

# Δημιουργία Διαγονιδιακών Ζώων

**Μαραζιώτη Αντωνέλλα**

Βιολόγος, PhD

Εργαστήριο Μοριακής Καρκινογένεσης  
Αναπνευστικού





# Περιεχόμενα

- ◆ Ορισμός και χρησιμότητα διαγωνιστικών ζώων
- ◆ Δημιουργία διαγωνιστικών ζώων
- ◆ Ονοματολογία διαγωνιστικών ζώων

# Ορισμός Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Διαγονιδιακά ζώα

- Οργανισμός που το γονιδίωμα του
  - έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή «ξένου DNA»
  - Το ξένο γενετικό υλικό μεταβιβάζεται στη συνέχεια στους απογόνους
- Έκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου
- Υπερέκφραση ενός ενδογενούς γονιδίου

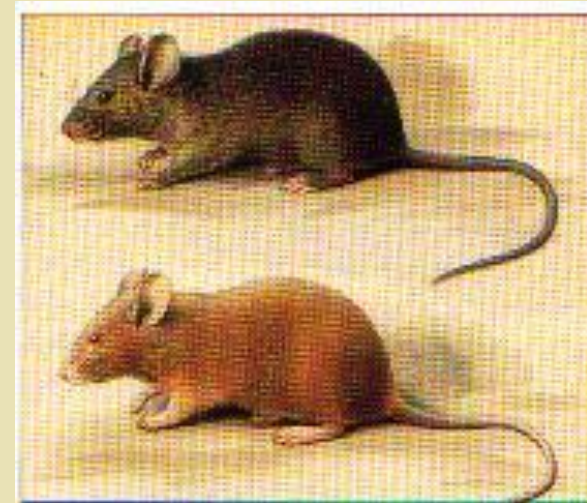


# Χρησιμότητα Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Διαγονιδιακοί μύες

– Χρησιμοποιούνται ως ζωικά πρότυπα για τη μελέτη:

- Της ρύθμισης γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των ιστών
- Της λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών
- Της ρύθμισης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων
- Της επίδρασης χημικών και βιολογικών ουσιών στη θεραπεία νόσων





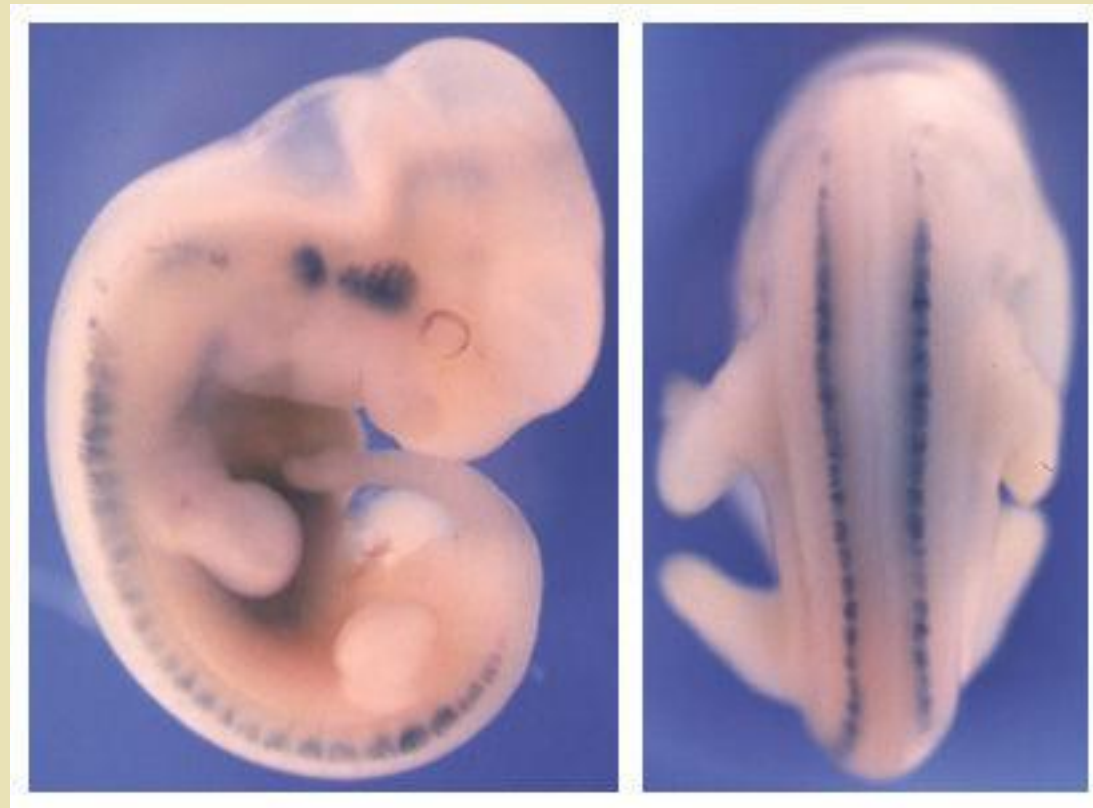


# Χρησιμότητα Διαγονιδιακών Ζώων

- ◆ Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης ενδογενών ή ξένων γονιδίων σε συγκεκριμένο χρόνο και σημείο στον οργανισμό
- ◆ Χαρακτηρισμός της ικανότητας ενός υποκινητή να κατευθύνει ιστοειδική έκφραση ενός γονιδίου
  - Π.χ. ένας υποκινητής μπορεί να συνδεθεί με ένα γονίδιο αναφοράς όπως το GFP

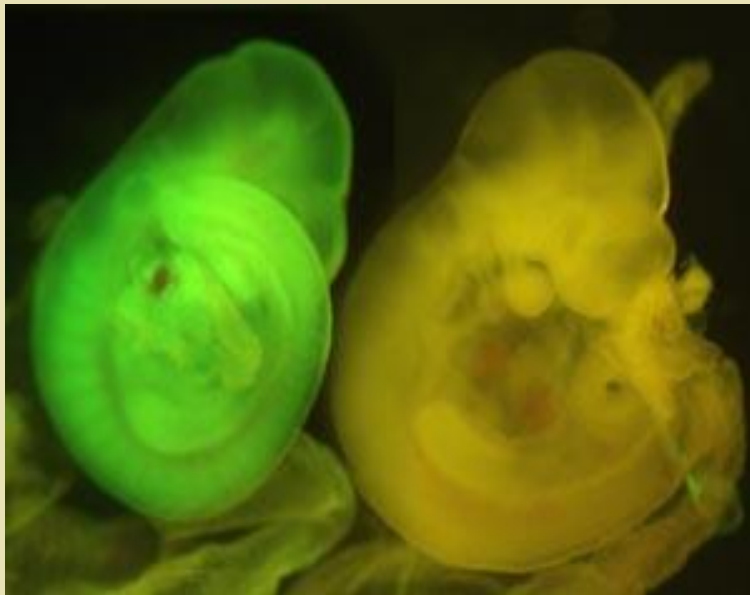
# Brinster's growth hormone mouse



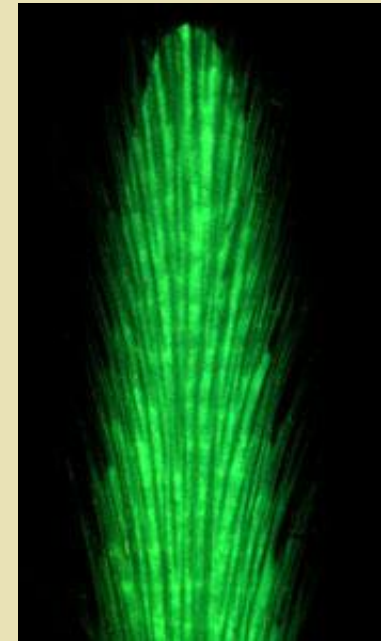


Διαγονιδιακά έμβρυα ποντικού όπου ο υποκινητής για ένα γονίδιο που εκφράζεται στα νευρικά προγονικά κύτταρα οδηγεί την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της β-γαλακτοσιδάσης. Οι νευρικές δομές που εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς φαίνονται με μπλε σκούρο χρώμα.

# GFP διαγονιδιακά ποντίκια



9.5 day embryos -  
GFP and wt



Tail tip

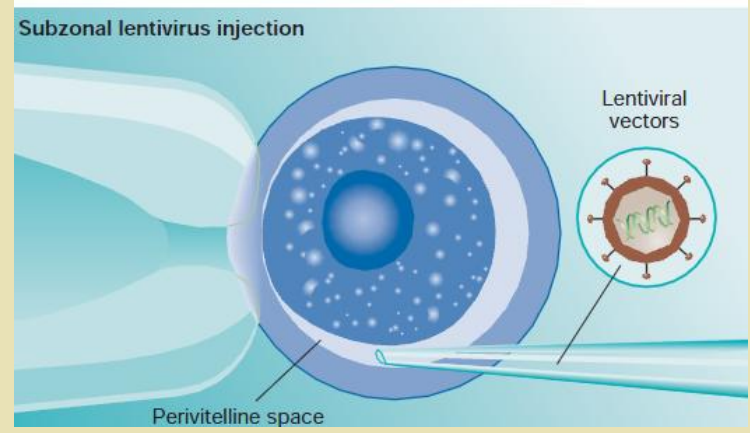
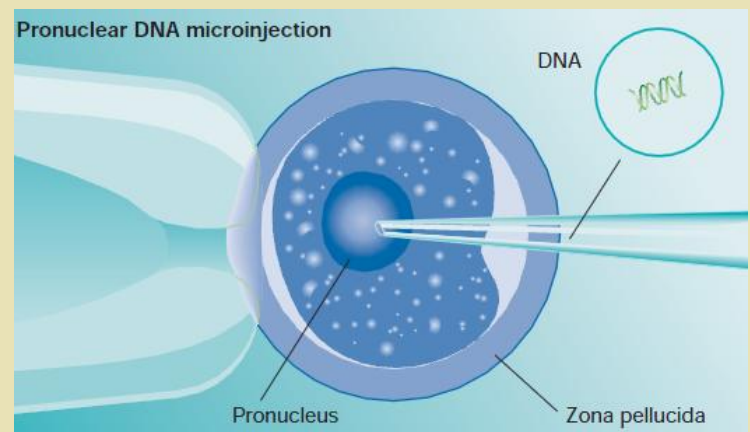
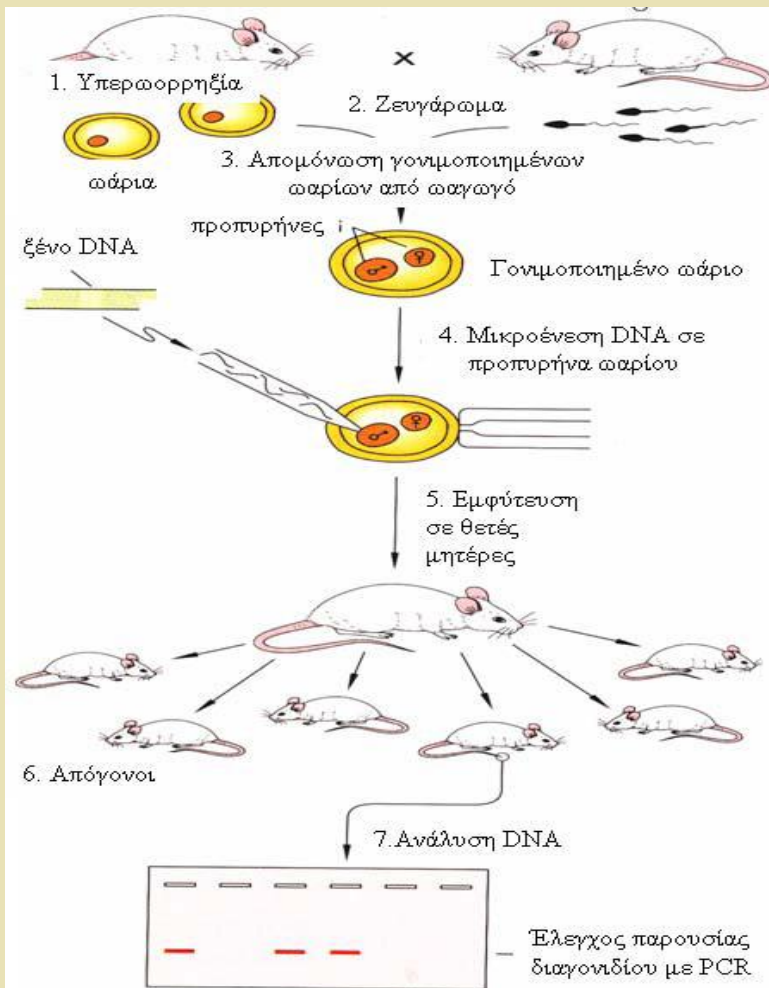




# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- Δύσκολη και Πολύπλοκη
  - Χρονοβόρα και με υψηλό κόστος
- ◆ 2 ΜΕΘΟΔΟΙ
- Μικροένεση σε προπυρήνα ωαρίου
  - Ιικοί φορείς για την μεταφορά των επιθυμητών γονιδίων

# Μέθοδοι Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων





# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγωνιδιακών Ζώων

## ◆ Τα Βήματα:

- Προετοιμασία του διαγωνιδίου που θα ενεθεί στον προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου
- Προετοιμασία των ποντικών
- Προετοιμασία των υλικών και των εργαλείων
- Προετοιμασία του συστήματος ανίχνευσης





# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

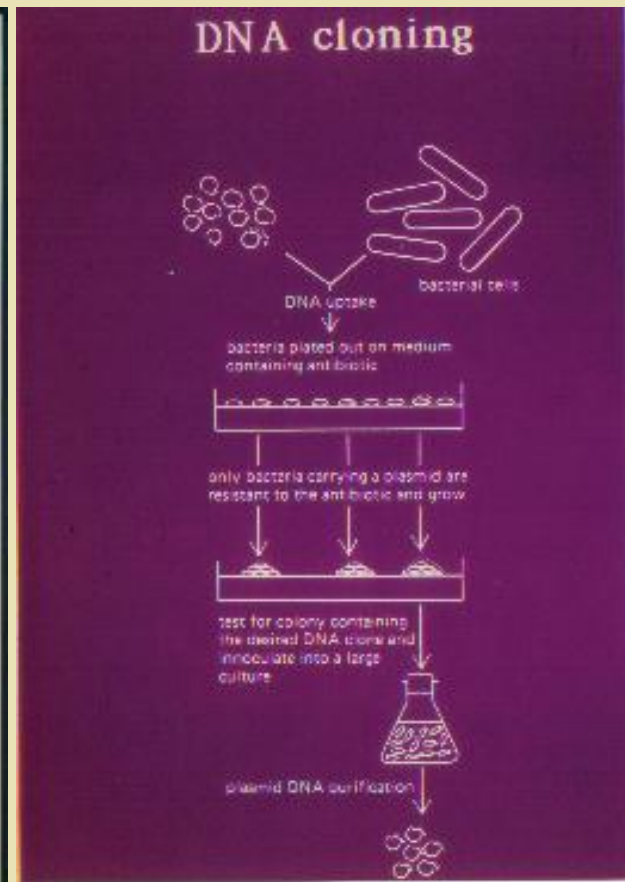
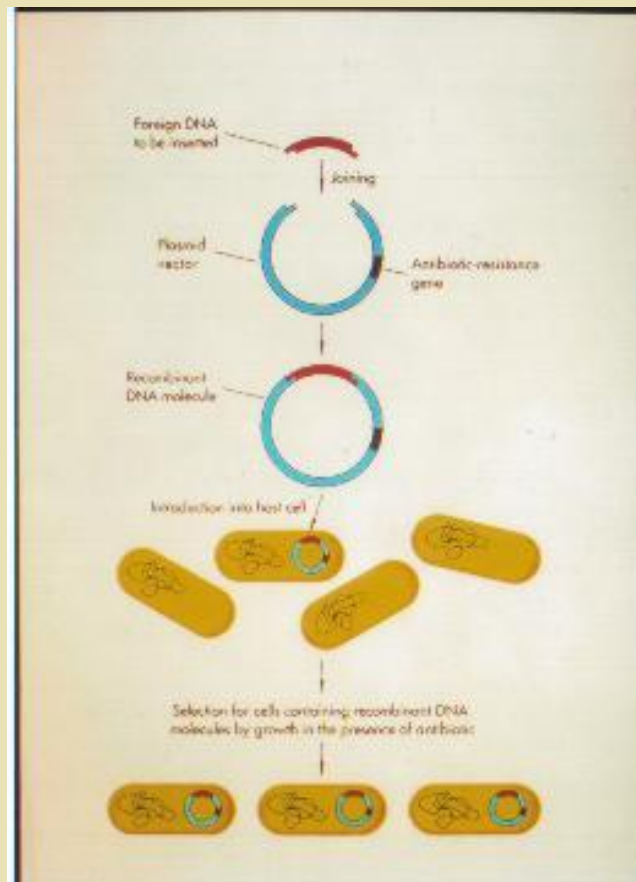
## ◆ Προετοιμασία του διαγονιδίου που θα ενεθεί στον προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου

- Το μήκος του DNA που θα εισαχθεί δεν είναι περιορισμένο
  - Το ιδανικό μήκος είναι 2-20 Kb
- Ενίσχυση του DNA κομματιού με τη χρήση της PCR
- Κλωνοποίηση σε vector , μεταφορά σε βακτήρια
- Προσεκτικός καθαρισμός του DNA κομματιού  
(όχι υπολλείμματα αιθανόλης, φαινόλης, διαφόρων ενζύμων κλπ)
- Μορφή του DNA
  - Γραμμικά μόρια ενσωματώνονται πιο αποτελεσματικά από κυκλικά μόρια (~ 5x)
- Συγκέντρωση του DNA
  - Πολύ υψηλή συγκέντρωση γίνεται τοξική για το ζυγωτό
  - Συγκέντρωση DNA : 1-3  $\mu\text{g/ml}$



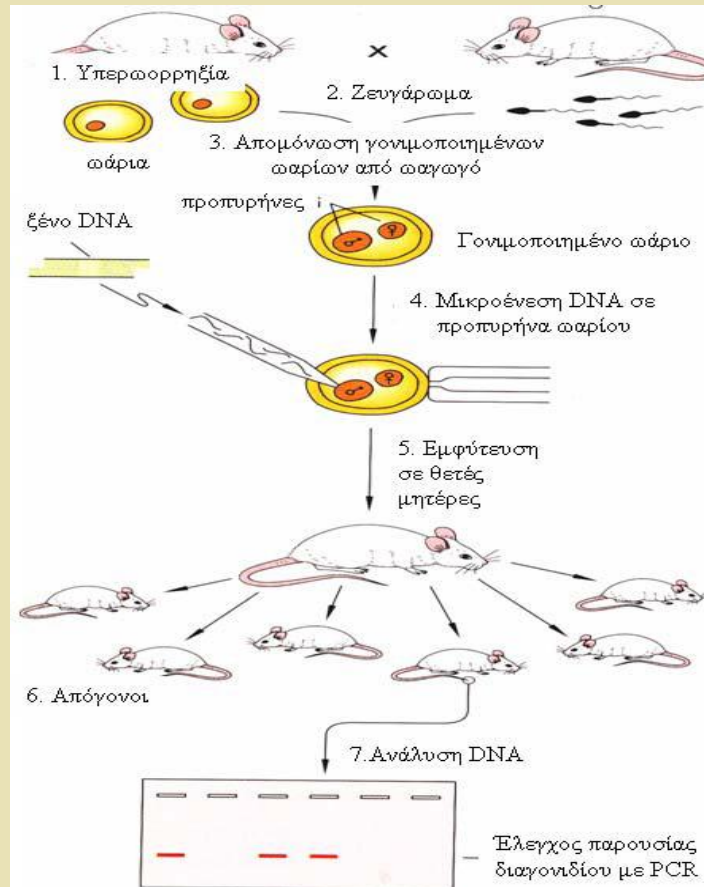
# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ◆ Προετοιμασία του διαγονιδίου που θα ενεθεί στον προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Προετοιμασία ποντικού



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Προετοιμασία ποντικού

– Θηλυκό ποντίκι με υπερδιέγερση ωοθηκών για απομόνωση γονιμοποιημένων ωαρίων

- Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων διεγείρεται με χορήγηση ορού γοναδοτροπίνης
- Η ωορηξία διεγείρεται με τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης
- Ηλικία : 4-8 εβδομάδων
- Ζευγάρωμα με γόνιμο αρσενικό ποντίκι

# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

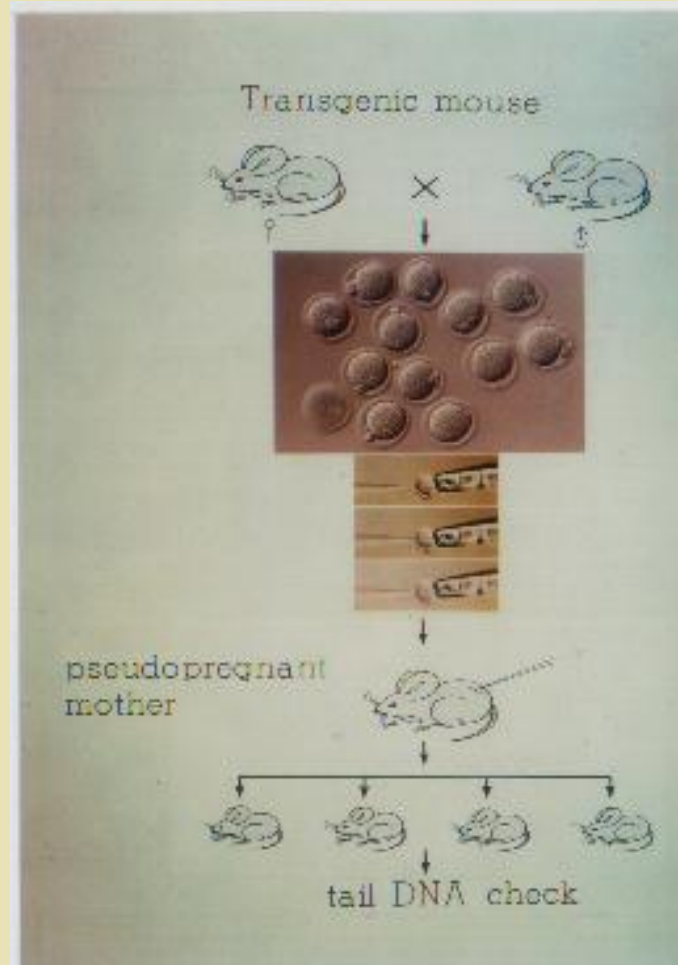
## ◆ Προετοιμασία ποντικού

– Γόνιμο αρσενικό ποντίκι

- Ζευγάρωμα με το υπερδιεγερμένο θηλυκό ποντίκι
- Ηλικία: 6-8 εβδομάδων
- Καλή απόδοση αναπαραγωγής

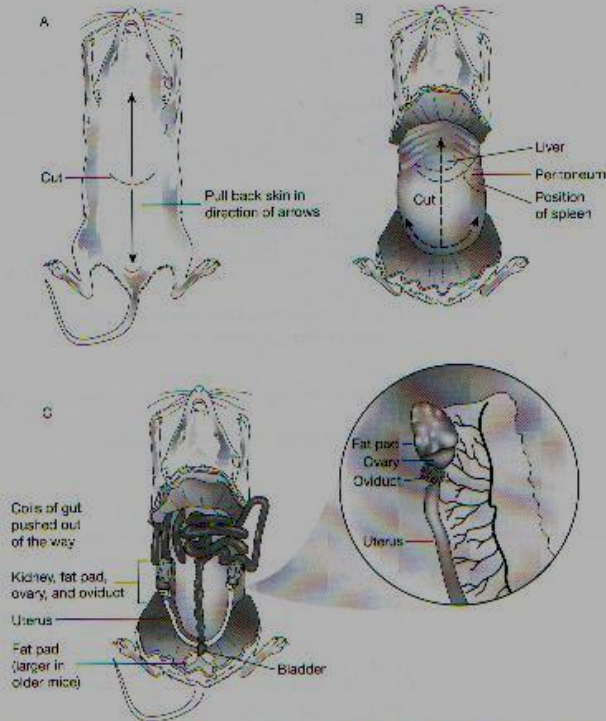


# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

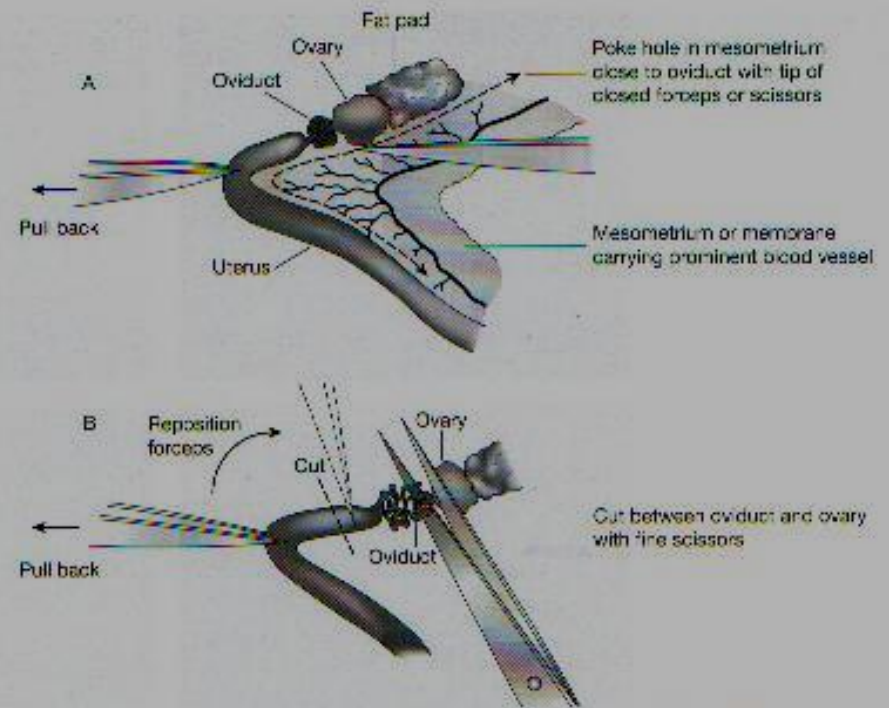


# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ☀️ Απομόνωση και συλλογή γονιμοποιημένων ωαρίων



**FIGURE 4.4.** Dissection of reproductive organs of a female mouse. (A) The position of the small lateral incision in the skin is indicated by the dashed line. The skin is then pulled back in the direction of the solid arrows. (B) The body wall (peritoneum) is cut in the direction of the dashed arrows. (C) The alimentary tract displaced to reveal reproductive organs in the floor of the body cavity.

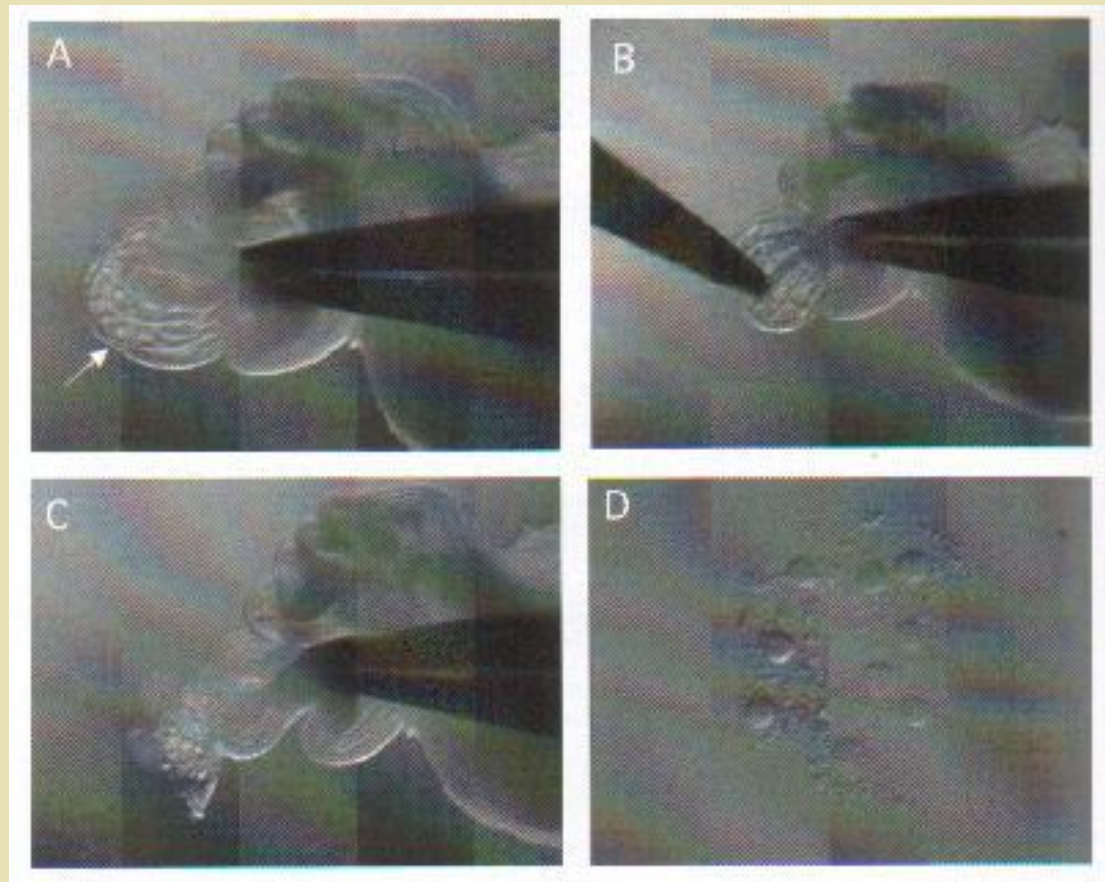


**FIGURE 4.5.** Dissection of the oviduct. (A) The ovary, oviduct, and end of the uterus are separated from the mesometrium with the closed tips of a pair of fine forceps. (B) A cut is made between the oviduct and the ovary. After repositioning the forceps, a second cut separates the oviduct from the uterus.



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ☀ Απομόνωση και συλλογή γονιμοποιημένων ωαρίων



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ☀ Απομόνωση και συλλογή γονιμοποιημένων ωαρίων





# Ένεση των Γονιμοποιημένων Ωαρίων

- ◆ Τα γονιμοποιημένα ωάρια συλλέγονται την 1.5 εμβρυϊκή μέρα
- ◆ Το DNA συνήθως ενίεται στον αρσενικό προπυρήνα



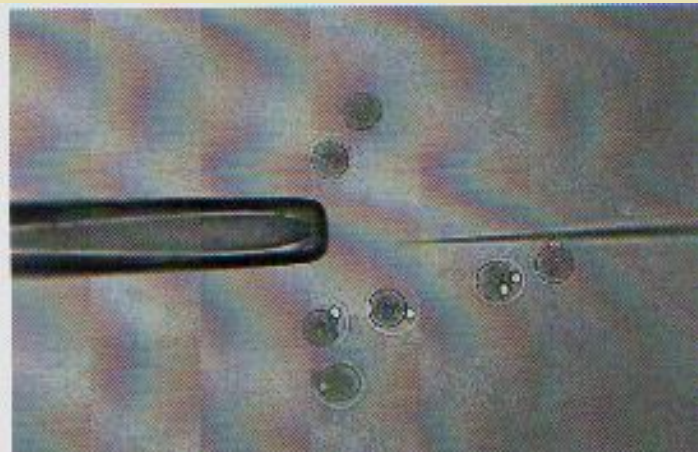
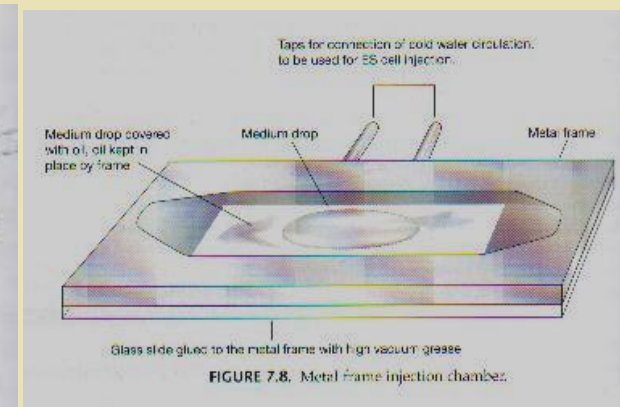
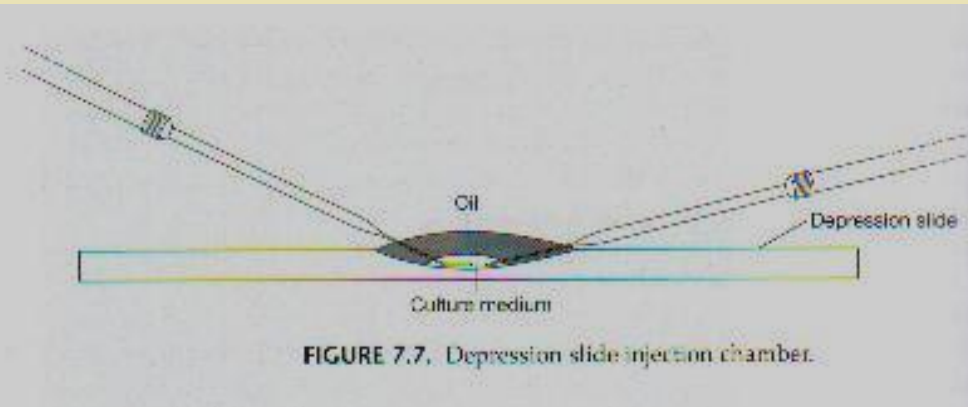
# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ◆ Μικροένεση του διαγονιδίου στο προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

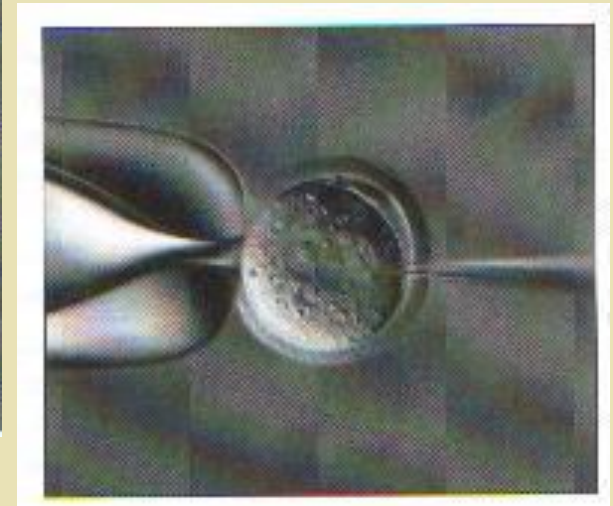
- ◆ Μικροένεση του διαγονιδίου στο προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου





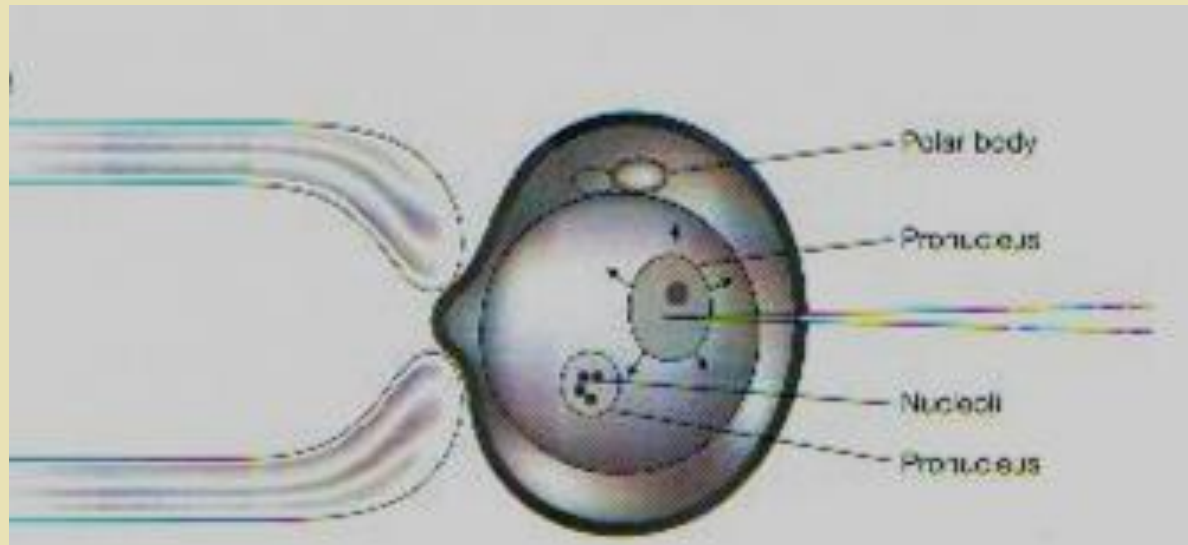
# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ◆ Μικροένεση του διαγονιδίου στο προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου



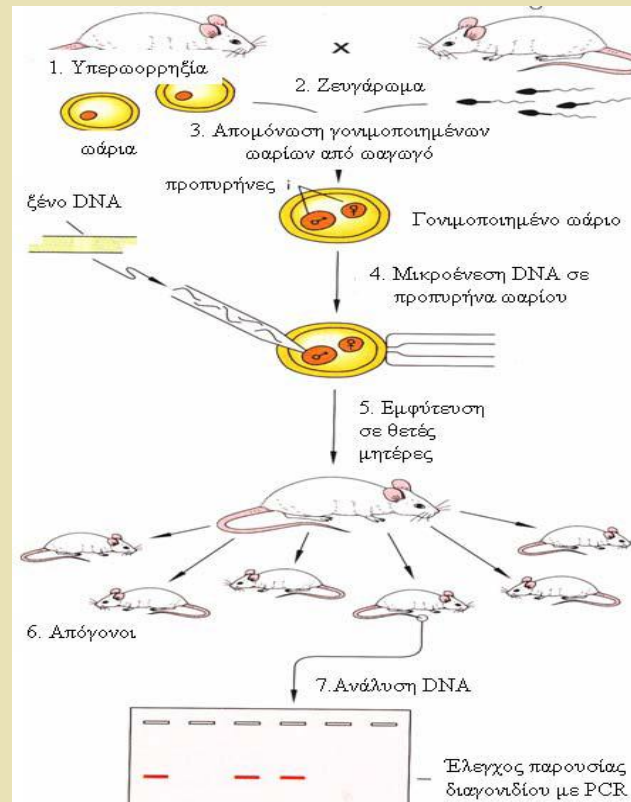
# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

- ◆ Μικροένεση του διαγονιδίου στο προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Προετοιμασία ποντικού







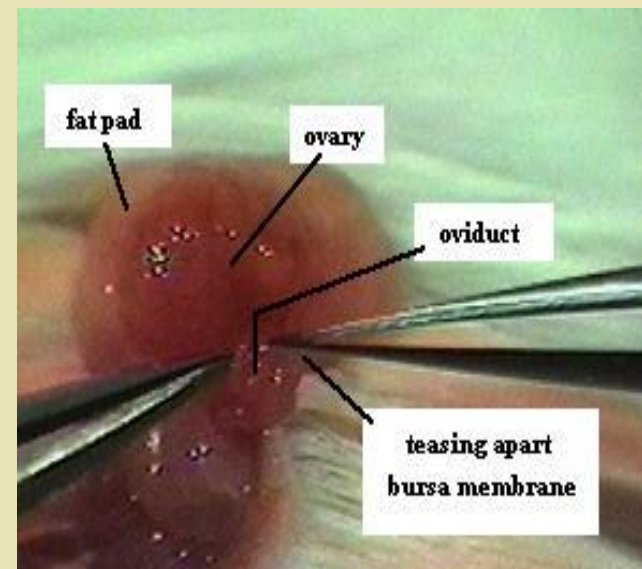
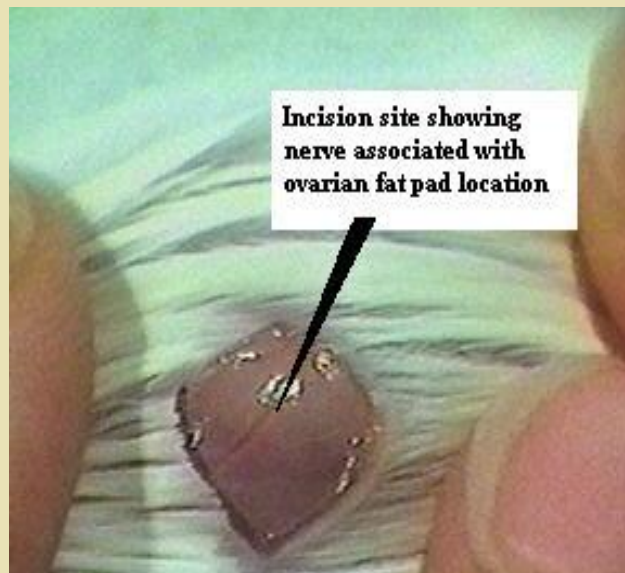
# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Προετοιμασία ποντικού

- Ψευδοέγκυο θηλυκό ποντίκι
  - Ηλικία :6-8 εβδομάδων
  - Ζευγάρωμα με στείρο αρσενικό ποντίκι
  - Παρατήρηση ζελατινώδους υγρού στο θηλυκό ποντίκι
  - Δέχεται τα γονιμοποιημένα ωάρια με τα διαγονίδια
- Στείρο αρσενικό ποντίκι
  - Έχει υποστεί εκτομή σπερματικού πόρου
  - Ζευγάρωμα με το ψευδοέγκυο θηλυκό ποντίκι
  - Ηλικία: μεγαλύτερο από 8 εβδομάδες

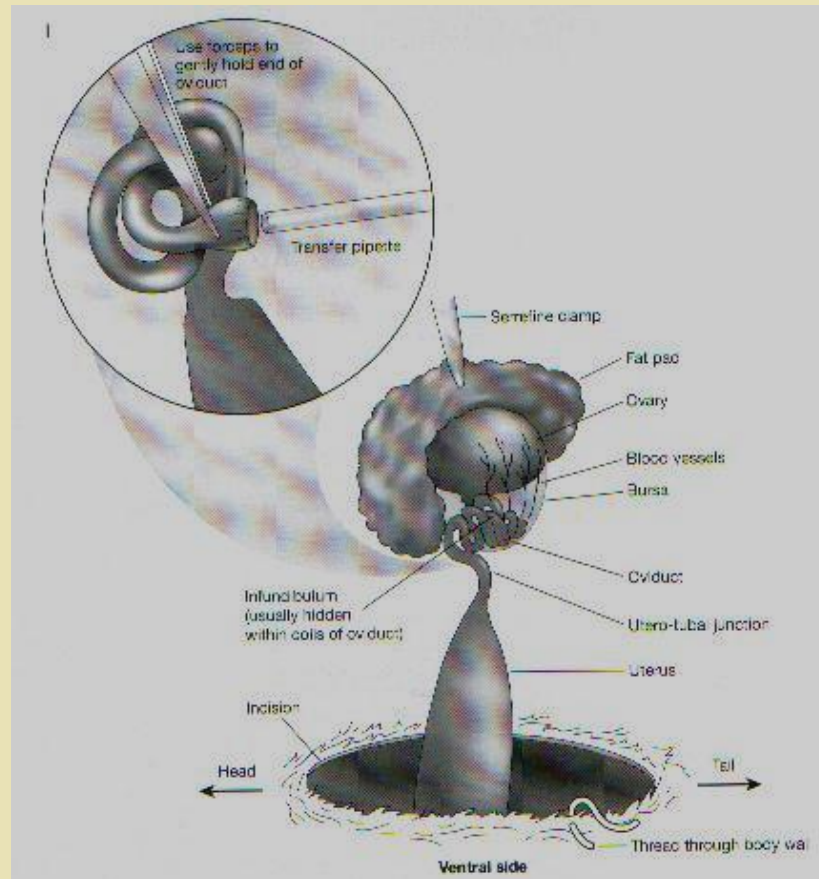
# Εμφύτευση γονιμοποιημένου ωαρίου

- ◆ Τα γονιμοποιημένα ωάρια μεταφέρονται την ίδια μέρα ή την επόμενη (στάδιο 2-κυττάρων) στη σάλπιγγα ενός ψευδοέγκυου θηλυκού ποντικιού



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

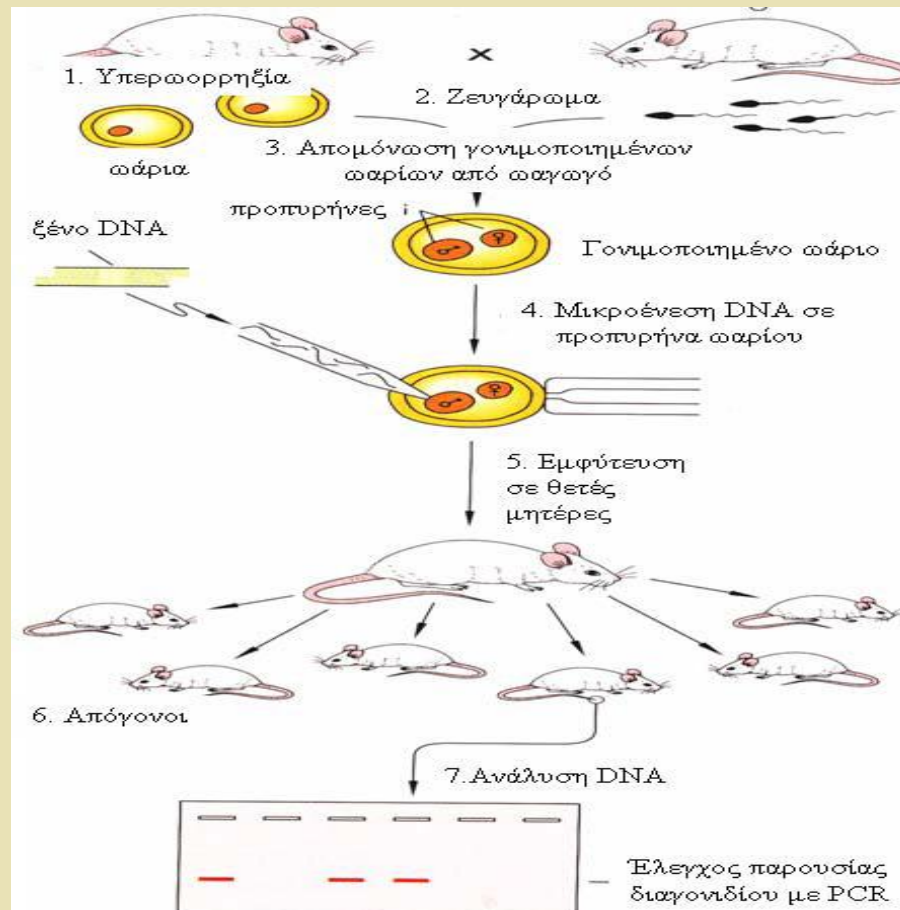
- ◆ Μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων που περιέχουν το διαγονίδιο στη σάλπιγγα ψευδοέγκυου θηλυκού ποντικού





# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

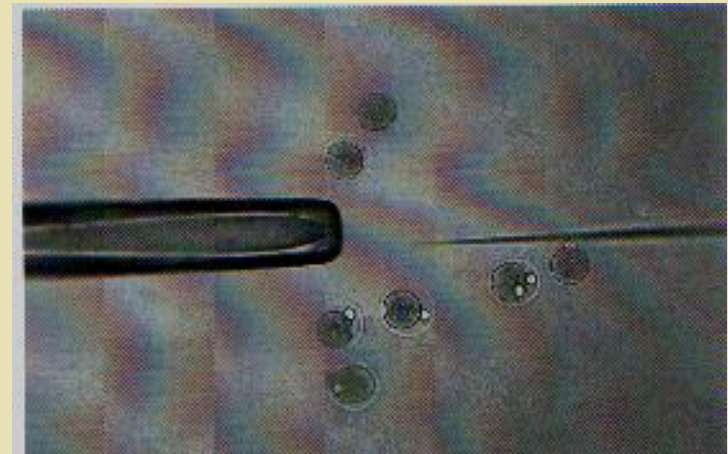
- ◆ Ανίχνευση του διαγονιδίου στους απογόνους



# Διαδικασία Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

## ◆ Προετοιμασία υλικών και εργαλείων

- Σύριγγες
- Ορός γοναδοτροπίνης (PMSG)
- Ανθρώπινη Χοριακή Γοναδοτροπίνη (HCG)
- Επωαστικός θάλαμος (370C, υγρασία 95% και 5% CO<sub>2</sub>)
- Χειρουργικό σετ εργαλείων
- 70% Αιθανόλη
- Στερεομικροσκόπιο με μικροχειριστή
- 35 mm petri dish
- Γυάλινες πιπέτες για την μικροένεση
- Συσκευή ανίχνευσης διαγονιδίου  
(PCR, Southern blot)





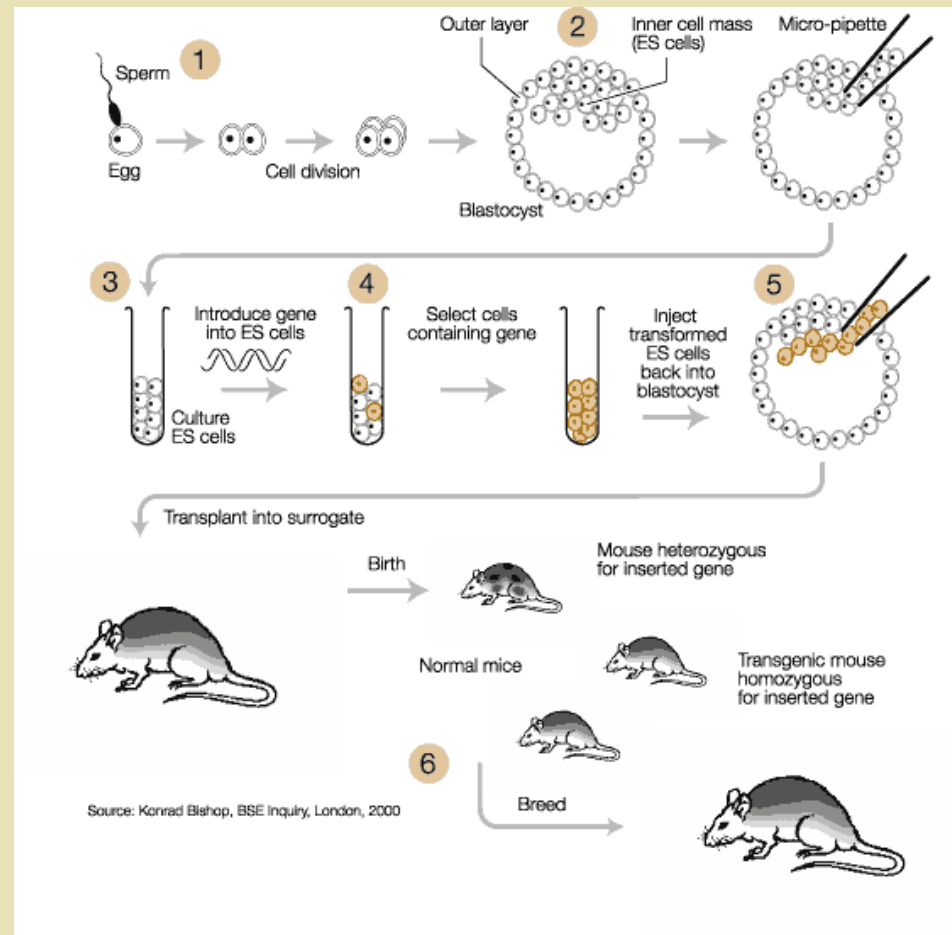
# Διαγονιδιακά Ζώα

- ◆ **Knockouts:** Μια ειδική κατηγορία διαγονιδιακών ζώων
  - Ποντίκια όπου έχουν αντικατάσταση του φυσιολογικού γονιδίου με μεταλλαγμένο ή απενεργοποίηση τμήματος ή όλου του γονιδίου
  - Το τροποποιημένο DNA τοποθετείται σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, όπου ανασυνδυάζεται με το υπάρχον γονίδιο στο χρωμόσωμα
    - Ομόλογος ανασυνδυασμός
  - Τα τροποποιημένα ES κύτταρα εισάγονται στο φυσιολογικό έμβρυο και το έμβρυο εμφυτεύεται στη μητέρα



# Μέθοδοι Δημιουργίας Διαγονιδιακών Ζώων

Διαμόλυνση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και ένεσή τους στη βλαστοκύστη





# Διαγωνιδιακά Ζώα

- ◆ **Knockouts:** Μια ειδική κατηγορία διαγωνιδιακών ζώων
  - Ο απόγονος είναι **χίμαιρα** – κάποια κύτταρα είναι φυσιολογικά και κάποια είναι knockouts
  - Χρειάζονται 2 γενιές αναπαραγωγής για την παραγωγή ενός ολοκληρωμένου knockout



# Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

- ◆ Απομονώνονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα στο στάδιο της βλαστοκύστης
- ◆ Αναπτύσσονται σε καλλιέργεια και διατηρούν πλήρως της ικανότητά τους να παράγουν όλα τα κύτταρα του ώριμου ζώου, περιλαμβάνοντας τους γαμέτες

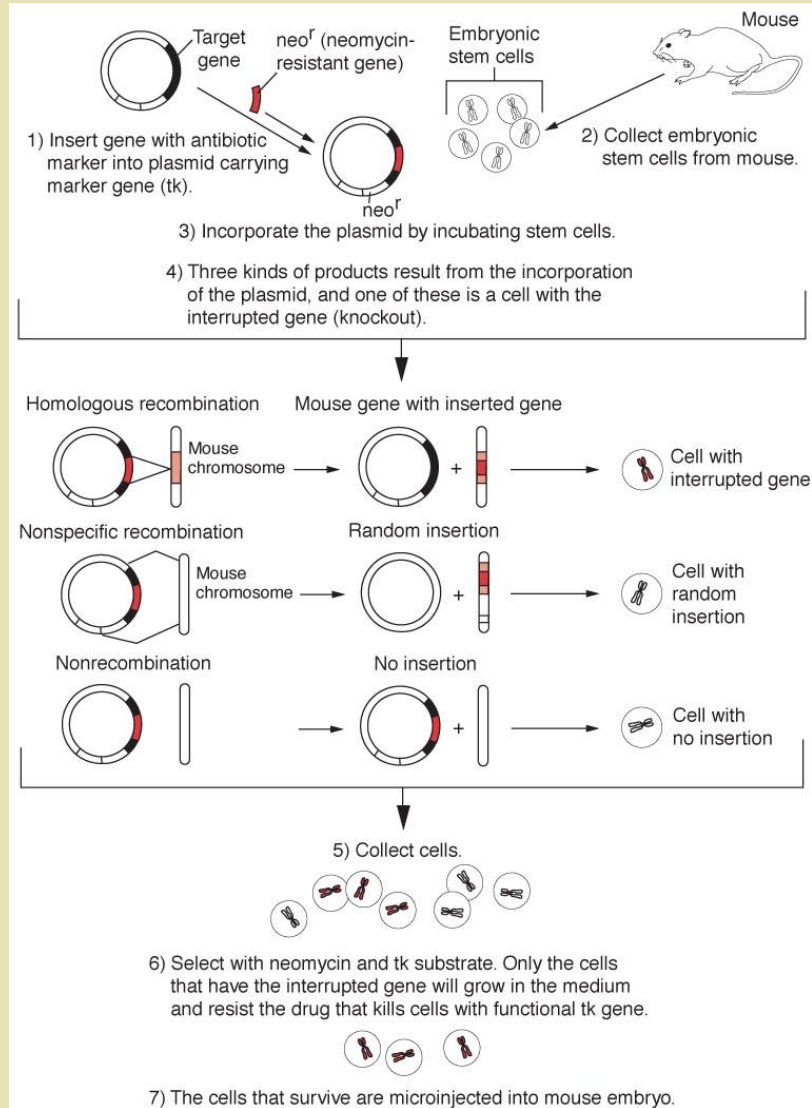




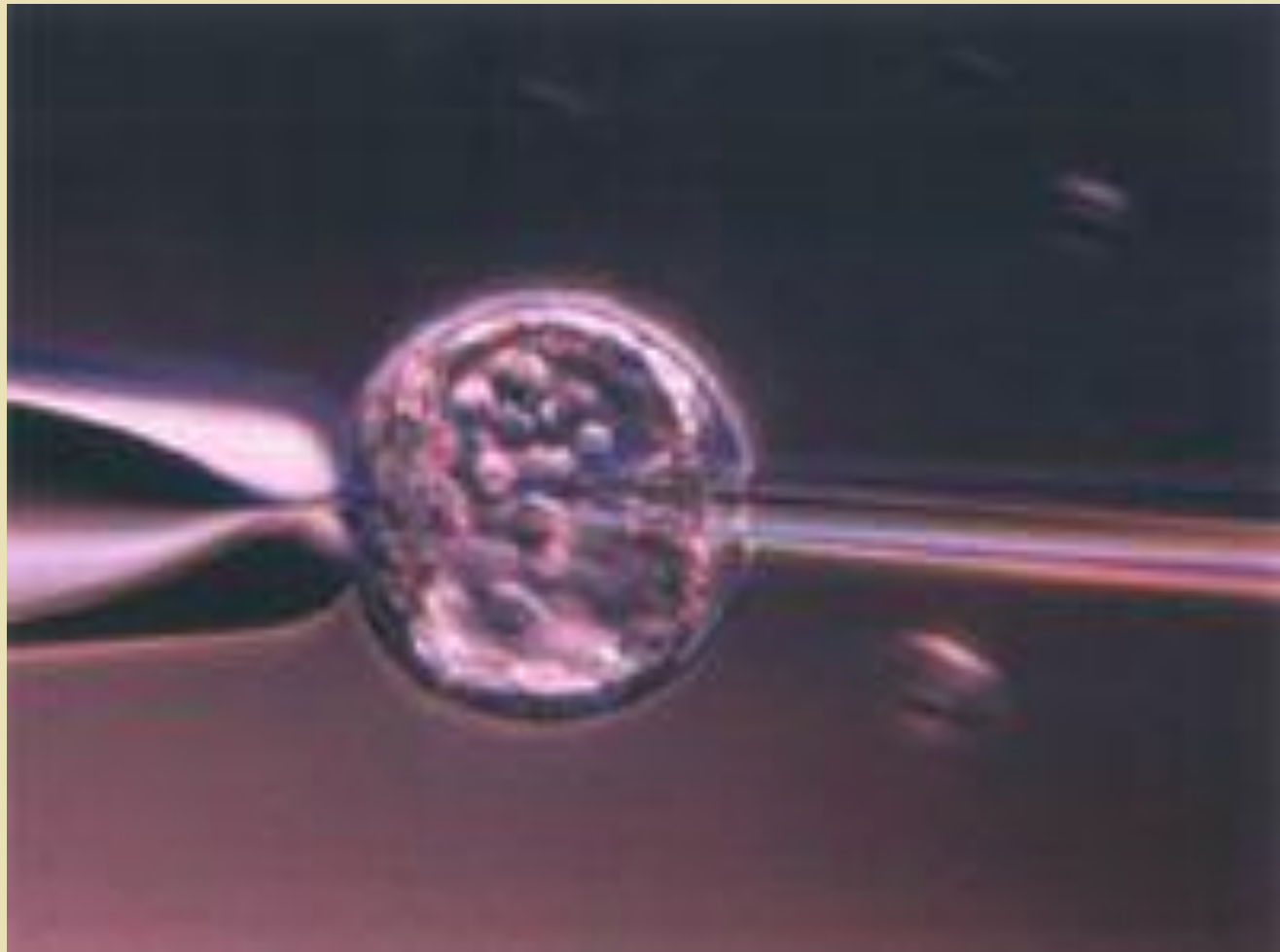
# Μετασχηματισμός των ES κυττάρων

- ◆ Εισαγωγή του vector στα ES κύτταρα με τη μέθοδο του ηλεκτροπαλμού
- ◆ Vector στο διάλυμα κινείται προς το εσωτερικό των ES κυττάρων
- ◆ Τα κύτταρα που επιβιώνουν μετά από επίδραση συγκεκριμένου αντιβιοτικού έχουν ενσωματώσει το τροποποιημένο γονίδιο

# Διαγονιδιακά Ζώα



# Μικροένεση των μετασχηματισμένων ES κυττάρων στις βλαστοκύστες



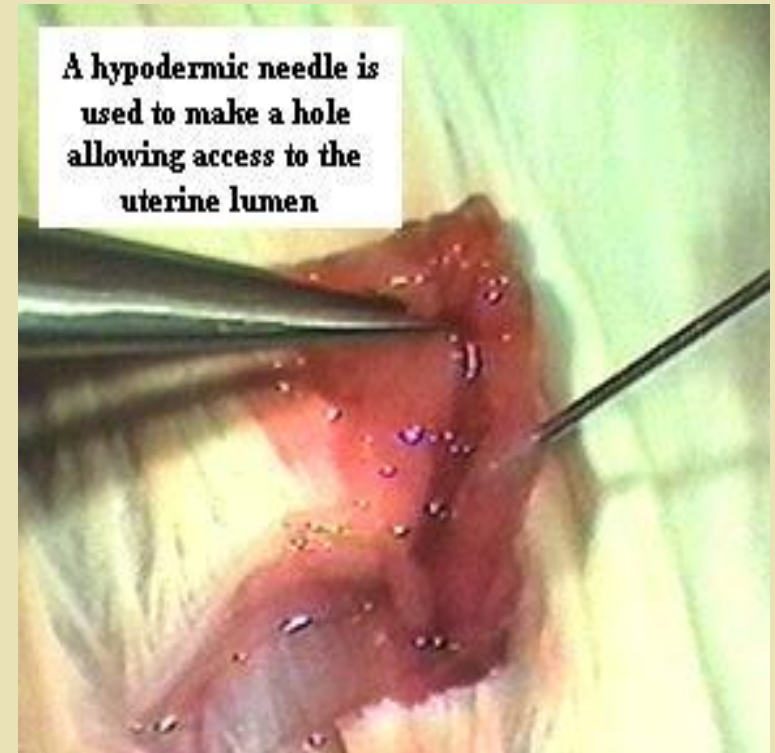
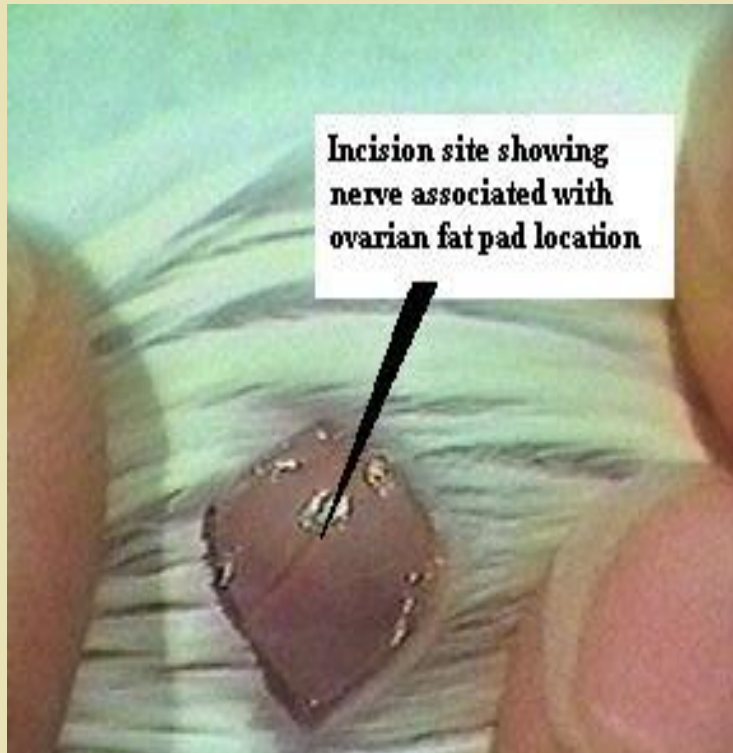




# Εμφύτευση των βλαστοκύστεων

- ◆ Οι βλαστοκύστες επωάζονται για λίγες ώρες
- ◆ Μεταφέρονται στη μήτρα των ψευδοέγκυων θηλυκών την 2.5 εμβρυϊκή μέρα
- ◆ Το ανώτερο το 1/3 των μεταφερόμενων βλαστοκύστεων θα αναπτυχθεί σε υγιή ποντίκια

# Εμφύτευση των βλαστοκύστεων



# Εμφύτευση των βλαστοκύστεων

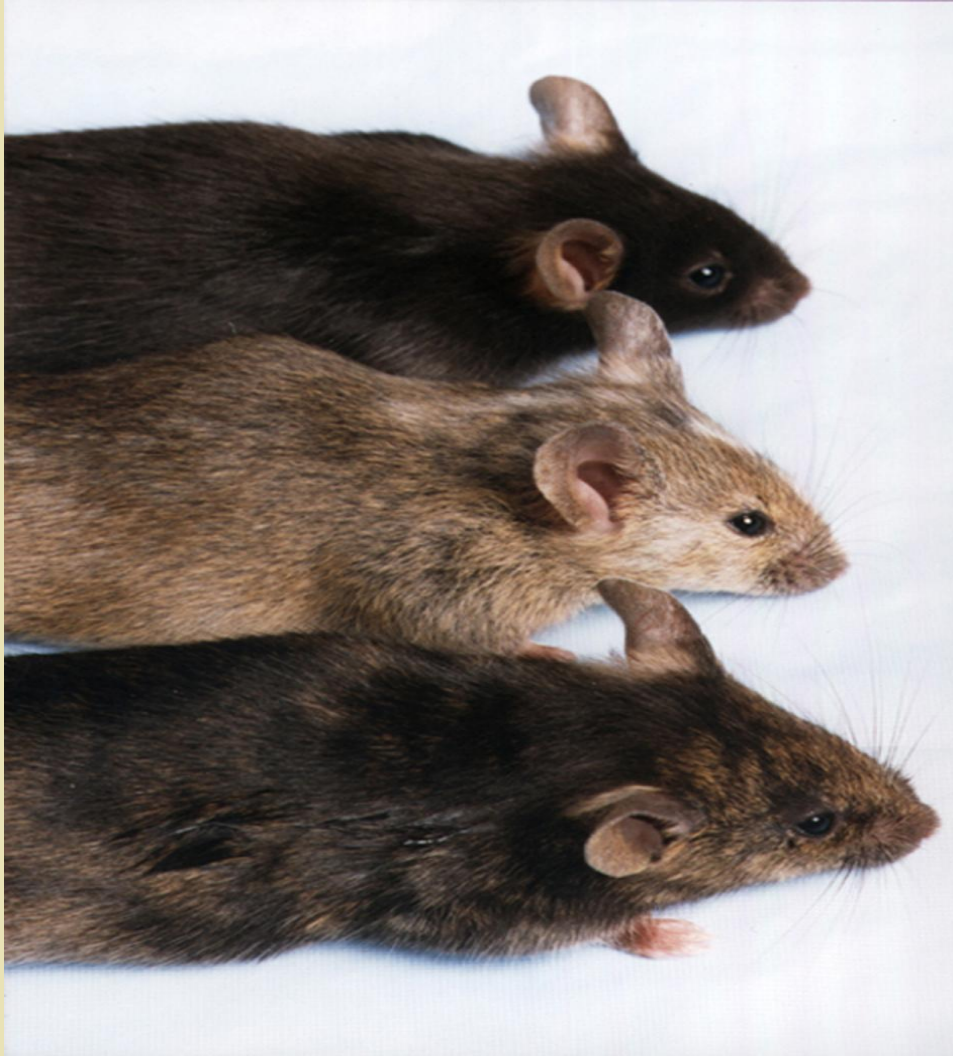
## ◆ Χιμαιρικό ποντίκι

- Συνήθως τα ES κύτταρα προέρχονται από ποντίκια ανοικτού χρώματος (ανοικτό καφέ ή λευκό τρίχωμα).
- Τα ES κύτταρα εμφυτεύονται σε βλαστοκύστη από ποντίκι μαύρου χρώματος.
- Όσο περισσότερο τα ES κύτταρα συμβάλλουν στο γονιδίωμα του ζώου τόσο πιο ανοικτό θα είναι το χρώμα του.
- Το χιμαιρικό ποντίκι συνήθως εμφανίζει συνδυασμό των δύο χρωμάτων





# Απόγονοι



Μαύρο ποντίκι-όχι εμφανή συμβολή των ES κυττάρων

Χιμαιρικό ποντίκι- Έντονη συμβολή των ES κυττάρων

Χιμαιρικό ποντίκι- Ασθενής συμβολή των ES κυττάρων



# Εξέταση απογόνων

- ◆ Απομόνωση DNA από ένα μικρό κομμάτι της ουράς ή του αυτιού του ζώου και εξέταση της παρουσίας του επιθυμητού γονιδίου
- ◆ 10-20% των απογόνων θα το έχουν και θα είναι ετερόζυγοι για το συγκεκριμένο γονίδιο



# Αναπαραγωγή των χιμαιρικών ποντικών

- ◆ Τα ετερόζυγα αρσενικά ζευγαρώνουν με διαφορετικές θηλυκές για να δώσουν πολλούς απογόνους ετερόζυγους, όπου στη συνέχεια θα διασταυρωθούν μεταξύ τους για να δώσουν ομόζυγα knockout ποντίκια
- ◆ Αν το αρσενικό ποντίκι μετά από 6 γέννες δεν καταφέρει να μεταφέρει το γονίδιο στους απογόνους η διαδικασία έχει αποτύχει



# Διαγονιδιακά Ζώα

- ◆ Διαγονιδιακά ζώα → ένεση σε προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου
- ◆ Knockout ζώα → Διαμόλυνση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και ένεσή τους στη βλαστοκύστη
- ◆ Τα διαγονιδιακά ζώα λειτουργούν ως μοντέλα :
  - ◆ Μελέτη της λειτουργίας γονιδίων  
Πολλές ανθρώπινες ασθένειες μπορούν να αναπαραχθούν με την εισαγωγή της ίδιας μετάλλαξης στο ποντίκι.
  - ◆ Τεστ φαρμάκων  
Επίδραση διαφόρων βιολογικών και χημικών ουσιών στην θεραπεία διαφόρων Νόσων

# ◆ Γενετική απαλοιφή στο knockout ποντίκι



- Εξέταση φαινοτύπου του ποντικιού

**Θνησιγόνο**

Το στοχευμένο γονίδιο είναι σημαντικό για την επιβίωση και την ανάπτυξη

**Φαινοτυπική  
διαφορά**

Η λειτουργία του στοχευμένου γονιδίου αποκαλύπτεται

**Φυσιολογικός  
φαινότυπος**

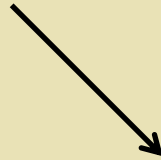
Η λειτουργία του στοχευμένου γονιδίου είναι μη σημαντική ή περιττή



**Υπο προϋποθέσεις γονιδιακή απαλοιφή**

# Υπο προϋποθέσεις γονιδιακή απαλοιφή

➤ **Ιστοειδικός** και/ή **χρονικός** έλεγχος της γονιδιακής απαλοιφής



❖ **Ιστοειδικός**  
υποκινητής που ελέγχει την  
έκφραση του διαγονιδίου

❖ **Χρονικά επαγόμενος**  
υποκινητής που ελέγχει την  
έκφραση του διαγονιδίου

Διαφορετικά μοντέλα υπο προϋποθέσεων γονιδιακής απαλοιφής:

- ❖ **Cre-loxP**
- ❖ **Tet-on/Tet-off**



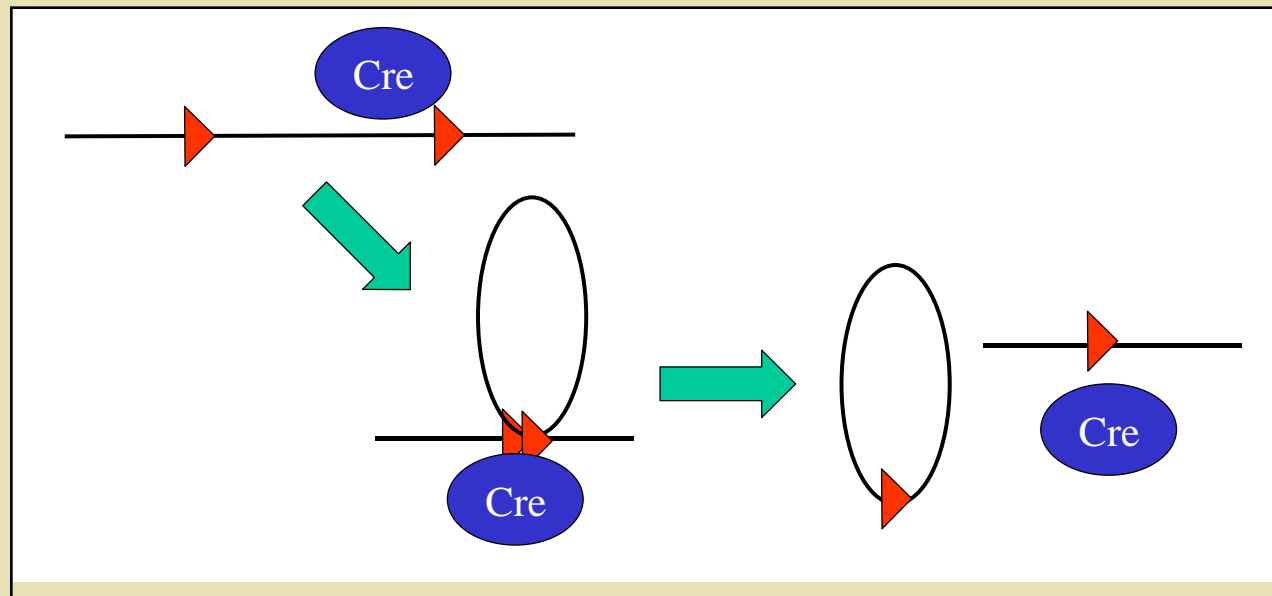
# Cre/loxP Σύστημα

## Cre recombinase

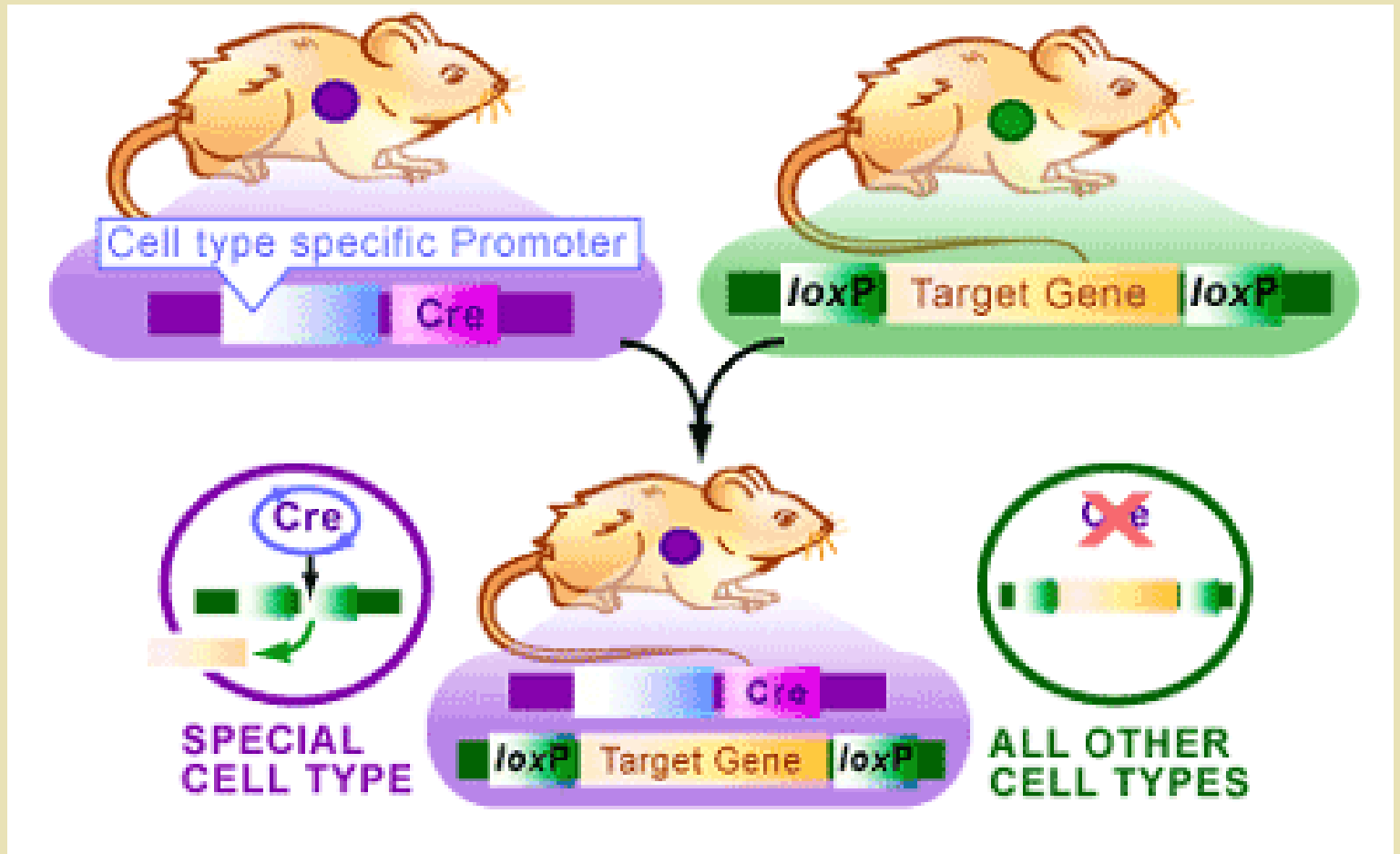
❖ Πραγματοποιεί ιστοειδικό ανασυνδυασμό μεταξύ 2 loxP περιοχών


## LoxP - DNA sequence

❖ Δύο 34bp αλληλουχίες που δρουν ως μαγνήτες της Cre recombinase για να ανασυνδυάσει το τμήμα του DNA που βρίσκεται μεταξύ τους



# Cre/loxP Σύστημα





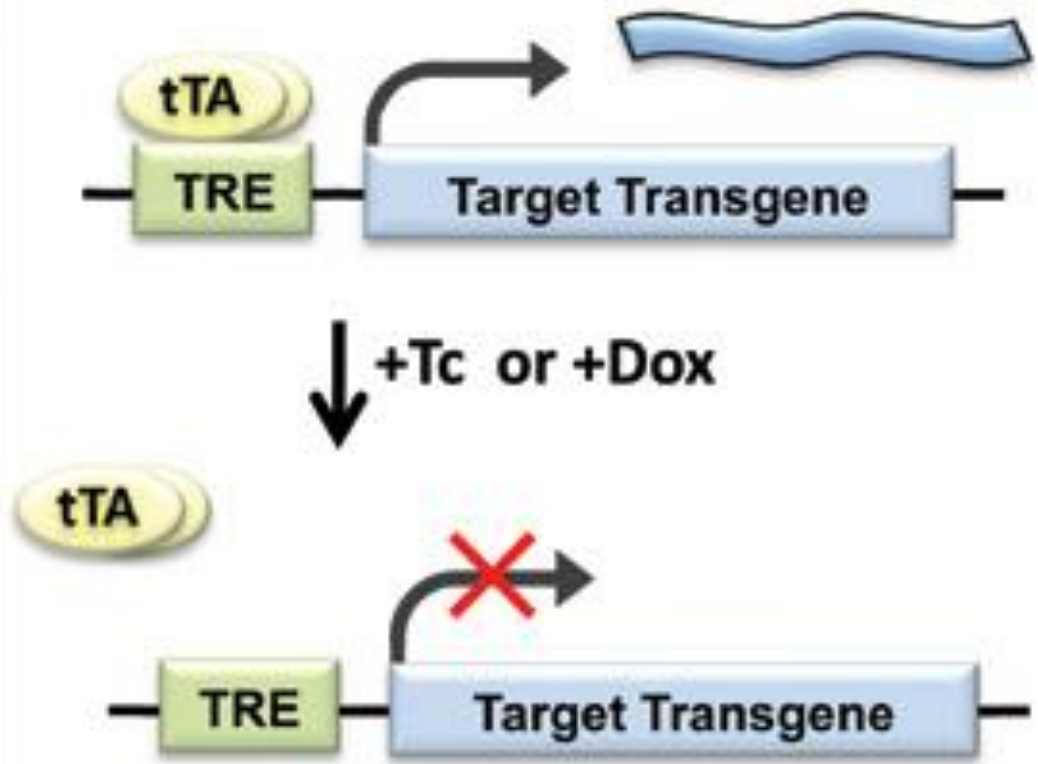
# Tet-on/Tet-off Σύστημα


- ◆ Στο **Tet-off** σύστημα μια ελεγχόμενη από τετρακυκλίνη πρωτεΐνη ενεργοποίησης **tTA** ρυθμίζει την έκφραση του στοχευμένου γονιδίου μέσω ενός **TRE** υποκινητή
- ◆ Απουσία Tc, *tTA* δεσμεύεται στο TRE και *ενεργοποιεί* το συγκεκριμένο γονίδιο
- ◆ Παρουσία Tc, *tTA* δεν δεσμεύεται στο TRE και η έκφραση του γονιδίου παραμένει *ανενεργή*



# Tet-off Σύστημα

## A) Tet-Off

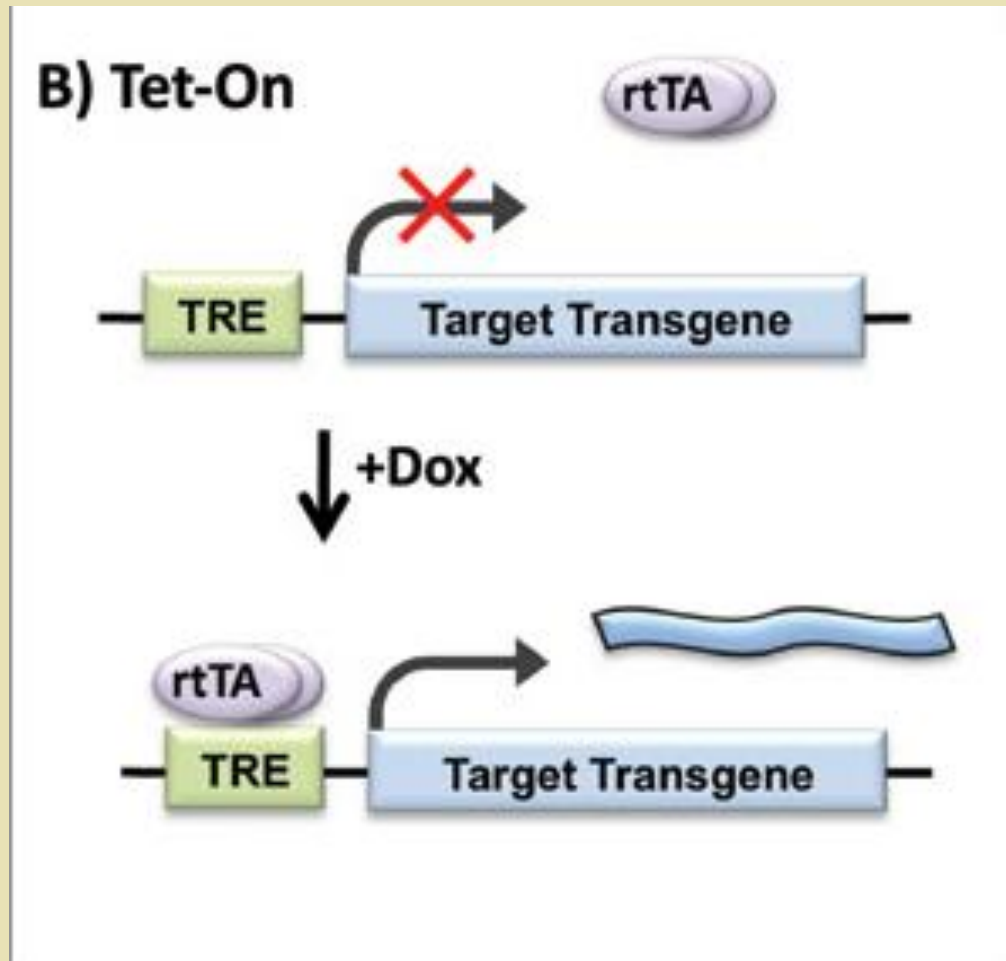




# Tet-on/Tet-off Σύστημα

- ◆ Στο **Tet-on σύστημα** μια ελεγχόμενη από τετρακυκλίνη πρωτεΐνη αντίστροφης ενεργοποίησης **rtTA** ρυθμίζει την έκφραση του στοχευμένου γονιδίου μέσω ενός **TRE** υποκινητή
- ◆ Παρουσία Tc, *rtTA* δεσμεύεται στο TRE και *ενεργοποιεί* το συγκεκριμένο γονίδιο
- ◆ Απουσία Tc, *rtTA* δεν δεσμεύεται στο TRE και η έκφραση του γονιδίου παραμένει *ανενεργή*

# Tet-on Σύστημα





# Συνοψίζοντας

Αυξημένος έλεγχος πάνω στη γονιδιακή τροποποίηση

- ◆ Διαγονιδιακό ποντίκι
- ◆ Τυχαία γενομική ενσωμάτωση διαγονιδίου
- ◆ Knock-out ποντίκι
- ◆ Ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα
- ◆ Υπο προϋποθέσεις διαγονιδιακό ποντίκι
- ◆ Ιστοειδική ή χρονικά συγκεκριμένη έκφραση του διαγονιδίου
- ◆ Επαγόμενο διαγονιδιακό ποντίκι
- ◆ Ιστοειδική και χρονικά συγκεκριμένη έκφραση του διαγονιδίου

# The Jackson Laboratory

Nomenclature experts:

[nomen@informatics.jax.org](mailto:nomen@informatics.jax.org)

Need help?

[micetech@jax.org](mailto:micetech@jax.org)

