

Myš jako model
vývojové
biologie

Vendula Pospíchalová

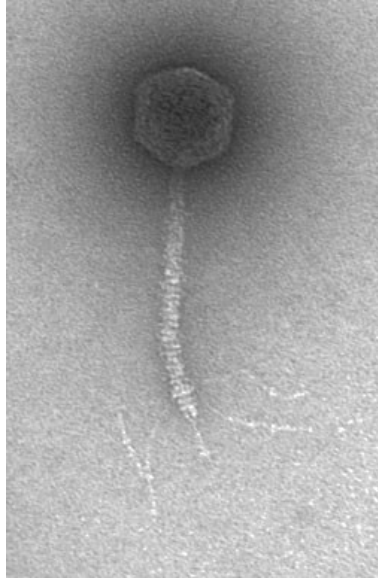
SCIENCEPHOTOLIBRARY

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,...)

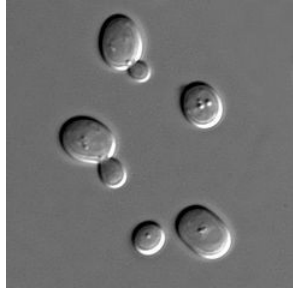


Nejčastější modelové organismy v experimentální biologii



Phage

(*Bactiophage Lambda*)



Yeast

(*Saccharomyces cerevisiae*)



Zebrafish

(*Danio rerio*)



Rat

(*Rattus norvegicus*)



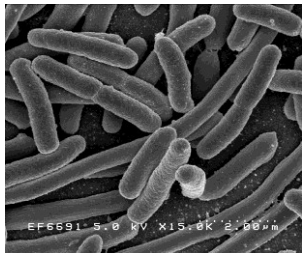
Mouse

(*Mus musculus*)



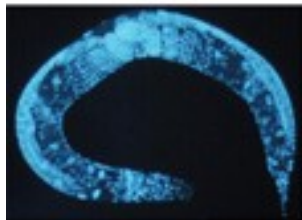
Fruitfly

(*Drosophila melanogaster*)



Bacterium

(*Escherichia coli*)



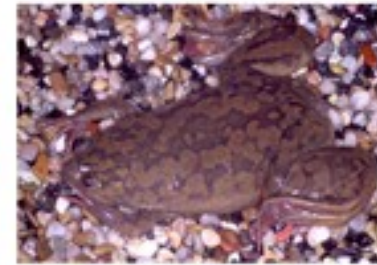
Nematode

(*Caenorhabditis elegans*)



Sea Urchin

(*Strongylocentrotus purpuratus*)



Frog

(*Xenopus laevis*)



Plant

(*Arabidopsis thaliana*)

Zásady práce s pokusnými zvířaty „3R“

- 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.)
- pokud to lze, mají se použít organismy z co nejnižších pater fylogenetického stromu
- raději bakterie než myši, raději myši než primáti

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)].**

Schéma přednášky

I. Myš jako laboratorní model

- Životní cyklus
- Chov
- Kmeny



II. „Experimental toolbox“

- Metody manipulace genomu
- Beta-katenin jako modelový gen
- Databáze a zdroje myší

Myš domácí (laboratorní)

(Mus musculus)



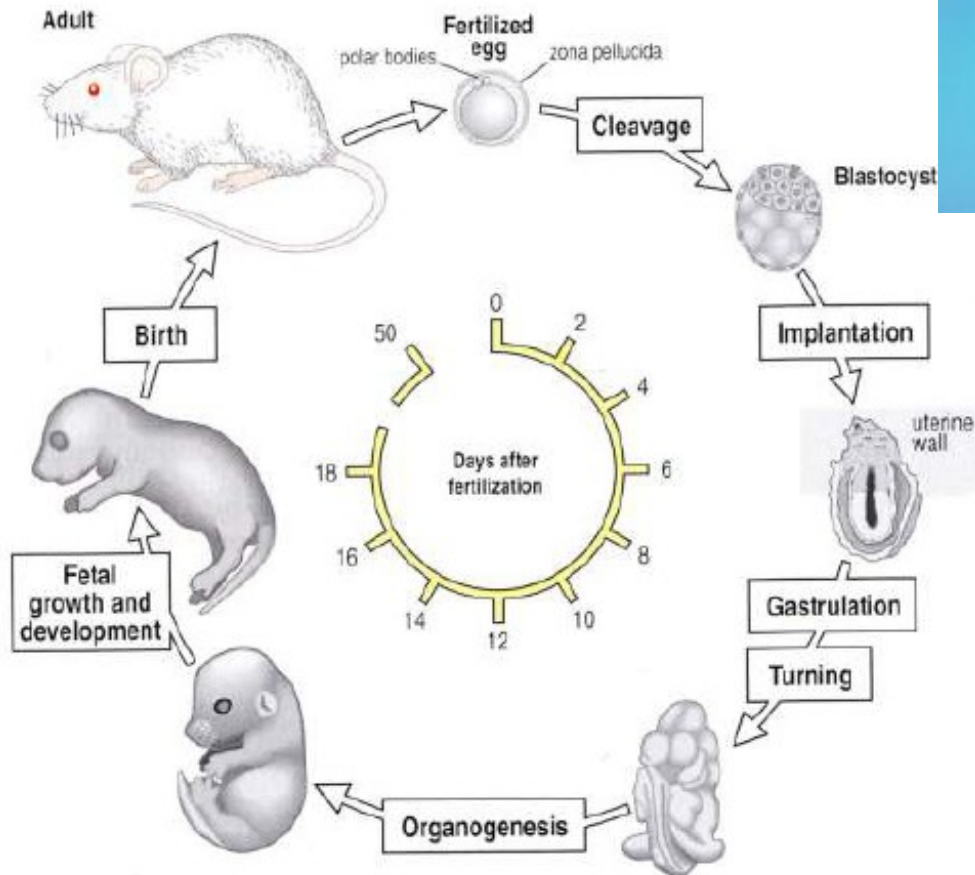
Výhody tohoto modelového organismu:

- Savec – 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

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- granule, voda, podestýlka, materiál na hnízdo
- Max. 6 myšek v jedné klíčce
- Náklady cca 30Kč na klíčku/týden
- IVC – individually ventilated cages – brání rozšíření případné infekce



Otevřená klíčka



IVC



Chovy laboratorních myší

- **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.)

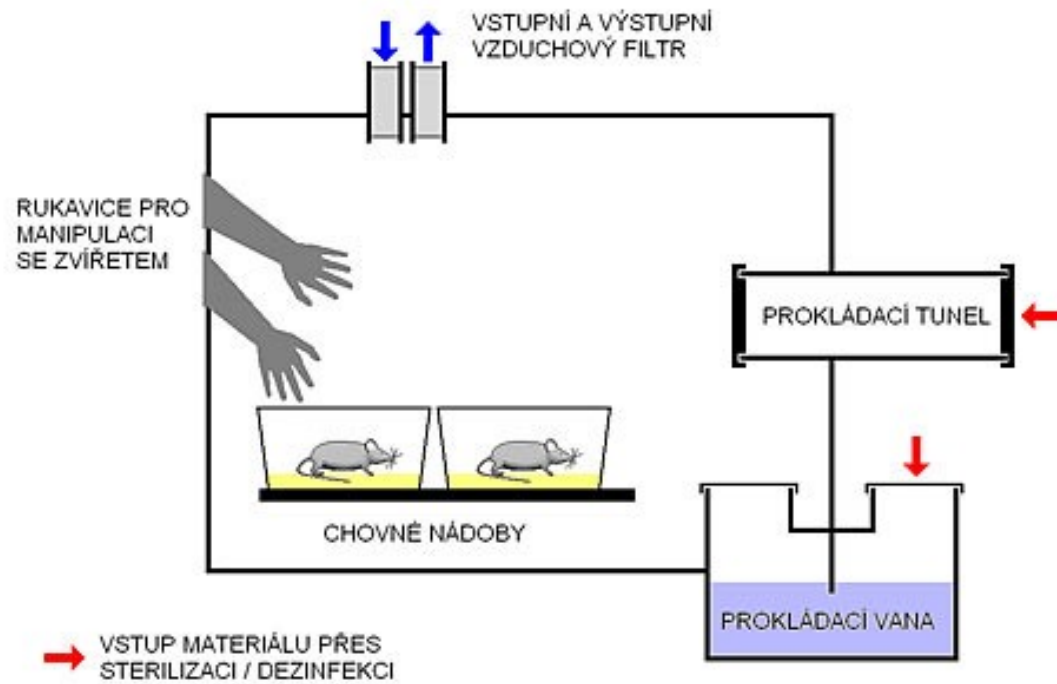
Protozoa (*Giardia muris*, *Encephalitozoon cuniculi*)

Ectoparasites

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

Chovy laboratorních myší

- **Izolátorový** – prostor pro zvířata je trvale oddělen bariérou od vnějšího prostředí a ošetřovatelů
 - imunodeficientní, axenické (germ-free) a gnotobiotické myši (definovaná mikroflóra)

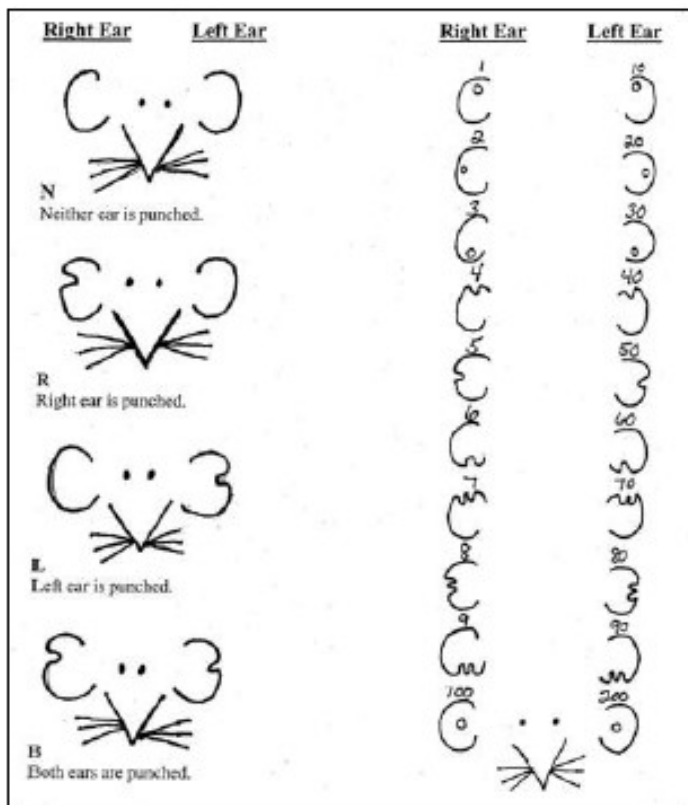


Archivace myších kmenů – kryoprezervace – embrya a spermie

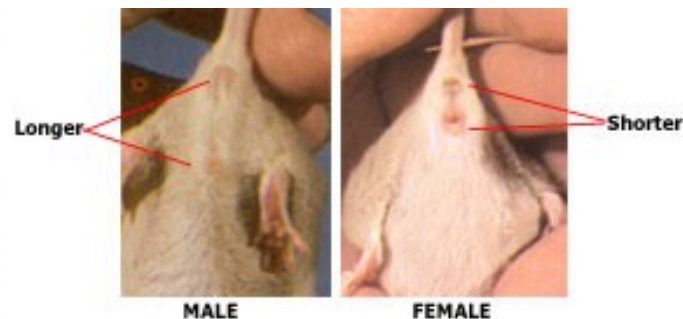
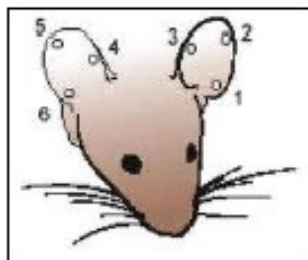
- rederivace, in vitro fertilizace (IVF) – pro „oživení“ kmene i pro „ozdravení“ (očištění od patogenů) (ustanovení SPF linie, izolátory)

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

Kmeny laboratorních myší

- **Inbrední kmen** - produktem 20 a více páření bratr x sestra, kdy všichni jedinci jsou odvozeni od jediného páru a jsou homozygotní ve všech alelách = **geneticky identičtí jedinci**
- 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, resistentní 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



II. „Experimental toolbox“

❖ běžně užívané metody a zdroje

- přirozené a indukované mutace
- embryonální kmenové buňky (ESCs)
- „knock-out a knock-in“ myši
- transgenní myši
- modelový příklad – β -katenin
- zdroje – archivy, databáze,...



Metody funkční genomiky

Funkční genomika

- cílem je určení funkce všech genů v genomu

Dva hlavní přístupy:

A) přímá genetika (forward genetics)

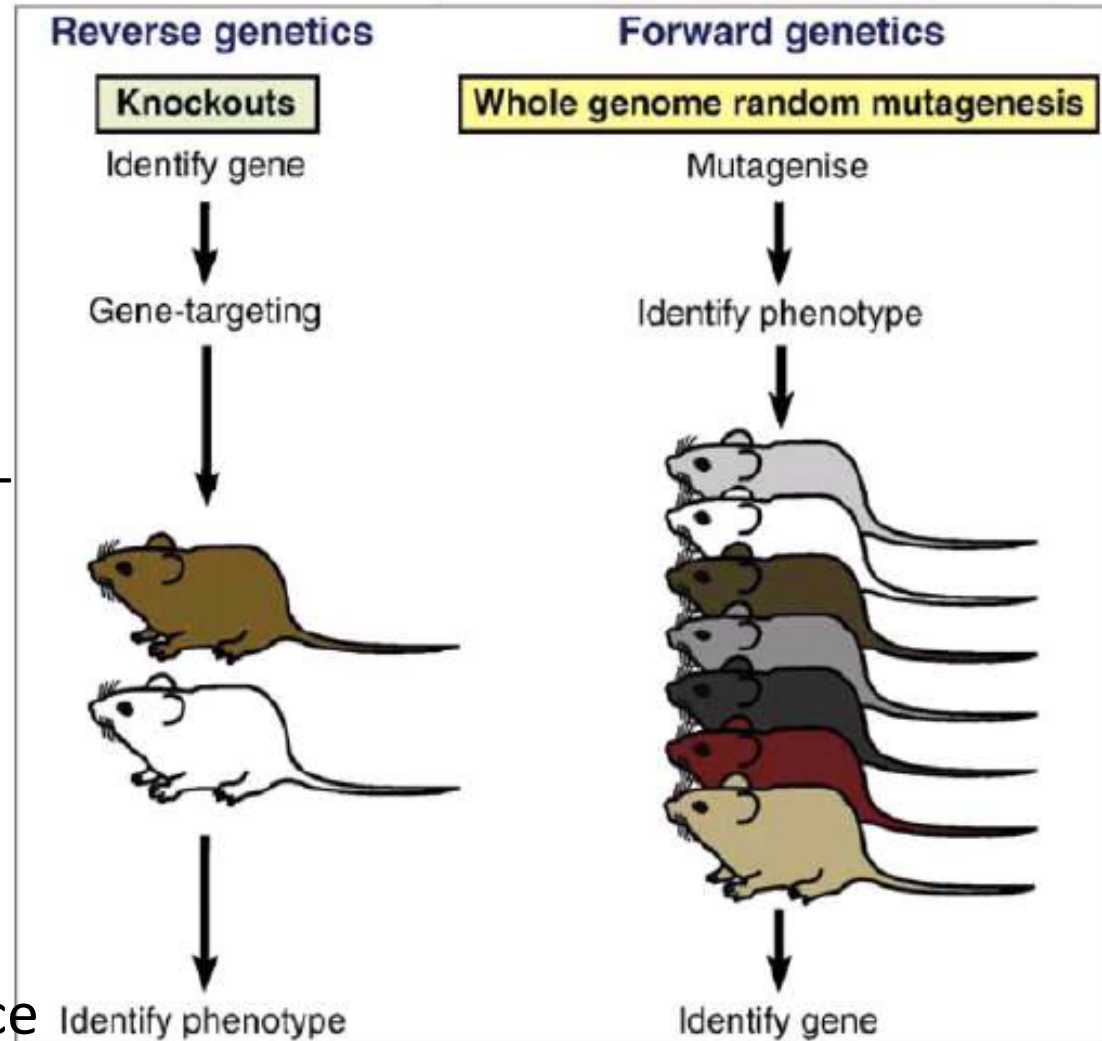
1. fenotyp (znak)
2. gen

- 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^{nu}*) myš

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

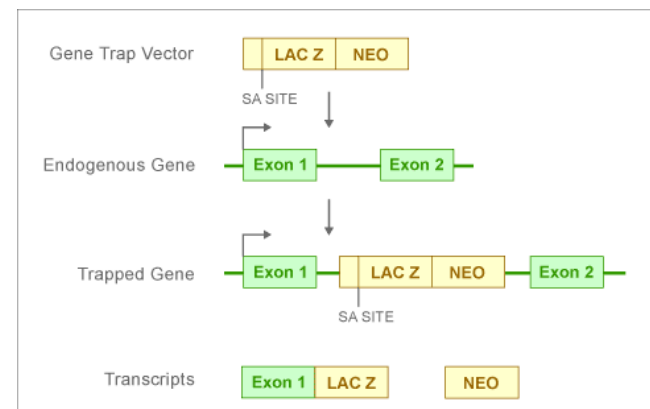
2. Indukované mutace – a) chemická mutagenese

nejčastěji N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)
př. *Apc^{Min}* myš – model vzniku kolorektálního
karcinomu, mutace v genu *Apc*



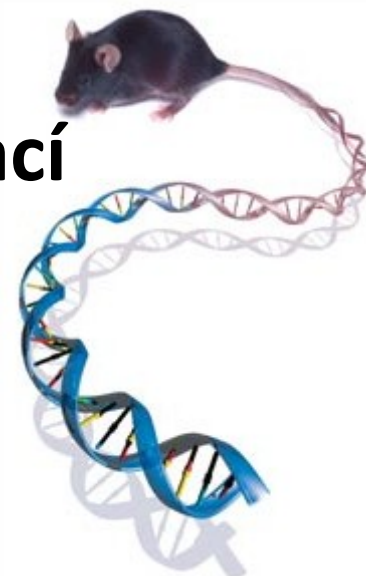
b) Genetické mutace – „gene-traps“ –

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

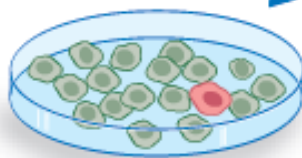
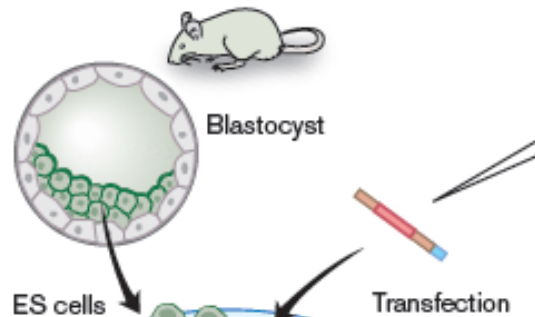
"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells".

„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).

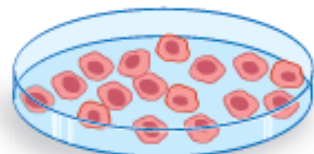


Rare cell carrying targeted gene

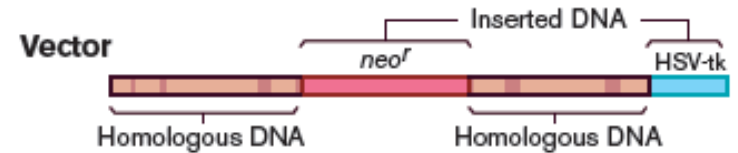
Positive-negative selection

4. Proliferation of targeted ES cell

Selection for presence of *neo^r* and absence of HSV-tk enriches targeted ES cells.



Pure population of ES cells carrying targeted gene

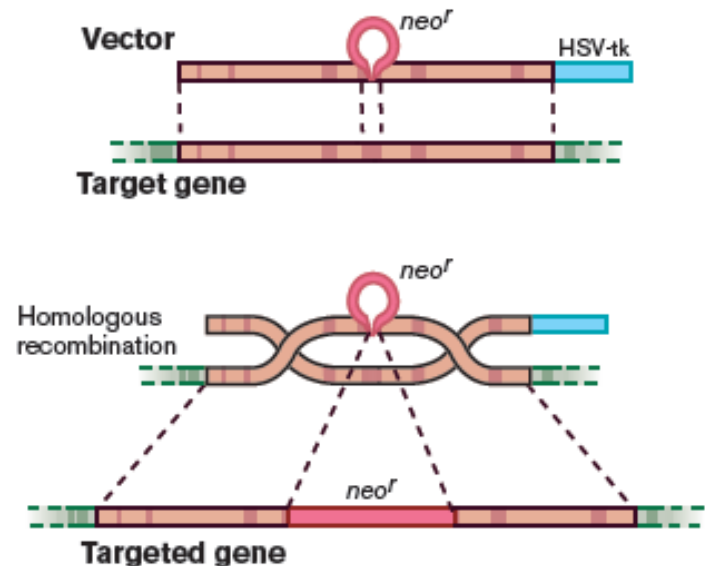


2. Construction of targeting vector

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

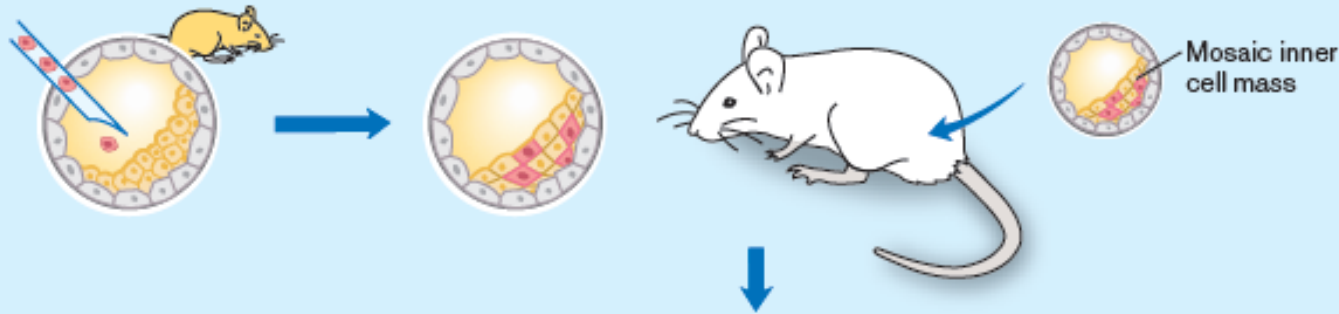


5. Injection of ES cells into blastocysts

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

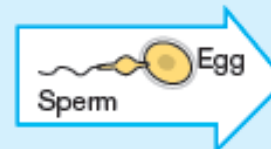


Mosaic mouse ♂

Normal mouse ♀



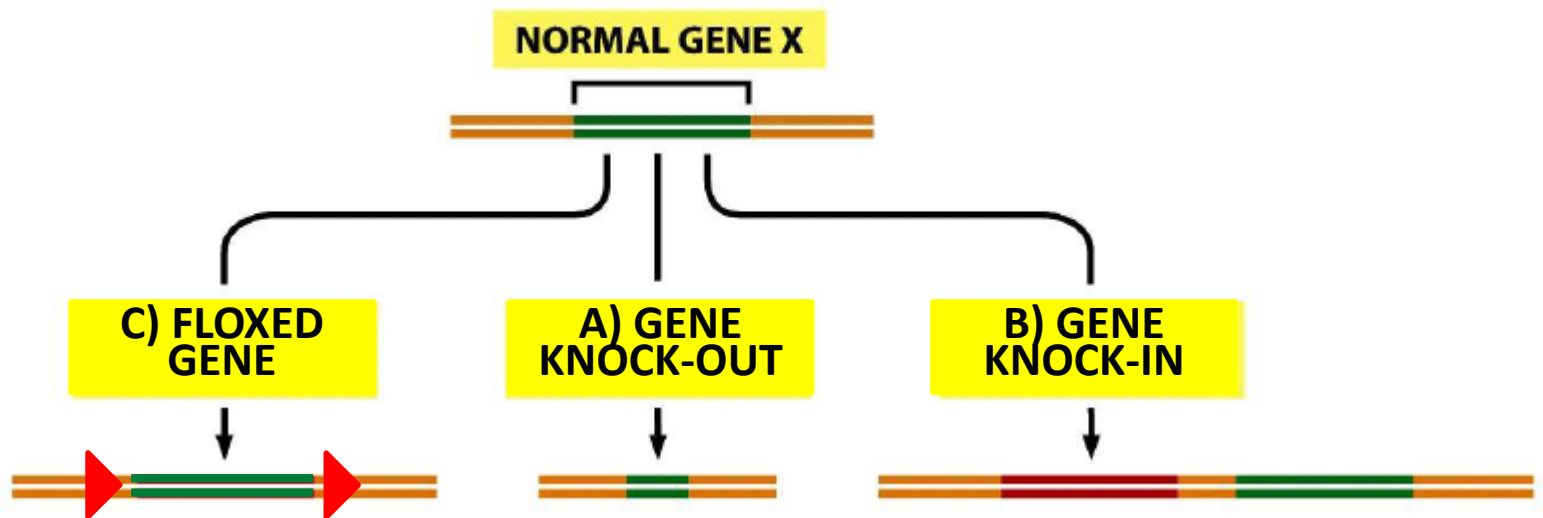
Gene targeted mice – called "knockout mice" when the targeted gene is inactivated



Normal mice

Genový „knock-out, knock-in“

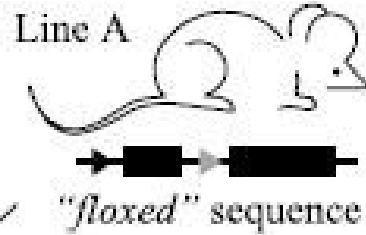
- A) **Klasický (celkový, totální) knock-out** – gen zcela vyřazen (dříve často nahrazen selekčním markerem), může vést ke smrti jedince již v prenatálním věku, což neumožňuje studium funkce v dospělém organismu
- B) **Knock-in** – do genového lokusu vložena mutace (záměna, inserce, delece,...) nebo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



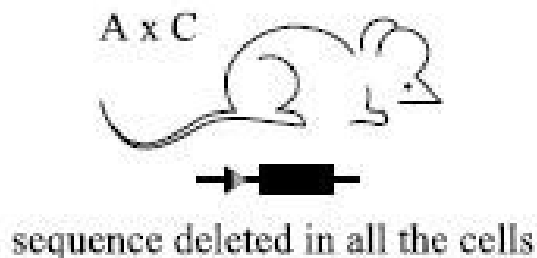
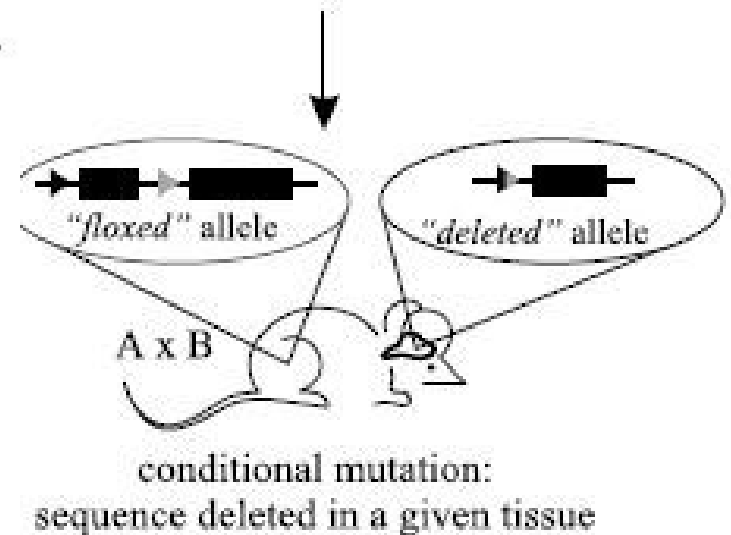
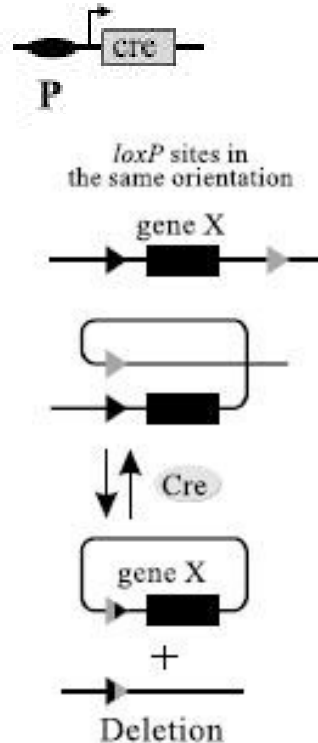
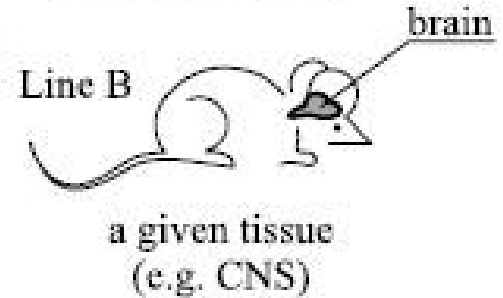
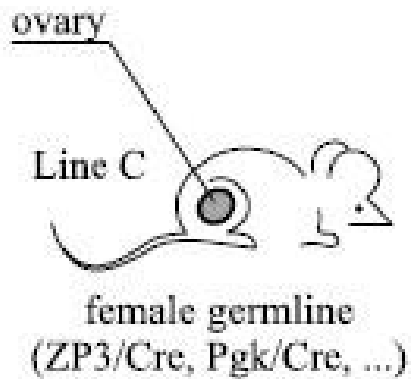
Cre/loxP systém

Babinet C., Cohen-Tannoudji M.; 2001

loxP site (locus of X-ing over)

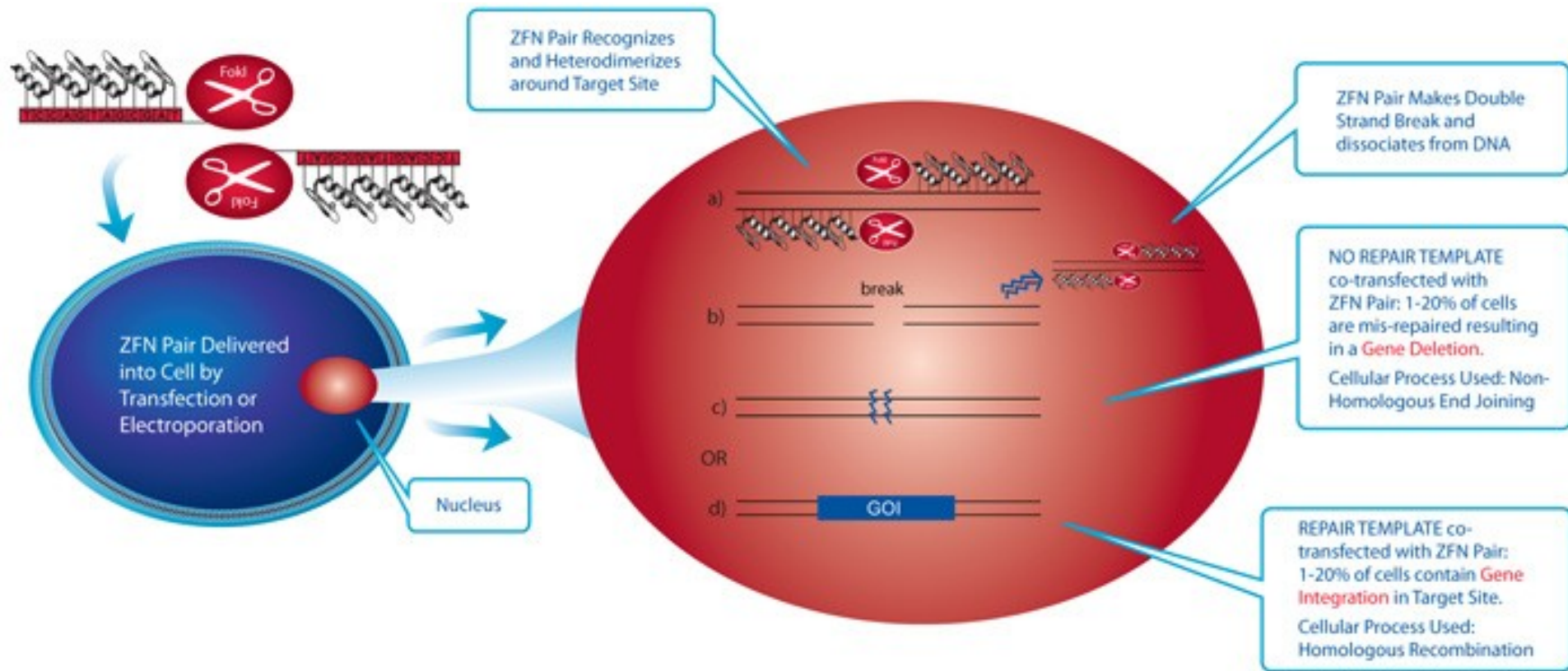


Cross with a transgenic mice expressing Cre in:



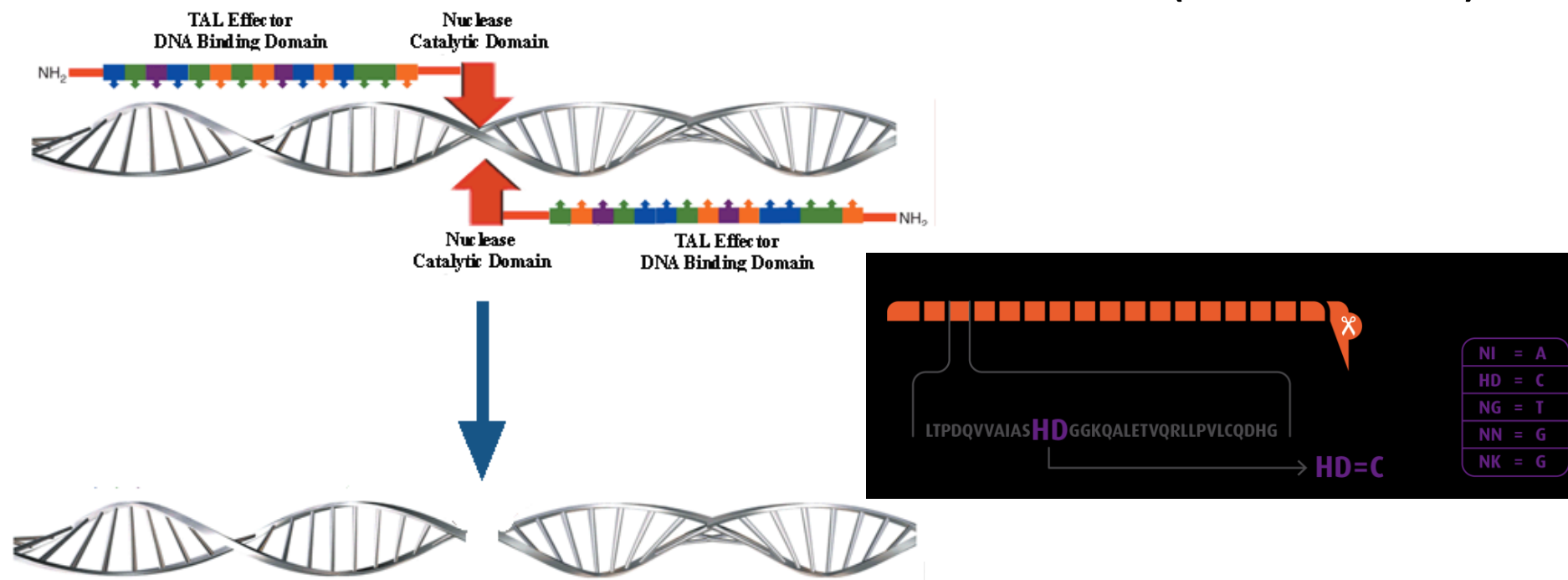
Nové metody „gene targetingu“

1. Zinc finger nuclease (ZFN) 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

2. TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) (© Collectis)

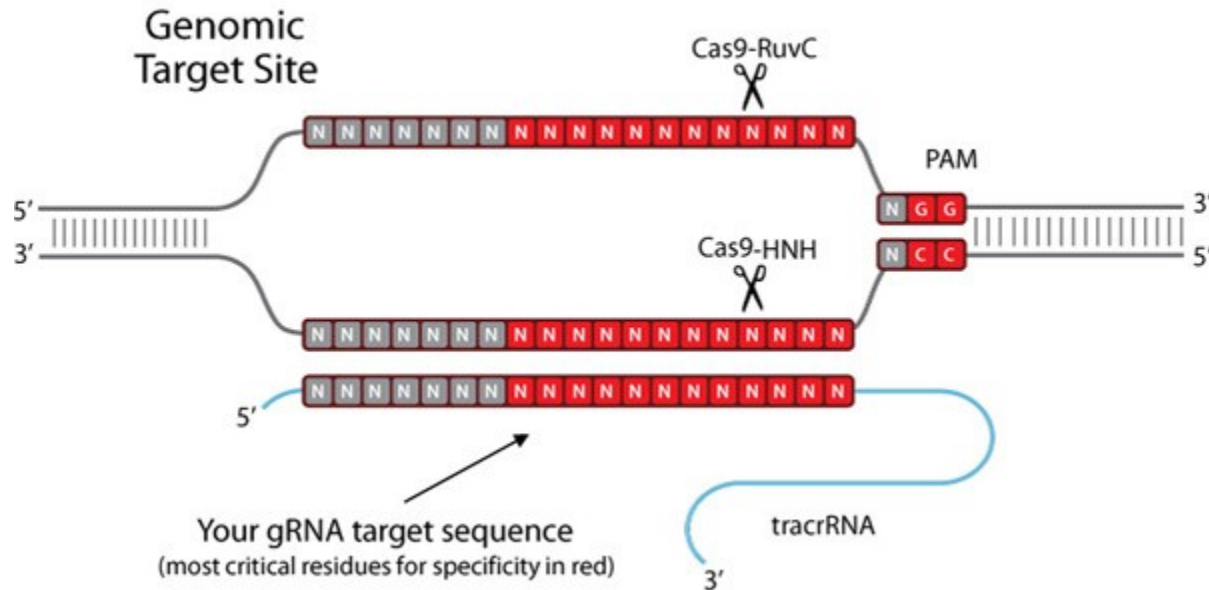


**Method of the Year 2011:
Gene-editing nucleases**

<http://www.youtube.com/watch?v=zDkUFzZoQAs>

3. CRISPR/Cas9 technologie (© Sigma Aldrich)

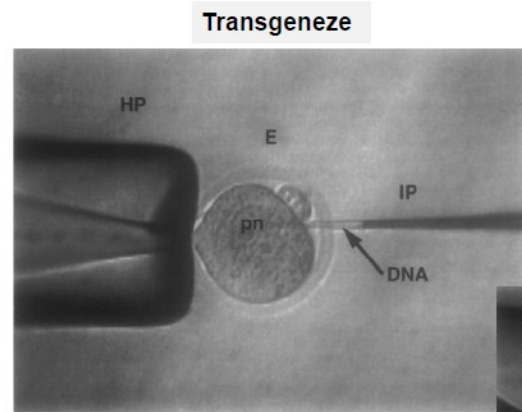
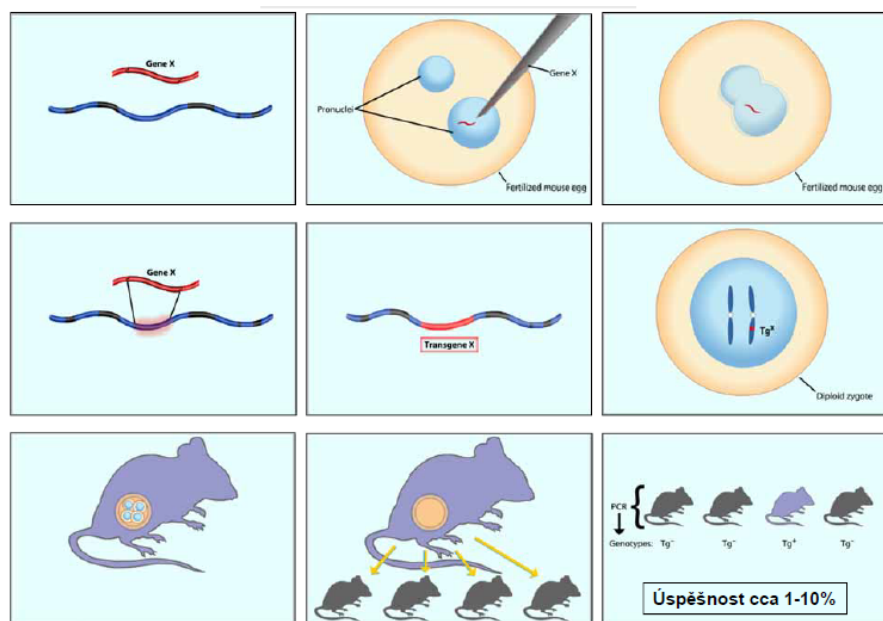
- CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated)



- bakteriální „imunitní systém“ – proti bakteriofágům a plasmidům exogenního původu
- odhalen u 40 % bakterií a u 90 % archeí, horizontální transfer komponent systému
- ZNF a TALEN náročné na výrobu - zapotřebí proteinů, navíc nezcela specifické
- Dnes možno připravit mutantní myš pomocí CRISPR/Cas pouze pronukleární injekcí plasmidu s Cas9 a sgRNA – trvá 1 měsíc

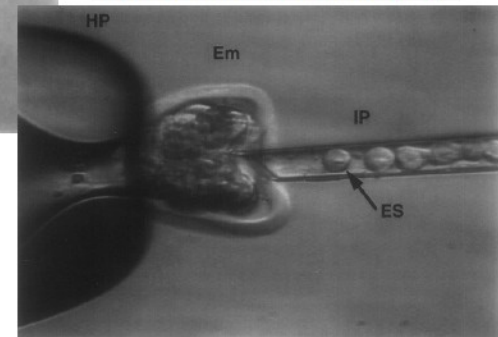
Transgenní zvířata

- **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

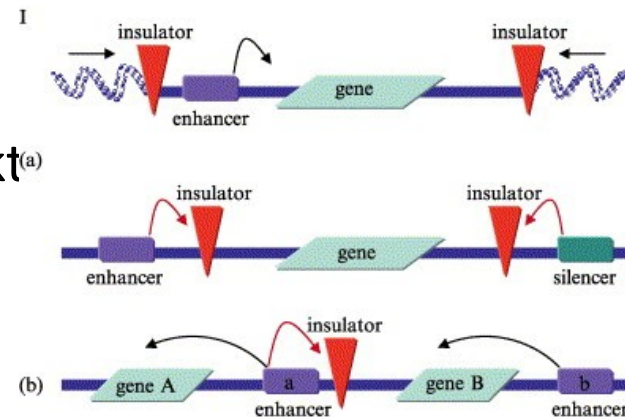


Transgenní myši

- **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, β -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^(a) (inzulátory, Matrix Associated Regions; MAR)
- použití velkých částí chromozomů (Bacterial Artificial Chromosome; BAC recombineering)



Jaká je role proteinu β -kateninu?

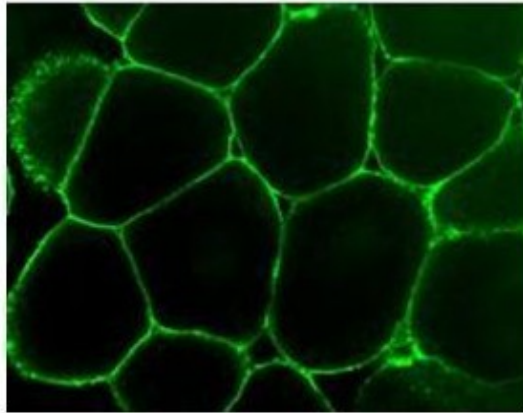


β -katenin je multifunkční protein

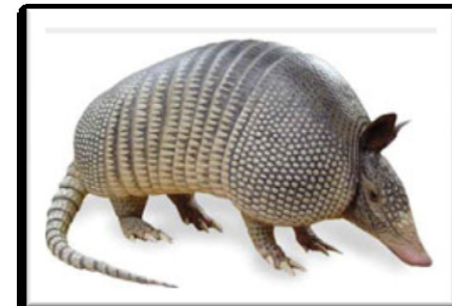
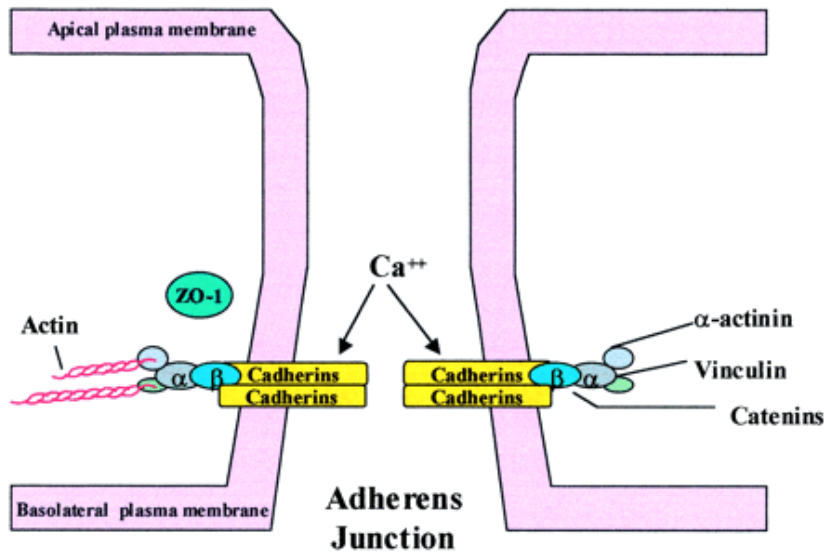
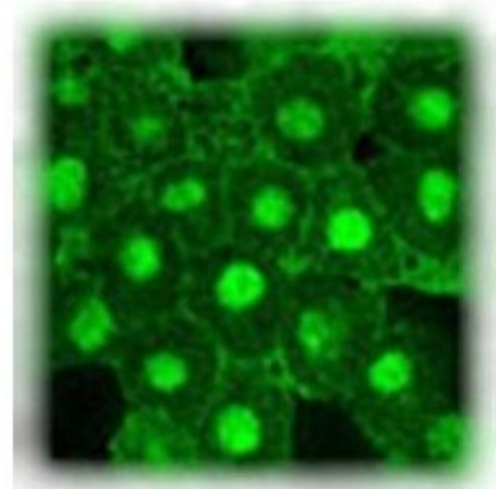
a) Mezipuněčné spoje (Ozawa et al., 1989)

b) Signalizace Wnt/ β -katenin (Wieschaus et al., 1984)

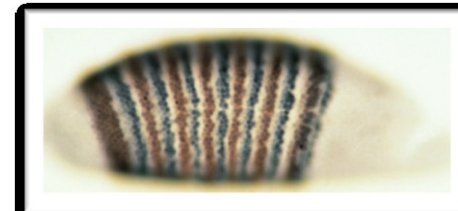
adhesion



signaling



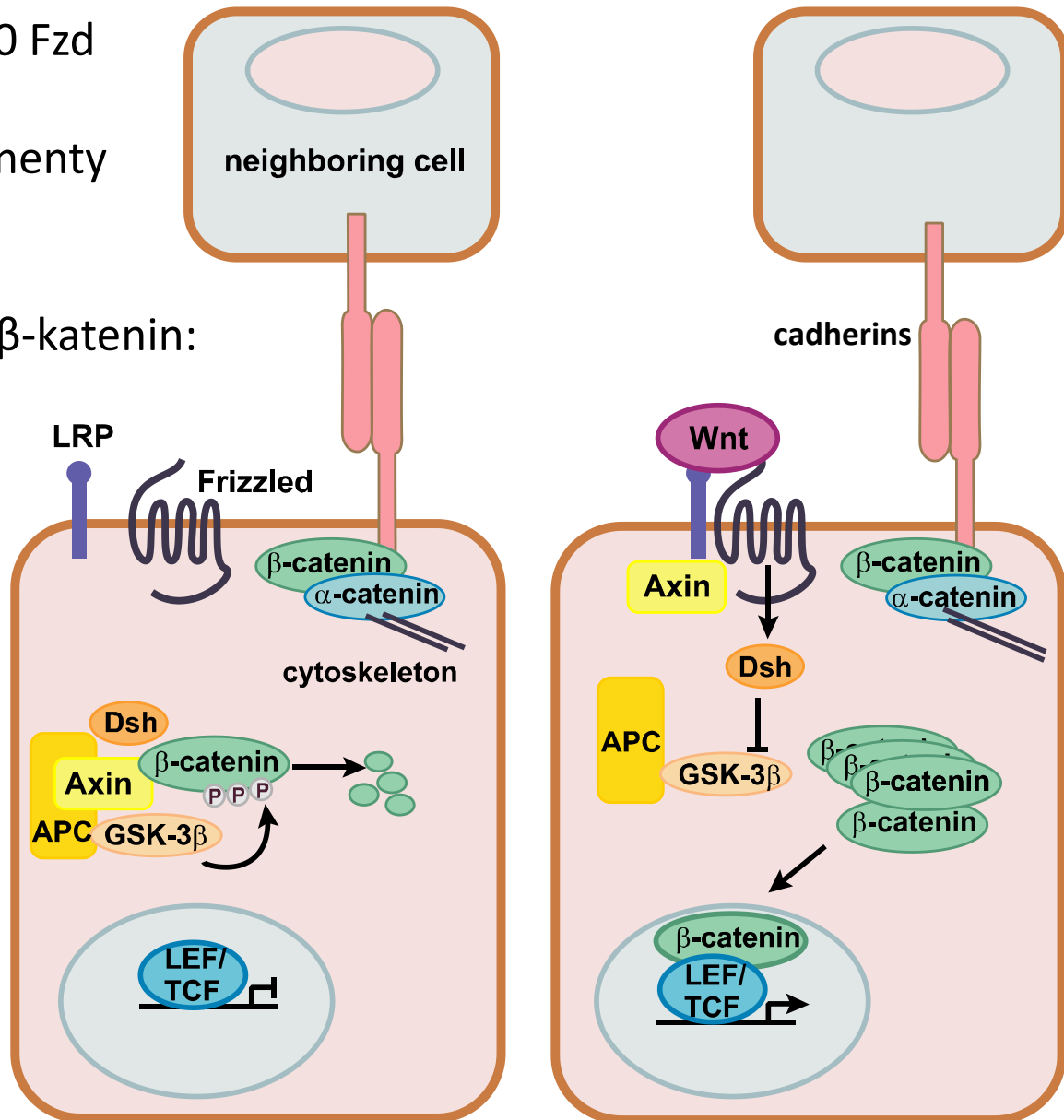
Armadillo –
ortolog beta-
kateninu
v *Drosophila*



Segmenty
v embryu
Drosophily

Signální dráha Wnt/ β -katenin

- Savci – 19 členů rodiny Wnt, 10 Fzd
- Všechna Metazoa mají komponenty signální dráhy Wnt
- Geny aktivované dráhou Wnt/ β -katenin: *c-Myc*, *Cyclin D1*, *Twist*, *Axin2*, *Lgr5*, ...
- Signalizace Wnt/ β -katenin řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci během embryonálního vývoje a obnovu tkání z kmenových buněk v dospělosti
- Nefyziologická aktivace vede k vývojovým defektům a ke vzniku nádorů



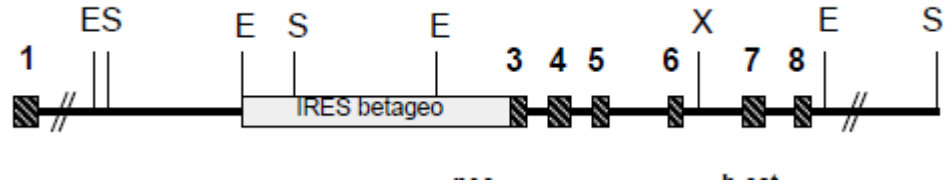
Klasický knock-out β -kateninu

β -catenin wt locus

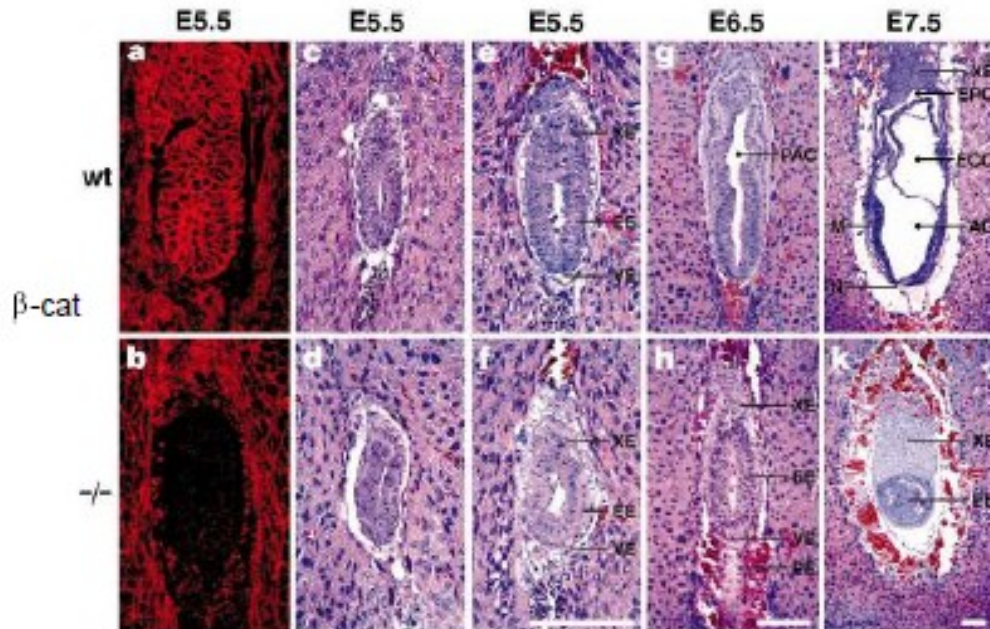


- ***Ctnnb1*** – velký gen (27 kBp) , kóduje protein β -katenin (781 aa)

- Haegal *et al.*, 1995 – delece exonu 2-15

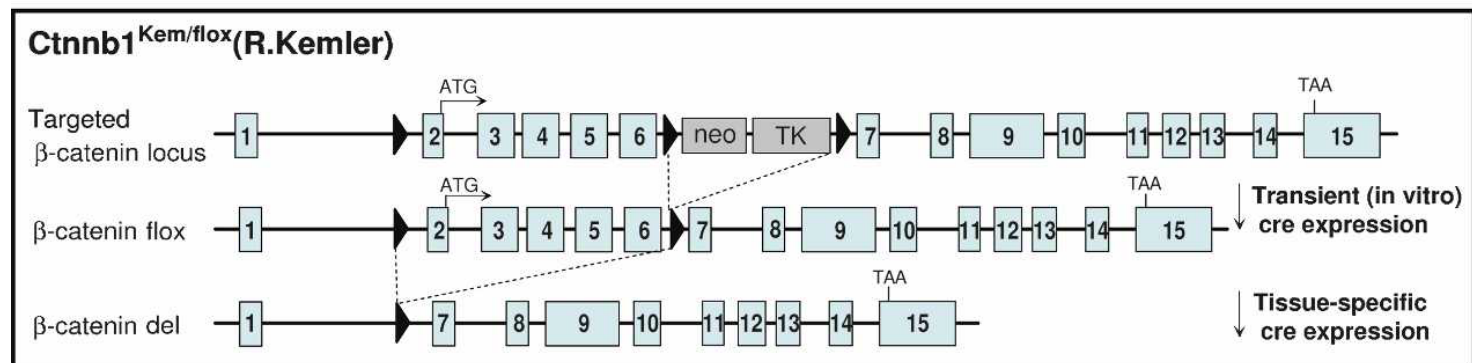
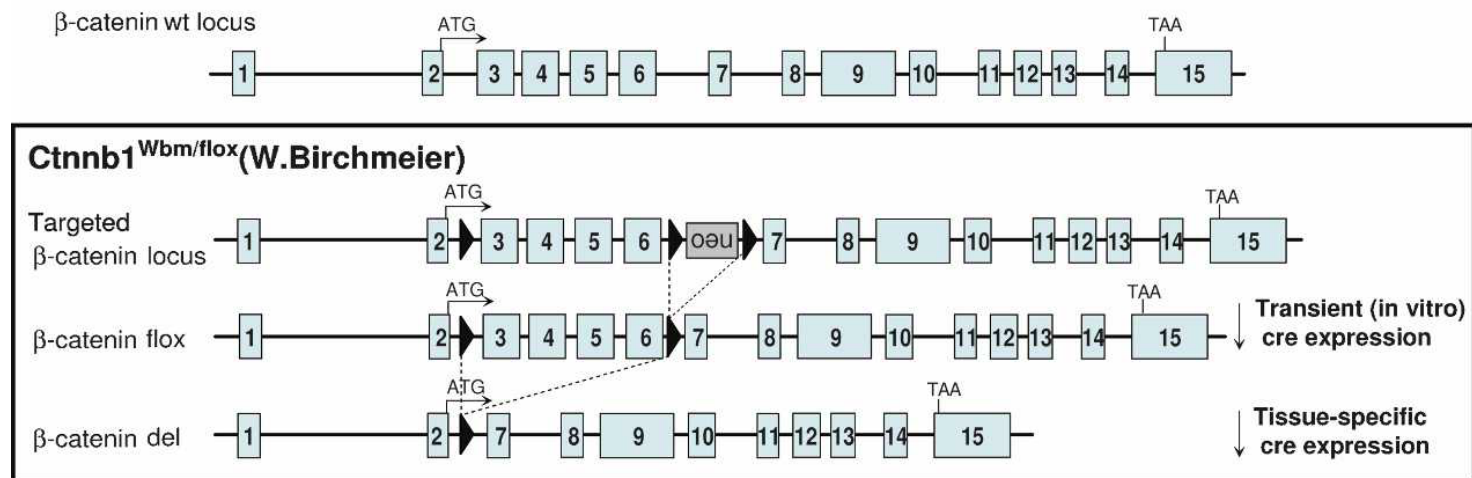


- ***Ctnnb1*^{-/-}** - gastrulační defekty, nevytváří A-P osu (E6) ani mezoderm (E7) – embryonálně letální fenotyp - nemá defekty v mezibuněčných spojích - kompenzuje γ -katenin (Huelsenken *et al.*,)



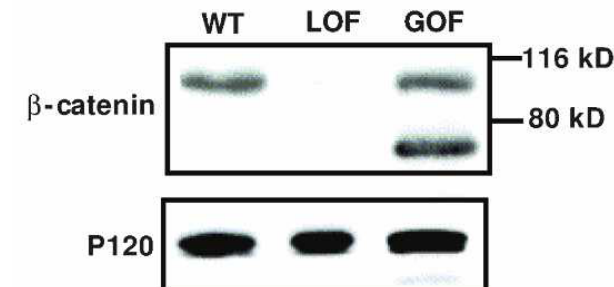
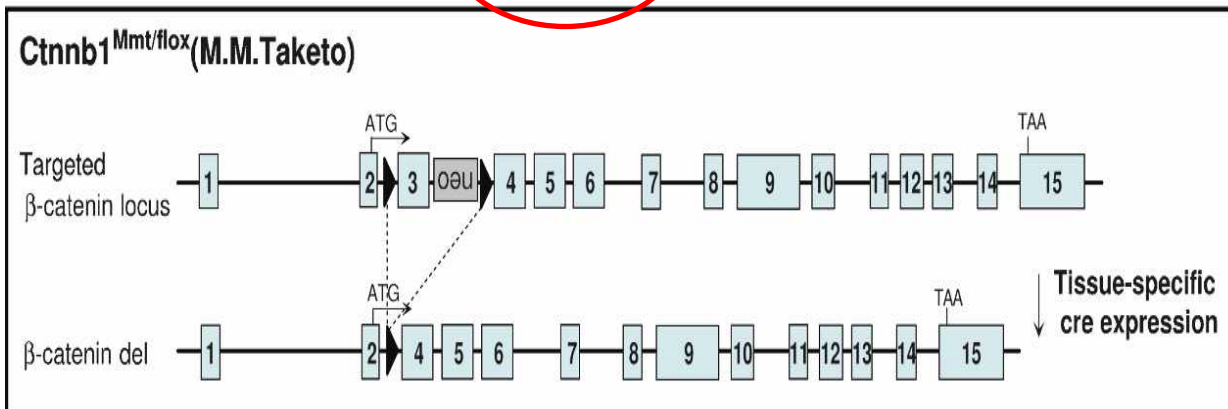
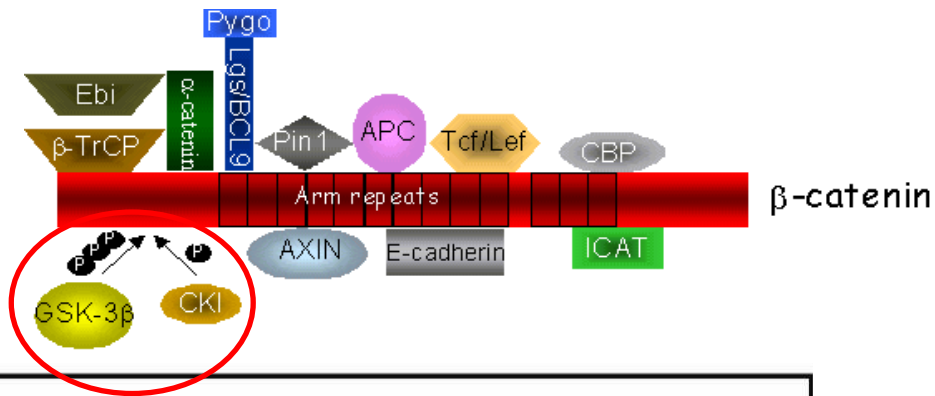
Podmíněný knock-out β -kateninu

- „Loss of function“ (LOF) alela („exon 3-6“, „exon 2-6“)
 - Podmíněná inaktivace genu v určité tkáni – po Cre rekombinaci posun čtecího rámce – nevzniká protein (= nulová alela)
=> nefunkční kanonická signalizace Wnt



Podmíněná aktivace β -kateninu

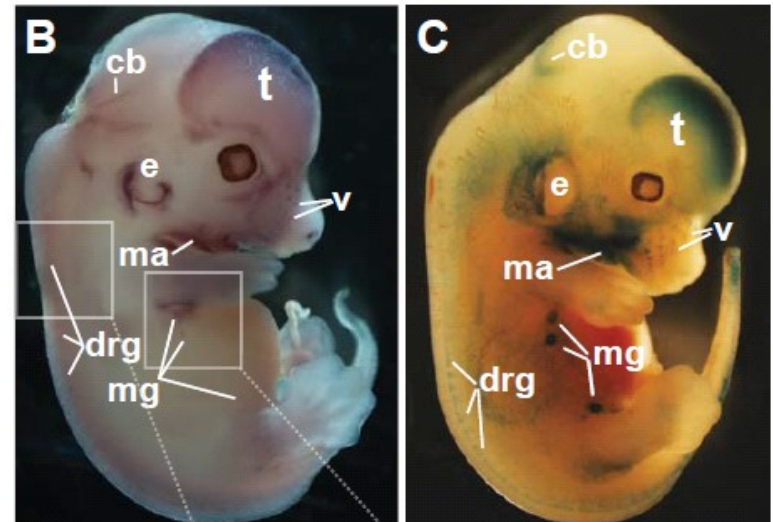
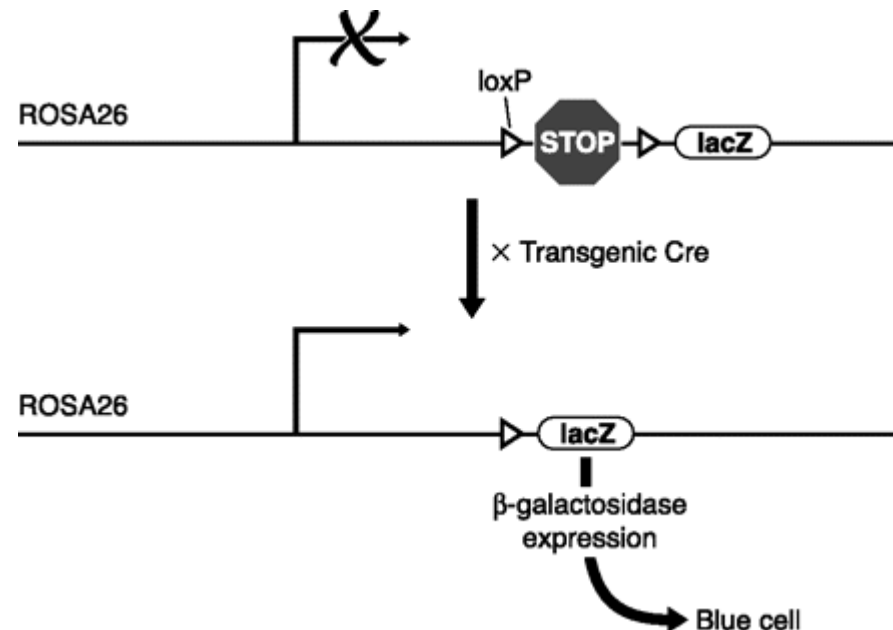
- „Gain of function“ (GOF) alela („exon 3“)
 - Po Cre rekombinaci delece exonu 3, ale fúze exonu 2 a 4 ve správném čtecím rámci – vzniká zkrácený protein bez N-koncové části s degradačním motivem (S45, T41, S37, S33) = stabilní
 - => kanonická signalizace Wnt trvale zapnuta



Cre rekombinázy („deleter strains“)

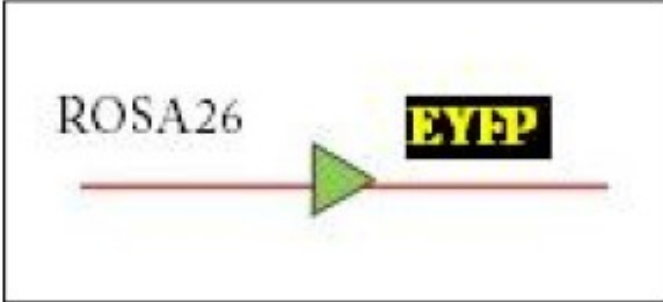
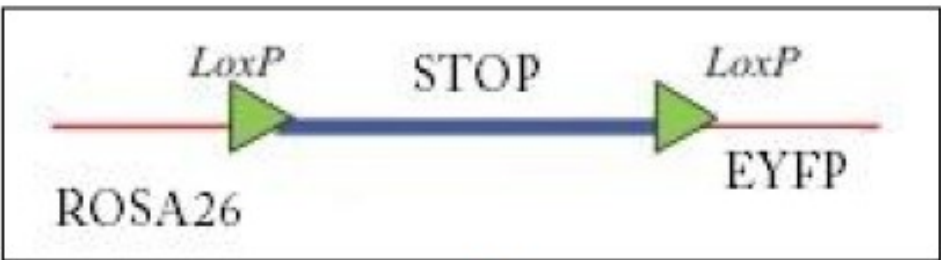
- Transgenní nebo „knock-in“ kmeny
- Exprese dána promoterem – vybíráme silné a tkáňově specifické
- Otestování aktivity pomocí reportérové myši – využití lokusu ROSA26, který je exprimován v průběhu embryogeneze a i v dospělosti ve všech buněčných typech

A) ROSA26-LacZ - beta-galaktozidáza (lacZ) tkáň exprimující tento enzym + X-gal (substrát) -> modrý nerozpustný produkt



Expresi *Troy Cre* odpovídá expresi *Troy* (in situ hybridizace)

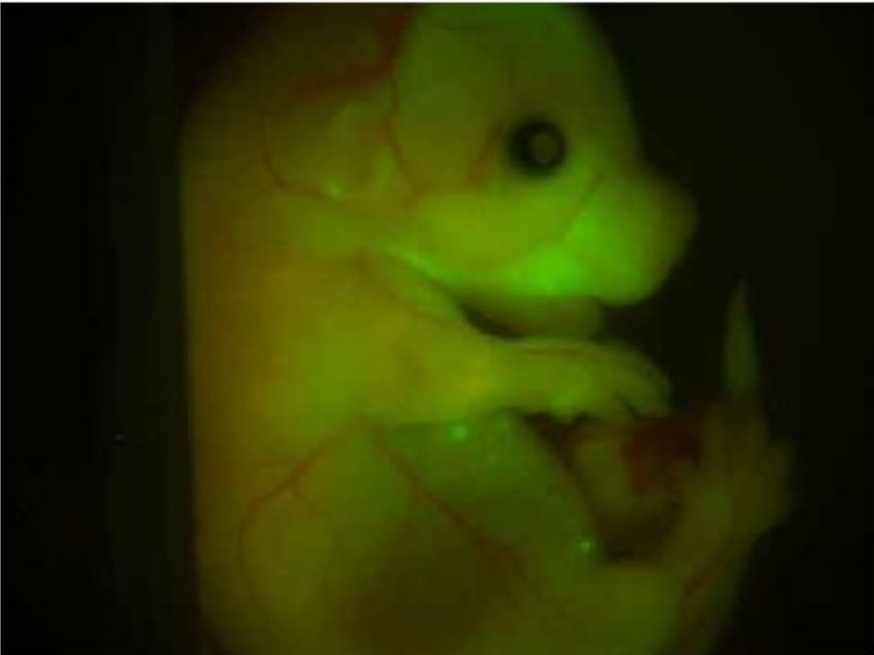
B) ROSA26–EYFP - Reportérová myš pro značení a izolaci živých (=nefixovaných) buněk pro další kultivace a experimenty



X
myš produkující Cre

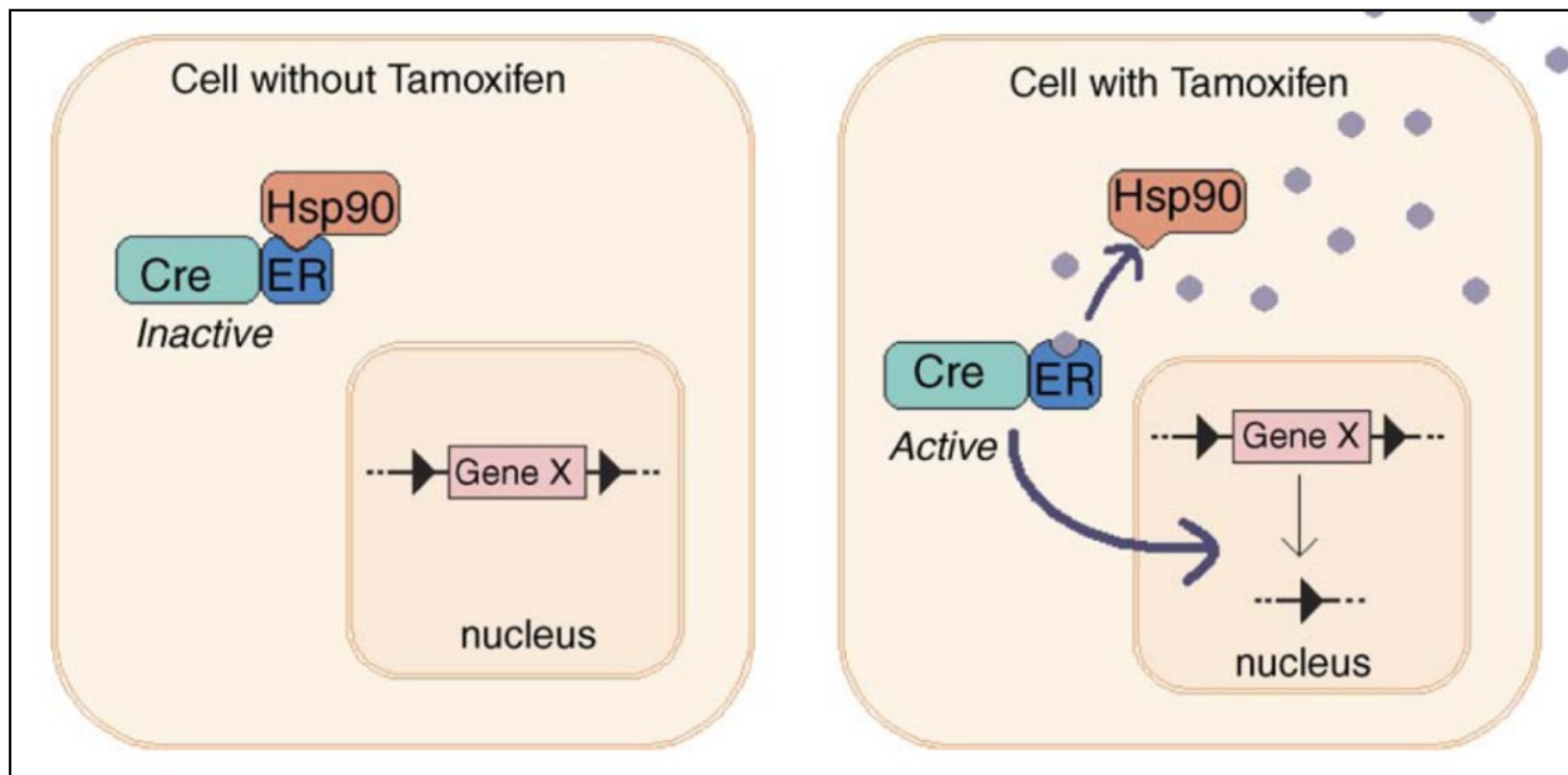
Troy Cre x Rosa26-loxP-(STOP)-loxP-EYFP

Troy x Rosa26-loxP-(STOP)-loxP-lacZ



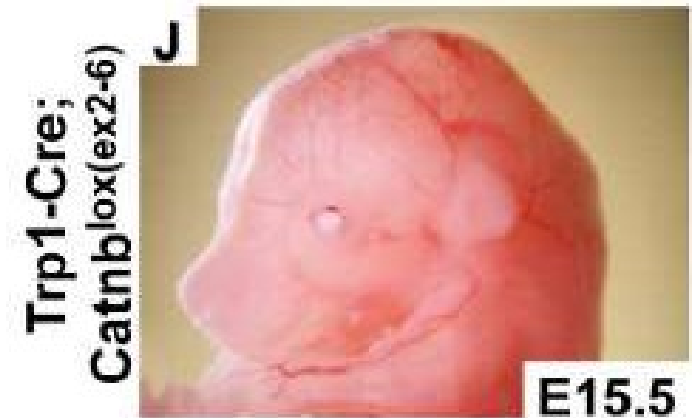
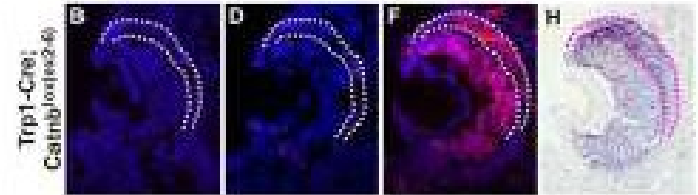
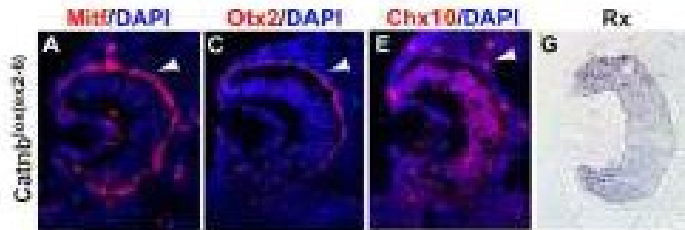
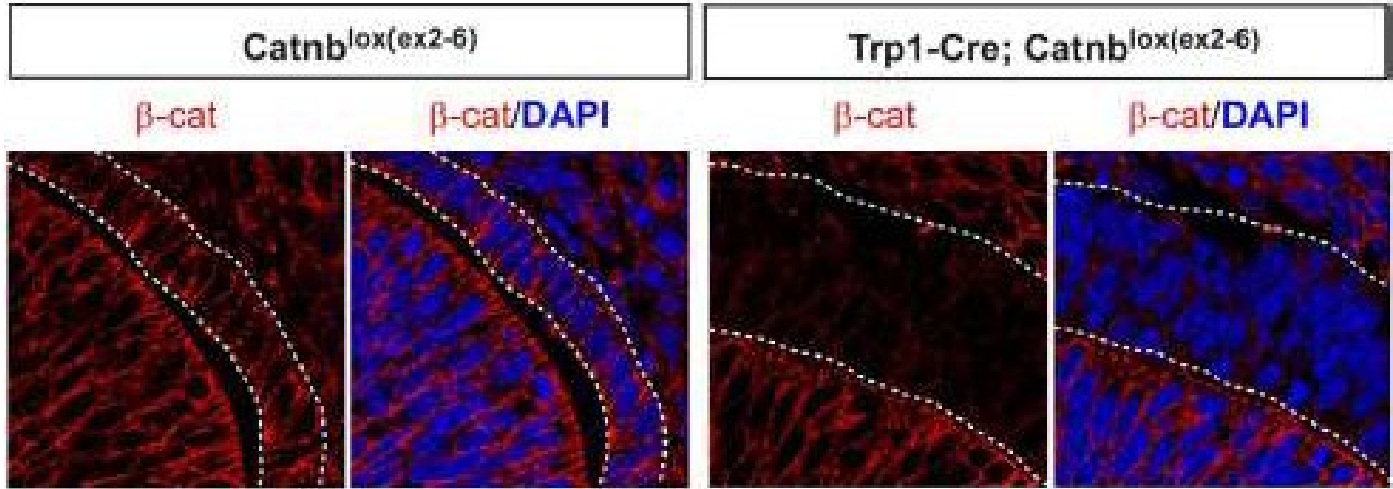
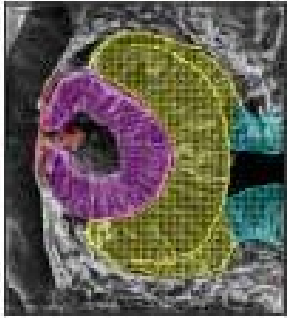
Cre recombináza fúzovaná s estrogenovým receptorem (CreER^{T2}) je regulována tamoxifenem

- Tamoxifen: syntetický analog estrogenu, jeho metabolit 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) se váže na modifikovaný estrogenový receptor (ER^{T2})

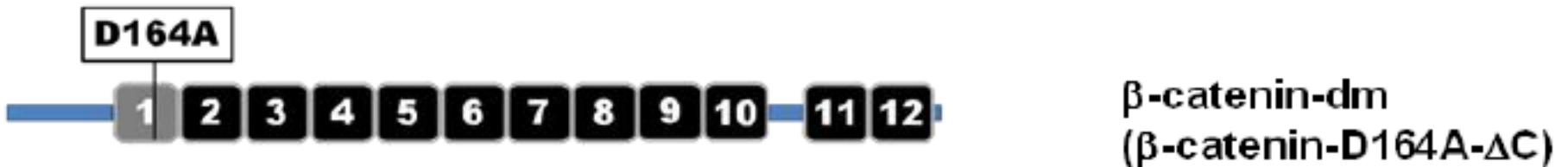
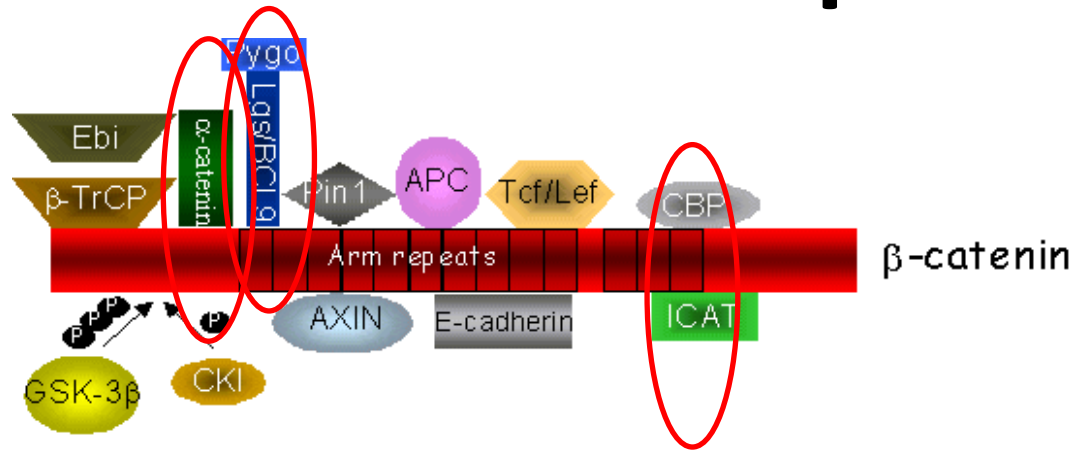


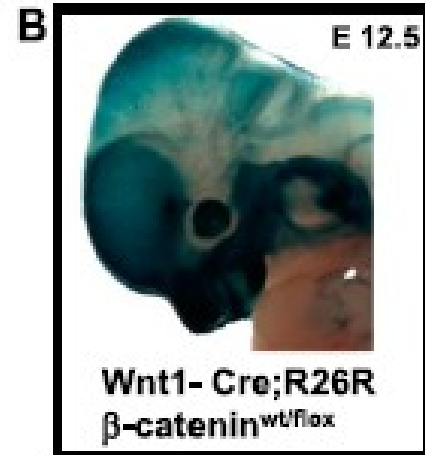
- CreER^{T2} – místně i časově specifická regulace rekombinace DNA

Experimenty odhalující funkci β -kateninu



Rozlišení duální funkce β -kateninu





Jak získat myš s cílenou mutací?



• LoxP myš

1. Jax nebo jiná laboratoř (www.jaxmice.org)
 - A) Hledání v literatuře
 - B) Specializované databáze (www.informatics.jax.org)
2. KOMP, EUCOMM – (www.komp.org, www.eucomm.org)
3. Vytvořit svou vlastní myš (sám či na objednávku - ZNF, TALEN, CRISPR)

• Cre myš

1. Jax nebo jiná laboratoř
 - A) hledání v literatuře
 - B) specializované databáze
2. Udělat si svou myš

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



| CREATE Partner Cre Recombinase Databases | Current Lines | Location |
|---|---------------|----------|
| Cre-X-Mice | 529 | Canada |
| CreZOO | 127 | Greece |
| MGI recombinase | 1402 | USA |
| CreERT2Zoo (will be integrated into CREATE) | 53 | France |

Only information is available,
no live mice are provided !

Specialized web resources: **International Knockout Mouse Consortium** (www.knockoutmouse.org)



International Knockout Mouse Consortium

[Home](#) [About IKMC](#) [MartSearch](#) [Download](#) [Nominate gene](#) [FAQ](#) [Order Products](#) [Contact IKMC](#)

Welcome to the IKMC



The International Knockout Mouse Consortium (IKMC) aims to mutate all protein-coding genes in the mouse using gene trapping and gene targeting in C57BL/6 ES cells. [Read more...](#)

[Download the IKMC Gene List](#)
[View targeting strategies](#)
[View all allele types](#)

The web services of the International Knockout Mouse (IKMC) have been transferred to the [International Mouse Phenotyping Consortium \(IMPC\)](#).

Search or Browse

Search IKMC database

Enter gene symbols, gene IDs or genome location

e.g., Adam19, Pax, ENSMUSG00000020681, Chr13:22210730-22311689
(coordinates from NCBI mouse genome assembly 38)

[Advanced Search](#)

Browse IKMC database


Use the following links to browse genes

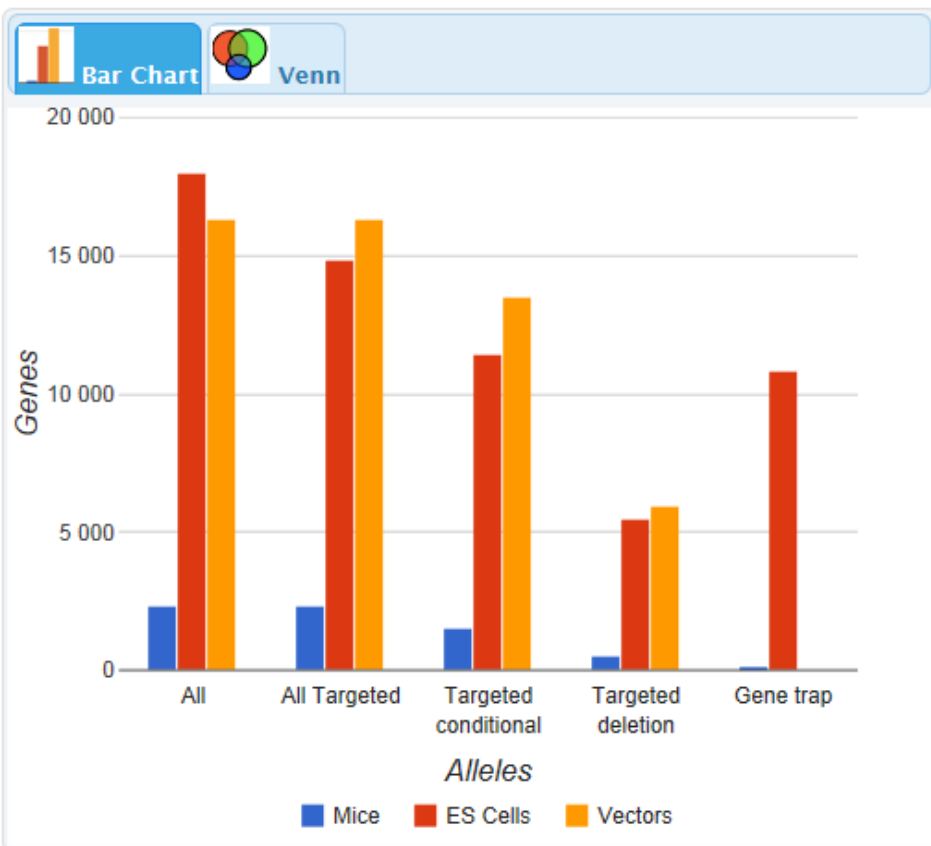
- [Browse by Gene Symbol](#)
- [Browse by Chromosome](#)



Database of mutant alleles of all mouse genes

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](#)

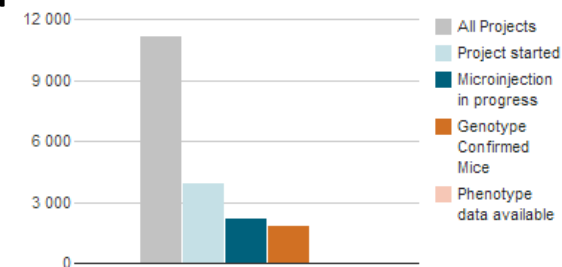
Gene trap alleles

| 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 products](#)

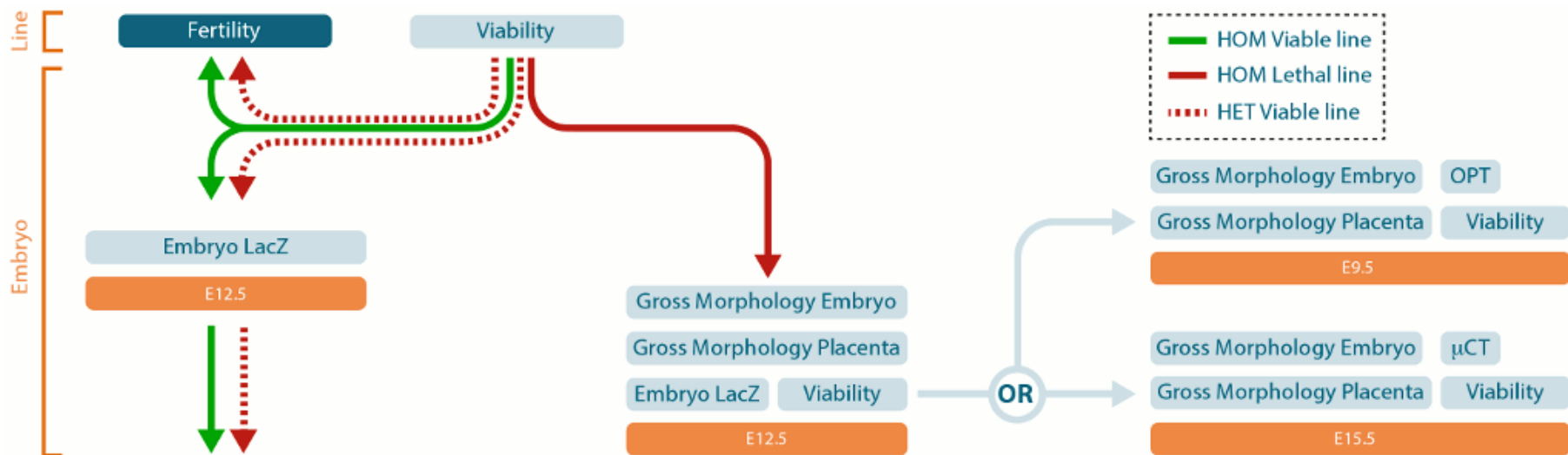
Project Status



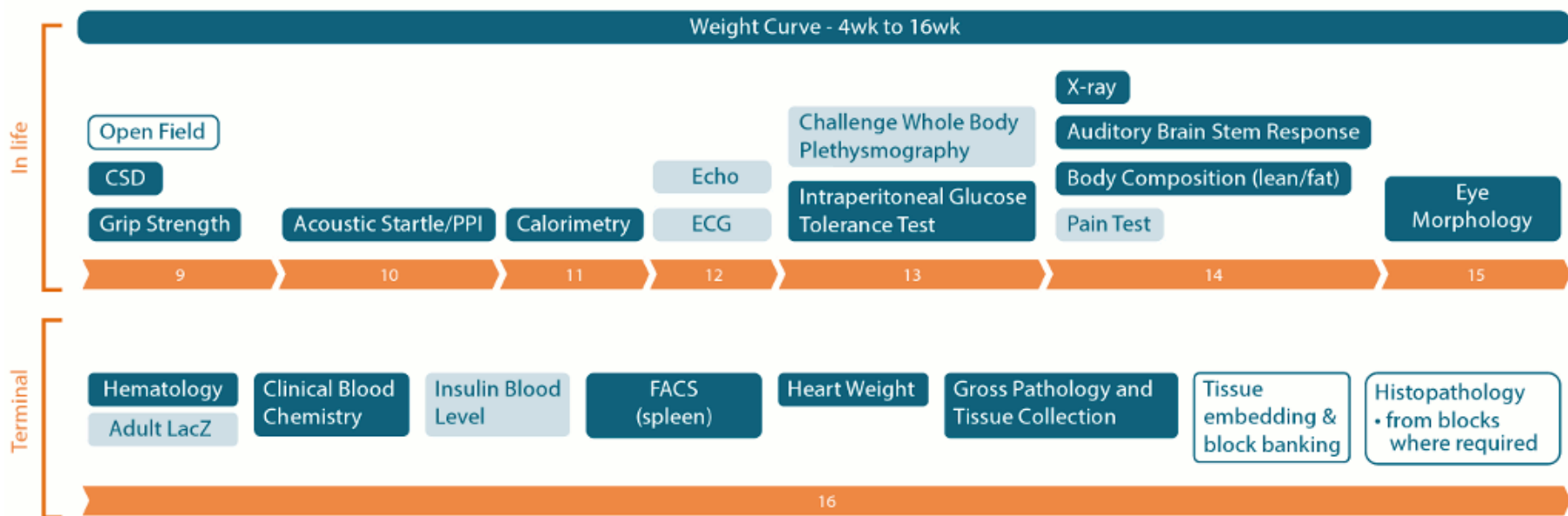
Pomoci tohoto přístupu zjistit funkci každého genu

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

Testy prováděné v myších klinikách

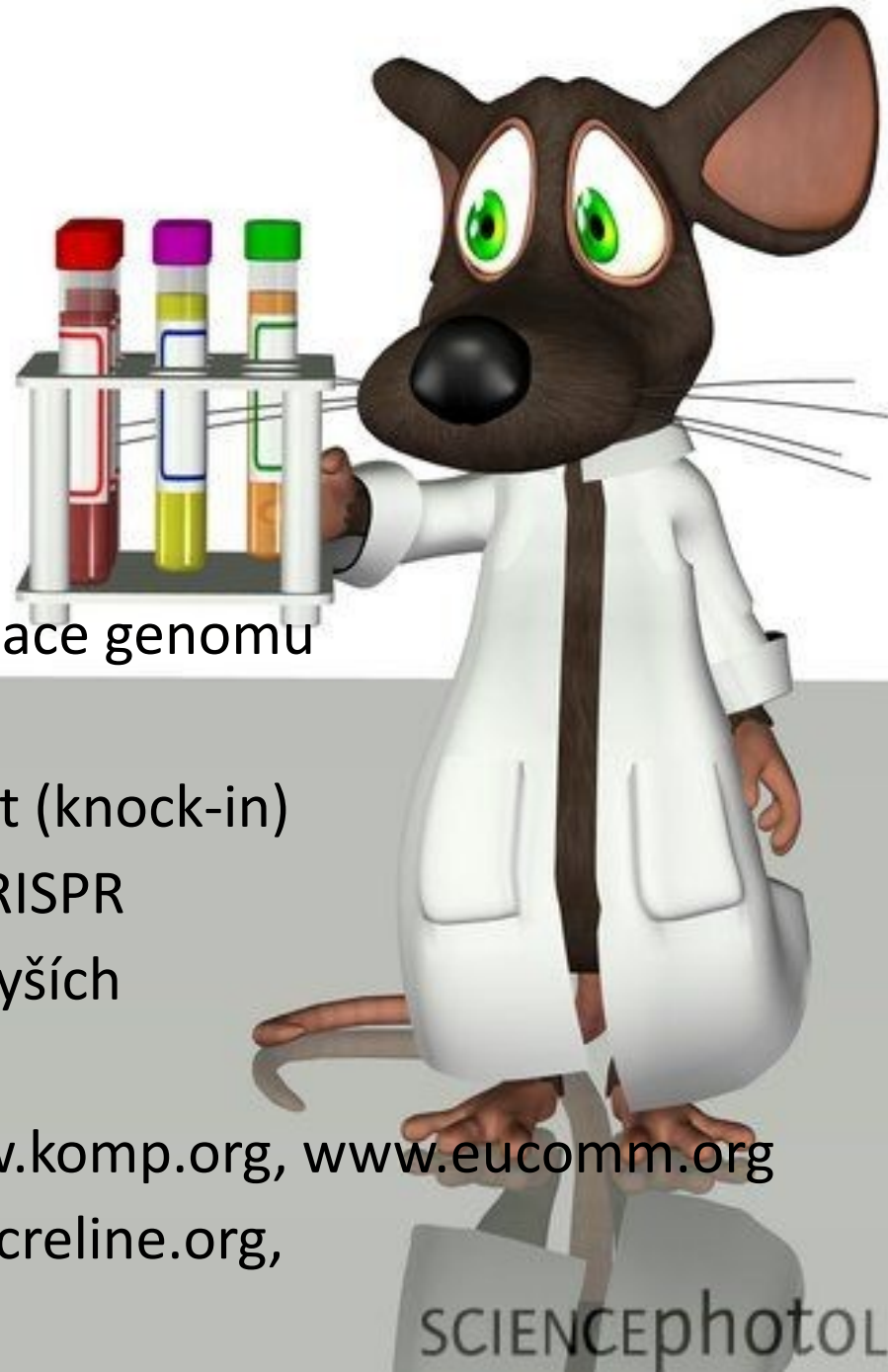


7M + 7F Mutant Adult Mice



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, ZNF, TALEN, CRISPR
- Cre linie – test na reportérových myších
 - ROSA26-LacZ, ROSA26-EYFP
- Databáze – www.jaxmice.org, www.komp.org, www.eucomm.org
 - www.informatics.jax.org, www.creline.org, www.mousephenotype.org



**Děkuji
za
pozornost!**

