

Myš jako model
vývojové
biologie

Vendula Pospíchalová

SCIENCEPHOTOLIBRARY

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

Schéma přednášky

I. Myš jako laboratorní model

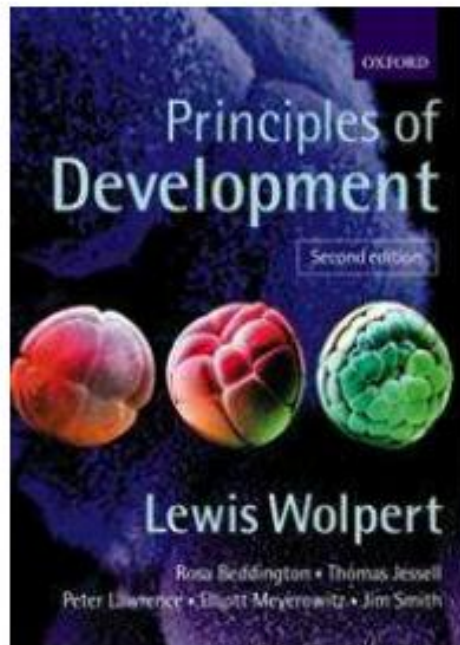
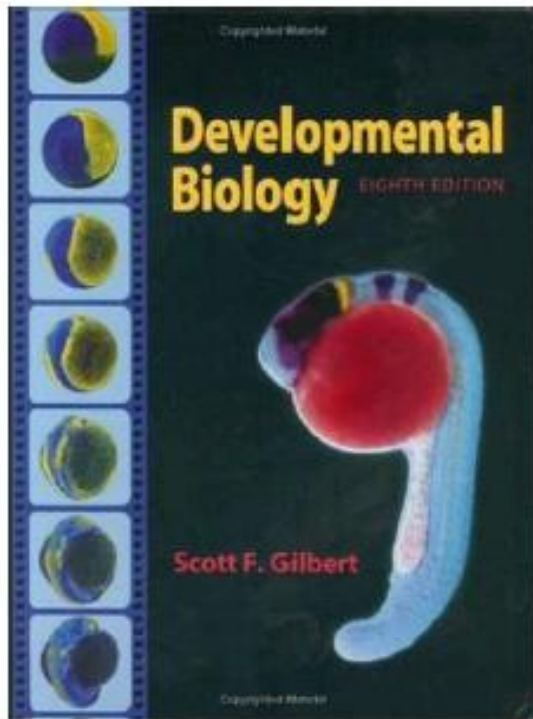
- Životní cyklus
- Chov
- Kmeny



II. „Experimental toolbox“

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

Doporučená literatura



+ mnoho internetových zdrojů

Related Books



[Manipulating the Mouse Embryo: A Practical Approach](#)
By Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer



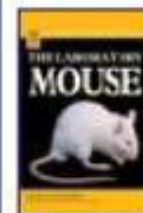
[Atlas of Mouse Development](#)
By Matthew H. Kaufman



[Mouse Phenotypes: A Handbook of Mouse Phenotypes](#)
By Virginia E. Papaioannou, Richard R. Behringer

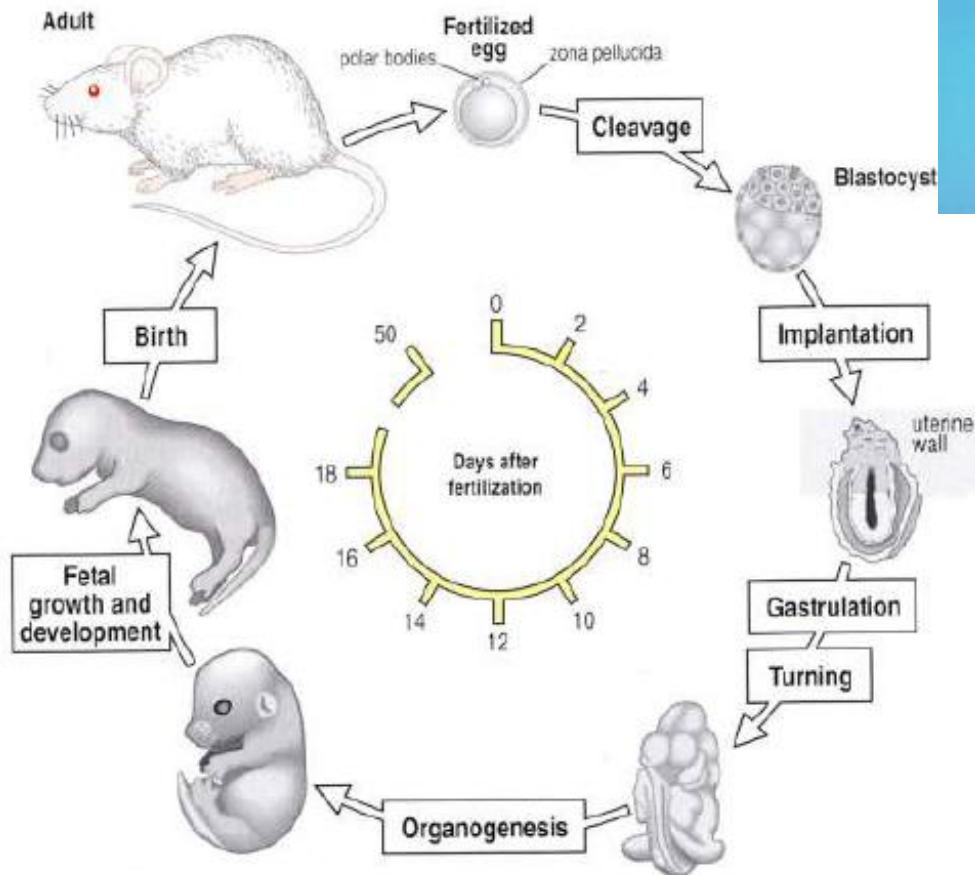


[The Anatomical Basis of Mouse Development](#)
By Matthew H. Kaufman, Jonathan B.L. Bard



[The Laboratory Mouse](#)
By Hans Hedrich

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

Chov laboratorních myší

- Relativně nenáročný – v klíčkách –
podestýlka, voda, granule
- 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.)

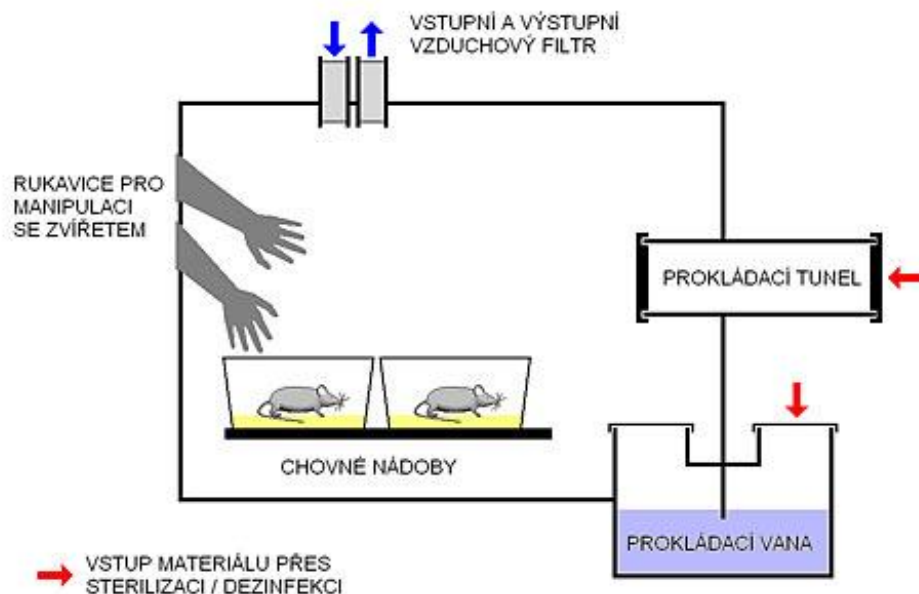
Protozoa (*Giardia muris*, *Encephalitozoon cuniculi*)

Ectoparasites

Mites (*Myobia musculi*, *Myocoptes musculinus*, *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)



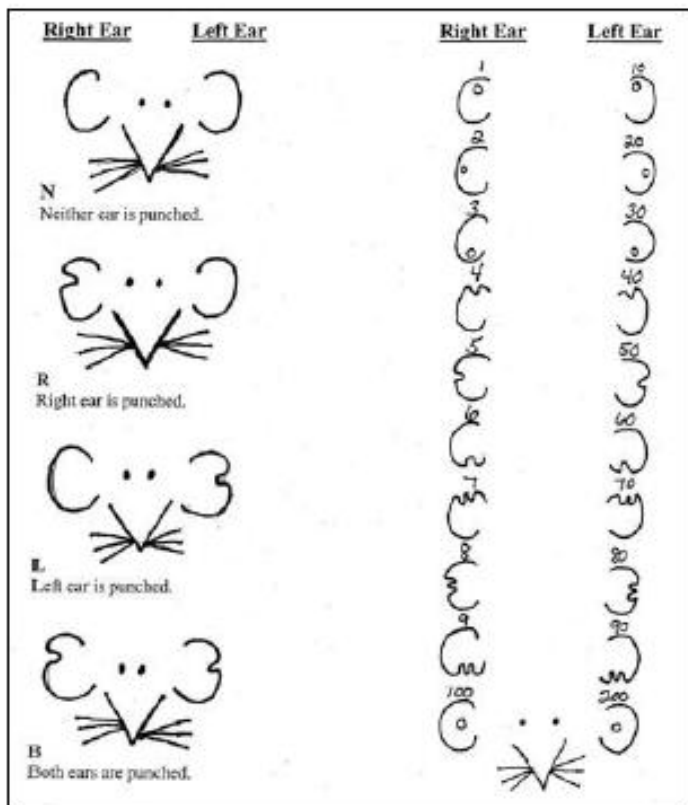
Archivace myších kmenů – kryoprezervace – embrya a spermie

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

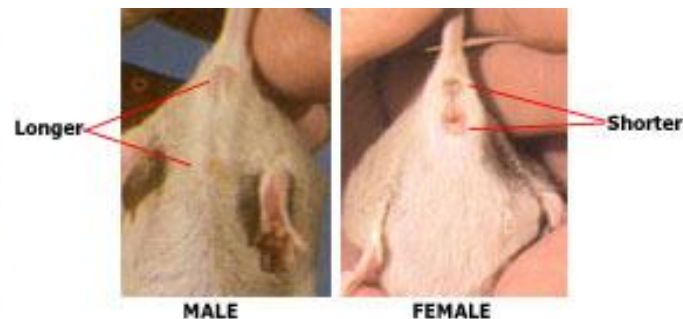
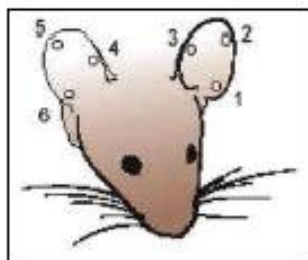
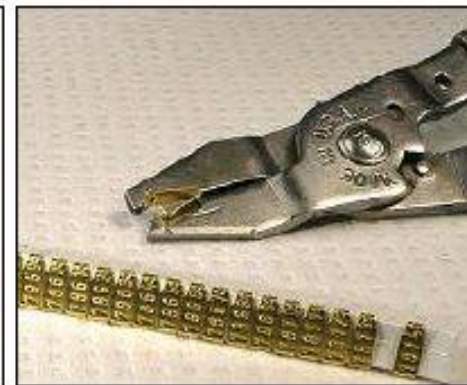
Legislativa - každý, kdo pracuje s myšmi musí mít oprávnění pro nakládání s laboratorními zvířaty, dle § 17 zákona 246/1992 Sb.
Na ochranu zvířat proti týrání

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

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

Breeding Performance

History Comments Add Comment Add Procedure Weight

History					
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)

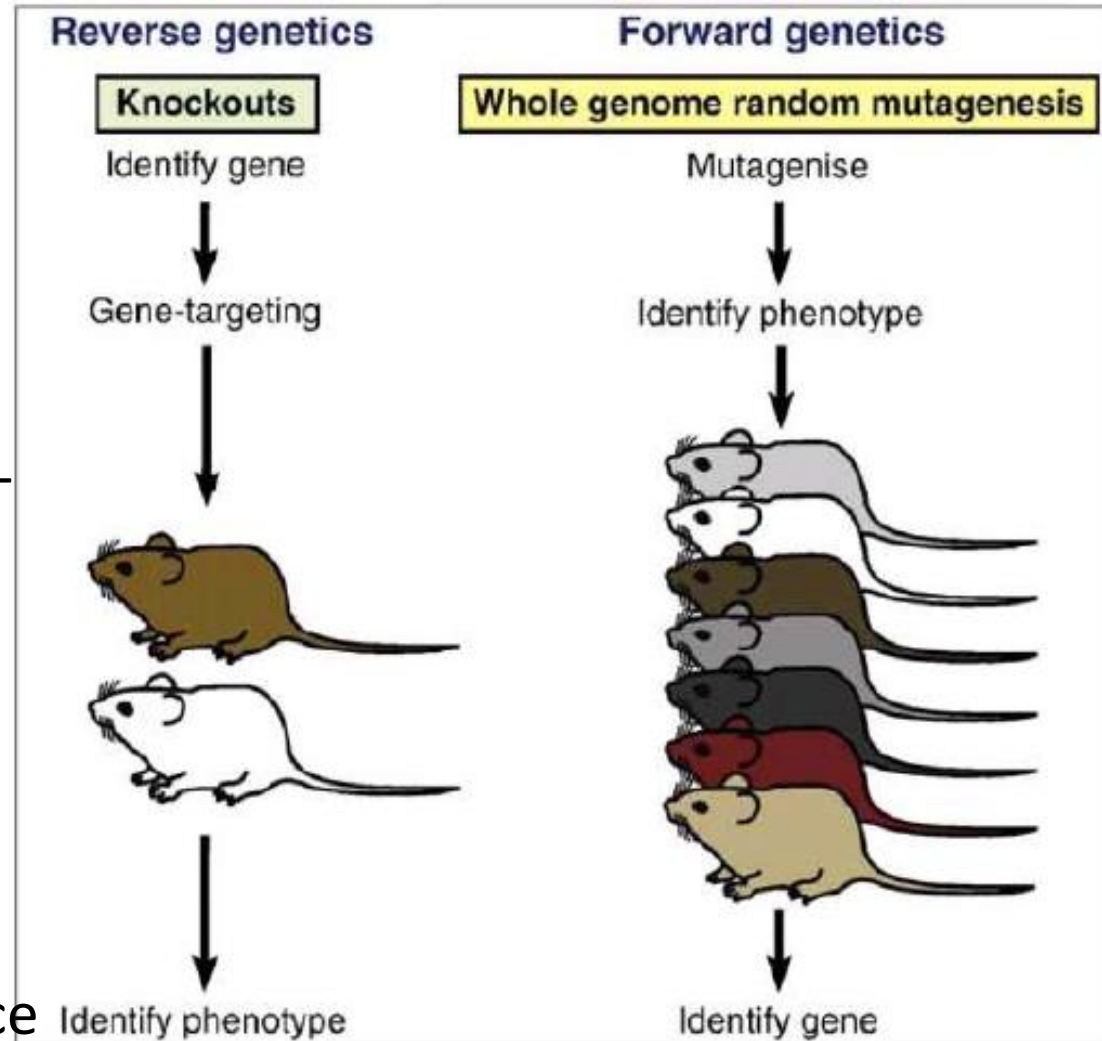
1. fenotyp (znak)
2. gen

- 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

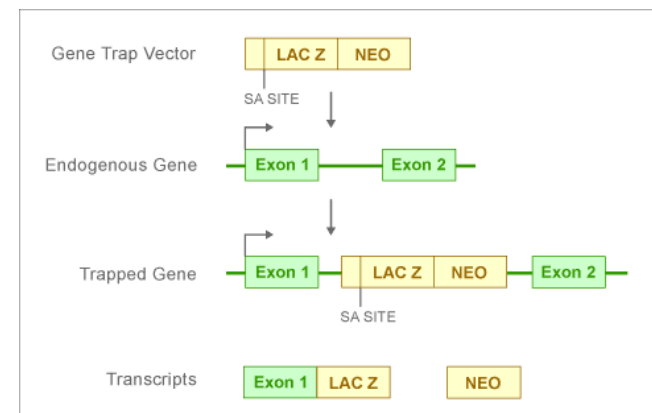
- **1966:** vznik (Glasgow, UK), **1968:** myši jsou imunodeficientní (nemají thymus), **1996:** myši jsou mutantní v transkripčním faktoru *Foxn1*



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

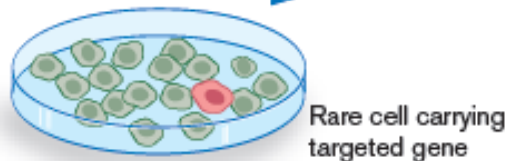
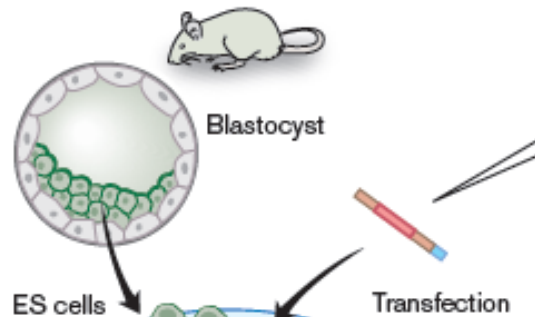
"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells".

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

Step 1 Gene targeting in ES cells

1. ES cell culture

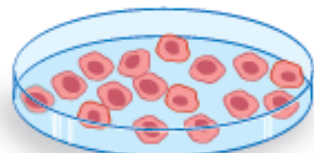
Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).



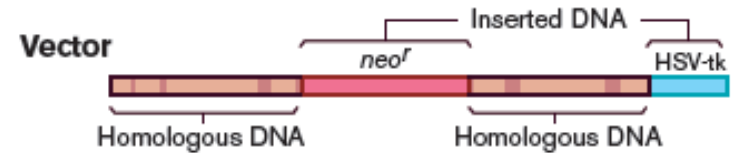
Positive-negative selection

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

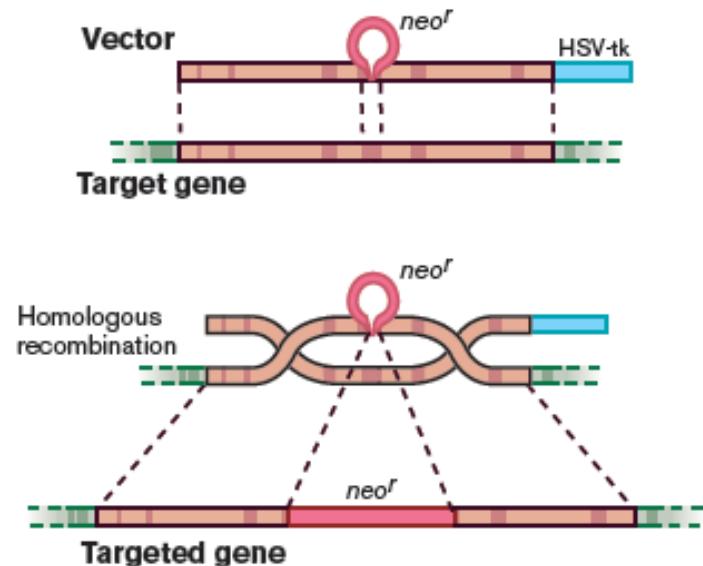


2. Construction of targeting vector

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

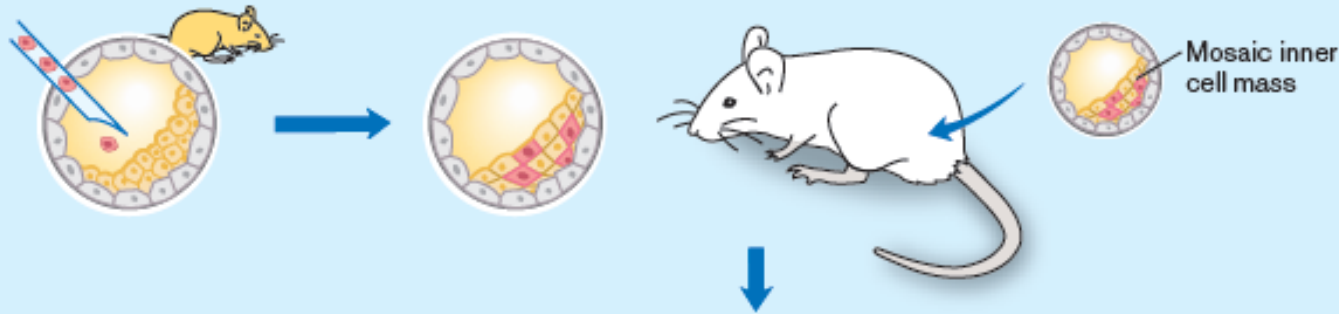


5. Injection of ES cells into blastocysts

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.



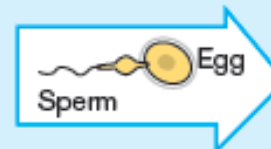
6. Birth and breeding of mosaic mice

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

Born mosaic mice



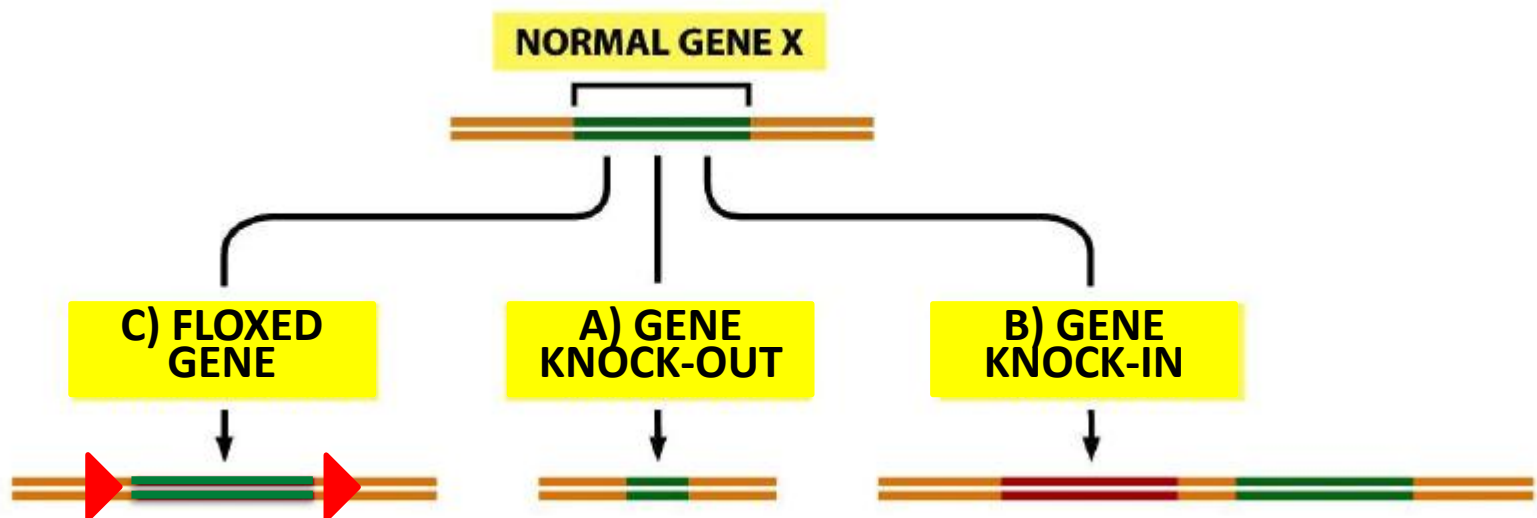
Gene targeted mice – called "knockout mice" when the targeted gene is inactivated



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

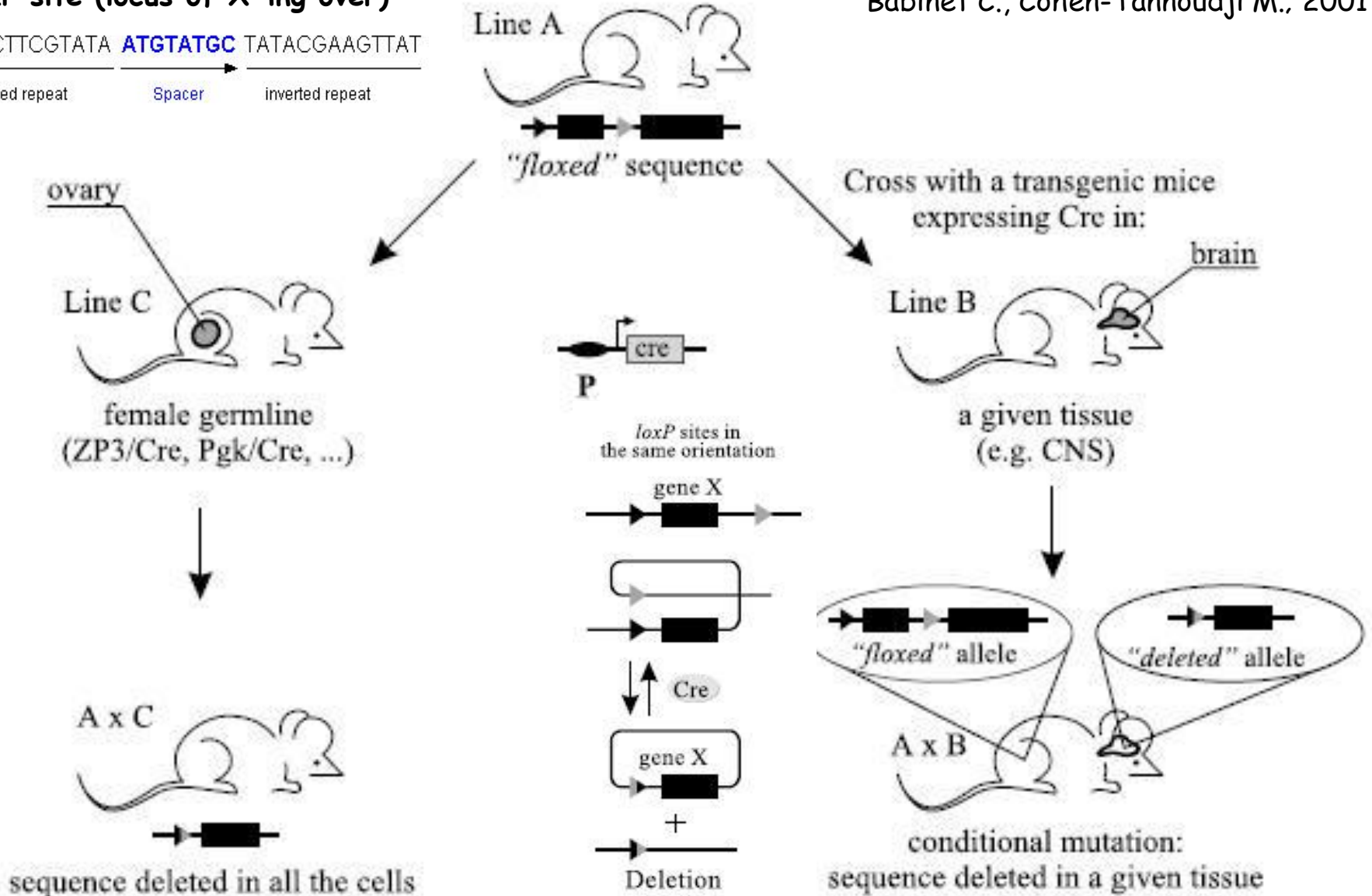


Cre/loxP systém

Babinet C., Cohen-Tannoudji M.; 2001

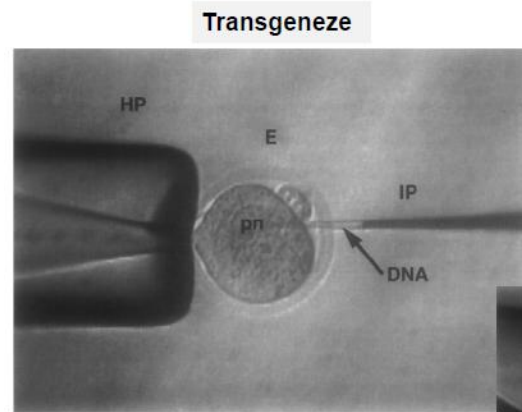
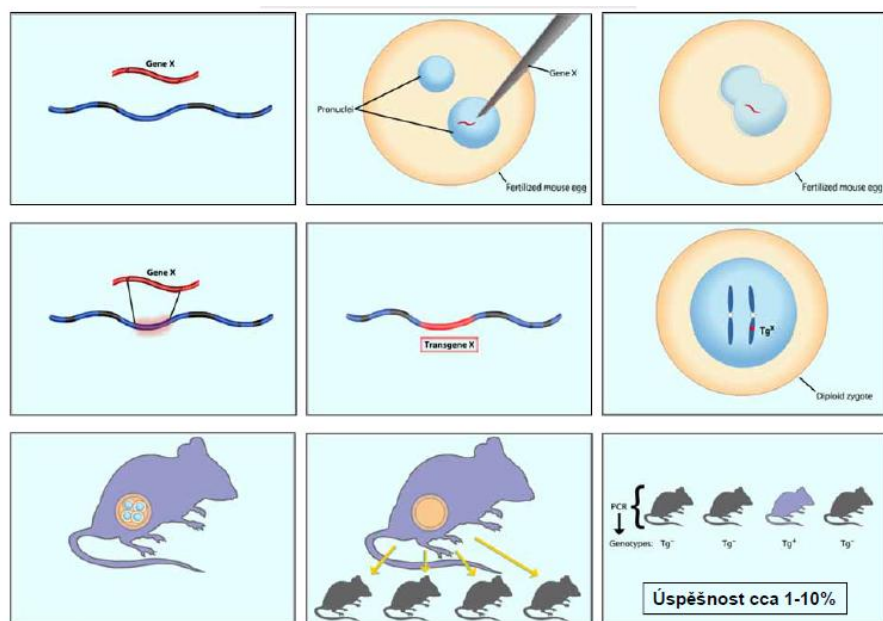
loxP site (locus of X-ing over)

ATAACTTCGTATA **ATGTATGC** TATACGAAGTTAT
 inverted repeat Spacer inverted repeat



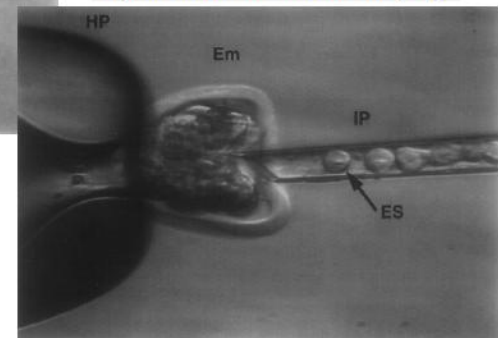
Transgenní zvířata

- **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

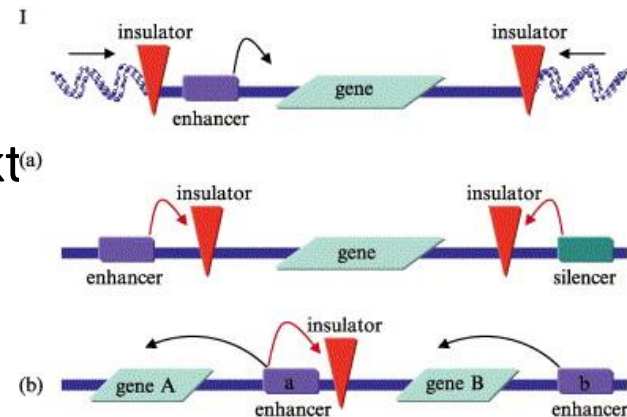


Transgenní myši

- **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 dózy“)

- **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?

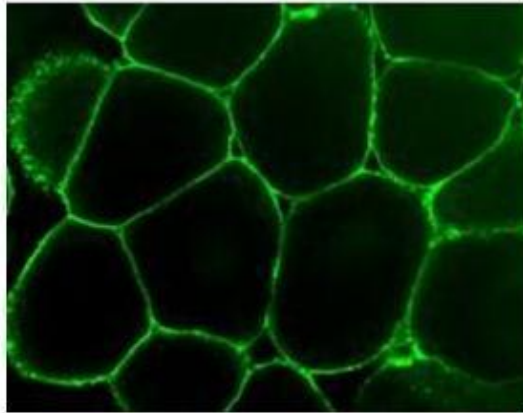


β -katenin je multifunkční protein

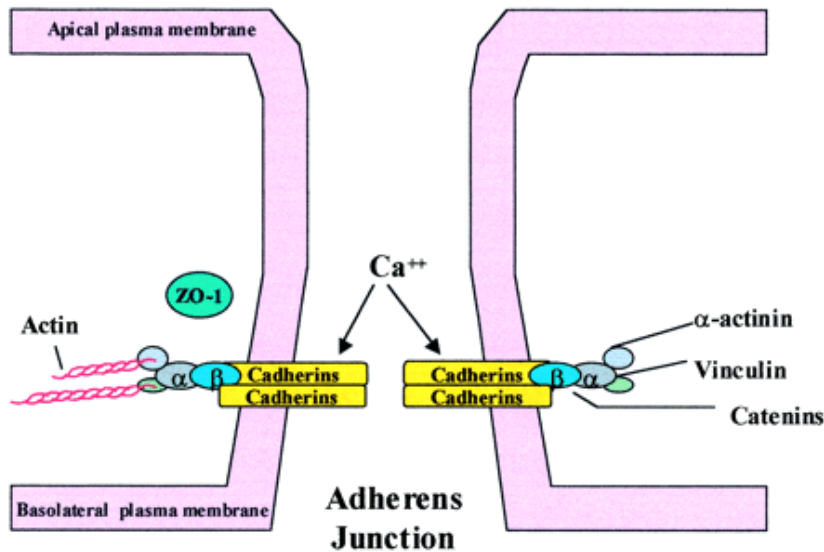
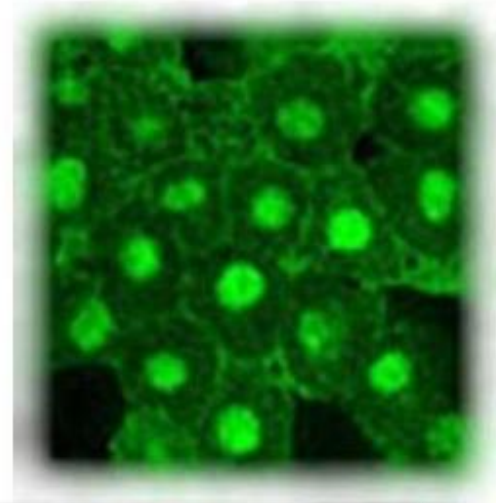
a) Mezibuněčné spoje (Ozawa et al., 1989)

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

adhesion



signaling



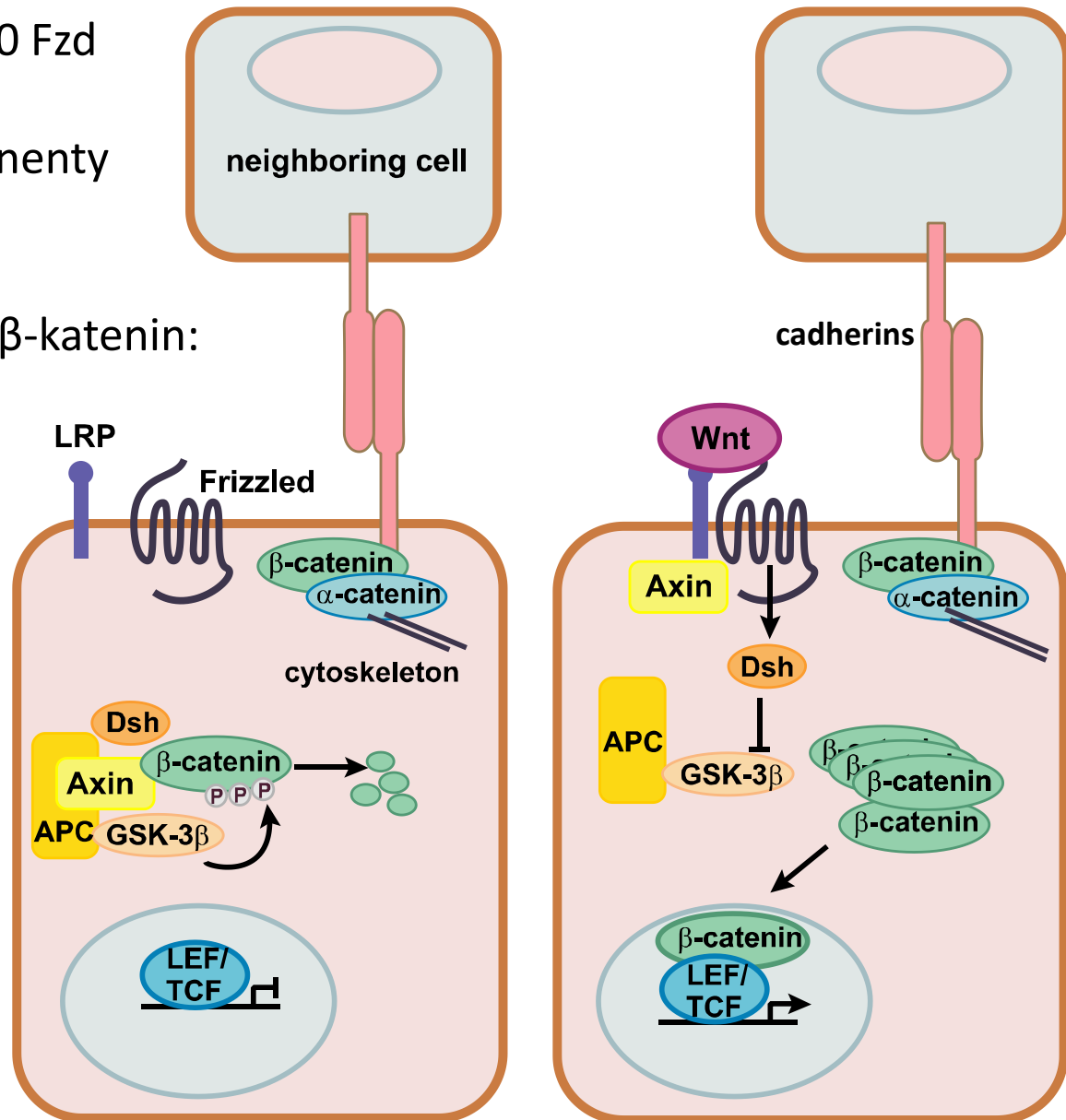
Armadillo –
ortolog beta-
kateninu
v *Drosophila*



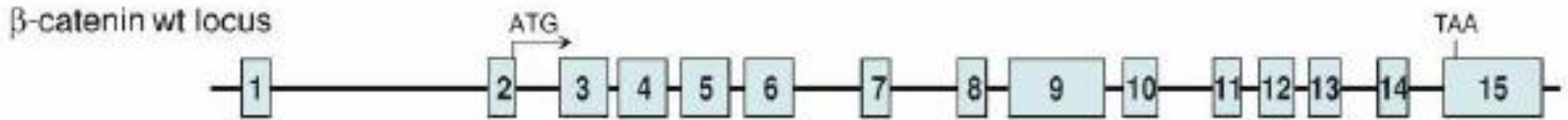
Segmenty
v embryu
Drosophily

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

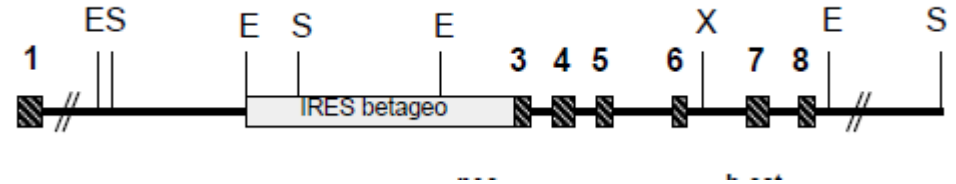


Klasický knock-out β -kateninu

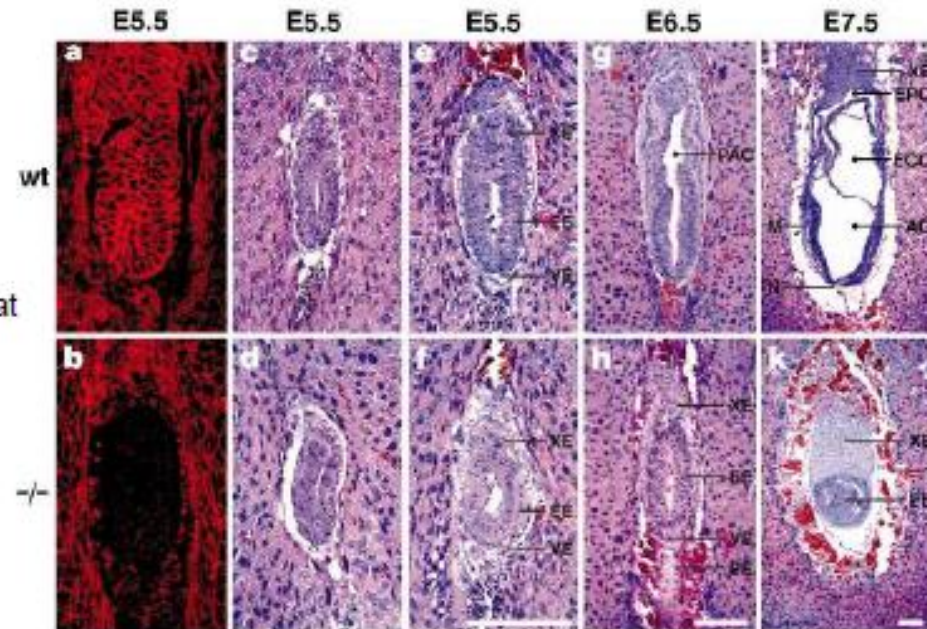


- ***Ctnnb1*** – velký gen (27 kBp) , kóduje protein β -katenin (781 aa)

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

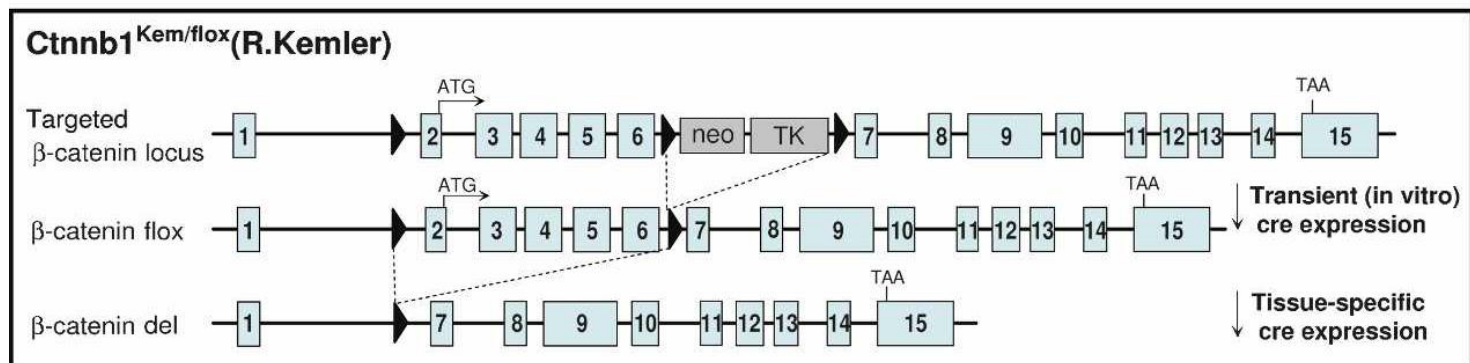
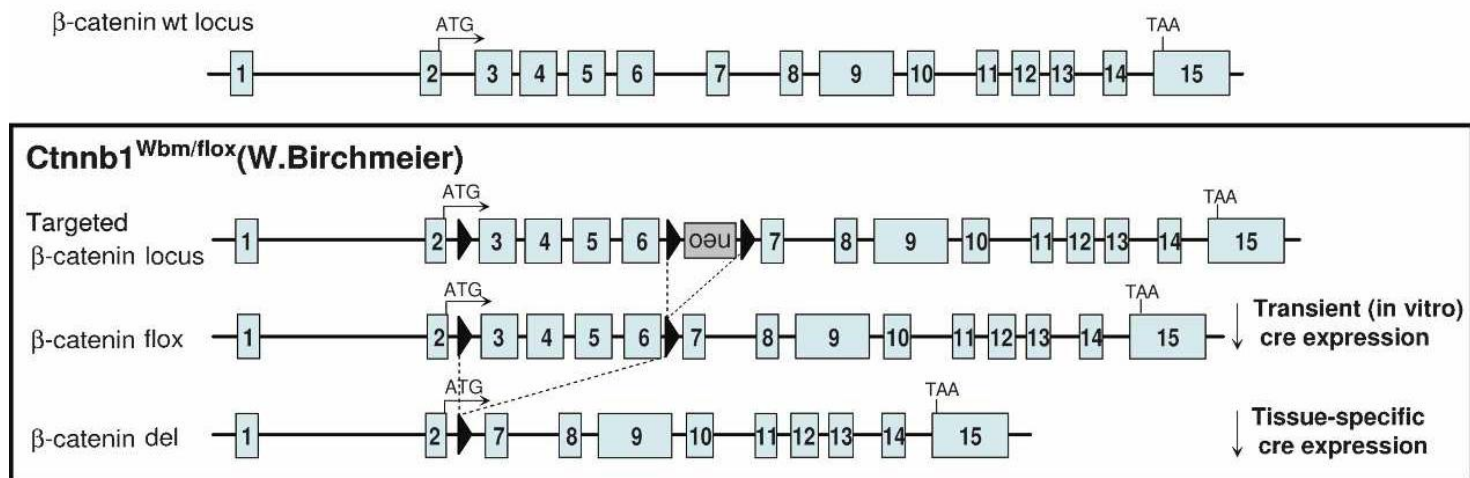


- ***Ctnnb1*^{-/-}** - gastrulační defekty, nevytváří A-P osu (E6) ani mezoderm (E7) – embryonálně letální fenotyp
- nemá defekty v mezibuněčných spojích -kompenzuje γ -katenin (Huelsken *et al.*,)



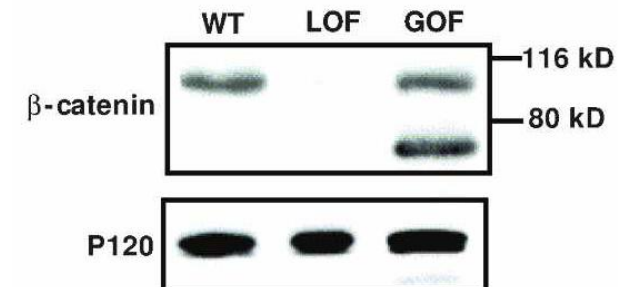
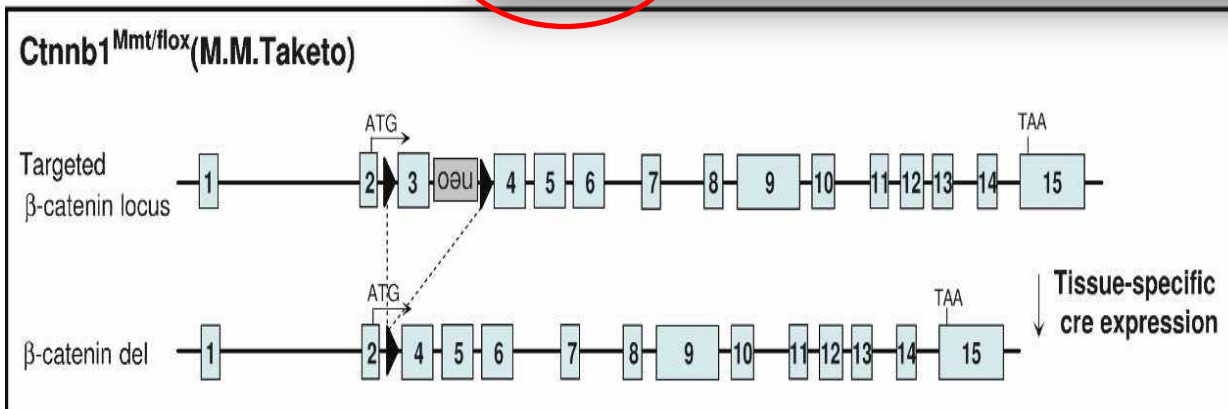
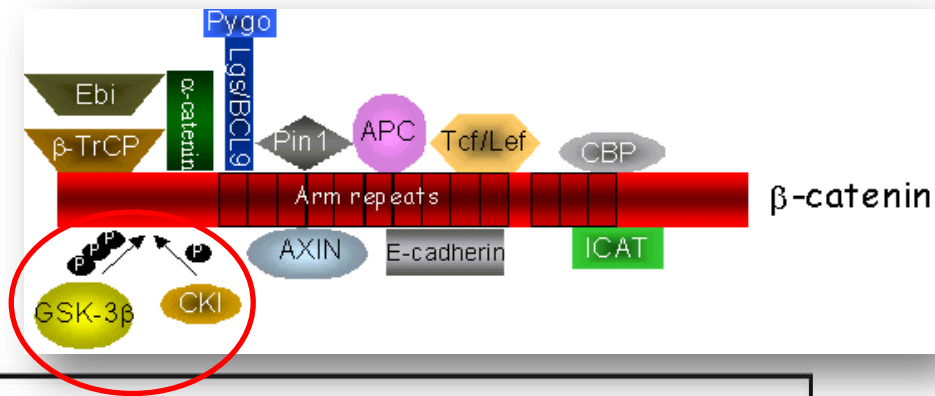
Podmíněný knock-out β -kateninu

- „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

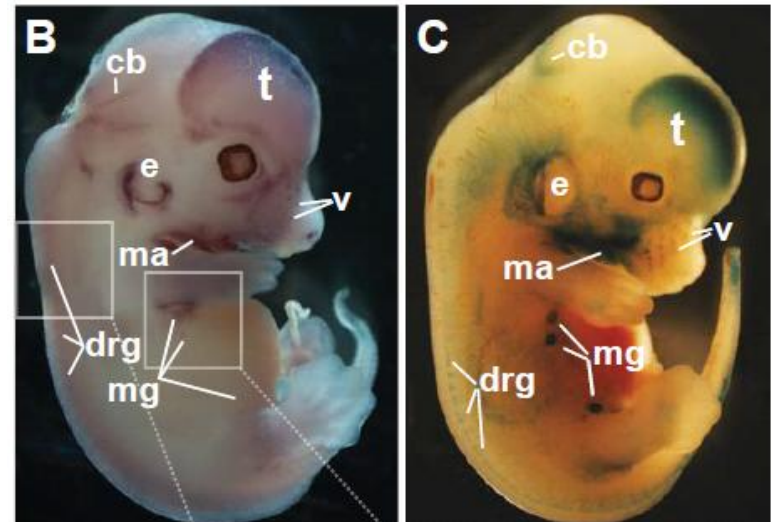
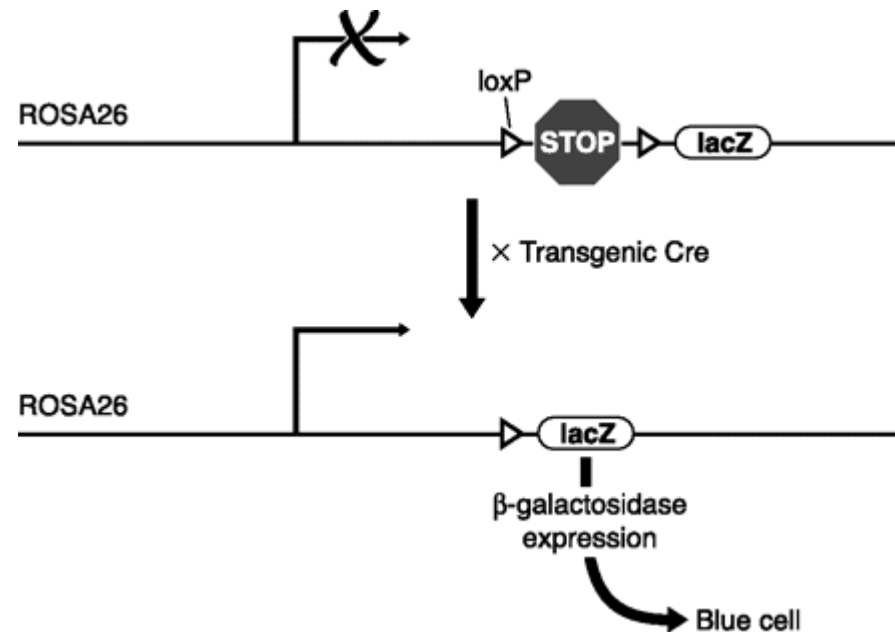
- „Gain of function“ (GOF) alela („exon 3“)
 - Po Cre rekombinaci delece exonu 3, ale fúze exonu 2 a 4 ve správném čtecím rámci – vzniká zkrácený protein bez N-koncové části s degradačním motivem (S45, T41, S37, S33) = stabilní
 - => kanonická signalizace Wnt trvale zapnuta



Cre rekombinázy („deleter strains“)

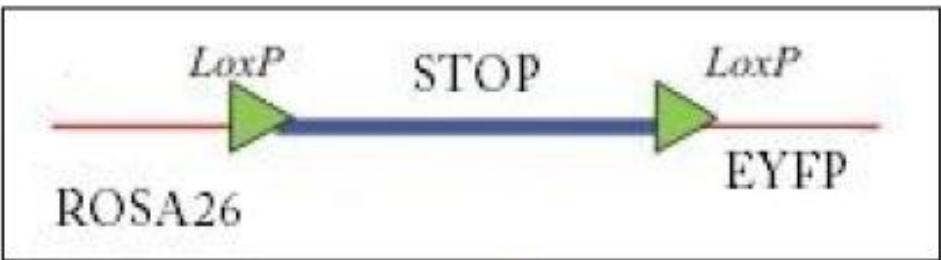
- Transgenní nebo „knock-in“ kmeny
- Exprese dána promoterem – vybíráme silné a tkáňově specifické
- Otestování aktivity pomocí reportérové myši – využití lokusu ROSA26, který je exprimován v průběhu embryogeneze a i v dospělosti ve všech buněčných typech

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

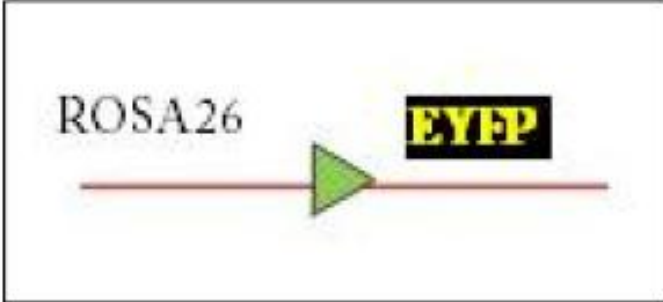


Expresi *Troy Cre* odpovídá expresi *Troy* (in situ hybridizace)

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



=

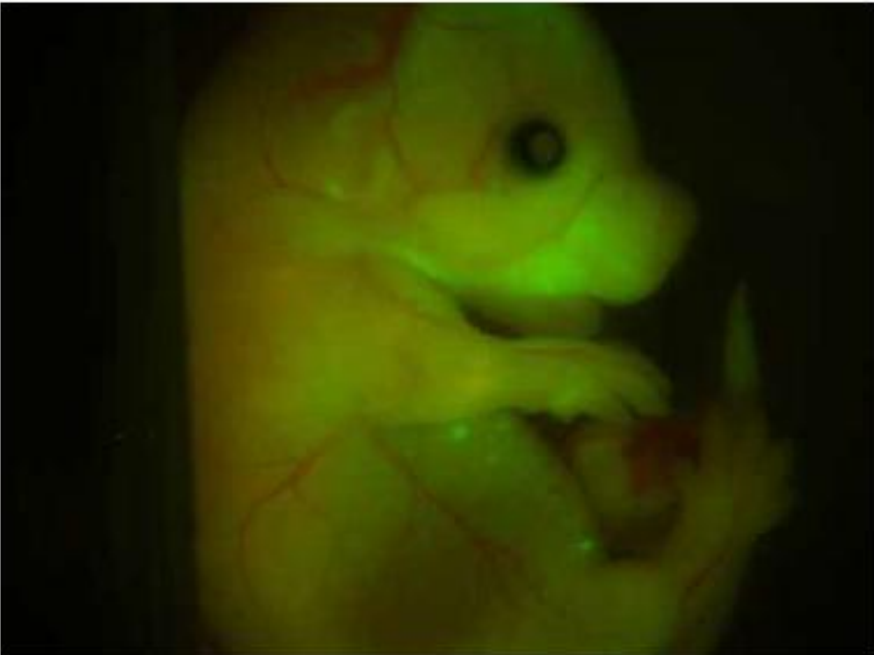


X

myš produkující Cre

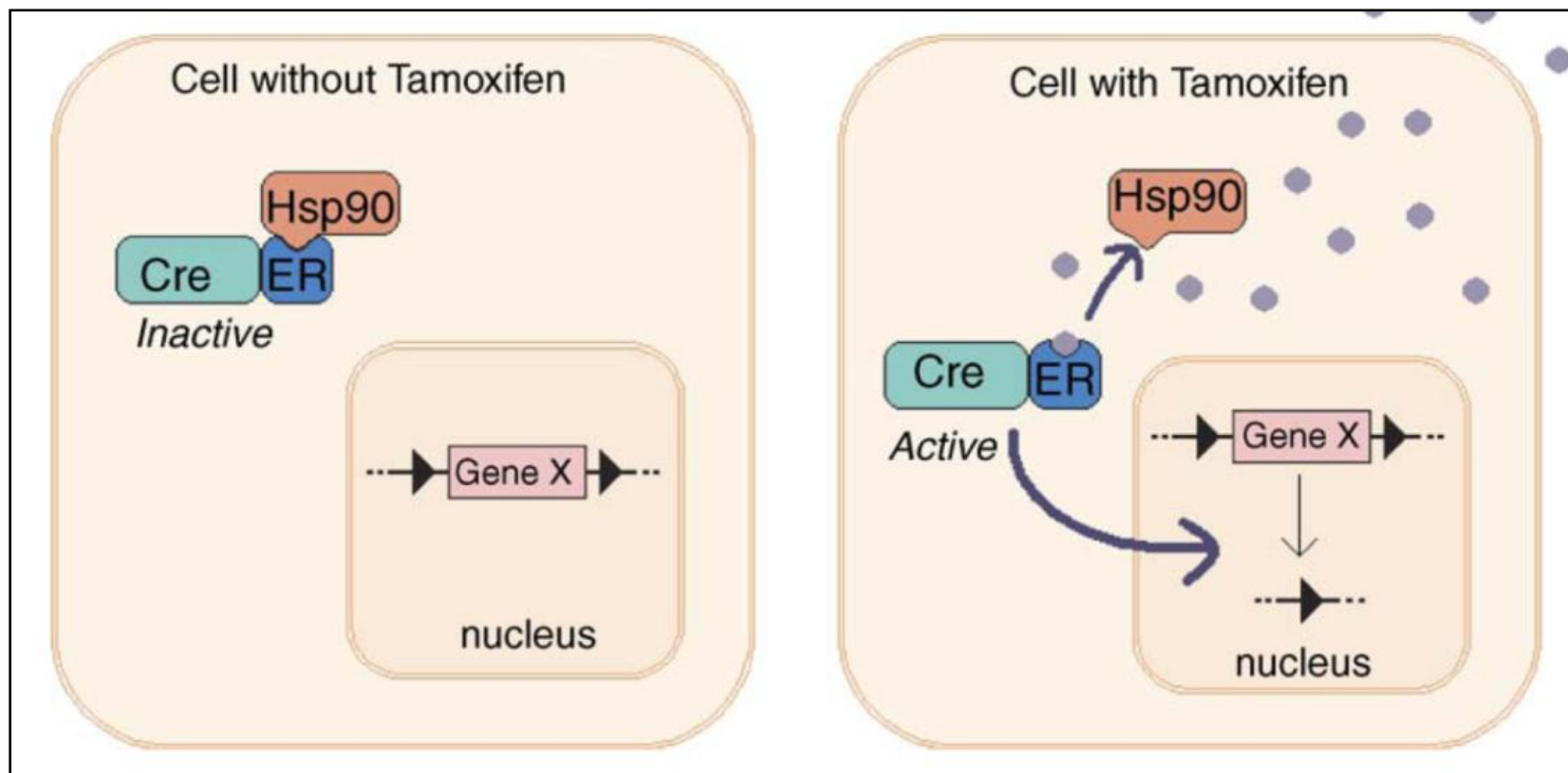
Troy Cre x Rosa26-loxP-(STOP)-loxP-EYFP

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



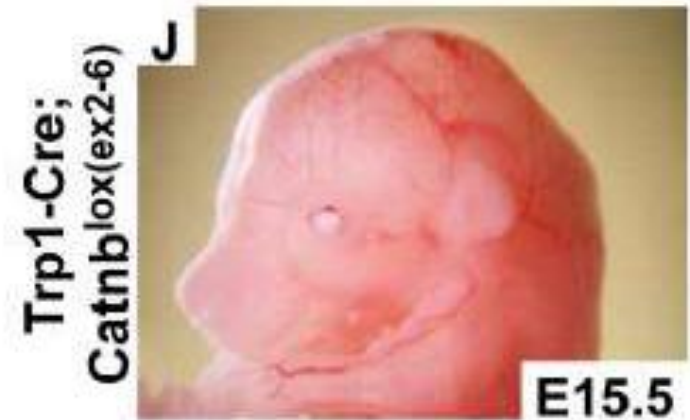
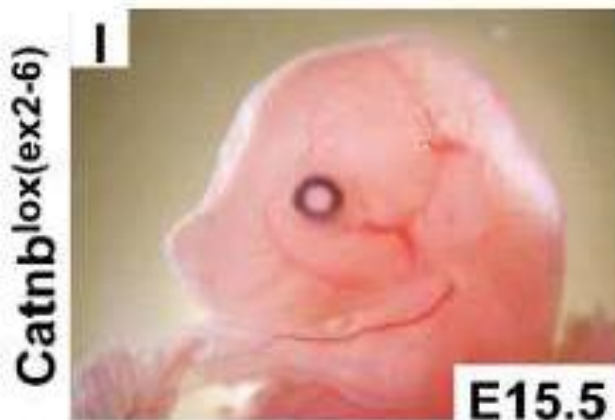
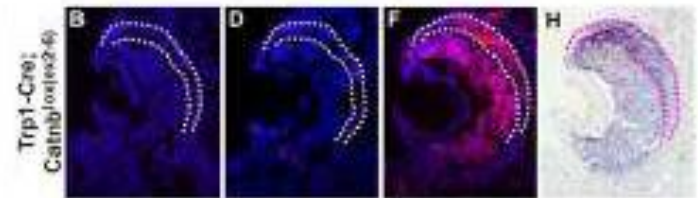
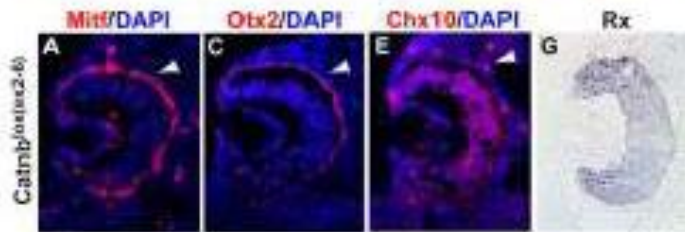
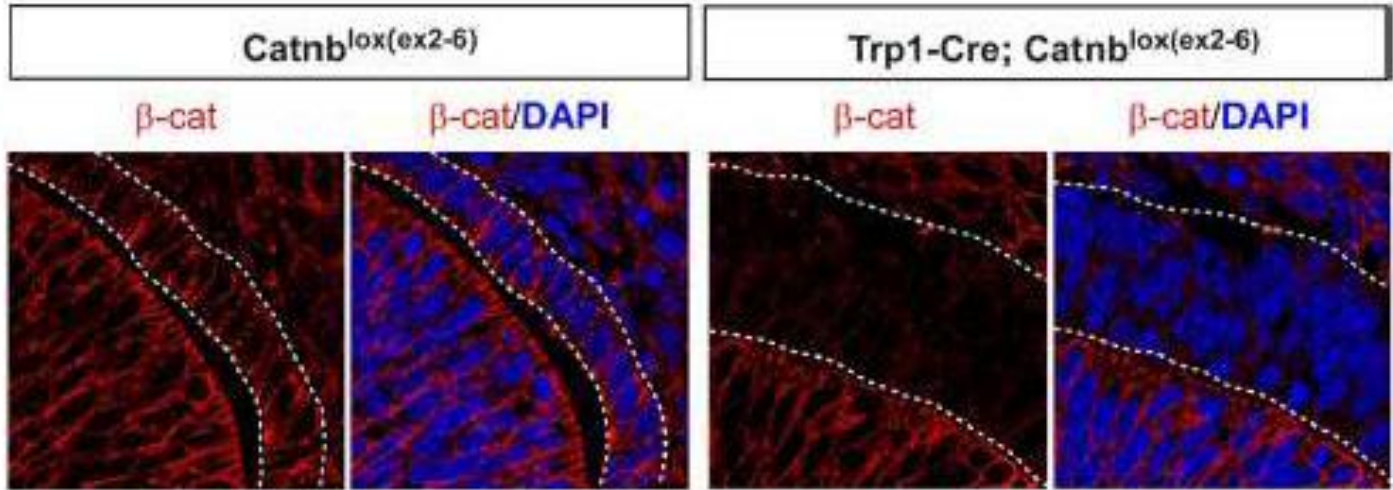
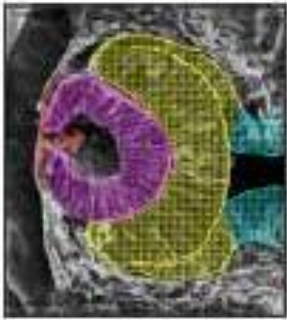
Cre recombináza fúzovaná s estrogenovým receptorem (CreER^{T2}) je regulována tamoxifenem

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

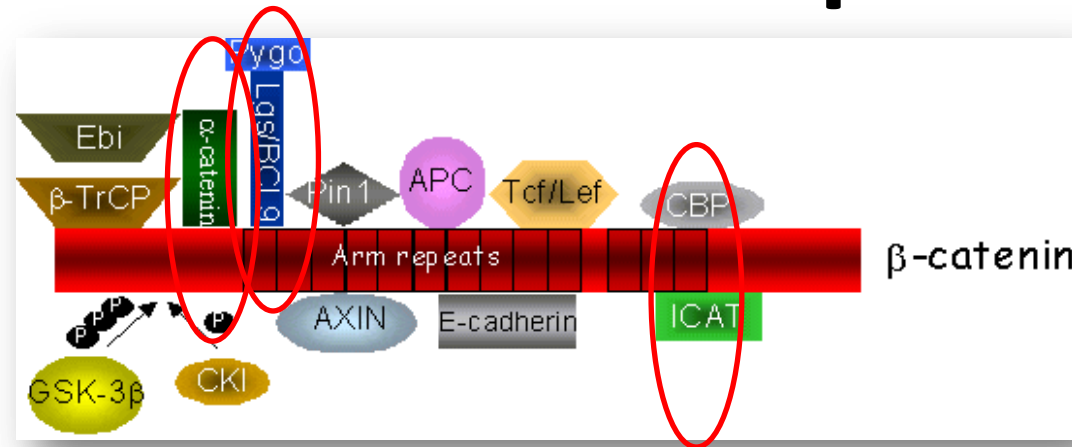


- CreER^{T2} – místně i časově specifická regulace rekombinace DNA

Experimenty odhalující funkci β -kateninu



Rozlišení duální funkce β -kateninu

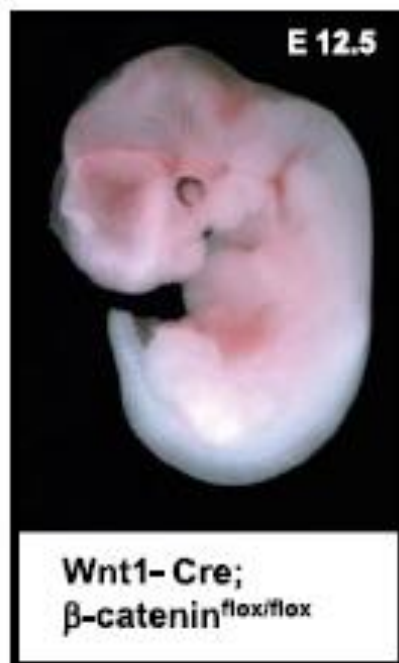


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 β -catenin-wild type

D164A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 β -catenin-D164A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 β -catenin- Δ C

D164A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 β -catenin-dm
(β -catenin-D164A- Δ C)



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-Zn fingers, TALEN)

- Cre myš

1. Jax nebo jiná laboratoř

- A) hledání v literatuře

- B) specializované
databáze

<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 !

2. Udělat si svou myš

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/6J ES cells. [Read more...](#)

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

Search or Browse

Search IKMC database

Enter gene symbols, gene IDs or genome location

e.g., *Ataxin78*, *Fox*, ENSMUSGIM000020887, Chr13:22210730-22371689
(coordinates from NCBI mouse genome assembly 37)

[Advanced Search](#)

Browse IKMC database

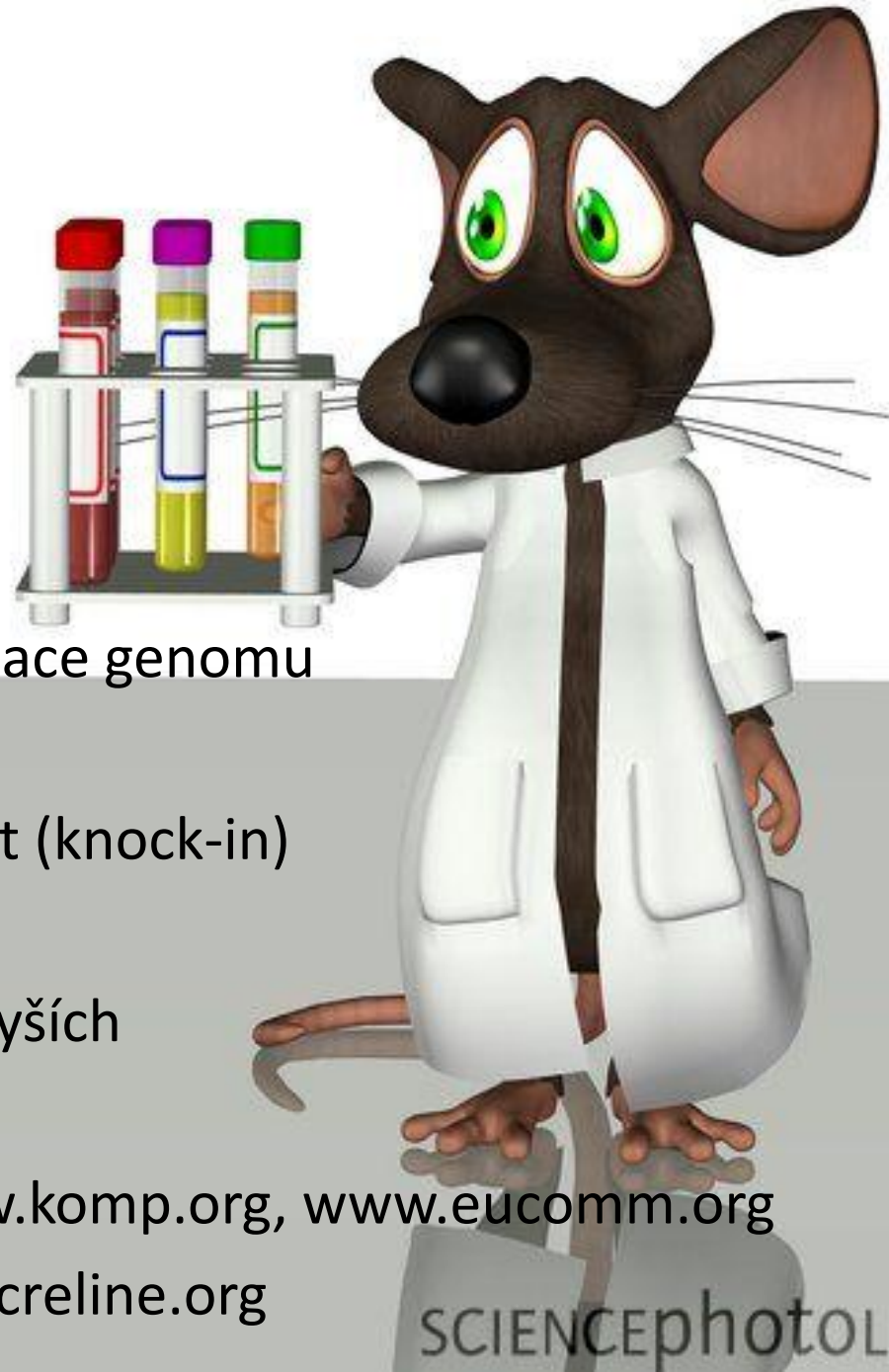
Use the following links to browse genes

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

Database of mutant alleles of all mouse genes

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
- 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



**Děkuji
za
pozornost!**

