

# Speciální metody fyziologie živočichů

- Laboratorní  
myš jako  
modelový  
organismus



Vendula Pospíchalová

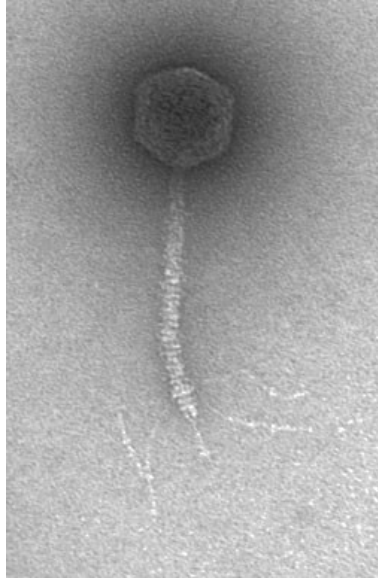
SCIENCEPHOTOLIBRARY

# Modelový organismus v experimentální biologii

- intenzívně zkoumaný organismus – cílem je poznání jeho samého, ale především popis obecnějších jevů a vztahů platících i pro jiné organismy
- Vlastnosti: - krátký životní cyklus
  - větší počet potomstva
  - ekonomická nenáročnost
  - relativní jednoduchost a nevýjimečnost ve zkoumané oblasti
  - dostatečné množství dostupných informací (znalost vývoje, sekvence genomu,...)

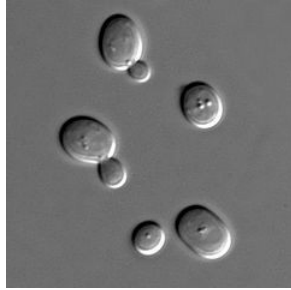


# Nejčastější modelové organismy v experimentální biologii



**Phage**

(*Bacteriophage Lambda*)



**Yeast**

(*Saccharomyces cerevisiae*)



**Zebrafish**

(*Danio rerio*)



**Rat**

(*Rattus norvegicus*)



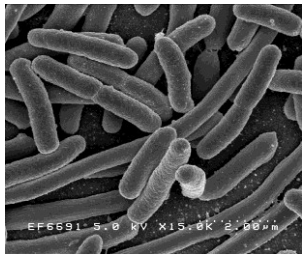
**Mouse**

(*Mus musculus*)



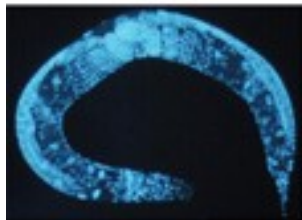
**Fruitfly**

(*Drosophila melanogaster*)



**Bacterium**

(*Escherichia coli*)



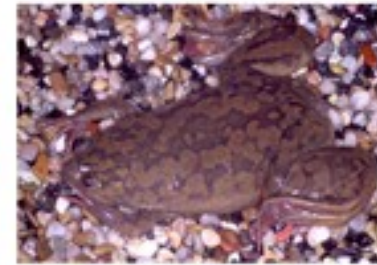
**Nematode**

(*Caenorhabditis elegans*)



**Sea Urchin**

(*Strongylocentrotus purpuratus*)



**Frog**

(*Xenopus laevis*)



**Plant**

(*Arabidopsis thaliana*)

# Etické aspekty práce se zvířaty

- **Práce se zvířaty je výsada/privilegium, rozhodně ne právo**
- 1. Musí být jasný přínos pro společnost, zdravotní či veterinární péči či získání unikátních poznatků, které jinak než za pomoci živých zvířecích modelů získat nelze
- 2. Je nutné, aby přínos získaných poznatků jednoznačně převážil případný „diskomfort“, bolest či utrpení zvířat během experimentů
- **Etický kodex:**
  - pokud to lze, mají se použít organismy z co nejnižších pater fylogenetického stromu - raději bakterie než myši, raději myši než primáti
  - důkladně zvážit počet a zdroj organismů, plánované procedury (minimalizovat bolest a znehybňující prostředky, zajistit vhodnou pooperační péči, právo na euthanasii, ...) – součástí projektů pokusů

# Zásady práce s pokusnými zvířaty „4R“

- 1959 - **The Principles of Humane Experimental Technique**  
- **W.M.S. Russell and R.L. Burch**
- **Refinement** – zjemnění = dobrá obživa, adekvátní zacházení školenými pracovníky, prostor pro život, pokusy v anestézii
- **Reduction** – zmenšení = počtu zvířat, délky pokusu, pokus se nesmí na stejném zvířeti znovu opakovat
- **Replacement** – nahrazení = pokus se provádí na zvířeti jen tehdy, neznáme-li žádnou alternativu, jinak dáme přednost alternativě (tkáňové kultuře atd.)
- **Responsibility** – dodržovat zákony, schválené protokoly a etický kodex
- Při nedodržení závažné následky nejen pro jednotlivce, ale i pro skupinu, ústav a celospolečenské vnímání využití laboratorních zvířat při biomedicínském výzkumu

# Legislativa upravující podmínky práce s modelovými organismy



- Nutno dodržovat evropské a české normy
  - 1) **zákon** České národní rady **na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992** ve znění platných úprav, vydaného ve sbírce zákonů č. 149/2004
  - 2) **vyhláška** Ministerstva zemědělství **o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat č. 207/2004 Sb.**
- § 3 a) **zvířetem se rozumí každý živý obratlovec**, kromě člověka, včetně volně žijícího zvířecího jedince a jeho samostatné života schopné formy, **nikoliv však plod nebo embryo**
- § 17 (3) **Manipulovat s pokusným zvířetem** a provádět zákroky vymezené projektem pokusů **mohou pouze osoby, které získaly osvědčení o odborné způsobilosti** [§ 18 odst. 5 písm. c)].

# Myš domácí (laboratorní)

## *(Mus musculus)*



### Výhody tohoto modelového organismu:

- Savelc – z tradičních modelů nejbliže k člověku
- Malá velikost – snadná manipulace a relativně levný chov
- Nejčastěji používaný model v biomedicíně
- Velká vědecká komunita – spousta zdrojů (mutantní kmeny, know how)
- Genetika – osekvenovaný genom (28 000 genů, 99% má ortology u lidí, divergence 75 milionů let), inbrední linie
- Široká paleta experimentálních přístupů – včetně možnosti homologní rekombinace v embryonálních kmenových buňkách a transgeneze
- Množství derivovaných buněčných linií pro *in vitro* kultivace

### Nevýhody

- Relativně málo – např. nepřístupné embryo, (příliš?) složitý organismus

# Schéma přednášky

## I. Myš jako laboratorní model

- Životní cyklus
- Chov
- Kmeny

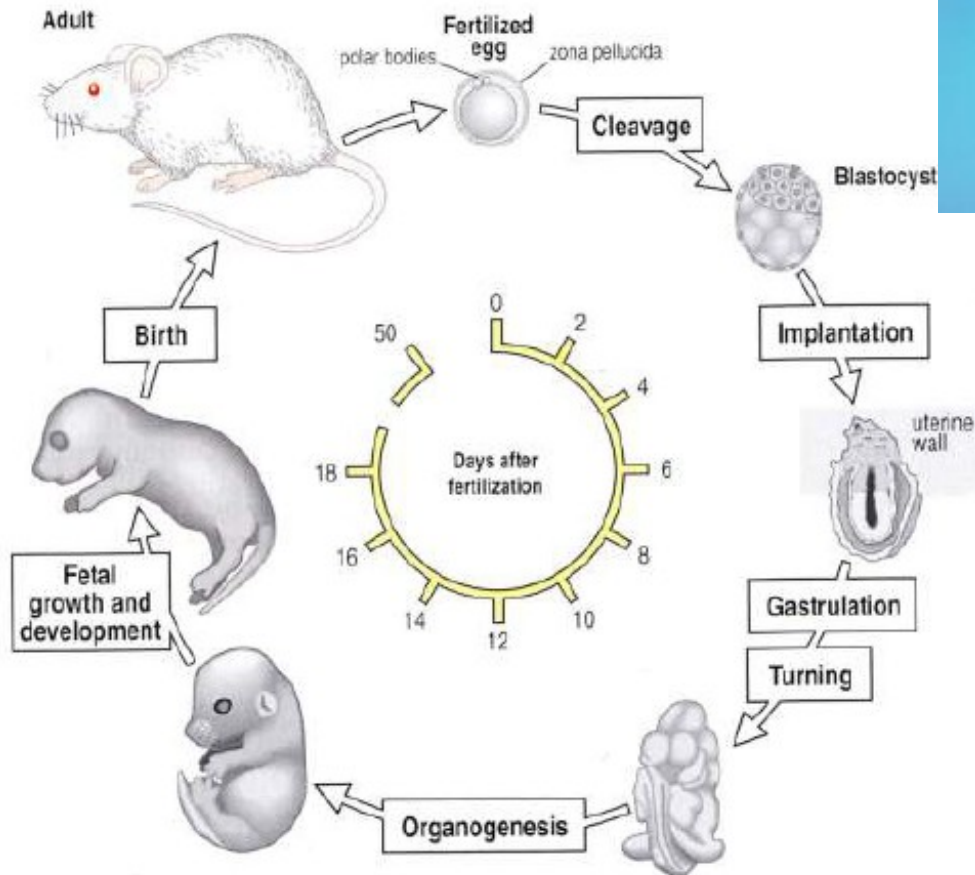


## II. „Experimental toolbox“

- Metody manipulace genomu
- Databáze a zdroje myší



# I. Myš jako laboratorní model



## Životní cyklus myši

- Gestace – 19-21 dní
- Odstav – 3-4 týdny
- Pohlavní dospělost – 6-7 týdnů
- Generační doba – 2-3 měsíce
- Estrus – polyestrální, 4-5 dní
- Počet mláďat ve vrhu 4-10
- Délka života – až 2 roky

# Manipulace s laboratorní myší

- Přenáší se uchopena za ocas
- Pro fixaci myš uchopíme palcem a ukazovákem pevně za kůži za krkem a ocas fixujeme malíkem
- Pro intraperitoneální injekci (i.p.) obrátíme zafixovanou myš bříškem vzhůru, hlavou dolů (pokles vnitřností) a druhou rukou aplikujeme injekci



# Manipulace s laboratorní myší



Video – tradiční zacházení s myší



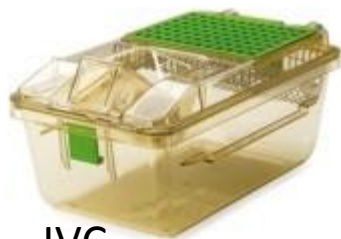
Video – zacházení s myší pomocí jen jedné ruky

# Chov laboratorních myší

- Relativně nenáročný – v klíčkách –  
podestýlka, voda, granule, (buničina)
- Teplota 22 ± 2 C
- Max. 6 myšek v jedné klíčce
- IVC – individually ventilated cages – brání  
rozšíření případné infekce



Otevřená klíčka



IVC



# Chovy laboratorních myší I

- **Otevřený (konvenční)** – vstup i výstup zvířat, osob i materiálu je bez bariéry, jen se zvýšenými hygienickými opatřeními
  - možno vylepšit IVC stojany a „flowboxy“ na přestýlání myší
- **Bariérový** – prostor pro zvířata je oddělen od vnějšího prostředí a vstup zvířat, osob i materiálu je možný jen přes bariéru (sterilizace vody, potravy, podestýlky zvýšená osobní hygiena )
  - **SPF – specified pathogen free** – pravidelné testy (~ 3 měsíce) na dané patogeny (> 40), uvedeny v certifikátu ke zvířatům
    - FELASA – Federation of Laboratory Animal Science Associations

## Excluded Agents

### Viral

MHV (Mouse Hepatitis Virus, Coronavirus)	Sendai virus
MVM (Minute Virus of Mice)	MPV (Mouse Parvovirus)
GDVII (Mouse Encephalomyelitis Virus)	Reovirus-3
EDIM (Enteric Disease of Infant Mice)	K virus
PVM (Pneumonia Virus of Mice)	Ectromelia virus
LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus)	Polyoma virus
MCMV (Mouse Cytomegalovirus)	Mouse Adenovirus
Hantaan virus	MTV (Mouse Thymic Virus)

### Bacterial

*Mycoplasma pulmonis*  
CAR bacillus (Cilia Associated Respiratory Bacillus)  
*Citrobacter rodentium*  
*Salmonella* spp.  
*Clostridium piliforme*

### Parasitic

Endoparasites  
Pinworms (*Syphacia* sp., *Aspiculuris tetraptera*)  
Tapeworms (*Hymenolepis* sp.)

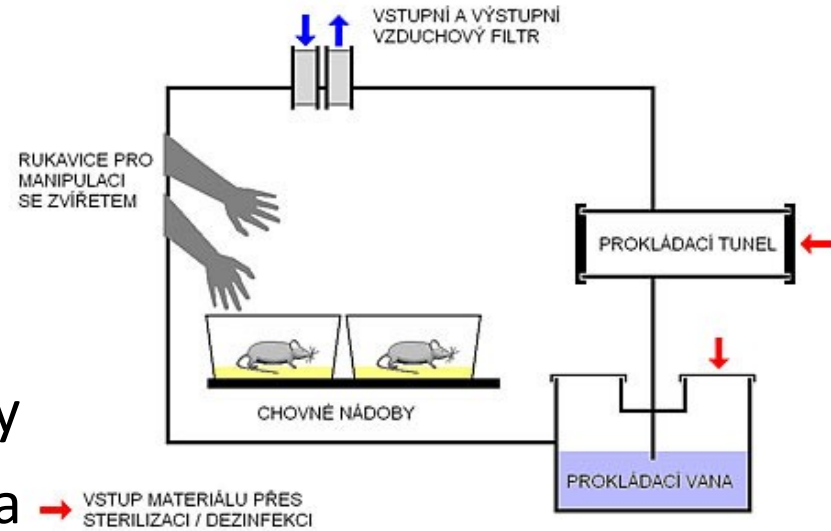
Protozoa (*Giardia muris*, *Encephalitozoon cuniculi*)

### Ectoparasites

Mites (*Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus*, *Radfordia affinis*, *Psoregates simplex*)

# Chovy laboratorních myší II

- **Izolátorový** – prostor pro zvířata je trvale oddělen bariérou od vnějšího prostředí a ošetřovatelů
  - imunodeficientní kmeny
  - **axenické (germ-free)** - bez mikroflóry



v trávicím traktu a na povrchu těla →

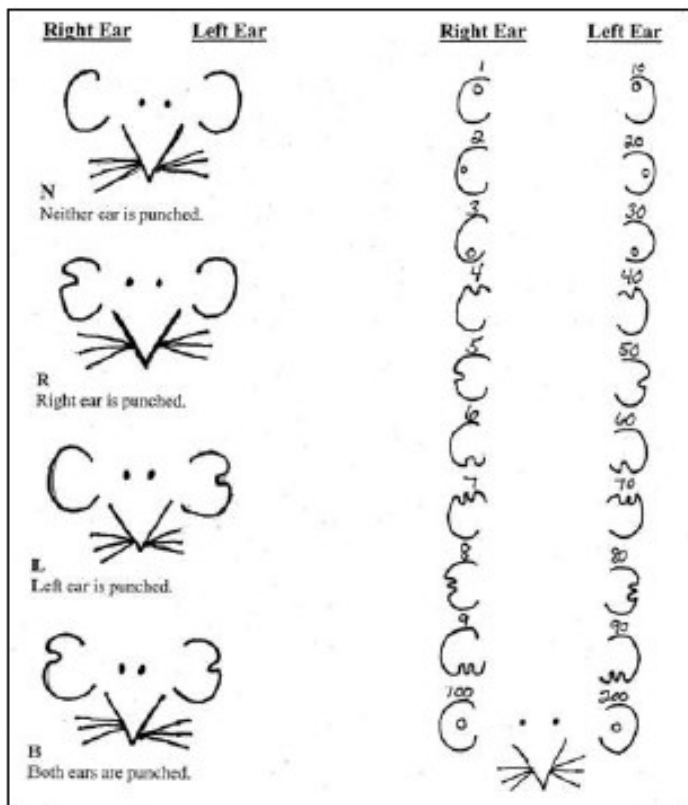
- mláďata hysterektomií do bezmikrobiálního prostředí izolátoru
- **gnotobiotické myši** (definovaná mikroflóra) - první generace – očkování mikroflóry axenickým zvířatům
- monoasociované (monoaxenické), di-, poly-asociované kmeny

**Archivace myších kmenů** – kryoprezervace – embrya a spermie

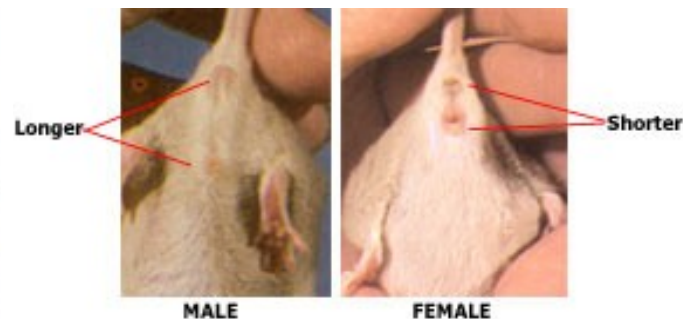
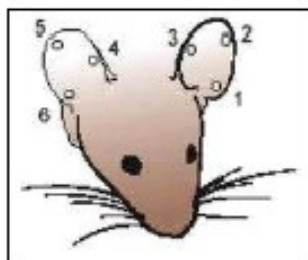
- rederivace, in vitro fertilizace (IVF) – pro „oživení“ kmene i pro „ozdravení“ (očištění od patogenů) (ustanovení SPF linie, izolátory)

# Značení laboratorních myší

- Jedinečné označení nutno u myší s různým genotypem v jedné kleci
- Během odstavu od matky – rozdělení dle pohlaví a ustřížení špičky ocásku na genotypování



- 1) Ušní známky
- 2) Značení uší nebo prstíků
- 3) Mikročipy



# Software pro práci s laboratorními zvířaty

Show Log

Logged in as:  
Korinek Vladimír

PyRAT Python Based Relational  
Animal Tracking

scionics

Animals Cages Reports Requests Administration Help Logout/Alias

Animals Stud males Pups

Apply Filter Remove Filter Print QS

Results: 795 animals found in 278 cages. Now showing 1 through 100

Current Filter: All mutations, Area 2 basement, Show Deceased/Exported: No, Show Plugged: Yes, Owner=korinek  
Current Ordering: ID (asc.)

View Page: 1 2 3 4 5 (3 more)

1 Go

<input type="checkbox"/>	WR ID	Parents	Cage	Location	C	Sex	Gen	Strain	Mutations	Add	DOB	Age (W)	Project
<input type="checkbox"/>	13F-03448	f. 64U-10051	S20M-03700	2F9R3		m	N/A	Myd88	Myd88 -/-	■	05/04/2012	39	None
<input type="checkbox"/>	18X-20374	f. 64U-10976 f. 64U-11146	S20M-04547	2F9R6		m	N/A	Villin1-cre	cre Tg		08/08/2012	21	None
<input type="checkbox"/>	18X-20389	f. 64U-11060 f. 64U-11441	B20M-00966	2F9R1		f	N/A	Villin1-cre	cre Tg		08/08/2012	21	None
<input type="checkbox"/>	18X-20390	f. 64U-11060 f. 64U-11441	B20M-00966	2F9R1		f	N/A	Villin1-cre	cre Tg		08/08/2012	21	None
<input type="checkbox"/>	20M-08052	m: 20M-04035 f. 20M-01574	S20M-04413	2F9R5	387	m	N/A	Hic1/loxP- villin cre ERT					
<input type="checkbox"/>	20M-08194	m: 20M-04159 f. 20M-01911 f. 20M-01912	S20M-02750	2F9R3		m	N/A	Hic1/delEx2-LGR5 Cre					
<input type="checkbox"/>	20M-08796	f. 64U-08309	B20M-00869	2F9R1	392	f	N/A	Hic1/loxP - ROSA-CreERT2					
<input type="checkbox"/>	20M-09446	m: 20M-08194 f. 20M-08576	S20M-04035	2F9R4	370	m	N/A	Hic1/delEx2-LGR5 Cre					
<input type="checkbox"/>	20M-09447	m: 20M-08194 f. 20M-08576	B20M-00866	2F9R1		f	N/A	Hic1/delEx2-LGR5 Cre					
<input type="checkbox"/>	20M-09459	m: 20M-08773 f. 20M-08774	S20M-04529	2F6R3	370	m	N/A	ZP3-cre					
<input type="checkbox"/>	20M-09506	m: 20M-08787 f. 20M-08790	S20M-03966	2F9R4	353	m	N/A	Hic1/loxP - ROSA-CreERT2					

## Animal Detail

Back Mark in Log Pedigree Print Add to Request

ID: 20M-08052 Project: ITT old age  
Owner: Korinek Vladimír License: None  
Contact: Vladimír.Korinek@img.eas.cz Condition: Normal

Species: mouse Weight: None  
Genetic Background: None  
Strain: Hic1loxP- villin cre ERT

Generation	N/A
Cage	S20M-04413
Date of Birth	25/05/2011
Date Sacrificed	None

Breeding Performance

Mutations	Name	Grade
■	loxP	+/-
■	Cre	+/-

History Comments Add Comment Add Procedure Weight

Event Type	Date	Description	Source Cage	Dest Cage
Move	20/11/2012 07:48	Moved by kolacir	B20M-00960	S20M-04413
Move	01/11/2012 07:14	Moved by kolacir	S20M-03117	B20M-00960
Set Project	19/03/2012 21:09	Project changed from 'None' to 'ITT old age' by pospich		
Move	23/02/2012 07:33	Moved by kolacir	B20M-00481	S20M-03117
Move	06/02/2012 12:47	Moved by kolacir	S20M-02929	B20M-00481
Move	03/01/2012 11:21	Moved by kolacir	B20M-00630	S20M-02929
Move	30/11/2011	Moved by kolacir	S20M-02041	B20M-00630

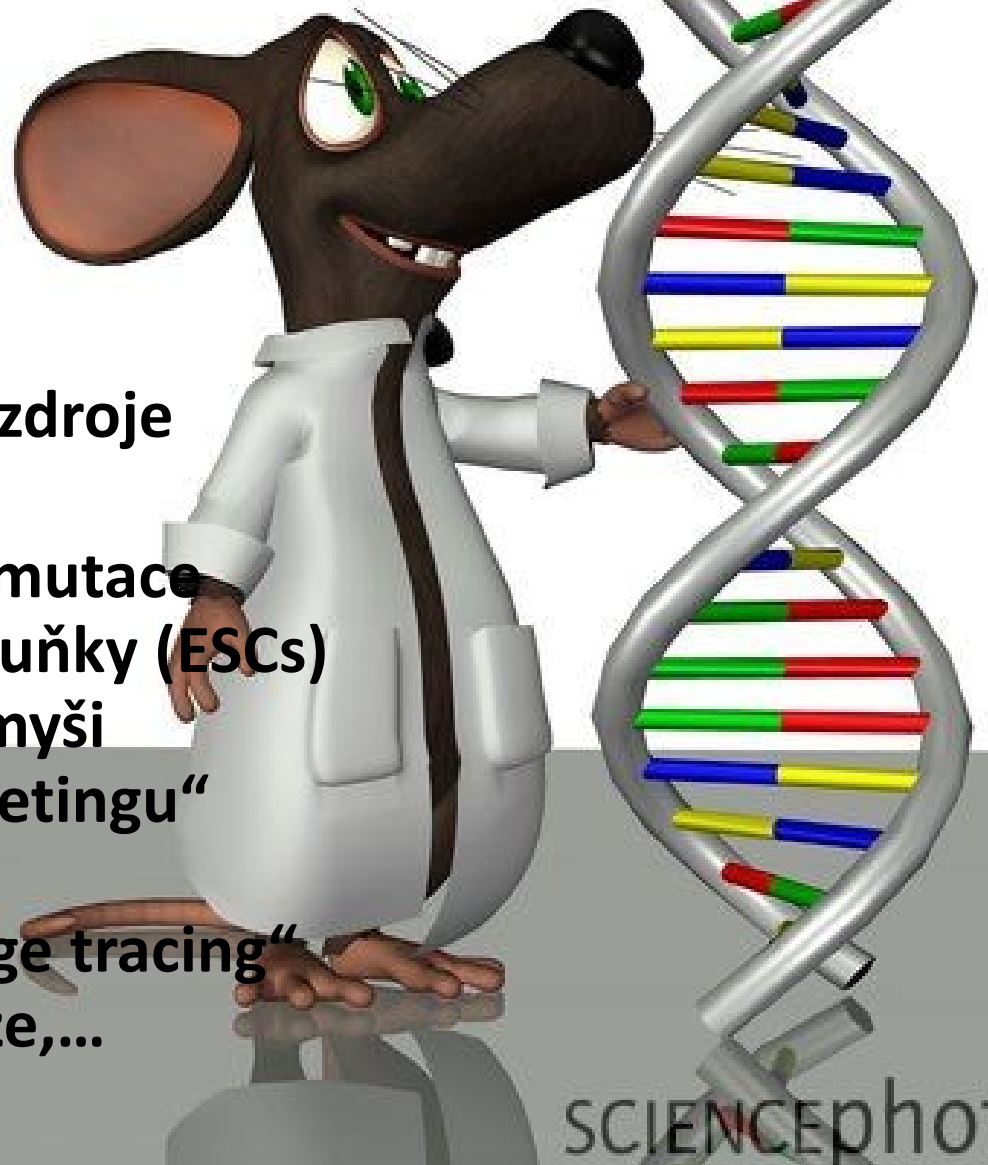
- Pro správu myší i komunikaci s ošetřujícím personálem
- Každá myš unikátní číslo (i třeba jen virtuální)
- Databáze informací o každém zvířeti – „iniciály“, rodokmen, historie, chovné záznamy, ...
- Možnost filtrování při vyhledávání
- Nevýhoda – pouze v AJ



## II. „Experimental toolbox“

### ❖ běžně užívané metody a zdroje

- přirozené a indukované mutace
- embryonální kmenové buňky (ESCs)
- „knock-out a knock-in“ myši
- nové metody „gene-targetingu“
  - ZFN, TALEN a CRISPR
- transgenní myši a „lineage tracing“
- zdroje – archivy, databáze,...



# Genetika laboratorních zvířat

## 1. Isogenní = geneticky definované kmeny

(isogenicita= genetická totožnost všech jedinců)

- **inbrední kmeny** - vznik příbuzenskou plemenitbou po více než 20 generací (bratr a sestra nebo rodič a potomek)
- **koizogenní (=mutantní) kmeny** - od původního kmene se liší jen v jednom genu, ve kterém došlo k mutaci
- **kongenní kmeny** - vznik křížením dvou kmenů a následným zpětným křížením (minimálně 10, selekce sledovaného znaku), výskyt specifických genů jednoho kmene na pozadí kmene druhého
- **konsomické kmeny** - na pozadí jednoho kmene přenesen zpětným křížením celý chromosom kmene druhého, obtížný proces

## 2. Neisogenní = geneticky nedefinované kmeny

- **outbrední linie** - geneticky heterogenní populace, vyhýbáme se příbuzenskému křížení, tak aby koeficient inbreedingu zůstal co nejnižší
- vhodné pro behaviorální pokusy

## 3. Kmeny geneticky částečně definované

# Nejčastější kmeny laboratorních myší

- **Inbrední kmen** - všichni jedinci jsou odvozeni od jediného páru a jsou homozygotní ve všech alelách = **geneticky identičtí jedinci**
  - fenotypová uniformita (nízká variabilita reaktivity v experimentu)
- Vytvořeny v 1. pol.20.stol. a udržovány (Jackson Lab,NIH,Charles River)
- C57BL/6J – „black 6“ - nejpoužívanější kmen, první osekvenovaný myší genom, permissivní pro většinu mutací, resistantní vůči nádorům, možnost indukce obezity, DM II. typu i aterosklerózy dietou
- 129 – pro „gene-targeting“ – vysoká frekvence produkce zárodečné linie, mnoho odvozených linií embryonálních kmenových buněk
- BALB/c – produkce monoklonálních protilátek pomocí hybridomů
- C3H/HeJ – používaný v mnoha odvětvích – výzkum infekčních chorob,..
- FVB/NJ - pro transgenezi – velký samčí pronukleus a velká mláďata



# Metody funkční genomiky

## Funkční genomika

- cílem je určení funkce všech genů v genomu

Dva hlavní přístupy:

### A) přímá (klasická) genetika (forward genetics)

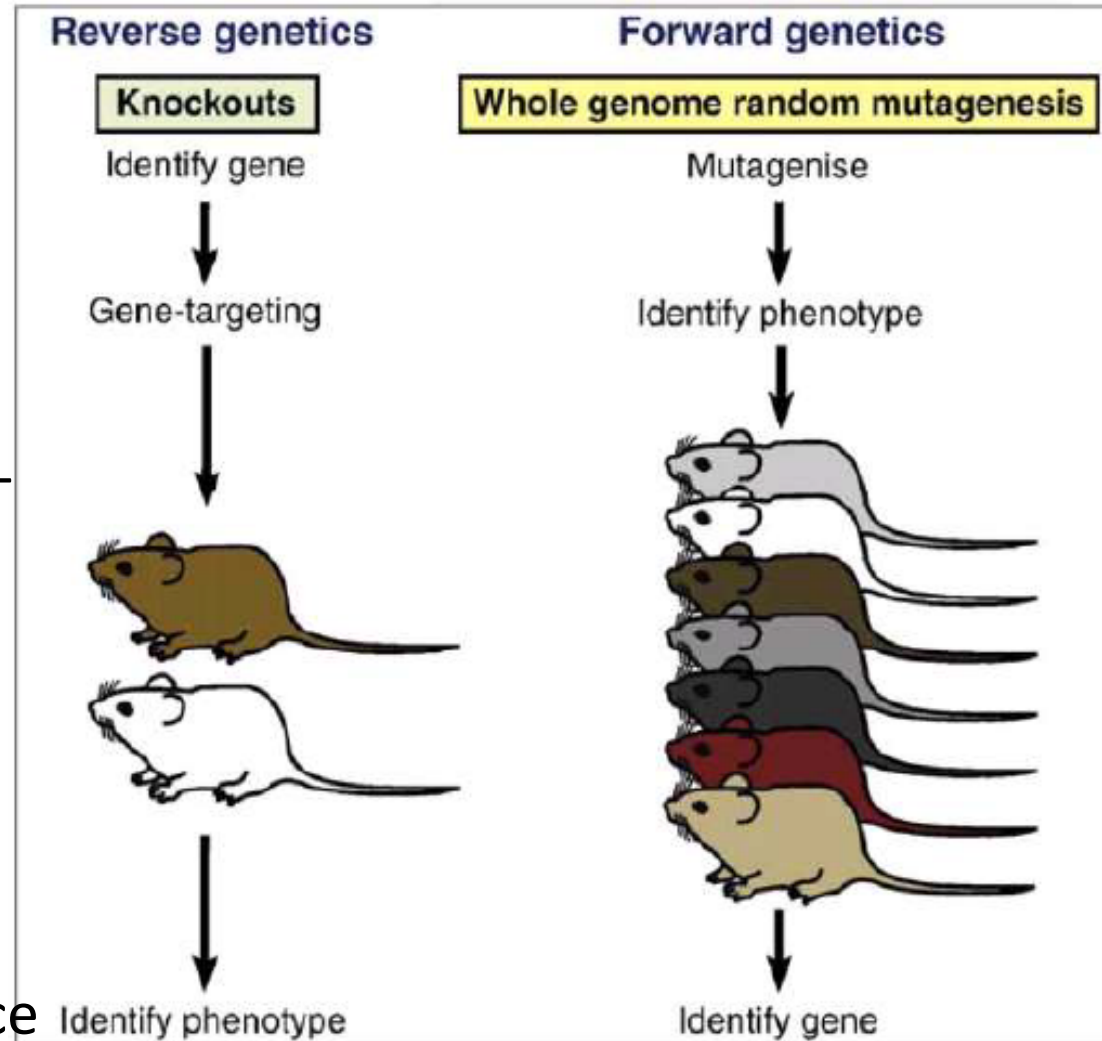
1. fenotyp (znak)
2. gen

- vychází z NÁHODNÉ mutagenese celého genomu

### B) reverzní genetika (reverse genetics)

1. sekvence DNA
2. Fenotyp

- základem jsou CÍLENÉ mutace



# Přímá genetika – přirozené a indukované mutace



## 1. Kolekce přirozeně se vyskytujících mutací

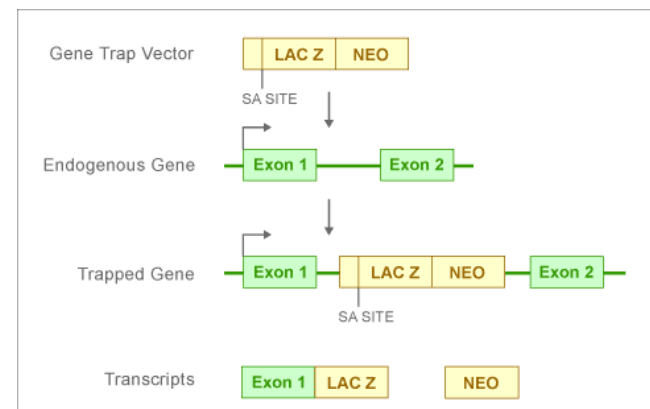
vzácný vznik, většinou ve velkých chovech  
př. Nahá („nude“,  $nu/nu$ , athymická, *Foxn1<sup>nu</sup>*) myš

- **1966:** vznik (Glasgow, UK), **1968:** myši jsou imunodeficientní (nemají thymus), **1996:** myši jsou mutantní v transkripčním faktoru *Foxn1*

## 2. Indukované mutace – a) chemická mutagenéze nejčastěji N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) př. *Apc<sup>Min</sup>* myš – model vzniku kolorektálního karcinomu, mutace v genu *Apc*

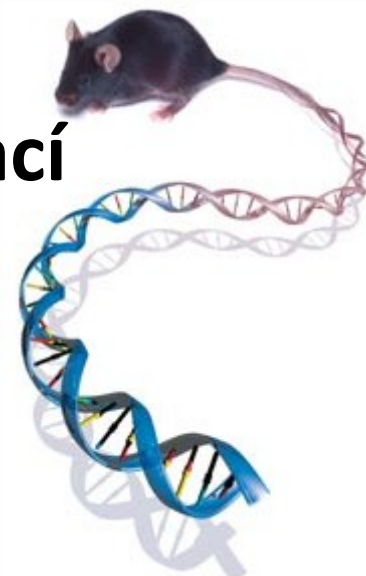


b) Genetické mutace – „gene-traps“ –  
inaktivace genu (SA-splice acceptor),  
exprese reportéru a DNA značka pro  
rychlé určení genu



# Reverzní genetika

## „Gene targeting“ – vnášení cílených mutací



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007  
Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans, Oliver Smithies

**The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007**

Nobel Prize Award Ceremony

Mario R. Capecchi

Sir Martin J. Evans

Oliver Smithies



Photo: U. Montan

Mario R. Capecchi



Photo: U. Montan

Sir Martin J. Evans



Photo: U. Montan

Oliver Smithies

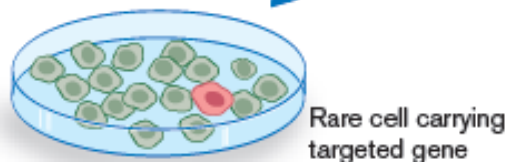
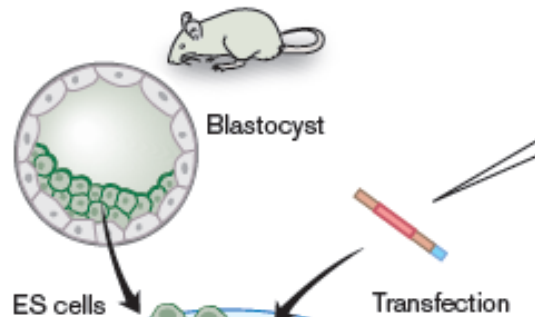
*"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells".*

# „Gene targeting“ – homologní rekombinace cílového vektoru v embryonálních kmenových buňkách

## Step 1 Gene targeting in ES cells

### 1. ES cell culture

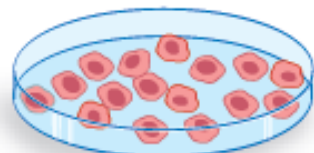
Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).



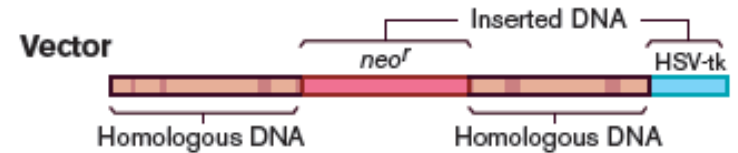
Positive-negative selection

### 4. Proliferation of targeted ES cell

Selection for presence of *neo<sup>r</sup>* and absence of HSV-tk enriches targeted ES cells.



Pure population of ES cells carrying targeted gene

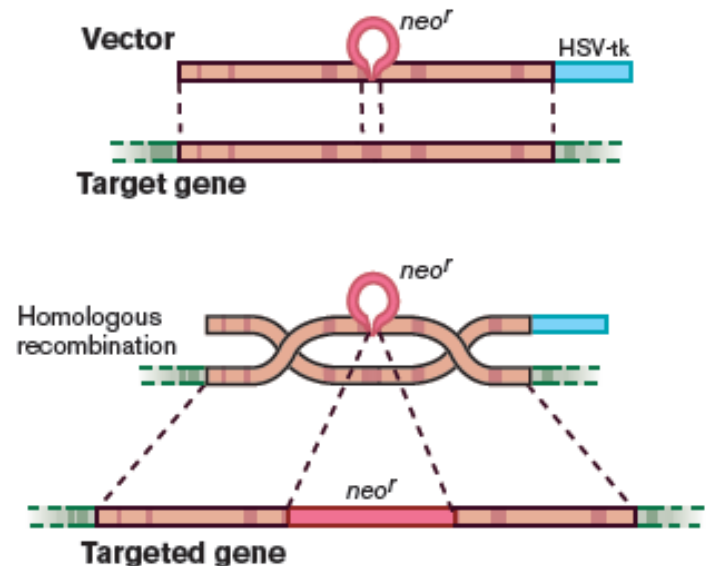


### 2. Construction of targeting vector

The vector contains pieces of DNA that are homologous to the target gene, as well as inserted DNA which changes the target gene and allows for positive-negative selection.

### 3. ES cell transfection

The cellular machinery for homologous recombination allows the targeting vector to find and recombine with the target gene.



# Jak získat z pozměněných embryonálních kmenových buněk myš

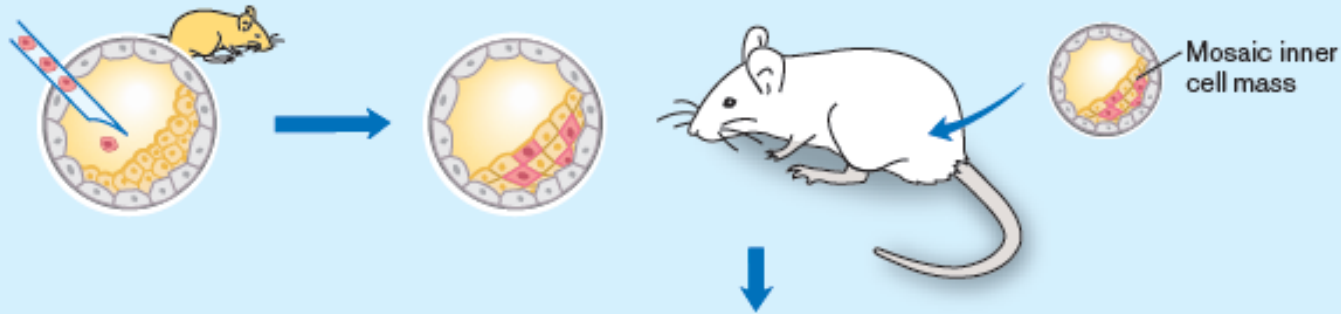
## Step 2 From gene targeted ES cells to gene targeted mice

### 5. Injection of ES cells into blastocysts

The targeted ES cells are injected into blastocysts...

...where they mix and form a mosaic with the cells of the inner cell mass from which the embryo develops.

The injected blastocysts are implanted into a surrogate mother where they develop into mosaic embryos.



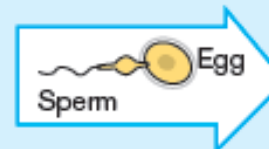
### 6. Birth and breeding of mosaic mice

The mosaic mice mate with normal mice to produce both gene targeted and normal offspring.

Born mosaic mice



Gene targeted mice – called "knockout mice" when the targeted gene is inactivated

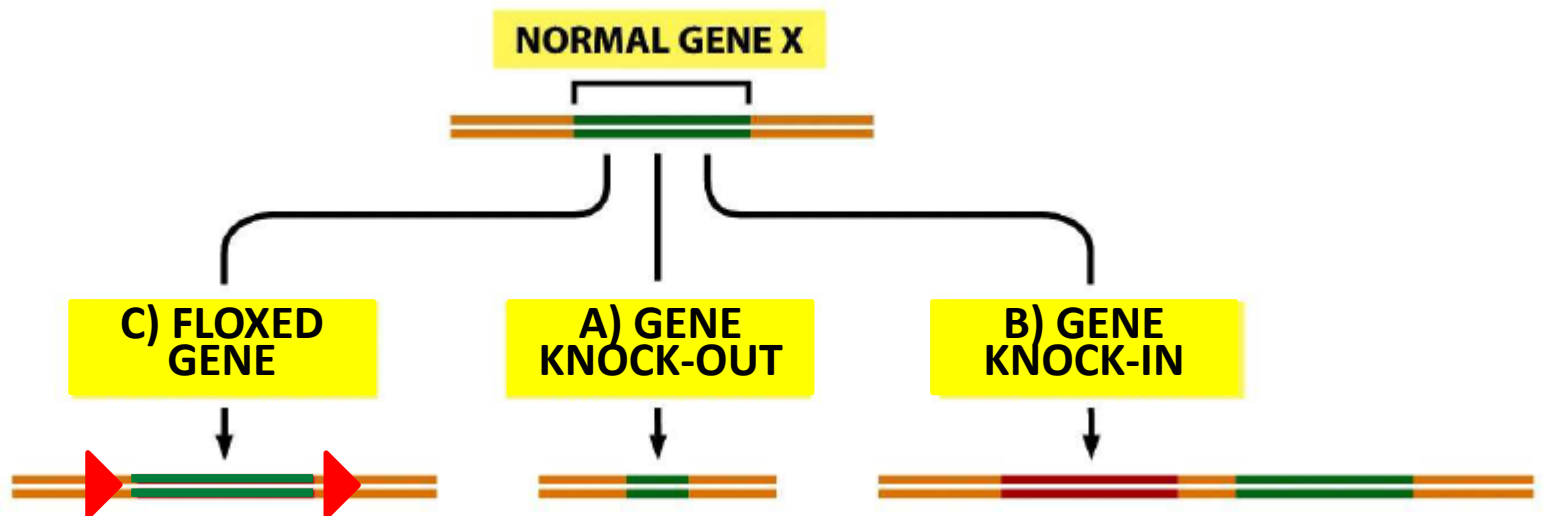


Normal mice



# Genový „knock-out, knock-in“

- A) Klasický (celkový, totální) knock-out** – gen zcela vyřazen (dříve často nahrazen selekčním markerem), může vést ke smrti jedince již v prenatálním věku, což neumožňuje studium funkce v dospělém organismu
- B) Knock-in** – do genového lokusu vložena mutace (záměna, inserce, delece,...) nebo např. reportérový gen či Cre rekombináza
- C) Podmíněný (kondicionální) knock-out** – Cre/loxP systém místně a časově specifická inaktivace genu



# Nové metody „gene targetingu“

1. Zinc finger nuclease (ZFN) technologie (© Sigma Aldrich)

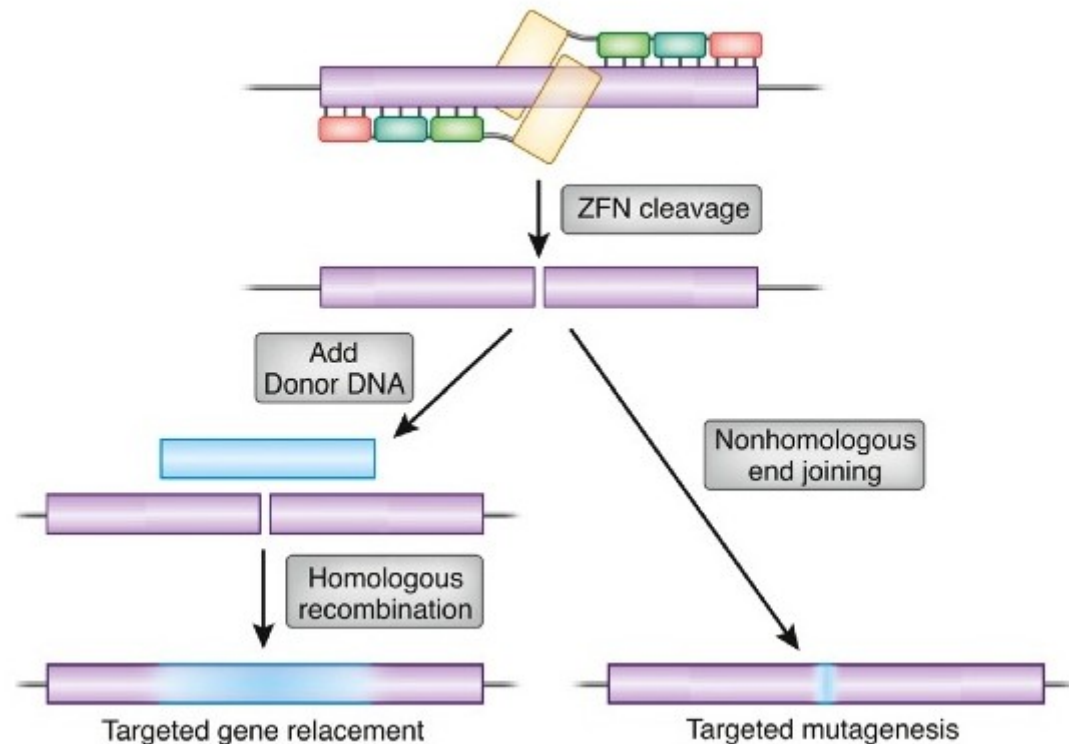
2. TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

(© Collectis)

3. CRISPR/Cas9

technologie

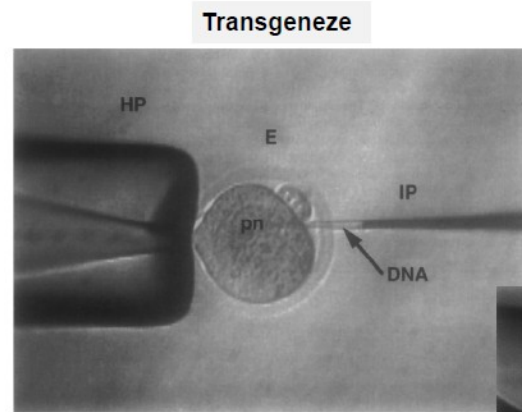
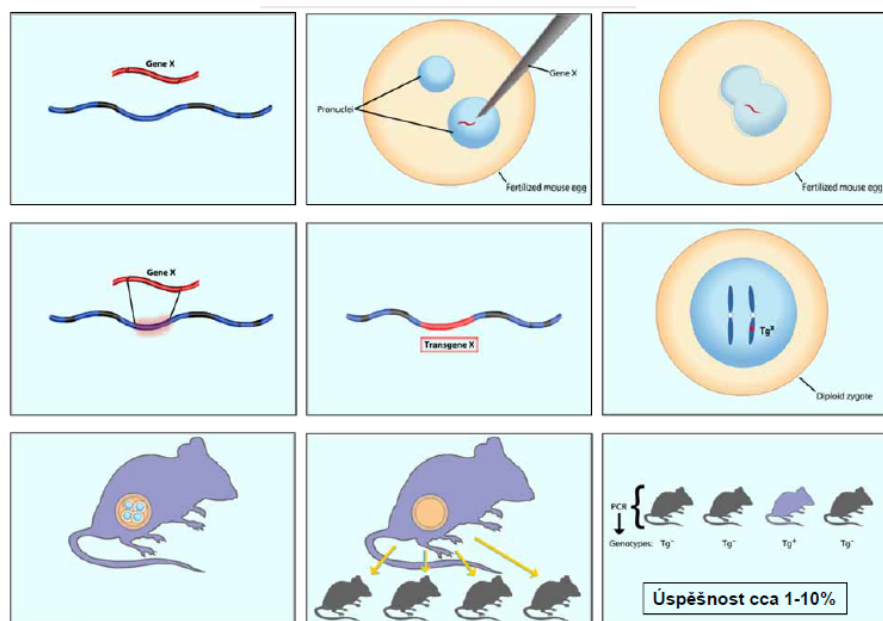
(© Sigma Aldrich)



- založeno na endogenních mechanismech opravy poškozené DNA
- funkční v mnoha buněčných liniích a organismech
- „knock-outové“ organismy připravené za měsíc či dva

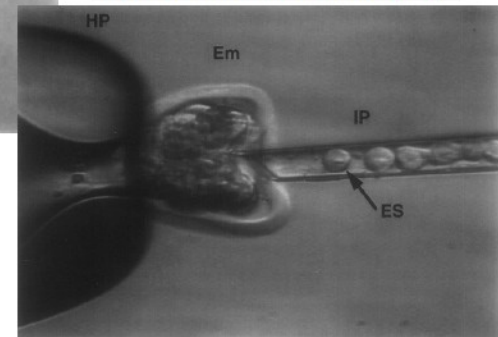
# Transgenní zvířata

- **Transgenní organismy** - jejich genom obsahuje cizorodou DNA, jejíž místo integrace je **NÁHODNÉ**
- **Příprava (pokusná myš)** - injekce „nahé“ DNA (konstrukt) do zygoty
  - náhodná integrace do genomu (často ve formě „tandem arrays“)
  - implantace do „náhradních“ (foster) matek (200-300 embryí)
  - genotypování potomstva na přítomnost transgenu (1-10%)
  - křížení „founderů“, analýza fenotypu



**Transgeneze  
vs.  
Gene targeting**

Injekce buněk do blastocysty

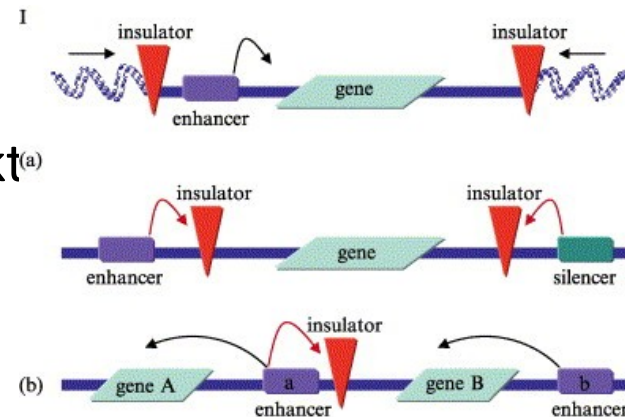


# Transgenní myši

- **Smysl pokusu** - co se stane, dojde-li k expresi genu v jiné než původní tkáni
  - nadprodukce proteinu (v původní či jiné tkáni)
  - produkce změněného proteinu
  - studium regulačních oblastí genu nebo značení buněk *in vivo* (exprese „reportérových“ proteinů – GFP,  $\beta$ -galaktozidáza)
- **Výhody** - rychlost a jednoduchost provedení
- **Nevýhody** - náhodná integrace konstruktů – narušení genů v místě integrace
  - poziční efekt regulačních oblastí genů v místě integrace na expresi transgenu (umlčování transgenu, ovlivnění exprese transgenu atd.)
  - integrace více kopií konstruktů (efekt „genové dóze“)


- **Řešení** - nutnost analýzy více „founders“

- použití DNA sekvencí eliminujících poziční efekt<sup>(a)</sup> (inzulátory, Matrix Associated Regions; MAR)
- použití velkých částí chromozomů (Bacterial Artificial Chromosome; BAC recombineering)

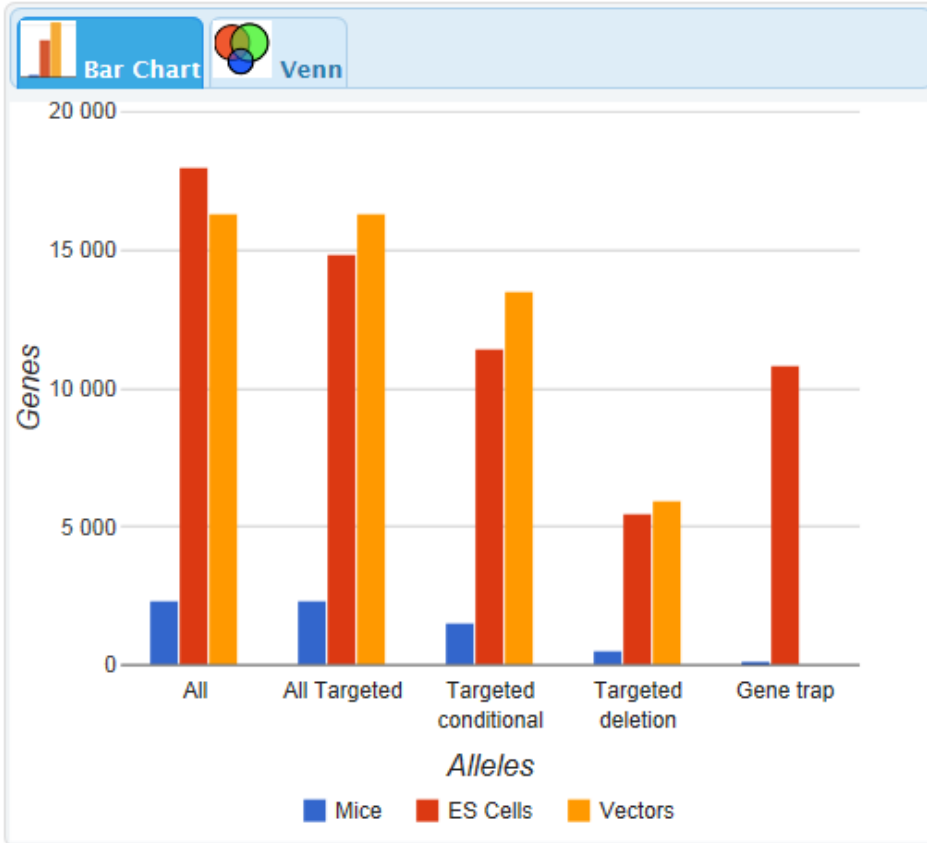


# International knock-out mouse consortium - IKMC

- Cíl IKMC – připravit (kondiciovaný) knock-out pro každý myší gen

IKMC Gene Progress Summary 

Updated 2013-05-06



## Targeted alleles

Total Genes	KOMP		EUCOMM/ EUCOMMTools	NorCOMM	mirKO
	CSD	Regeneron			
Vectors available	6596	4731	9909	839	
ES cells available	5518	4086	7862	569	221
Mutant mice available	890	465	904	4	

[View details and project goals](#) [View details about the acronyms used](#)

## Gene trap alleles

Total Genes	TIGM	EUCOMM	NorCOMM
ES cells available	9346	4352	4587
Mutant mice available	150	10	

*NOTE: Not all gene traps are in C57BL/6 ES cells. [View strain information](#)*

[See how researchers are using IKMC p](#)

Pomoci tohoto přístupu zjistit funkci každého genu

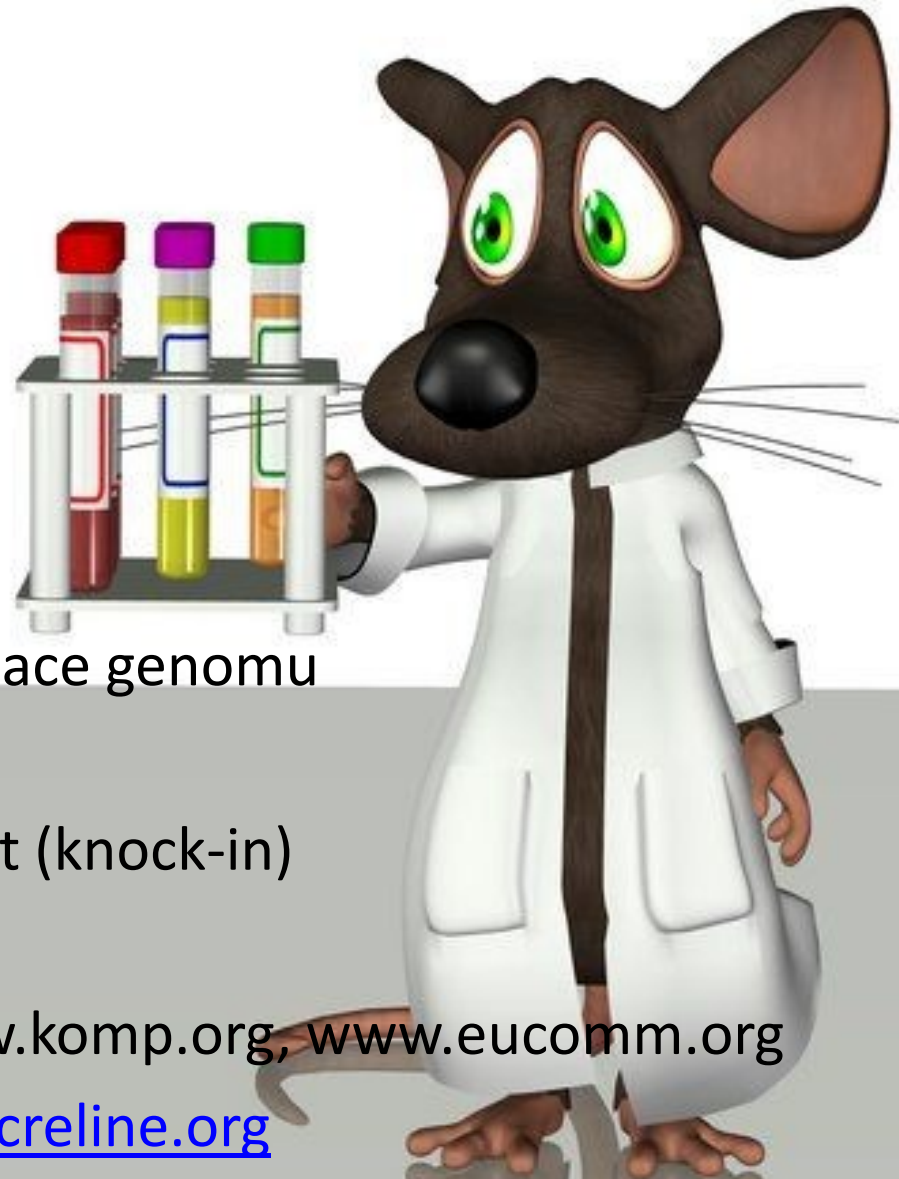
- nutno systematicky studovat fenotyp myší
- tzv. myší kliniky (jedna budována i u Prahy)
- [www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org) - IMPC



**IMPC**  
INTERNATIONAL MOUSE  
PHENOTYPING CONSORTIUM

# Shrnutí

- Myš je nejpoužívanější model pro biomedicínský výzkum
- Chov konvenční vs. bariérový chov  
IVC, SPF, izolátorový chov
- Výborný genetický model –  
inbrední kmeny, možnost manipulace genomu  
– gene targeting vs. transgeneze
- Klasický vs. kondicionální knock-out (knock-in)  
– Cre/loxP systém
- Databáze – [www.jaxmice.org](http://www.jaxmice.org), [www.komp.org](http://www.komp.org), [www.eucomm.org](http://www.eucomm.org)  
– [www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org), [www.creline.org](http://www.creline.org)
- Pokud se chcete dozvědět více o experimentech s laboratorními myšmi, přihlaste se ve čtvrtém ročníku na kurzy Bi9903 a Bi9906



**Děkuji  
za  
pozornost!**

