

Aplikace *in vivo* modelů savců ve fyziologii

RNDr. Vendula Pospíchalová, Ph.D.

(pospich@sci.muni.cz)

Ústav experimentální biologie

Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

Bi5599 Metody aplikované biochemie a buněčné biologie

2019-11-13

Struktura dnešní přednášky

1. Etické a legislativní aspekty práce se zvířaty
2. Využití a výběr vhodného zvířecího modelu
3. Nejčastější (savčí) modely ve fyziologii (biomedicíně)
4. Laboratorní potkan
5. Laboratorní myš
6. Chov laboratorních myší
7. Experimenty s laboratorní myšmi
8. Genetická manipulace laboratorních myší
9. Souhrn a závěr

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 „3+1R“

definováno v **The Principles of Humane Experimental Technique**

- *W.M.S. Russell and R.L. Burch* (1959)

- **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** – zodpovědnost = dodržovat zákony, schválené protokoly a etický kodex
- Při nedodržení závažné následky nejen pro jednotlivce, ale i pro skupinu, ústav (univerzitu) a celospolečenské vnímání využití laboratorních zvířat při biomedicínském výzkumu

Legislativa upravující podmínky práce s modelovými organismy



- Nutno dodržovat evropskou směrnici: DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes“)

- <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>

- http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm

- a české právní normy

Veřejné zakázky Úřední desky Tiskový servis Kalendář akcí Právní předpisy Kontakty E-podatelna Česky English

eAGRI Ochrana zvířat

Rozcestník eAGRI ▶ Hledaný výraz Hledej Podrobné hledání ▶ Přihlásit

Ochrana zvířat

- ▶ [Systém ochrany zvířat v ČR](#)
- ▶ [Aktuální témata v ochraně zvířat](#)
- ▶ [Výsledky kontrol ochrany zvířat](#)
- ▶ [Vzdělávání a kurzy](#)
- ▶ [Legislativa](#)
- ▶ [Životní situace](#)
- ▶ [Publikace a dokumenty](#)
- ▶ [Kontakty](#)

Ochrana zvířat



„Zvířata jsou stejně jako člověk živými tvory, schopnými na různém stupni pociťovat bolest a utrpení, a zasluhují si proto pozornost, péči a ochranu ze strany člověka.“ Tak zní preambule zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, základního právního předpisu týkajícího se ochrany zvířat, na jehož základě je postavena činnost všech státních orgánů ochrany zvířat v České republice. Těmi jsou především Ministerstvo zemědělství, včetně Ústřední komise pro ochranu zvířat a Výboru pro ochranu zvířat používaných pro vědecké účely, a orgány veterinární správy.

Zákon zakazuje týrání zvířat i všechny formy propagace týrání zvířat. Jeho účelem je chránit zvířata, jež jsou živými tvory schopnými pociťovat bolest a utrpení, před týráním, poškozováním jejich zdraví a jejich usmrcením bez důvodu, pokud byly způsobeny, byť i z nedbalosti, člověkem.

Zákon stanoví, které činnosti jsou považovány za týrání zvířat, důvody k usmrcení zvířete, upravuje ochranu zvířat při usmrcování, použití znečitlivění, ochranu zvířat při veřejném vystoupení a povinnosti pořadatelů těchto akcí, ochranu zvířat při přepravě. Stanoví podmínky, které je nutno dodržovat při chovu hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech, podmínky chovu a



<http://eagri.cz/public/web/mz/e/ochrana-zvirat>

Aktuální témata

- [Co dělat v případě zjištění strádajících zvířat?](#)
- [Výklad k problematice zvláštního opatření, zejména k umístění týraného zvířete do náhradní péče](#)
- [Ztráta osvědčení, změna jména držitele osvědčení a podobné situace](#)
- [Nová doporučení ÚKOZ: Podmínky ochrany psů a koček v obchodech se zvířaty.](#)

Odstraňování byrokracie

[Pomozte nám odstranit byrokracii z resortu zemědělství a pošlete nám své podněty.](#)

Kalendář

listopadu 2018

Legislativa v ČR

- 1) **zákon** České národní rady **na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992** ve znění platných úprav
- 2) **vyhláška** Ministerstva zemědělství **o ochraně pokusných zvířat č. 419/2012 Sb.** (ve znění vyhlášky č. 299/2014 Sb.)

Důležité body:

- Výzkumné zařízení musí získat akreditaci od Ústřední komise na ochranu zvířat
- Každý projekt musí být schválen odbornou komisí daného zařízení a rezortní komisí MZe
- § 3 a) zvířetem se rozumí každý živý obratlovec, kromě člověka, nikoliv však plod nebo embryo
- Manipulovat s pokusným zvířetem a provádět zákroky vymezené projektem pokusů mohou pouze osoby, které získaly osvědčení o odborné způsobilosti [§ 15d].

Zvířecí modely ve fyziologii (biomedicíně)

- Jsou intenzívně zkoumané organismy – cílem může být poznání jich samotných, ale především je to popis obecnějších jevů a vztahů platících i pro jiné modely a obzvláště pro člověka

Využívají se pro:

- základní výzkum mechanismů onemocnění
- vývoj nových terapeutických strategií
- vývoj a objev léčiv
- předklinické studie
- testování toxicity
- vývoj nových zvířecích modelů dle potřeby a zájmu

„In vivo veritas“

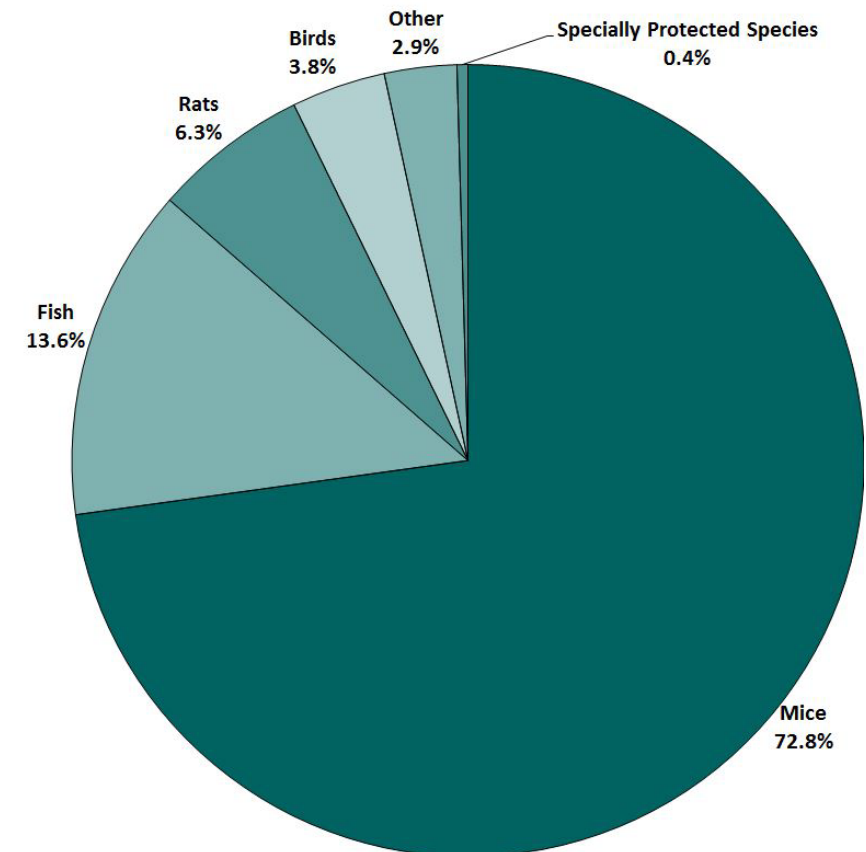
Nejčastější modelové organismy ve fyziologii (biomedicíně)

Bezobratlí: háďátko (*Caenorhabditis elegans*)
octomilka (*Drosophila melanogaster*)

Obratlovci: drápatka (*Xenopus laevis*)
danio (*Danio rerio*), zebrafish
kur (*Gallus gallus domesticus*)
myš (*Mus musculus*)
potkan (*Ratus norvegicus*)
králík (*Oryctolagus cuniculus*)
+ psi, kočky, prasata, primáti



Distribution of animals used
in research in UK in 2017



Požadavky na (ideální) modelový organizmus

a) biologické

- dostupnost, možnost chovu v laboratorních podmínkách
- relativní jednoduchost a nevýjimečnost ve zkoumané oblasti
- nekomplikovaný životní cyklus
- dostatečně rychlý vývoj
- produkce většího množství potomků

b) metodické

- možnost genetických manipulací (křížení, náhodná a cílená mutageneze, reverzní genetika)
- velikost
- dostupnost sekvenčních dat

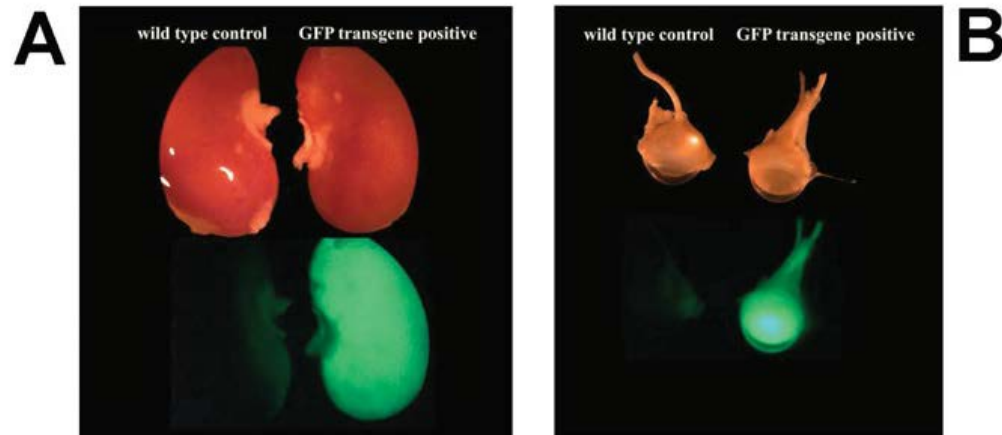
Výběr vhodného modelu ve fyziologii

- 1) vhodný na sledování zvoleného onemocnění
- 2) reaguje podobně jako člověk
(založené na základě evidence, nebo biologické podobnosti, čím základnější biologický proces tím vyšší předpoklad, že člověk a zvíře budou reagovat podobně)
- 3) správný design experimentu
(demonstrace odpovědi, vhodná velikost, délka života, adekvátní kontroly, dostatečné množství zvířat - statistické vyhodnocení)
- 4) mnohé modely jsou vysoko specifické (např. primáti)
- 5) validace modelu (např. nové léčivo v preklinické studii)



Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

- větší než myš (více buněk, větší orgány) – výhodné pro operační přístupy (oblíbený GFP transgen pro transplantační imunologii)
- Vhodné pro kardiovaskulární choroby, toxikologii, neurologii a behaviorální studie – mnohem více „společenské“ než myši a v chování více podobné člověku (viz outbreeding)



Example of fluorescence seen in EGFP rat strains. Images of SDTg(GEF)2Ba1RRRC(RRRC:0065) strain on right of each panel and wild type controls images. Upper images for each panel are under bright light, bottom images for each panel are under fluorescent light. Panel A: kidney; B: eye; <http://www.rrrc.us/>

10 FACTS Rat



1. Rats were used in research for the first time more than 200 years ago to understand human physiology and medicine
2. The brown Norway rat genome sequenced April 2004
3. Rats have been invaluable to cardiovascular medicine, neural regeneration, wound healing, diabetes, and transplantation
4. Mazes to test rat intelligence were first built a century ago
5. About 10% of rat genes are shared in mice but absent in humans
6. Almost all disease-linked human genes have homologs in the rat
7. 30 Nobel Prizes were based on research with rats
8. According to a study, the favourite foods of city-dwelling rats include scrambled eggs, macaroni and cheese and cooked corn
9. A rat can fall as far as 50 feet (15m) and land unharmed
10. Rats don't have gallbladders or tonsils, but do have belly buttons

Studium autismu pomocí hlodavců

- 3 nt inzerce v genu *FMR1* (fragile X mental retardation 1) vede k Syndromu fragilního X – jedné z nejčastějších genetických příčin mentálního postižení
- Tato inzerce vede k metylaci promotoru genu *Fmr1*, což má za následek zablokování jeho exprese, čím méně proteinu gen produkuje, tím jsou příznaky onemocnění vážnější
- Změny v genu *FMR1* jsou jednou z mála známých genetických příčin poruch autistického spektra
- Pokud vyřadíme gen *Fmr1* u myší, dojde k posílení jejich sociálních interakcí
- Pokud vyřadíme gen *Fmr1* u potkanů, dojde ke snížení jejich sociálních interakcí a snížení hlasových projevů, což jsou podobné změny chování, jaké vidíme u pacientů s mutacemi v genu *FMR1*
- Potkani s vyřazeným genem *Fmr1* vykazují také kompulzivní žvýkání
- Kompulzivní a opakující se vzorce chování jsou typické symptomy poruch autistického spektra u lidí
- V tomto případě je tedy potkan lepší model pro studium role genu *Fmr1* v rozvoji autismu než myš



Myš domácí (laboratorní)



(*Mus musculus*)

Nejčastěji používaný model v biomedicíně

Výhody tohoto modelového organismu:

- Savec – z tradičních modelů nejbliže k člověku
- Malá velikost – snadná manipulace a relativně levný chov
- 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. neprůhlednost těla (x dánío), nepřístupné embryo, (příliš?) složitý organismus – genové rodiny – funkční zastupitelnost genů

10 FACTS

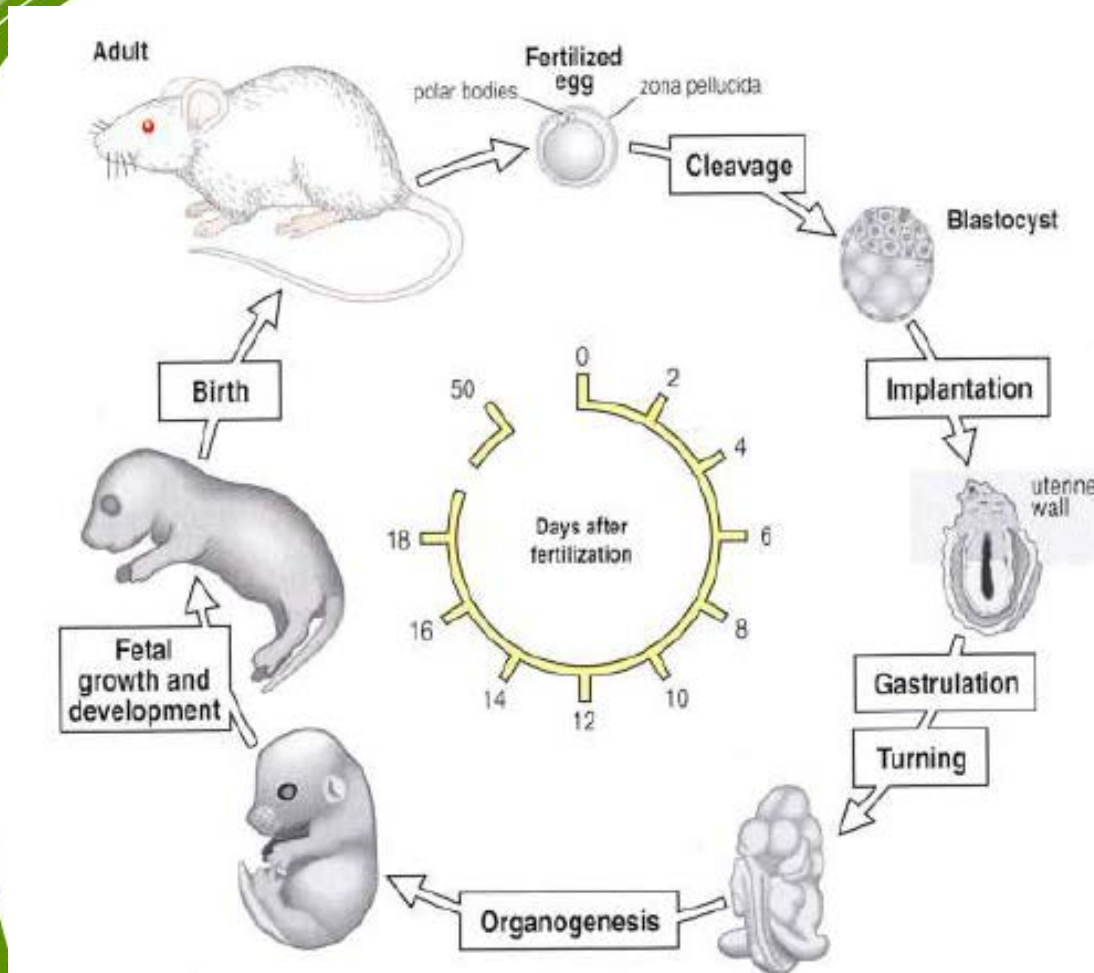
Mouse



1. Mice are used in 74.7% of procedures in animal research
2. 98% of human genes have a comparable gene in mice
3. Inbred strains of mice have been a disease model, long before the mouse genome project and transgenics.
4. Mice were first cloned in 1998
5. Studies using mice were awarded 30 Nobel prizes
6. Mice helped with the discovery of HIV and its treatment
7. Mice are often involved in fundamental research – how genes work, how cells function and how the body integrates information
8. Without mice, organ transplant, IVF, most vaccines, cancer cures, our understanding of the immune system, wouldn't be the same
9. Mice don't sweat or vomit
10. Mice can jump a foot into the air, and climb and swim really well



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
- „Jeden lidský rok = cca 14 myších dní“

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



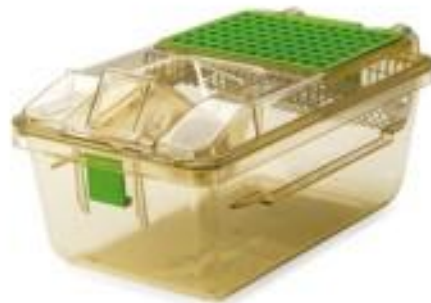
Video – uchopování myši pomocí jen jedné ruky

Chov laboratorních myší

- Relativně nenáročný – v plastových nádobách (tzv. klíčkách či nesprávně „akvářkách“) - podestýlka, voda + granule *ad libitum*, (buničina či jiný úkryt)
- Teplota $22\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Max. 6 myšek v jedné klíčce (ale jen 1 chovný samec)
- IVC – individually ventilated cages – brání rozšíření případné infekce do celého chovu



Otevřená klíčka

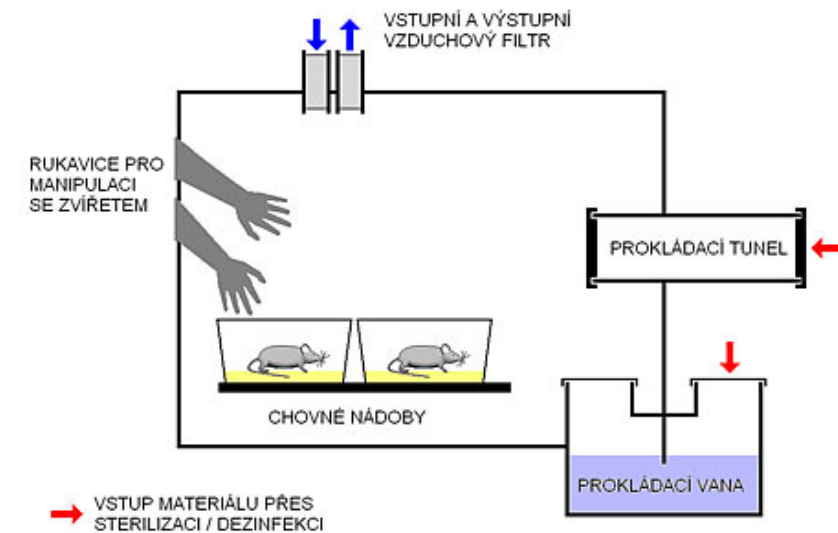


IVC



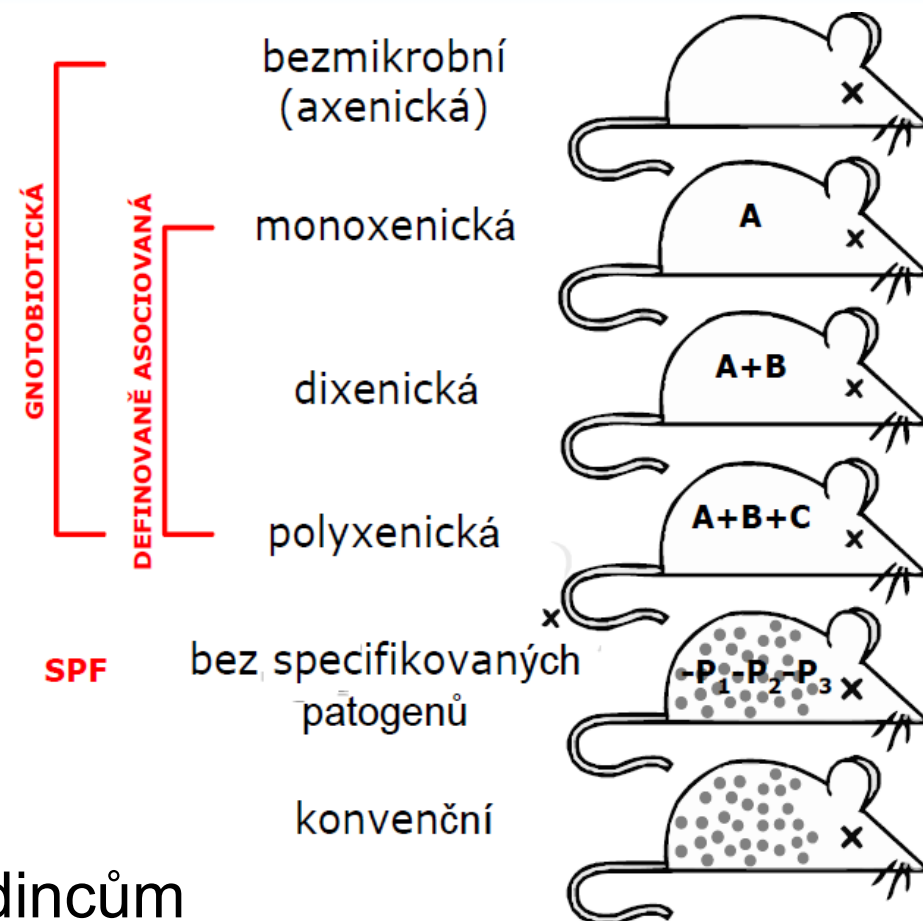
System chovu laboratorních myší

- **Otevřený (konvenční)** – vstup i výstup zvířat, osob i materiálu je bez bariéry, jen se zvýšenými hygienickými opatřeními
 - možno vylepšit IVC stojany a laminárními boxy 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 ošetřovatelů)
- **Izolátorový** – prostor pro zvířata je trvale oddělen bariérou od vnějšího prostředí a osob, které se zvířetem manipulují
 - gnotobiotické a imuno-deficientní kmeny



Dělení podle mikrobiálního osídlení zvířat

- **konvenční** – nedefinovaná mikroflóra, otevřený chov za dodržení základních hygienických podmínek
- **SPF** – viz samostatný snímek
- **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 jedincům
 - monoasociované (monoxenické) kmeny
 - diasociované (dixenické) kmeny
 - polyasociované (polyxenické) kmeny



Studium gnotobiotických myší v ČR

Laboratoř gnotobiologie,
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Pracoviště Nový Hrádek v Orlických
horách

Hlavní témata výzkumu

Studium vlivu komensálních bakterií na vývoj přirozené a adaptivní imunity

Myší model alergické senzibilace k inhalačním a potravním alergenům

Myší model autoimunitní uveitidy

Myší model ulcerózní kolitidy indukovaný dextran sulfátem sodným

Myší model Crohnovy choroby (Nod2-deficitní kmen)

Studium vlivu komensálních a probiotických bakterií na enterické infekce selat v časném postnatálním období

Model nekrotizující enterokolitidy u předčasně porozených gnotobiotických selat

Úloha $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T buněk při imunizaci naivního imunitního systému prasat

Vliv komenzálních bakterií na vývoj zánětu selat

Vývoj a vyzrávání prasečích B buněk



Vedoucí: **RNDr. Marek Šinkora, Ph.D.**

Tel.: **491 418 516**

E-mail: **marek@biomed.cas.cz**

Zaměstnanci

Fotogalerie oddělení

Stránky laboratoře

Laboratoř je detašovaným pracovištěm bývalého sektoru imunologie a gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR. Laboratoř byla založena v 60. letech prof. Jaroslavem Šterzlem v Novém Hrádku v Orlických horách s cílem založit pracoviště, kde by byla odchovávána bezkolostrální selata. Prasata mají speciální placentaci, která nedovoluje prostup mateřských protilátek a stávají se tak ideálním modelem pro studium nástupu imunitní odpovědi. Byla vyvinuta technologie odchovu bezmikrobních prasat, potkanů, králíků a myší. V současné době pracovníci laboratoře při svých experimentech využívají unikátní bezmikrobní zvířata (myši a prasata), která umožňují studovat vliv definovaných složek mikrobioty na vývoj fyziologické a imunitní odpovědi u experimentálních modelů lidských onemocnění. Nedílnou součástí výzkumného programu pracoviště je výzkum ontogeneze imunitních buněk selete.

SPF – „specified pathogen free“ zvířata

- "specific pathogen free" – mikroflóra zvířat prokazatelně neobsahuje specifikované patogeny (salmonela, tuberkulóza, hepatitida...), jinak není přesně definována, proto je vhodnější název „specified pathogen free“
- Chov je přísně bariérový a je podrobován pravidelným testům (~ 3 měsíce) na dané patogeny (> 40), uvedeny v certifikátu ke zvířatům
- Výběr se řídí doporučeními FELASA – Federation of Laboratory Animal Science Associations (<http://www.felasa.eu/>)

Archivace myších kmenů – kryoprezervace –
 embrya a spermie
 - rederivace, in vitro fertilizace (IVF) – pro
 „oživení“ kmene i pro „ozdravení“
 (očištění od patogenů), ustanovení
 SPF linie, či izolátorového chovu

BACTERIOLOGY	ECTOPARASITES	NECROPSICAL EXAMINATION
<i>Klebsiella oxytoca/pneumoniae</i>	Acarids (sarcoptes, others...)	Histopathological lesions observed
<i>Proteus mirabilis, vulgaris</i>	Arthropods	VIROLOGY
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Demodex	Ectromelia virus
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dermatophytes	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCM)
<i>Citrobacter rodentium</i>	Fleas - Louses (Polyplax, others...)	Minute virus of mice (MVM)
<i>Clostridium piliforme</i> (tyzzer)	Myobiidae (<i>Myobia</i> , <i>Radfordia</i>)	Mouse adenovirus (MAD) type 1 (FL)
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Myocoptidae (<i>Myocoptes</i> , <i>Trichoecus</i>)	Mouse adenovirus (MAD) type 2 (K87)
<i>Helicobacter</i> spp.	ENDOPARASITES	Mouse cytomegalovirus (MCMV)
<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>Aspicularis tetraptera</i>	Mouse hepatitis virus (MHV)
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Entamoeba</i> spp.	Mouse norovirus
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	Mouse parvovirus (MPV 1 and MPV 2)
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	<i>Hymenolepis (diminuta et nana)</i>	Mouse rotavirus (EDIM)
<i>Streptococci B-hemolytic A, B, C, F, G</i>	<i>Spironucleus</i> spp.	Pneumonia virus of mice
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Syphacia</i> spp.	Reovirus type 3 (Reo 3)
	<i>Trichomonas</i> spp.	Sendai virus
		Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)

a, b, c, d : additional tests to FELASA list

<https://www.janvier-labs.com/421.html>

Značení laboratorních myší

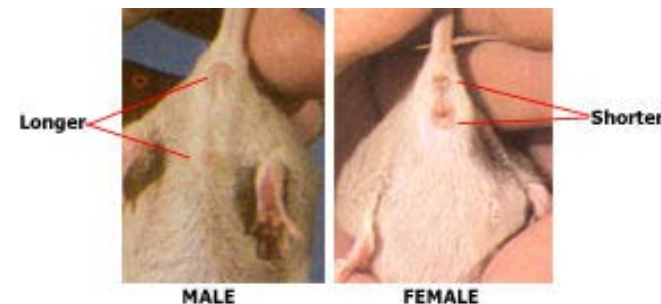
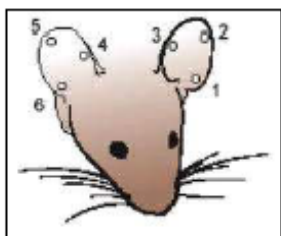
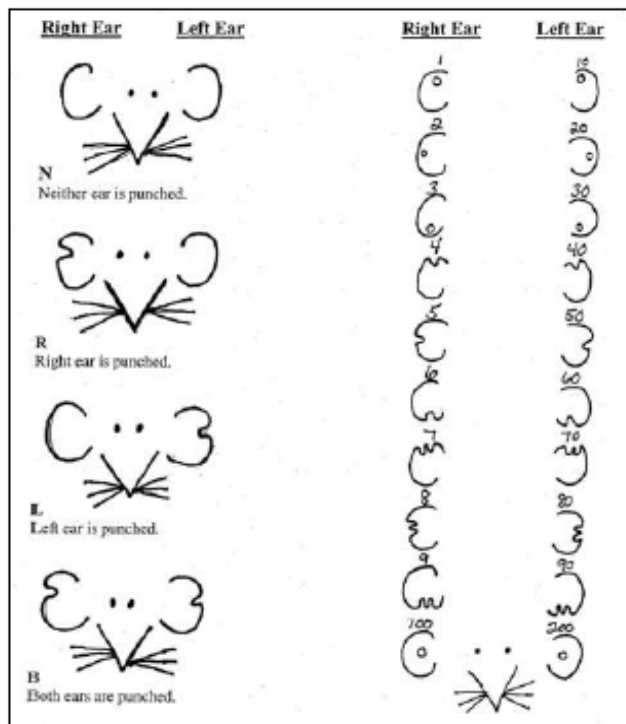
- Jedinečné označení nutno u myší s různým genotypem v jedné klíčce
- Během odstavu od matky – rozdělení dle pohlaví a ustřižení špičky

ocásku na genotypování

1) Ušní známky

2) Značení uší nebo prstíků

3) Mikročipy



Software pro práci s laboratorními zvířaty

The screenshot displays the PyRAT (Python Based Relational Animal Tracking) software interface. At the top, it shows the user is logged in as 'Korinek Vladimir'. The main navigation bar includes 'Animals', 'Cages', 'Reports', 'Requests', 'Administration', 'Help', and 'Logout/Alias'. Below this, there are filters for 'Animals', 'Stud males', and 'Pups'. A summary box indicates 'Results: 795 animals found in 278 cages. Now showing 1 through 100'. The main table lists animal records with columns for ID, Parents, Cage, Location, Sex, Gen, Strain, Mutations, Add, DOB, Age (W), and Project. A detailed view for animal ID 20M-08052 is shown on the right, including its owner (Korinek Vladimir), contact, species (mouse), genetic background, and a table of mutations (loxP and Cre).

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

Animal Detail

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

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

Modify	Name	Grade
<input checked="" type="checkbox"/>	loxP	+/+
<input checked="" type="checkbox"/>	Cre	+/-

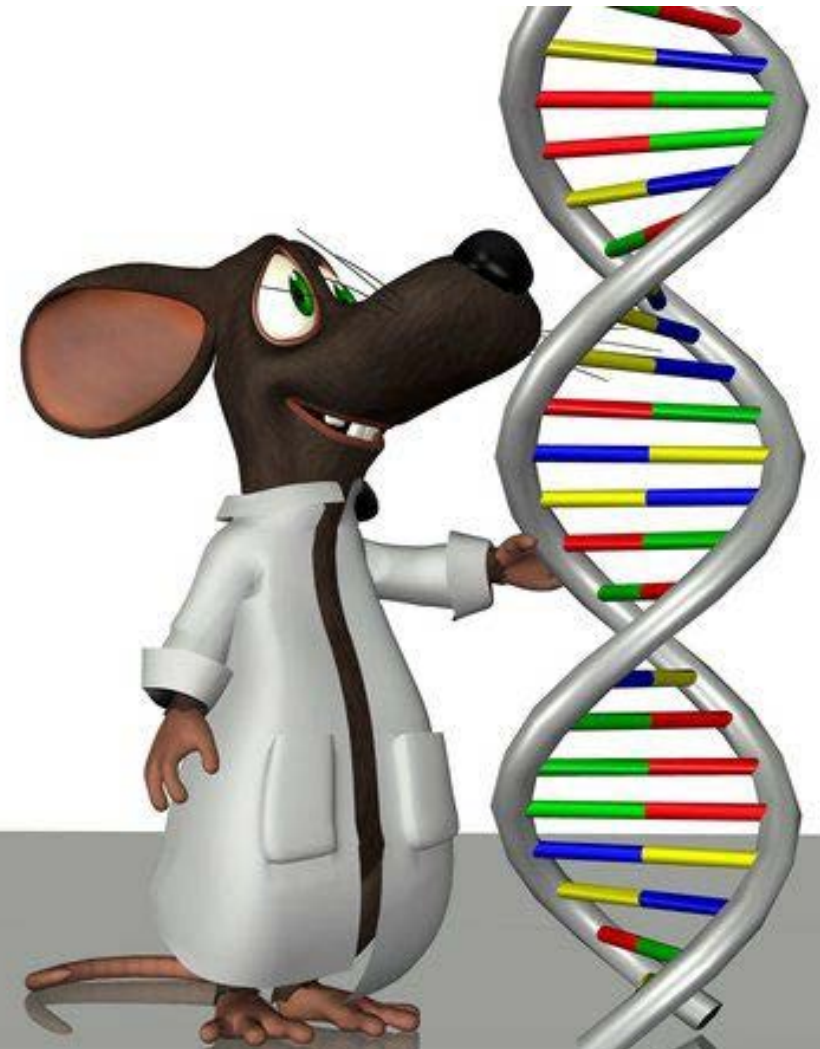
History

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
- 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
 - Cre/loxP systém
 - nové metody „gene-targetingu“
 - ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9
 - transgenní myši
 - myší kliniky



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)

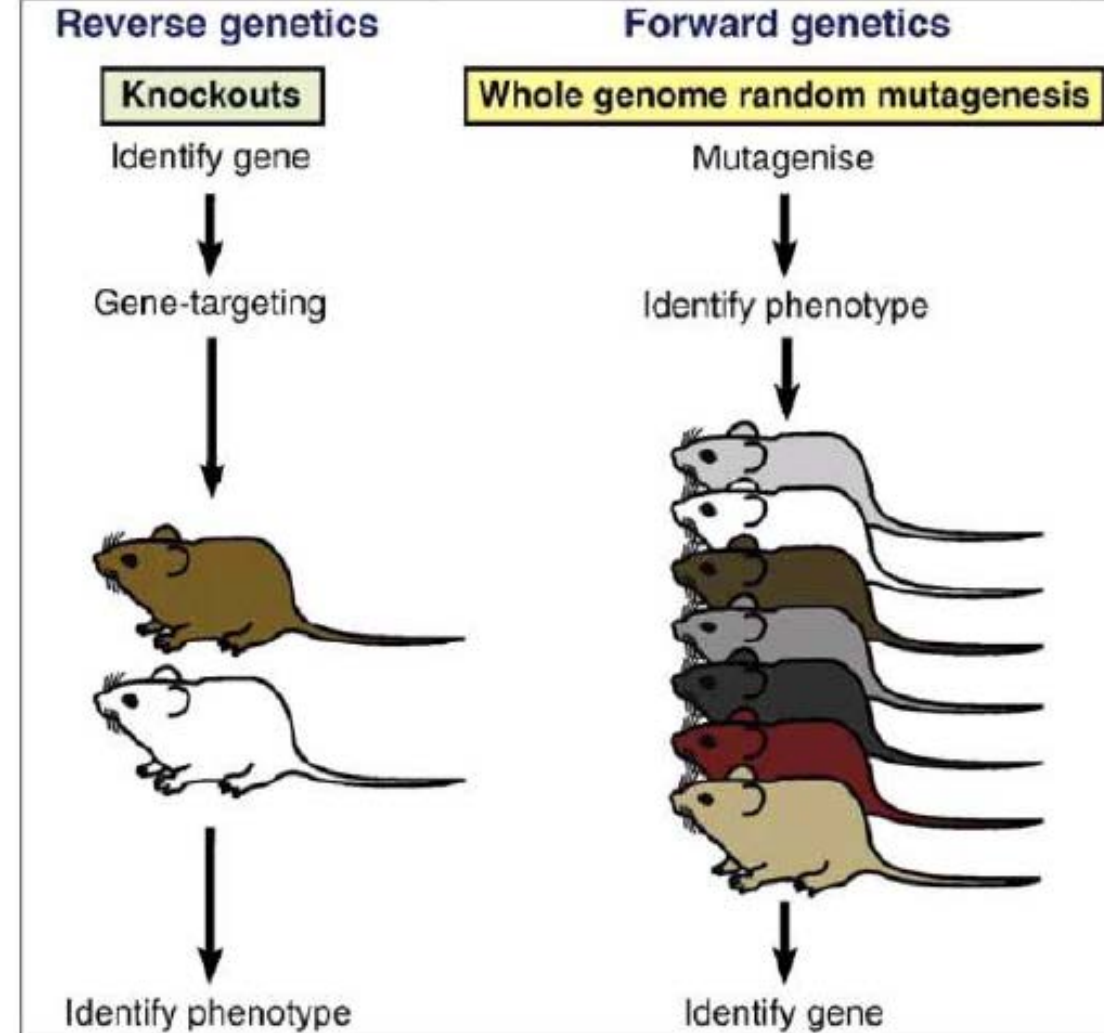
1. fenotyp (znak)
2. gen

- vychází z NÁHODNÉ mutageneze celého genomu

B) reverzní genetika (reverse genetics)

1. sekvence DNA
2. Fenotyp

- základem jsou CÍLENÉ mutace



Přímá genetika – přirozené a indukované mutace

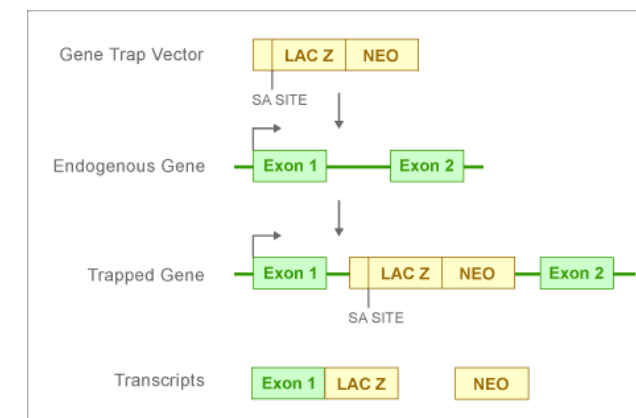
- 1. Kolekce přirozeně se vyskytujících mutací**
vzácný vznik, většinou ve velkých chovech
př. Nahá („nude“, nu/nu, athymická, *Foxn1^{nu}*) myš
 - **1966:** vznik (Glasgow, UK), **1968:** myši jsou imunodeficientní (nemají thymus), **1996:** myši jsou mutantní v transkripčním faktoru *Foxn1*



- 2. Indukované mutace – a) chemická mutagenéze**
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



- Vnášení cílených mutací bylo dříve omezeno pouze na buňky s vysokou frekvencí homologní rekombinace, což jsou mimo kvasinek jen myší embryonální kmenové buňky
- To bránilo vnášení cílených mutací u jiných organismů (uplatňovala se proto především transgeneze)
- Zlom nastal se zavedením nových metod vnášení cílových mutací (ZNF, TALEN a především Crispr/Cas9), ty umožnily vnášet cílené mutace prakticky do všech buněk a organismů

 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

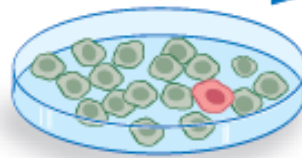
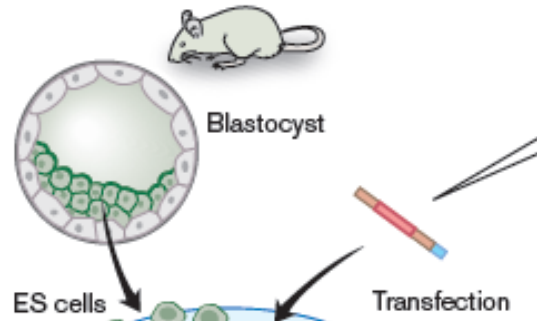
"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells".

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

Step 1 Gene targeting in ES cells

1. ES cell culture

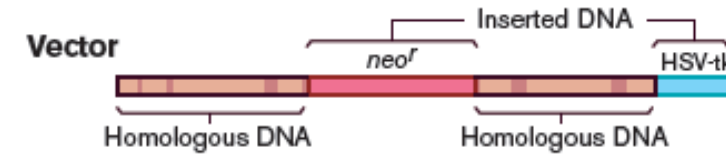
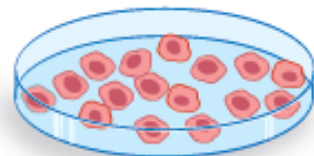
Embryonic stem (ES) cells are cultivated from mouse pre-implantation embryos (blastocysts).



Positive-negative selection

4. Proliferation of targeted ES cell

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

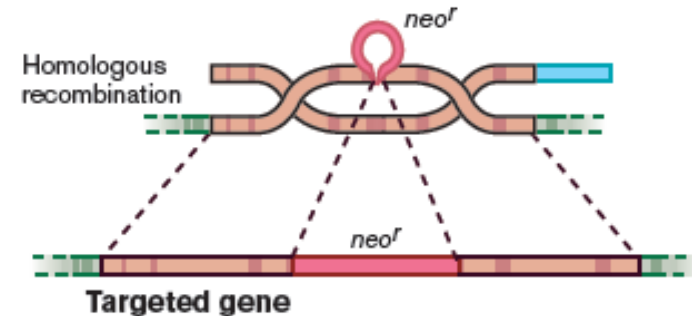
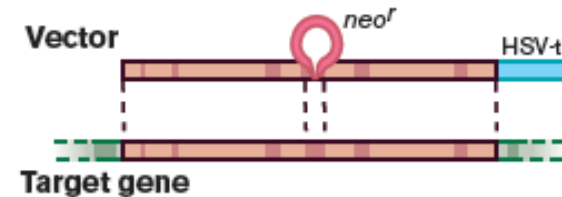


2. Construction of targeting vector

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

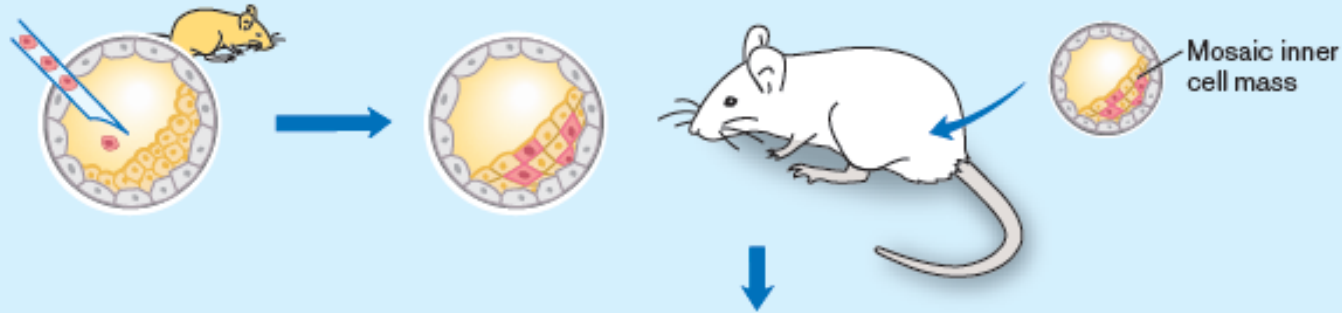
Step 2 From gene targeted ES cells to gene targeted mice

5. Injection of ES cells into blastocysts

The targeted ES cells are injected into blastocysts...

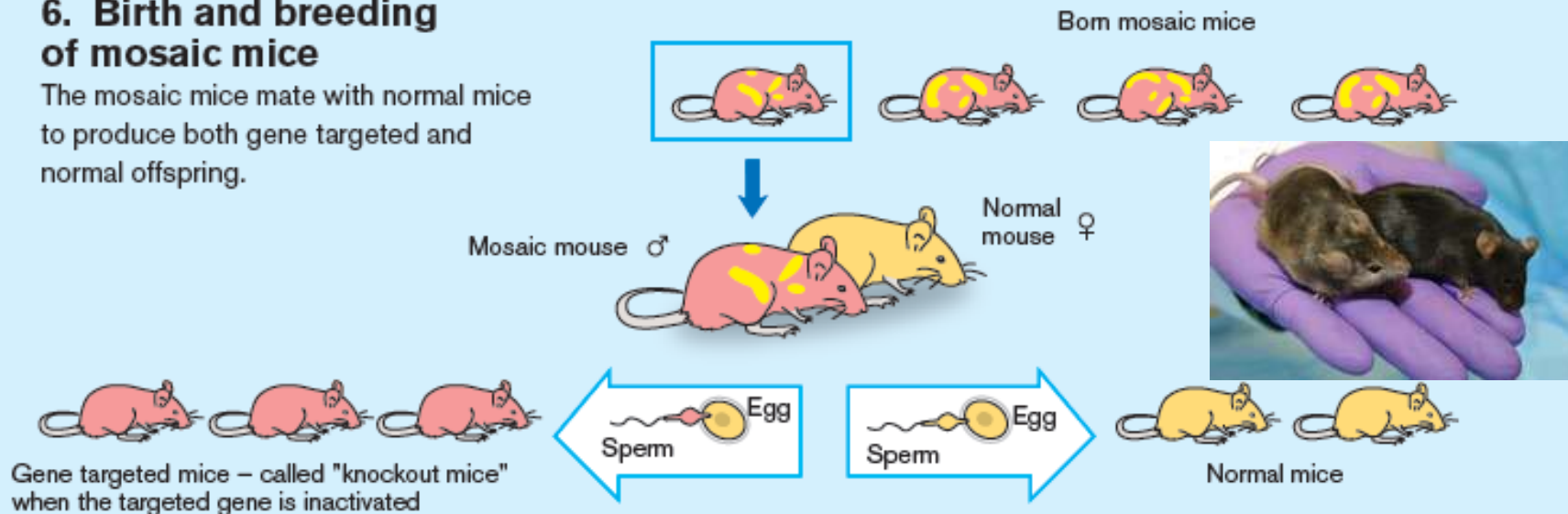
...where they mix and form a mosaic with the cells of the inner cell mass from which the embryo develops.

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.

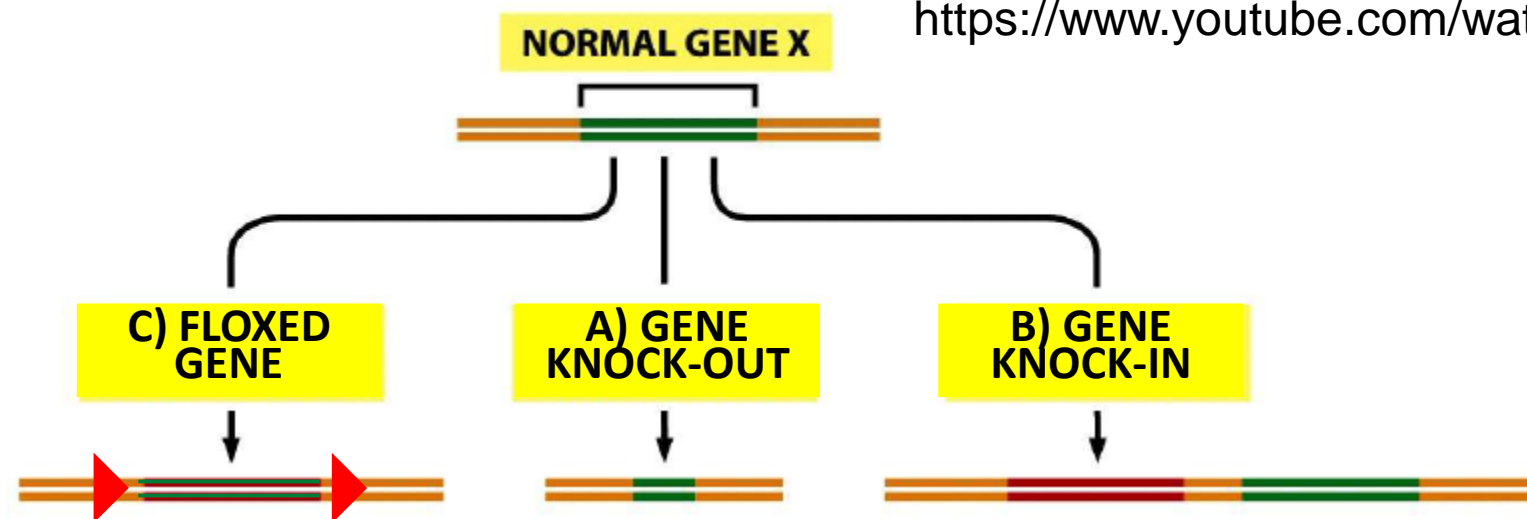


Genový „knock-out, knock-in“

- 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

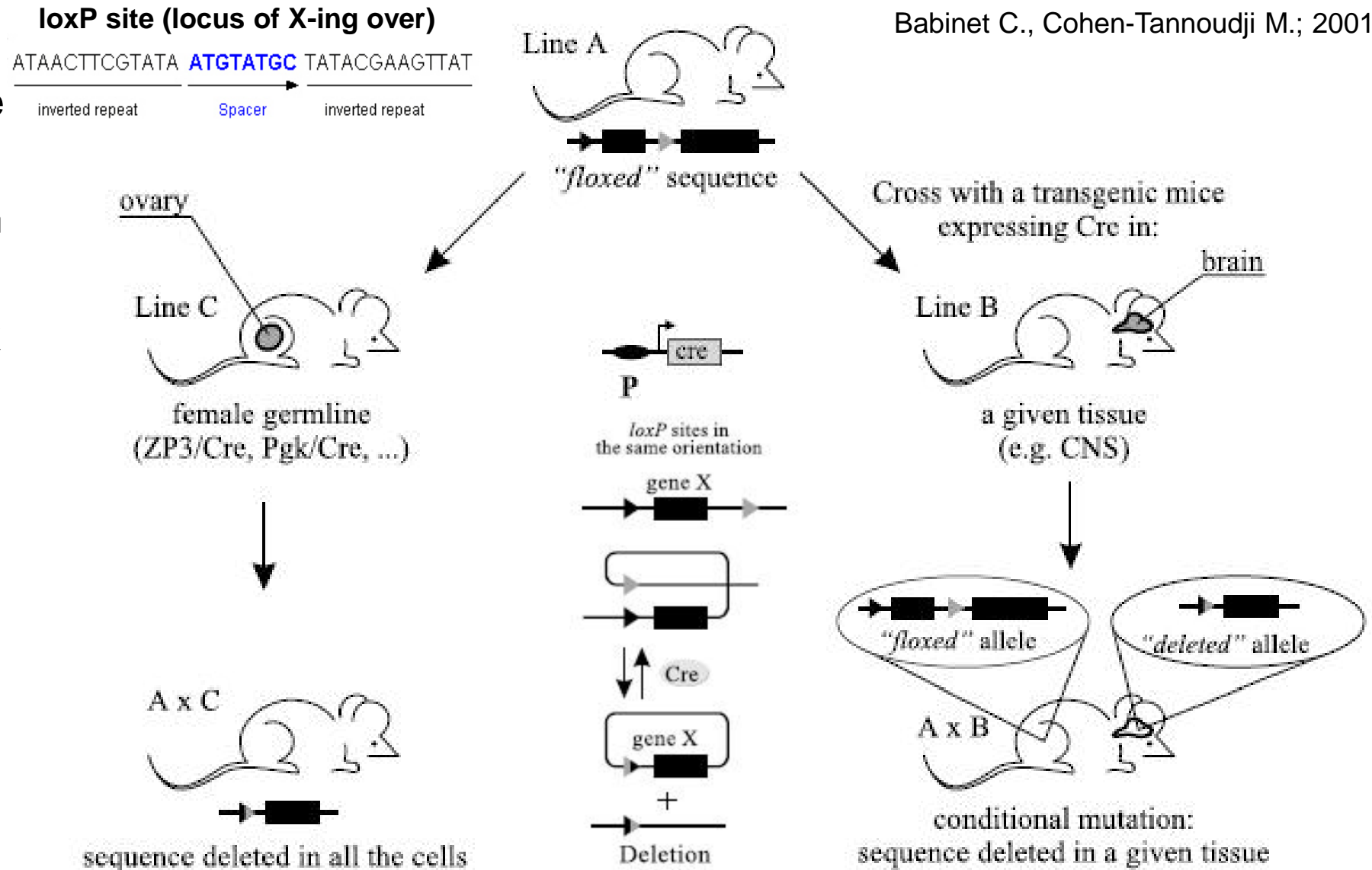
Více informací na:

<https://www.youtube.com/watch?v=oLPjiwM0G7A>



Cre/loxP systém – podmíněná delece genu

- CreER^{T2} - Cre recombináza fúzovaná s estrogenovým receptorem je regulována hydroxytamoxifenem (aktivní až po injekci tamoxifenu)
- CreER^{T2} – umožňuje místně i časově specifickou regulaci rekombinace DNA

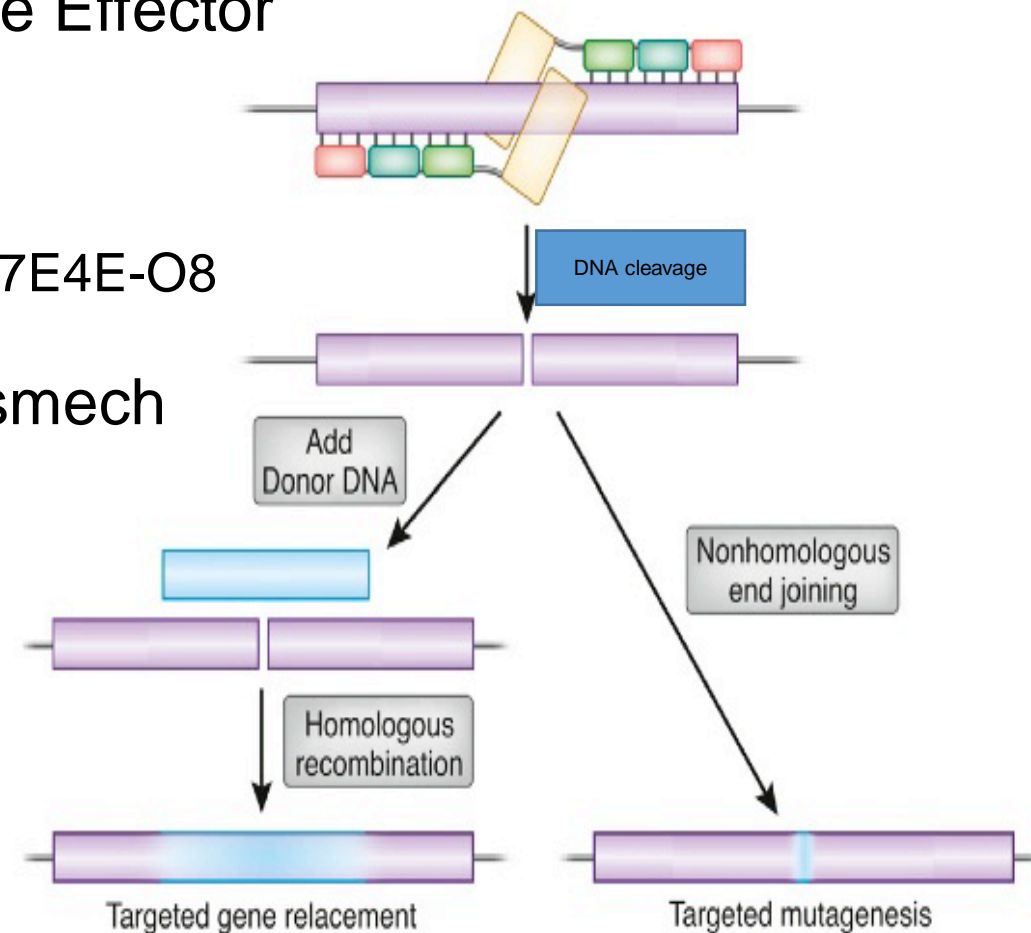


Nové metody „gene targeting“

1. Zinc finger nuclease (ZNF) technologie
2. TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
3. **CRISPR/Cas9 technologie**

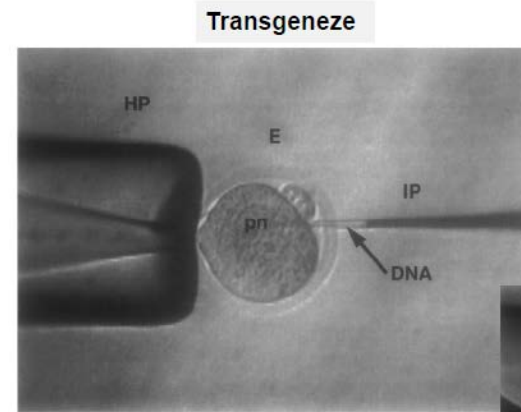
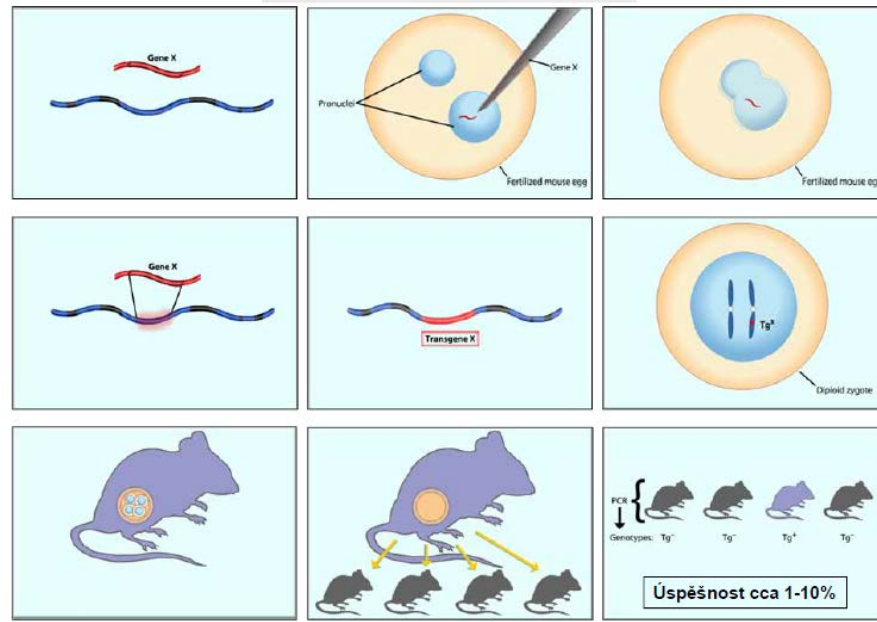
<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8>

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



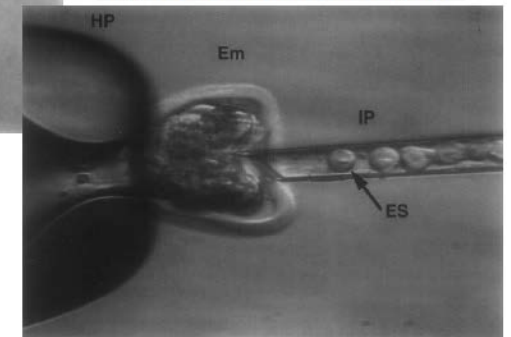
Transgenní zvířata

- **Transgenní organismy** - jejich genom obsahuje cizorodou DNA, jejíž místo integrace je však **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



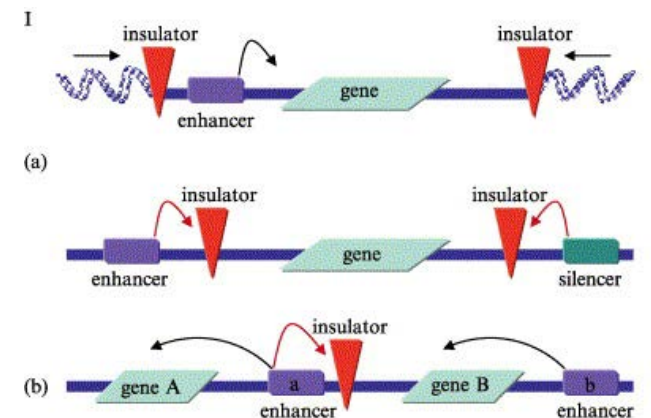
**Transgeneze
vs.
Gene targeting**

Injekce buněk do blastocysty



Transgenní myši

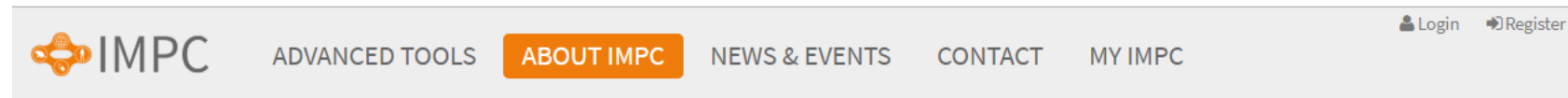
- **Smysl pokusu** - co se stane, dojde-li k expresi genu v jiné než původní tkáni
 - nadprodukce proteinu (v původní či jiné tkáni)
 - produkce změněného proteinu
 - studium regulačních oblastí genu nebo značení buněk *in vivo* (exprese „reportérových“ proteinů – GFP, β -galaktozidáza)
- **Výhody** - 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 (inzulátory, Matrix Associated Regions; MAR)
 - použití velkých částí chromozomů (Bacterial Artificial Chromosome; BAC recombineering)



International knock-out mouse consortium

- Cíl IKMC – připravit (kondiciovaný) knock-out pro každý myší gen
- Pomoci tohoto přístupu zjistit funkci každého genu
- Nutno systematicky studovat fenotyp myší - tzv. myší kliniky (jedna i ve Vestci u Prahy)

<http://www.mousephenotype.org/about-ikmc>



[Home](#) » [About IMPC](#) » [About IKMC](#)



About the International Knockout Mouse Consortium

The members of the International Knockout Mouse Consortium (IKMC) are working together to mutate all protein-coding genes in the mouse using a combination of gene trapping and gene targeting in C57BL/6 mouse embryonic stem (ES) cells.

The IKMC includes the following programs:

- [Knockout Mouse Project \(KOMP\)](#) (USA)
 - **CSD**, a collaborative team at the Children's Hospital Oakland Research Institute ([CHORI](#))[®], the [Wellcome Trust Sanger Institute](#)[®] and the University of California at Davis [School of Veterinary Medicine](#)[®], led by Pieter deJong, Ph.D., CHORI, along with K. C. Kent Lloyd, D.V.M., Ph.D., UC Davis; and Allan Bradley, Ph.D. FRS, and William Skarnes, Ph.D., at the Wellcome Trust Sanger Institute.
 - **Regeneron**, a team at the [VelociGene](#)[®] division of **Regeneron** Pharmaceuticals, Inc., led by David Valenzuela, Ph.D. and George D. Yancopoulos, M.D., Ph.D.
- [European Conditional Mouse Mutagenesis Program \(EUCOMM\)](#)[®] (Europe)
- [EUCOMM: Tools for Functional Annotation of the Mouse Genome \(EUCOMMTOOLS\)](#) (Europe)
- [North American Conditional Mouse Mutagenesis Project \(NorCOMM\)](#)[®] (Canada)
- [Texas A&M Institute for Genomic Medicine \(TIGM\)](#)[®] (USA)

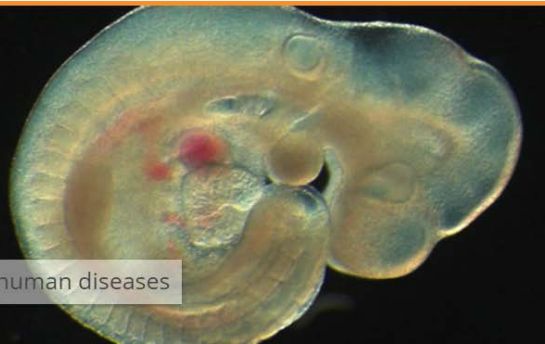
Jak lze geneticky upravené myši systematicky studovat?



Czech Centre for Phenogenomics

hosted by the Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v.v.i.

HOME ABOUT US RESEARCH & EDUCATION PHENOTYPING TRANSGENIC & ARCHIVING ANIMAL FACILITY PRECLINICAL TESTING



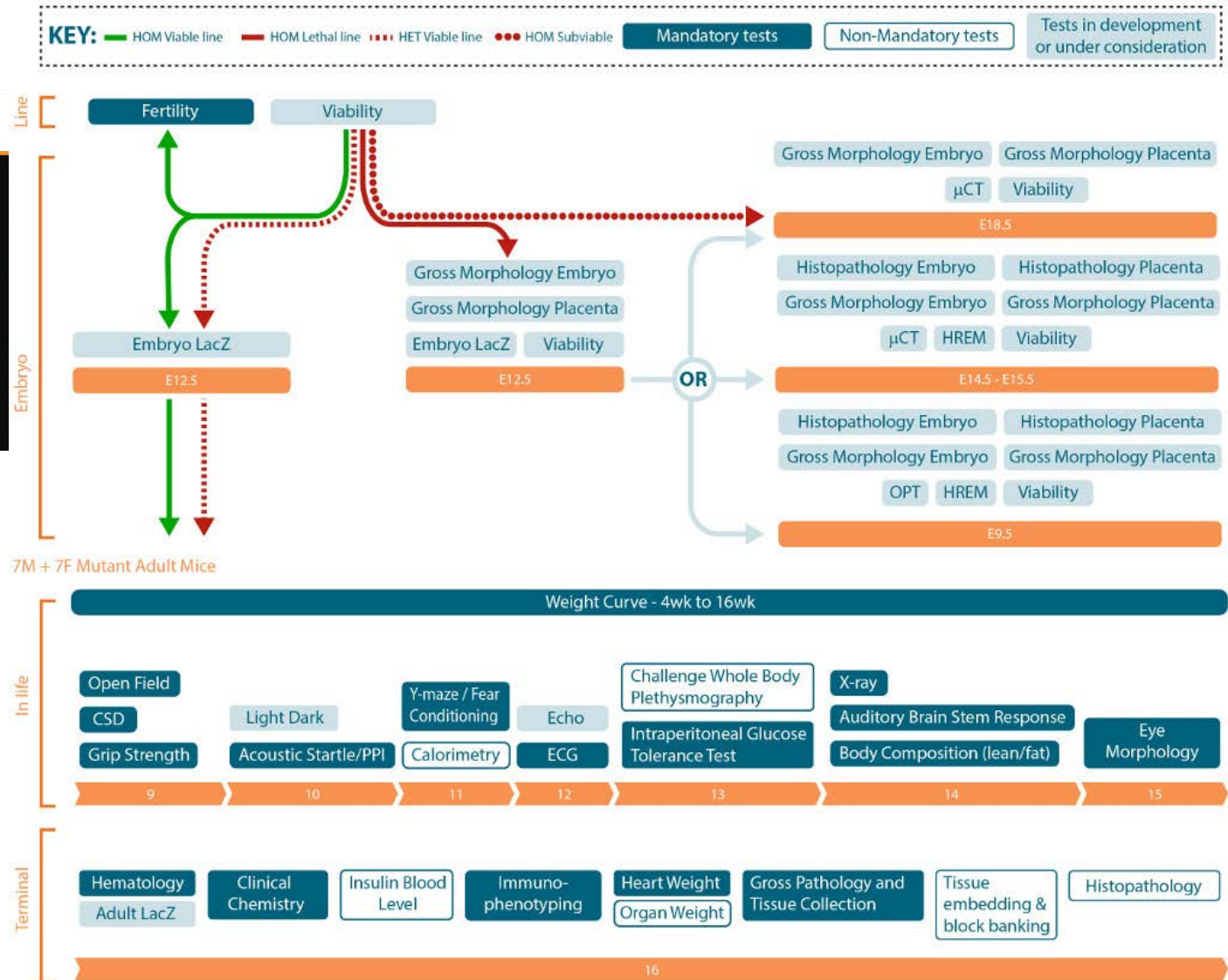
We are working to

identify new therapeutic targets for treating human diseases

<https://www.phenogenomics.cz/>

Fenotypování (Phenotyping)

- Komplexní fyziologické a morfologické posouzení myši v SPF prostředí pomocí standardizovaných testů dle **IMPreSS (International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens)**,



Shrnutí

- Ochrana zvířat je etický imperativ nejen během experimentů s nimi
- 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, www.komp.org, www.eucomm.org, www.informatics.jax.org, www.creline.org



**Děkuji
za
pozornost!**

