

Ιολογία – Διαγονιδιακοί ποντικοί

Ιωάννης Καρακασιλιώτης

Η ιστορία των ποντικών εργαστηρίου

- 1100 BC- αναγνώριση διαφόρων χρωμάτων στους ποντικούς (Κίνα)
- 1909- Τα πρώτα ενδογαμικά στελέχη
- 1962- Γυμνοί ποντικοί
- 1980- Το πρώτο διαγονιδιακό ποντίκι
- 1989- Το πρώτο knockout
- 1990s- Συστήματα επαγόμενης έκφρασης/σίγασης,
- 2002 mouse genome project

Γιατί ο ποντικός σαν μοντέλο των
ανθρώπινων ασθενειών

Γιατί ο ποντικός ;;

- **Ένα από τα πιο κοντινά στον άνθρωπο μοντέλα–**
θηλαστικό
- **Το πιο πολύπλοκο–**
συνδυάζει συστήματα όπως το ενδοκρινές, νευρικό,
ανοσολογικό
- **Ένα από τα πιο μικρά θηλαστικά–**
έως 50 γραμμάρια
- **Γρήγορη ενηλικίωση–**
Απογαλακτισμός σε 20 μέρες
Ενηλικίωση σε 30 μέρες
- **Γρήγορη αναπαραγωγή –**
Οίστρος κάθε τέσσερις μέρες
Γέννηση μέχρι και 12 μικρών ανά γέννα



“Γονιδιωματική” του ποντικού

- Human genome ~3 billion bp
- Mouse genome ~ 3 billion bp
- Μέγεθος γονιδιώματος άλλων γνωστών οργανισμών-μοντέλων
 - Μύγα (*Drosophila*) ~ 140 million bp (21-fold less)
 - Σκώληκας (*C. elegans*) ~ 97 million bp (31-fold less)
 - Ζύμες (*Saccharomyces*) ~ 12 million bp (250-fold less)
 - Βακτήρια (*E. coli*) ~ 5 million bp (600-fold less)

99% των γονιδίων έχουν ανθρώπινο ομόλογο

Συστήματα που έχουν αναπτυχθεί γύρω από τους ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

Knockouts

Διαγονιδιακά

Συστήματα ιστοειδικής και ελεγχόμενης έκφρασης



Υποβοήθηση αναπαραγωγής

Κρυοσυντήρηση σπέρματος/εμβρύων

Εμβρυομεταφορά

In vitro γονιμοποίηση



Εργαλεία

Mouse genome project

Εμβρυικά βλαστικά κύτταρα

Συστοιχίες έκφρασης γονιδίων

Βιβλιοθήκες γενετικών τόπων σε βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (BAC)

... και το πιο σημαντικό όλων εμφανίζουν ασθένειες όμοιες με τις ανθρώπινες

Παραδείγματα Μοντέλων ασθενειών σε ποντικούς :

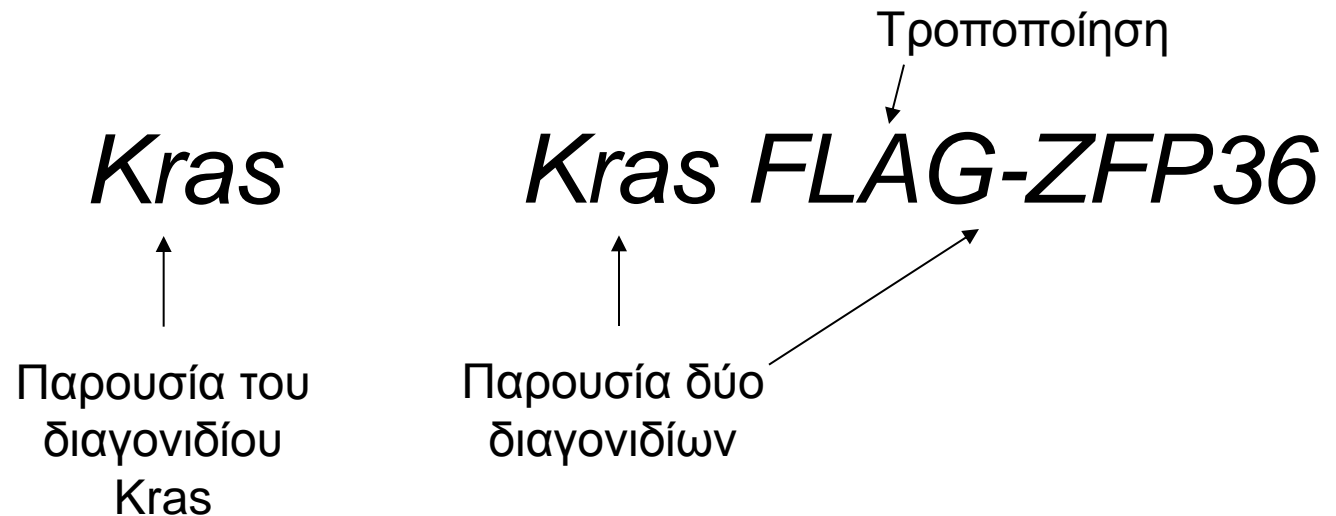
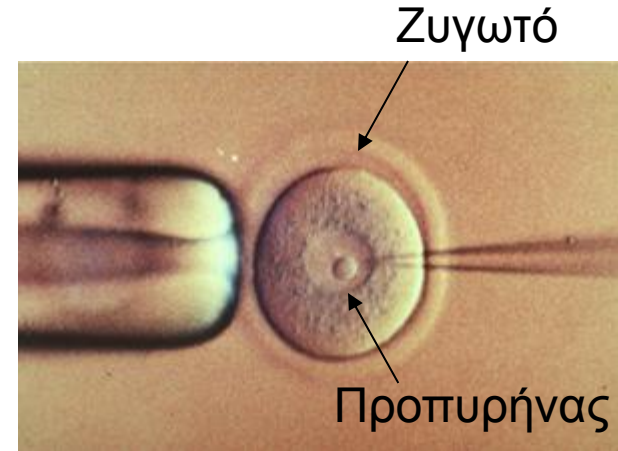
- 1) Διαβήτης 1 (αυτοάνοση ασθένεια) και 2 (μεταβολική ασθένεια)
- 2) Αθηροσκλήρωσης (αυξημένη χοληστερόλη και επικαθιση στα αγγεία)
- 3) Μυϊκή Δυστροφία (νευρομυϊκή ασθένεια)
- 4) Ρευματοειδής αρθρίτιδα (αυτοάνοση ασθένεια ??)
- 5) Κυστική Ίνωση (ασθένεια του πνεύμονα)
- 6) Επιληψία (νευρολογική ασθένεια)

Γενετική ποντικών

- Πρόσθεση εξωγενών γονιδίων (διαγονιδιακά)
- Τροποποίηση ενδογενών γονιδίων
 - Αφαίρεση γονιδίων (knockout)
 - Στοχευμένη μεταλλαξογένεση γονιδίων
 - Ελεγχόμενη έκφραση γονιδίων (conditional)

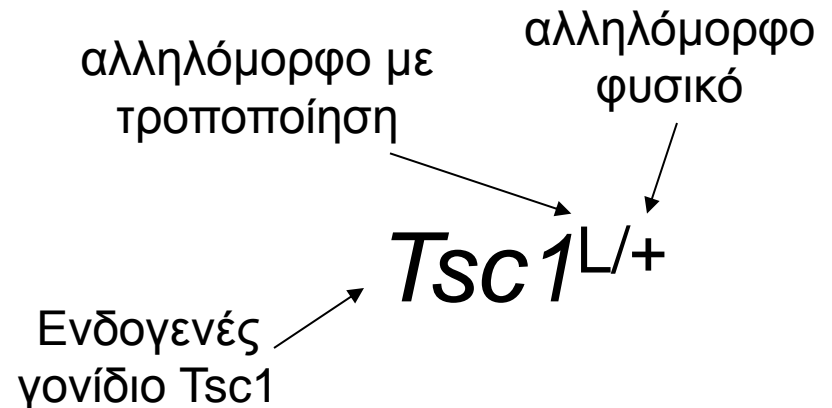
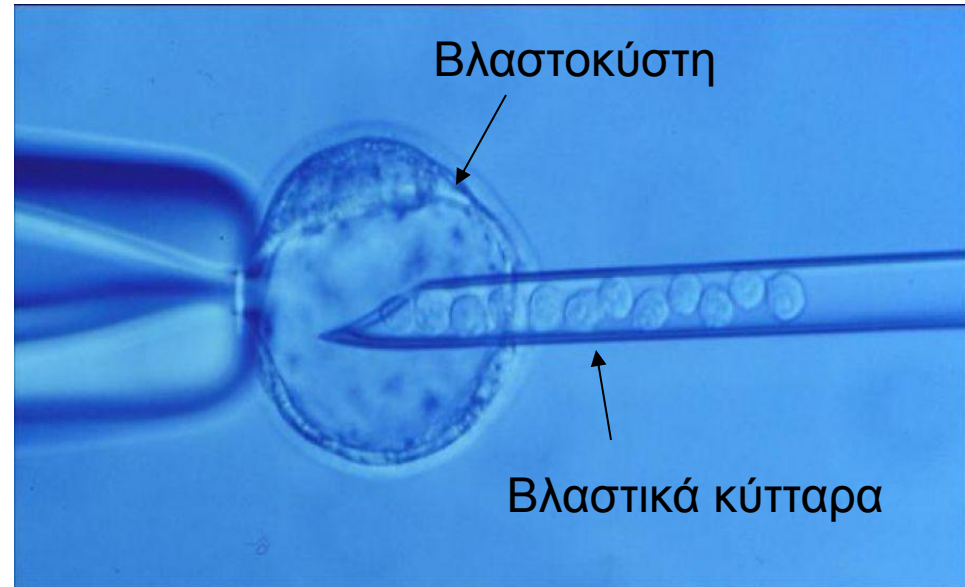
Διαγονιδιακοί ποντικοί

1. Γονιμοποιούμε το ωάριο στο εργαστήριο
2. Εισάγουμε σε αυτό το επιθυμητό DNA με μικροβελόνα
3. Το ξένο DNA ενσωματώνεται συνήθως σε κάποιο χρωμόσωμα



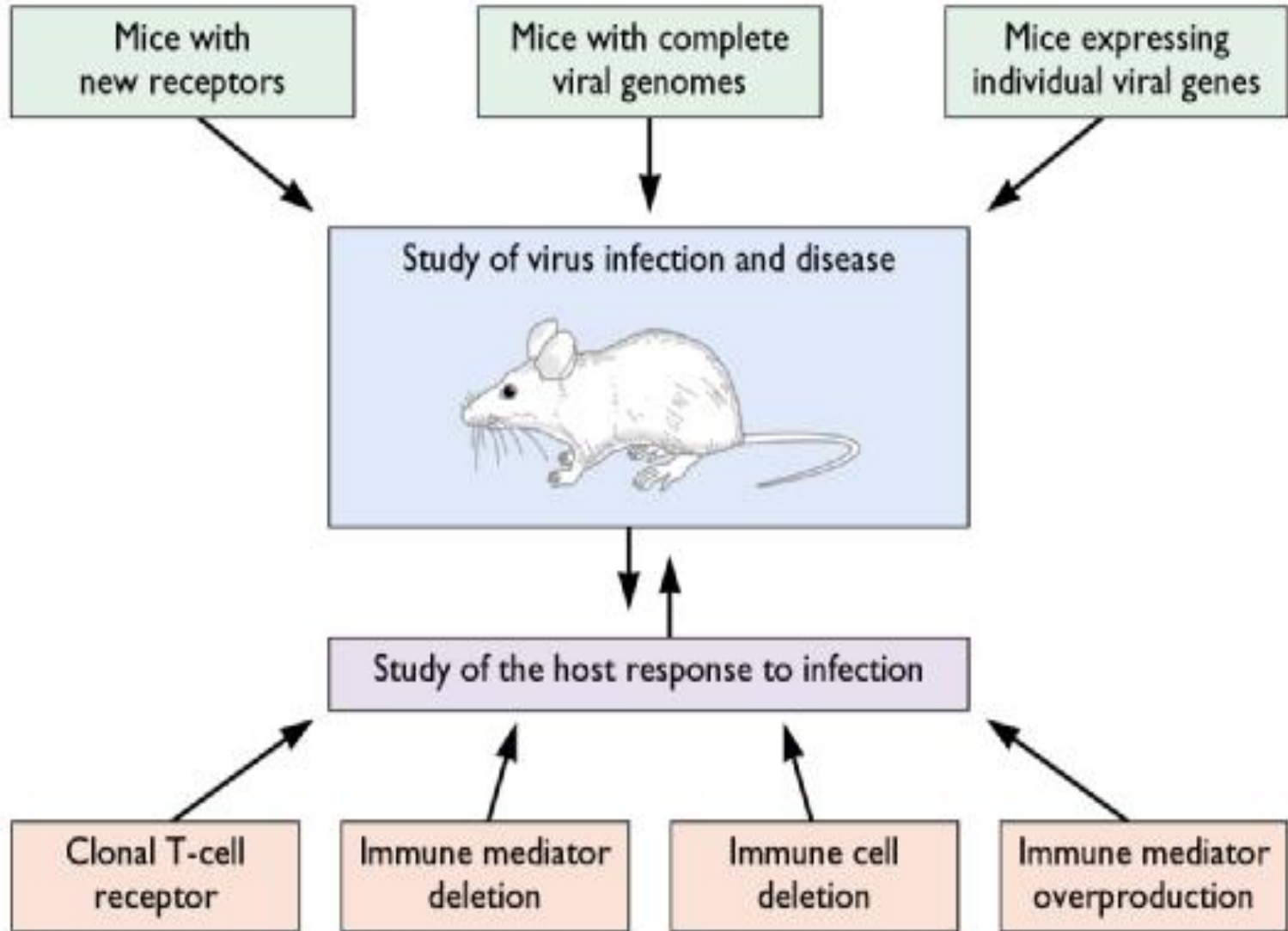
Ποντικοί με στοχευμένη αφαίρεση ή τροποποίηση γονιδίου

1. Τροποποιούμε γενετικά βλαστικά κύτταρα μέσω στοχευμένου ανασυνδυασμού της ενδογενούς περιοχής με αντίστοιχη τροποποιημένη στο εργαστήριο
2. Το DNA του ποντικού έχει
 - A) χάσει μέρος ενός γονιδίου
 - B) τροποποιηθεί σε μία θέση (μεταλλαγή)
 - Γ) αποκτήσει αλληλουχίες που επιτρέπουν την υποσυνθήκες απώλεια μέρους ενός γονιδίου

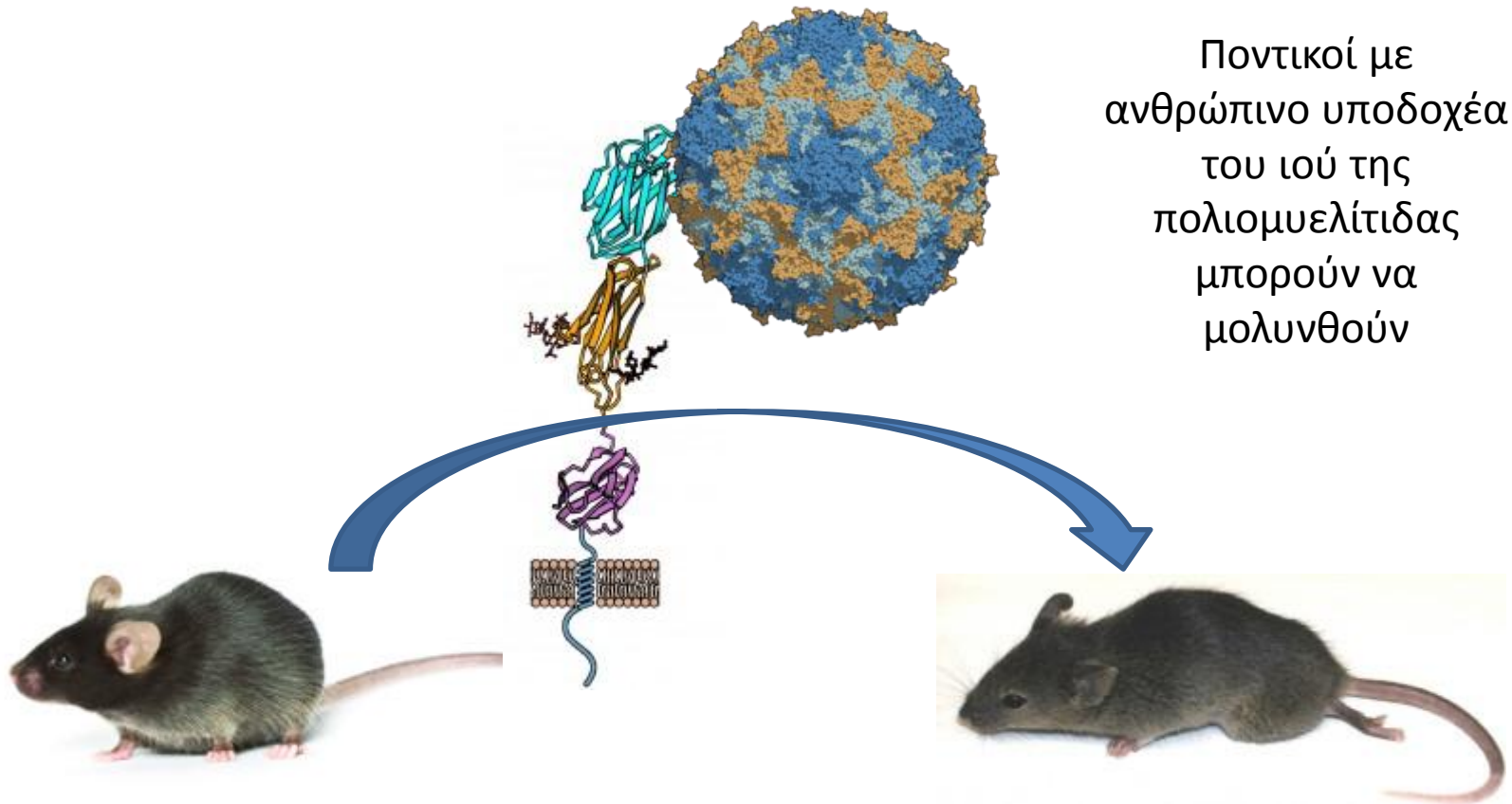


Experimental models – *in vivo*

Transgenic & knockout mice for studying viral pathogenesis

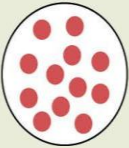
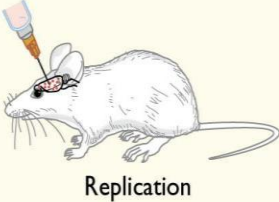
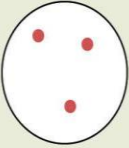
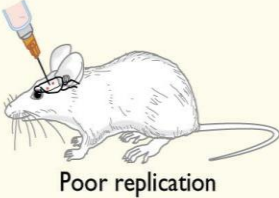
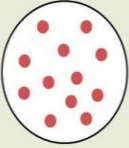
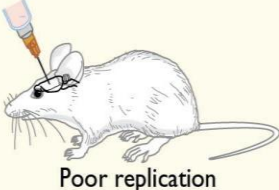


CD155/PVR ποντικούς και πολιομυελίτιδα



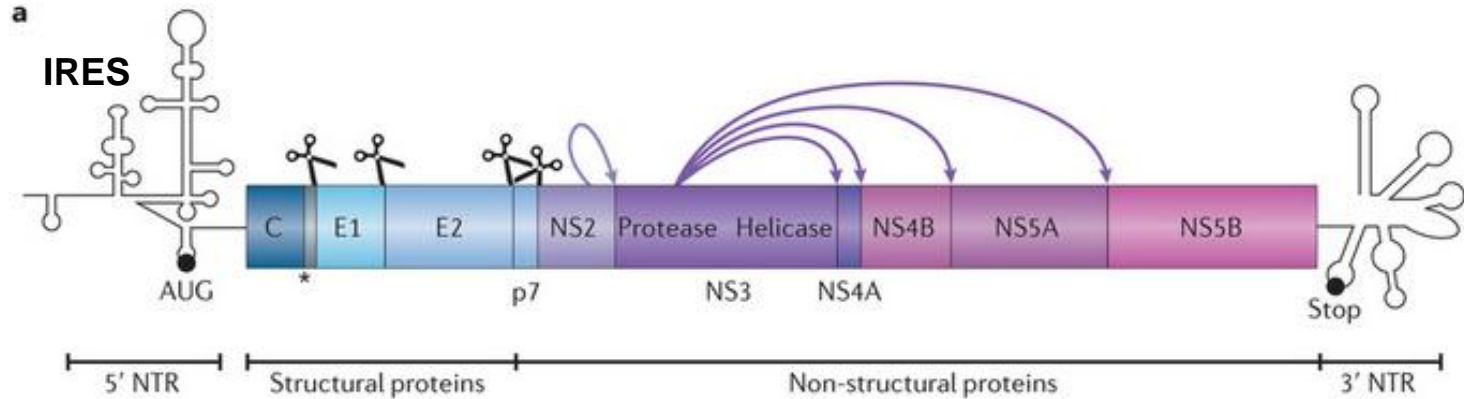
Μία από τις σειρές εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας για τον ποιοτικό έλεγχο νευρομολυματικότητας του εμβολίου Sabin

Μελετώντας τους παράγοντες μολυσματικότητας

	Growth in cell culture	Effect on mice	
Αγρίου Τύπου		 Replication	Μολυσματικό
Μεταλλαγή που οδηγεί σε παρεμπόδιση της αντιγραφής		 Poor replication	Εξασθενημένο
Μεταλλαγή σε γονίδιο που προκαλεί τη μολυσματικότητα		 Poor replication	Εξασθενημένο

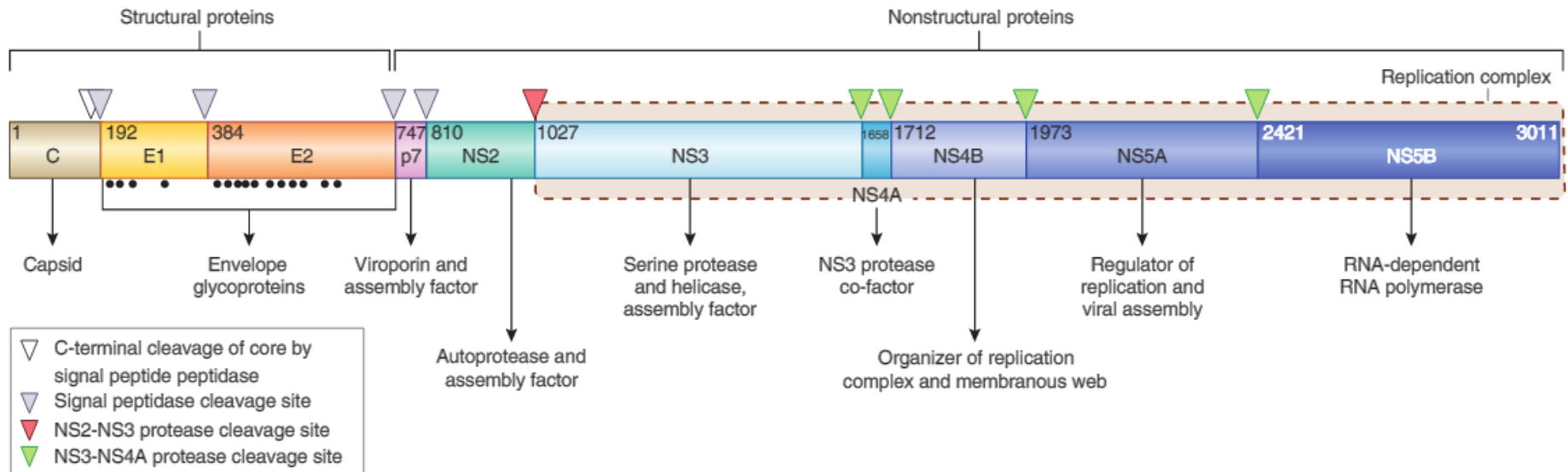
HCV και διαγονιδιακοί ποντικοί

Οργάνωση του γονιδιώματος του HCV

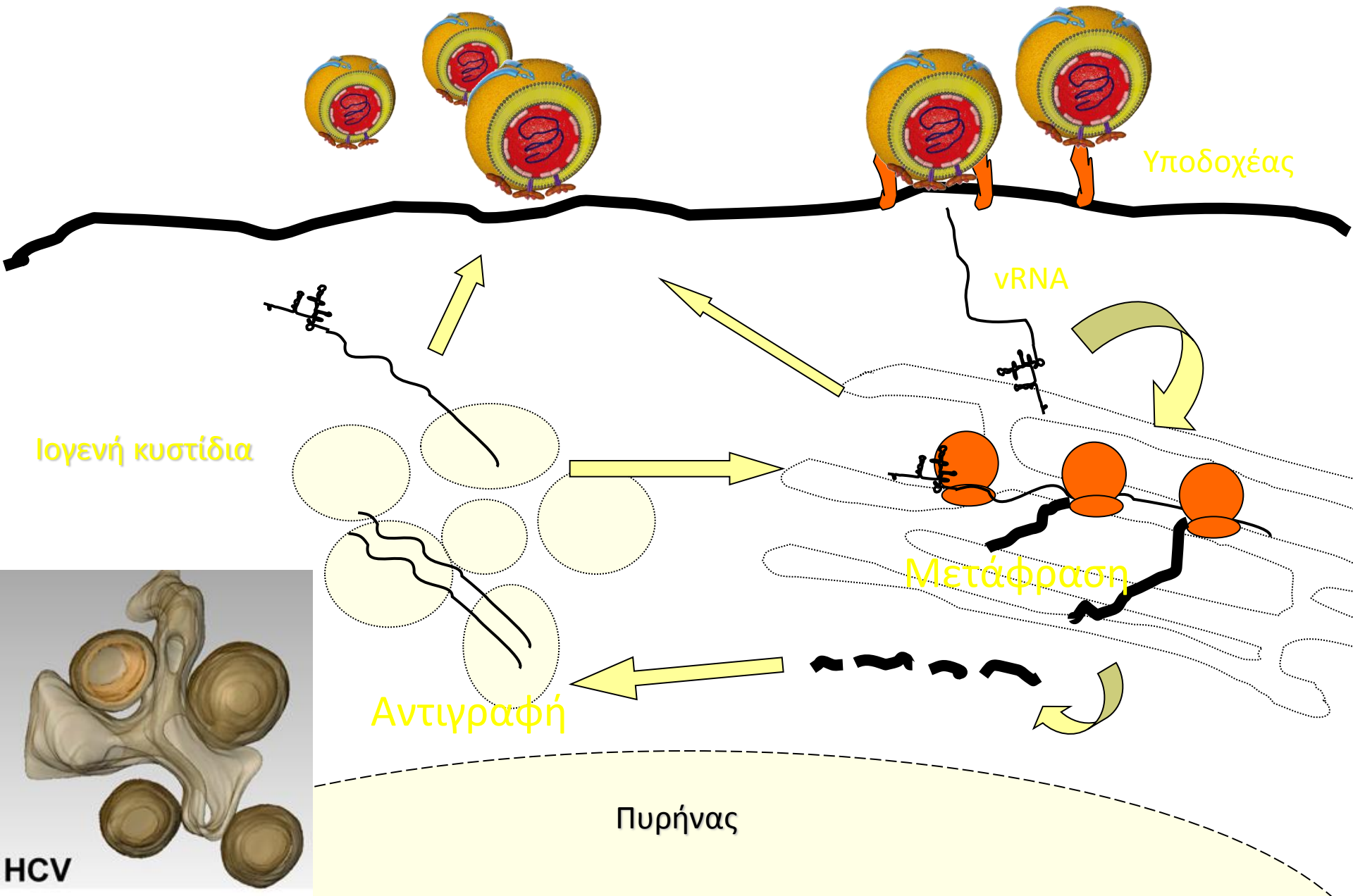


Δομικές

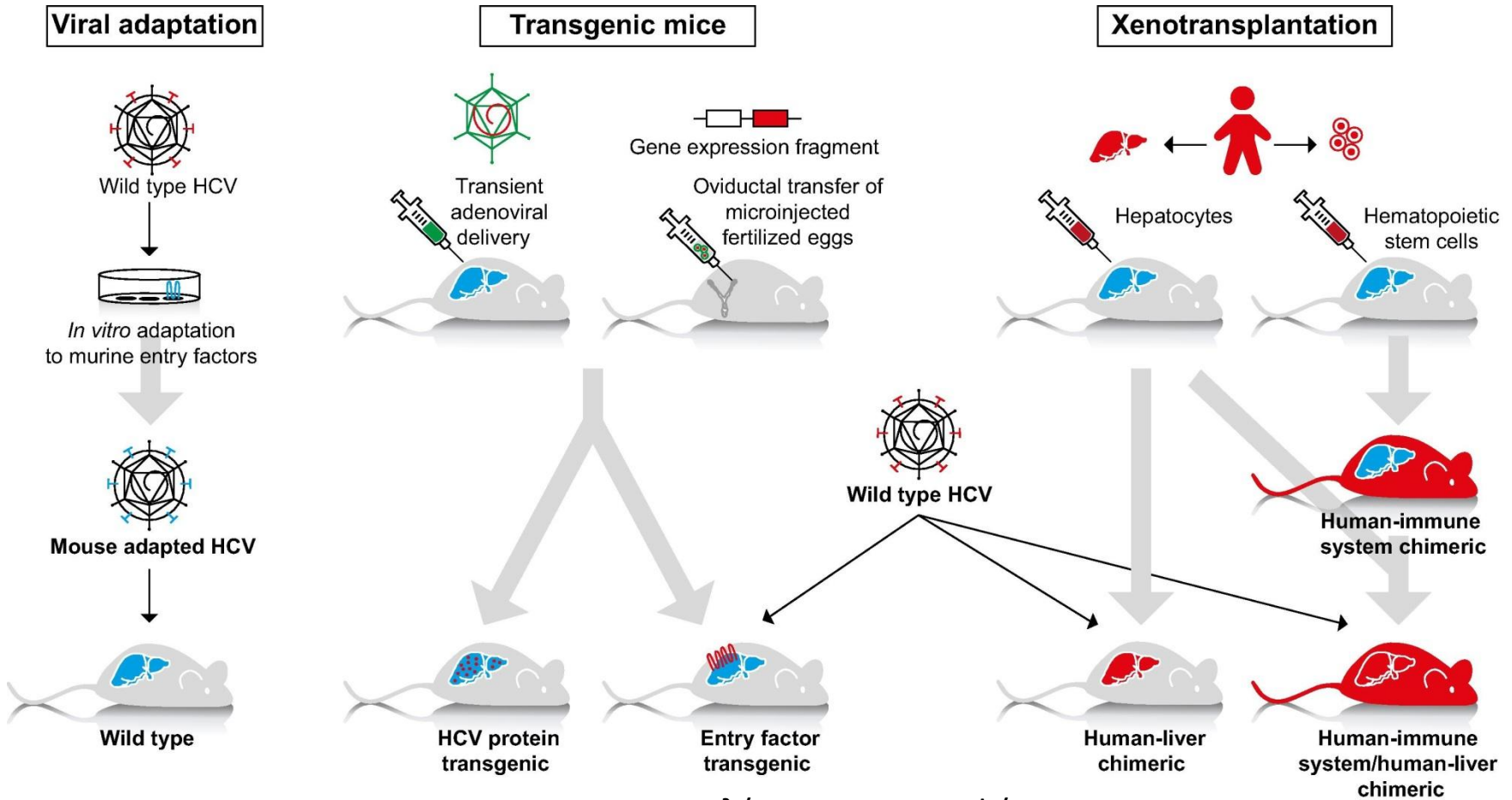
Μη-δομικές



Ο κύκλος ζωής του ιού HCV



Μέθοδοι χρήσης ζώων εργαστηρίου για τη μελέτη του HCV



Μελέτη της παθολογίας του ιού

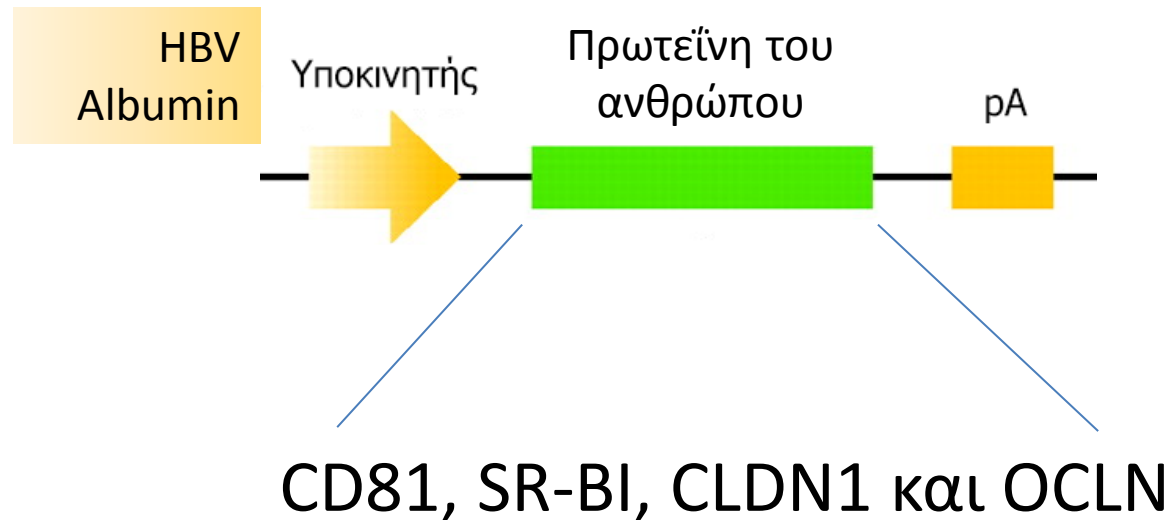
Μελέτη της αντιγραφής του ιού και της ανοσιακής απόκρισης

Μοντέλα ελέγχου φαρμάκων

Διαγονιδιακοί ποντικοί μελέτης της
ϊκής αντιγραφής

Διαγονιδιακοί Ποντικοί που εκφράζουν ανθρώπινες πρωτεΐνες υποδοχείς του ΗCV

- Προπυρηνική έγχυση DNA με γενικό ή ηπατοειδικό υποκινητή που οδηγεί την έκφραση μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης



Μόλυνση με HCV γενετικά εξανθρωπισμένων ποντικών

- Παράλληλη έκφραση ανθρώπινων πρωτεϊνών που λειτουργούν ως υποδοχείς του HCV (4 human entry factor mouse - 4hEF)
 - Μόλυνση με HCV των ποντικών 4hEF οδήγησε σε υποτυπώδη πολλαπλασιασμό του ιού
- Διασταύρωση του 4hEF με ποντικό που του λείπει ένας σημαντικός σηματοδότης της εγγενούς ανοσίας (STAT1^{-/-})
 - Επιτυχής μόλυνση με HCV που διήρκεσε 2 μήνες.

Ποντικοί με ανθρώπινο ηπατικό ξενομόσχευμα

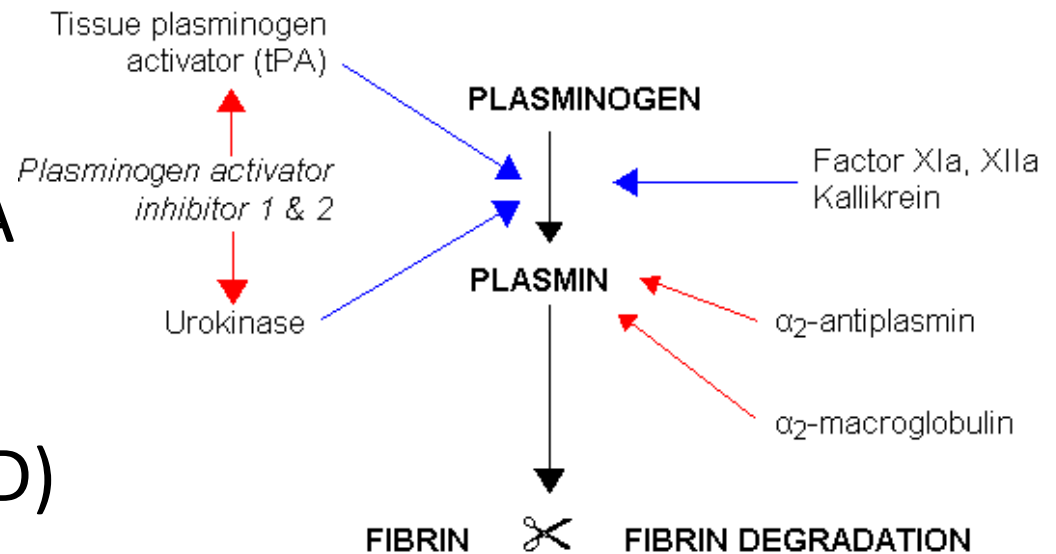
- Ποντικοί με ανεπάρκεια απόρριψης του μοσχεύματος από το ανοσοποιητικό σύστημα
- Παράλληλα ύπαρξη ενός μηχανισμού θανάτου των ηπατοκυττάρων του ποντικού
- Χορήγηση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων
- Ανασύσταση του ήπατος με υψηλή ποσόστωση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων

uPA-SCID

- Ποντικοί που υπερεκφράζουν το γονίδιο της ουροκινάσης (uPA) κάτω από τον υποκινητή της Αλβουμίνης υφίστανται σταδιακή ηπατική ανεπάρκεια

- Συνδυασμός των ποντικών Alb- uPA με ποντικούς γενετικώς ανεπάρκειας (SCID)

- Δυνατότητα μόλυνσης από κλινικά στελέχη



FRG

- Knockout για fumarylacetoacetate hydrolase ($FAH^{-/-}$) σταματάει τον καταβολισμό της τυροσίνης και υπερσυσσώρευση τοξικών ενδιάμεσων μεταβολιτών που οδηγούν σε θάνατο τα ηπατοκύτταρα.
- Συνδυασμός με την ανοσοανεπάρκεια λόγω έλλειψης του γονιδίου ανασυνδυασμού $V(D)J$ στα B και T λεμφοκύτταρα $RAG2^{-/-}$ και του γονιδίου της γ -αλυσίδας του υποδοχέα της IL-2 ($IL-2R\gamma^{-/-}$).

Μοντέλο Μελέτης Φαρμάκων *in vivo*

Daclatasvir and Telaprevir in vivo tests

PubMed.gov

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed

Advanced

Format: Abstract ▾

Send to ▾

[Antiviral Res.](#) 2008 Dec;80(3):231-8. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.07.006. Epub 2008 Aug 14.

The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV.

[Meuleman P¹](#), [Leroux-Roels G.](#)

⊕ Author information

Abstract

The study of the hepatitis B virus (HBV) and the hepatitis C virus (HCV) has long been hampered by the lack of a suitable small animal model. Both viruses could only be studied in humans or in chimpanzees. Recently, a new chimeric mouse model was developed that was permissive for HBV and HCV infection. In this model, uPA^{+/+}-SCID mice, suffering from a transgene-induced liver disease, are transplanted early after birth with primary human hepatocytes. These human hepatocytes integrate in the parenchyma and progressively repopulate the diseased mouse liver without losing their normal metabolic functions. Successfully transplanted mice can then be infected with HBV and HCV. In this review, we describe the characteristics of this chimeric mouse model in more detail and give an overview of how this model has already contributed to the development of new antiviral compounds for the treatment of viral hepatitis.

PMID: 18706933 DOI: [10.1016/j.antiviral.2008.07.006](#)