

ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ: ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Δ.Κοντογιάννης, PhD
Ινστιτούτο Ανοσολογίας, Ε.ΚΕ.Β.Ε. “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”

Ορισμοί

Academic Press Dictionary of Science & Technology

Transgenesis. *Genetics.* The introduction of new DNA sequences into the germline, resulting in the production of transgenic animals

Transgenic animal. *Molecular Biology.* Any animal into which cloned genetic material has been transferred

Transgenic organism. *Genetics.* An organism that has become transformed after the introduction of novel DNA into its genome.

Federation of European Laboratory Animal Associations

Transgenic animal is an animal in which there has been a deliberate modification of its *genome*, the genetic makeup of an organism responsible for inherited characteristics.

Διαγονιδιακά Ζώα:



Ασπόνδυλα (πχ. *Caenorhabditis elegans*)
Έντομα (πχ. *Drosophila melanogaster*)

Σπονδυλωτά

Αμφίβια (πχ. *Xenopus laevis*)
Θηλαστικά (πχ. *Mus musculus*)

1^η ΕΝΟΤΗΤΑ:

- Διαγονιδιακά Θηλαστικά- Κατηγορίες**
- Διαγονιδιακοί ποντικοί- Ιστορικά Στοιχεία
Αμιγή Στελέχη
Στοιχεία Αναπτυξιακής Βιολογίας
του Ποντικού**

Διαγονιδιακά Θηλαστικά



Γονιδιακή Λειτουργία
Λειτουργική Γονιδιωματική
Πρότυπα Νοσημάτων
Φαρμακογονιδιωματική
Φαρμακολογικές & Κλινικές
Δοκιμασίες

Βιοαντιδραστήρες
Βιό-μηχανική
Μεταμοσχεύσεις

Ιστορικά Στοιχεία- Διαγένεση στον ποντικό

1900-1910

ΓΕΝΕΤΙΚΗ



DBA

C57Bl/6

Ανασυνδυσμένο DNA-Μορ.Βιολογία
Ανοσοβιολογία Αναπτυξιακή Β.



1987-89

Γονιδιακή Στόχευση
Evans, Smithies & Capecchi



Κλινικές Επιστήμες

Ιολογία/Βακτηριολογία

1989-94

Ιστοειδική τροποποίηση
Cre/loxP
Sauer, Ruddle, Westphal & Rajewsky

1995-96

Χωροχρονική τροποποίηση
tTA/rtTA
Gossen & Bujard



Βιοπληροφορική



Λειτουργική Γονιδιωματική

Το εργαστηριακό ποντίκι (*Mus musculus*)

Ιδανικό πειραματόζωο διότι:

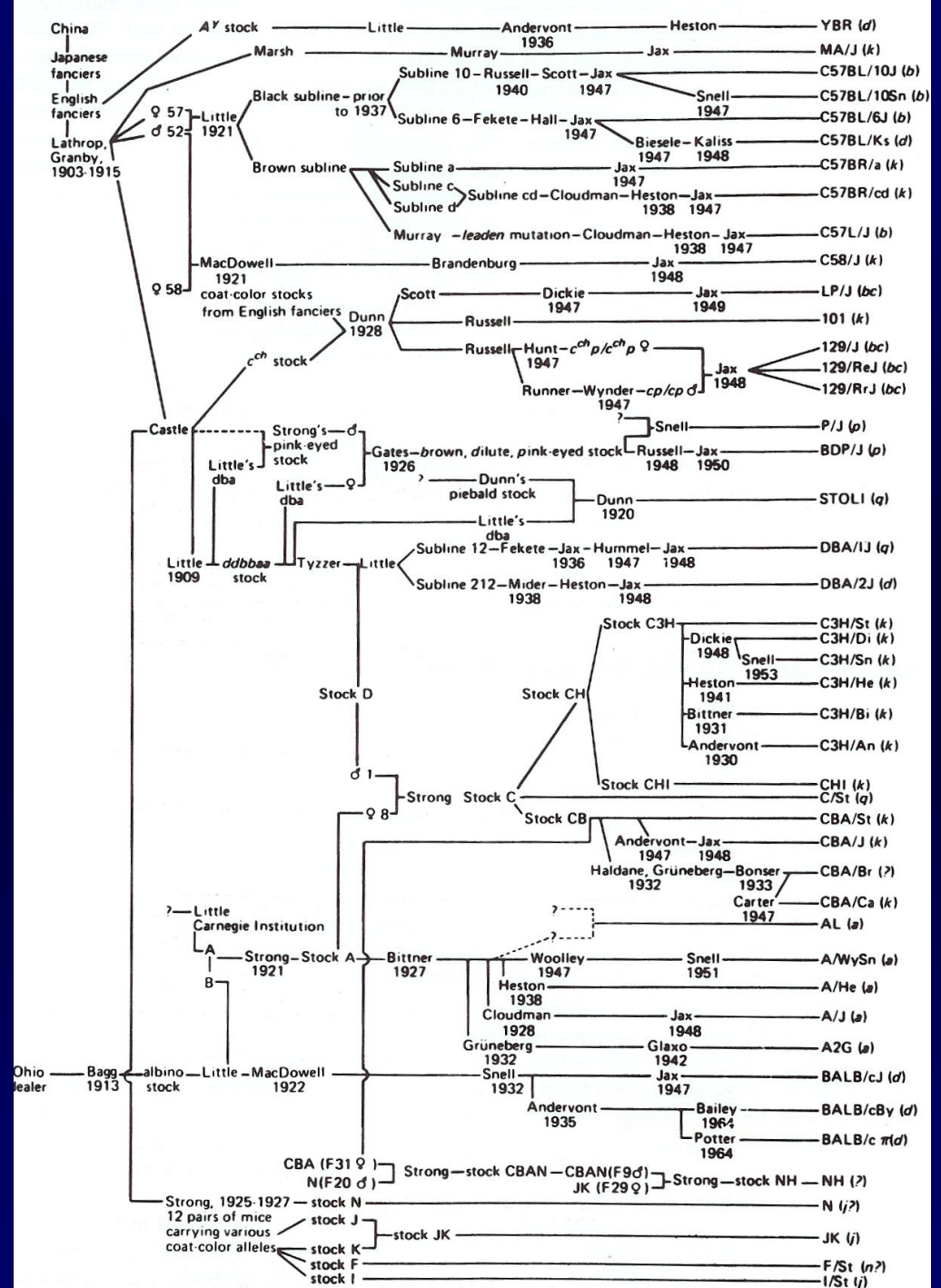
- Ως θηλαστικό έχει κοινά στοιχεία με τη φυσιολογία & παθολογία του ανθρώπου
- Εύκολη & οικονομική διαχείριση σε εργαστηριακό περιβάλλον λόγω του μικρού μεγέθους
- Ευκολία διασταυρώσεων- Μικρός κύκλος κύησης (21 ημέρες)
- Γρήγορη ενηλικίωση (5-7 εβδομάδες)
- Μικρός κύκλος ζωής (12-18 μήνες)

Ομοικτικά Στέλεχη Ποντικού:

«Ως Ομοικτικό Στέλεχος ορίζεται το στέλεχος εκείνο που έχει διατηρήσει τη γενετική του σύσταση για τουλάχιστον 20 ανάδρομες διασταυρώσεις και συνεπώς όλοι του οι γονιδιακοί τόποι βρίσκονται σε ομοζυγωτική κατάσταση, εξαιρουμένων των φυσικών μεταλλαγών»

(σταθερό γενετικό υπόστρωμα)

Altman & Katz, 1979 – Morse, 1981

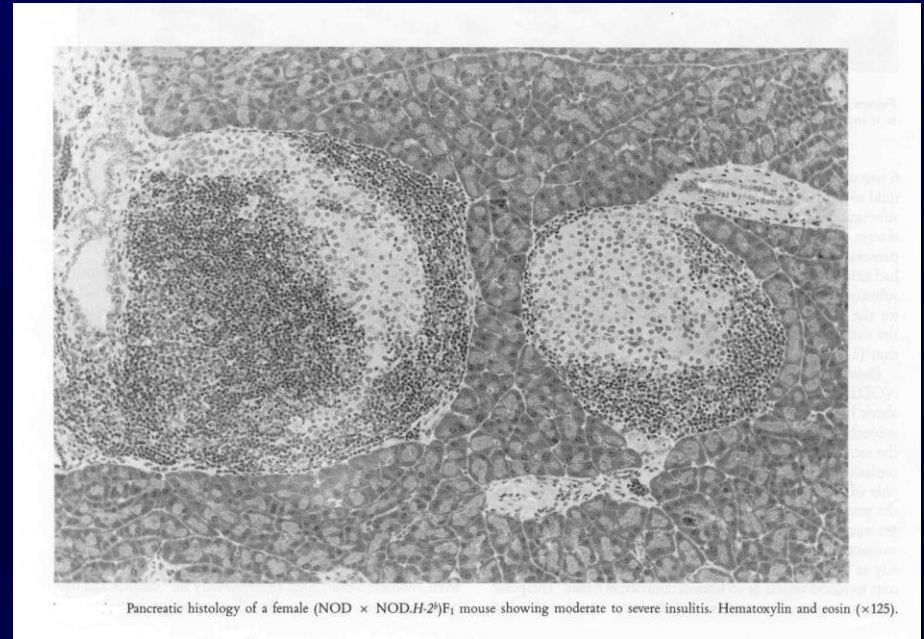
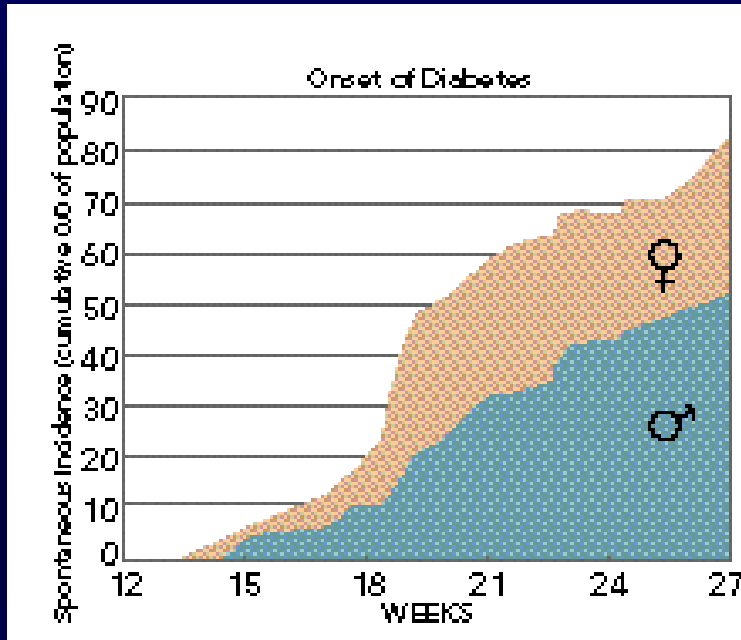


Σημασία:

- Στα διαγονιδιακά συστήματα προσπαθούμε να συσχετίσουμε **μία** συγκεκριμένη **γονιδιακή** λειτουργία με **φαινοτυπικές** αλλοιώσεις στο σύνολο του οργανισμού
- Πολλοί φαινότυποι καθορίζονται από δίκτυα γονιδίων (πχ. ανοσολογική απόκριση, καρκίνος) που σε καταστάσεις γενετικής **πρόσμιξης** μπορούν να δράσουν **επιστατικά** στη διαγονιδιακή μεταλλαγή, επηρεάζοντας έτσι τη συγκεκριμένη γονιδιακή λειτουργία
- Ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ομομικτικών στελεχών, η διαγονιδιακή μεταλλαγή μπορεί να επιφέρει διαφορετικές φαινοτυπικές αλλοιώσεις

ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

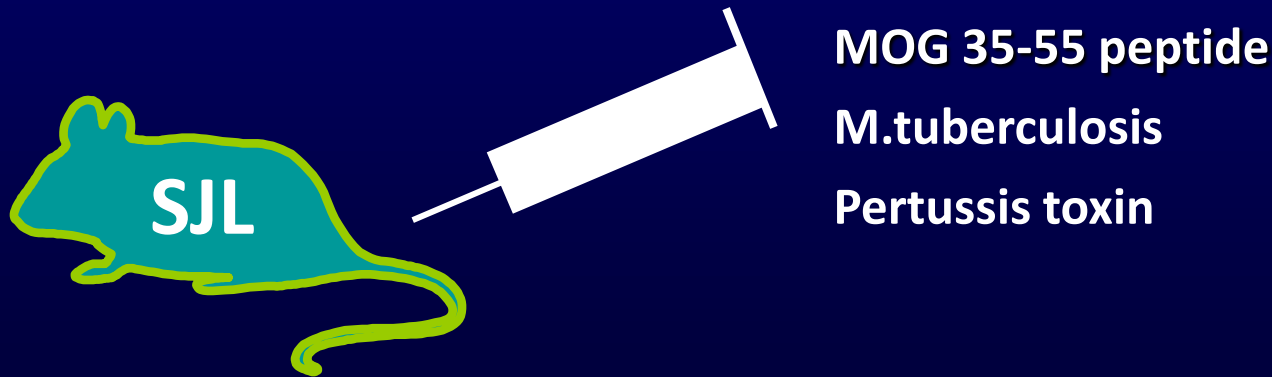
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Οι ποντικοί NOD ως πρότυπα αυτοάνοσου διαβήτη



- Πολυγενετική Βάση-19 παθογονοσχετιζόμενοι γονιδιακοί τόποι συμπεριλαμβανομένου του MHC-II (I-A protein; *I-Ag7* or *I-Anod*) και της Ιντερλευκίνης-2

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis as a mouse

Model for Multiple Sclerosis



Mice are recorded every 2 days for neurological deficits according to the following clinical scale

0: no clinical disease

1: tail weakness

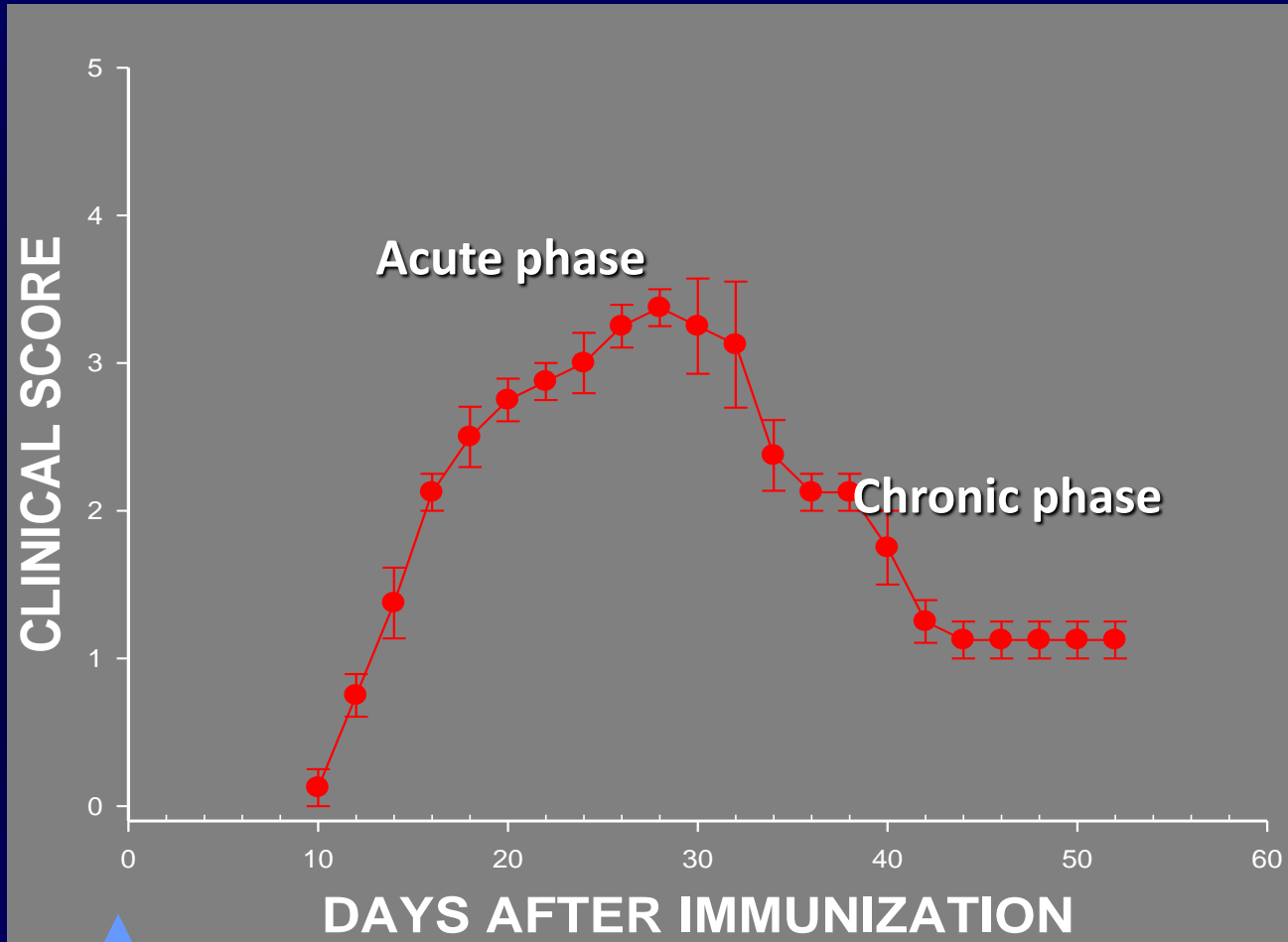
2: Paraparesis (incomplete paralysis of 1 or 2 hind limbs)

3: Paraplegia (complete paralysis of 1 or 2 hind limbs)

4: Paraplegia with forelimb weakness or paralysis

5: Dead or moribund animal

EAE disease initiation and progression in wt mice



immunization

Ομομικτικά Στελέχη και Γενετική Προδιάθεση στην Παθολογία

Στέλεχος	Προδιάθεση
DBA	Αρθρίτιδα
SJL	Πολλαπλή Σκλήρυνση
BALB/C	Υπερευαισθησία
NZB	Ερυθηματώδης Λύκος
A/J	Καρκίνος
C57BL/6	Ουδέτερο

Mouse strain information and resources (inbred and mutant)

International Mouse Strain Resources	http://www.informatics.jax.org/imsr/index.jsp
JAX Mice	http://jaxmice.jax.org/index.html
Federation of International Mouse Resources	http://www.fimre.org
Mouse Mutant Resource	http://www.jax.org/mmr/index.html
Mouse Mutant Regional Resource Centers	http://www.mmrrc.org
Riken Bioresource Center	http://www.brc.riken.jp/lab/animal/en
The European Mouse Archive	http://www.emmanet.org
Mouse Models of Human Cancer Consortium	http://http://mouse.ncifcrf.gov
Canadian Mouse Mutant Repository	http://www.cmmr.ca/index.html

Knockout and transgenic mice

International Gene Trap Consortium*	http://www.genetrap.org
Mouse Genome Informatics Deltagen/Lexicon	http://www.informatics.jax.org
Induced Mutant Resource, Jackson Laboratory	http://www.jax.org/imr/index.html
Samuel Lunenfeld Research Institute†	http://www.mshri.on.ca/nagy
Mouse Mutant Regional Resource Centers	http://www.mmrrc.org
Micer	http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/mousegenomics

Sequence/phenotype databases

Ensembl	http://www.ensembl.org/Mus_musculus/index.html
Map Viewer at NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview
Genome Browser, UCSC	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
Mouse Genome Informatics Database	http://www.informatics.jax.org
Vertebrate Genome Annotation	http://vega.sanger.ac.uk/index.html
Panther	http://pantherdb.org
Mouse Phenome Database	http://www.jax.org/phenome
Eumorphia	http://www.eumorphia.org
Mouse Tumor Biology Database	http://tumor.informatics.jax.org
German Mouse Clinic	http://www.gs.f.de/ieg/gmc

Pathways analysis

Ingenuity	http://www.ingenuity.com
GenMAPP	http://www.genmapp.org
KEGG Pathway Database	http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

Βιοπληροφορική και Γενετική Ποντικού

SNP databases

Roche	http://mousesnp.roche.com
GNF	http://snp.gnf.org
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
Mouse Phenome Database	http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rt=snp/door
Mouse Genome Informatics Database	http://www.informatics.jax.org/menus/strain_menu.shtml
Perlegen	http://mouse.perlegen.com/mouse
Wellcome Trust Centre for Human Genetics	http://www.well.ox.ac.uk/mouse/INBREDS
Broad Institute	http://www.broad.mit.edu/personal/claire/MouseHapMap/Inbred.htm

Expression databases

GNF SymAtlas	http://symatlas.gnf.org
Institute for Genomic Research	http://pga.tigr.org
Gene Expression Omnibus	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
The Jackson Laboratory	http://www.informatics.jax.org/menus/expression_menu.shtml
Brain Atlas	http://www.brainatlas.org
GenSat	http://www.gensat.org/index.html
EMAGE	http://genex.hgu.mrc.ac.uk/Emage/database/emageIntro.html

Comparative genomics

VISTA	http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml
Mouse Genome Informatics Database	http://www.informatics.jax.org/menus/homology_menu.shtml
Rat Genome Database	http://www.rgd.mcw.edu/VCMAP/mapview.shtml

Quantitative traits analysis

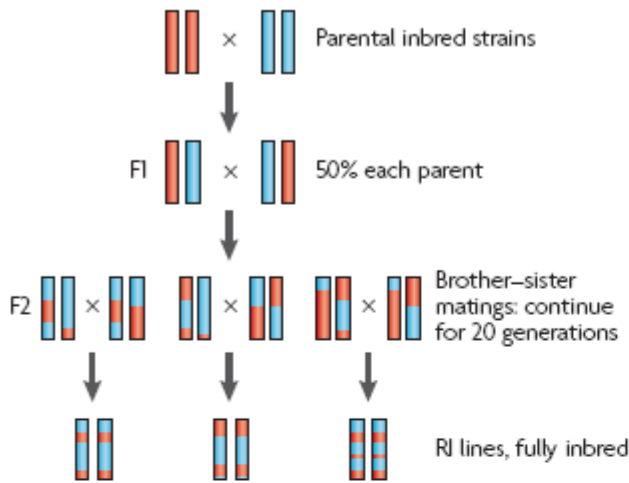
The Jackson Laboratory, Churchill Laboratory	http://www.jax.org/staff/churchill/labsite
R/qrtl	http://www.biostat.jhsph.edu/~kbroman/qrtl
Web/QTL	http://www.genenetwork.org/home.html
The Jackson Laboratory PGA	http://pga.jax.org/resources/index.html
The Complex Trait Consortium	http://www.complextait.org

The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis

Luanne L. Peters, Raymond F. Robledo, Carol J. Bult, Gary A. Churchill, Beverly J. Paigen and Karen L. Svenson

Γενετική Ανάλυση/ανίχνευση παθολογικών γονιδιωματικών τόπων

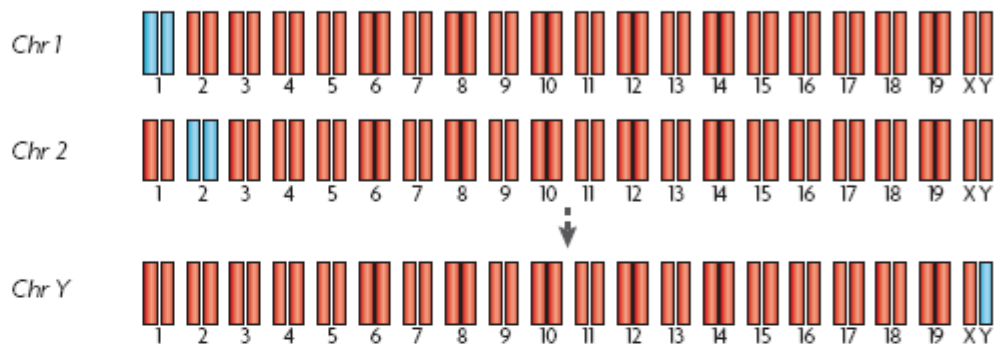
a Recombinant inbred strains



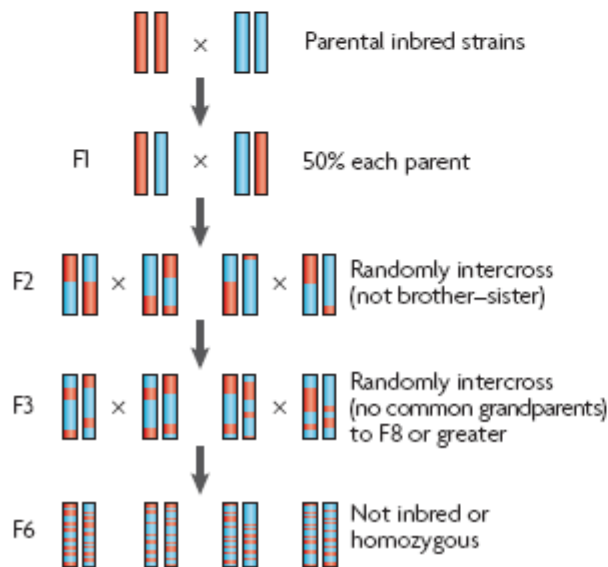
c Congenic strains



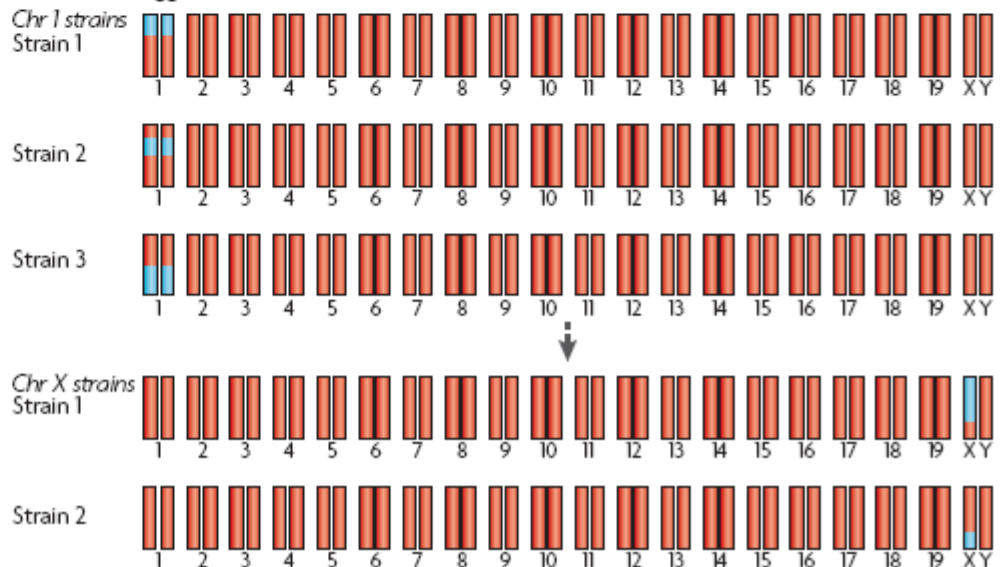
d Chromosome substitution strains



b Advanced intercross lines



e Genome tagged mice



Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene

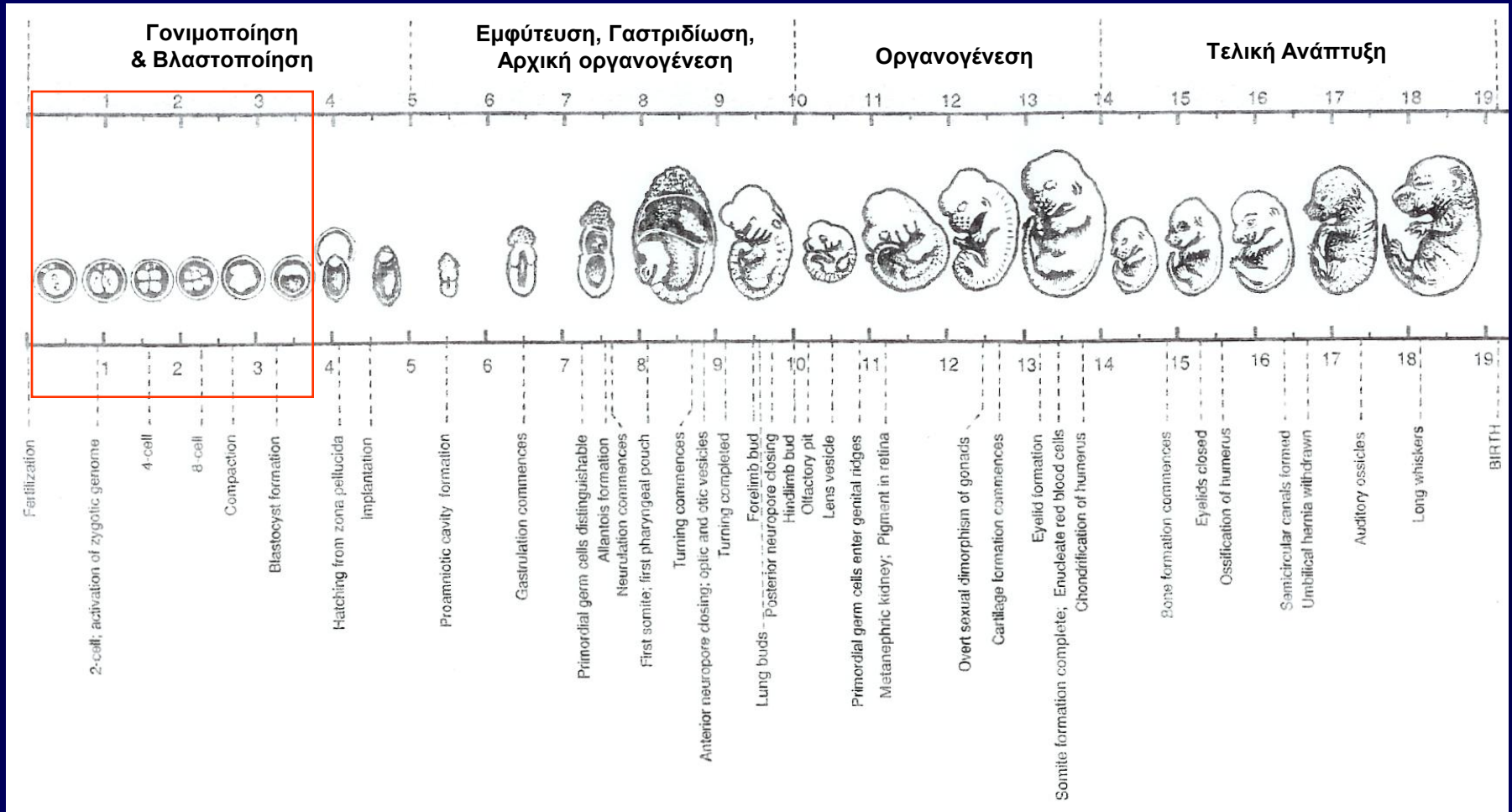
Alexander Poltorak, Xiaolong He,* Irina Smirnova, Mu-Ya Liu,†
 Christophe Van Huffel,‡ Xin Du, Dale Birdwell, Erica Alejos,
 Maria Silva, Chris Galanos, Marina Freudenberg,
 Paola Ricciardi-Castagnoli, Betsy Layton, Bruce Beutler§

Fig. 2. The *Lps^d* allele represents a missense mutation affecting the cytoplasmic domain of Tlr4. Reverse transcription of mRNA isolated from mouse peritoneal macrophages was followed by PCR with the primers TTCTAACTC-CCTCCTGCGAC and CCTCTTCTC-CTTCAGATTAAG, which amplify the entire coding region of the

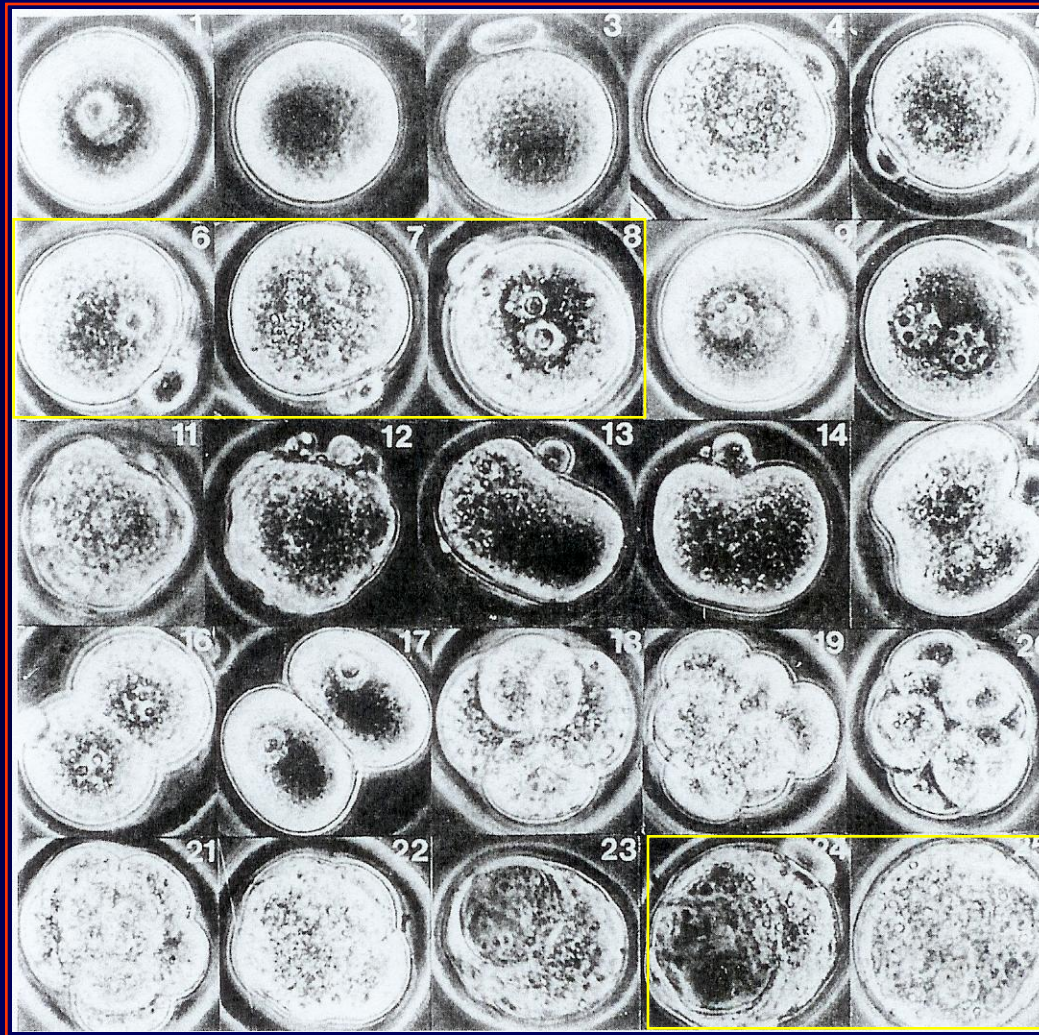
mouse Tlr4 cDNA, yielding a product 2951 nucleotides (nt) long. The open reading frame of the mouse Tlr4 cDNA predicts a protein that is 835 amino acids long. The mutation, at position 712, lies in the most conserved portion of the Tlr4 sequence and is located within the cytoplasmic domain. Dots below the sequence indicate residues that vary between species. The Pro→His substitution that distinguishes Tlr4 of C3H/HeJ mice is boxed. Abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr.

		mouse/rat	
		712	
C3H/HeJ(700) ...RFHLCLHYRDFI	H	GVAIAANIIQEGFHKS...(730)	
C3H/HeN(700) ...RFHLCLHYRDFI	P	GVAIAANIIQEGFHKS...(730)	
rat (700) ...RFQLCLHYRDFI	P	GVAIAANIIQEGFHKS...(730)	
human (702) ...PFQLCLHYRDFI	P	GVAIAANIIHEGFHKS...(732)	
	• •		•

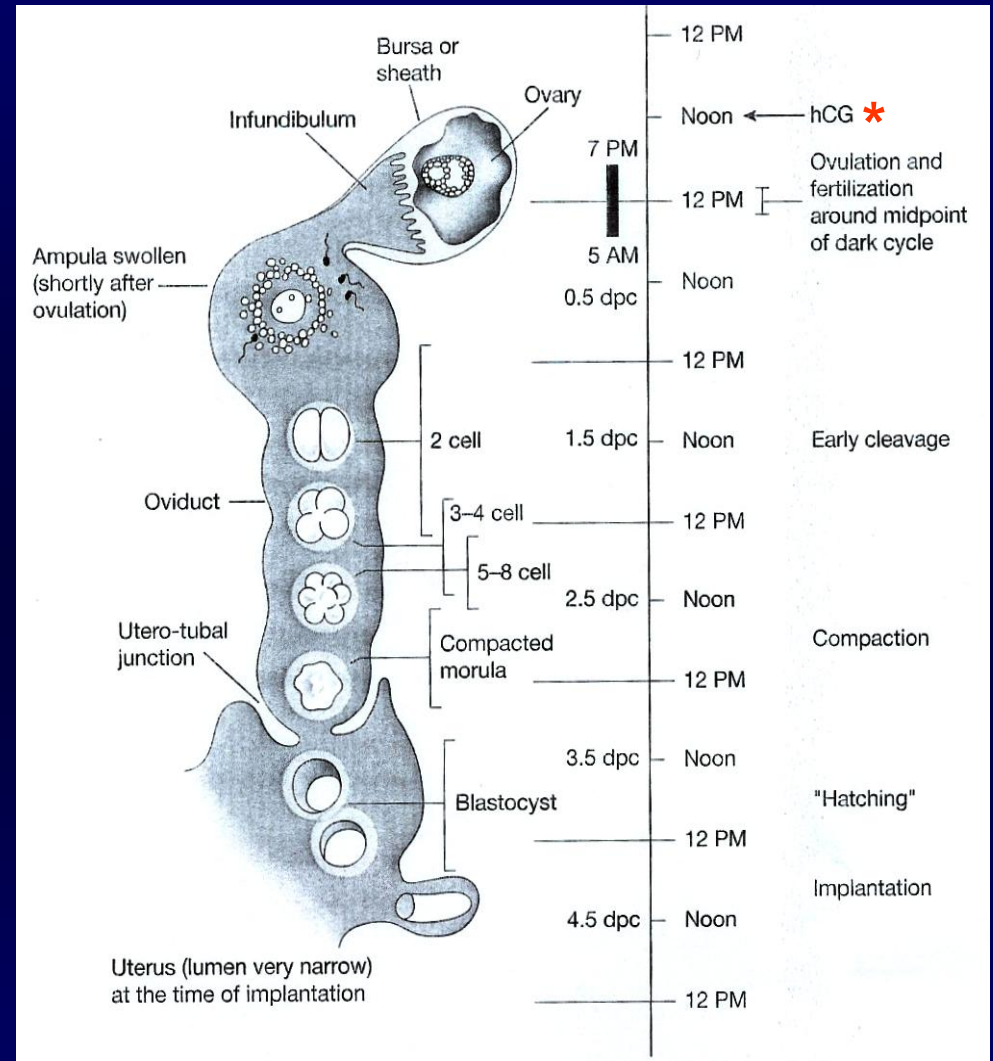
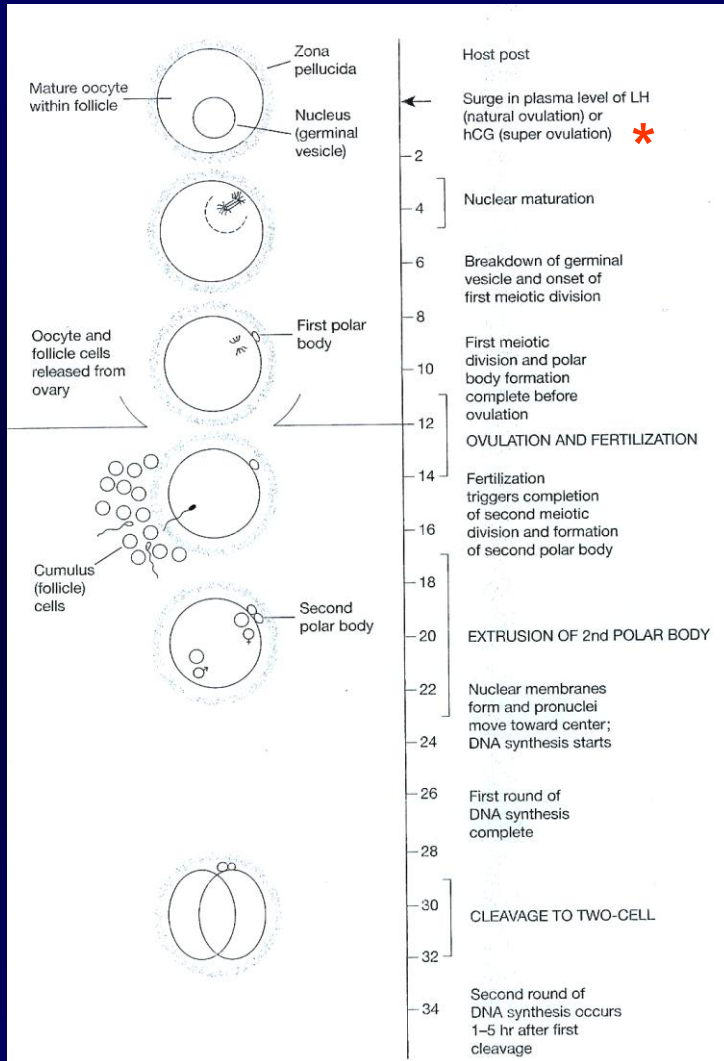
Στάδια ανάπτυξης του εμβρύου του ποντικού



Στάδια Ανάπτυξης Εμβρύου-πριν την εμφύτευση



Φυσική / Τεχνητή Ωορρηξία & γονιμοποίηση



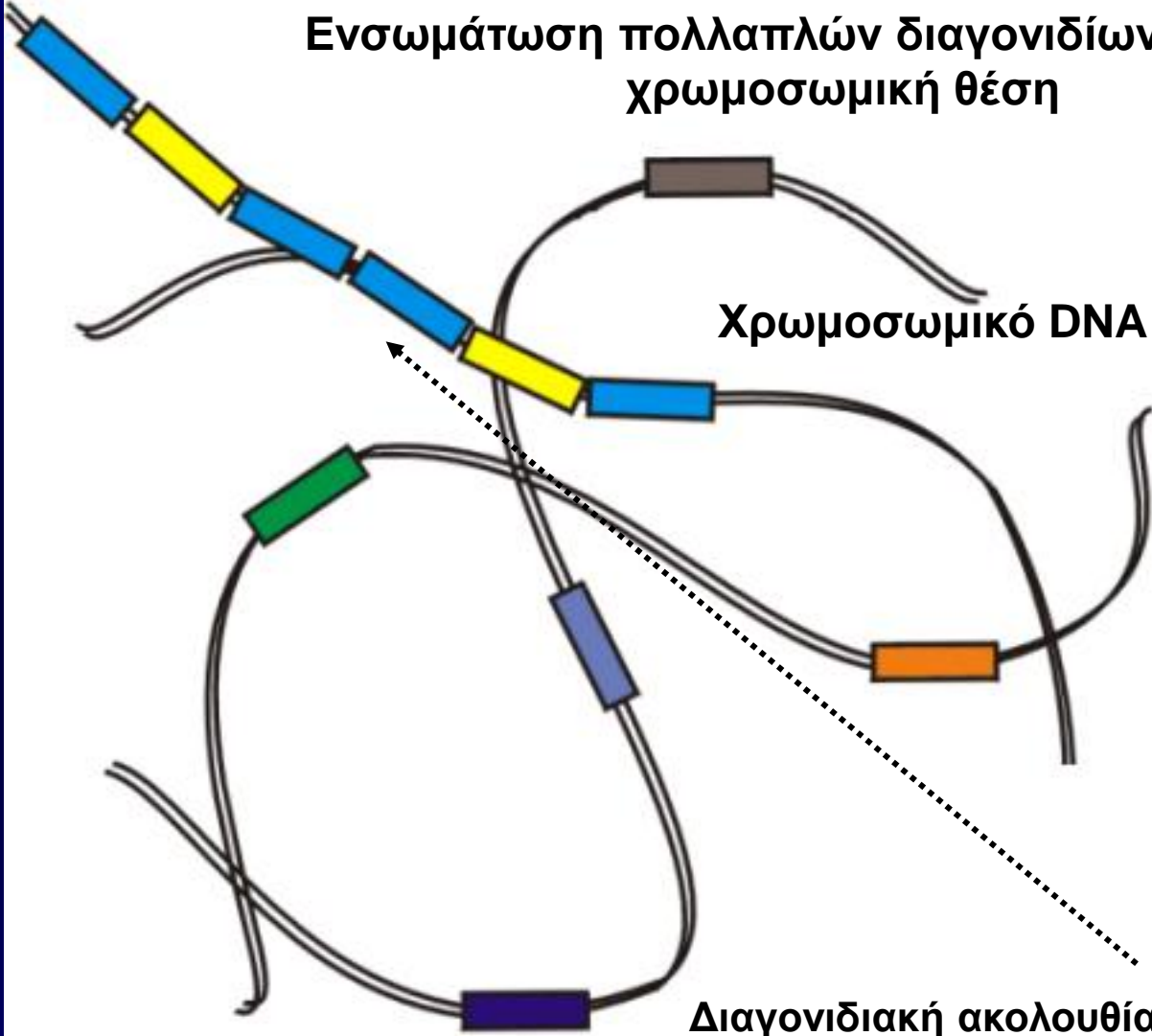
***hCG: Χοριονική Γοναδοτροπίνη**

2^η ΕΝΟΤΗΤΑ:

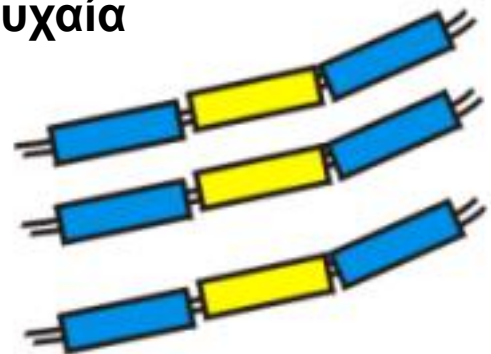
- Διαγονιδιακά συστήματα προσθήκης, τυχαίας ενσωμάτωσης ή υπερέκφρασης

Στοιχεία Μοριακής-Σύσταση Διαγονιδίων
Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών
Ανάλυση Διαγονιδιακών ποντικών
Εφαρμογές & παραδείγματα

Ενσωμάτωση πολλαπλών διαγονιδίων σε τυχαία
χρωμοσωμική θέση



Χρωμοσωμικό DNA



Εξωγενές
Γονίδιο
(Διαγονίδιο)

Διαγονιδιακή ακολουθία -tandem array of transgenes.
(Διαγονιδιακός γενετικός τόπος- transgenic allele)

ΣΤΟΧΟΙ:

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ
ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ)**

ΑΝΑΛΥΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Ο σχεδιασμός ενός διαγονιδίου βασίζεται στις ανάγκες της ανάλυσης και τα πρότυπα έκφρασης των φυσικών γονιδίων

1. Επιλογή Κωδικής αλληλουχίας

Είδος

cDNA (δηλ. εκφραζόμενο γονίδιο μετά το μάτισμα)

Γονιδιακή αλληλουχία (δηλ. φυσικό γονίδιο με εσώνια/εξώνια)

2. Επιλογή στοιχείων ελέγχου (υποκινητές, μη μεταφραζόμενα άκρα mRNA, σήματα πολυαδενυλίωσης)

Φυσικά (δηλ. του ιδίου το γονιδίου)

Ετερόλογα (δηλ. από άλλα γονίδια που ενδέχεται να ενισχύσουν ή να ελαχιστοποιήσουν την έκφραση)

3. Επιθυμητό πρότυπο έκφρασης

Καθολικό (δηλ. στο σύνολο των ιστών του ποντικού)

Ιστοειδικό (δηλ. σε συγκεκριμένους ιστούς του ποντικού)




Εκτοπικό (δηλ. σε ιστούς που φυσιολογικά δε εκφράζουν το γονίδιο)

4. Επιθυμητή διάρκεια έκφρασης

Συνεχής

Επαγόμενη

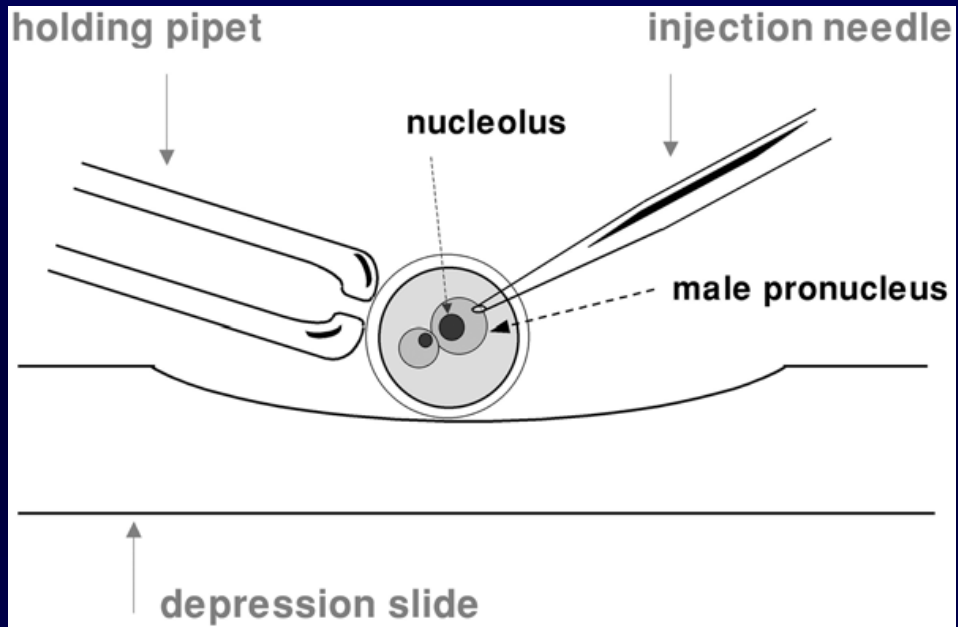
Παραδείγματα Διαγονιδιακών Κατασκευών

Κατασκευή	Πηγή DNA	Στοιχεία Ελέγχου
1. 	cDNA	Ετερόλογα
2. 	Γονίδιο	Φυσικά
3. 		«Υβριδικά»
4. Διαγονίδια μεγάλου μεγέθους Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) Yeast Artificial Chromosomes (YACs)	Γονιδιακός Τύπος	Φυσικά

Μεθοδολογίες Εισαγωγής Διαγονιδίων

1. Μετασχηματισμός βλαστικών κυττάρων
(Προβληματική μέθοδος – «μωσαϊκά»)
2. Μικροέγχυση σε προ-πυρήνες ζυγοτών
(Η πλέον «κλασσική» και επιτυχημένη μέθοδος)
3. Επιμόλυνση με Ιούς (Αδενοϊούς, Ρετροϊούς)
(Προβληματική μέθοδος-τοξικότητα, «μωσαϊκά»)

Η διαδικασία της προπυρηνικής μικρο-έγχυσης DNA

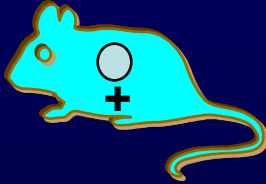


Το πρωτόκολλο με « μία ματιά »

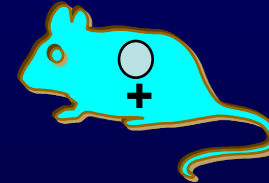
Δότης

Δέκτης

Ορμονική
Επαγωγή
Ωορρηξίας

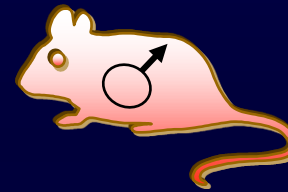
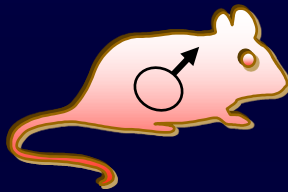


Συγγενικό
Στέλεχος



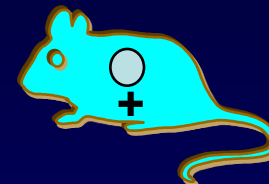
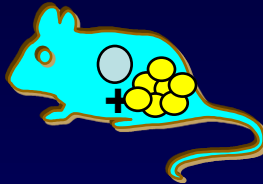
Φυσική
Κατάσταση
«Οίστρου»

Φυσική
Διασταύρωση



Φυσική
Διασταύρωση
Με στείρο
αρσενικό
(βασεκτομή)

Αφαίρεση
Ζυγών



«Ψευδέγκυος»
Θηλυκό

Μικροέγχυση
DNA



Μεταμόσχευση



Γέννηση

Στάδια Γονοτυπικής Ανάλυσης σε DNA από βιοψίες ή βιολογικά υγρά

1. Ανίχνευση «διαγονιδιακών ιδρυτών σειράς» (transgenic founders)
(PCR, υβριδισμός στυπωμάτων σχισμής με σημασμένους ανιχνευτές για τη ανίχνευση του διαγονιδίου)
2. Έλεγχος μεταβίβασης του διαγονιδίου-Καθορισμός αριθμού αντιγράφων
Διασταύρωση με ποντικούς συγγενούς στελέχους
(Αποκλεισμός στείρων “ιδρυτών”)
Γονοτυπική ανάλυση για την ανίχνευση του διαγονιδίου στους απογόνους
(Υβριδισμοί στυπωμάτων σχισμής)
Διαχωρισμός πολλαπλών ενσωματώσεων
Διαχωρισμός μωσαϊκών
Η μεταβίβαση ακολουθεί τους βασικούς κανόνες γενετικής
3. Έλεγχος ακεραιότητας διαγονιδίου
Χαρτογράφηση διαγονιδιακού τόπου μετά από πέψεις γενωμικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και υβριδισμό στυπωμάτων με σημασμένους ανιχνευτές (Southern Blot)
4. Εγκατάσταση αποικιών των σειρών -Απλή γονοτυπική ανάλυση με PCR

1. Ανάλυση Προτύπου Έκφρασης στο επίπεδο του μεταγράφου (mRNA)

- Απομόνωση Ολικού RNA από ιστούς και κύτταρα-
Ανίχνευση Έκφρασης του διαγονιδίου (RT-PCR, Northern Blots, S1 nuclease mapping, Ribonuclease Protection assays)
- Ανίχνευση μεταγράφου σε τομές ιστών με υβριδισμούς *in situ*

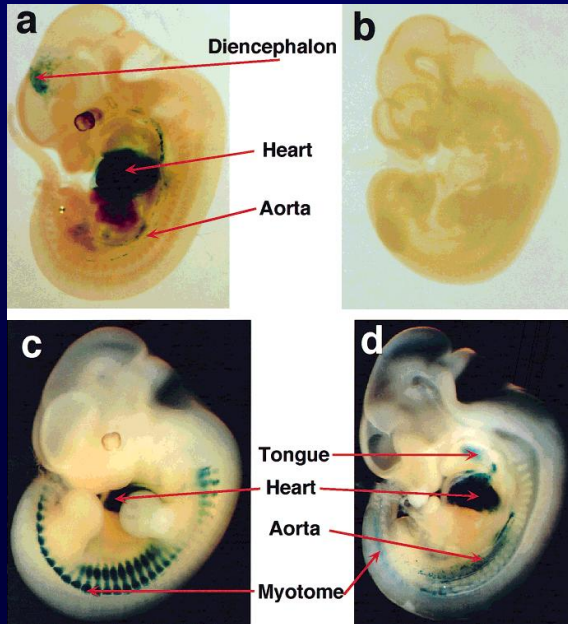
2. Ανάλυση Προτύπου έκφρασης στο επίπεδο της πρωτεΐνης (εάν υπάρχουν αντισώματα ή το διαγονίδιο φέρει ενσωματωμένο δείκτη-tag)

- Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ιστούς ή κύτταρα, διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση- ανοσοανίχνευση σε στυπώματα (Western blots)
- Ανοσοϊστοχημεία σε τομές ιστών
- Ανοσοφθορισμός και κυτταρομετρία ροής
- Μελέτες δράσης ή ενεργότητας

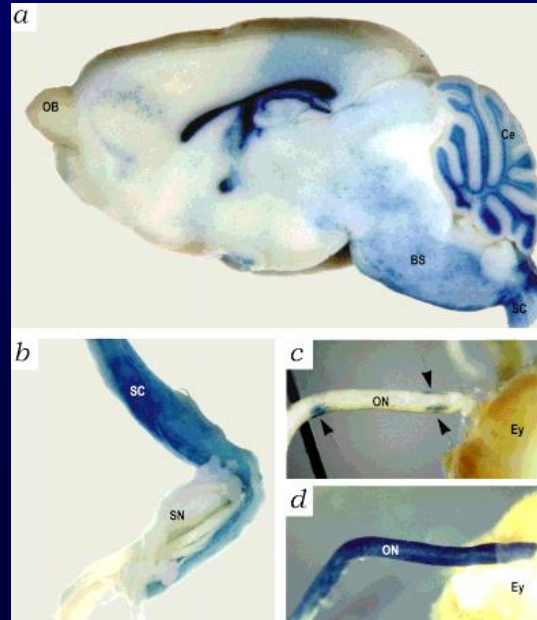
3. Φαινοτυπική ανάλυση (ιστοπαθολογικές, κυτταρολογικές κλπ. Αναλύσεις)

Παραδείγματα:

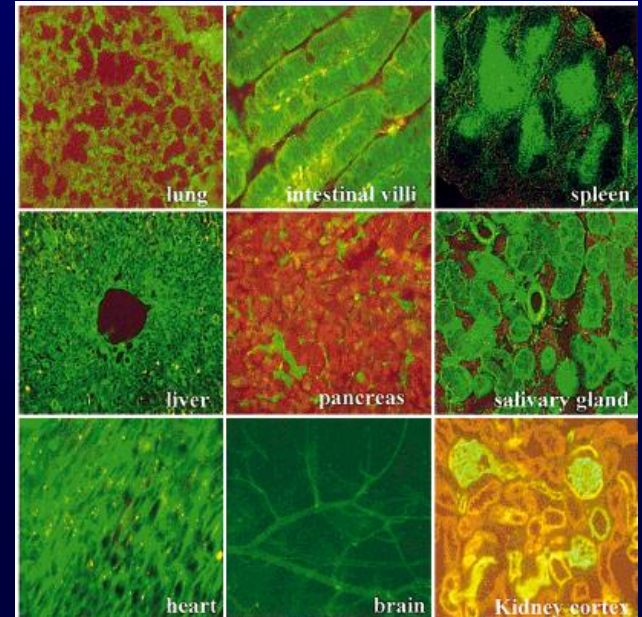
- Ανάλυση υποκινητών με χρήση διαγονιδίων-μαρτύρων (reporters)



Υποκινητής: Smooth muscle actin
Μάρτυρας: β -galactosidase
Λείος Μυϊκός Ιστός



Υποκινητής: Myelin Basic Protein
Μάρτυρας: β -galactosidase
Ολιγοδενδρογλοία



Υποκινητής: Γενικός
Μάρτυρας: EGFP
Διάφορα Όργανα

- Πειραματικά πρότυπα καρκίνου-υπερέκφραση K-ras, p53, κλπ.
- Πειραματικά πρότυπα φλεγμονής- υπερέκφραση κυτοκινών

3^η ΕΝΟΤΗΤΑ:

- Διαγονιδιακά συστήματα γονιδιακής στόχευσης (gene targeting)
Βλαστικά & Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα
Ομόλογος Ανασυνδυασμός- “knock-out” & “knock-in”

Μεθοδολογίες

- Φάση I Γονιδιακές κατασκευές στόχευσης
Γονιδιακή Στόχευση σε EB
Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων
- Φάση II Ενσωμάτωση EB σε έμβρυα
- Φάση III Χιμαιρικά ζώα
- Φάση IV Ανάλυση ποντικών
Εφαρμογές & παραδείγματα



ΣΤΟΧΟΙ

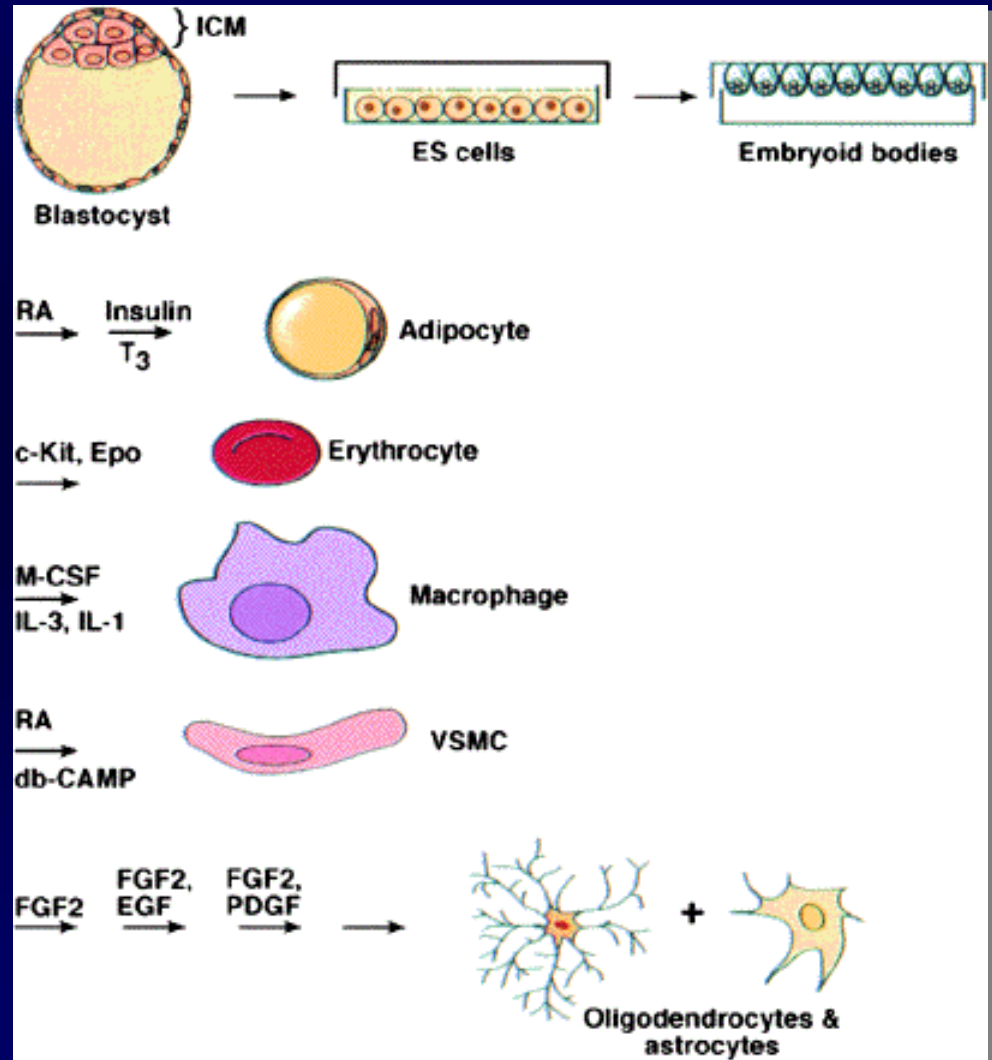
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΝΑΛΥΣΗ & ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΟΝΙΔΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΣΙΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΤΟΠΟΥ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΟ-ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΜΕΣΑ ΑΠΟ ΤΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΟΜΟΛΟΓΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

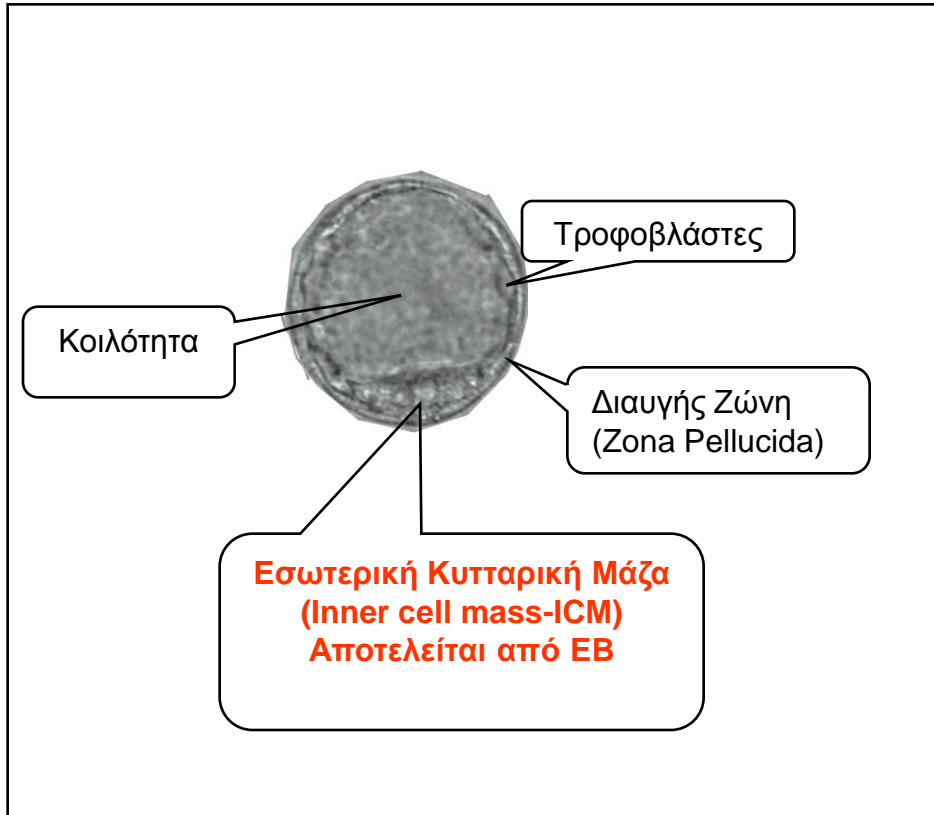
- ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ**
- ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ**

Εμβρυϊκά Βλαστικά Κύτταρα (ΕΒ) (Embryonic stem cells-ES)

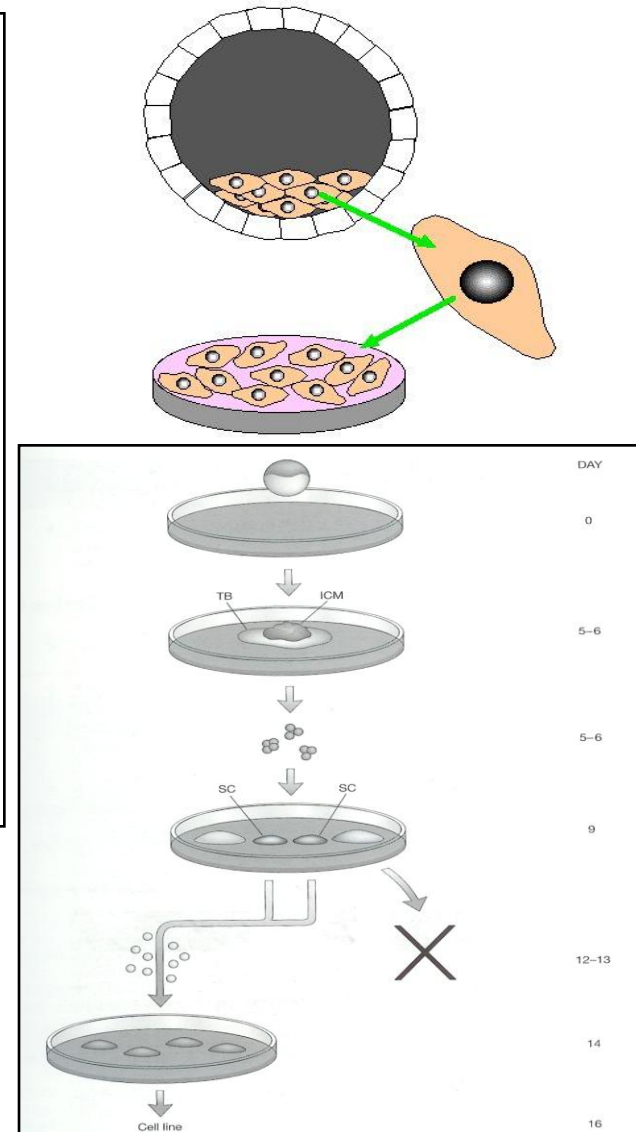
- Πλειοδυναμικά κύτταρα
- Εύκολη Καλλιέργεια σε αδιαφοροποιήτη κατάσταση
- Εύκολη διαφοροποίηση σε οποιονδήποτε ιστό
- Εύκολη γενετική τροποποίηση



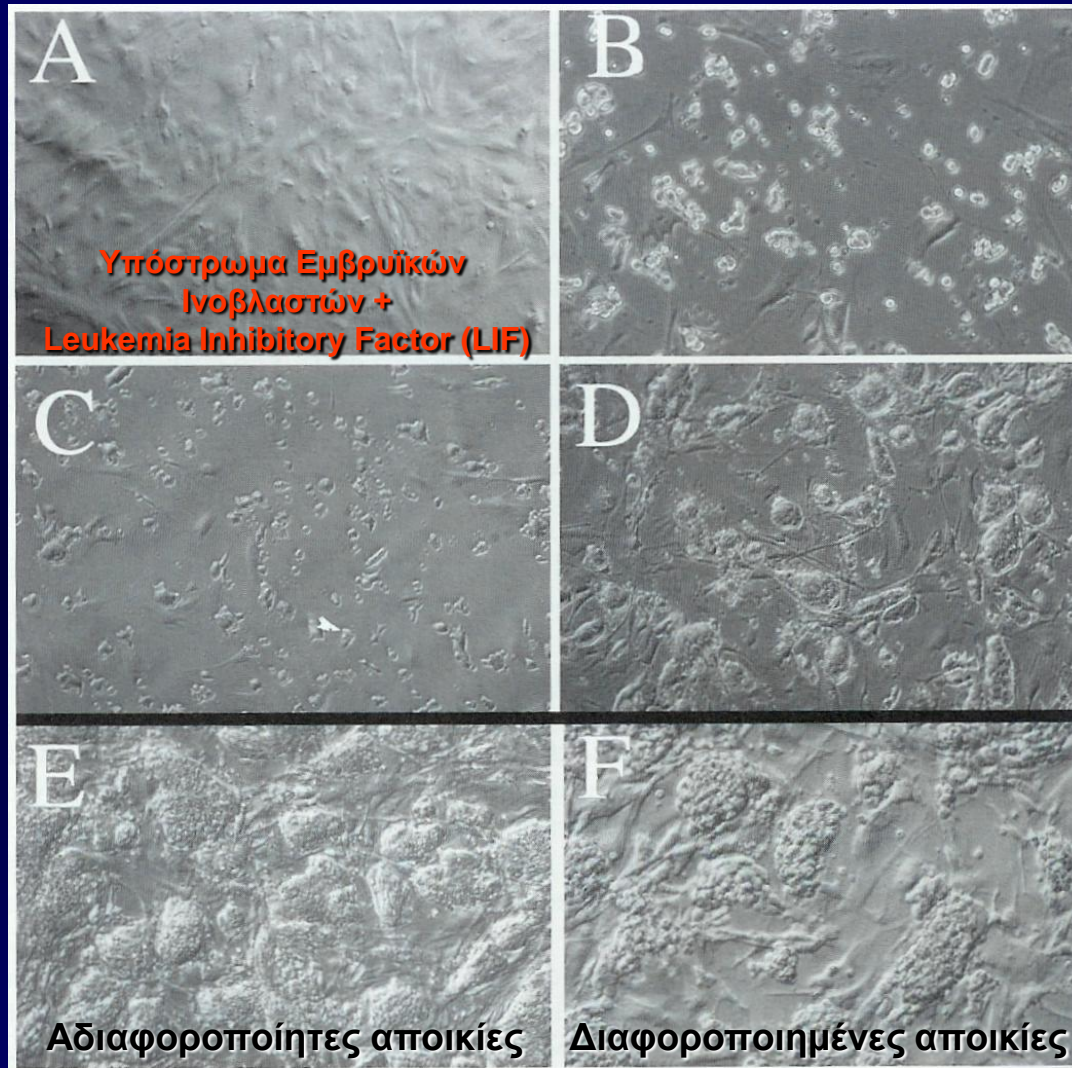
Βλαστοκύστη

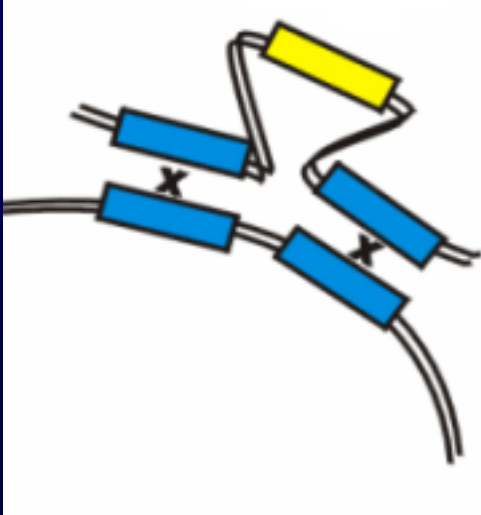


Απομόνωση ΕΒ



Καλλιέργεια Εμβρυϊκών Βλαστοκυττάρων





Ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ γονιδιακών κατασκευών αντικατάστασης και ενδογενών γονιδιακών τόπων κατά τη γονιδιακή στόχευση

“Knock-out” : αντικατάσταση με μεταλλαγή αποσιώπησης

“Knock-in” : αντικατάσταση με μεταλλαγή αλλοίωσης λειτουργίας ή ρύθμισης



Η κατασκευή γονιδιακής στόχευσης πρέπει να φέρει:

- μεγάλα τμήματα DNA (>2Kb) υψηλής ομολογίας και συγγένειας προς το φυσικό γενετικό τόπο και εκατέρωθεν της περιοχής προς μεταλλαγή-άκρα *(το ποσοστό του ομόλογου ανασυνδυασμού είναι ανάλογο του μεγέθους του ομόλογου DNA)*
- τη μεταλλαγή η οποία θα πρέπει να έχει ελεγχθεί σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας, καθώς και λειτουργικά εφόσον αυτό είναι δυνατό
- **Ετερόλογα γονίδια για τη θετική επιλογή των ανασυνδυασμένων βλαστικών κυττάρων** – ο ομόλογος ανασυνδυασμός είναι ένα σπάνιο φαινόμενο (συχνότητα $1:10^6$) και συνεπώς είναι απαραίτητη η στρατηγική για τον εμπλουτισμό των καλλιεργειών EB σε ανασυνδυασμένα κύτταρα

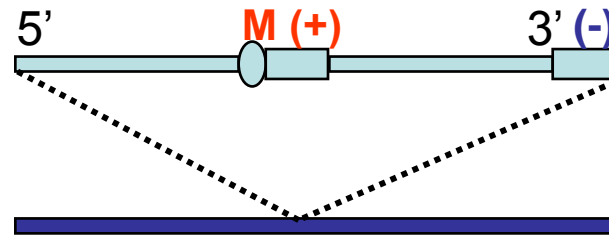
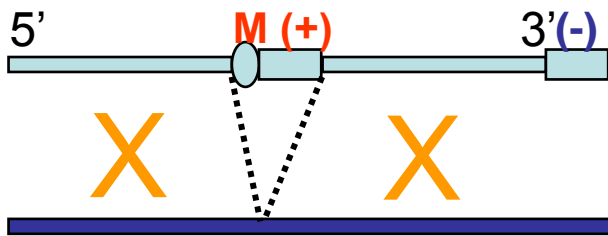
«Κλασσική» στρατηγική εμπλουτισμού:

1. **Θετική επιλογή** κυττάρων που **περιέχουν** την γονιδιακή κατασκευή λόγω της δράσης ενός ετερόλογου γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα σε μία αντιβιοτική ουσία
2. **Αρνητική επιλογή** των κυττάρων όπου η γονιδιακή κατασκευή έχει εισαχθεί σε **τυχαίες** χρωμοσωμικές θέσεις λόγω της δράσης ενός ετερόλογου γονιδίου που προσδίδει τοξικότητα σε μία αντιβιοτική ουσία

1° Αντιβιοτικό
επιλέγει τα κύτταρα
που έχουν την κατασκευή

Ομόλογος
Ανασυνδυασμός

Τυχαία Ενσωμάτωση

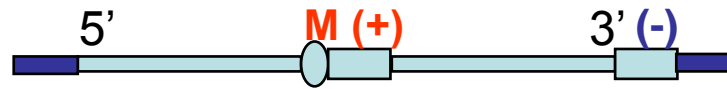
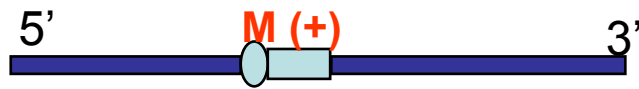


Κατασκευή στόχευσης

Χρωμοσωμικό DNA

Ανασυνδυασμένος Τύπος

Τύπος Ενσωμάτωσης

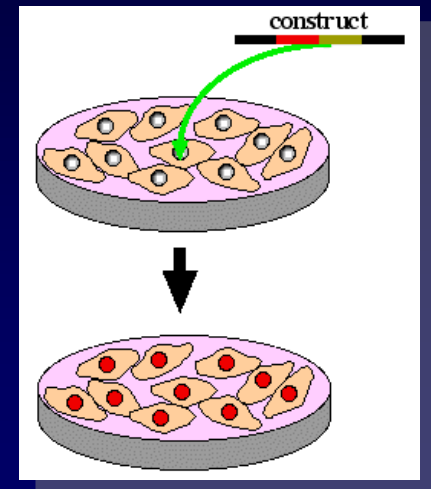


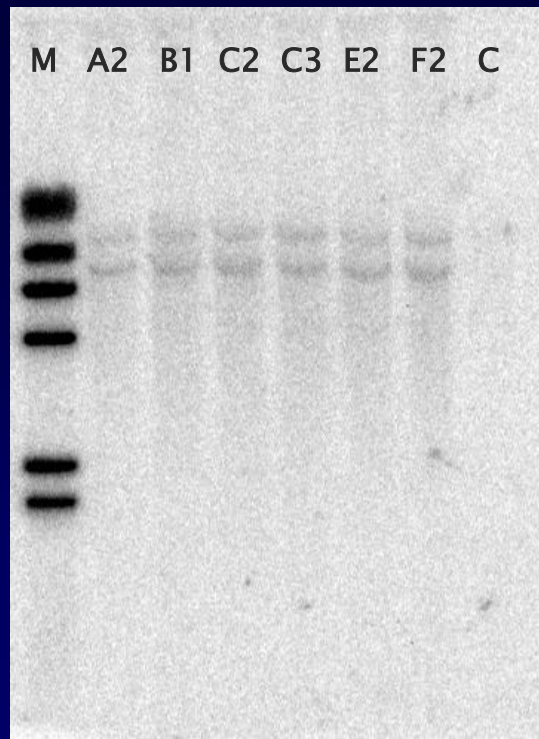
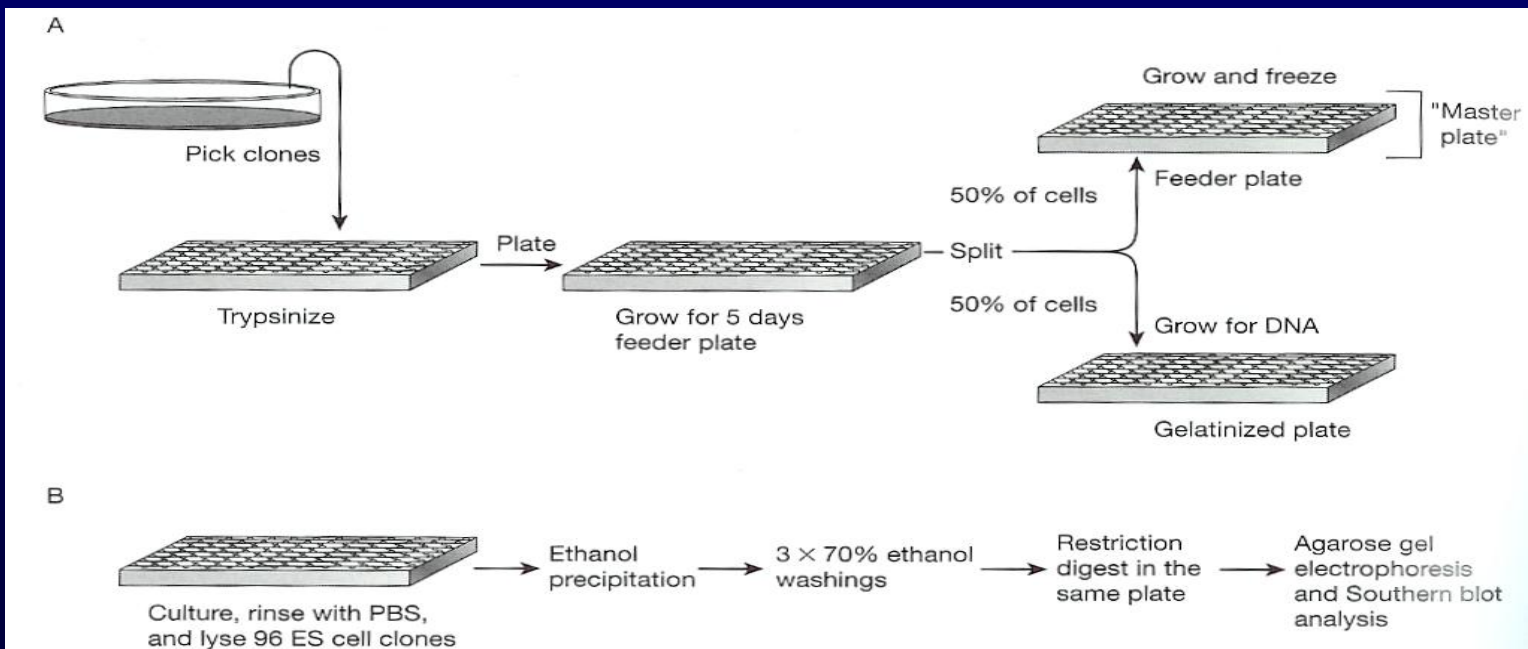
2° Αντιβιοτικό
Σκοτώνει τα κύτταρα
Με τυχαίες ενσωματώσεις



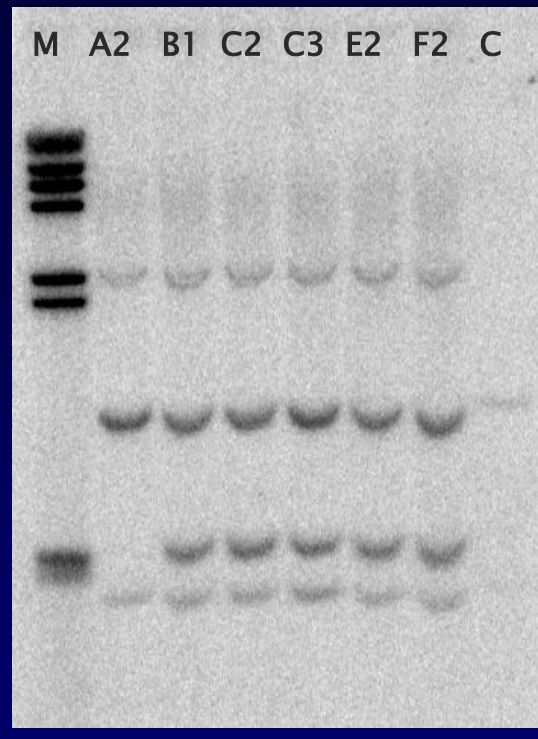
Εισαγωγή Κατασκευών στόχευσης σε EB

- Μετασχηματισμός καλλιεργειών βλαστικών κυττάρων με ηλεκτροπαλμό (electroporation)
- Ανακαλλιέργεια σε στρώμα ινοβλαστών και LIF παρουσία αντιβιοτικών επιλογής
- Απομόνωση ανθεκτικών κλώνων (200-1000)
- Ανακαλλιέργεια κλώνων σε πολλαπλές πλάκες (96 well replica plates)
- Γονοτυπικός έλεγχος-επιλογή κλώνων που φέρουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό
- Έλεγχος Καρυώτυπου
- Δημιουργία αποθεμάτων επιλεγμένων κλώνων
- Επαναφορά EB σε βλαστοκύστεις





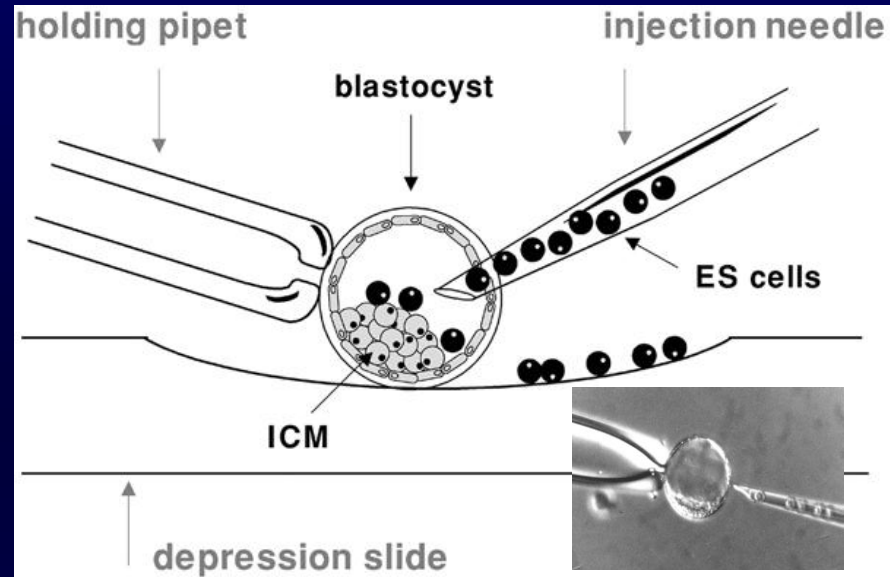
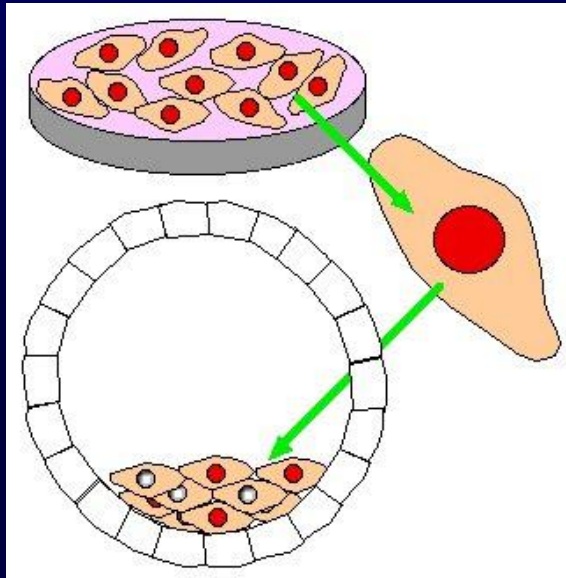
← φυσικός Τόπος
 ← Μεταλλαγμένος Τόπος



← Μετ. Τόπος
 ← φυσ. Τόπος
 ← Μετ. Τόπος
 ← φυσ. Τόπος

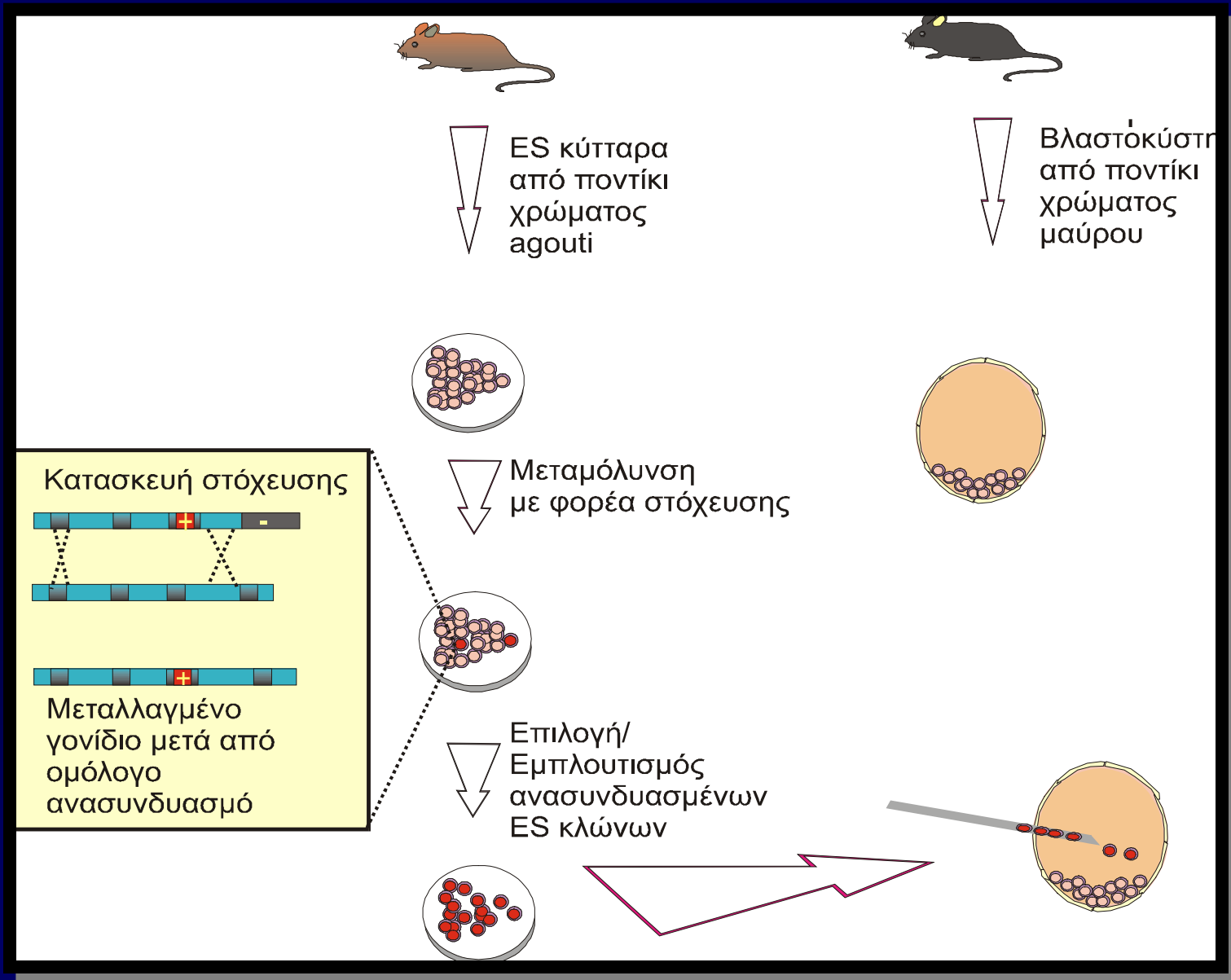
Τεχνικές Μεταφοράς

- Με μικροένεση

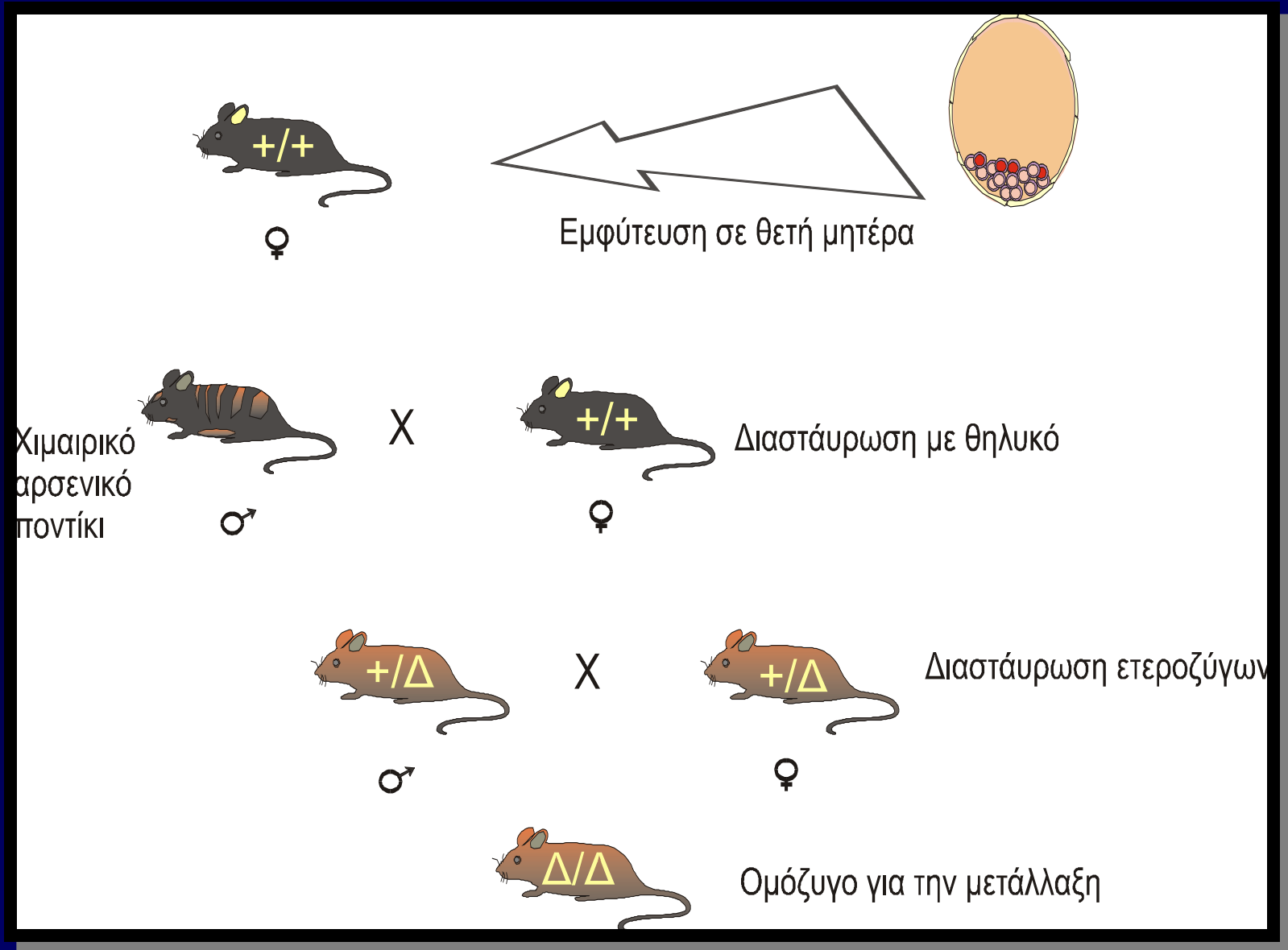


- Με σύντηξη εμβρύων (aggregation chimeras)

Γονιδιακή Στόχευση Ενδογενούς Γενετικού τόπου (Gene Targeting)



Μεθοδολογίες Διαγονιδιακών ΙΙ: Γονιδιακή Στόχευση Ενδογενούς Γενετικού τόπου (Gene Targeting)



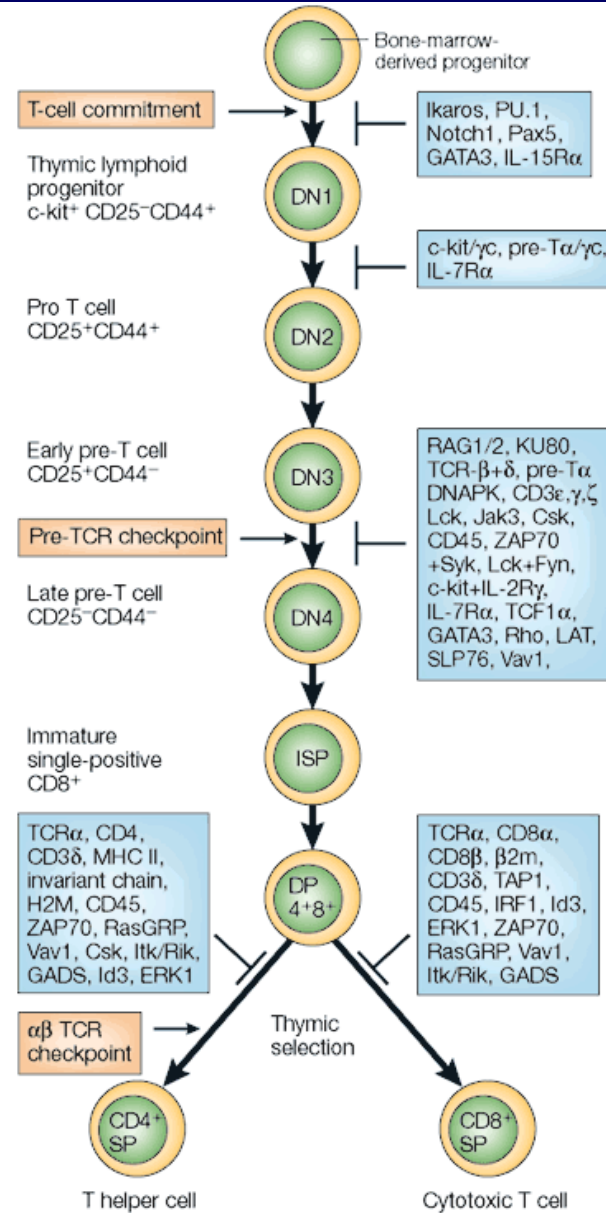
Χίμαιρα
ΕΒ από agouti
Βλαστοκύστη από μαύρο

Φυσικού
Τύπου
«Μαύρο»



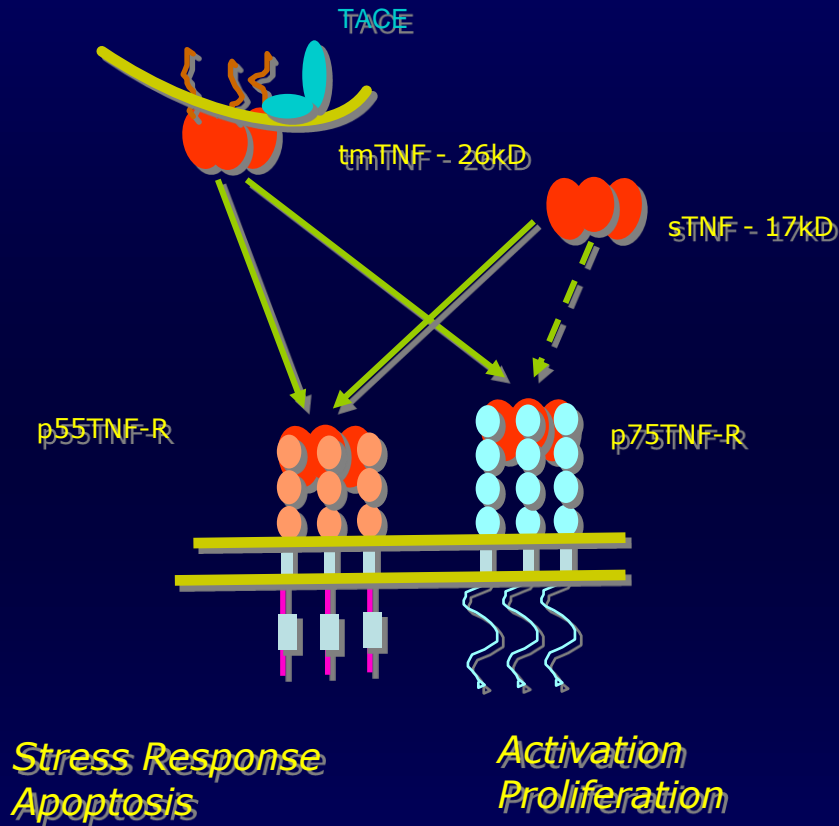
Παράδειγμα Εφαρμογής Knock-out στην Ανοσολογία (1)

Knock-out που επηρεάζουν την επιλογή των T-λεμφοκυττάρων Στο Θύμο



Knock-out στην Ανοσολογία (2):

Η πλειοτροπική δράση του TNF και των υποδοχέων του



Φυσιολογία

Άμυνα έναντι βακτηρίων
Ανοσολογική Ρύθμιση

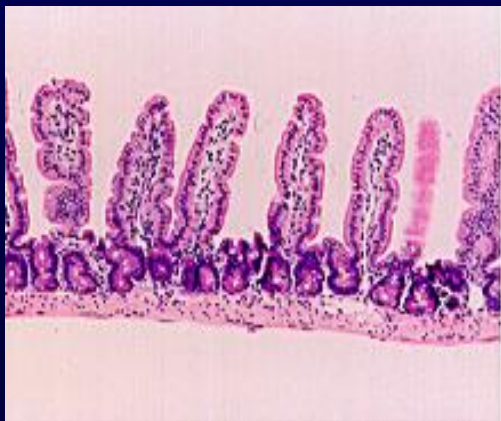
Ανάπτυξη & Οργάνωση
Δευτερογενών Λεμφικών Οργάνων

Παθολογία

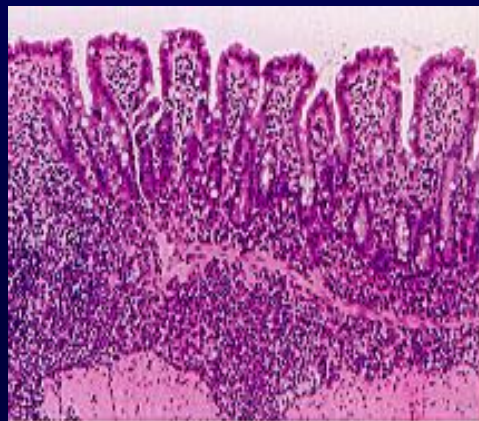
Σηπτική Καταπληξία
Ρευματοειδείς Αρθρίτιδα
Φλεγμονώδης Εντερίτιδα
Σκλήρυνση Κατά Πλάκας
Σακχαρώδης Διαβήτης
Ερυθηματώδης Λύκος

Ileal inflammation resembling Crohn's disease in $TNF^{\Delta ARE}$ mice

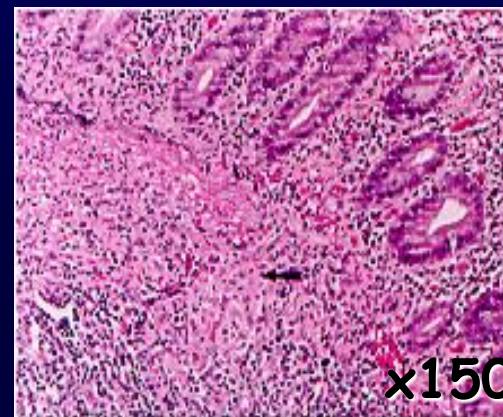
$TNF^{+/+}$ 8wks



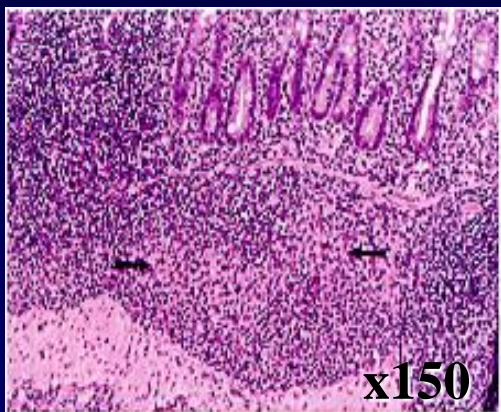
$TNF^{\Delta ARE/\Delta ARE}$ 7wks



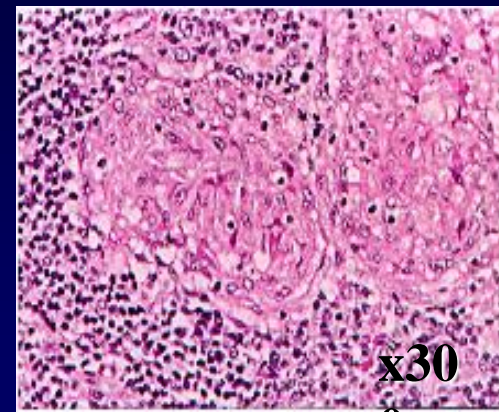
Human CD



$TNF^{\Delta ARE/\Delta ARE}$ granuloma



Human CD granuloma



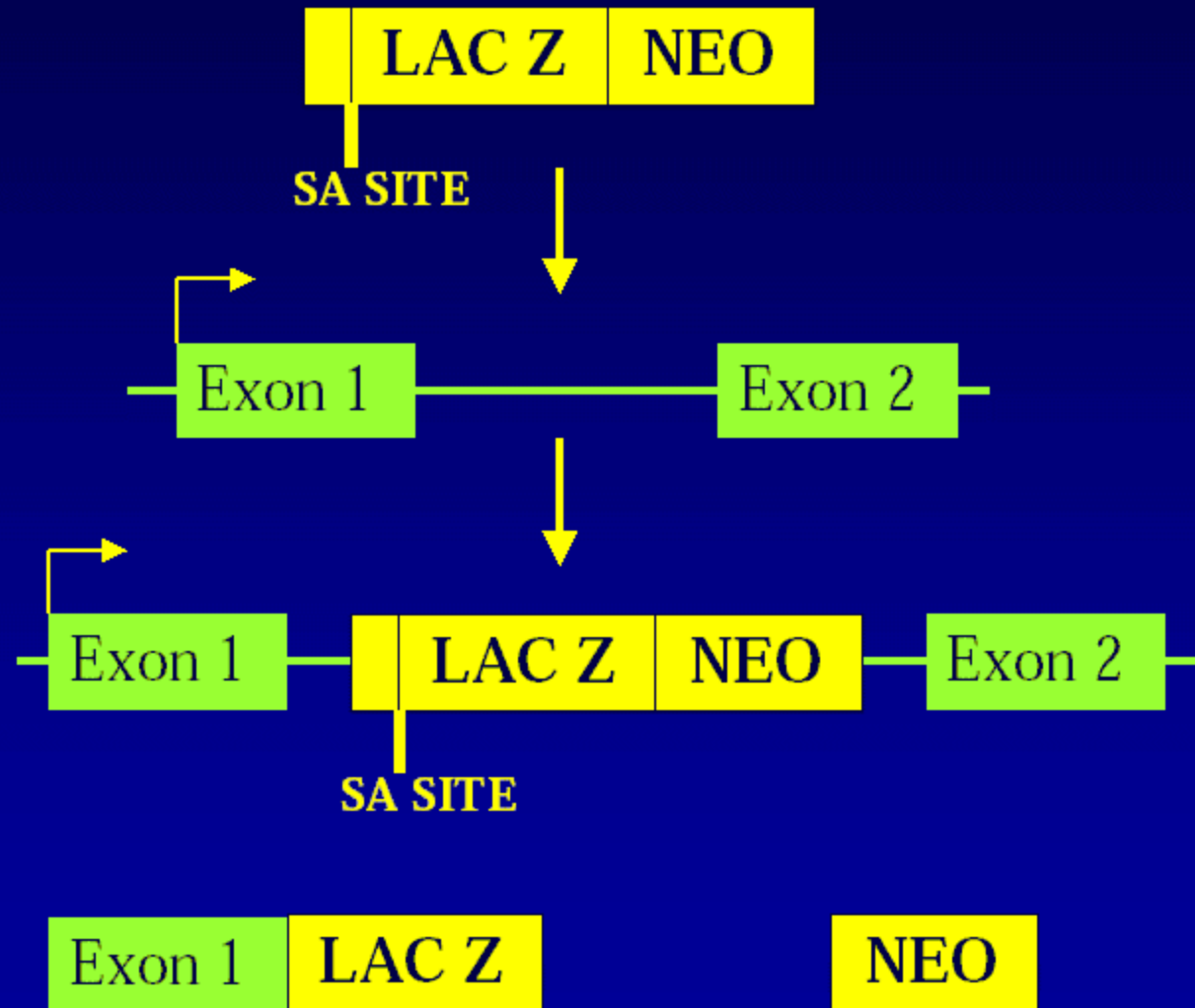
Παράδειγμα “Παγίδας Γονιδίων” (Gene Trap)

Όχημα Παγίδας
Γονιδίων

Ενδογενής
Γονιδιωματικός
Τόπος

«Παγιδευμένο»
Γονίδιο

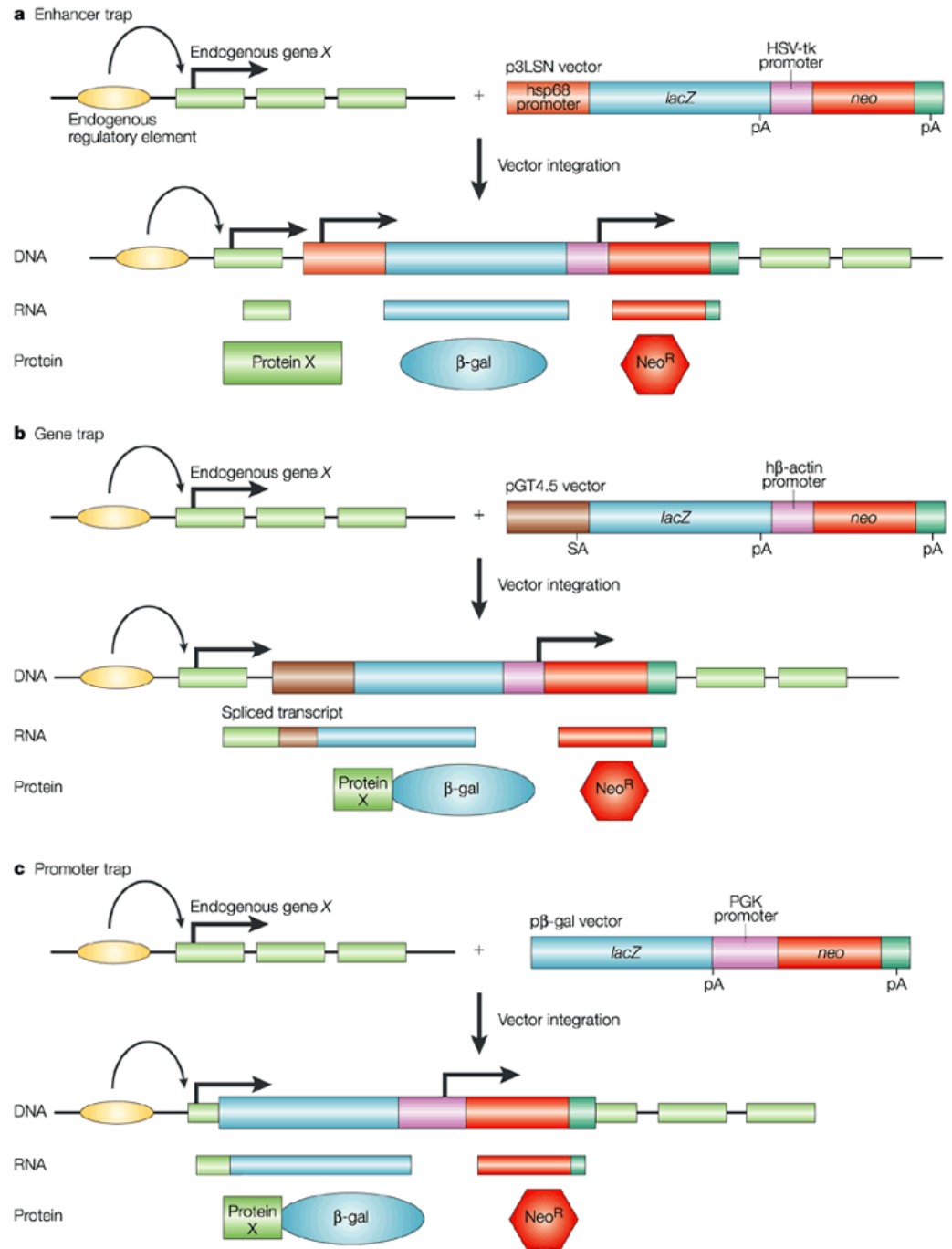
Μετάγγραφο

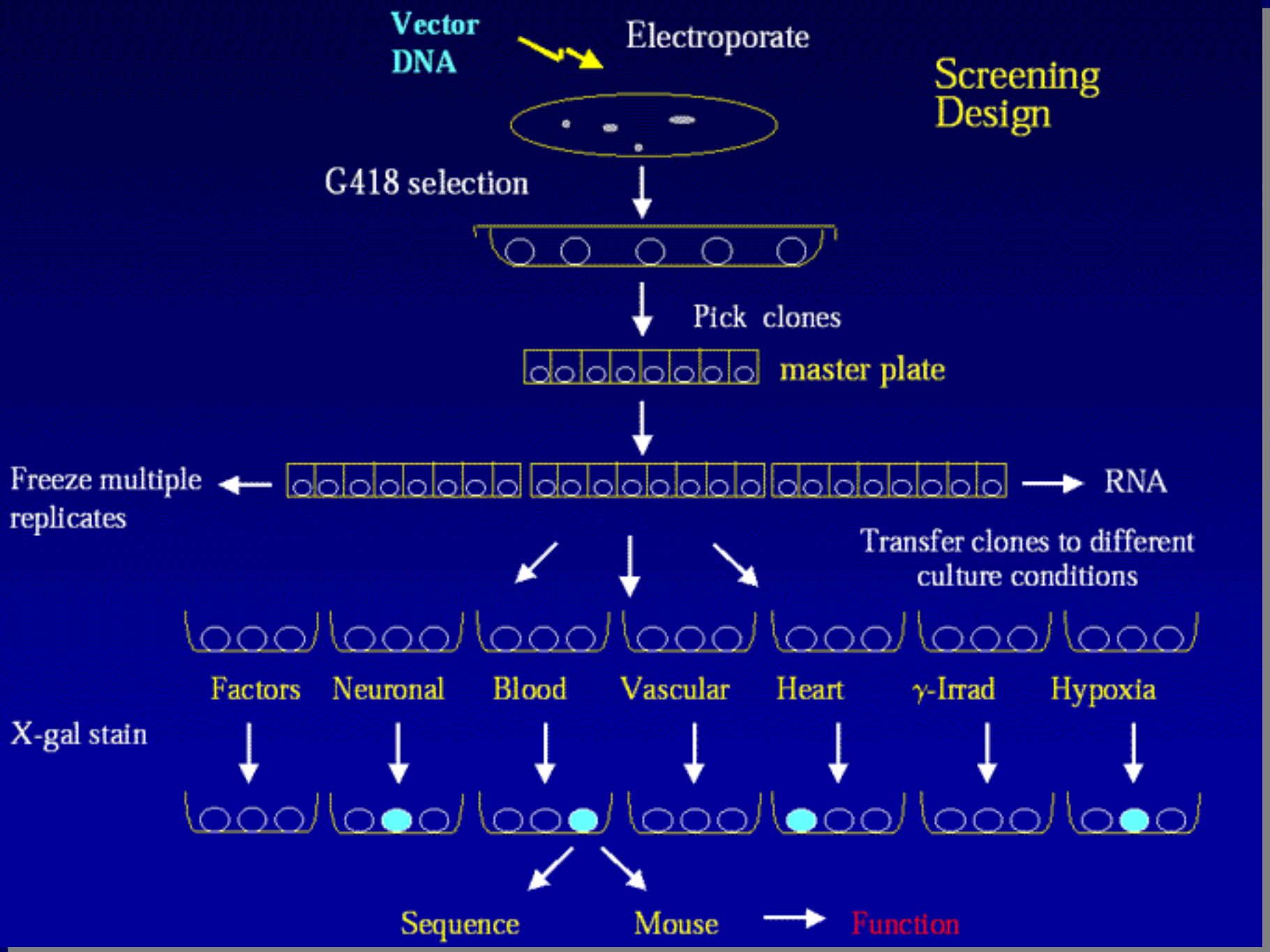


Παγίδα «Ενισχυτή»

Παγίδα «Γονιδίου»

Παγίδα «Υποκινητή»



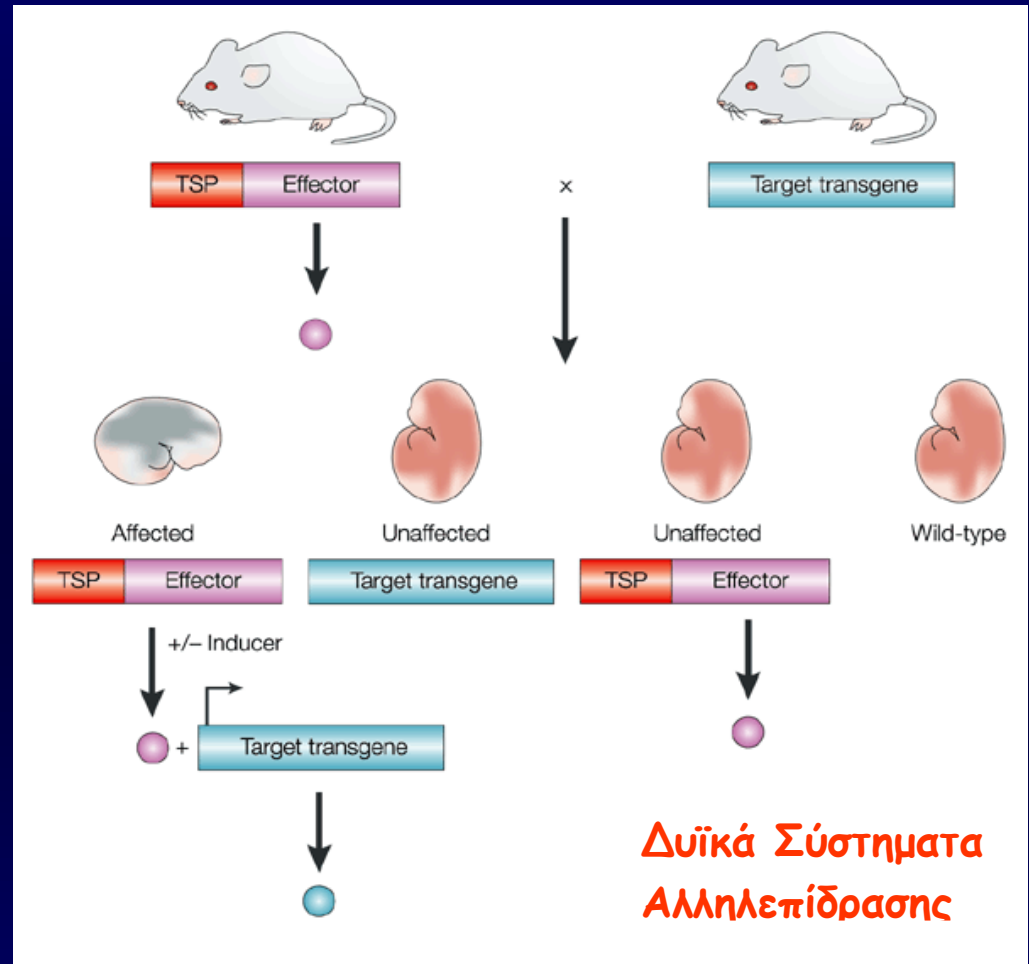


4^η ΕΝΟΤΗΤΑ: Η νέα γενιά

- Διαγονιδιακά συστήματα Επιλεκτικής Γονιδακής Τροποποίησης (Conditionals)
Συστήματα Τοποειδικού ανασυνδυασμού (Cre/loxP, Flp/Frt)
Συστήματα Τροποποίησης με αντιμικροβιακές ουσίες

Επιλεκτική Γονιδιακή μετατροπή- Αρχές

Στόχος:
Ανάλυση γονιδιακής λειτουργίας
Σε Ιστοειδικό ή
Χρονικά περιορισμένο πλαίσιο

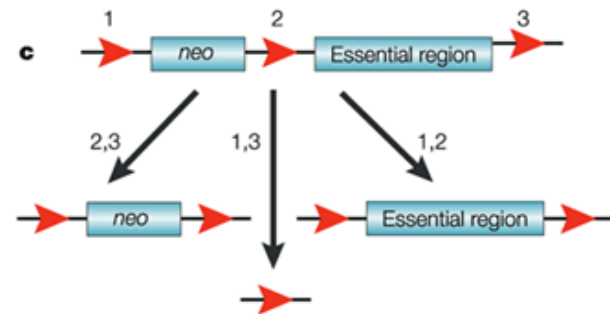
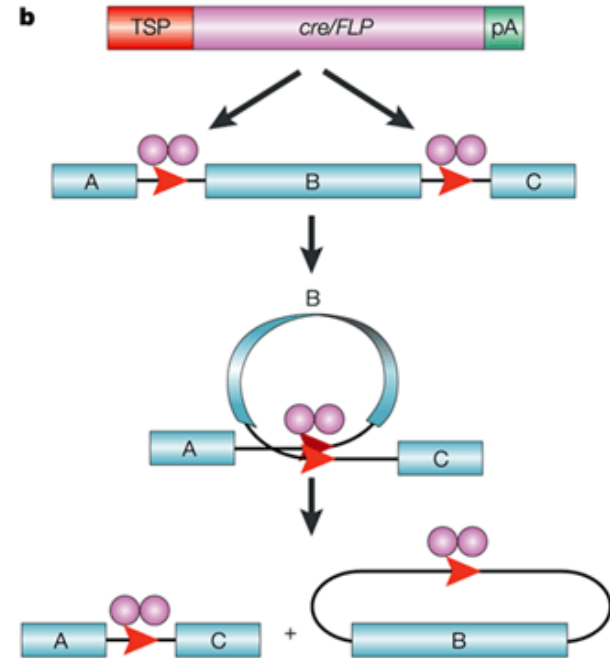


Συστήματα Τοποειδικού ανασυνδυασμού

Εφαρμογή τοπο-ειδικών Ανασυνδυαστικών ενζύμων:

1. Cre/loxP

2. FLP/FRT



Πρόβλημα

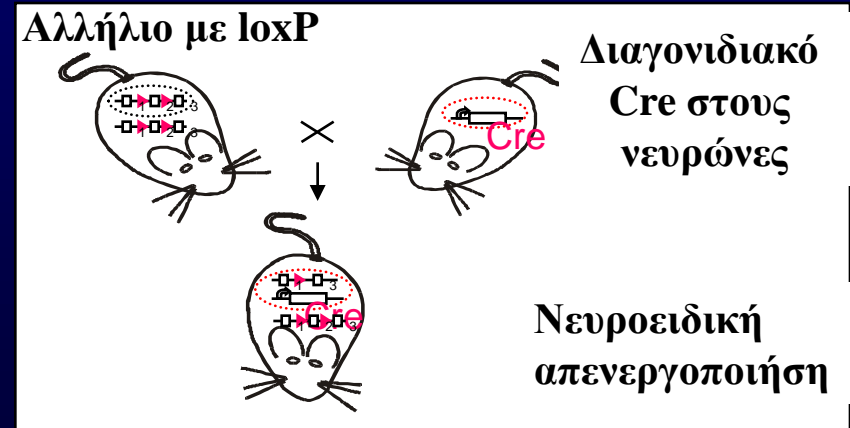
Η καθολική απενεργοποίηση του γονιδίου προκαλεί θάνατό του εμβρύου...

+/- -/- -/- +/-

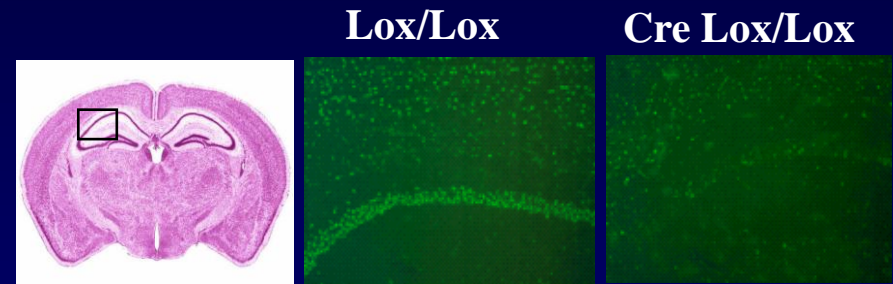


... υπάρχουν στοιχεία που δηλώνουν ότι το γονίδιο αυτό παίζει ρόλο στο ΚΝΣ του ενήλικου

Λύση

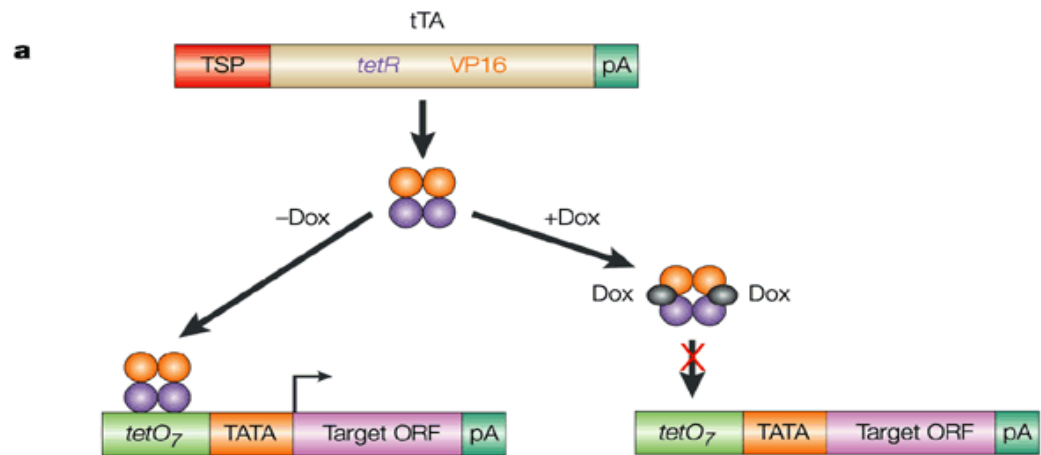


Το έμβρυο αναπτύσσεται κανονικά και το ενήλικο ζώο εκφράζει το γονίδιο σε όλους τους ιστούς πλην των νευρώνων

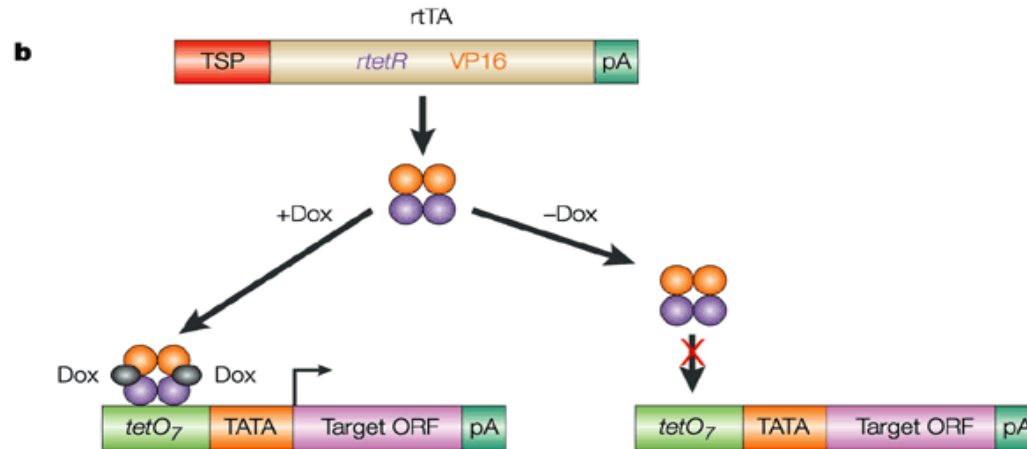


Συστήματα Τροποποίησης με αντιμικροβιακές ουσίες (Tetracycline, Doxycycline)

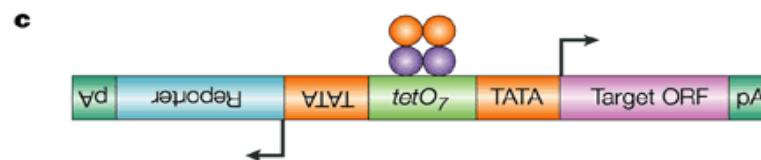
Ενεργοποίηση

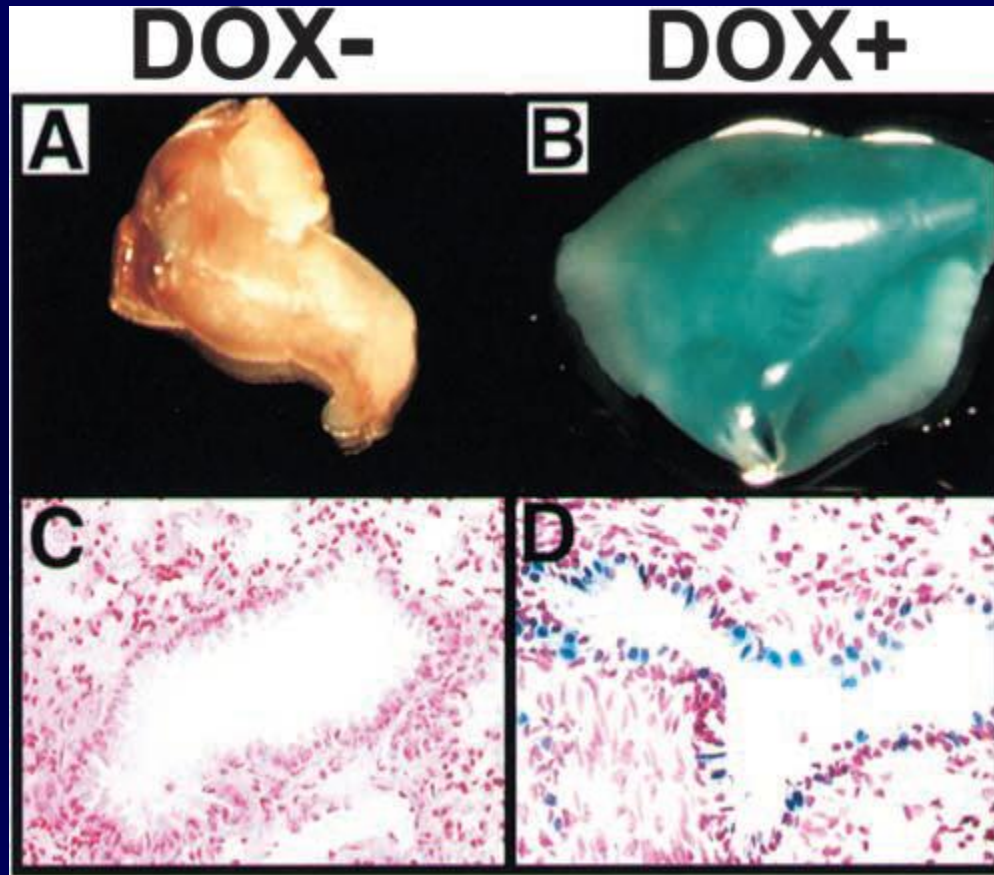


Απενεργοποίηση



Διπλή Ρύθμιση





Inducible Systems for the overexpression of the RNA-binding protein HuR

Binary Tetracycline Responsive System

Transactivator Transgene



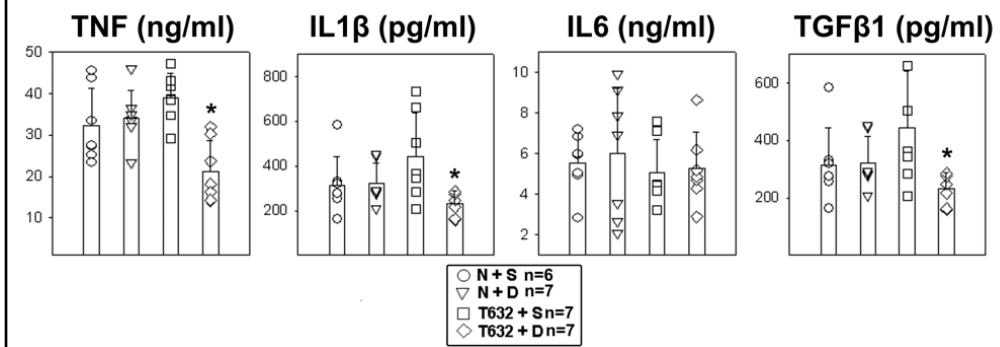
+ Dox - Dox



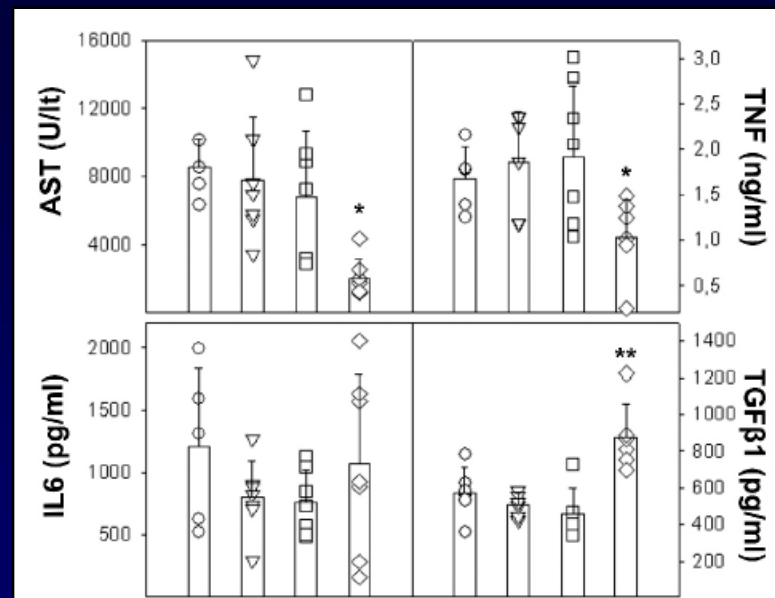
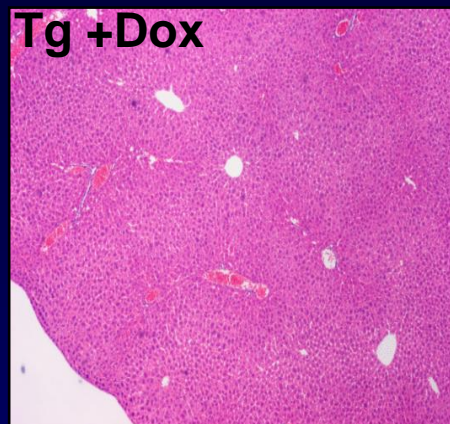
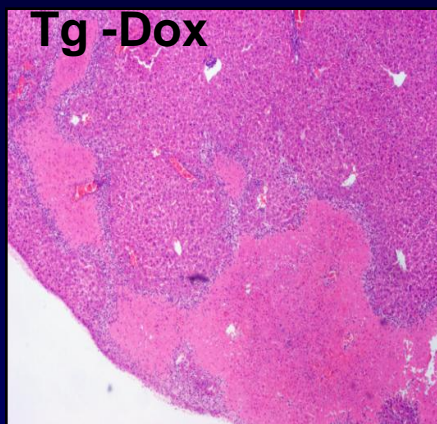
Responder Transgene

1 Kb

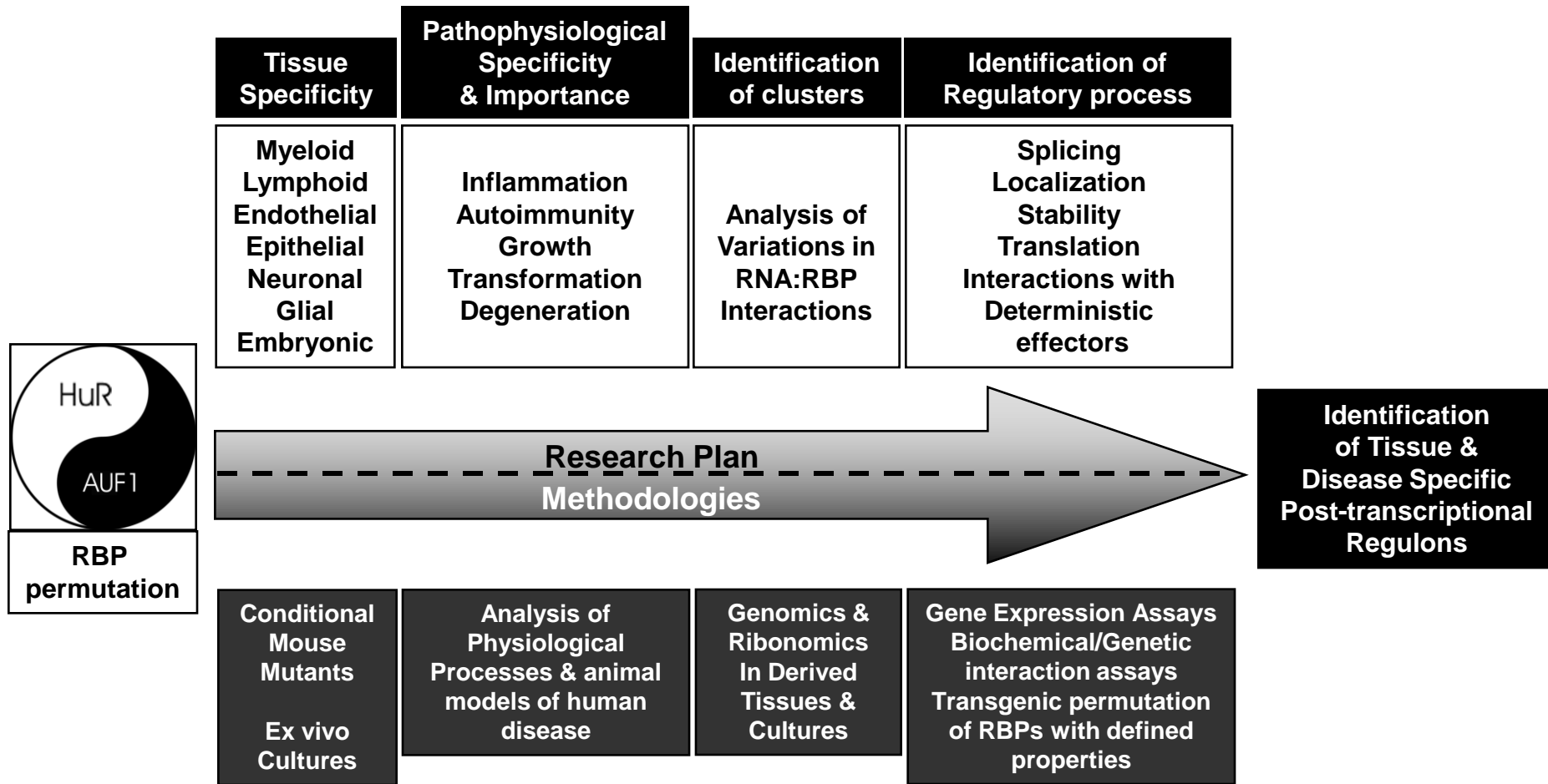
Reduction of cytokines in LPS challenged mice



Attenuation of Con A hepatitis



Combination of filters



Identifying tissue specific HuR regulons relating to immune disorders

	Cre driver	Specificity	Deletion	Survival	Imm.Disease
Immunity	Tie1 <i>(Fassler, SE)</i>	Endothelia	Ed 8.0	Viable/ Fertile	Arthritis, IBD, Septic Shock
	LysM <i>(Forster, GER)</i>	Myeloid	Ed 8.0 (HSCs)	Viable/ Fertile	Myelopoiesis, Inflammatory, Infectious
	Lck <i>(Marth, USA)</i>	T-lymphoid	>Ed 12.0 (DN Thym)	Viable/ Fertile	Autoimmune Infectious
	CD19Cre/ cGC1Cre <i>(Rajewsky)</i>	B-lymphoid M.Turner, Barbraham Inst.	?	?	Organ Specific Systemic Autoimmune
CNS	CamKII <i>(Shutz, GER)</i>	Neurons	Perinatal	Viable/ Fertile	Multiple Sclerosis
	MOG <i>(Kollias, GR)</i>	Glia	PnD 14.0	Viable/ Fertile	Multiple Sclerosis
GI	Fabpl <i>(Gordon, USA)</i>	Int. Epithelia	Ed 13.5	Viable/ Fertile	IBD
	Villin <i>(Gumucio, USA)</i>	Int. Epithelia	Ed 12.5	Viable/ Fertile	IBD
Lung	SPC-rtTA-Cre <i>(Whitsett, USA)</i>	Pul. Epithelia	Ed. 6-10 (Dox)	Viable/ Fertile	Pulmonary inflammation



5^η ΕΝΟΤΗΤΑ

Εφαρμογή της διαγένεσης στη λειτουργική γονιδωματική και στη βιοϊατρική

Ανάγνωση
Αλληλουχίας



Γονιδίωμα
Πρωτέωμα





Επιλογή:

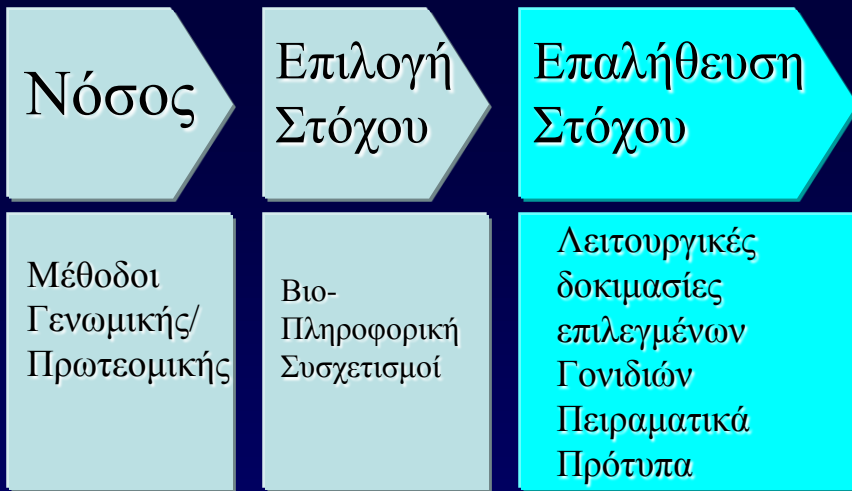


Μοριακές
Αλληλεπιδράσεις
Συσχετισμοί
Παθολογία!

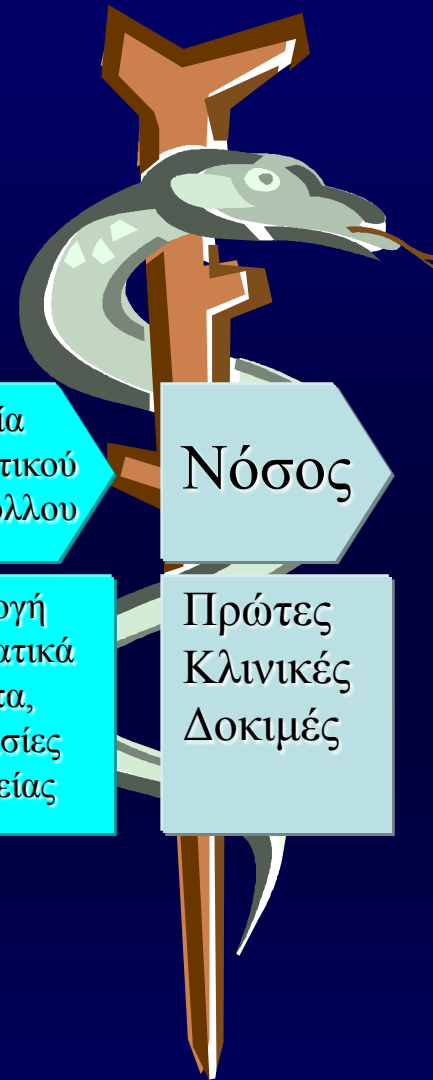
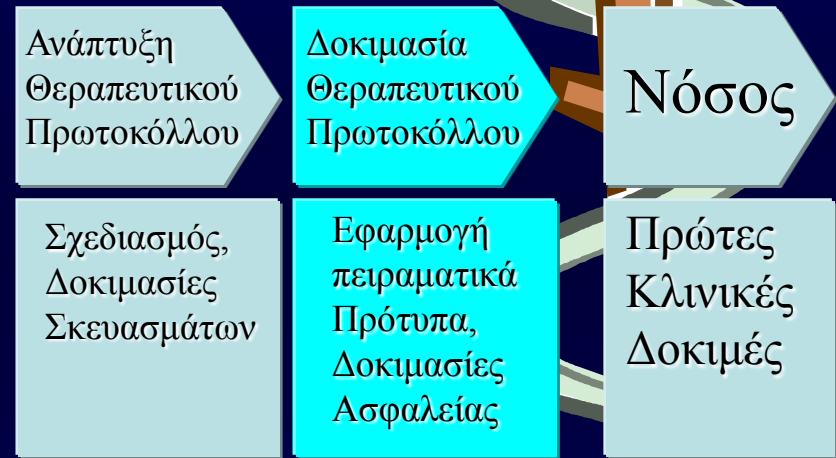
Λειτουργική
Γονιδιωματική

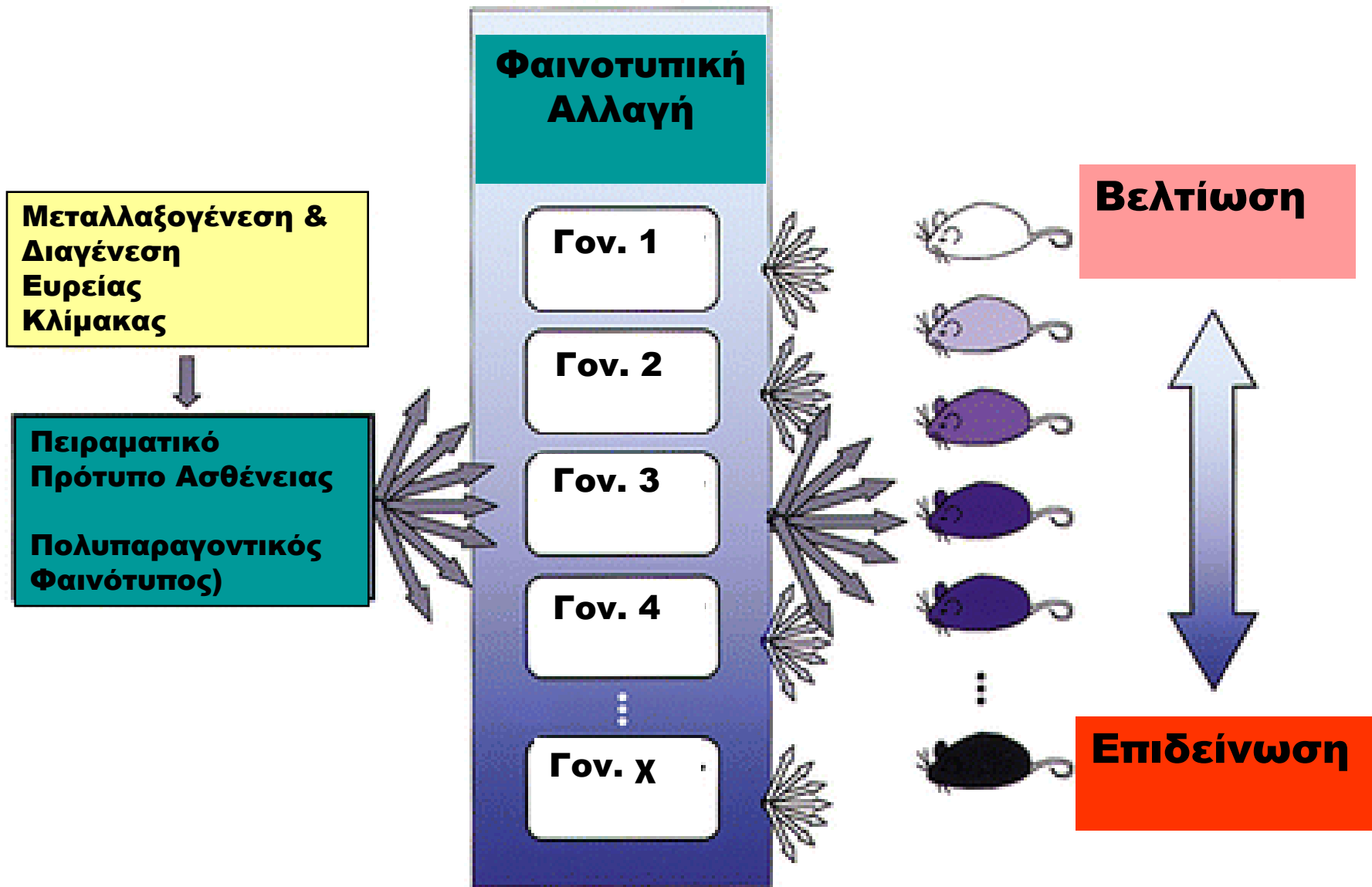


Φαινότυπος → Γονίδιο



Γονίδιο → Φαινότυπος





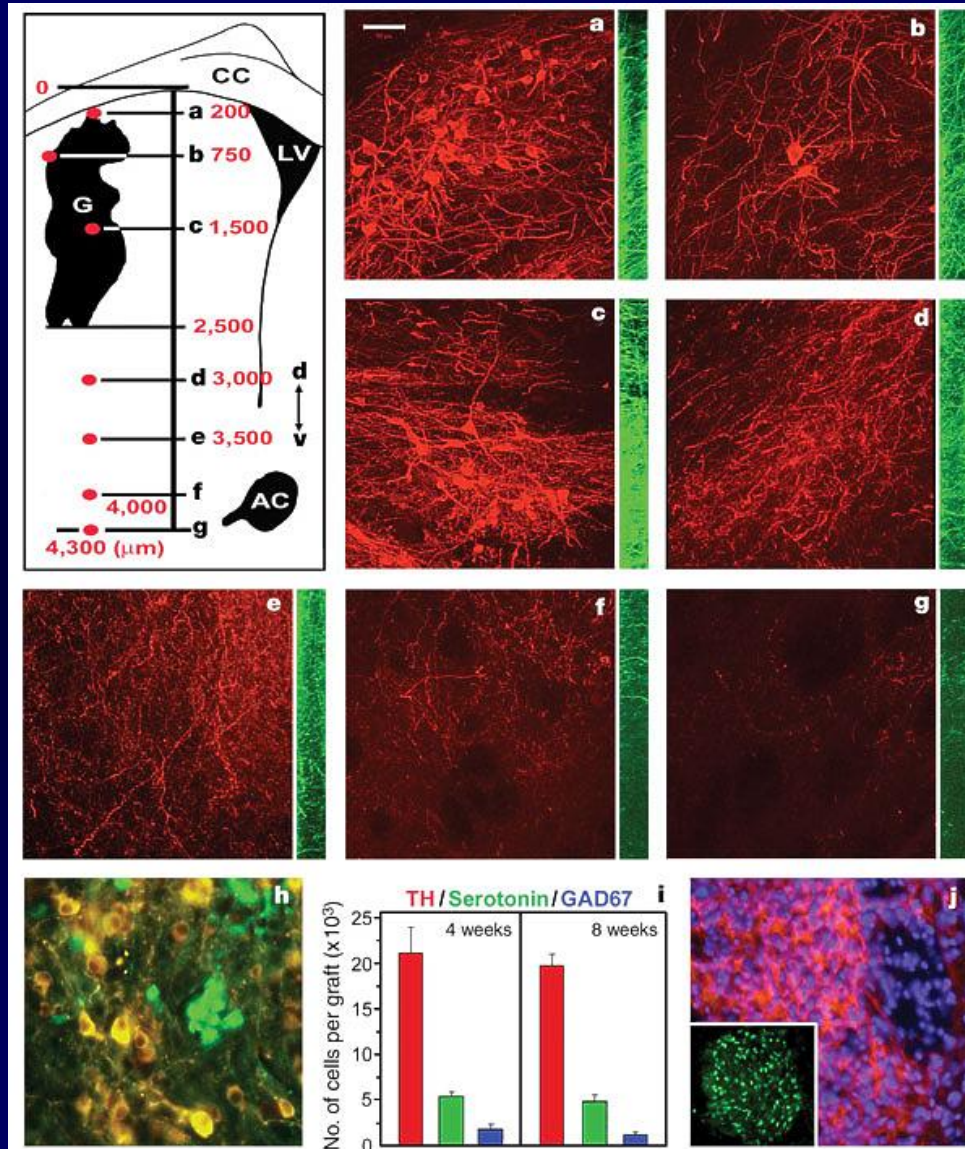
Ανίχνευση Θεραπευτικών Γονιδιακών Στόχων στις ΙΦΕ



X knock-out Γονιδίου	Επίδραση στο Φαινότυπο ΙΦΕΝ
TNFR1	Εξουδετέρωση
TNFR2	Βελτίωση
RAG-1	Εξουδετέρωση
CD4	Επιδείνωση
β2M	Βελτίωση
TcRδ	Ουδέτερη
μMT	Ουδέτερη
IL-12	Βελτίωση
IFNγ	Βελτίωση
IL-4	Ουδέτερη

* ΙΦΕΝ= Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδης Εντερίτιδες

ES to Dopamine neurons rescue an animal model of Parkinson's Disease



- Nurr-1 transfected ES cells generated midbrain CNS precursors
- Engraftment into 6-OH-DA treated hosts
- Replacement of damaged neurons in striatum

Kim JH et al. 2002. Nature

Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord

John W. McDonald *et al.* Nature Medicine 5, 1410 - 1412 (1999)

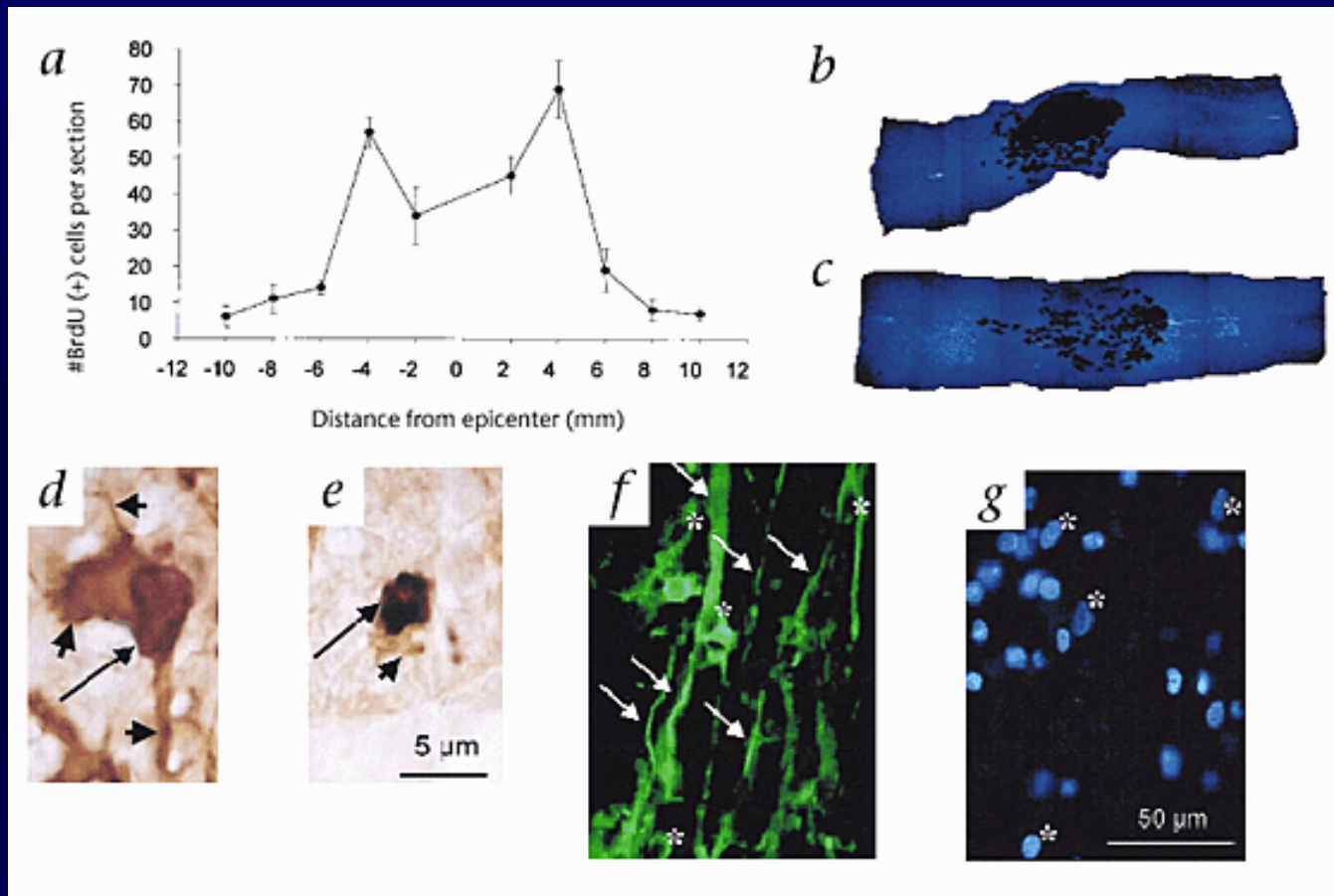
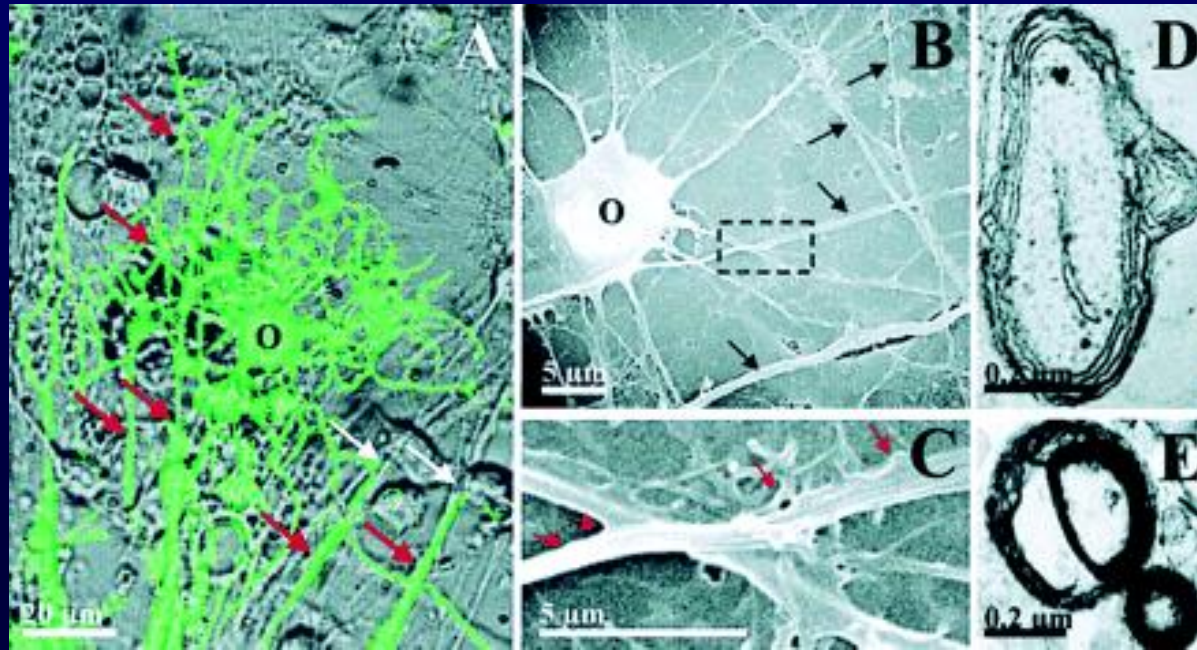


Figure 1: BrdU labeled ES cell-derived cells 2 weeks after transplantation.

a, BrdU-labeled nuclei per 1-mm segment in longitudinal sections ($n = 11$ rats; three sections per rat). Data represent mean \pm s.e.m. **b** and **c**, Hoechst 33342-labeled sections 42 d after injury, transplanted with vehicle (**b**) or ES cells (**c**) 9 d after injury. **d**, BrdU-positive cell (purple; long arrow) co-labeled with GFAP (brown; short arrows). **e**, BrdU-labeled cell (purple; long arrow) co-labeled with APC CC-1 (brown; short arrow). **f** and **g**, The mouse-specific marker EMA shows processes (arrows) emanating from ES cells (**f**). *, Nuclei in **f** are stained by Hoechst 33342 in **g**.

ES to Oligodendrocytes remyelinate damaged spinal cord axons in rats



ES cell-derived oligodendrocytes are capable of myelinating multiple axons in culture.

O1 immunoreactivity (green) is superimposed on a phase-contrast image in a mixed ES cell-derived neuronal/glial culture (9 DIV).

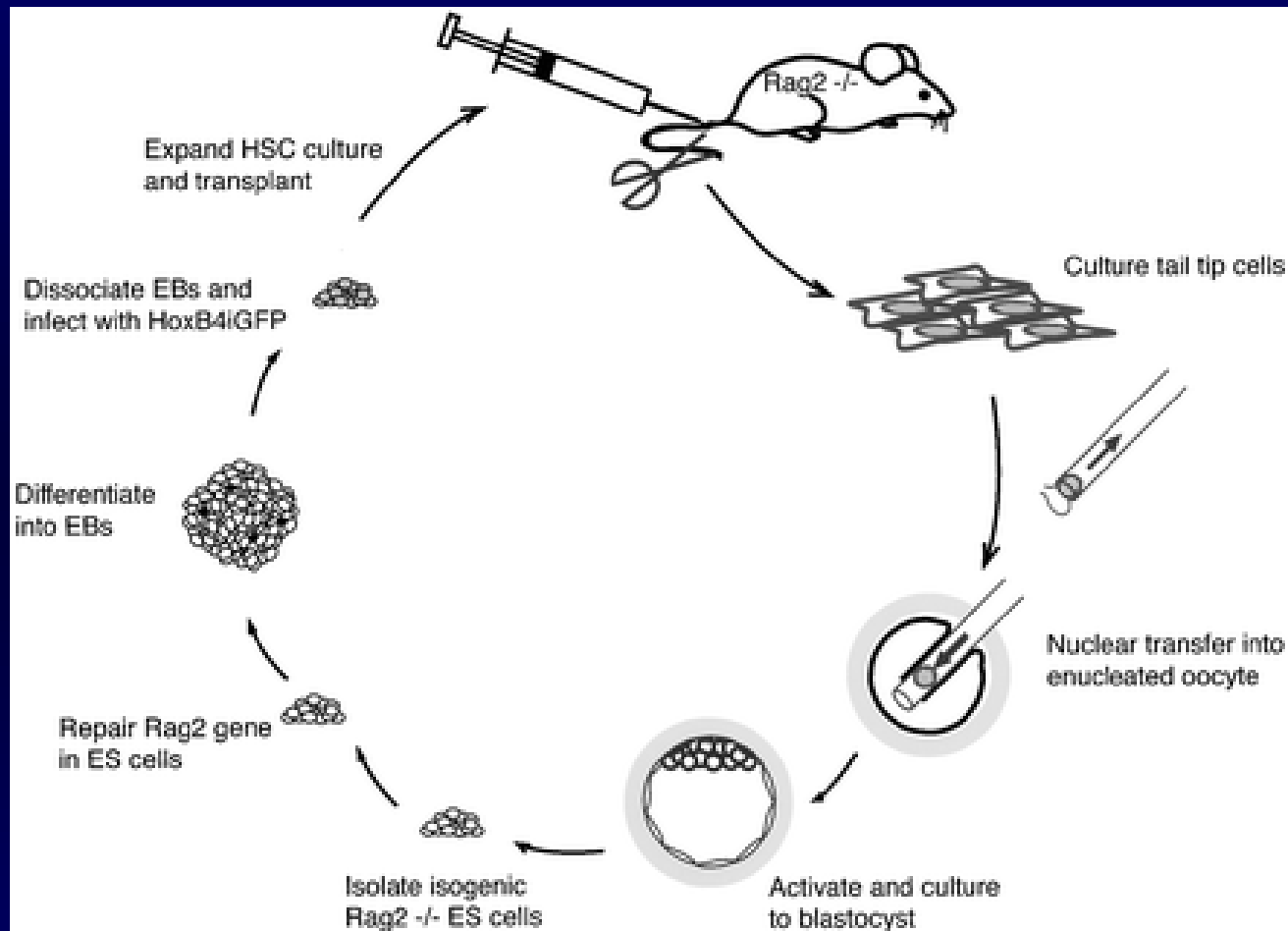
White arrows indicate axons and red arrows indicate O1 immunoreactive wrapped axon segments.

(B) Scanning EM shows oligodendrocyte (O) and passing axons (black arrows).

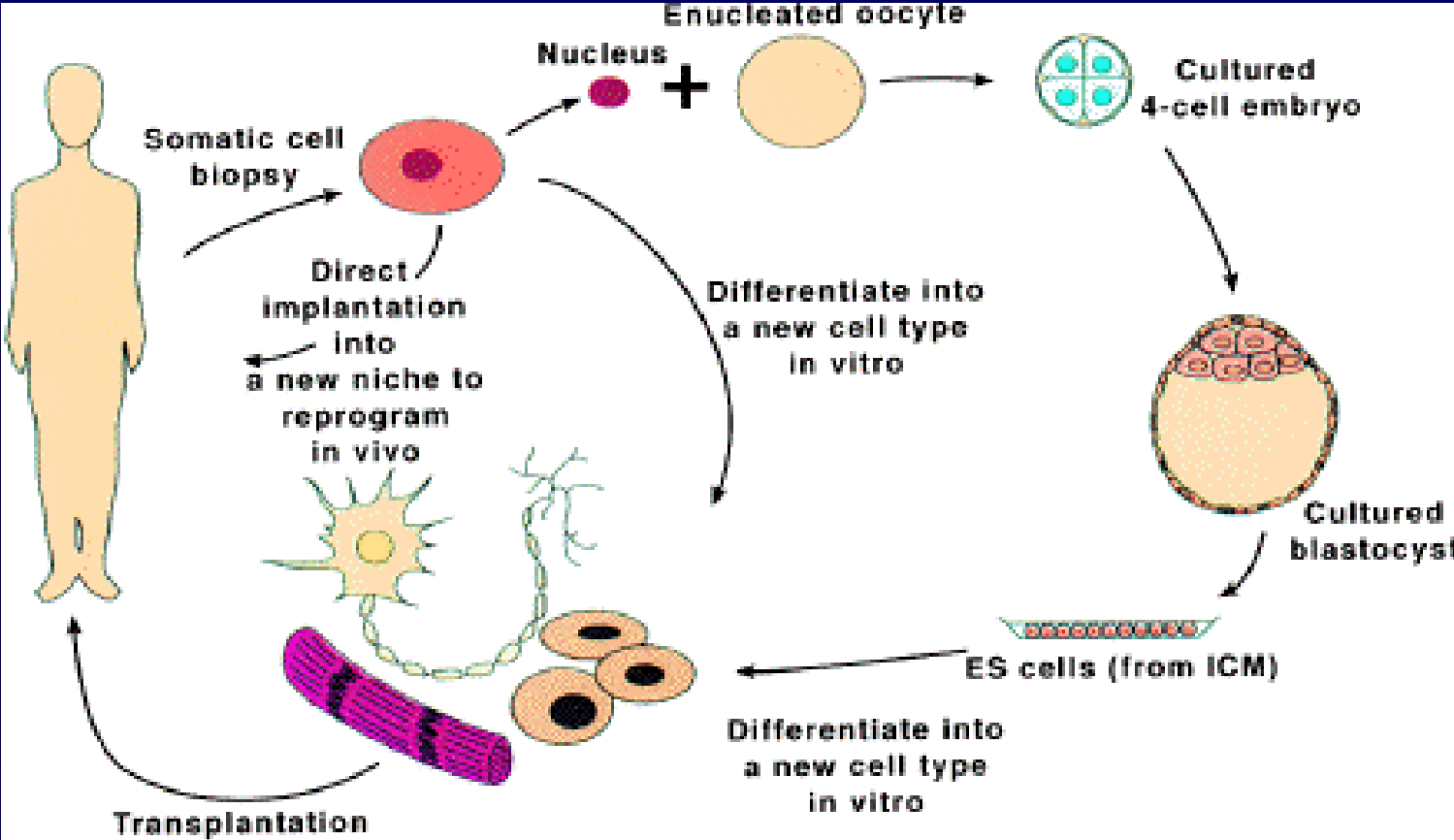
Higher magnification (box from B) demonstrates early axon wrapping (red arrows) by an oligodendrocyte process (C), which is similar to early phases of myelination described in studies using video microscopy (49).

Transmission EM shows myelin profiles typical of early myelination in 9 DIV culture (D and E).

Rescuing from RAG2 absence and immune deficiency via stem cell, gene targeting and somatic nuclear transfer technologies



Rideout W, et al., 2002. Cell



Προτεινόμενη Βιβλιογραφία

Γενικά:

- Genes VIII. Ed. Benjamin Lewin. 2003. Oxford Univeristy Press
- Principles of Gene Manipulation. 6e. 2002. Ed. Primrose, Twyman & Rose. Blackwell Scientific

Ειδικά:

- Manipulating the Mouse Embryo. 2003. Ed. Nagy, Gerteinstein, Vintersten & Behringer. CSHL Press
- The Atlas of Mouse Development. 2003. Ed. M.H. Kaufman. Academic Press
- Transgenic Mouse. 2003. *Methods in Molecular Biology*, V.209. Ed. Hofken & Van Deursen. Humana Press

Αναφορές:

- Mak, Peninger & Ohashi. 2001. Knock-out mice. *Nat.Rev.Immunol.* 1:11.
- Lewandoski. 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat.Rev.Genet.* 2:743.
- Stanford, Cohn & Cordes. 2001. Gene trap mutagenesis. *Nat.Rev.Genet.* 2:756.
- Douni E., et al., (2004). Genetic engineering in the mouse: Tuning TNF/TNFR expression. In *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 98: Tumor Necrosis Factor. Eds A. Corti and P. Ghezzi. Humana Press Inc., p139-171.
- Nelms & Goodnow. 2001. Genome wide ENU mutagenesis. *Immunity*. 15:409