

Středoškolská odborná činnost 2012/2013

Vliv FGF1 na vývoj končetin během embryogeneze

Renata Zajíčková

Brno 2013

Středoškolská odborná činnost 2012/2013

Obor SOČ: 04 – Biologie

Vliv FGF1 na vývoj končetin během embryogeneze

Influence of FGF1 on the limb development during embryogenesis

Autor práce:

Renata Zajíčková

Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55

616 00, Brno

Jihomoravský kraj

Konzultanti:

Mgr. Petra Celá

Doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D.

AV ČR

Ústav živočišné fyziologie a genetiky

Brno



AKADEMIE VĚD
ČESKÉ REPUBLIKY

Brno 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně s pomocí Mgr. Petry Celé a doc. Marcely Buchtové Ph.D., použila jsem pouze zdroje uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorských zákonů) v platném znění.

V Brně dne

podpis:.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svým konzultantům Mgr. Petře Celé a doc. RNDr. Marcelu Buchtové, Ph.D. za poskytnutou pomoc a soustavnou podporu, kterou mi věnovaly během celého roku, cenné rady, které mi poskytly a za vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Krejčímu, Ph.D. za poskytnutí FGF1 proteinů a protilátek pro tento projekt. Mé poděkování rovněž patří celému kolektivu AV ČR za příjemné pracovní prostředí a pomoc při práci v laboratoři. Můj dík za finanční podporu patří také JMK a JCMM, díky které byla tato práce vypracována.

Děkuji své rodině a blízkým přátelům za neutuchající důvěru a podporu.



Jihomoravský kraj



Abstrakt

Rodina fibroblastových růstových faktorů (FGF) je během embryonálního vývoje zapojena do mnoha vývojových procesů. Signalizační poruchy FGF hrají významnou roli v patogenezi mnoha růstových defektů, metabolických nebo nádorových onemocnění. Konkrétní funkce a působení jednotlivých FGF nejsou dosud zcela známé. Tato práce pojednává o roli několika FGF proteinů a o jejich imunohistochemické detekci. Cílem práce bylo porovnat účinky FGF1 proteinu samotného, v kombinaci s heparinem a jeho modifikované formy FGF1-3x a FGF1-3x112 na embryonální vývoj. Proteiny byly v různých koncentracích aplikovány do pravého končetinového pupene a následně byly analyzovány změny externí morfologie a skeletální abnormality. Použití FGF1-WT i FGF1-WT s heparinem neprokázalo žádnou výraznější změnu fenotypu při externí ani při skeletální analýze. Toxicitě heparinu odpovídaly i výsledky mortality při zvyšování jeho koncentrace. Aplikace modifikovaných forem FGF1, FGF1-3x a FGF1-3x112 vykazovala externí i skeletální fenotyp u 50–60 % embryí a jejich abnormality se velmi podobaly. Tento fenotyp nápadně připomínal poruchu signalizace FGFR3, která způsobuje achondroplazii. Jedná se o nemoc dědičnou, kde dochází k narušení enchondrální osifikace ovlivňující růst kostí do délky. Ty jsou pak nápadně krátké, zakřivené, avšak normálně široké.

Přítomnost FGF1 proteinů byla dále prokázána na histologických řezech při použití tří různých protilátek FGF-1 (B-3), FGF-1 (C-19) a FGF-1 pomocí fluorescence (FITC), kdy pozitivita byla patrná nejčastěji v těsné blízkosti implantované kuličky s proteinem. U protilátky FGF-1 (C-19) byl pozorován výrazný signál přímo v kuličce.

Tato práce přinesla nové poznatky v oblasti FGF1 signalizace v embryonálním vývoji a jejímu potenciálu způsobovat morfologické změny. Aplikací stabilizované formy FGF1 do končetinového pupene, a tím navýšením množství i prodloužením jeho účinku bylo zjištěno, že se FGF1 podílí na regulaci vývoje kostí. Získané výsledky mohou posloužit jako model pro studium poruch chondrogenese.

Abstract

Fibroblast growth factor family (FGF) is involved in many processes during embryonic development. The disruption of FGF signaling plays important role in the pathogenesis of many developmental defects, metabolic or tumor diseases. However, the exact role of FGF pathways is not fully understood. This study is focused on the roles of FGF1 proteins and their localization with using immunohistochemical methods. The goal of this study was to compare the effect of FGF1-WT, FGF1-WT with heparin and his modified forms FGF1-3x and FGF1-3x112 on embryonic development. The proteins were injected or implanted in different concentrations into the right limb bud and the changes in external morphology and skeletal abnormalities were analyzed. FGF1-WT and FGF1-WT with heparin did not exhibit any obvious external or skeletal phenotype. As the heparin is toxic for embryos, the phenotype and the mortality corresponded to heparin concentration. The modified forms of protein (FGF1-3x and FGF1-3x112) exhibited external and skeletal phenotype in 50–60 % of analyzed embryos and their morphological defects were very similar. This phenotype corresponds to defect of FGFR3 signaling, which causes the achondroplasia. It is hereditary disease with defects of enchondral ossification, which influences the growth of the bones. Affected bones are shorter, gibbous and wider.

The immunohistochemical detection of FGF1 proteins was analyzed with using of three different antibodies: FGF-1 (B-3), FGF-1 (C-19) and FGF-1 with fluorescence (FITC). The signal appeared mostly around the bead. In the case of antibody FGF-1 (C-19), the expression was found directly in the bead soaked with protein.

This study provides new findings of FGF1 role during the embryonic development and its ability to cause morphological changes. The application of FGF1 into the limb bud, which ectopically increased the amount of protein as well as the time of exposure, led to finding that FGF1 is involved in the regulation of bone development. Results obtained in this study can serve for future studies of chondrogenetic defects and diseases in human.

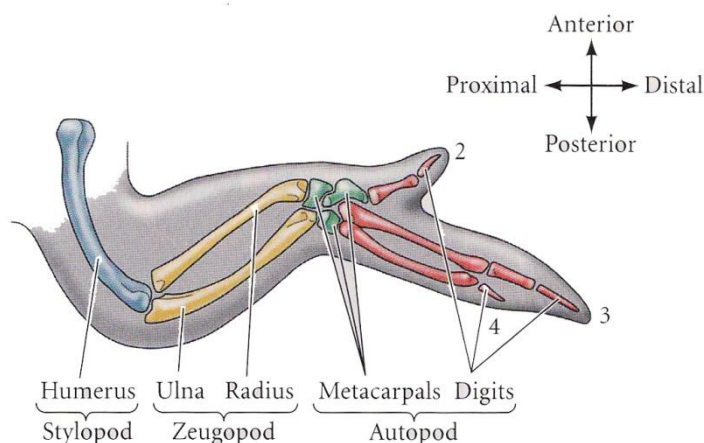
Obsah

1. ÚVOD	1
2. VÝVOJ KONČETINY	1
2.1 BUNĚČNÁ SMRT	4
2.2 OSIFIKACE KOSTÍ KONČETINY	6
3. FIBROBLASTOVÉ RŮSTOVÉ FAKTORY	7
3.1 FGF LIGANDY A RECEPTOROVÉ RODINY	7
3.2 FUNKCE FGF V INICIACI KONČETINOVÉHO PUPENE	8
3.2.1 <i>Specifické funkce FGF v apikálním ektodermovém hřebeni</i>	8
3.2.2 <i>Zdroj a identita endogenního končetinového induktoru</i>	8
3.3 FGF1 – FIBROBLASTOVÝ RŮSTOVÝ FAKTOR 1	9
4. MATERIÁL A METODIKA	10
4.1 APLIKACE FGF1 PROTEINŮ	10
4.1.1 <i>Implantace kuliček</i>	11
4.1.2 <i>Injektáž protenů</i>	11
4.2. BARVENÍ SKELETU	12
4.3. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ.....	13
4.4. IMUNOHISTOCHEMICKÉ METODY	14
5. VÝSLEDKY	16
5.1. VLIV FGF1 NA VÝVOJ KŘÍDLA U KUŘECÍCH EMBRYÍ	16
5.1.1 <i>Externí fenotyp kuřecích embryí po aplikaci FGF1</i>	16
5.1.2 <i>Skeletální fenotyp kuřecích embryí po aplikaci FGF1</i>	25
5.2. IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE FGF1 NA HISTOLOGICKÝCH ŘEZECH	33
5.2.1 <i>Detekce FGF-1 (B-3): sc-55520</i>	33
5.2.2 <i>Detekce FGF-1 (C-19): sc-1884</i>	34
5.2.3 <i>Detekce FGF-1 (FITC)</i>	35
6. DISKUZE	37
7. ZÁVĚR	38
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	39
9. POUŽITÁ LITERATURA	40
10. PŘÍLOHY	41
10.1. ABSTRAKT	41

THERMAL STABILITY REGULATES FIBROBLAST GROWTH FACTOR SIGNALING	41
10.2. TABULKY INJEKTÁŽÍ	42

1. Úvod

Končetina obratlovců představuje velice důležitý orgán pro řadu základních činností s asymetrickým uspořádáním jednotlivých částí ve všech třech rozměrech (obr. 1). Prvním rozměrem je proximo-distální osa, kdy dochází k tvorbě paže, předloktí a vlastní ruky, jak je tomu např. u člověka. Druhým rozměrem je antero-posteriorní osa, kdy se tvoří malíčky na posteriorní straně, zatímco palec na straně anteriorní. U lidí je zřejmé, že vývoj prstů na ruce je zrcadlový. A konečně, naše končetiny mají dorso-ventrální osu, kde dlaň je snadno rozeznatelná od hřbetu ruky. Kostí končetiny jsou formovány chondrogenní osifikací. Zpočátku jsou základy kostí chrupavčité, ale později je většina chrupavky nahrazena kostní tkání (Gilbert, 2006).

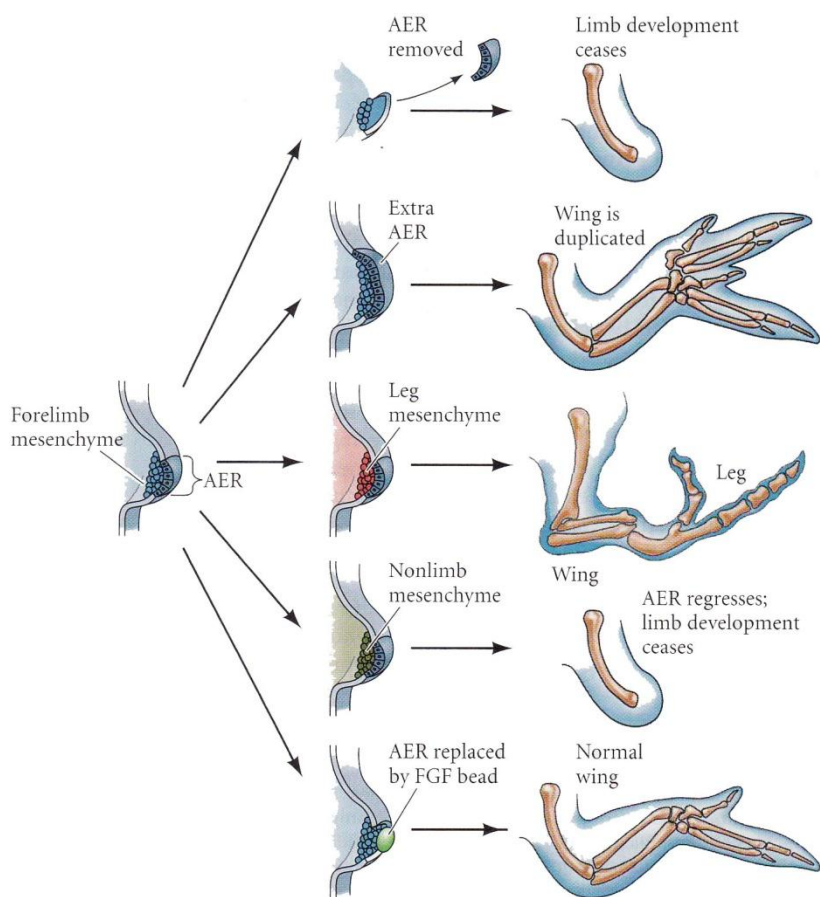


Obr. 1: Skeletální model kuřecího křídla. Prsty jsou očíslovány 2, 3 a 4 (upraveno z Gilbert, 2006)

2. Vývoj končetiny

Vývoj končetiny začíná u člověka koncem čtvrtého embryonálního týdne na končetinovém poli, kde buňky mezenchymu z laterálního somatického mezodermu prolifерují za vzniku malých párových výčnělků (Malínský, 1992). Tento základ končetiny se označuje jako končetinový pupen. Pupeny pro hrudní (horní) končetiny se vytvářejí o několik dní dříve než pupeny pro pánevní (dolní) končetiny. Tato mezenchymová masa je kryta povrchoým ektodermem, ve kterém fibroblastový růstový faktor (FGF) vyvolává diferenciaci struktury,

kteřá se označuje jako apikální ektodermový hřeben („apical ectodermal ridge“ – AER) (obr. 2).

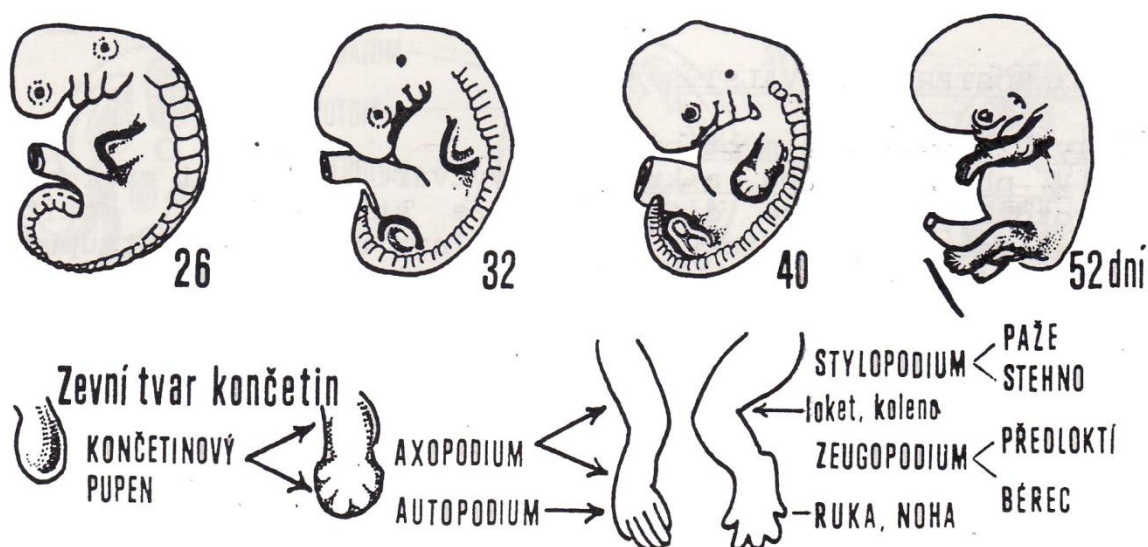


Obr. 2: Shrnutí experimentů demonstrujících vliv apikálního ektodermového hřebene na mezenchym uložený pod ním (upraveno z Gilbert, 2006)

Ektodermový hřeben postupuje rovnoběžně s distálním okrajem končetinového pupene a stane se hlavním signální centrem pro vývoj končetiny. Mezi jeho hlavní funkce patří zachování přilehlého mezenchymu v plastickém proliferačním stavu, který umožní lineární růst končetiny (Gilbert, 2006). Proximo-distální růst a vlastní diferenciaci jednotlivých částí končetinového pupene je umožněna díky množství interakcí mezi ektodermovým hřebenem a mezenchymem uloženým pod ním. Tento distální mezenchym je často nazýván zóna polarizační aktivity (ZPA), jež způsobuje rozšíření koncové části končetinového pupene, která se následně oplošťuje. Zóna růstu specifikuje osud mezenchymových buněk. Čím více času stráví buňka v zóně růstu, tím více mitotické aktivity prokazuje a stává se dorsálně specifikovanou. Ačkoliv zóna růstu zůstává rozměrově stejně velká, buňky ji během růstu

končetiny pravidelně opouštějí. Z prvních buněk, které odcházejí ze zóny růstu se diferencuje stylopodium, kdežto z posledních buněk autopodium. Pokud dojde k experimentálnímu oddělení apikálního ektodermálního hřebene, mezenchymové buňky se nemohou dále dělit a následně se diferencovat. Vytváří se tedy pouze proximální skeletální struktury (Gilbert, 2006).

Dále se ve vývoji vytvoří axopodium, které se na okrajích znovu rozšiřuje v terčovitě autopodium. Další diferenciaci v základu končetiny postupuje u člověka v 6. týdnu prenatalního vývoje (Klika, 1983). V tomto období dojde ohnutím loketního a kolenního kloubu k rozlišení proximální části neboli stylopodia na základ paže nebo stehna, a dále distální části neboli zeugopodia na základ předloktí nebo bérce (obr. 3).



Obr. 3: Formování zevního tvaru končetiny během prenatalního vývoje (upraveno z Malínský a kol., 1992)

Další důležitou událostí ve vývoji končetiny je diferenciaci zóny polarizační aktivity, která kontroluje antero-posteriorní modelování distálních struktur (Tickle, 2006). Zóna polarizační aktivity iniciuje tvorbu apikálního ektodermálního hřebene, který následně specifikuje antero-posteriorní osu. Polarizační aktivita může být detekována v posteriorním regionu končetinového pupene od časného vývoje končetiny až po stádium, kdy se začínají formovat prsty.

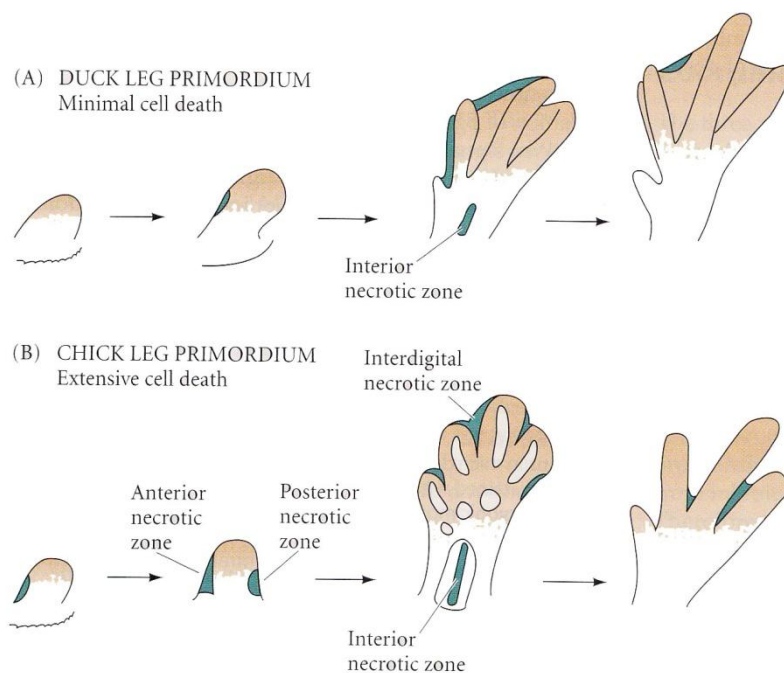
Prsty se vytvářejí relativně v pozdním stádiu vývoje končetiny, kdy končetinový pupen již vyrostl do délky a změnil svůj tvar. Experimenty na kuřecích embryích prokázaly, že buňky podílející se na vytvoření autopodia jsou specifikované dříve, než jsou patrné jednotlivé

základy prstů a tedy jejich antero-posteriorní a dorso-ventrální osy jsou dávno ustanovené (Tickle, 2006). Základy prstů vznikají v oblasti autopodia, kde jsou na začátku navzájem propojeny vrstvou ektodermu ve formě interdigitální masy. U člověka se během 7.–8. týdne začínají jednotlivé prsty oddělovat, přičemž na hrudní končetině k tomuto ději dochází dříve než na končetině pánevní. Díky diferenciaci kosterního základu a přilehlých myoblastů roste končetina do délky. Zdrojem buněk pro diferenciaci myoblastů jsou mezodermové buňky pocházející z myotomu (Klika, 1983).

FGF signální molekuly se účastní iniciace tvorby končetinového pupene, kontrole růstu končetinového základu i následné tvorby chrupavek (Tickle, 2006).

2.1 Buněčná smrt

Buněčná smrt hraje významnou roli ve vytváření končetin u čtyřnožců. Je neodmyslitelná při formování kloubů a prstů. Smrt jistých populací buněk je v končetině geneticky naprogramovaná a probíhá po celou dobu vývoje. Buněčná smrt se podílí na oddělení prstů od sebe a dále na oddělení obou kostí předloktí (ulna a radius) v oblasti vnitřní nekrotické zóny. Na formování konečného tvaru končetiny se podílí anteroiorní a posteriorní nekrotická zóna

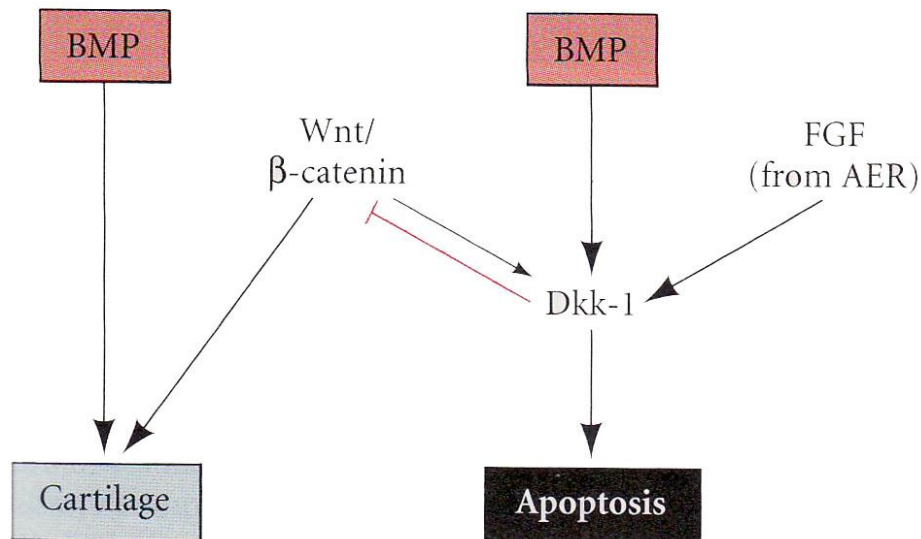


(obr. 4). Buňky podstupující buněčnou smrt během embryonálního vývoje jsou odstraněny apoptotickou cestou bez aktivace imunitního systému.

Obr. 4: Schéma buněčné smrti v noze (A) kachního a (B) kuřecího embrya. Tmavé oblasti určují oblasti buněčné smrti. Je zde vidět, že oblasti buněčné smrti jsou větší u kuřecího embrya než u kachního. (převzato z Gilbert, 2006)

Na iniciaci apoptózy v autopodiu se podílí např. proteiny rodiny BMP (obr. 5). Jelikož se tyto proteiny vyskytují ve veškerém mezenchymu zóny proliferační aktivity, je zřejmé, že buněčná smrt by nastala v celém základu končetiny. Z tohoto důvodu je nezbytné potlačení aktivity BMP na specifických místech. Tato inhibice je zprostředkována Nogginem, proteinem, který se váže pouze na BMP a tím předchází jejich vazbě na receptory (Capdevila, 1998). Noggin je produkován v chrupavce končetiny i v perichondriálních buňkách obklopující chrupavku. Pokud se vyskytuje Noggin v celém končetinovém pupenu, v žádné oblasti k apoptóze nedojde.

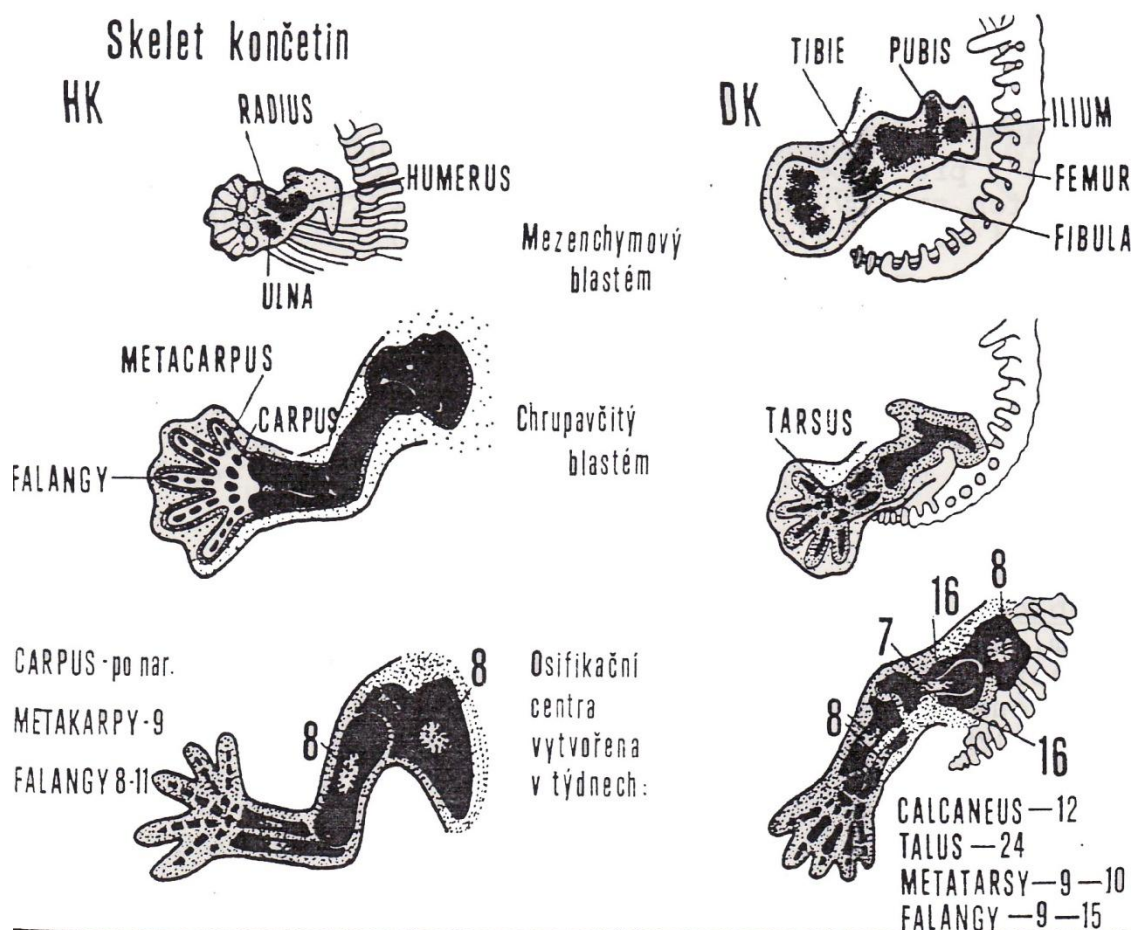
Mezi první funkce, které byly v minulosti připsány BMP proteinům bylo vytváření kostí a chrupavčitých tkání (Gilbert, 2006). Ve vývoji končetiny umožní BMP mezenchymovým buňkám nejen kontrolovat apoptózu, ale i diferenciaci buněk do chondrocytů. Stejně BMP proteiny mohou způsobit buněčnou smrt nebo proliferaci buněk v závislosti na vývojovém stádiu. Možnosti přesné kontroly signalizace jsou kritickým krokem v prenatálním vývoji nejen končetin, ale všech orgánů.



Obr. 5: Model dvojí role BMP signalizace končetinového mezenchymu. BMP může být produkován při současném výskytu FGF (při iniciaci apoptózy) nebo Wnt (při indukci kosti) (upraveno z Gilbert, 2006)

2.2 Osifikace kostí končetiny

Pokud by došlo k diferenciaci veškeré chrupavkové tkáně do kostní ještě před narozením jedince, naše tělo by dále nemohlo růst. Chrupavka končetin osifikuje chondrogenním způsobem, kdy nejprve dochází k zahušťování mezenchymu do chrupavčitého blastému (Gilbert, 2006). V něm se postupně objevuje ve středu osifikační centrum a od něj osifikace postupuje ke koncům kostí. Nicméně, jak se osifikační linie blíží ke konci chrupavčitého modelu, chondrocyty proliferují, zvětšují se a následně rozpadají. V dlouhých kostech savců zůstávají i po narození jedince chrupavčité oblasti, které se nazývají epifýzo-diafyzární růstové ploténky, které zanikají až kolem 20. roku života (Malínský, 1992). Tyto ploténky obsahují jednak chondrocyty s vysokou proliferační aktivitou a dále region s hypertrofickými chondrocyty, které následně vápenatí a osifikační linie postupuje do oblasti odumírajících chondrocytů. Dokud jsou růstové ploténky schopny produkovat nové chondrocyty, kost dále roste (obr. 6).



Obr. 6: Vývoj skeletu končetiny (převzato z Malínský a kol., 1992)

3. Fibroblastové růstové faktory

Fibroblastové růstové faktory (FGF) byly prvně popsány před 25 lety a během prenatálního vývoje se účastní mnoha biologických procesů, jako např.: diferenciace, proliferace, migrace, adheze, apoptóza nebo chemotaxe (Martin, 1998). Postupně došlo k identifikaci celé velké rodiny proteinů, které jsou stěžejními intercelulárními signalizačními molekulami v embryogenezi. FGF jsou zodpovědné za iniciaci a regulaci pozdějšího vývoje většiny orgánů v těle obratlovců.

Všechny FGF molekuly zprostředkovávají své buněčné odezvy aktivací příslušných FGF receptorů (FGFR), na které se vážou. FGFR patří do rodiny tyrozinkinázových receptorů, jejichž extracelulární část je tvořena ze tří imunoglobulinu-podobných domén. Doposud jsou známy čtyři typy receptorů (Sheeba, 2010).

3.1 FGF ligandy a receptorové rodiny

Počáteční úsilí izolovat faktory v mozkové tkáni, které stimulují proliferaci fibroblastů, vedlo k identifikaci dvou blízce příbuzných proteinů, dnes známých jako FGF1 a FGF2 (Martin, 1998). Další analýzy ukázaly, že FGF1 a FGF2 jsou členy velké rodiny, která podle dnešních dat zahrnuje u savců alespoň 22 genů (Coulier, 1997). Minimálně pět těchto genů se uplatňuje během vývoje končetin.

Proteiny kódované Fgf geny obsahují sekvenci asi 120 aminokyselin, která určuje terciální strukturu proteinu a jeho schopnost vázat heparin nebo heparan sulfát (HSPGs). Heparin a HSPGs jsou záporně nabitými polymery a s molekulami proteinů na sebe působí přes elektrostatické interakce (Wong, 1998).

FGF proteiny působí jako intercelulární signalizační molekuly a jsou efektivně exportovány z buněk, které je produkují. Jakmile opustí buňku, FGF se aktivně naváže na HSPGs (např.: syndekany, glypican nebo perlecan), které se nacházejí v buněčné membráně a v extracelulárním matrix.

3.2 Funkce FGF v iniciaci končetinového pupene

Z 22 známých FGF genů je několik exprimováno v distální části vyvíjejícího se končetinového pupene, nejméně čtyři v apikálním ektodermálním hřebeni a další pak v mezenchymu uloženém pod ním (Martin, 1998).

3.2.1 Specifické funkce FGF v apikálním ektodermovém hřebeni

FGF produkované v apikálním ektodermovém hřebeni plní zejména dvě hlavní funkce. Jednou z nich je stimulace proliferujících buněk v zóně růstu a tedy tvorba nových buněk potřebných pro růst končetiny (Martin, 1998). FGF také interagují s genem *Shh* („Sonic Hedgehog“), který následně slouží k aktivaci *Hox* genů a *Bmp2* v mezenchymu. SHH je velmi důležitý pro vývoj embrya v počáteční fázi a je jedním z hlavních indukčních signálů ve formování antero-posteriální osy a ve ventrálních somitech. Další hlavní funkcí FGF produkovaných v apikálním ektodermovém hřebeni je zachovat aktivní SHH signalizaci v posteriorní části končetiny, která se označuje jako zóna polarizační aktivity. Po transplantaci buněk z posteriorní oblasti končetinového pupene na anteriorní stranu jiného pupene byly buňky schopny vytvořit druhou kopii posteriorního skeletu. Polarizační aktivita buněk se ztratila při odstranění apikálního ektodermového hřebene. Znovu se však obnovila, když byl do posteriorního končetinového mezenchymu aplikován FGF protein (Martin, 1998).

3.2.2 Zdroj a identita endogenního končetinového induktoru

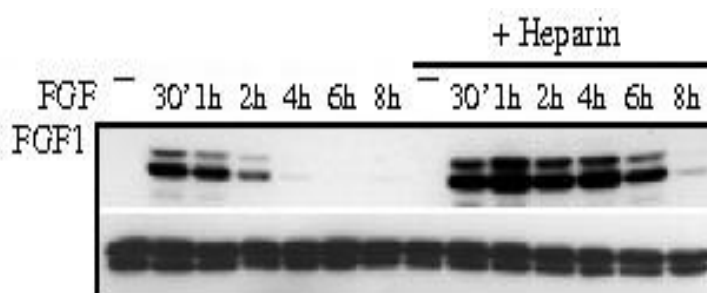
Zjištění, že aplikace FGF může navodit formování končetiny, umožnilo porozumět existenci přirozených induktorů a schopnosti na ně reagovat. Odhalení, že FGF je postačujícím induktorem při formování kompletní končetiny, naznačuje, že endogenním aktivátorem může být jakýkoliv člen FGF rodiny (Martin, 1998).

K iniciaci končetin u kuřat dochází mezi stádii 13 a 15 a hlavním zdrojem buněk je mezoderm. Aplikováním FGF do vnitřního končetinového regionu, je schopno vyvolat vývoj končetiny, což naznačuje, že endogenní induktor není normálně přítomen ve vlastním končetinovém regionu (Martin, 1998).

3.3 FGF1 – Fibroblastový růstový faktor 1

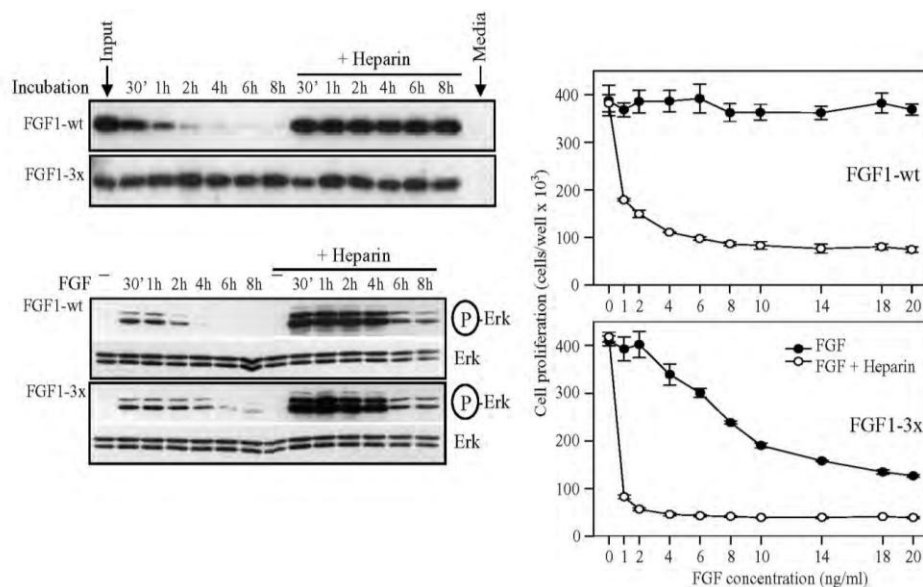
FGF1 a FGF2 byly prvními izolovanými proteiny a původně byly označeny jako kyselý FGF a zásaditý FGF díky jejich izoelektrickým vlastnostem (Miller, 1999). FGF1 a FGF2 se liší od většiny ostatních FGF v mnoha směrech. FGF1 je unikátní mezi FGF díky své vysoké afinitě ke všem známým FGF receptorům. Společně s FGF2 se také nachází v buněčném jádru.

FGF1 a FGF2 hrají roli v průběhu embryonálního vývoje, ale i v dospělosti. Oba FGF proteiny jsou ve vysokém množství obsažené v mozku, ovšem každý faktor je lokalizován v jiné subpopulaci nervových buněk (Miller, 1999). Výskyt FGF1 byl popsán u sensorických i motorických neuronů, stejně tak v substantia nigra, cholinergních neuronech předního mozku a v několika dalších subkortikálních populacích nervových buněk.

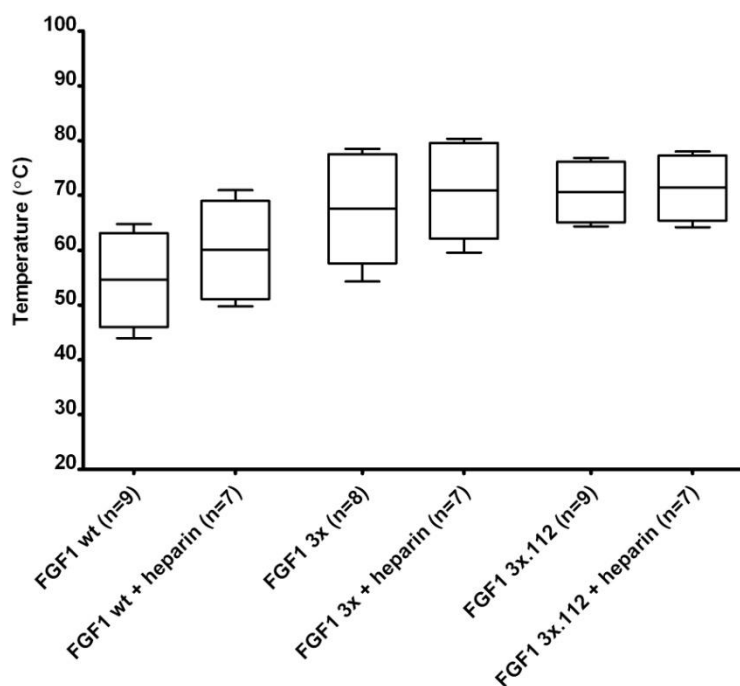


Někteří členové FGF rodiny hrají důležitou roli při hojení ran – mezi ně patří hlavně FGF1, FGF2 a FGF7. FGF indukují angiogenezi, stejně tak stimulují proliferaci mnoha typů buněk podílejících se na hojení, včetně endotelových buněk, fibroblastů a keratinocytů. Mnoho typů buněk aktivovaných při hojení má receptory pro FGF nebo jsou samy schopny je vylučovat (Miller, 1999).

Obr. 7: Samotný FGF1 protein je méně stabilní v přirozené formě (WT) než s navázaným heparinem (zdroj P. Krejčí)



Obr. 8: Modifikace FGF1 proteinu (forma 3x) je více stabilní než přirozená forma (WT) a vazba s heparinem jej dále stabilizuje (zdroj P. Krejčí)



Obr. 9: Modifikované formy FGF1 proteinu (3x a 3x112) jsou stabilnější za vyšší teploty (zdroj P. Krejčí).

4. Materiál a metodika

Oplozená kuřecí vajíčka byla dodána z farmy Integra (Žabčice, Česká Republika). Vajíčka byla inkubována za teploty 37,8 °C a jednotlivá stádia embryí byla určena pomocí dříve publikovaného systému (Hamburger and Hamilton, 1951). Všechny experimenty byly provedeny podle protokolu schváleného etickou komisí Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

4.1 Aplikace FGF1 proteinů

FGF1 proteiny byly aplikovány do pravé končetiny embrya ve stádiu 18–25 (Hamburger a Hamilton, 1951). Stáří se určuje podle celkové morfologie stavu embrya a podle počtu somitů po obou stranách embrya.

Vajíčka byla přechovávána v inkubátorech při teplotě 100 F (37,8 °C) a následně otevřena. Jedná se o propíchnutí skořápky na tupém konci vajíčka nůžkami, kde se nachází vzduchová komůrka. Dále se vytvoří další otvor na horní straně vodorovně položeného vajíčka. Aby embryo kleslo, vysaje se injekční stříkačkou 1 ml bílku. Tím se udělá prostor pro vystřihnutí okénka, které umožní implantaci či injektáž.

4.1.1. Implantace kuliček

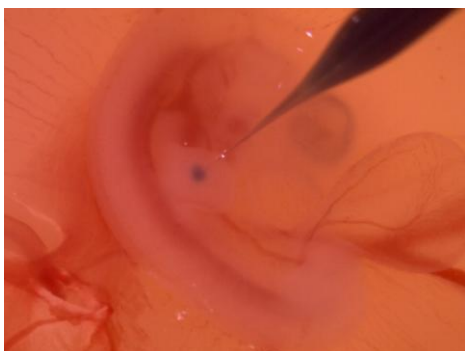
Kulička s modifikovaným proteinem FGF1 byla implantována do pravého křídla embrya poté, co se pod mikroskopem (Leica, Německo) pinzetou odstranily embryonální obaly (amnion a chorion) z dané oblasti.

Pro implantaci jsme použili modifikované proteiny FGF1-3x, FGF1-3x112 a přirozenou formu proteinu FGF1-WT („wild type“ – WT). Výhodou tohoto způsobu aplikace je působení proteinu pouze na implantovanou oblast narozdíl od injektáže, kdy se protein může rozšířit do celého těla.

Po implantaci se vajíčko uzavřelo lepicí páskou a vrátilo se do inkubátoru. Následný odběr se provedl po 10 dnech. Pro náš výzkum byla z embrya odebrána pouze křídla a ta se dále fixovala ve 100% alkoholu.

4.1.2. Injektáž proteinů

Heparin (Sigma-Aldrich H3149-50 KU) byl smíchán s trypanovou modří pro zabarvení roztoku a následně byl vpraven do mikroinjekční skleněné jehly. Ta byla po roztržení embryonálních obalů zavedena do pravého křídla a pomocí mikroinjekčního zařízení (Eppendorf, Německo) byl roztok vstříknut do mezenchymu embrya (obr. 10). Následně se vajíčko uzavřelo lepicí páskou a vložilo zpět do inkubátoru. Odběr obou křídel embrya byl proveden 10 dní poté. Všechny vzorky byly fixovány ve 100% alkoholu.



Obr. 10: Aplikace FGF1 proteinu pomocí skleněné jehly a mikroinjekčního zařízení do pravého končetinového pupene.

4.2. Barvení skeletu

Odběry jsou prováděny cca týden před vylíhnutím, kdy se vajíčka vyndají z inkubátoru, otevřou se a provede se dekapitace embrya. Embryo se poté položí na Petriho misku, kde se odstříhnou křídla, která se fixují čtyři dny ve 100% alkoholu. Dalším krokem je převedení vzorků do acetonu. Po 4 dnech začíná samotné barvení. Nejdříve se vzorky propláchnou destilovanou vodou a následně se připraví barvicí roztok. Ten se skládá z 1 dílu 3% alciánové modři v 70% alkoholu, z 6 dílů 0,1% alizarinové červeně ($C_{14}H_8O_4$) v 70% alkoholu, z 1 dílu kyseliny octové (CH_3COOH) a 17 dílů 70% alkoholu. Alciánová modř znázorňuje kyselé mukopolysacharidy případně glykogen (Vacek, 1995) a alizarinová červeně se váže na vápník, a tedy barví kostní tkáň. Barvicí roztok se připravuje pokaždé čerstvý a barvy se před smícháním filtrují. Barvení probíhá 10 dní a poté se vzorky propláchnou destilovanou vodou a naplní se roztokem 20% glycerolu ($C_3H_8O_3$) a 2% hydroxidu draselného (KOH). V tomto roztoku zůstanou vzorky tak dlouho, dokud není tkáň kompletně jasná. Je nutné tento děj sledovat, aby se tkáň nerozpadla. Roztok se může podle potřeby několikrát vyměnit. Pokud je tkáň průhledná, naloží se vzorky do 50% glycerolu, kde jsou 7 až 14 dní. Doba není kritická, a pokud tkáň není úplně jasná, může se opakovat krok s roztokem 20% glycerolu a 2% KOH. Tkáň se uchovává ve 100% glycerolu, ve kterém se i fotí pro následnou analýzu skeletu.

4.3. Histologické zpracování tkání

Tkáň odebraná pro histologické zpracování musí být ihned po odběru fixována vložením do fixační tekutiny. Fixace se provádí, aby se předešlo osmotickým změnám, sraštění, a tedy i morfologickým změnám v tkáni. Je nezbytné zejména uchovat všechny původních vazby a reaktivitu proteinů i ostatních buněčných složek pro následující histochemické reakce.

Hlavním účelem fixace je konzervace buněk a tkání. Ta zabrání autolýze inaktivací lyzomálních enzymů a zastaví růst bakterií a plísní. Struktura proteinů a aktivita enzymů je ovšem více či méně ovlivněna právě tímto protektivním účinkem (Lukáš, 1997).

Pro fixaci kuřecího embrya ve stádiu HH27 byl použit 4% pufrovaný formol a následně byl vzorek zpracován podle následujícího protokolu:

Vyprání v pramenité vodě: 10–30 min (dle délky fixace)

Alkohol 30%; 50%; 70%; 80%; 85%; 90%; 95%; 100% po 30 minutách

- 1) Xylen I.; II.; III. po 30 min
- 2) Parafin I.; II.; III.; po 30 min
- 3) Zalítí do parafínu

Nejdříve se tkáň vypere v pramenité vodě, aby se odstranilo fixační činidlo a zabránilo se přefixování vzorku. Dále je nutné tkáň odvodnit vzestupnou alkoholovou řadou, čímž se zabrání jejímu smrštění. Po odvodnění se alkohol musí z tkáně dokonale odstranit, neboť se v něm parafin nerozpouští. Proto se tkáň prosycuje xylenem, který se jednak mísí s alkoholem, a také dobře rozpouští parafin. Následuje prosycení tkáně rozehřátým parafinem při teplotě kolem 56–58 °C. Parafin vyplní mikroskopické štěrbinu v tkáni, a ta se pak dá krájet na velmi tenké řezy v rádech mikrometrů.

Vzorky zalité do parafínu byly na mikrotomu nakrájeny na řezy tlusté 5 μm a pomocí vodní lázně nanoseny v sériích na podložní sklíčka. Dohromady byly zhotoveny 3 sady levé končetiny, 5 sad pravé končetiny a 10 sklíček kuřecí ledviny. Z každé sady bylo jedno sklíčko obarveno podle protokolu na barvení hematoxylinem-eosinem:

- 1) Odparafinování – 2x xylen po 10'
- 2) Zavodnění tkáně – 2x alkohol 96% po 10'
- 3) Barvení jader

1. Mayerův hematoxylin 5'
2. Modrání v teplé pramenité vodě 5'
- 4) Barvení cytoplazmy buněk – Eosin 3'
- 5) Odvodnění - 2x alkohol 96% po 10'
- 6) Projasnění – xylen s fenolem
- 7) 2x xylen po 10'
- 8) Zamontování do montovacího média

Výsledkem barvení jsou modrá jádra, světle modrá chrupavka, oranžové až červené vazivo a oranžové erythrocyty. Na propírání se používají skleněné květy.

Pomocí náhledových sklíček bylo zjištěno, že aplikovanou kuličku obsahují tři sady pravé končetiny.

4.4. Imunohistochemické metody

Jedná se o aplikaci imunologických principů a metod, které nám pomáhají při studiu výskytu proteinů ve tkáních nebo buňkách. Tyto metody jsou dceřnými k histochemickým metodám, které detekují chemicky definované látky v buňkách, tkáňových kulturách a řezech z tkáňových bloků. Samotná imunohistochemie využívá vazby antigenu se specifickou protilátkou. Pokud je antigen, proti němuž je specifická protilátka namířena, ve tkáni přítomen, protilátka se na něj naváže. Takto navázaná protilátka se dá znázornit řadou způsobů (Lukáš, 1997).

Na zhotovených tkáňových řezech byl protein FGF1 detekován podle následujícího protokolu:

- 1) Xylen I. 10'
- 2) Xylen II. 10'
- 3) oplach ve 100% alkoholu
- 4) Alkohol I. 100% 5'

- 5) Alkohol II. 96% 5'
- 6) Alkohol III. 70% 5'
- 7) Oplach v destilované H₂O 10'
- 8) Citrátový pufr (1:9) 5' při teplotě 95–100 °C, necháme zchladnout 20'
- 9) PBS 3'
- 10) H₂O₂ 3% 10'
- 11) Blokovací sérum 20' při pokojové teplotě (1000μl PBS + 15μl séra- Vectastain rabbit/mouse/goat IgG)
- 12) Primární protilátka 60' při pokojové teplotě (1:50 protilátka + ředidlo DAKO Antibody Diluent)
- 13) PBS 5'
- 14) Sekundární protilátka 30' při pokojové teplotě (1000μl PBS + 5μl sekundární protilátky)
- 15) PBS 5'
- 16) ABC reagent 30' při pokojové teplotě (1000μl PBS + 10μl A + 10μl B)
- 17) PBS 5'
- 18) DAB – čas podle vybarvení (1,5 ml DAB pufru + 1 kapka?)
- 19) Oplach v PBS
- 20) Destilovaná H₂O 5' => zastavení reakce
- 21) Gillův hematoxylin 2-5 '
- 22) Pramenitá voda 5'
- 23) Oplach v destilované H₂O 5'
- 24) Odvodnění: alkohol I. - III.

25) Xylen I., xylen II.

26) Zamontování do Entellanu

Pokud se používá fluorescenčně značená protilátka, je třeba pracovat ve tmě. Po 60' inkubaci v primární protilátce následuje oplach v PBS 5' a zamontování do ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Německo). Poté se vzorky vyhodnocují pod fluorescenčním mikroskopem.

5. Výsledky

5.1. Vliv FGF1 na vývoj křídla u kuřecích embryí

5.1.1. Externí fenotyp kuřecích embryí po aplikaci FGF1

V experimentu byly použity modifikované proteiny FGF1-3x, FGF1-3x112 a jejich přirozená forma FGF1-WT, popř. FGF1-WT s heparinem. Jejich efekt byl testován na externím fenotypu křídel i na přežití embryí po aplikaci tří různých koncentrací. Vývoj křídla u embryí začíná ve stádiu HH17, a tedy implantace FGF1 proteinů byla provedena mezi stádiem HH19-24, kdy už je vytvořen končetinový pupen, ale ještě nejsou buňky diferencované.

FGF1 - WT

Pro určení vlivu na externí fenotyp byl FGF1-WT implantován do pravého křídla nejprve v nejnižší koncentraci (0,25 mg/ml; počet embryí n = 14; obr. 11). Bylo odebráno 14 embryí (100 %) bez externího fenotypu. Jedno embryo bylo při odběru mrtvé (7,14 %) (Tab. 1).



Obr. 11: Levá a pravá končetina s aplikovaným proteinem FGF1-WT v koncentraci 0,25 mg/ml byla bez zřetelného fenotypu.

Při zvýšení koncentrace proteinu (0,5 mg/ml; $n = 35$; obr. 12) bylo odebráno šest (17,14 %) mrtvých embryí bez externího fenotypu. Z živých embryí měla fenotyp pouze dvě embrya (5,71 %) - jejich pravé křídlo bylo kratší než levé. U ostatních přeživších embryí (77,14 %) nebyly pozorovány žádné změny fenotypu (Tab. 1).



Obr. 12: Levá a pravá končetina s aplikovaným proteinem FGF1-WT v koncentraci 0,5 mg/ml. Pravá končetina je kratší (pozorováno u 5,71 % embryí).

Při aplikaci nejvyšší koncentrace (1 mg/ml; n = 29; obr.13) jsme zaznamenali pět (17,24 %) embryí s fenotypem, z toho tři (60 %) byla mrtvá. Dvě mrtvá embrya (6,89 %) měla otevřenou dutinu břišní a kratší pravé křídlo téměř bez autopodia. Třetí mrtvé embryo (3,45 %) mělo pouze kratší pravé křídlo. U jednoho živého embrya (3,45 %) bylo pozorováno delší pravé křídlo (obr. 13), a u dalšího živého embrya (3,45 %) přetočené křídlo s tenčím brachiem. Živých embryí bez fenotypu bylo 21 (72,41 %) a mrtvá embrya bez fenotypu byla tři (10,34 %) (Tab. 1).



Obr. 13: Levá a pravá končetina s aplikovaným proteinem FGF1-WT v koncentraci 1 mg/ml. Pravá končetina je delší než levá, tento fenotyp se vyskytl u 3,45 % embryí.

Tab. 1.: Externí analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-WT.

	FGF1-WT (0,25 mg/ml)	FGF1-WT (0,5 mg/ml)	FGF1-WT (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	14	35	29
normální	14	33	24
s fenotypem	0	2	5
%	0 %	5,71 %	17,24 %

Heparin

Pro kontrolu byla udělána injekce čistého heparinu (koncentrace 25 mg/ml) do 25 embryí. 14 embryí (56 %) přežilo a všechna (100 %) byla bez fenotypu. Stejně tak všechna mrtvá embrya (44 %) byla bez fenotypu.

FGF1 - WT s heparinem

Vzhledem k neznalosti účinku heparinu na stabilizaci proteinu byly testovány čtyři různé koncentrace v kombinaci s proteinem FGF-WT. U nejnižší aplikované koncentrace (FGF1 0,125 – heparin 0,5 mg/ml; n = 19) byla odebrána tři embrya (15,79 %) s fenotypem kratšího pravého křídla a antebrachia – všechna byla živá. Pouze tři embrya (15,79 %) z celkového počtu byla při odběru mrtvá (Tab. 2).

Při mírném zvýšení koncentrace FGF1 (FGF1 0,25 – heparin 0,5 mg/ml; n = 18) mělo při odběru fenotyp pouze jedno embryo (5,56 %), které bylo živé mělo kratší pravé křídlo. Živých embryí bylo odebráno 13 (72,22 %) (Tab. 2).

Z embryí s injektovanou nejvyšší koncentrací FGF proteinu (FGF1 0,5 – heparin 0,5 mg/ml; n = 19) bylo osm (42,11 %) embryí mrtvých, a z toho jedno (12,5 %) mělo fenotyp s kratším pravým křídlem deformovaného tvaru. Pouze dvě živá embrya (18,18 %) měla změnu ve fenotypu (Tab. 2).

Následně byla testována vyšší koncentrace heparinu (FGF1 0,25 – heparin 25 mg/ml; n = 22). Fenotyp mělo pouze jedno embryo (4,55 %), které bylo při odběru živé. Jeho pravé křídlo

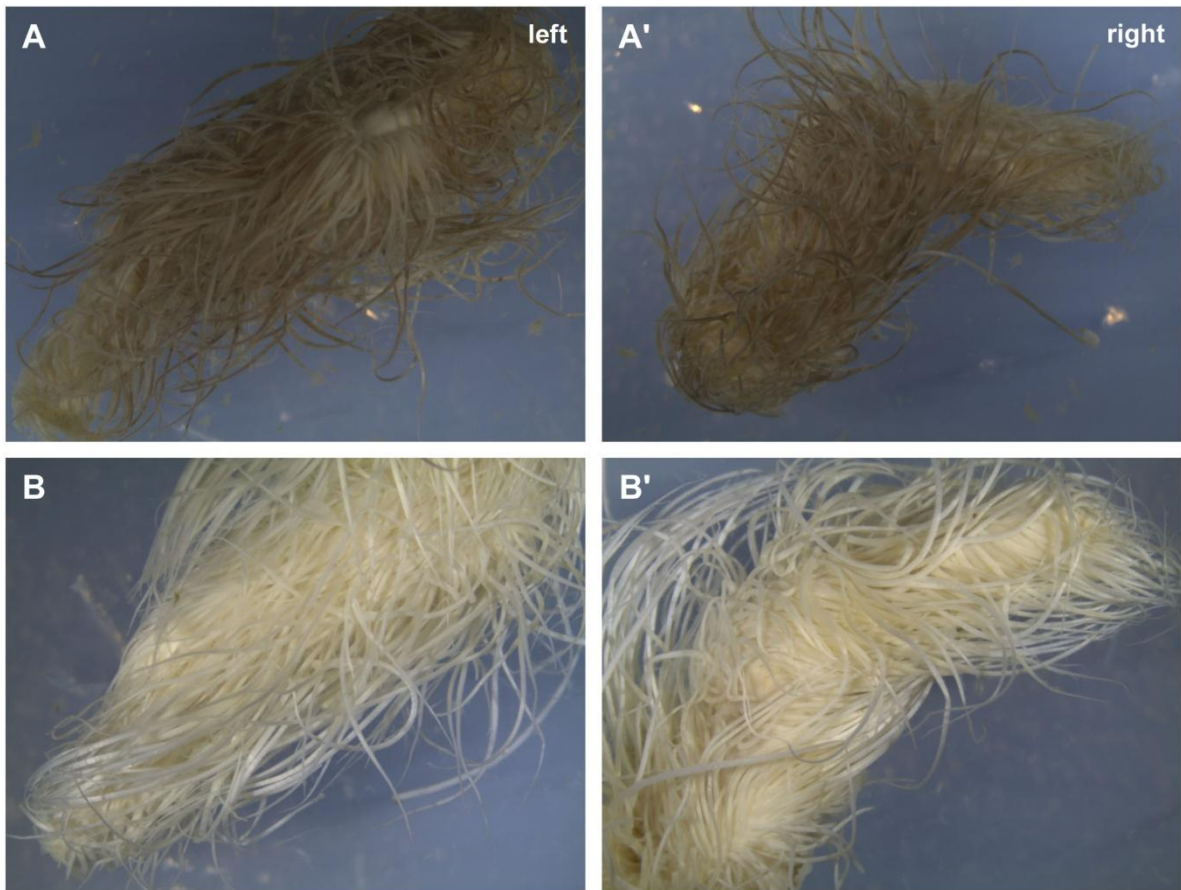
bylo menší a mělo výrůstek na antebrachiu. Z celkového počtu bylo 13 (59,09 %) embryí živých a devět (40,91 %) mrtvých (Tab. 2).

Tab. 2.: Externí analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-WT s heparinem.

	FGF1-WT (0,125 mg/ml) s heparinem (0,5 mg/ml)	FGF1-WT (0,25 mg/ml) s heparinem (0,5 mg/ml)	FGF1-WT (0,5 mg/ml) s heparinem (0,5 mg/ml)	FGF1-WT (0,25 mg/ml) s heparinem (25 mg/ml)
Celkový počet embryí	19	18	19	22
normální	16	17	16	21
s fenotypem	3	1	3	1
%	15,79 %	5,56 %	15,79 %	4,55 %

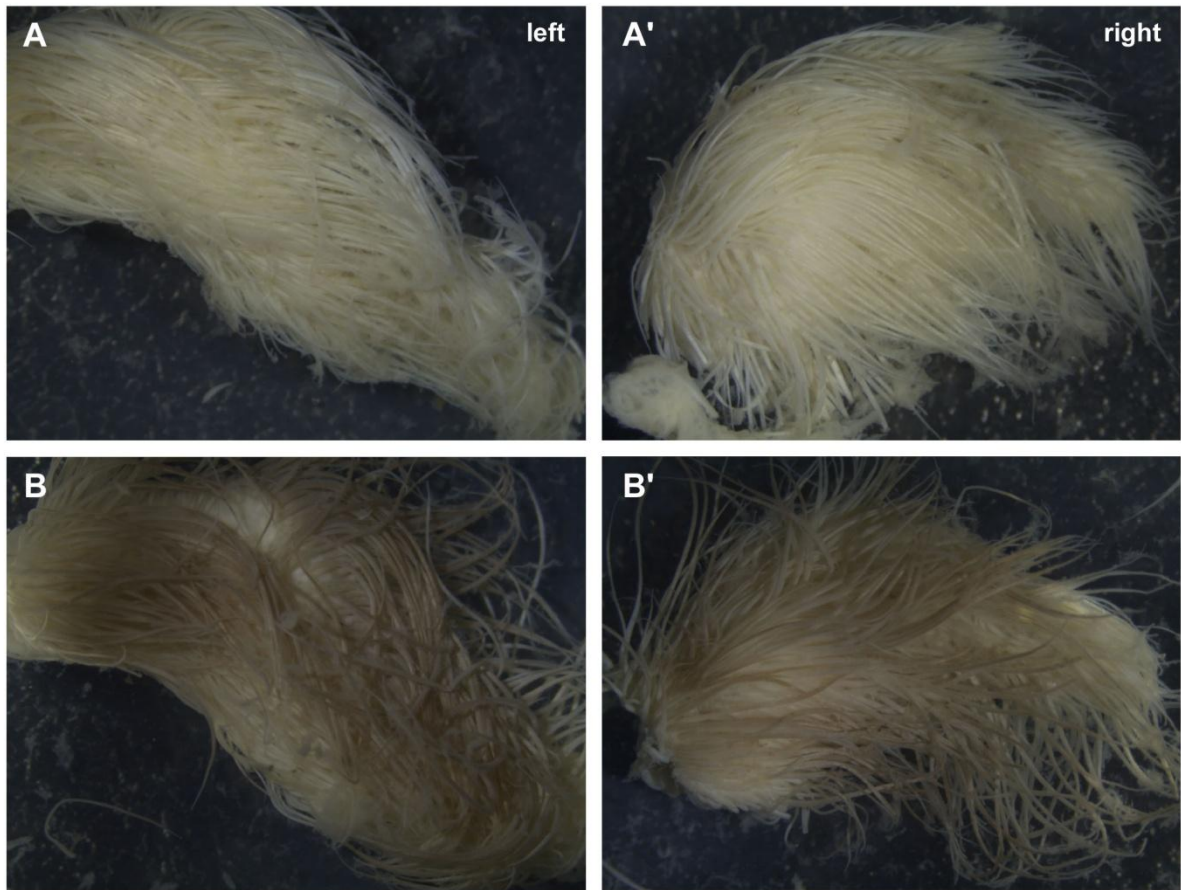
FGF1 3x

Pro analýzu modifikovaného proteinu FGF1-3x jsme použili nejprve nejnižší koncentraci (0,25 mg/ml; n = 15; obr. 14). Dvě embrya byla při odběru mrtvá (13,33 %), ale neměla žádný externí fenotyp. Bez fenotypu bylo rovněž osm živých embryí (53,33 %), a s fenotypem jich bylo odebráno pět (33,33 %). Při použití této koncentrace byly pozorovány dvě změny u externího fenotypu, a to kratší pravé křídlo u dvou embryí (13,33 %) a u třech embryí (20 %) se vytvořil malý výběžek na antebrachiu (Tab. 3).



Obr. 14: Ukázka obou fenotypů při použití 0,25 mg/ml koncentrace proteinu FGF1-3x. Levá končetina slouží jako kontrolní.

Po aplikaci vyšší koncentrace FGF1-3x (0,5 mg/ml; $n = 43$; obr. 15) bylo pozorováno 25 (58,14 %) embryí s fenotypem a 18 (41,86 %) bez fenotypu. Z celkového počtu bylo pět (11,63 %) embryí mrtvých, a z toho pouze jedno vykazovalo změnu fenotypu. Velmi častým jevem ($n = 16$; 37,21 %) bylo zkrácení a ztlustění pravého křídla. Dalším rysem byla změna tvaru autopodia a otevřená hrudní nebo břišní dutiny. Tento fenotyp se vyskytl u celkem devíti embryí (20,93 %) (Tab. 3).



Obr. 15: Pravá končetina je zkrácená a tlustší oproti levé kontrolní končetině. Tento fenotyp byl pozorován u 37,21 % embryí. Jedná se o koncentraci 0,5 mg/ml aplikovaného proteinu FGF1-3x.

Pro analýzu nejvyšší koncentrace (1 mg/ml; n = 18; obr. 16) bylo odebráno 17 (94,44 %) živých embryí, z nich sedm (41,18 %) nevykazovalo fenotyp. Včetně jednoho mrtvého embrya bylo celkem 11 (61,11 %) embryí s fenotypem. Osm (44,44 %) embryí mělo menší a kratší křídlo a tři (16,67 %) embrya měla menší autopodium (Tab. 3).



Obr. 16: Na levé fotografii je vidět implantovaná kulička s proteinem FGF1-3x o koncentraci 1 mg/ml, a také menší autopodiumcu této končetiny. Pravá fotografie zobrazuje pravou končetinu s fenotypem u staršího embrya, která je kratší oproti levé kontrolní.

Tab. 3.: Externí analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-3x.

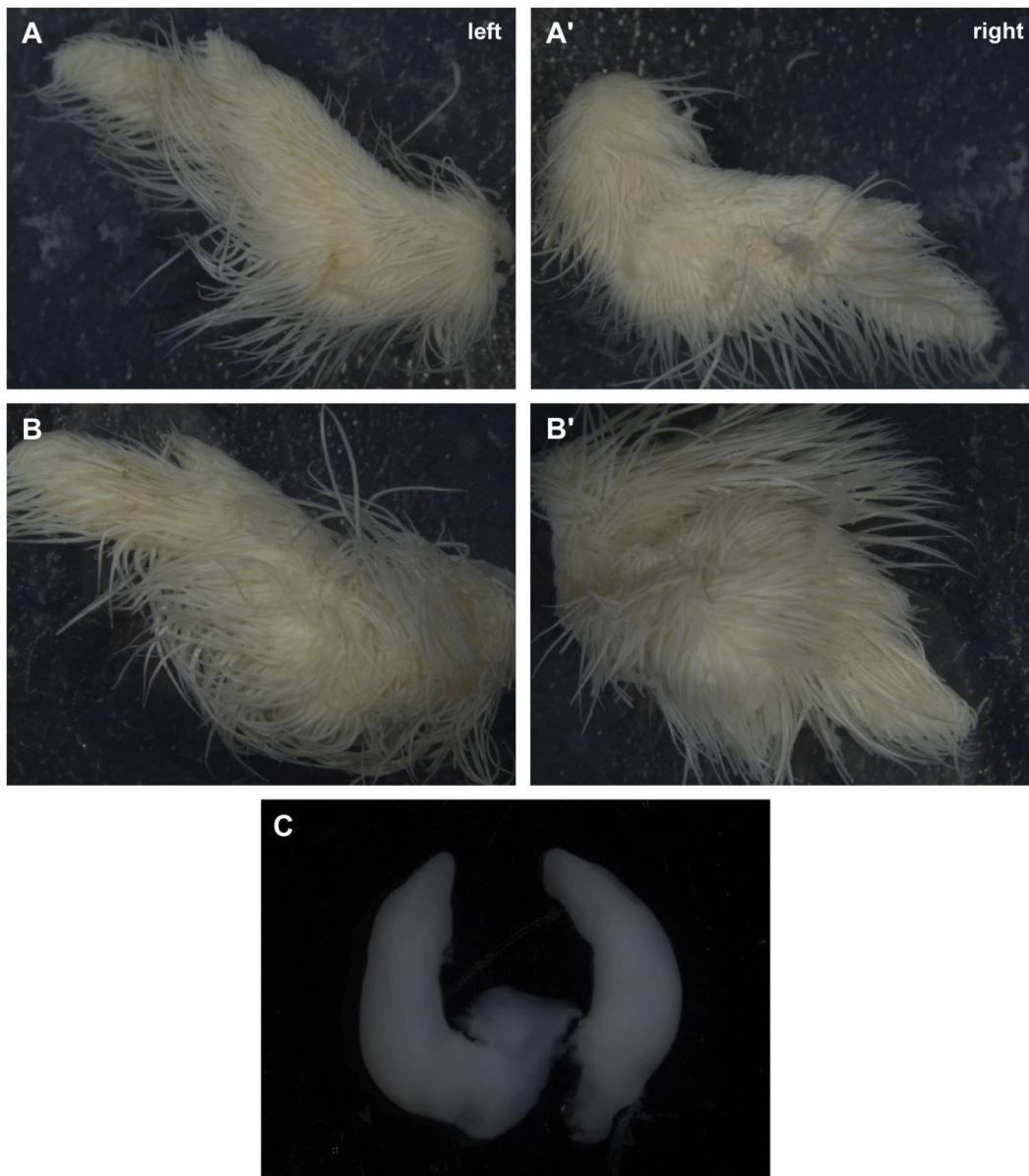
	FGF1-3x (0,25 mg/ml)	FGF1-3x (0,5 mg/ml)	FGF1-3x (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	15	43	18
normální	10	18	7
s fenotypem	5	25	11
%	33,33 %	58,14 %	61,11 %

FGF1 3x112

Pro analýzu vlivu modifikovaného proteinu FGF1-3x112 na vývoj končetin byly dosud testovány dvě koncentrace. Po aplikaci nižší koncentrace (0,5 mg/ml; n = 46; obr. 17) jsme zaznamenali deset (21,74 %) mrtvých embryí, z toho šest (60 %) mělo fenotyp a byla fixována v 4 % pfa. Hlavním znakem tohoto fenotypu byla otevřená dutina břišní a u pravého křídla menší autopodium. Z 36 (78,26 %) živých embryí mělo 14 fenotyp (38,89 %), a to hlavně menší a kratší pravé křídlo (71,43 %; n=10). U čtyř embryí (28,58 %) byla nalezena otevřená hrudní a břišní dutina (Tab. 4).

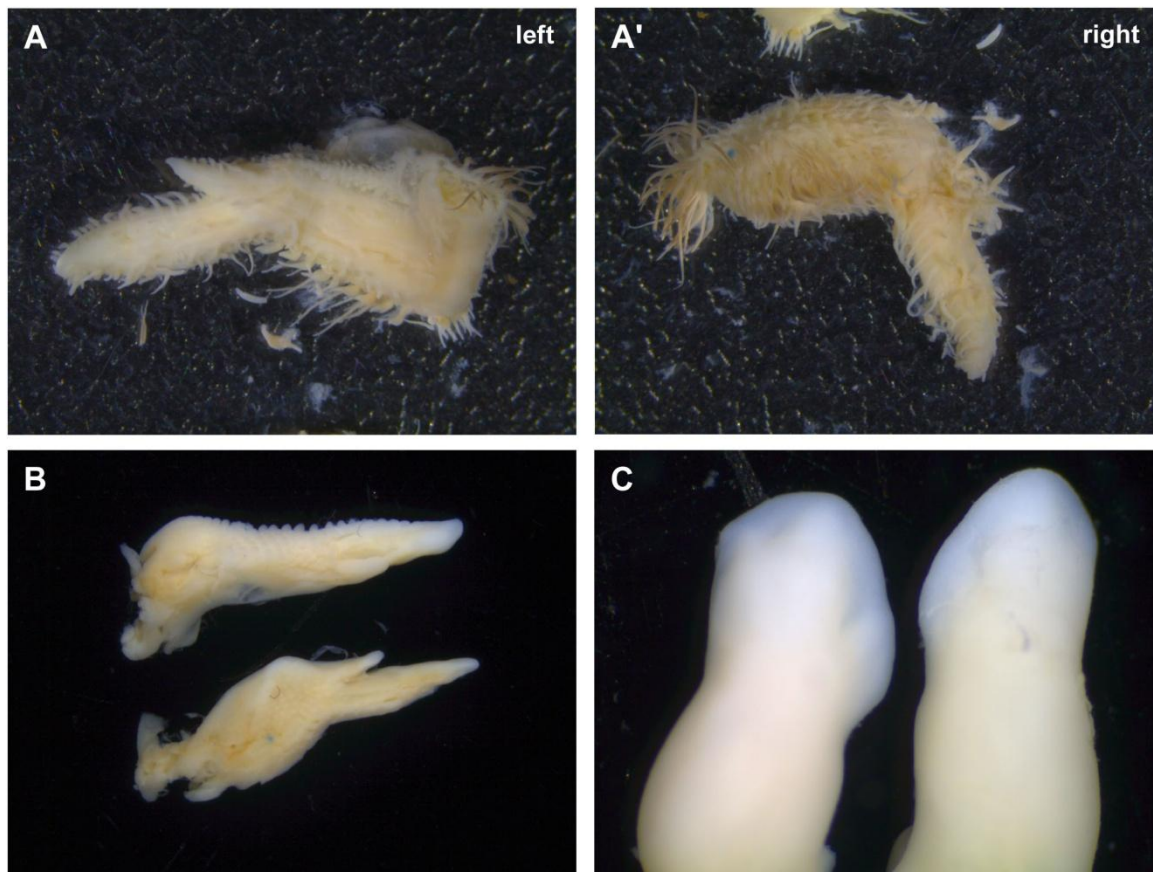
Tab. 4.: Externí analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-3x112.

	FGF1 – 3x112 (0,5 mg/ml)	FGF1 – 3x112 (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	46	37
normální	26	15
s fenotypem	20	22
%	43,48 %	59,5 %



Obr. 17: Fenotyp u embryí po aplikaci modifikovaného proteinu FGF1-3x112 v koncentraci 0,5 mg/ml

Vyšší koncentrace proteinu (1 mg/ml; n = 37; obr. 18) způsobila větší úmrtnost embryí (54,05 %). Všechna mrtvá embrya byla fixována v 4 % pfa, pět z nich (25 %) nevykazovalo fenotyp a 15 (75 %) mělo pozmeněnou morfologii křídla. Nejčastějším projevem bylo delší pravé křídlo a menší autopodium (80 %; n = 12), dalším pak zkrácení pravého křídla (20 %). Celkem 17 embryí bylo odebrání živých (45,95 %), z čehož sedm mělo externí změny fenotypu (41,18 %), a to kratší křídlo s tenčím antebrachiem (71,43 %; n = 5), nebo deformovaný první prst (28,57 %; n = 2) (Tab. 4).



Obr. 18: Fenotyp embryí po aplikaci modifikovaného proteinu FGF1-3x112 v koncentraci 1 mg/ml

5.1.2. Skeletální fenotyp kuřecích embryí po aplikaci FGF1

Po nafocení externího fenotypu byla embrya barvena alciánovou modří a alizarinovou červení a nafocena znovu pro analýzu skeletálního fenotypu. Byla použita pouze přeživší embrya, a tak se liší počty vzorků s výsledky externího fenotypu. 100 % tedy označuje počet živých embryí v dané experimentální skupině.

Pozn.: U vzorků FGF1-WT s heparinem stále ještě probíhá barvení, a proto pro ně nejsou prezentovány finální výsledky.

FGF1-WT

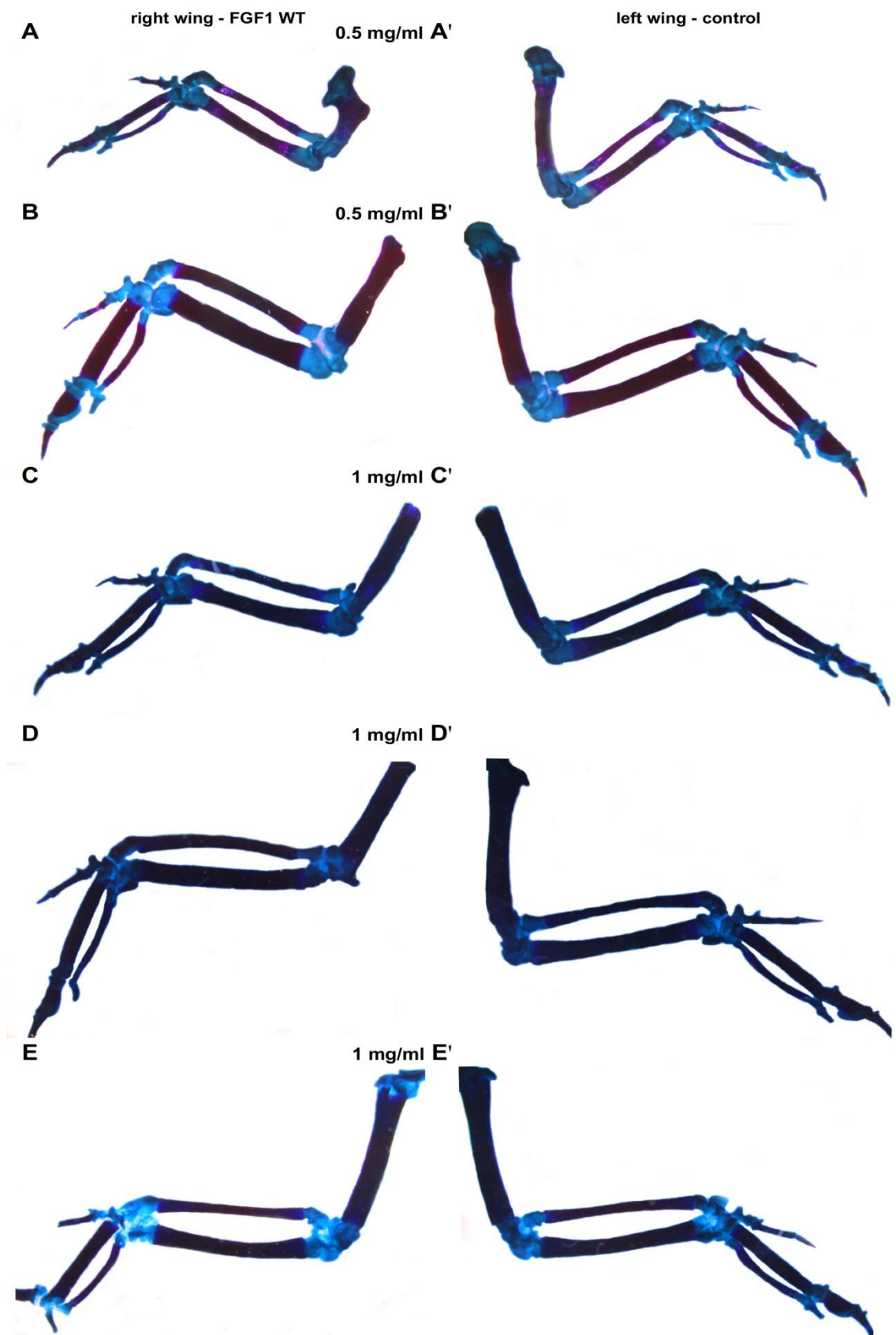
U nejnižší koncentrace (0,25 mg/ml; n = 13) bylo odebráno 13 (100 %) živých embryí bez fenotypu.

Při použití vyšší koncentrace (0,5 mg/ml; n = 29) měla čtyři embrya zkrácený humerus (13,79 %, obr. 19A'). U jednoho embrya se kromě tohoto defektu vyskytlo deformované zápěstí (obr. 19B'). Ostatní živá embrya (86,21 %) nevykazovala žádnou změnu skeletálního fenotypu (Tab. 5).

Nejvyšší použitá koncentrace (1 mg/ml; n = 23) způsobila 3 různé změny fenotypu, které ovšem nebyly nijak výrazně zastoupeny. Kratší ulnu měla dvě embrya (8,70 %, obr. 19C'), malý výrůstek na antebrachiu jedno embryo (4,35 %, obr. 19D'), a taktéž mělo jedno embryo kratší humerus (4,35 %) (Tab. 5).

Tab. 5.: Skeletální analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-WT.

	FGF1-WT (0,25 mg/ml)	FGF1-WT (0,5 mg/ml)	FGF1-WT (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	14	35	29
normální	14	33	24
s fenotypem	0	2	5
%	0 %	5,71 %	17,24 %



Obr. 19: Skeletání fenotypy embryí po implantaci proteinu FGF1-WT.

FGF1 3x

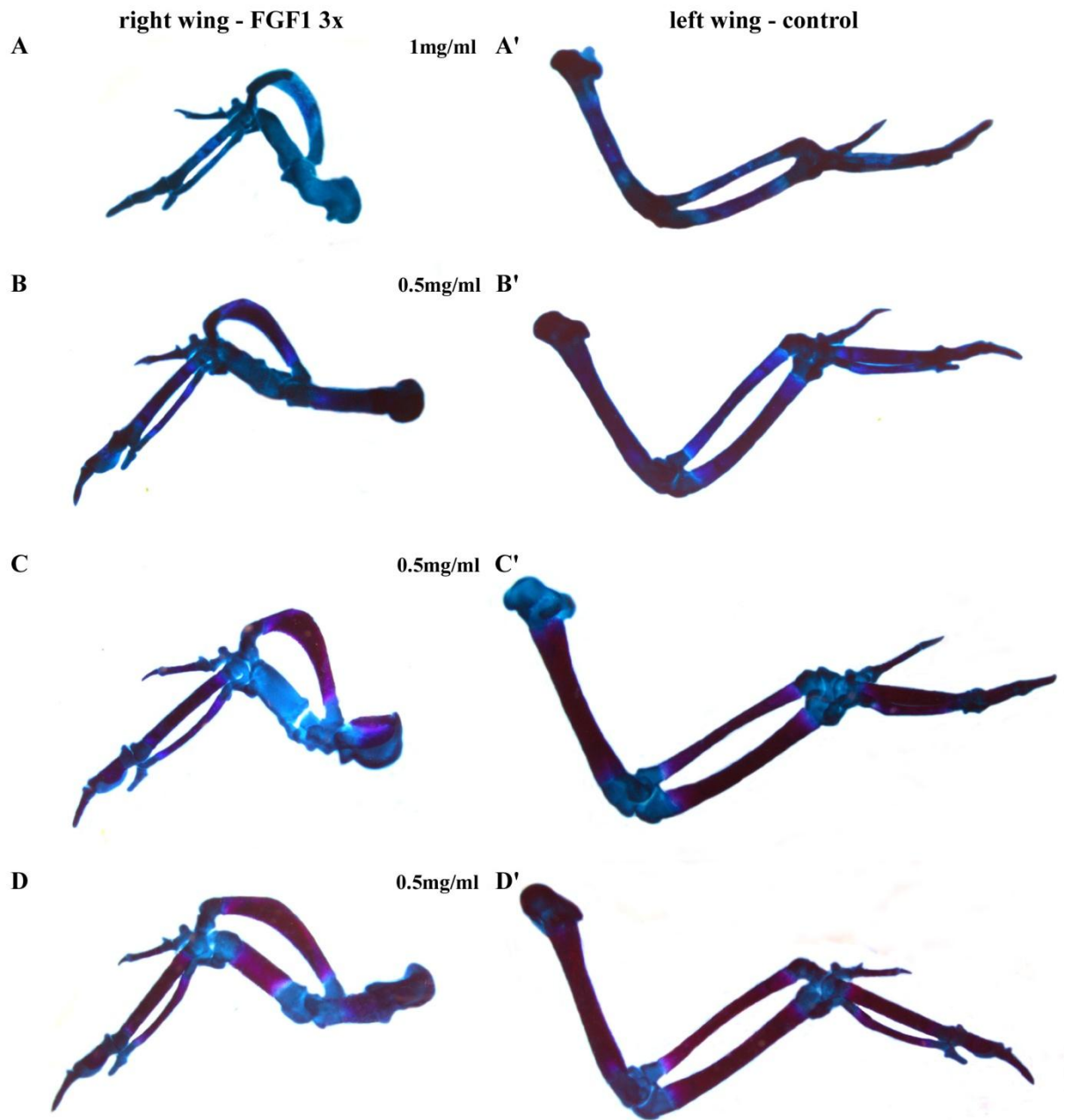
U nejnižší použité koncentrace (0,25 mg/ml; n = 13; obr. 20) byly pozorovány dva různé fenotypové projevy a to celkem u devíti embryí (69,23 %). Šest embryí mělo kratší a tlustší humerus (46,15 %) a tři měla pouze základ humeru (23,08 %) (Tab. 6).

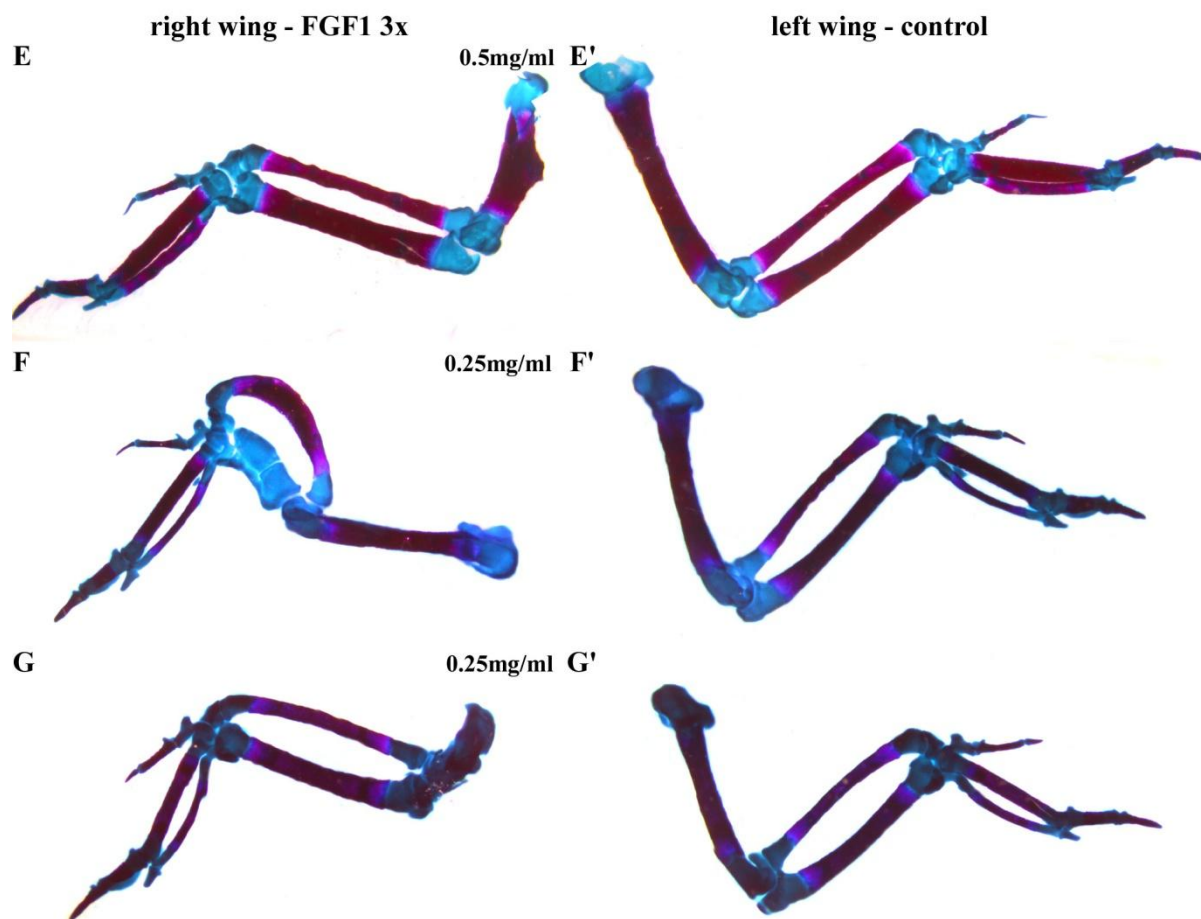
Při použití vyšší koncentrace (0,5 mg/ml; n=38; obr. 20) se vyskytla řada skeletálních defektů, které se vzájemně kombinovaly. Nejčastějším projevem byl zkrácený humerus, který byl pozorován u 16 embryí (42,11 %). Dále byla pozorována kombinace deformací, a to vypouklý radius, zkrácená a široká ulna, velmi zkrácený a tlustý humerus a špatné napojení prstů na kloub. Tento fenotyp se vyskytoval u deseti embryí (26,32 %). Pět embryí (13,15 %) mělo deformovaný tvar humeru, tlustší ulnu a špatné vyvinuté klouby. Posledním pozorovaným fenotypem u dvou embryí (5,26 %) byl malý výrůstek na ulně a menší humerus. Výjimečně byla obarvena i tři mrtvá embrya, která měla radius i humerus menší a tlustší (Tab. 6).

Nejvyšší koncentrace (1 mg/ml; n = 15; obr. 20) způsobila zejména zkrácený a tlustší humerus, kde se ve dvou případech vytvořil i malý výběžek. Tento fenotyp se vyskytoval u devíti embryí (60 %). U dvou embryí (13,33 %) byl pozorován vypouklý radius. Ostatní embrya nevykazovala žádné skeletální defekty (Tab. 6).

Tab. 6.: Skeletální analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1- 3x.

	FGF1-3x (0,25 mg/ml)	FGF1-3x (0,5 mg/ml)	FGF1-3x (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	13	38	15
normální	4	5	4
s fenotypem	9	33	11
%	69,23 %	86,84 %	73,33 %





Obr. 20: Skeletální změny embryí s implantovaným modifikovaným proteinem FGF1-3x.

FGF1 3x112

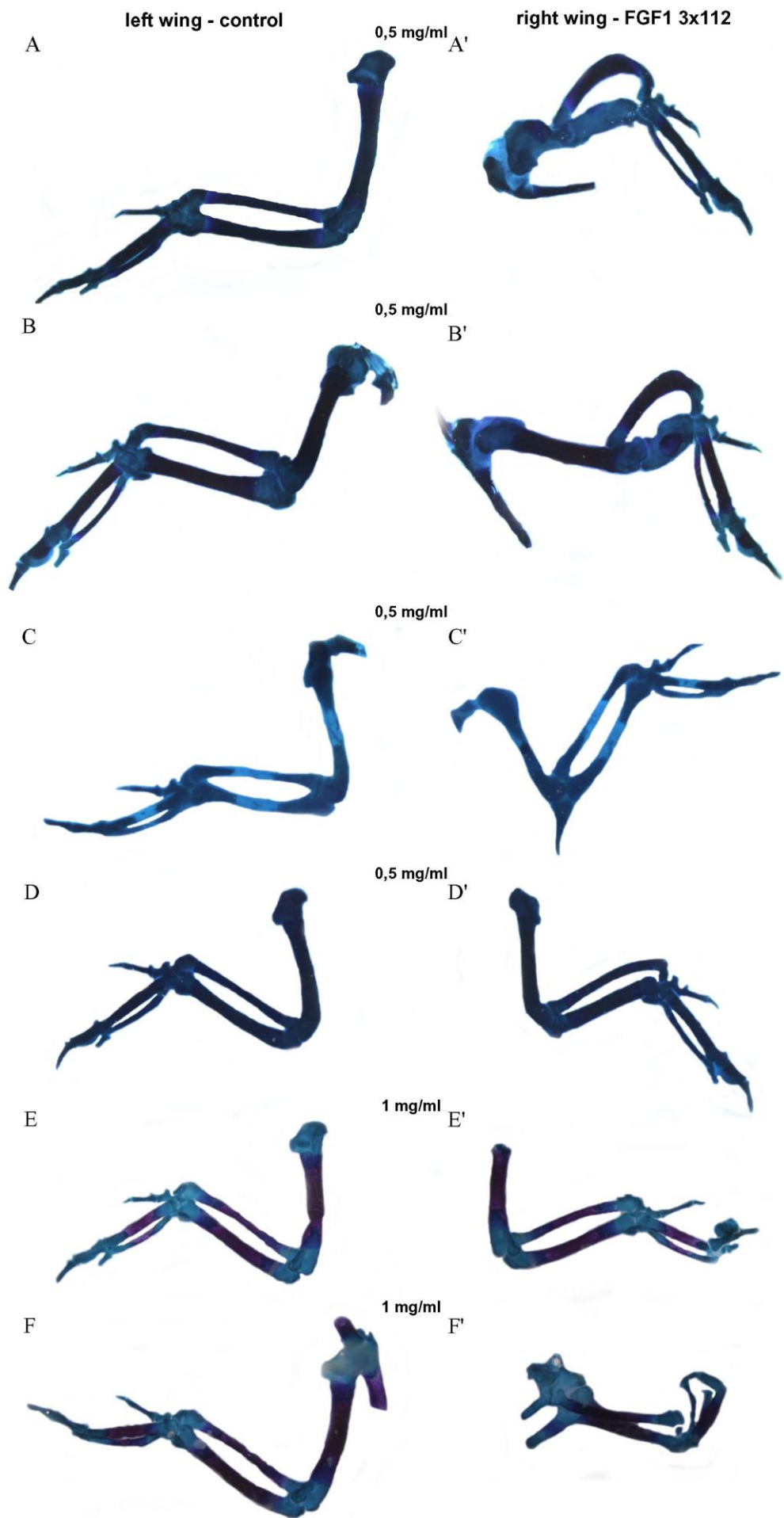
Modifikovaný protein FGF1-3x112 byl implantován za pomoci kuliček ve dvou koncentracích. Při použití nižší koncentrace (0,5 mg/ml; n = 36; obr. 21) převládaly fenotypy s velmi výraznými deformacemi. Nejčastěji se vyskytující defekty byly zkrácený a tlustší humerus, tlustší ulna a kratší autopodium. Tento fenotyp byl pozorován u 15 embryí (41,67 %). U třech embryí (8,33 %) byl pozorován vypouklý radius, deformované prstní klouby a kratší a tlustší ulna. Posledním fenotypem byl menší výrůstek na ulně (5,56 %) (Tab. 7).

U vyšší koncentrace proteinu (1 mg/ml; n = 16; obr. 21) se vyskytlo pouze šest embryí s fenotypem (37,5 %). Jednou z anomálií byl zkrácený humerus, u některých jedinců skoro až chybějící (25 %). Dále byla pozorována embrya (12,5 %) s abnormálními prsty a některými kostmi (Tab. 7).

Tab. 7.: Skeletální analýza morfologických změn na kuřecích křídlech po implantaci FGF1-3x112.

	FGF1-3x112 (0,5 mg/ml)	FGF1-3x112 (1 mg/ml)
Celkový počet embryí	36	16
normální	16	10
s fenotypem	20	6
%	55,56 %	37,5 %

Obr. 21: Skeletání fenotypy embryí s implantovaným modifikovaným proteinem FGF1-3x112 (na další straně).



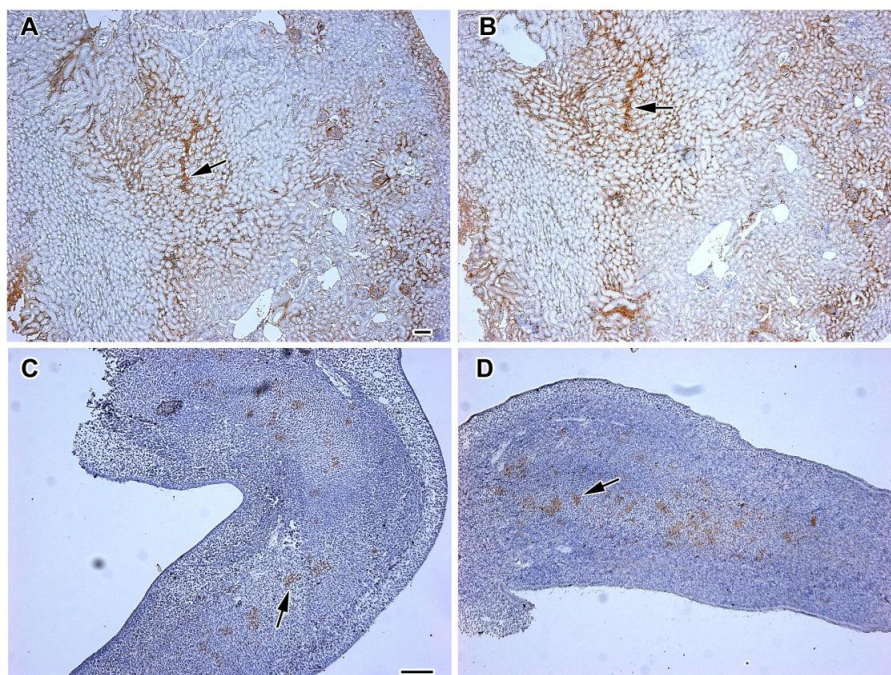
5.2. Imunohistochemická detekce FGF1 na histologických řezech

Cílem následující části projektu bylo určit, jaký typ protilátky pro detekci proteinu FGF1 bude nejlépe fungovat na histologických řezech křídel kuřecích embryí, do kterých byl dříve implantován. Byly použity dvě protilátky od Santa Cruz Biotechnology a fluorescenční protilátka od Biorbyt.

5.2.1. Detekce FGF-1 (B-3): sc-55520

FGF-1 (B3) je myší monoklonální protilátka, která se váže na aminokyseliny (16–140) lidského FGF1. Tato protilátka je doporučena pro detekci FGF1 u myši, krysy a u člověka. Blokační sérum a sekundární protilátka byly použity z detekčního kitu Vectastain mouse IgG.

Pozitivní signál byl zaznamenán u všech vzorků. Aplikace citrátové pufru nevedla k výrazným změnám. FGF1 – pozitivní buňky byly detekovány v kontrolní tkáni ledviny (obr. 21A). Na řezu ledviny po aplikaci citrátového pufru byl signál výraznější (obr. 21B). U kontrolního levého křídla byla pozitivita minimální (obr. 21C). Pravá končetina vykazovala silnější pozitivitu než levá končetina (obr. 21D).

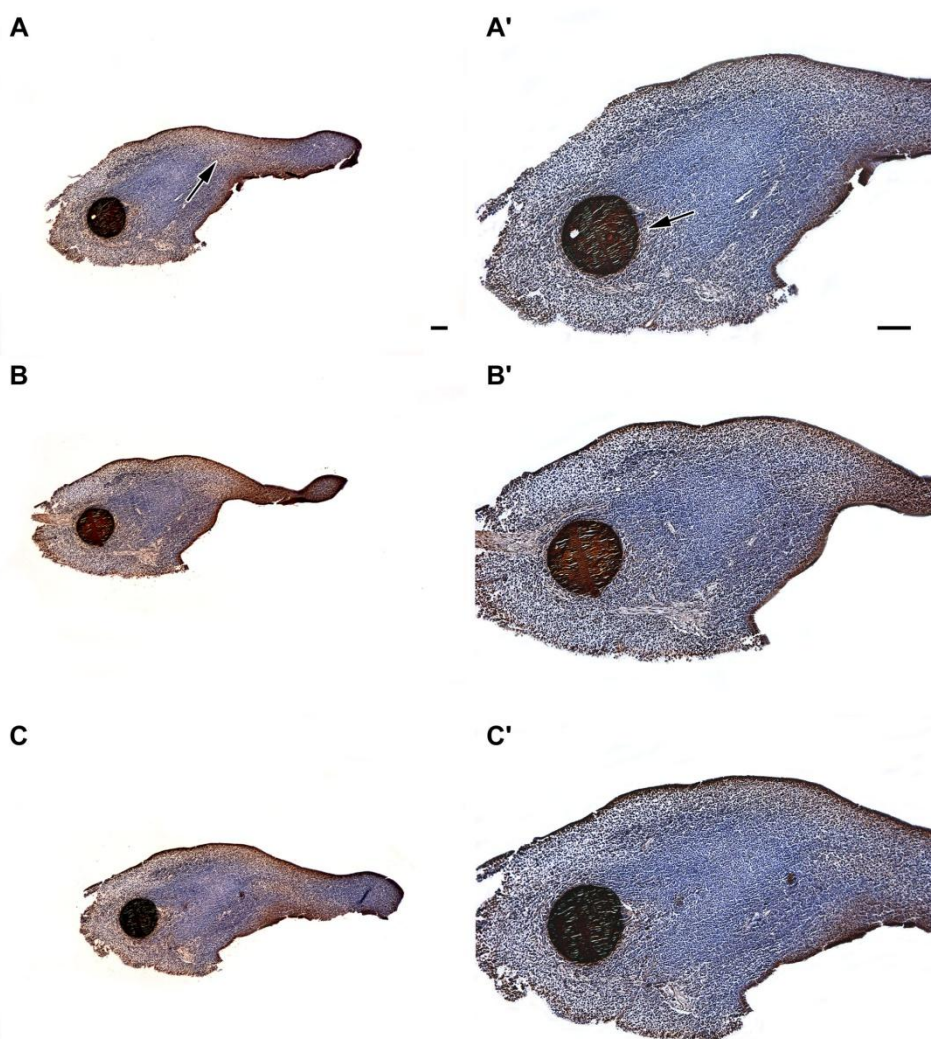


Obr. 21: Detekce FGF1(B-3) v ledvině, levé a pravé končetině. Měřítko je 100 μm .

5.2.2. Detekce FGF-1 (C-19): sc-1884

FGF-1 (C-19) je polyklonální kozí protilátka, která se váže v oblasti C-terminální domény lidského FGF1. Doporučená aplikace pro tuto protilátku, je detekce FGF1 a FGF2 na myši, kryse a na lidech. Blokační sérum a sekundární protilátka byly použity z detekčního kitu Vectastain goat IgG.

Pomocí této protilátky byl detekován FGF-1 pouze na vzorku pravé končetiny, a to velmi silně v kuličce (celá tmavě hnědá) a při okrajích křídla (obr. 22B',C',D'). Dále byl signál pozorován jako celá plocha v zúženém konci končetiny (obr. 22B,C,D). V ledvině byl zaznamenán signál v oblasti ledvinových kanálků, pouze sběrací kanálky byly negativní (obr. 22A).

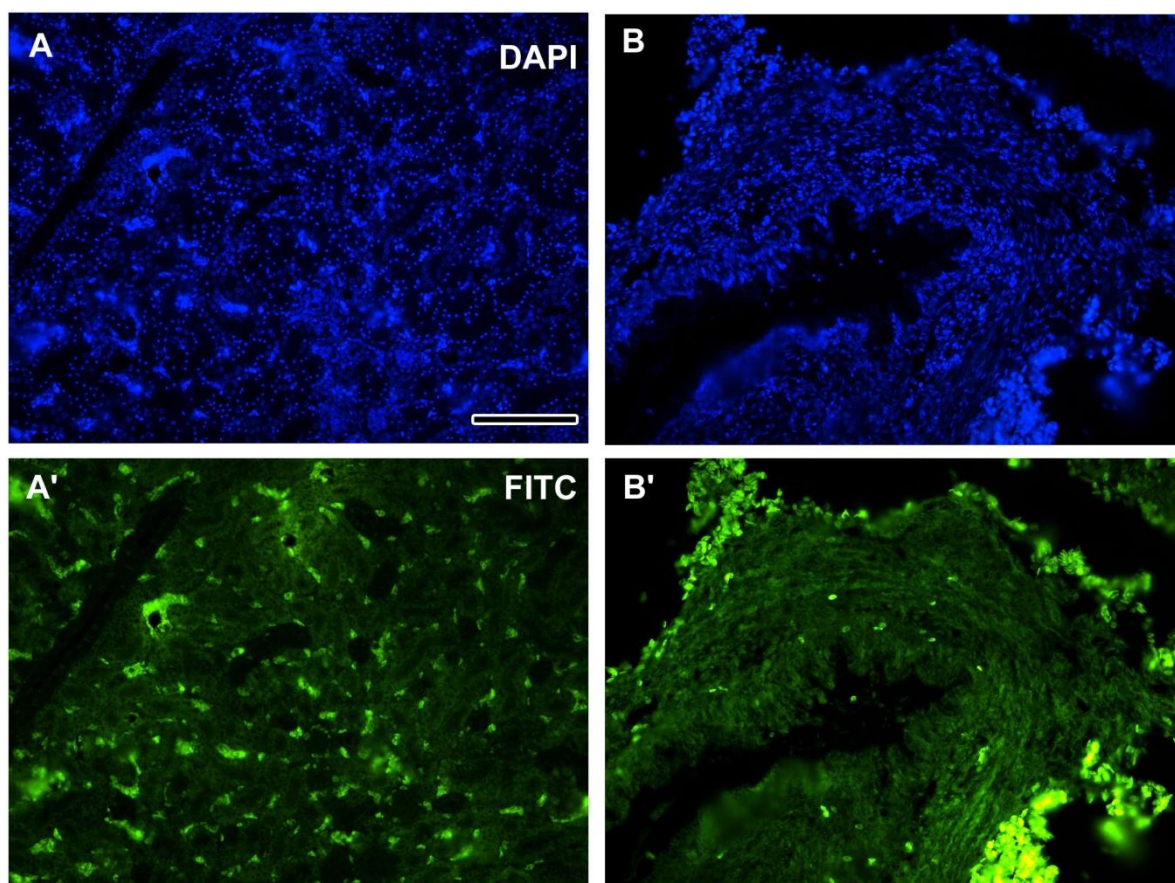


Obr. 22: Detekce FGF-1 (C-19) ve zúženém konci pravé končetiny a v oblasti kuličky. Zvětšeno 5x (A, B, C) a 10x (A', B', C'). Měřítko je 100 μm .

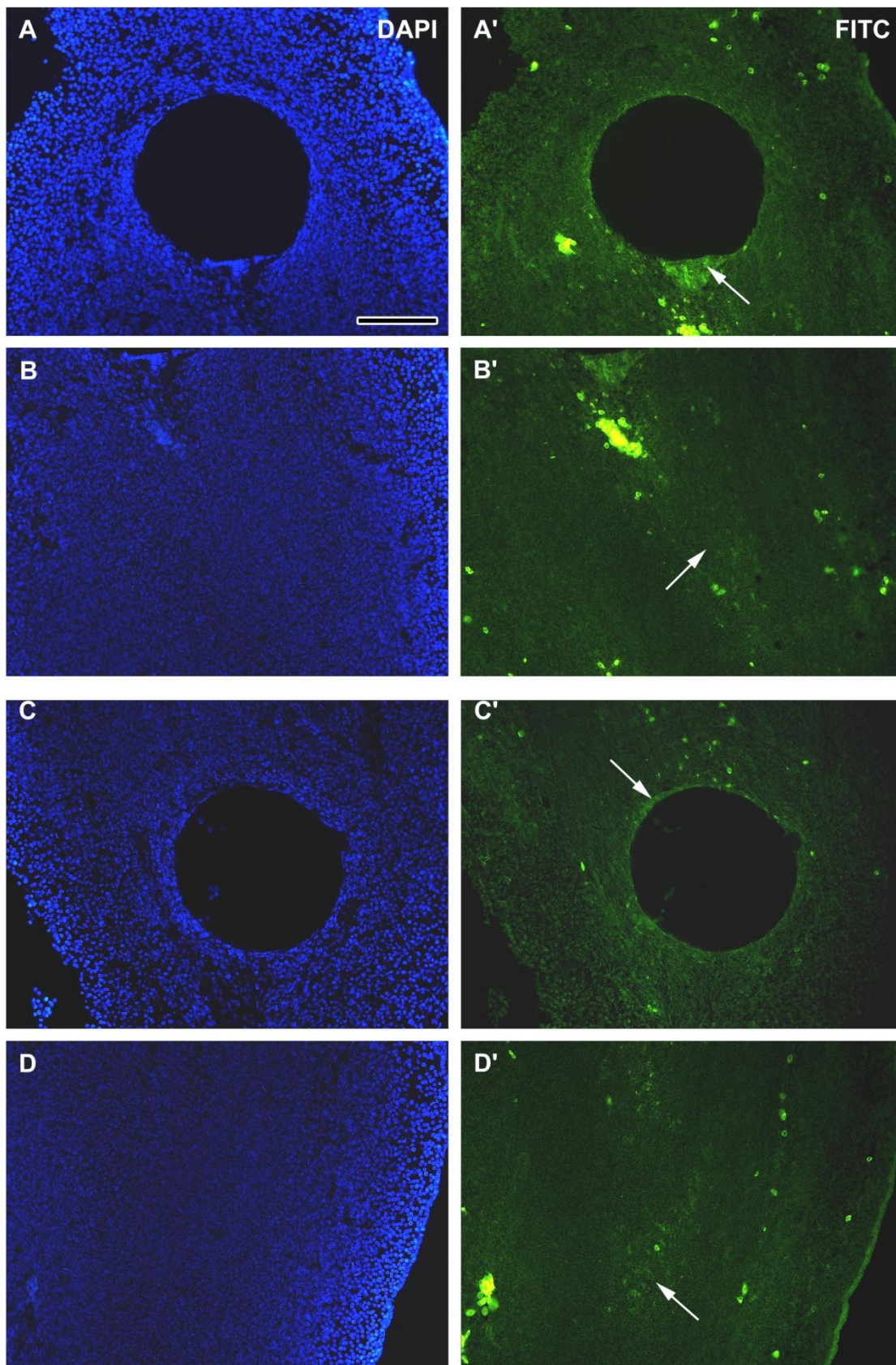
5.2.3. Detekce FGF-1 (FITC)

FGF1 protilátka konjugovaná s FITC byla naředěna v PBS a následně skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedná se o králičí polyklonální protilátku doporučenou pro detekci FGF1 u myši, krysy a u člověka. Blokační sérum bylo použito z kitu Vectastain rabbit IgG a vzorky byly zamontovány do ProLong Gold antifade reagent.

U této protilátky neměla aplikace citrátového pufru žádný vliv na zlepšení signálu. Signál byl pozorován u všech vzorků, a to hlavně kolem kuličky (obr. 24C',E') a slabě jako pás uprostřed končetiny (obr. 24D',F'). Pozitivita v ledvině byla slabší a rozptýlená (obr. 23A',B').

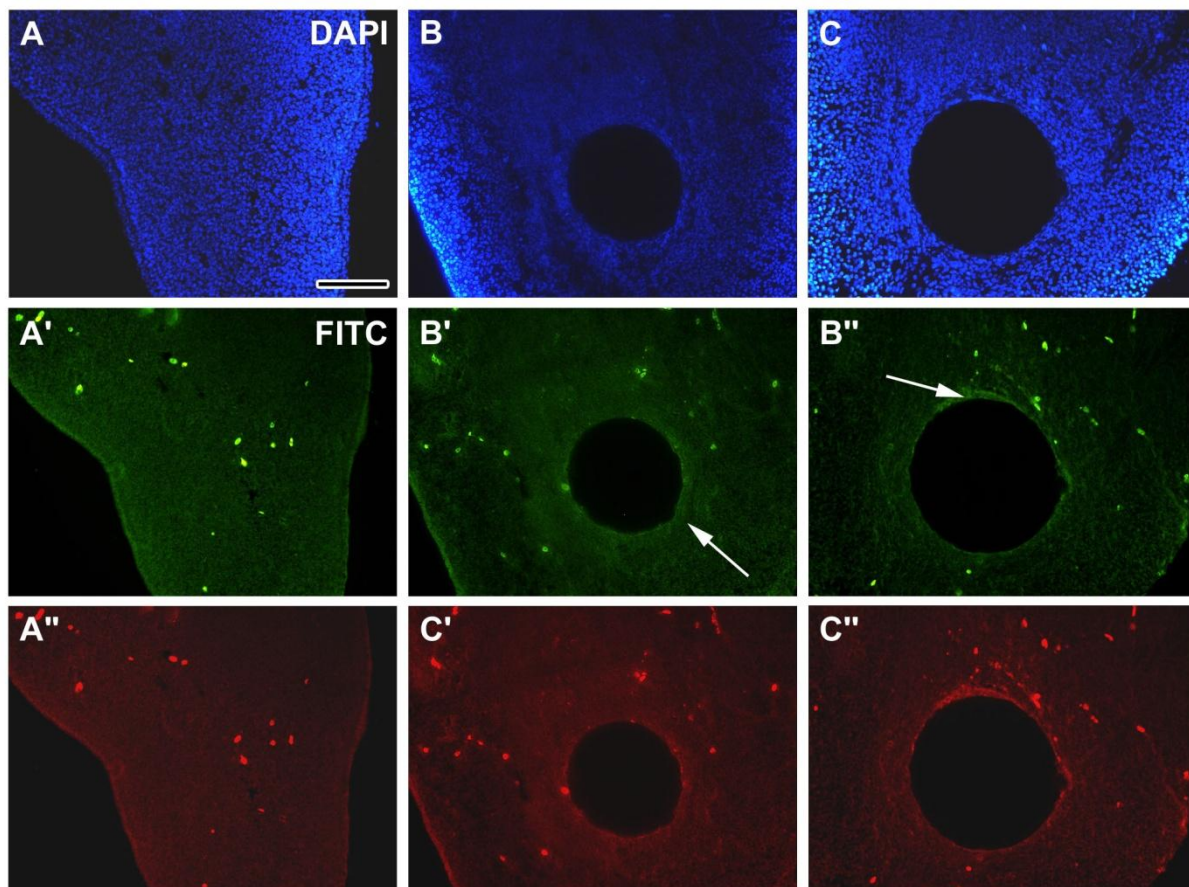


Obr. 23: Signál je patrný v ledvioných kanálcích a kolem erytrocytů. Nafocené fluorescenčním mikroskopem, měřítko 100 μm .



Obr. 24: Slabý signál byl pozorován kolem kuličky a uprostřed končetiny. Nafocené fluorescenčním mikroskopem, měřítko 100 μm .

Kolem kuličky byl jen slabý signál (obr. 25B",C"), stejně tak při okrajích končetin. Levá kontrolní končetina byla zcela negativní (obr. 25A").



Obr. 25: Levá končetina zcela negativní, u pravé je slabý signálu kolem kuličky. Nafočené fluorescenčním mikroskopem, měřítko 100 μm .

6. Diskuze

Role proteinu FGF1 byla dosud zejména zkoumána v souvislosti se svým sesterským proteinem FGF2, s kterým sdílí podobnou strukturu, expresní profil a buněčnou lokalizaci. Vzhledem k tomu, že FGF1 je schopný se vázat a aktivovat všechny známé receptory FGF, je proto pravděpodobně jediným substituentem FGF2, a mít tak obdobné biologické funkce (Miller, 1999).

Samostatně však úloha FGF1 nikdy nebyla dopodrobna zkoumána, a proto jsme se rozhodli otestovat jak přirozený protein FGF1, tak jeho modifikované formy. Přirozený protein FGF1

jsme testovali také spolu s heparinem, což ovšem nemělo za následek výraznější morfologické změny. Jako modifikované proteiny jsme použili FGF1-3x a FGF1- 3x112. Dosud nebyl proveden žádný výzkum, který by prokázal změnu fenotypu po jejich použití. Pouze Miller (1998) porovnával FGF1 a FGF2 knockout u myši.

U myši FGF2^{-/-} byly pozorovány rozdíly ve struktuře mozku a reparaci tkání, zatímco u FGF1^{-/-} myši nebyla pozorována žádná změna fenotypu. Analýza FGF1-FGF2 double-knockout nevysvětlila poměrně slabé projevy fenotypových změn, spojené s inaktivací pouze jednoho z daných faktorů. Jejich fenotyp nebyl výraznější než u samotného FGF2^{-/-} (Miller, 1998).

Z našeho výzkumu je patrné, že použití FGF1-WT nevykazuje časté morfologické změny, jako tomu bylo u modifikovaného proteinu FGF1-3x. Aplikací FGF1 do končetiny jsme ektopicky navýšili množství FGF1 v posteriorní části končetiny, a morfologie skeletu se následně začala měnit zejména v této oblasti. Ulna byla kratší a tlustší, a tím se radius musel vyklenout, aby udržel spojení v oblasti kloubů. Stejně tak došlo ke zmenšení a ztluštění humeru. Tyto deformity jsou morfologicky podobné s poruchou signalizace FGFR3, které nastávají při vzniku achondroplazie. Tato nemoc je dědičná a dochází při ní k poruše enchondrální osifikace ovlivňující růst kostí do délky. Kostí jsou pak nápadně krátké, zakřivené, avšak normálně široké. Z tohoto důvodu by náš výzkum mohl být v budoucnosti využit jako model pro studium poruch chondrogenese.

7. Závěr

V práci byl sledován vliv tří forem proteinu FGF1 (FGF1-WT, FGF1-WT s heparinem, FGF1-3x a FGF1-3x112) na vývoj končetin u kuřecích embryí se zaměřením na externí morfologii a skeletální abnormality. Dále byla provedena detekce proteinu FGF1 v embryonální tkáni s využitím tří různých protilátek: FGF-1 (B-3), FGF1 (C-19) a FGF1 (FITC) na histologických řezech končetiny po aplikaci proteinu FGF1. Získané výsledky lze shrnout do několika následujících bodů:

- Samotný FGF1-WT je považován za velmi nestabilní. Tomuto tvrzení odpovídají i výsledky, kdy při použití nejvyšší koncentrace proteinu vykazovalo pouze 17,24 %

embryí změnu fenotypu. Dokonce ani použití heparinu pro stabilizaci FGF1-WT neprokázalo výraznější defekty, pouze vyšší úmrtnost s vyšší dávkou heparinu.

- Modifikované formy FGF1 proteinu způsobily výrazné změny fenotypu. Hlavními znaky byla zkrácená ulna a humerus, abnormálně vyvinuté klouby nebo chrupavčitý výběžek na ulně. V tomto případě se výskyt abnormalit u embryí pohyboval kolem 50–60 %.
- U všech použitých protilátek byl detekován FGF1, a to nejčastěji těsně kolem kuličky nasáklé aplikovaným proteinem nebo přímo v ní. Na kontrolních levých končetinách žádný signál pozorován nebyl. Tyto protilátky se tedy dají použít i na kuřecích embryích, nicméně jako nejvhodnější se jeví potilátka s na vázaným FITC pro detekci ve fluorescenčním mikroskopu.

8. Seznam použitých zkratk

AER – „apical ectodermal ridge“ (apikální ektodermový hřeben)

FGF – „fibroblast growth factor“ (fibroblastový růstový faktor)

SHH – „Sonic hedgehog“

BMP – „Bone morphogenetic protein“ (kostní morfogenetický protein)

WT – „wild type“ (přirozený protein)

Hox – Homeobox

HSPG – heparan sulfát

FGFR – „Fibroblast growth factor receptor“ (receptor pro fibroblastový růstový faktor)

ZPA – zóna polarizační aktivity

IM – „intermediate mesoderm“

PBS – „phosphate buffered saline“ (pufrovaný solný roztok)

DAB – diaminobenzidin

9. Použitá literatura

- Vacek, Z.** (1995). Histologie a histologická technika. ISBN 80-70130-202-7
- Gilbert, S. F., S. Singer** (2006). Developmental biology. ISBN: 978-0878932504
- Malínský, J., V. Lichnovský, V. Kamarád** (1992). Přehled embryologie člověka v obrazech. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého.
- Klika, E., Z. Vacek, M. Dvořák, K. Kepeller** (1983). Embryologie. Praha: Zdravotnické nakladatelství Avicenum
- Tickle, C.** (2006). Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nature Reviews*, **7**: 45-53.
- Capdevila, J., R. L. Johnson** (1998). Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. **197**: 205-17
- Martin, G. R.** (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* **12**: 1571-1586
- Sheeba, C. J., R. P. Andrade, D. Duprez, I. Palmeirim** (2010). Comprehensive analysis of fibroblast growth factor receptor expression patterns during chick forelimb development. **54**: 1517-26
- Coulier, F., P. Pontarotti, R. Roubin, H. Hartung, M. Goldfarb, and D. Birnbaum** (1997). Of worms and men: An evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J. Mol Evol.* **44**: 43-56
- Miller, D. L., S. Ortega, O. Bachayan, R. Basch, C. Bastilico** (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Molecular and cellular biology*, **20**: 2260-2268
- Lukáš, Z., E. Dráberová, J. Feit, B. Vojtěšek** (1997). Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice. Sborník prací lékařské fakulty v Brně.
- Hamburger, V., H. L. Hamilton** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, **195**: 231-72
- Wong, P., W. H. Burgess** (1998). FGF2-Heparin Co-crystal Complex-assisted Design of Mutants FGF1 and FGF7 with Predictable Heparin Affinities. **273**: 18617-22

10. Přílohy

10.1. Abstrakt

– výsledky projektu budou prezentovány na konferenci „17th International Congress of Developmental Biology“ v Mexiku (červen 2013)

Thermal stability regulates fibroblast growth factor signaling

Iva Vesela¹, Marcela Buchtova², Renata Zajickova², Malgorzata Zakrzewska³, Antoni Wiedlocha³ and Pavel Krejci¹

¹ Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

² Department of Anatomy, Histology and Embryology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

³ Centre for Cancer Biomedicine, University of Oslo, Norway

Fibroblast growth factor (FGF) system represents one of the fundamental tools of cell communication. Eighteen FGFs act as tissue growth factors or metabolic hormones to regulate many important processes throughout development, life, and disease. We report that biological activity of FGF1, FGF4, FGF5, FGF6, FGF8, FGF9, FGF16-18, and FGF20 is severely limited *in vitro* and *in vivo*, manifested as failure to activate downstream FGF-receptor (FGFR) signaling and/or to influence specific cell behavior. This phenotype is not caused by FGFR specificity or the absence of appropriate low affinity FGF co-receptors (the heparan sulfate proteoglycans) at the cell surface. Instead, a failure to signal stems from thermal instability in at least 10 different members of FGF family. We further report that experimental stabilization via heparin binding, introduction of stabilizing mutations or lowering the cell cultivation temperature rescues the biological activity of unstable FGFs in both *in vitro* and *in vivo* conditions. Our data suggest that limited thermal stability might influence the biological activity of extracellular signaling molecules.

10.2. Tabulky injektáží

a) FGF1 WT

Označení	Datum	Způsob aplikace	Koncentrace	Stádium	Dead or alive	Datum odběru	Fixace	Typ kuličky	Externí fenotyp	Skeletální fenotyp
MB1257	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	19.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB1258	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB1259	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1300	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal (rozpadlo se v KOH)
MB 1302	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1304	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1305	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus and metacarpus little shorter
MB 1306	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	little thicker ulna
MB 1307	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing shorter	
MB 1309	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	little thicker ulna
MB 1311	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1312	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	Affi blue	R wing twisted and brachium thinner	small process on antebrachium
MB 1313	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	20.12.2011	100% EtOH	Affi blue	R wing longer	normal
MB 1332	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB 1334	9.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	19.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB 1447	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1448	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1449	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1450	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1452	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	19	dead	1.2.2012	4%pfa	Affi blue	R wing without autopodium, nice phenotype, open abdominal cavity	
MB 1453	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	dead	1.2.2012	4%pfa	Affi blue	R wing shorter autopodium, open abdominal cavity	
MB 1454	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1456	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1457	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1458	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1459	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1460	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	18	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1461	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1463	27.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	6.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal

MB 1667	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1668	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1669	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1670	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1673	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1674	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1676	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1677	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	dead	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1678	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1679	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1680	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus little shorter
MB 1681	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1682	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	dead	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1683	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	dead	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1684	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1687	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	metacarpal bone little shorter and thinner
MB 1688	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1691	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1693	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1694	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1695	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1697	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1698	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1704	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	dead	23.4.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1705	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	dead	23.4.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1707	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	dead	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1709	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1710	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1711	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1713	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	normal
MB 1715	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1716	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1717	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	24	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1719	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1721	17.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	23	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1783	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal (rozpadlo se v KOH)
MB 1785	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1788	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	21	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1789	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	dead	22.5.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1790	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal

MB 1791	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	21	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1792	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1793	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1794	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1795	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1796	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1797	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1798	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1799	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1800	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	19	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	R winf little shorter	normal

b) FGF1 WT s heparinem

Označení	Datum	Způsob aplikace	Koncentrace	Stádium	Dead or alive	Datum odběru	Fixace	Typ kuličky	Externí fenotyp	Skeletální fenotyp
MB1955	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	dead			Affi blue		
MB1956	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	dead	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1957	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1958	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	22	dead			Affi blue		
MB1959	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	22	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	
MB1960	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	20	dead			Affi blue		
MB1961	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1962	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	19	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1963	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	
MB1964	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1965	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1966	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	dead			Affi blue		
MB1967	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1968	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	

MB1969	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	20	daad	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1970	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	22	dead	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter, deformed shape	
MB1971	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1972	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.5 - H 0.5 mg/ml	20	dead			Affi blue		
MB1973	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	little shorter antebrachium	
MB1974	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	dead			Affi blue		
MB1975	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1976	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	22	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1977	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	22	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1978	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	little shorter, 1st finger missing, other fingers deformed	
MB1979	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1980	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1981	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1982	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1983	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	only little shorter	
MB1984	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1985	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1986	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1987	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	dead			Affi blue		
MB1988	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1989	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	dead			Affi blue		
MB1990	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1991	2.10.2012	implantace do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2139	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	little shorter	
MB2140	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	

MB2141	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2142	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2143	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2144	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2145	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	19	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2146	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23				Affi blue		
MB2147	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2148	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2149	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2150	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20				Affi blue		
MB2151	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2152	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2153	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2154	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2155	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2156	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2157	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22	dead	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2158	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2159	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22				Affi blue		
MB2160	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22				Affi blue		
MB2161	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2162	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2163	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2164	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2165	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23				Affi blue		

MB1989	2.10.2012	implanatce do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	dead			Affi blue		
MB1990	2.10.2012	implanatce do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	21	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB1991	2.10.2012	implanatce do křídla	F 0.125 - H 0.5 mg/ml	20	alive	13.10.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2139	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	little shorter	
MB2140	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2141	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2142	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2143	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2144	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2145	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	19	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2146	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23				Affi blue		
MB2147	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2148	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2149	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2150	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20				Affi blue		
MB2151	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2152	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	20	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2153	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2154	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2155	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	22				Affi blue		
MB2156	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 0.5 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2157	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22	dead	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2158	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2159	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22				Affi blue		
MB2160	31.10.2012	implanatce do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22				Affi blue		

MB2166	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	24	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2167	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22				Affi blue		
MB2168	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23				Affi blue		
MB2169	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	22	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2170	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2171	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter, small process on the antebrachium	
MB2172	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	little shorter	
MB2173	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2174	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23				Affi blue		
MB2175	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2176	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	20	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2177	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2178	31.10.2012	implantace do křídla	F 0.25 - H 25 mg/ml	23	alive	11.11.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2445	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21	dead	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2446	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	19	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2447	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2448	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	23				Affi blue		
MB2449	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2450	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20				Affi blue		
MB2451	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2452	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2453	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20				Affi blue		
MB2454	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2455	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2456	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2457	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21				Affi blue		
MB2458	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2459	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	21	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2460	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2461	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	

MB2462	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20				Affi blue		
MB2463	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2464	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20				Affi blue		
MB2465	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2466	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2467	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB2468	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20				Affi blue		
MB2469	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	19				Affi blue		
MB2470	12.12.2012	implantace do křídla	25 mg/ml	20	alive	22.12.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	

c) FGF1 3x

Označení	Datum	Způsob aplikace	Koncentrace	Stádium	Dead or alive	Datum odběru	Fixace	Typ kuličky	Externí fenotyp	Skeletální fenotyp
MB1223	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	20.12.2011	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB1224	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	20.12.2011	100% EtOH	Affi blue	R wing smaller	humerus shorter and thicker, process on humerus
MB1225	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	22	alive	20.12.2011	100% EtOH	Affi blue	R wing longer and smaller autopodium	humerus shorter and thicker (rozpadlo se v KOH)
MB1228	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing smaller autopodium	
MB1230	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	21	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing smaller autopodium	
MB1235	8.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing smaller	
MB 1496	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing smaller	humerus shorter and thicker
MB 1497	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1498	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter
MB 1499	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter
MB 1500	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus little shorter
MB 1501	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1502	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	nice fenotyp, R wing shorter	humerus rudimental, radius bended, ulna thicker
MB 1503	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1506	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	fenotyp, R wing shorter	shorter humerus, gibbous radius
MB 1507	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	fenotyp, R wing shorter	shorter humerus, gibbous radius
MB 1508	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus shorter, process on humerus
MB 1509	8.2.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	17.2.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus shorter and thicker
MB 1595	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing thinner, anoftalmie	radius and ulna little shorter, metacarpus and digiti little shorter

MB 1596	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus little shorter
MB 1597	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	dead	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker with deformed shape, ulna little thicker
MB 1598	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter, thicker	gibbous radius, thick and short ulna, very short and thick humerus, digitus alularis with small process
MB 1599	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	4% pfa	Affi blue	R wing shorter, thicker	
MB 1600	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	thick and short humerus with deformed shape, little thicker ulna
MB 1604	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus short and thick with deformed shape, little shorter and thicker ulna, first joint crooked
MB 1605	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	shorter and thicker humerus with deformed shape, gibbous radius with wrong connection to joint, ulna shorter and thicker-deformed
MB 1606	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	shorter and thicker humerus with deformed shape, gibbous radius, ulna shorter and thicker, on digitus major deformed first finger
MB 1611	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter, process on antebrachium	humerus shorter and thicker with deformed shape, little shorter and thicker ulna, ectopic cartilage close antebrachium
MB 1612	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter, open abdominal cavity	shorter humerus, gibbous radius, ulna shorter and thicker with wrong connection to first joint
MB 1613	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter bended on other side, open abdominal and chest cavity	humerus very small, just crista pectoralis, radius with wrong connection to second joint
MB 1614	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter and thicker	humerus very small with deformed shape, small process from ulna
MB 1615	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	short and thick humerus with deformed shape, gibbous radius, thick and short ulna, small process from digitus alularis
MB 1616	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	little shorter humerus and ulna
MB 1617	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	dead	12.3.2012	4%pfa	Affi blue	R wing different shape of autopodium	
MB 1618	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	shorter and thicker humerus with deformed shape, both joints deformed, radius with wrong connection to the second one, little thicker ulna
MB 1619	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	shorter and thicker humerus with deformed shape
MB 1620	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter, smaller and thinner	shorter and thicker humerus with deformed shape, little thicker ulna
MB 1621	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	dead	12.3.2012	4%pfa	Affi blue	autopodium a bit thinner	
MB 1624	9.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	18.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter ulna, shorter humerus

MB 1732	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	humerus little shorter and thicker, ulna little thicker
MB 1735	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter (1/2)	humerus shorter and thicker, gibbous radius, ulna shorter and thicker
MB 1736	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter (1/2)	humerus shorter and thicker, gibbous radius, ulna shorter and thicker
MB 1738	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus, ulna little shorter and thicker
MB 1739	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1740	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	thicker and shorter humerus, small process on antebrachium
MB 1741	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	little shorter humerus
MB 1744	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter (1/2)	humerus shorter and thicker, gibbous radius, ulna shorter and thicker
MB 1746	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker
MB 1747	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little thinner	gibbous radius, thick and short ulna
MB 1748	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	wing normal, open abdominal cavity	normal
MB 1749	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter (1/2)	humerus shorter and thicker, gibbous radius, ulna shorter and thicker
MB 1751	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1752	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1754	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1755	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1757	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	shorter humerus
MB 1758	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1759	18.4.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	30.4.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	gibbous radius, thick and short ulna
MB 1766	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker
MB 1767	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	small process on the antebrachium	humerus rudimental
MB 1768	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	small process on the antebrachium	humerus shorter and thicker
MB 1769	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal (rozpadlo se v KOH)
MB 1770	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	21	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker
MB 1773	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	21	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1774	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1775	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	21	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus shorter and thicker, gibbous radius, ulna shorter and thicker
MB 1776	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker
MB 1777	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	dead	22.5.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1778	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	dead	22.5.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1779	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus rudimental
MB 1780	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	small process on the antebrachium, R wing smaller and shorter	humerus rudimental

MB 1781	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1782	18.5.2012	implantace do křídla	0,25 mg/ml	20	alive	28.5.2012	100% EtOH	Affi blue	small precess on the antebachium, R wing a bit shorter	humerus shorter and thicker

d) FGF1 3x112

Označení	Datum	Způsob aplikace	Koncentrace	Stádium	Dead or alive	Datum odběru	Fixace	Typ kuličky	Externí fenotyp	Skeletální fenotyp
MB1169	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	normal	
MB1170a	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	24		12.12.2011	100%EtOH	Affi blue	R wing shorter and antebachium thicker	in staining
MB1170b	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	24	dead	12.12.2011	4%pfa	Affi blue	shape of autopodium deformed	
MB1172	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	23	dead	13.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing longer and smaller autopodium	
MB1173	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	22	dead	20.12.2011	100%EtOH	Affi blue	R wing shorter	radius longer, ulna thicker
MB1174	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	24	dead	13.12.2011	4%pfa	Affi blue		
MB1179	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	13.12.2011	4%pfa	Affi blue	R wing longer and smaller autopodium	
MB1182	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	22	dead	13.12.2011	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter and antebachium thicker	in staining
MB1191	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	20.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB1193	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	18	alive	20.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB1195	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	dead	12.12.2011	4%pfa	SM2	normal	
MB1196	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	20.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB1198	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	20.12.2011	100% EtOH	SM2	Lwing (treated) little shorter	normal
MB1200	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	SM2	R wing longer and smaller autopodium	
MB1201	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	12.12.2011	4%pfa	SM2	R wing shorter and smaller autopodium	
MB1202	7.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	20.12.2011	100% EtOH	SM2	normal	normal
MB 1339	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	18	alive	21.1.2012	100% EtOH	Affi blue	bump on 1. finger otherwise normal	normal
MB 1348	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	12.1.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1349	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20		13.1.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1358	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter
MB 1360	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1367	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	R wing shorter, twisted and 1. finger missing	only some bones are formed
MB 1370	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20		21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	normal	shorter antebachium, abnormal fingers
MB 1372	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	normální	normal (rozpadlo se v KOH)

MB 1376	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	R wing shorter and thinner	humerus almost missing, thicker and shorter
MB 1378	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	19	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	R wing thinner and very small autopodium	
MB 1380	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	alive	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus shorter
MB 1381	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	R wing thinner and longer, smaller autopodium	
MB 1382	11.12.2011	implantace do křídla	1 mg/ml	20	dead	21.1.2012	100%EtOH	Affi blue	R wing thicker antebrium and small bumb on distal antebrium	radius thicker, humerus thicker and shorter
MB 1411	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	21	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	R wing a bit longer and thinner	
MB 1413	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	22	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	R wing little longer and thinner	
MB 1415	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	24	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	smaller autopodium and R wing thinner	
MB 1416	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	23	alive	21.1.2012	100% EtOH	Affi blue	wings smaller and open abdomen	humerus shorter
MB 1418	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	24	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	weak autopodium	
MB 1421	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	25	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	R wing little longer and autopodium smaller	
MB 1425	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	25	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1426	12.1.2012	implantace do křídla	1 mg/ml	25	dead	16.1.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1543	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	3.2.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker, ulna thicker, shorter autopodium
MB 1544	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker, ulna thicker, shorter autopodium
MB 1545	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1546	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus little thicker
MB 1547	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker
MB 1549	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	9.3.2012	4%pfa	Affi blue	R autopodium a bit smaller, abdominal and chest cavity open	
MB 1550	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	5.3.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1377	12.12.2011	implantace do křídla	2 mg/ml	20	alive	22.1.2012	101%EtOH	Affi blue	R wing shorter and thinner	humerus almost missing, thicker and shorter
MB 1379	12.12.2011	implantace do křídla	2 mg/ml	20	dead	17.1.2012	5%pfa	Affi blue	R wing thinner and very small autopodium	
MB 1381	12.12.2011	implantace do křídla	2 mg/ml	21	alive	22.1.2012	101%EtOH	Affi blue	R wing shorter	humerus shorter
MB 1382	12.12.2011	implantace do křídla	2 mg/ml	21	dead	17.1.2012	5%pfa	Affi blue	R wing thinner and longer, smaller autopodium	
MB 1383	12.12.2011	implantace do křídla	2 mg/ml	21	dead	22.1.2012	101%EtOH	Affi blue	R wing thicker antebrium and small bumb on distal antebrium	radius thicker, humerus thicker and shorter

MB 1558	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	dead	10.3.2012	100% EtOH	Affi blue	small process on forearm, else normal	in staining
MB 1559	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	18	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	abdominal and chest cavity open	normal
MB 1560	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1561	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	smaller wing	gibbous radius, shorter and thicker ulna, both joints are crooked
MB 1562	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1564	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing smaller and thicker, spiry process from antebrachium	shorter fingers, humerus thicker (kus chybi, chyba při odberu)
MB 1565	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1566	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorted and thicker
MB 1567	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1568	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	fenotyp, shorter thicker wing	ulna shorter and thicker, first joint deformed, gibbous radius with wrong connection to the second joint, digitus alularis with extra phalanges, humerus shorter
MB 1569	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1570	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	ulna little shorter, radius little longer, articulatio deformed, digitus allularis deformed
MB 1571	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	18	dead	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	
MB 1572	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter	gibbous radius, shorter and thicker ulna, both joints are crooked, phalanges shorter, humerus shorter and thicker with deformed shape
MB 1573	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	8.3.2012	4%pfa	Affi blue	open abdominal cavity	
MB 1574	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	18	dead	8.3.2012	4%pfa	Affi blue	open abdominal cavity, limbs normal	
MB 1575	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	thinner wing, strangulated enamel	humerus shorter and thicker, ulna little deformed in articulatio
MB 1577	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus shorter and thicker with deformed shape, ulna little thicker
MB 1578	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	wings normal, open abdominal and chest cavity	humerus shorter, there is a small bony process sticky out from ulna on the first joint, crooked joints
MB 1579a	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	smaller wing, open abdominal and chest cavity	normal
MB 1579b	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	12.3.2012	4%pfa	Affi blue	normal	
MB 1580	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	little shorter humerus
MB 1581	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little shorter	normal
MB 1582	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	wings normal, open abdominal and chest cavity	little shorter ulna
MB 1583	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	21	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal, gut out	normal

MB 1584	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing shorter, small process in antebrachium	process from ulna
MB 1585	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	22	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	process from ulna, without digitus minor
MB 1586	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1587	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	normal
MB 1588	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	12.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing little thicker	humerus little shorter, ectopic cartilage close antebrachium
MB 1589	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	dead			Affi blue		
MB 1590	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	18	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	R wing thinner	normal
MB 1591	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	19	dead	4.3.2012	4%pfa	Affi blue	R wing a bit smaller autopodium	
MB 1592	2.3.2012	implantace do křídla	0,5 mg/ml	20	alive	13.3.2012	100% EtOH	Affi blue	normal	humerus little shorter, radius and ulna shorter and thicker