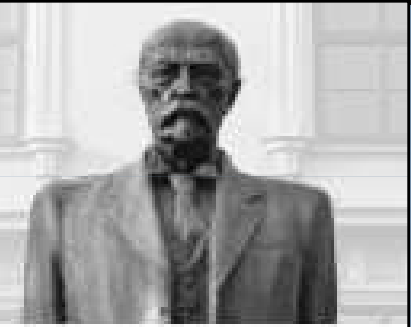


**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
*Česká republika*



# Myš jako model vývojové biologie

Některé podklady poskytli:  
Lenka Kočí, Katarína Chlebová, Jan Němec

# Myš

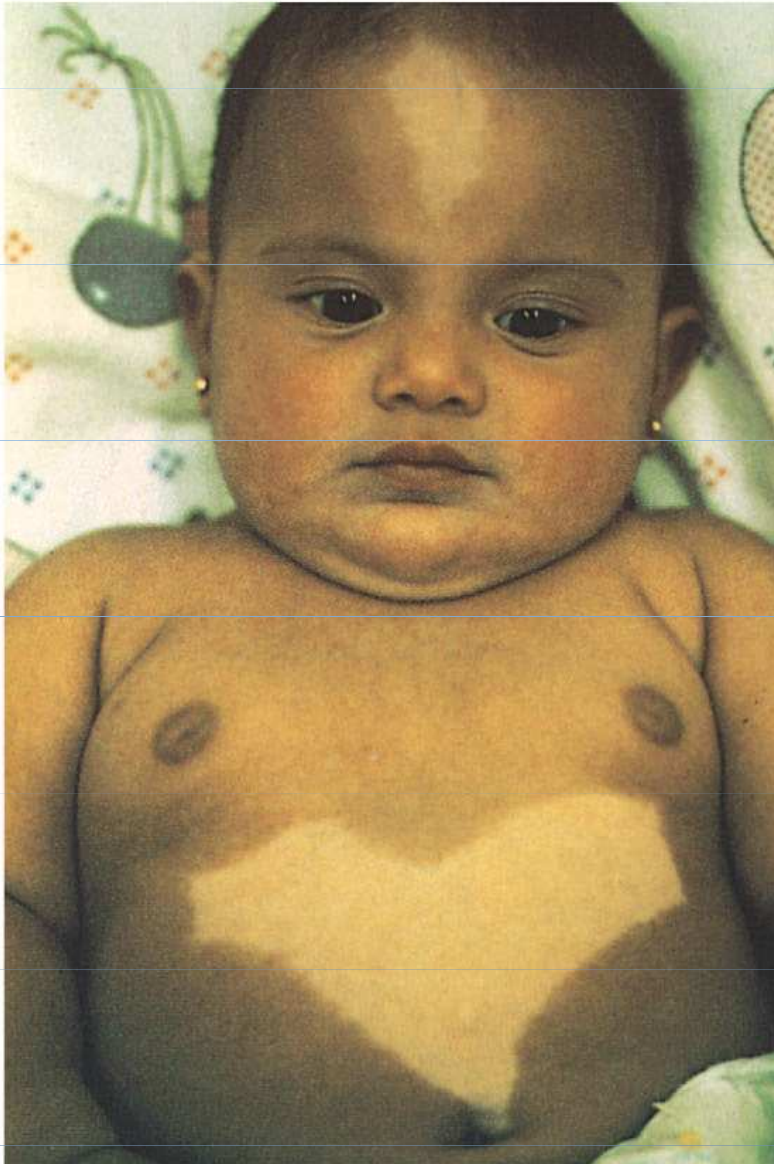
- savec
- z toho plyne, že embryonální vývoj je ze všech modelů nejpodobnější člověku
- genom sekvenován
- jedinečný díky možnostem genetických manipulací (transgenní myši)



*"... and stay away from scientists – they cause cancer."*

# Myš je velmi relevantní model pro studium lidské embryologie

(A)



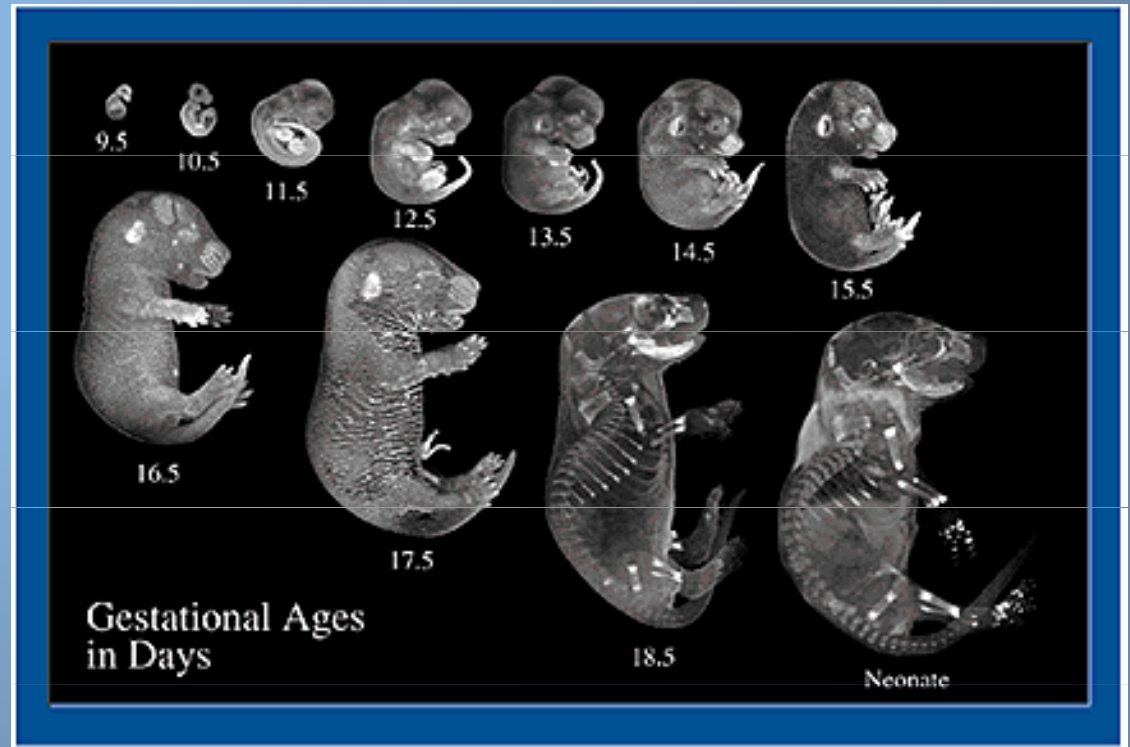
(B)



piebaldismus

# Myš - nevýhody

- relativně dlouhý generační čas
- embrya obtížně přístupná experimentální manipulaci – pouze v děloze matky
- finančně náročný model



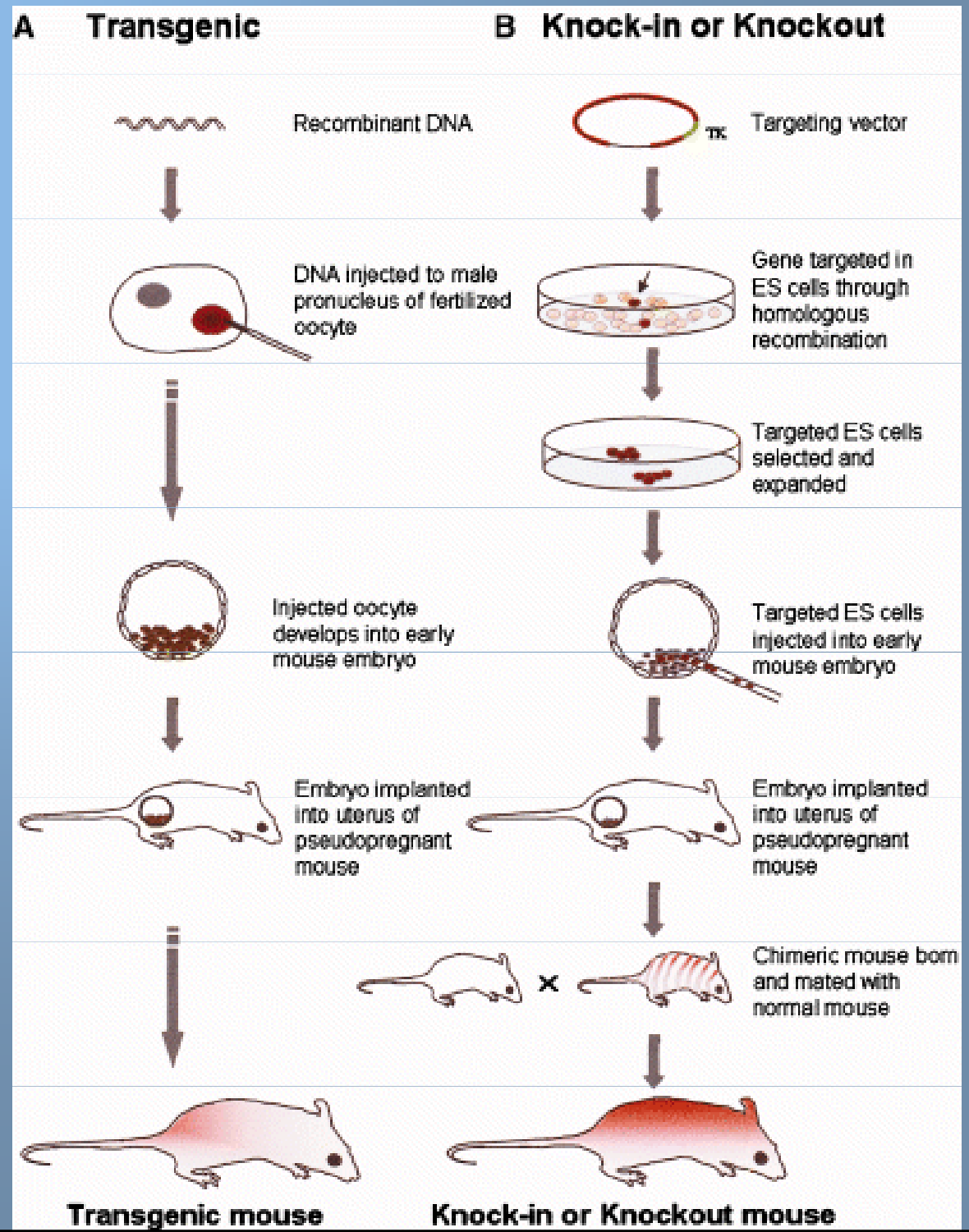
# Transgenní myš

Nobelova cena 2007

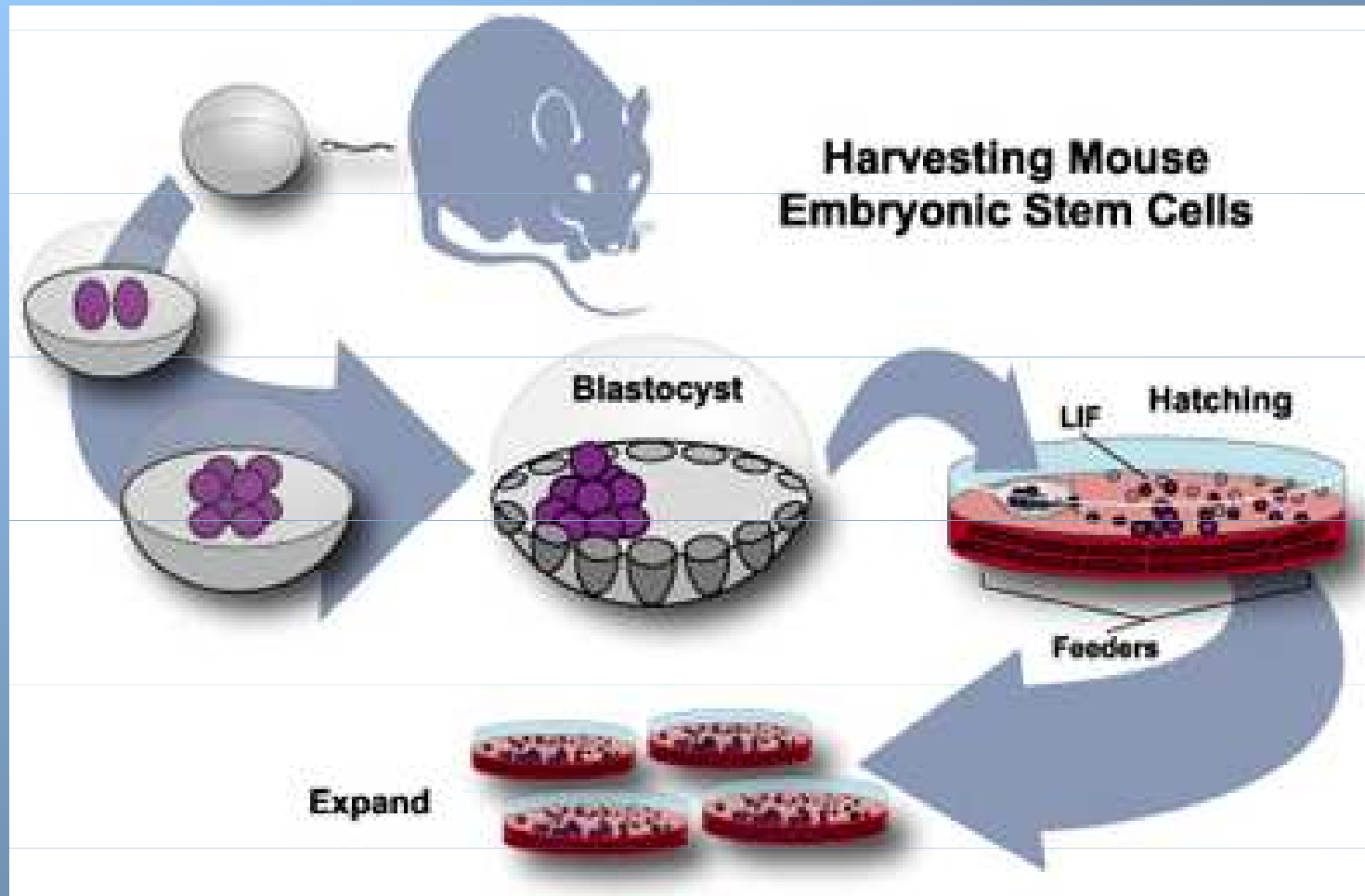
**Mario R. Capecchi,  
Martin J. Evans and  
Oliver Smithies**

za

„principles for  
introducing specific  
gene modifications in  
mice by the use of  
embryonic stem cells“



# Příprava myších kmenových buněk

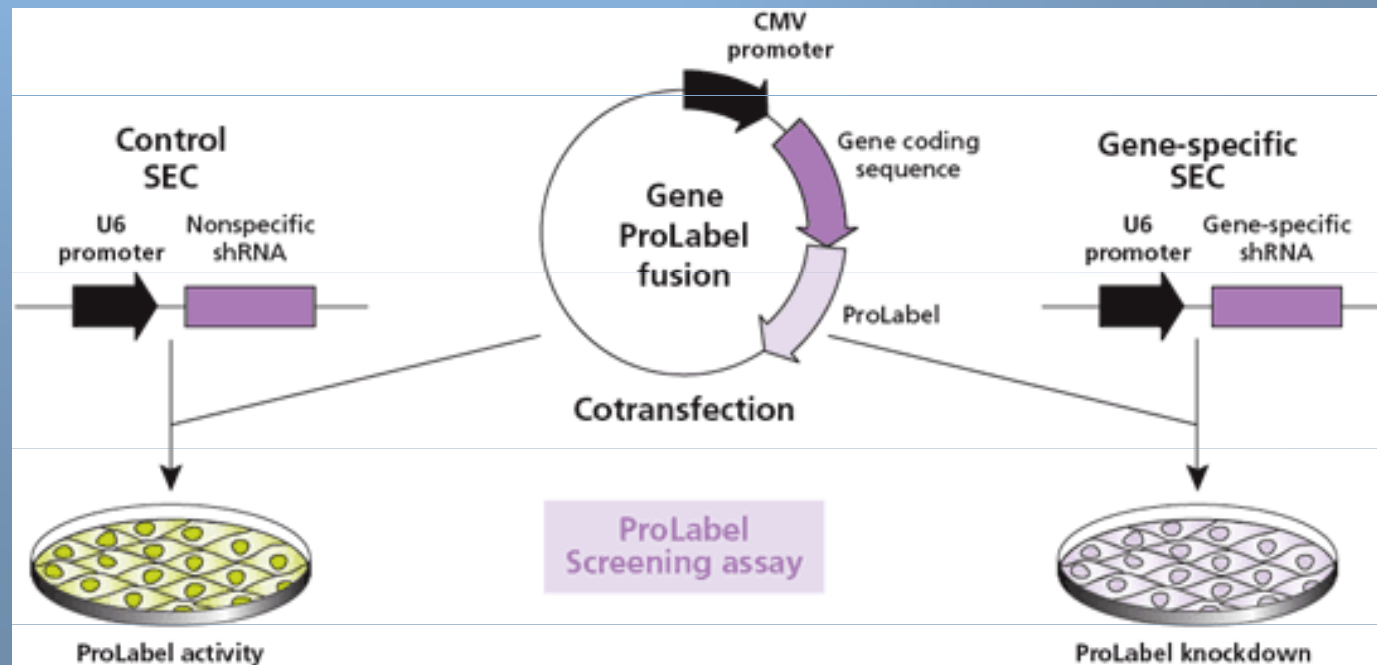


# Transgenní myš – state of the art:

- knock-in myši – umožňují záměny genů, vnesení bodových mutací atd.
- kondicionální knock-out/in myši založené na Cre-recombinázovém systému
  - a) pouze v určité tkáni/typu buněk
  - b) pouze po vnější stimulaci (tzv. inducibilní Cre), tj. v experimentálně určeném čase
  - c) náhodně – v určitém procentu buněk, využití pro lineage tracing

# Kondiciovaná genová exprese

- Změna genomu – „zapnutí/vypnutí“ genu
- Transaktivace transkripce, rekombinace DNA
- Řada biologických procesů



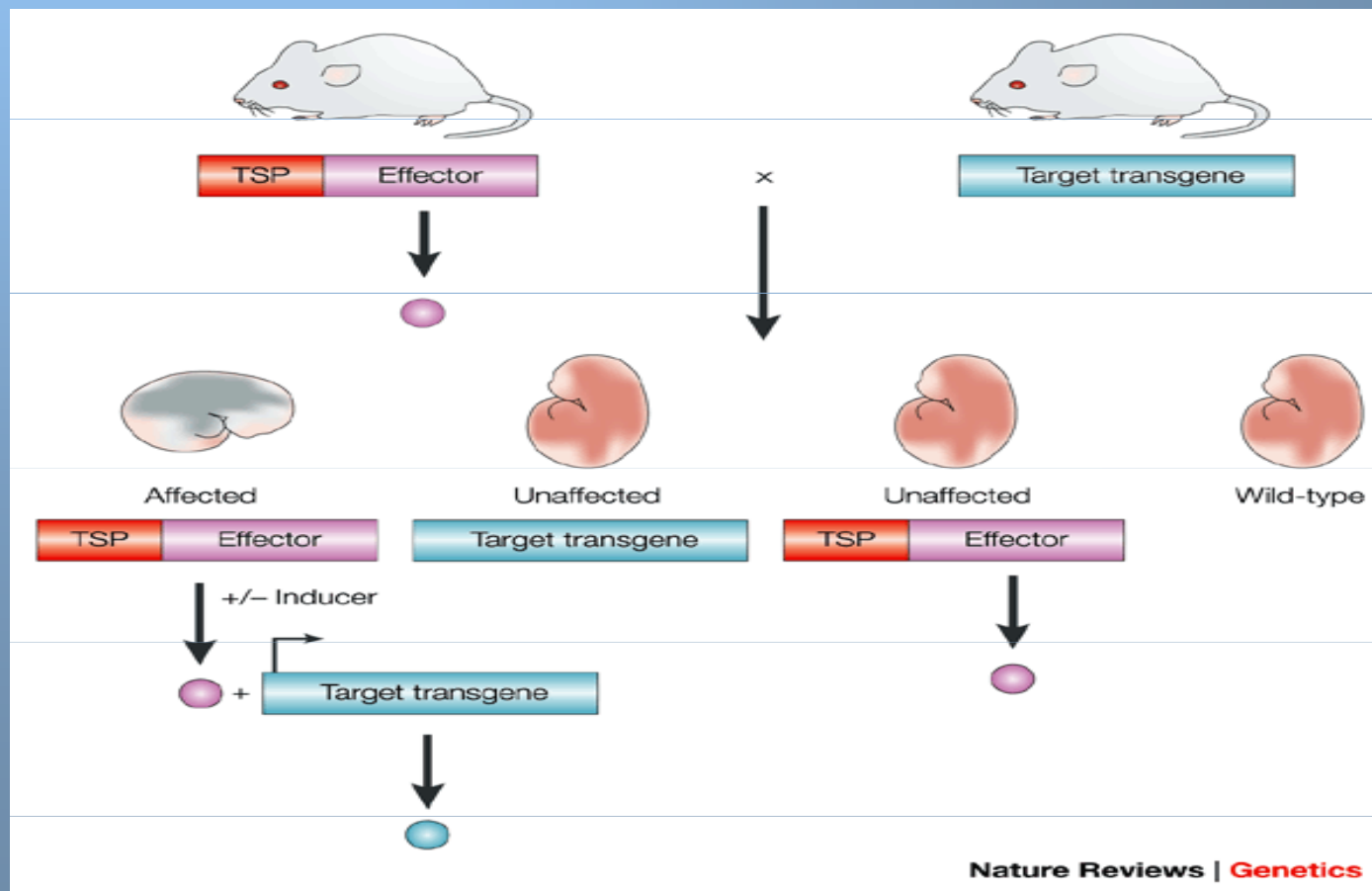


# Binární transgenní systém

- Dříve – krátké sekvence transgenu s ovlivnitelným promotorem
  - Ovlivnění: těžké kovy, teplotní šoky, interferony, steroidy
- Krátké sekvence: pleiotropní efekty, vysoká bazální aktivita bez přítomnosti induktoru

# Binární transgenní systém

- Binární systém – efektor + transgen



# Transkripčná transaktívacia

= aktivácia transkripcie génov prostredníctvom špecifických regulačných proteínov

Binárny transgénny systém expresie génov kontrolovaný interakciami medzi efektorovým transgénom so špecifickým promotorom (transaktivátor) a cieľovými transgénmi, v prítomnosti indikátoru.

V 1. binárnom systéme, transgénna transkripcia bola transaktivovaná virovým proteínom – upustenie

VP16 proteín z Herpes simplex – kontrola transkripcie cieľových transgénov obsahujúcich VP16 response element

## Výhody:

- reverzibilita expresie cieľových génov
- senzitivita stupňa transgéennej aktivácie ku koncentrácii indikátoru
- schopnosť kontroly expresie viac ako jedného cieľového transgénu

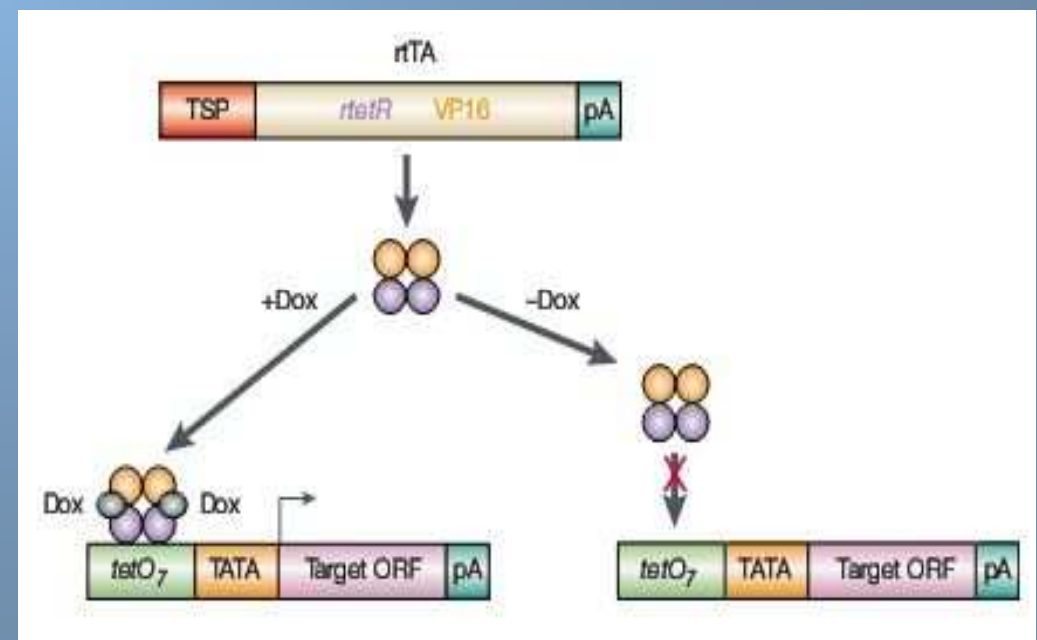
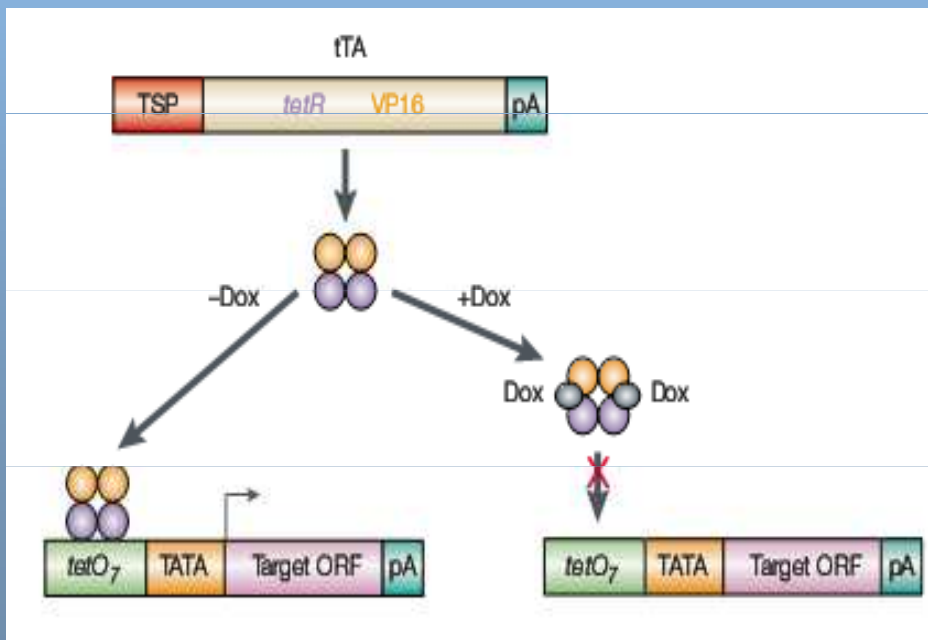
modely: TetR-based system

Gla4-based system

# TetR-based system

(tetracycline-dependent gene expression system)

- Manfred Gossen a Hermann Bujard
- efektor – VP16 transaktivačná doména + E.coli tetracycline represor (TetR) gene
- indikátor – doxycycline (Dox)
- verzie systému:
  - originálna: tet-off (tTA nedokáže viazať DNA v prítomnosti indikátoru)
  - modifikovaná: tet-on (rtTA viaže DNA iba v prítomnosti indikátoru)



# TetR-based system

(tetracycline-dependent gene expression system)

Využitie: embryogenéza  
tumorigenéza, cancerogenéza  
nádorová terapia

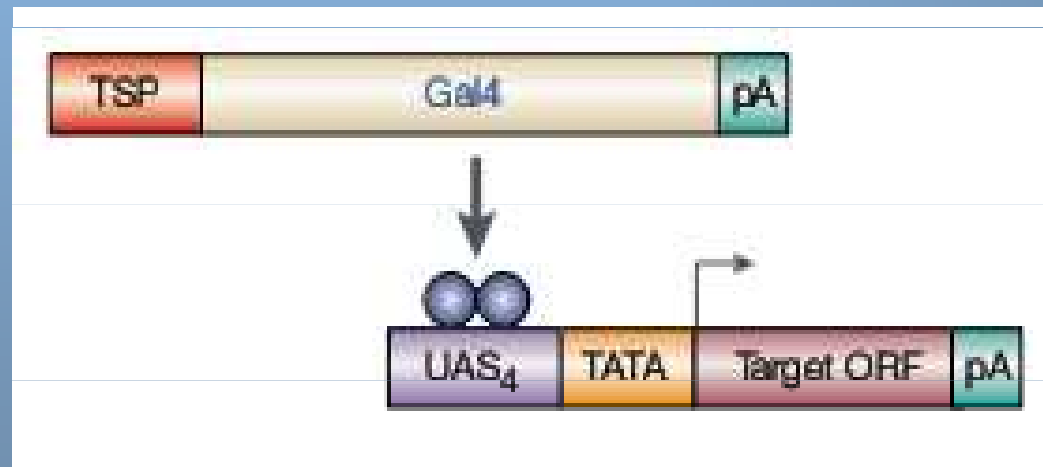
Modifikácie: transaktivačných domén  
trans-represorových domén  
codon-usage modifikácie  
variácie konfigurácie *tetO* sekvencie

# GAL4-based system

Efektor: Gal4 transkripčný transaktivátor zo *Saccharomyces cerevisiae*  
UAS – upstream activating sequence

Gal4/UAS systém používaný k priamej transgéennej aktivácii je prvý binárny nevirový systém aplikovaný na myšiach

Štúdia Sonic hedgehog (Shh) v dorzo-ventrálnom patterningu vo vývoji centrálnej nervovej sústavy u myši

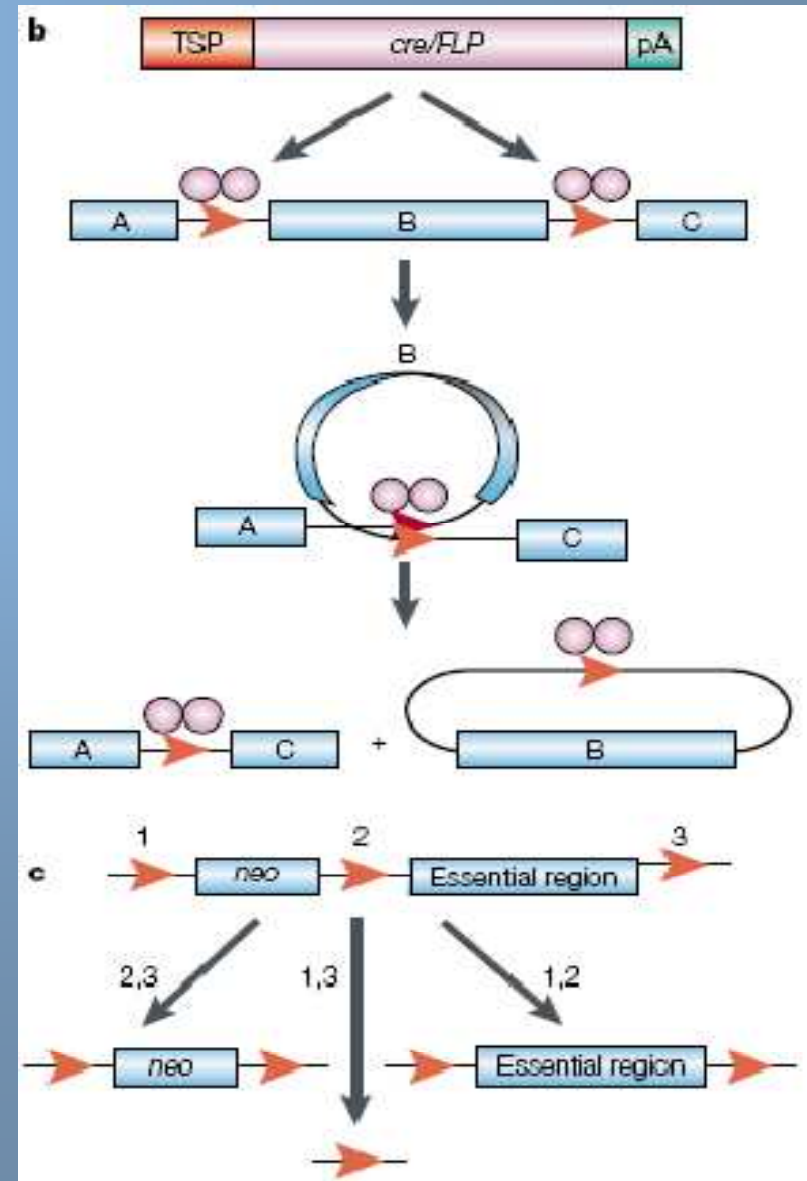


# Místně specifická rekombinace DNA

- Místně specifické rekombinázy:  
Cre (z bakteriofága P1)  
Flp (ze *Sacharomyces cerevisiae*)
- Vlastnosti: rekombinují jen určitá místa ( loxP resp. FRT),  
nevyžadují přídatné proteiny ani kofaktory
- Cre/loxP systém vs. Flp/FRT systém

# Princip místně specifické rekombinace

- Umlčení nebo aktivace genové exprese
- Exprese Cre nebo Flp rekombinázy (které katalyzují rekombinaci mezi příslušnými rozpoznávacími místy)
- Odstranění fragmentů DNA, které jsou obklopeny přímými repeticemi (loxP nebo FRT)





# Tkáňově specifické vypínání genů (knockout)

- Výhodou je, že můžeme obejít letální fenotyp a také podrobně zkoumat biologické procesy
- Postup:
  - Produkce myší, u kterých je gen zájmu obklopen místy loxP
  - Linie myší, které exprimují Cre jen v určitých tkáních
  - Křížením vznikne potomstvo, kde je gen našeho zájmu inaktivován jen v buňkách, které exprimují Cre
  - Ke správné interpretaci fenotypu je třeba vědět, ve kterých buňkách došlo k rekombinaci- užití reportéru
- Hypomorfní alela

# Aktivace genů katalyzovaná Cre

- K aktivaci dojde
  - Odstraněním STOP DNA (která zabraňovala transkripci daného genu)
  - Obnovením ORF (který byl přerušen nějakou sekvencí)

## Časová regulace exprese Cre

# Závěr

- Kontrola exprese dvou a více genů ve stejné myši
- Změna nejen na úrovni DNA a RNA, ale i na úrovni proteinu

**Děkujeme za pozornost**

