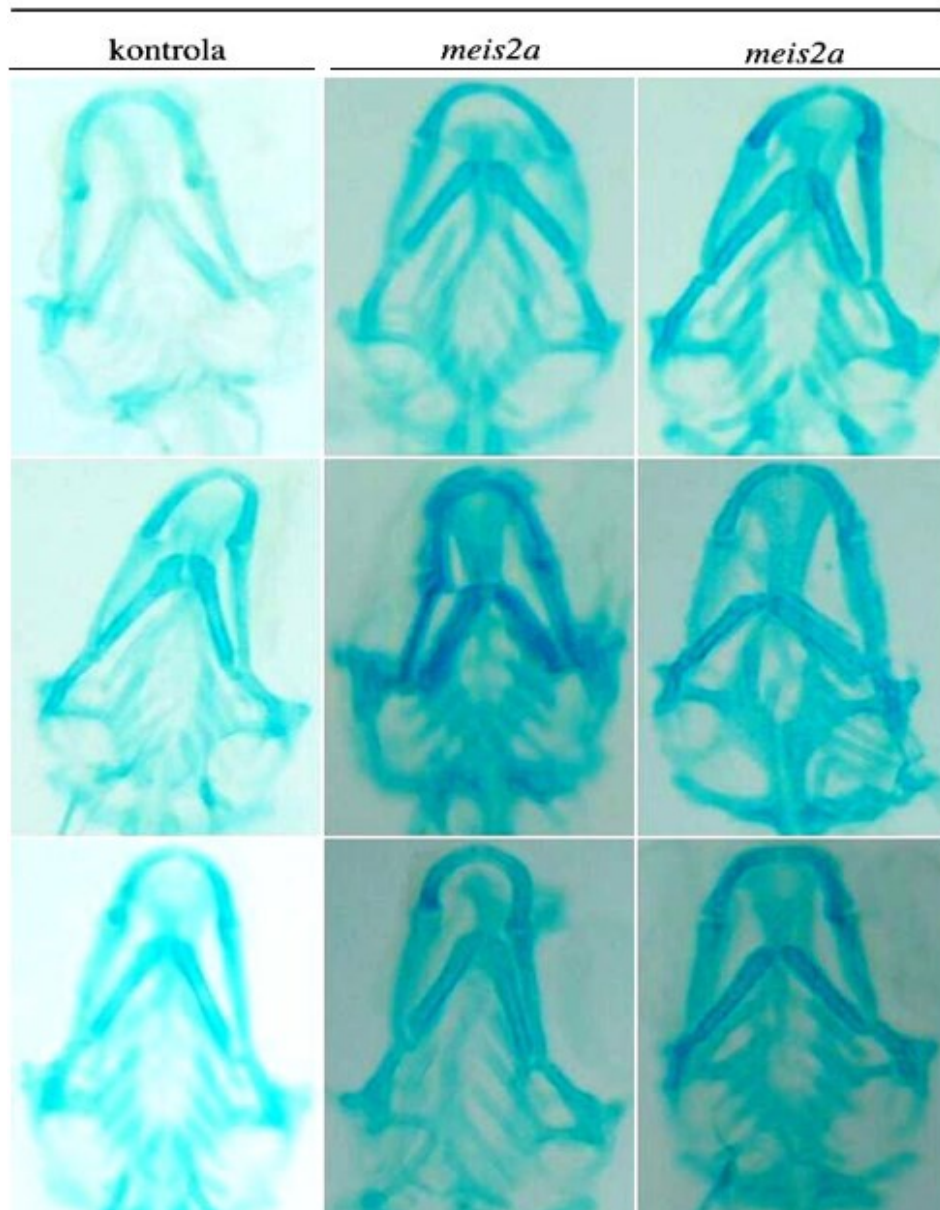
Pri farbení hlavových chrupaviek knock-out embryí, u ktorých bol z funkcie vyradený gén *meis2a*, sme nepozorovali zreteľné malformácie chrupaviek, ktoré by boli dôsledkom absencie Meis2a transkripčného faktoru (Obr. 27).



Obrázok 25: Anatómia chrupaviek hlavy u *Danio rerio*, 5 dpf.
 Ventrálny pohľad na anatomické uporiadanie chrupaviek zebričky vo vývojovom štádiu 5 dní po fertilizácii (dpf). Prevzaté a upravené podľa (Zoeller et al., 2009).



Obrázok 26: Farbenie chrupaviek hlavy Alcianovou modrou u morfantov *meis2a* a *meis2b*, 5 dpf.
 Ventrálny pohľad na Alcianové farbenie embryí 5 dní po fertilizácii (dpf). Malformácie chrupaviek hlavy po injekciách morfrolín (MO) blokujúcich transláciu *meis2a* a *meis2b* génu. V oboch prípadoch došlo k deformáciám mandibulárnych chrupaviek (Meckelovej chrupavky, palatoquadratum, ceratohyal a taktiež hyomandibulare). U *meis2b* bol pozorovaný fentotyp u 9 z 31 embryí a u *meis2b* to bolo u 7 embryí z celkového počtu 46.



Obrázok 27: Farbenie chrupaviek hlavy Alcianovou modrou u mutantov *meis2a*, 8 dpf.

Ventrálny pohľad na Alcianové farbenie embryí 8 dní po fertilizácii (dpf) u knock-out rýb. Nie sú pozorované žiadne výrazne zmeny v usporiadaní chrupaviek v hlavovej oblasti.

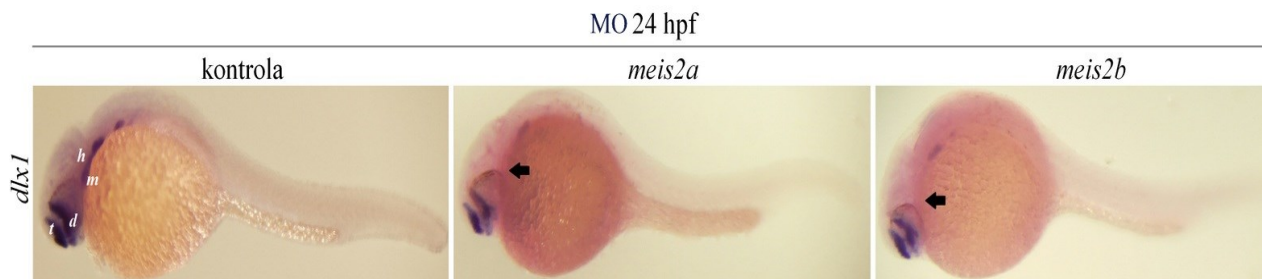
6.3.2 In situ hybridizácia

Pri analýze mutantov sme sa zamerali na dve hlavné oblasti, a to kraniofaciálnu oblasť a vývoj srdca, ktoré sú poškodené pri vývoji embryí u myši s chýbajúcim Meis2 (Machon et al., 2015). In situ hybridizácia (ISH) nám umožnila sledovať lokalizáciu expície špecifických génov neurálnej lišty pomocou komplementárnych DNA prób. U morfantov sme venovali pozornosť špecifikátoru buniek neurálnej lišty, génu *dlx1*, ktorý je okrem iného exprimovaný aj v tvárovo-hlavových štruktúrach. U morfantov a mutantov sme pozorovali expresiu génu

myl7, ktorý sa exprimuje v svalovej srdečnej predsieni a tým moduluje srdečný vývoj a kontraktilitu myokardu.

U morfantov sme pozorovali redukciu expresie *dlx1* v oblasti mandibulárneho a hyoidného oblúku (Obr. 28) pri knock-down oboch génov, čo naznačuje dôležitosť Meis2a a Meis2b proteínov pri formovaní týchto štruktúr.

In situ hybridizácia *myl7* nám umožnila sledovať morfológické zmeny vo vývoji predsieni srdca zebričky (Obr. 29). Expressiu *myl7* sme sledovali u morfantov z ventrálneho pohľadu, kde sme pozorovali zmenu v rozsahu signálu expresie génu a jeho čiastočnú redukciu (Obr. 30). U mutantov *meis2a*, ktoré sme sledovali z frontálnej strany, sme pri značení *myl7* pozorovali veľmi mierne zväčšenie predsieni srdca, avšak na potvrdenie týchto pozorovaní sú potrebné ďalšie experimenty (Obr. 31).



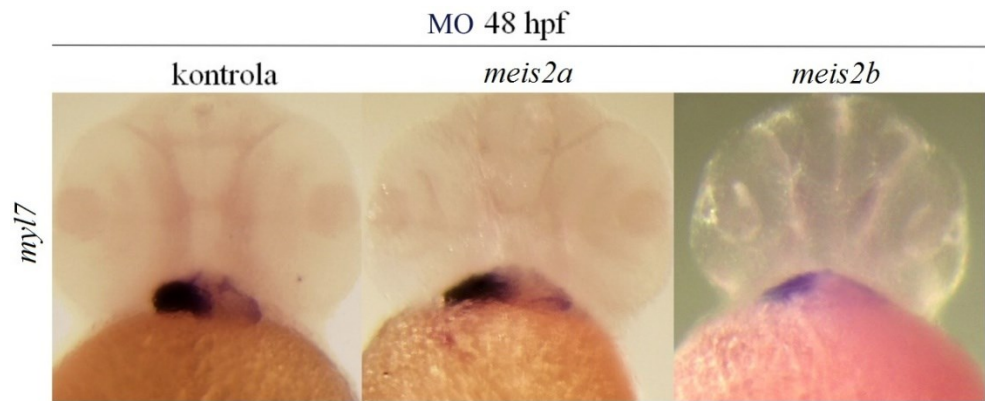
Obrázok 28: Expressia *dlx1* u morfantov (MO) *meis2a* a *meis2b*, 24.hpf.

Gén *dlx1* je u kontrolnej ryby exprimovaný v koncovom mozgu (telencephalon, t), medzmozgu (diencephalon, d), v mandibulárnom obluku (m) a hyoidnom obluku (h). U morfantov *meis2a* aj *meis2b* bola pozorovaná redukcija expresie v mandibule a hyoidnom obluku.

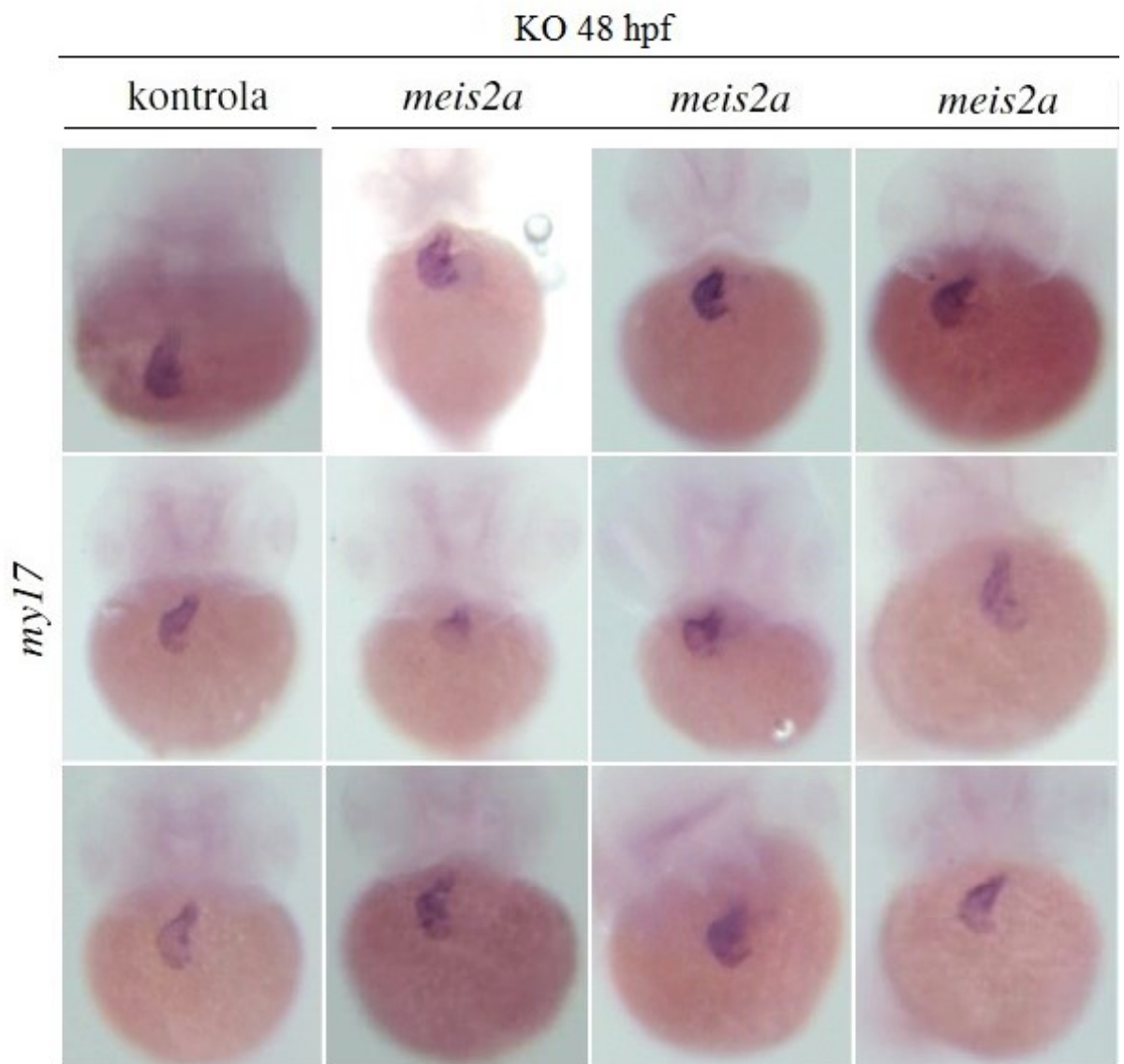


Obrázok 29: Usporiadanie srdca u *Danio rerio*, 5 dpf.

Červeným je značený predsieňový prekursor, modrým je značený komorový prekursor, žltá značí predsieňovo-komorový kanál. Prevzaté a upravené podľa (Keßler et al., 2012).



Obrázok 30: *In situ* hybridizácia *myl7* na morfantoch *meis2a* a *meis2b*, 48 hpf. Pohľad z ventrálnej strany na značenú srdečnú predsieň, u morfantov *meis2a* a *meis2b* došlo k zmene expresie.

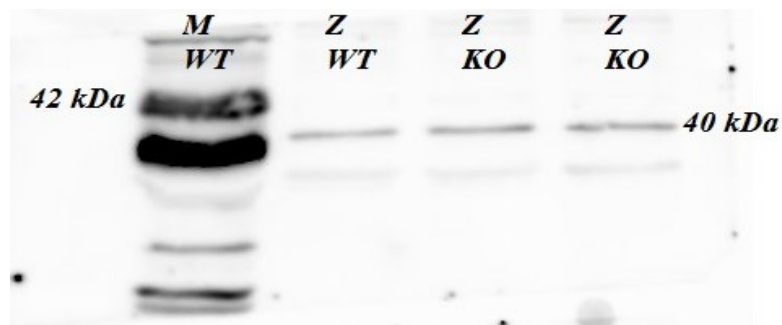


Obrázok 31: *In situ* hybridizácia *myl7* na mutantoch *meis2a*, 48 hpf. Pohľad z frontálnej strany na značenú srdečnú predsieň, u mutantov *meis2a* je možné pozorovať veľmi mierne zväčšenie predsiene srdca.

6.3.3 Western blot

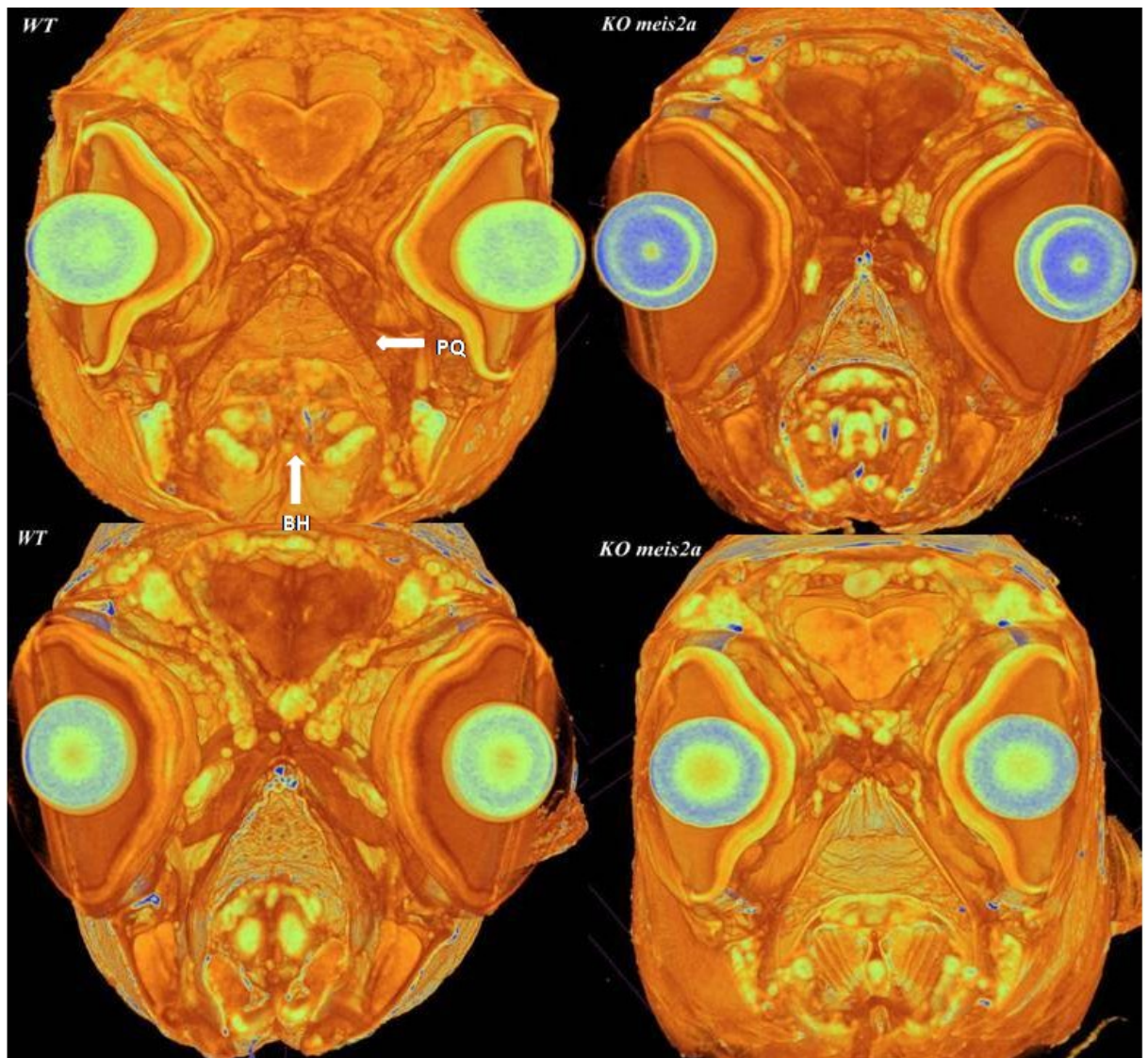
Western blot sme využili na overenie prítomnosti proteínu Meis2a vo vzorkách mutatívnych rýb, ako kontrolu sme použili izolované proteíny z ryby divokého typu. Izolované proteíny z myši sme použili pre overenie funkčnosti protilátky na jednotlivé modelové organizmy. Protilátka, ktorú sme použili bola primárne generovaná pre myši Meis2.

Bandy odpovedajúce veľkosti Meis2 proteínov sme pozorovali u všetkých testovaných vzoriek (Obr. 32). Podľa očakávaní sa nám podarilo pozorovať bandy, ktoré odpovedajú Meis2 proteínu (42 kDa) v extrakte z myšieho embrya, čím sme potvrdili špecificitu protilátky. Band podobnej veľkosti (40 kDa) bol pozorovaný aj vo vzorkách proteínov izolovaných zo zebričky. U Dania sme bandy pozorovali vo vzorke z ryby divokého ale aj vo vzorkách s KO *meis2a*, pravdepodobne z toho dôvodu, že aminokyselinové sekvencie všetkých testovaných Meis proteínov sú si veľmi podobné (Obr. 33) a väzba protilátky, nie je špecifická na Meis2a a pravdepodobne nebude špecifická ani na Meis2b.



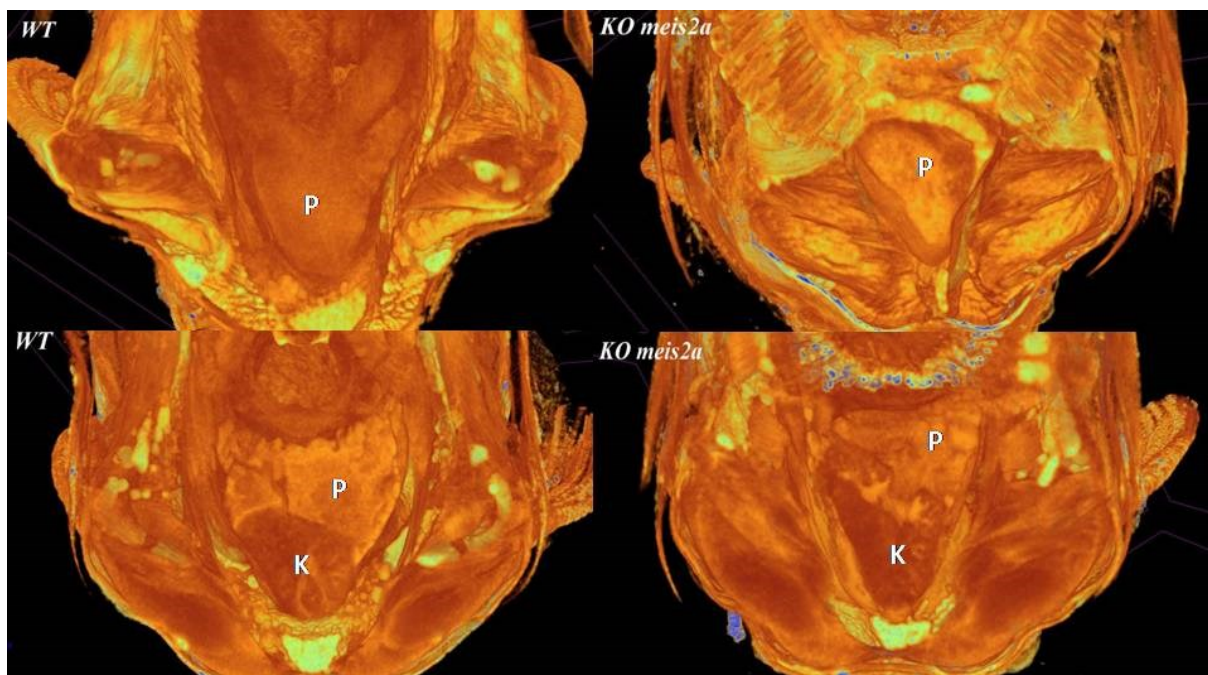
Obrázok 32: WB detekcia prítomnosti Meis2 proteínov.

Ako kontrola boli použité proteínové vzorky myši (M, WT) a ryby divokého typu (Z, WT). Tak ako u kontrolných vzoriek aj u mutantov zodpovedali detegované bandy veľkostiam Meis2a aj Meis2b proteínov (u myši 42 kDa, u zebričky 40 kDa).

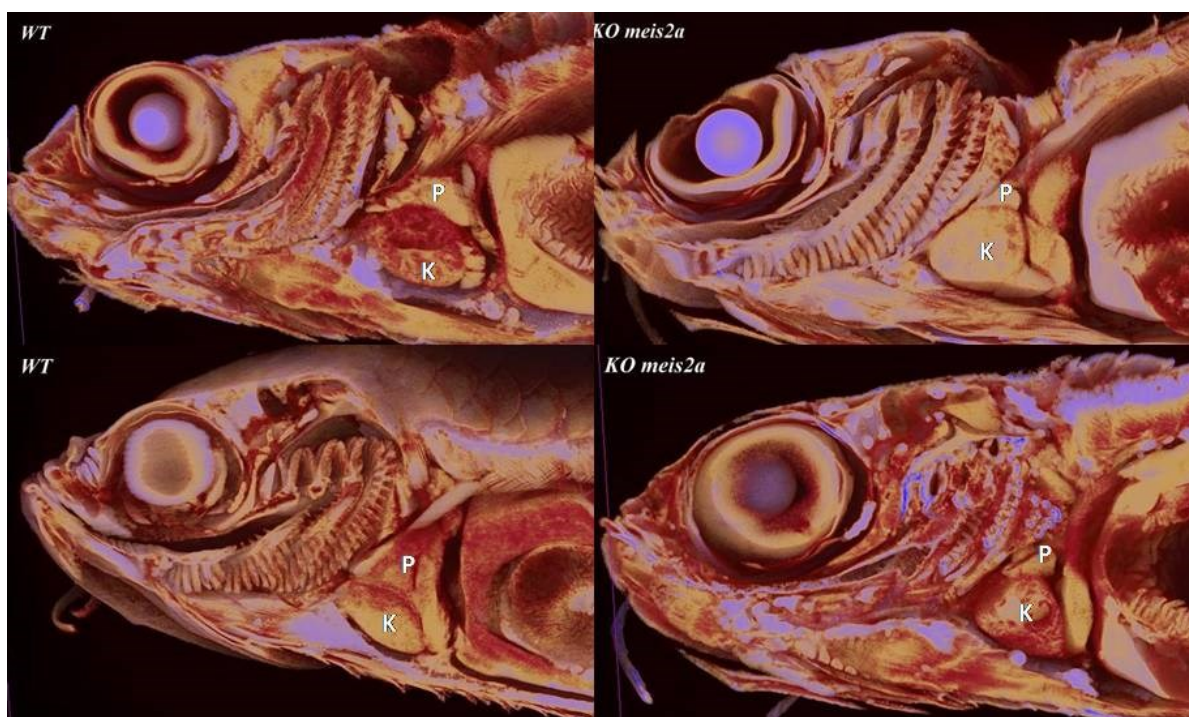


Obrázok 34: Frontálny rez hlavou *Danio rerio*, microCT, 2mpf.

Snímky frontálnych rezov z microCT u rýb divokého typu (WT) a mutantov (KO) *meis2a*. Nepozorovali sme jednoznačný fenotyp v hlavových chrupkách ako napríklad palatoquadrate (PQ) alebo basihyal (BH).



Obrázok 35: Tranzverzálny rez hlavou *Danio rerio*, microCT, 2mpf.
 Snímky tranzverzálnych rezov z microCT u rýb divokého typu (WT) a mutantov (KO) *meis2a*. Nepozorovali sme jednoznačný fenotyp v predsieni (P) a komore srdca (K).



Obrázok 36: Sagitálny rez *Danio rerio*, microCT, 2mpf.
 Snímky sagitálnych rezov z microCT u rýb divokého typu (WT) a mutantov (KO) *meis2a*. Ani sagitálny pohľad neodhalil jednoznačný fenotyp v predsieni (P) a komore srdca (K).

7 DISKUSIA

Neurálna lišta, ktorá je derivovaná z ektodermu, sa veľmi často označuje aj ako štvrtá zárodočná vrstva (Hall, 2000), a to práve kvôli tomu, že ide o populáciu multipotentných migrujúcich buniek, ktoré sú schopné dať vznik širokej škále odvodených tkanív. Migrácia buniek neurálnej lišty je jedným zo základných dejov evolúcie stavovcov, ktorý vedie k formovaniu chrupaviek hlavy ako napríklad čeľusti a tvárovej časti, pigmentovým a srdcovým bunkám, periférnemu nervovému systému, axónom a veľa ďalšieho. Ide o tranzientnú štruktúru, ktorá podstupuje epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu, preto je prítomná len v raných embryonálnych štádiách. Akékoľvek poruchy vývoja neurálnej lišty môžu viesť k závažným patológiám a negatívnemu dopadu na množstvo orgánových systémov a funkčných štruktúr v rámci tela stavovcov, čím sa otvára dôležitost' a široké študijné pole pre výskum týchto štruktúr.

Je dôležité pochopiť mechanizmus formovania a diverzifikácie neurálnej lišty, a preto bolo v rámci posledných rokov vynaložené veľké úsilie na štúdium indukčných molekúl neurálnej lišty. Špecifikácia neurálnej lišty na neurálnej platni je niekoľko stupňový proces. Neurálna lišta je pravdepodobne pod kontrolou transkripčných a epigenetických faktorov, ktoré vytvárajú hierarchické usporiadanie v regulačných kaskádach (Huang and Saint-Jeannet, 2004; Simões-Costa and Bronner, 2015). K indukcii buniek neurálnej lišty dochádza počas gastrulácie na hranici medzi prezumptívnou epidermis a neurálnou platňou. Prvým krokom je pravdepodobne špecifikácia okrajov neurálnej platne. Neurálna platňa by mala následne indukovať v bunkách na okraji neurálnej platne transkripčné faktory, ktoré ich špecifikujú. Špecifikátory neurálnej platne indukujú ďalší set špecifických transkripčných faktorov a to špecifikátory neurálnej lišty, ktoré indukujú epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu nasledovanú delamináciou z neuroepitelu a migráciou buniek neurálnej lišty pod kontrolou špecifických transkripčných faktorov. V poslednom kroku dochádza k diferenciácii buniek neurálnej lišty.

Avšak, nie všetky faktory, ktoré pravdepodobne zohrávajú dôležitú špecifikačnú úlohu počas formovania buniek neurálnej lišty, sú zahrnuté v génovej regulačnej sieti pre formovanie buniek neurálnej lišty. Príkladom môže byť TALE homeodoménový transkripčný faktor Meis. Machon et al. (2015) preukázal, že Meis2 je vysoko abundantný v bunkách neurálnej lišty, a že zohráva dôležitú úlohu pre ich správnu funkciu. *Meis2* deficientné embryá myši preukazovali defekty v tkanivách, ktoré sú derivované z neurálnej lišty. Bolo pozorovaných niekoľko abnormalít v kraniálnych nervoch, abnormálny výtokový trakt srdca a problémy v správnom formovaní srdca. Experimenty v rovnakej štúdií, na kondicionálnych

mutantoch myši, potvrdili dôležitosť Meis2 ako významného faktoru počas formovania buniek neurálnej lišty. Kondicionálnej mutanty preukázali poruchy pri vývoji kraniofaciálneho skeletu, srdca a taktiež abnormality v kraniálnych nervoch. (Machon et al., 2015).

Podobné výsledky boli získane aj na experimentoch využívajúcich ako modelový organizmus *Danio rerio*. U zebričiek bola preukazná dôležitosť prítomnosti Meis1 a Meis2a proteínov počas raného embryonálneho vývoja, kde došlo poruchám vo vývoji tvárovohlavových chrupaviek, ktoré sú derivované z NCC. Zníženie expresie oboch proteínov viedlo k získaniu podobného kraniofaciálneho fenotypu. (Melvin et al., 2013). Avšak celá štúdia bola postavená na využívaní knock-down experimentov pomocou Morfolín.

Morfolína boli použité na plošný skrining génových funkcií u zebričky (Pickart et al., 2006). Ide zároveň o najviac využívané anti-sense knock-down nástroje v tomto modelovom organizme, ktoré sú schopné redukovať maternálne, tak aj zygotické proteíny (Ciruna et al., 2002). Morfolína poskytujú široké možnosti pre skúmanie funkcie génov v živých organizmoch, ale s dostupnosťou nástrojov, ktoré dokážu špecificky modifikovať genóm sa naskytuje čoraz viac otázok ohľadne schopnosti Morfolín poskytnúť jednoznačné fenotypové výsledky. Pre overenie špecificity Morfolín, Kok et al. (2015) vo svojej štúdií indukovali knock-down špecifické mutácie u viac ako dvadsiatich génov. Získane fenotypy u polovice génov, u ktorých bola potvrdená špecifita MO rescue experimentmi, neodpovedali publikovaným fenotypom založených na Morfolínach a targetovaní RNA. Na základe týchto výsledkov, autori predpokladajú, že špecifita Morfolín nie je dostatočná k tomu, aby bol targetovaný len jeden gén, o ktorý sa zaujímate, čo vedie k značným pochybnostiam aj u dosiaľ publikovaných dát. (Kok et al., 2015).

Práve pre to v tejto práci využívame predovšetkým miestne špecifický CRISPR/Cas9 systém ako nástroj pre vytvorenie mutančných línií v *meis2* génoch u zebričky. Avšak aj napriek vyššie spomenutým pochybnostiam o špecificite Morfolín, sme sa rozhodli ich využiť ako kontrolu k knock-out experimentom a tiež pre zistenie vzťahov medzi jednotlivými paralógmi génu.

CRISPR/cas9 systém bol etablovaný v našom laboratóriu a poskytuje jednoduchú a finančne nenáročnú modifikáciu genómu s omnoho vyššou špecificitou na nami ciele miesto v sekvencii DNA na rozdiel od Morfolín. Tieto programovateľné nukleázy v genóme indukujú vznik dvojreťazcových zlomov. Indukcia mutácie, resp. knock-out génu, o ktorý sme sa snažili v tejto práci je závislá na oprave dvojreťazcových zlomov. Spôsob opravy má esenciálny význam pre zachovanie genómovej integrity. Rozlišujeme medzi homologickou

opravou (oprava podľa sesterskej chromatídy) ale v prípadoch, kedy sme chceli navodiť knock-out génu, sme sa spoliehali na nehomológne spájanie koncov nukleotidových reťazcov DNA, ktoré viedli k vzniku heteroduplexov. Heteroduplexy sme detegovali pomocou testu mobility heteroduplexov (HMA). Miestne špecifické nukleázy, ako sú nukleázy zinkových prstov (ZFN), efektorové nukleázy podobné transkripčným aktivátorom (TALEN) a CRISPR/Cas9 systém sú schopné meniť genóm organizmu trvalo a táto zmena je prenášaná na potomkov, čo nám umožnilo vygenerovať F2 homozygotnú líniu *meis2a*, zatiaľ čo morfolína majú len časovo obmedzené knock-down pôsobenie.

Na druhú stranu, dominantné postavenie Morfolín v génových skrínincoch na *Danio rerio* je nevyvrátiteľné, avšak nedávno sa objavila štúdia, ktorá už pracuje s miestne špecifickými nukleázami. Guerra et al. (2018) pomocou TALEN-ov študoval mechanizmy podieľajúce sa na stanovenej rozmanitosti srdca. Cez tento knock-out prístup vyradili z funkcie *meis* gény v genóme zebričky. Získaný fenotyp v srdci sa však značne líšil od fenotypov, ktoré boli pozorované u zebričky po knock-down experimentoch s Morfolínami. Genómová mutácia v čítacom rámci *meis* génov poukázala na dominantné postavenie *meis2b*. (Guerra et al., 2018). V týchto mutantoch došlo k razantnému zväčšeniu srdečnej predsiene zebričky v pomere k jej komore. Paige et al. (2012) pomocou Morfolín identifikoval *meis2b* gén ako gén podieľajúci sa na srdečnom vývoji. Na rozdiel od knock-out experimentov (Guerra et al., 2018), Paige et al. (2012) využili Morfolína a pozoroval problémy s morfogenézou srdca týkajúce sa formovania srdečnej trubice a jej rotácie. Defekty boli trvalé a vyústili do nesprávneho tvarového usporiadania srdca. (Paige et al., 2012). Z týchto zistení nevyplýva jednoznačný záver pre priradenie funkčných vlastností *meis2* počas kardiovaskulárneho vývoja srdca. Ide o ďalší príklad, kedy bol pozorovaný rozdielny fenotyp po mutagenéze pomocou programovateľných nukleáz a knock-down experimentov pomocou Morfolín, čo pravdepodobne ukazuje na ich nedostatočnú špecifitu. Preto sa aj v tejto oblasti naskytuje zaujímavá možnosť pre štúdium génov rodiny *meis*, ktorú sme sa rozhodli preskúmať aj v tejto práci pomocou knock-down aj knock-out prístupov.

Transkripčný faktor Meis (myeloidový ektopický vírový integračný priestor) bol pôvodne objavený kvôli jeho mutáciám, ktorá urýchlila progres HOX-dependentnej leukémie (Moskow et al., 1995; Rieckhof et al., 1997). Ide o transkripčný faktor TALE (predĺženie troch aminokyselínových slučiek) s homeodoménou, cez ktorú interaguje s DNA. Je dôležité si uvedomiť, že všetky Meis proteíny zdieľajú veľkú časť homológnych aminokyselínových

úsekov, a preto je ich rozlíšenie veľmi ťažké, hlavne u experimentov založených na detekcii pomocou protilátok, ktoré sme sa rozhodli využiť aj my. U ľudí aj u myši je podobnosť Meis1 a Meis2 transkripčných faktorov viac ako 85 %. (Schulte and Geerts, 2019).

Meis proteíny boli spočiatku považované za kofaktory proteínov Hox, však dnes sa predpokladá, že ide o dôležité a relatívne vysoko univerzálne regulátory bunkového správania. Meis sú schopné tvoriť heterodiméry alebo heterotriméry s proteínmi ako napríklad Pbx, Hox a ďalšími transkripčnými faktormi, pravdepodobne cez priame proteín-proteínove interakcie (Jolma et al., 2015). Predpokladá sa, že aktivita *meis* génov je prísne regulovaná vo viacerých úrovniach, počnúc reguláciou RNA expície, zostrihom mRNA a stabilitou proteínu, až po posttranslačné modifikácie. Tento predpoklad však vyžaduje ďalšie systematické experimentálne testovanie. (Schulte and Geerts, 2019).

V genóme cicavcov sa nachádzajú tri homológy *meis* génov (*meis1*, *meis2*, *meis3*), ale u zebričky je týchto génov päť (*meis1a*, *meis1b*, *meis2a*, *meis2b* a *meis3*) (Furutani-Seiki and Wittbrodt, 2004). V tejto práci sme sa zamerali na transkripčný faktor Meis2, ktorého gén sa v genóme zebričky vyskytuje v dvoch paralógoch. Počas evolúcie došlo u *Danio rerio* k duplikácií genómu, čo viedlo k vzniku *meis2a* a *meis2b*. Každý z týchto génov dokáže dať vznik niekoľkým proteínovým variantám počas alternatívneho splicingu. Gén *meis2a* kóduje päť alternatívnych zostrihových variant, z toho 4 produkty kódujú funkčný proteín. U génu *meis2b* môže dôjsť k vzniku 3 zostrihových variant z toho dve kódujú proteín. U myši a človeka je počet proteínových variant výrazne vyšší, zároveň ani u jedného z týchto organizmov nedošlo k duplikácii *Meis2*. U človeka vzniká 27 splicingových variant *MEIS2* s 10 produktmi a u myši je variant *Meis2* 19 so 6 produktmi.

Pripravili sme mutantné knock-out línie zebričky v oboch génoch, *meis2a* aj *meis2b*. Použili sme CRISPR/Cas9 systém, pre ktorý sme navrhli hneď niekoľko sgRNA. V prípade oboch génov sme pracovali s deléciami v exónoch 2, ktoré viedli k posunu čítacieho rámca a zároveň sú prítomné vo všetkých zostrihových variantách, ktoré kódujú funkčné proteíny. Vynára sa tu otázka toho, či stojí genómová duplikácia za rozdelením funkcií *meis2* medzi *meis2a* a *meis2b* (sub-funkcionalizácia) alebo týmto krokom došlo k vzniku nových funkcií (neo-funkcionalizácia). Štúdium funkcie a dôležitosti Meis proteínov vo vývoji zebričky je zaujímavá z pohľadu hľadania kolinearity vo vývoji regulačných mechanizmov u stavovcov ako myš alebo človek.

Hlavná otázka, na ktorú sme sa v predkladanej práci zamerali je zistenie úlohy Meis2 transkripčného faktora počas diferenciácie buniek neurálnej lišty. Naše otázky vyplývajú hlavne z diskutabilných publikovaných dát, a preto sme sa zamerali na to, akú úlohu zohráva

Meis2 pri poškodeníach srdca a chrupaviek počas kraniofaciálneho vývoja. V nasledujúcich kapitolách budú diskutované získane výsledky a hypotézy, ktoré ilustrujú dôležitosť *meis2* génovej rodiny počas formovania buniek neurálnej lišty.

7.1 Príprava mutantnej línie *meis2a* a *meis2b*

Vytvorili sme knock-out mutané línie *meis1a* a *meis1b* injekciou do 1 alebo 2 bunkového štádia embrya. Injikovaná bola zmes všetkých navrhnutých sgRNA, spolu s endonukleázou Cas9, pričom bol každý gén injikovaný zvlášť. SgRNA boli navrhnuté tak, aby navigovali Cas9 proteín do špecifických miest v exónoch, kde boli navrhnuté (Obr. 15). Pomocou online dostupných predikčných programov ako je Chopchop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), CCTop (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) a CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) boli na základe predikovanej efektivity a off-targetov vybrané a pripravené najvhodnejšie sgRNA. Prítomnosť sgRNA bola po transkripcii overená na agarózovom gély (Obr. 17).

V štádiu 5 dpf bolo po každej injekcii vybraných 12 náhodných embryí a genotypovaných testom mobility heteroduplexov (HMA). V prípade, že sme identifikovali aspoň jedno mutané embryo, považovali sme injekciu za úspešnú. U génu *meis2b* sme mali problém s generovaním F0 mutantnej línie, pravdepodobne z dôvodu inaktívnej endonuklázy Cas9. Kvôli tejto skutočnosti došlo k zdržaniu a neboli sme schopní vygenerovať F2 mutantú líniu homozygotov a podrobiť ju tak fenotypovým analýzám v čase odovzdávania tejto práce.

Genotypovanie F0 generácie pomocou HMA potvrdilo očakávanú efektivitu sgRNA u jednotlivých génov, a to s úspešnosťou zhruba 70 % (Tab. 16). Avšak táto účinnosť je len ilustračná, keďže sme injikovali kombinácie všetkých sgRNA navrhnutých pre jeden gén, tým pádom je efektivita závislá od množstva faktorov, ako napríklad od prípravy injikačného mixu.

7.2 Úloha Meis2a pri vývoji tvarových chrupaviek

Bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré pojednávajú o dôležitosti Meis2 transkripčného faktora ako o esenciálnom prvku pre diferenciáciu buniek neurálnej lišty počas kraniofaciálneho vývoja. Na kondicionálnych mutantoch myší boli sledované poruchy tvárovo-hlavového skeletu, ktoré mali za následok defekty v mandibule, hyoidnej kosti a tiež v chrupavkách vnútorného ucha (Machon et al., 2015). Tak ako u myší aj u zebričiek bola preukazaná dôležitosť prítomnosti Meis1 a Meis2a proteínov počas raného embryonálneho vývoja. U zebričiek došlo k poruchám vo vývoji tvárovo-hlavových chrupaviek, ktoré sú derivované z NCC. Bolo pozorované sfúzovanie chrupaviek, ktoré sú zvyčajne derivované z

toho istého alebo susedného branchialného obluku. (Melvin et al., 2013). Melvinova et al. (2013), štúdia bola postavená na experimentoch s Morfolínami, ktorých špecifita je v poslednej dobe veľmi diskutovaná (Kok et al., 2015).

Knock-down experimenty v tejto práci preukázali dominantnú úlohu Meis2 vo vývoji buniek neurálnej lišty a ich hlavovo-tvárových derivátoch. U oboch génov, *meis2a* aj *meis2b* sme sledovali výrazné fenotypy v oblasti tvárových chrupaviek, kde došlo k spojeniu Meckelovej chrupavky s palatoquadratum, čím naše výsledky korelujú s prácou Melvin et al. (2013), kde bol podobný fenotyp sledovaný len u *meis2a*. Okrem týchto chrupaviek, boli deformované aj ceratohyal a hyomandibulare. (Obr. 25, 26). Na morfantoch prevedená in situ hybridizácia *dlx1* génu, ktorý bol popísaný ako regulátor neurogenézy zúčastňujúci sa vývoja predného mozgu, branchiálnych oblúkov a kraniofaciálnych derivátov, podporila fenotypové výsledky z farbenia tvárovo-hlavových chrupaviek. Exprimácia *dlx1* bola u knock-down oboch homológov *meis2* redukovaná v oblastiach mandibulárneho a hyoidného obluku (Obr. 28). Z týchto výsledkov vyplýva to, že *dlx1* sa nachádza pravdepodobne pod reguláciou *meis2* aj *meis2b* a preto došlo k jeho redukcii u *meis2a* a *meis2b* knock-down embryí.

Na druhú stranu, u pripravenej línie pomocou CRISPR-Cas9 technológie sme u embryí s knock-out *meis2a* nepozorovali žiadne zreteľné defekty pri vývoji chrupaviek hlavy ani pri jednom z použitých prístupov a to u farbenia Alcianovou modrou (Obr. 27) a u microCT (Obr. 34).

Naša vytvorená knock-out línia *meis2a* tak nepotvrdila pozorovania pri experimentoch s Morfolínami. Je možné, že za tým stojí ich nedostatočná špecifita a tak môžu ovplyvňovať expresiu aj ďalších *meis* génov, ako napríklad *meis1a* a *meis1b*. Knock-down experimenty s Morfolínami ukázali to, že oba proteíny Meis2 by mali zohrávať úlohu pri kraniofaciálnom vývoji. Redukcia *dlx1* v mandibulárnom a hyoidnom obluku podporuje hypotézu dôležitosti Meis2 proteínov pri formovaní týchto štruktúr. Avšak hlavný prístup, a to knock-out experimenty, ktoré sme v tejto práci využili, nepotvrdili, že Meis2a je esenciálny pre kraniofaciálny vývoj. Tým pádom sme vyvrátili predpoklad založený na Morfolínach, že Meis2 je nevyhnutelný pri vývoji hlavy. Na druhú stranu, Morfolíno pre *meis2a* môže taktiež targetovať *meis2b* z dôvodu homológií v štart kodónoch a nízkej morfolínovej špecifite, preto sú nevyhnuté ďalšie experimenty na knock-out líniach *meis2b*.

7.3 Meis2a pravdepodobne zohráva zanedbateľnú úlohu pri vývoji srdca

U cicavcov je asymetria a rozdielna morfogenéza pravého a ľavého srdečného priestoru dôležitá pre správne vedenie krvi, ale zároveň stále malo preskúmaná (Campione and

Franco, 2016; Koshiba-Takeuchi et al., 2009). Zebrička ako modelový organizmus pomohla k pochopeniu mechanizmov účastniacich sa stranovej rozmanitosti srdca.

Guerra et al. (2018) po prvé popísal Meis2b transkripčný faktor ako faktor, ktorý sa asymetricky exprimuje na ľavej strane srdca dospelého *Danio rerio*. Prvé zmeny vo zvýšení pomeru povrchu predsieni, v ktorej preukázal exprimáciu *meis2b*, k pomeru povrchu komory, sledoval od tretieho týždňa po fertilizácii na knock-out *meis2b* deficientných rybách (Guerra et al., 2018). Na identifikáciu srdečných regulátorov u zebričky boli využité aj Morfolína, experimenty ukázali defektnú srdečnú morfogenézu cez problémy vo fúzovaní srdečnej trubice a problémy s jej rotáciou (Paige et al., 2012).

In situ hybridizácia *myl7*, modulátora vývoja a kontraktility srdečnej predsieni, na morfantoch v našich experimentoch ukázala zmenu v expresii *meis2a* aj *meis2b* a ich čiastočnú redukciu (Obr. 3), čo naznačuje účasť Meis2 proteínov vo vývoji predsieni u zebričky. Na knock-out mutantoch *meis2a* sme sledovali nie príliš výrazný fenotyp, a to mierne zväčšenie predsieni srdca v embryách 48 hpf (Obr. 31).

Veľmi mierne zväčšenie predsieni srdca u našich knock-out embryí, ktoré sa nepotvrdilo u dospelých rýb, nás vedie k záveru, že Meis2a pravdepodobne zohráva len zanedbateľnú úlohu vo vývoji tohto orgánu. Homozygotná knock-out línia *meis2b* nestihla byť do dokončenia tejto práce vygenerovaná. V budúcnosti by bolo určite dobre zvážiť in situ hybridizačnú analýzu *meis2a* aj *meis2b* na embryách starších ako 48 hpf. Na týchto embryách by sa pravdepodobne mohol objaviť výraznejší fenotyp, podobný tomu, ktorý bol prezentovaný v publikácii Guerra et al. (2018), ktorí začali pozorovať zväčšovanie srdečnej predsieni u KO *meis2b* zebričiek až od 3 týždňa po fertilizácii.

7.4 Verifikácia prítomnosti proteínu Meis2a Western blotom

U mutantných embryí sme potvrdili prítomnosť proteínov Meis2a (Obr. 32). Keďže sme pripravili mutantnú homozygotnú líniu zebričky s knock-out *meis2a*, prítomnosť tohto proteínu nebola z našej strany očakávaná. Protilátka, ktorú sme použili, bola primárne pripravená na detekciu Meis2 u myší, ale preukázala sa účinná aj u zebričky, pretože detegovala band správnej veľkosti a to zhruba o veľkosti 40 kDa, čo zodpovedá veľkostiam Meis2 a Meis2b proteínov. Na druhú stranu, bandy o rovnakej veľkosti boli detegované aj vo vzorkách z mutovaných zvierat. Dôvod, prečo sa nám pravdepodobne podarilo identifikovať Meis2a proteíny v KO mutantných vzorkách je ten, že aminokyselinové sekvencie Meis2 a Meis2b sú si veľmi podobné (Obr. 33) a protilátka nebola špecifická len na Meis2a. Ďalej je možné, že protilátka rozoznáva N-terminálny koniec Meis2a, ktorý je v knock-out rybách prítomný

(nonsense mutácia je v exóne 2). Pre dôsledné overenie prítomnosti proteínov pravdepodobne vyradených z funkcie je nevyhnutné v ďalších testoch použiť špecifickú protilátku, alebo overiť prítomnosť Meis2 u knock-out rýb, ktoré sú deficientné v oboch homológoch génov *meis2a* aj *meis2b*.

7.5 Počítačová tomografia (MicroCT)

MicroCT analýza *meis2a* deficientných rýb nepreukázala výrazné morfológické zmeny v porovnaní so vzorkami rýb divokého typu. Pre budúce analýzy, či už na knock-out jednotlivých génov alebo knock-out *meis2a* aj *meis2b* zároveň bude nevyhnutné použiť väčšiu kohortu rýb. (Obr. 34, 35, 36)

7.6 Zhrnutie

Pomocou CRISPR-Cas9 bola pripravená knock-out *meis2a* deficientná línia *Danio rerio*. Sekvenácia potvrdila deléciu 50 bp a posun čítacieho rámca v Meis2a proteíne. Mutantnú líniu *meis2b* sme do odovzdania tejto práce nestihli pripraviť, hoci F0 generácia bola vytvorená.

Potenciálne vzťahy medzi študovanými transkripčnými faktormi boli overené Morfolínami, ktoré preukázali možnú dôležitosť *meis2a* aj *meis2b* počas kraniofaciálneho aj srdečného vývoja *Danio rerio*. Na rozdiel od morfantov, mutanti v *meis2a* nevykazovali žiadny zreteľný fenotyp v hlavovo-tvárových chrupavkách. Vo vývoji srdca sme pozorovali len veľmi slabý fenotyp u embryí, a to v expresii *myl7*, markeru pre vývoj srdečnej predsene. Tak ako mutanti aj morfanti preukázali miernu zmenu expresie tohto markeru. MicroCT analýza dospelých rýb nepotvrdila zmeny vo vývoji srdca a hlavových chrupaviek. Línia knock-out *meis2a* je životaschopná a fertílne.

K presnému určeniu úlohy *meis2* génov v *Danio rerio* bude nutné vygenerovať homozygotnú líniu *meis2b* a následne líniu ktorá bude deficientná v oboch homológoch *meis2* a teda v *meis2a* aj *meis2b*.

8 ZÁVER

V tejto práci sme študovali úlohu transkripčného faktoru Meis2 počas embryonálneho vývoja *Danio rerio*. U zebričky došlo počas evolúcie k duplikácií genómu. Preto sme sledovali vplyv dvoch paralógov Meis2a a Meis2b transkripčných faktorov na bunky neurálnej lišty počas vývoja zebričky ako modelového organizmu. Neurálna lišta sa nazýva aj štvrtým zárodočným listom, z toho dôvodu, že dáva vznik širokej škále bunkových derivátov, vrátane hlavovo-tvárových chrupaviek a taktiež aj srdečným bunkám. V tejto práci sme sa zamerali na determináciu a vývoj kraniofaciálnych a srdečných buniek, pretože sme predpokladali, že ide o deriváty buniek neurálnej lišty, ktoré by mali byť regulované Meis2.

Pre štúdium Meis2 sme zvolili mutané línie pripravené pomocou CRISPR-Cas9 technológie a ako kontrolu ku knock-out experimentom sme využili Morfolína. Pri knock-out experimentoch, kedy sme vytvorili mutané línie *meis2a*, nedošlo k potvrdeniu predpokladov založených na experimentoch s Morfolínami. Pri vývoji kraniofaciálnych chrupaviek sme u mutantov *meis2a* nepozorovali žiadny fenotyp, pričom u morfantov boli pozorované výrazné zmeny vo vývoji hlavových chrupaviek, taktiež aj v expresii špecifických génov, ako napríklad *dlx1*. Je možné, že účinky Morfolín mimo ich cieľ sú rozšírenejšie, ako sa predpokladalo.

K vysloveniu hypotézy o regulačných funkciách Meis2 je potrebný ďalší výskum. Aby sa zabránilo vzájomnej kompenzácii *meis2a* a *meis2b*, je vhodné urobiť výskum na embryách deficientných na oba tieto transkripčné faktory. Taktiež by k porozumeniu Meis2 pomohla analýza viacerých špecifikátorov buniek neurálnej lišty, aby sme boli schopní zaradiť Meis2 do regulačnej kaskády buniek neurálnej lišty. Objasnenie regulačných sietí, v ktorých sa môžu zúčastňovať Meis2 proteíny, či už na extracelulárnej alebo na intracelulárnej úrovni, je veľká výzva pre vývojových biológov. Vďaka získaniu veľkého množstva genomických a proteomických dát o Meis rodine transkripčných faktorov, spoločne s rýchlo sa vyvíjajúcimi genomickými technológiami to snáď nie je až tak vzdialený cieľ.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Adli, M., 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
- Agoston, Z., Li, N., Haslinger, A., Wizenmann, A., Schulte, D., 2012. Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development. *BMC Dev. Biol.* 12, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-12-10>
- 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, e1006441. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006441>
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., Mann, R.S., 2002. Combinatorial control of Drosophila eye development by Eyeless, Homothorax, and Teashirt. *Genes Dev.* 16, 2415–2427. <https://doi.org/10.1101/gad.1009002>
- Bessa, J., Tavares, M.J., Santos, J., Kikuta, H., Laplante, M., Becker, T.S., Gómez-Skarmeta, J.L., Casares, F., 2008. meis1 regulates cyclin D1 and c-myc expression, and controls the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye. *Development* 135, 799–803. <https://doi.org/10.1242/dev.011932>
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., Sauka-Spengler, T., 2010. Assembling Neural Crest Regulatory Circuits into a Gene Regulatory Network. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 581–603. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113245>
- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., Ekker, S.C., 2009. A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6, 69–77. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0555>
- Blum, M., De Robertis, E.M., Wallingford, J.B., Niehrs, C., 2015. Morpholinos: Antisense and Sensibility. *Dev. Cell* 35, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.09.017>
- Boch, J., Bonas, U., 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Bolande, R.P., 1997. Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr. Pathol. Lab. Med. J. Soc. Pediatr. Pathol. Affil. Int. Paediatr. Pathol. Assoc.* 17, 1–25.
- Campione, M., Franco, D., 2016. Current Perspectives in Cardiac Laterality. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3. <https://doi.org/10.3390/jcdd3040034>
- Chang, C.-P., Stankunas, K., Shang, C., Kao, S.-C., Twu, K.Y., Cleary, M.L., 2008. Pbx1 functions in distinct regulatory networks to pattern the great arteries and cardiac outflow tract. *Dev. Camb. Engl.* 135, 3577–3586. <https://doi.org/10.1242/dev.022350>
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.-S., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 230–232. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>
- Choi, W.-Y., Giraldez, A.J., Schier, A.F., 2007. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* 318, 271–274. <https://doi.org/10.1126/science.1147535>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186, 757–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., Schier, A.F., 2002. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14919–14924. <https://doi.org/10.1073/pnas.222459999>
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Corey, D.R., Abrams, J.M., 2001. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biol.* 2, reviews1015.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews1015>
- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B., Le Douarin, N.M., 1998. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Dev. Camb. Engl.* 125, 3445–3459.
- Coy, S.E., Borycki, A.-G., 2010. Expression analysis of TALE family transcription factors during avian development. *Dev. Dyn.* 239, 1234–1245. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22264>

- Creazzo, T.L., Godt, R.E., Leatherbury, L., Conway, S.J., Kirby, M.L., 1998. Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 267–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.267>
- Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., Peng, S., 2018. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 10, 455–465. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>
- Deschamps, J., van Nes, J., 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2931–2942. <https://doi.org/10.1242/dev.01897>
- Dutton, K., Dutton, J.R., Pauliny, A., Kelsh, R.N., 2001. A morpholino phenocopy of the colourless mutant. *Genesis* 30, 188–189. <https://doi.org/10.1002/gene.1062>
- Eisen, J.S., Smith, J.C., 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Dev. Camb. Engl.* 135, 1735–1743. <https://doi.org/10.1242/dev.001115>
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y., Postlethwait, J., 1999. Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- Franco, D., Christoffels, V.M., Campione, M., 2014. Homeobox transcription factor Pitx2: The rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 24, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2013.06.001>
- Freemantle, S.J., Kerley, J.S., Olsen, S.L., Gross, R.H., Spinella, M.J., 2002. Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* 21, 2880–2889. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205408>
- Fujita, A., Isidor, B., Piloquet, H., Corre, P., Okamoto, N., Nakashima, M., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Miyake, N., Matsumoto, N., 2016. De novo MEIS2 mutation causes syndromic developmental delay with persistent gastro-esophageal reflux. *J. Hum. Genet.* 61, 835–838. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.54>
- Furutani-Seiki, M., Wittbrodt, J., 2004. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev., Medaka* 121, 629–637. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.010>
- Geerts, D., Revet, I., Jorritsma, G., Schilderink, N., Versteeg, R., 2005. MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Lett., Advances in basic and translational neuroblastoma research* 228, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.047>
- Gerety, S.S., Wilkinson, D.G., 2011. Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. *Dev. Biol.* 350, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.030>
- Gilbert, S.F., 2003. Developmental biology, in: *Developmental Biology*, 7th Ed. Sinauer Associates, Massachusetts, p. 429.
- Giliberti, A., Currò, A., Papa, F.T., Frullanti, E., Ariani, F., Coriolani, G., Grosso, S., Renieri, A., Mari, F., 2020. MEIS2 gene is responsible for intellectual disability, cardiac defects and a distinct facial phenotype. *Eur. J. Med. Genet.* 63, 103627. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.01.017>
- Glavic, A., Silva, F., Aybar, M.J., Bastidas, F., Mayor, R., 2004. Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 131, 347–359. <https://doi.org/10.1242/dev.00945>
- Govindan, G., Ramalingam, S., 2016. Programmable Site-Specific Nucleases for Targeted Genome Engineering in Higher Eukaryotes. *J. Cell. Physiol.* 231, 2380–2392. <https://doi.org/10.1002/jcp.25367>
- Groves, A.K., LaBonne, C., 2014. Setting appropriate boundaries: Fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev. Biol., Placodes* 389, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.11.027>
- Guerra, A., Germano, R.F., Stone, O., Arnaout, R., Guenther, S., Ahuja, S., Uribe, V., Vanhollenbeke, B., Stainier, D.Y., Reischauer, S., 2018. Distinct myocardial lineages break atrial symmetry during cardiogenesis in zebrafish. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32833>
- Hall, B.K., 2000. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol. Dev.* 2, 3–5. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2000.00032.x>
- Hammerschlag, A.R., Stringer, S., de Leeuw, C.A., Sniekers, S., Taskesen, E., Watanabe, K., Blanken, T.F., Dekker, K., te Lindert, B.H.W., Wassing, R., Jonsdottir, I., et al., 2017. Genome-wide association analysis of insomnia complaints identifies risk genes and genetic overlap with psychiatric and metabolic traits. *Nat. Genet.* 49, 1584–1592. <https://doi.org/10.1038/ng.3888>
- Hardy, S., Legagneux, V., Audic, Y., Paillard, L., 2010. Reverse genetics in eukaryotes. *Biol. Cell* 102, 561–580. <https://doi.org/10.1042/BC20100038>

- He, M.-D., Zhang, F.-H., Wang, H.-L., Wang, H.-P., Zhu, Z.-Y., Sun, Y.-H., 2015. Efficient ligase 3-dependent microhomology-mediated end joining repair of DNA double-strand breaks in zebrafish embryos. *Mutat. Res.* 780, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.08.004>
- Heasman, J., Kofron, M., Wylie, C., 2000. β Catenin Signaling Activity Dissected in the Early *Xenopus* Embryo: A Novel Antisense Approach. *Dev. Biol.* 222, 124–134. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9720>
- Heine, P., Dohle, E., Bumsted-O'Brien, K., Engelkamp, D., Schulte, D., 2008. Evidence for an evolutionary conserved role of *homothorax/Meis1/2* during vertebrate retina development. *Development* 135, 805–811. <https://doi.org/10.1242/dev.012088>
- Horvath, P., Barrangou, R., 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, X., Saint-Jeannet, J.-P., 2004. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev. Biol.* 275, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.033>
- Hurk, R. van den, Lambert, J.G.D., 1983. Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can. J. Zool.* 61, 2381–2387. <https://doi.org/10.1139/z83-317>
- Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., Joung, J.K., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 227–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- Hyman-Walsh, C., Bjerke, G.A., Wotton, D., 2010. An autoinhibitory effect of the *homothorax* domain of *Meis2*. *FEBS J.* 277, 2584–2597. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07668.x>
- Ikmi, A., McKinney, S.A., Delventhal, K.M., Gibson, M.C., 2014. TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis*. *Nat. Commun.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6486>
- Imamura, T., Morimoto, A., Takanashi, M., Hibi, S., Sugimoto, T., Ishii, E., Imashuku, S., 2002. Frequent co-expression of *HoxA9* and *Meis1* genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement. *Br. J. Haematol.* 119, 119–121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03803.x>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K.R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., Enge, M., Kivioja, T., Morgunova, E., Taipale, J., 2015. DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature* 527, 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature15518>
- Kawagoe, H., Humphries, R.K., Blair, A., Sutherland, H.J., Hogge, D.E., 1999. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 13, 687–698. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401410>
- Keßler, M., Just, S., Rottbauer, W., 2012. Ion Flux Dependent and Independent Functions of Ion Channels in the Vertebrate Heart: Lessons Learned from Zebrafish. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2012/462161>
- Khudyakov, J., Bronner-Fraser, M., 2009. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Dev. Dyn.* 238, 716–723. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21881>
- Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kirby, M.L., Hutson, M.R., 2010. Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adhes. Migr.* 4, 609–621. <https://doi.org/10.4161/cam.4.4.13489>
- Kok, F.O., Shin, M., Ni, C.-W., Gupta, A., Grosse, A.S., van Impel, A., Kirchmaier, B.C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., DeSantis, D.F., Sheppard-Tindell, S., et al., 2015. Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Dev. Cell* 32, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.018>
- Kolb, J., Anders-Maurer, M., Müller, T., Hau, A.-C., Grebbin, B.M., Kallenborn-Gerhardt, W., Behrends, C., Schulte, D., 2018. Arginine Methylation Regulates MEIS2 Nuclear Localization to Promote Neuronal Differentiation of Adult SVZ Progenitors. *Stem Cell Rep.* 10, 1184–1192. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.010>

- Koshiba-Takeuchi, K., Mori, A.D., Kaynak, B.L., Cebra-Thomas, J., Sukonnik, T., Georges, R.O., Latham, S., Beck, Laurel, Beck, Laural, Henkelman, et al., 2009. Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* 461, 95–98. <https://doi.org/10.1038/nature08324>
- Labosky, P.A., Kaestner, K.H., 1998. The winged helix transcription factor Hfh2 is expressed in neural crest and spinal cord during mouse development. *Mech. Dev.* 76, 185–190. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00105-1)
- Lane, J.M., Liang, J., Vlasac, I., Anderson, S.G., Bechtold, D.A., Bowden, J., Emsley, R., Gill, S., Little, M.A., Luik, A.I., Loudon, A., Scheer, F.A.J.L., et al., 2017. Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits. *Nat. Genet.* 49, 274–281. <https://doi.org/10.1038/ng.3749>
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Le Douarin, N.M., Smith, J., 1988. Development of the Peripheral Nervous System from the Neural Crest. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 375–404. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.002111>
- Le Lièvre, C.S., Le Douarin, N.M., 1975. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34, 125–154.
- Li, W., Cornell, R.A., 2007. Redundant activities of Tfap2a and Tfap2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos. *Dev. Biol.* 304, 338–354. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.042>
- Lin, Y., Cradick, T.J., Brown, M.T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B.M., Vertino, P.M., Stewart, F.J., Bao, G., 2014. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 42, 7473–7485. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
- Machon, O., Masek, J., Machonova, O., Krauss, S., Kozmik, Z., 2015. Meis2 is essential for cranial and cardiac neural crest development. *BMC Dev. Biol.* 15, 40. <https://doi.org/10.1186/s12861-015-0093-6>
- Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., Sadek, H.A., 2013. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253. <https://doi.org/10.1038/nature12054>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Manfroid, I., Delporte, F., Baudhuin, A., Motte, P., Neumann, C.J., Voz, M.L., Martial, J.A., Peers, B., 2007. Reciprocal endoderm-mesoderm interactions mediated by fgf24 and fgf10 govern pancreas development. *Development* 134, 4011–4021. <https://doi.org/10.1242/dev.007823>
- Marcos, S., González-Lázaro, M., Beccari, L., Carramolino, L., Martín-Bermejo, M.J., Amarie, O., Martín, D.M.-S., Torroja, C., Bogdanović, O., Doohan, R., Puk, O., Angelis, M.H. de, Graw, J., Gomez-Skarmeta, J.L., Casares, F., Torres, M., Bovolenta, P., 2015. Meis1 coordinates a network of genes implicated in eye development and microphthalmia. *Development* 142, 3009–3020. <https://doi.org/10.1242/dev.122176>
- Maves, L., Tyler, A., Moens, C.B., Tapscott, S.J., 2009. Pbx acts with Hand2 in early myocardial differentiation. *Dev. Biol.* 333, 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.004>
- Melvin, V.S., Feng, W., Hernandez-Lagunas, L., Artinger, K.B., Williams, T., 2013. A morpholino-based screen to identify novel genes involved in craniofacial morphogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 242, 817–831. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23969>
- Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M.E., Martínez-A, C., Ros, M.A., Torres, M., 2000. Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3961–3970.
- Meulemans, D., Bronner-Fraser, M., 2002. Amphioxus and lamprey AP-2 genes: implications for neural crest evolution and migration patterns. *Development* 129, 4953–4962.
- Minehata, K.-I., Kawahara, A., Suzuki, T., 2008. meis1 regulates the development of endothelial cells in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.075>
- Morcos, P.A., 2007. Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.172>

- Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I.O., Buchberg, A.M., 1995. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5434–5443. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5434>
- Mukherjee, K., Bürglin, T.R., 2007. Comprehensive Analysis of Animal TALE Homeobox Genes: New Conserved Motifs and Cases of Accelerated Evolution. *J. Mol. Evol.* 65, 137–153. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0023-0>
- Nasevicius, A., Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat. Genet.* 26, 216–220. <https://doi.org/10.1038/79951>
- Nickl, P., 2019. Mutagenesis in *Danio rerio* using CRISPR technology. Diploma thesis, Charles University in Prague, Prague.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O., 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156, 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Paige, S.L., Thomas, S., Stoick-Cooper, C.L., Wang, H., Maves, L., Sandstrom, R., Pabon, L., Reinecke, H., Pratt, G., Keller, G., Moon, R.T., Stamatoyannopoulos, J., Murry, C.E., 2012. A temporal chromatin signature in human embryonic stem cells identifies regulators of cardiac development. *Cell* 151, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.027>
- Papan, C., Campos-Ortega, J.A., 1994. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio* (*Brachydanio*) *rerio*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 203, 178–186. <https://doi.org/10.1007/BF00636333>
- Parker, H.J., Bronner, M.E., Krumlauf, R., 2016. The vertebrate Hox gene regulatory network for hindbrain segmentation: Evolution and diversification: Coupling of a Hox gene regulatory network to hindbrain segmentation is an ancient trait originating at the base of vertebrates. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 38, 526–538. <https://doi.org/10.1002/bies.201600010>
- Parker, H.J., Pushel, I., Krumlauf, R., 2018. Coupling the roles of Hox genes to regulatory networks patterning cranial neural crest. *Dev. Biol., The Neural Crest: 150 years after His’ discovery* 444, S67–S78. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.016>
- Penberthy, W.T., Shafizadeh, E., Lin, S., 2002. The zebrafish as a model for human disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 7, NaN-NaN. <https://doi.org/10.2741/penber>
- Pennonen, J., 2017. Characterization of Human Pubertal Timing Gene VGLL3 in Zebrafish Development. Diploma thesis, University of Helsinki, Helsinki
- Pickart, M.A., Klee, E.W., Nielsen, A.L., Sivasubbu, S., Mendenhall, E.M., Bill, B.R., Chen, E., Eckfeldt, C.E., Knowlton, M., Robu, M.E., Larson, J.D., et al., 2006. Genome-Wide Reverse Genetics Framework to Identify Novel Functions of the Vertebrate Secretome. *PLoS ONE* 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000104>
- Plaut, I., 2000. Effects of fin size on swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 203, 813–820.
- Rieckhof, G.E., Casares, F., Ryoo, H.D., Abu-Shaar, M., Mann, R.S., 1997. Nuclear Translocation of Extradenticle Requires homothorax, which Encodes an Extradenticle-Related Homeodomain Protein. *Cell* 91, 171–183. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80400-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80400-6)
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., Ekker, S.C., 2007. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* 3, e78. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030078>
- Roselló-Díez, A., Arques, C.G., Delgado, I., Giovinazzo, G., Torres, M., 2014. Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning. *Development* 141, 1534–1543. <https://doi.org/10.1242/dev.106831>
- Saadaoui, M., Merabet, S., Litim-Mecheri, I., Arbeille, E., Sambrani, N., Damen, W., Brena, C., Pradel, J., Graba, Y., 2011. Selection of distinct Hox–Extradenticle interaction modes fine-tunes Hox protein activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2276–2281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006964108>
- Sánchez-Guardado, L.Ó., Irimia, M., Sánchez-Arrones, L., Burguera, D., Rodríguez-Gallardo, L., García-Fernández, J., Puelles, L., Ferran, J.L., Hidalgo-Sánchez, M., 2011. Distinct and redundant expression and transcriptional diversity of MEIS gene paralogs during chicken development. *Dev. Dyn.* 240, 1475–1492. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22621>

- Sauka-Spengler, T., Bronner-Fraser, M., 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 557–568. <https://doi.org/10.1038/nrm2428>
- Schulte, D., Frank, D., 2014. TALE transcription factors during early development of the vertebrate brain and eye. *Dev. Dyn.* 243, 99–116. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24030>
- Schulte, D., Geerts, D., 2019. MEIS transcription factors in development and disease. *Development* 146. <https://doi.org/10.1242/dev.174706>
- Shanmugam, K., Green, N.C., Rambaldi, I., Saragovi, H.U., Featherstone, M.S., 1999. PBX and MEIS as Non-DNA-Binding Partners in Trimeric Complexes with HOX Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7577–7588. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7577>
- Shiga, Y., Akiyama, M., Nishiguchi, K.M., Sato, K., Shimozawa, N., Takahashi, A., Momozawa, Y., Hirata, M., Matsuda, K., Yamaji, T., Iwasaki, M., Tsugane, S., Oze, I., Mikami, H., Naito, M., Wakai, K., Yoshikawa, M., Miyake, M., Yamashiro, K., et al., 2018. Genome-wide association study identifies seven novel susceptibility loci for primary open-angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1486–1496. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy053>
- Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., DeKolver, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., Mitchell, J.C., Arnold, N.L., Gopalan, S., Meng, X., Choi, V.M., et al., 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459, 437–441. <https://doi.org/10.1038/nature07992>
- Simões-Costa, M., Bronner, M.E., 2015. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142, 242–257. <https://doi.org/10.1242/dev.105445>
- Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R.A., Zhang, K., Cheng, L., Ye, Z., 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell* 15, 12–13. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.011>
- Southard-Smith, E.M., Kos, L., Pavan, W.J., 1998. SOX10 mutation disrupts neural crest development in *Dom Hirschsprung* mouse model. *Nat. Genet.* 18, 60–64. <https://doi.org/10.1038/ng0198-60>
- Srivastava, S., Desai, S., Cohen, J., Smith-Hicks, C., Barañano, K., Fatemi, A., Naidu, S., 2018. Monogenic disorders that mimic the phenotype of Rett syndrome. *Neurogenetics* 19, 41–47. <https://doi.org/10.1007/s10048-017-0535-3>
- Stankunas, K., Shang, C., Twu, K.Y., Kao, S.-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sanyal, M., Selleri, L., Cleary, M.L., Chang, C.-P., 2008. Pbx/Meis deficiencies demonstrate multigenetic origins of congenital heart disease. *Circ. Res.* 103, 702–709. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175489>
- Streit, A., Berliner, A.J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., Stern, C.D., 2000. Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74–78. <https://doi.org/10.1038/35017617>
- Sumanas, S., Lin, S., 2004. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discov. Today TARGETS* 3, 89–96. [https://doi.org/10.1016/S1741-8372\(04\)02428-4](https://doi.org/10.1016/S1741-8372(04)02428-4)
- Summerton, J., 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 141–158. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(99\)00150-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(99)00150-5)
- Summerton, J., Weller, D., 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 187–195. <https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.187>
- Thisse, C.; Thisse, B., 2005. High Throughput Expression Analysis of ZF-Models Consortium Clones. ZFIN_Direct Data Submission.
- Tyler, M.S., 2010. *Developmental Biology: A Guide for Experimental Study* (Third Edition). Sinauer Associates, Publisher Sunderland, Massachusetts 01375, Chapter-15 Zebrafish.
- Verheije, R., Kupchik, G.S., Isidor, B., Kroes, H.Y., Lynch, S.A., Hawkes, L., Hempel, M., Gelb, B.D., Ghomid, J., D'Amours, G., Chandler, K., Dubourg, C., et al., 2019. Heterozygous loss-of-function variants of MEIS2 cause a triad of palatal defects, congenital heart defects, and intellectual disability. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 27, 278–290. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0281-5>
- Waskiewicz, A.J., Rikhof, H.A., Hernandez, R.E., Moens, C.B., 2001. Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Dev. Camb. Engl.* 128, 4139–4151.
- Williams, T.M., Williams, M.E., Innis, J.W., 2005. Range of HOX/TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13:MEIS interaction. *Dev. Biol.* 277, 457–471. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.004>

- Wu, C.-R., Ye, M., Qin, L., Yin, Y., Pei, C., 2017. Expression of lens-related microRNAs in transparent infant lenses and congenital cataract. *Int. J. Ophthalmol.* 10, 361–365. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.03.06>
- Wu, Y.-H., Zhao, H., Zhou, L.-P., Zhao, C.-X., Wu, Y.-F., Zhen, L.-X., Li, J., Ge, D.-X., Xu, L., Lin, L., Liu, Y., Liang, D.-D., Chen, Y.-H., 2015. miR-134 Modulates the Proliferation of Human Cardiomyocyte Progenitor Cells by Targeting Meis2. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 25199–25213. <https://doi.org/10.3390/ijms161025199>
- Xu, K., 2013. The Next Generation Biotechnology for Apple Improvement and Beyond: The CRISPR/Cas9 Story.
- Yook, J.I., Li, X.-Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., Fearon, E.R., Weiss, S.J., 2006. A Wnt–Axin2–GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1398–1406. <https://doi.org/10.1038/ncb1508>
- Zha, Y., Xia, Y., Ding, J., Choi, J.-H., Yang, L., Dong, Z., Yan, C., Huang, S., Ding, H.-F., 2014. MEIS2 is essential for neuroblastoma cell survival and proliferation by transcriptional control of M-phase progression. *Cell Death Dis.* 5, e1417. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.370>
- Zoeller, J.J., Pimpong, W., Corby, H., Goldoni, S., Iozzo, A.E., Owens, R.T., Ho, S.-Y., Iozzo, R.V., 2009. A Central Role for Decorin during Vertebrate Convergent Extension. *J. Biol. Chem.* 284, 11728–11737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808991200>