

Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze

Katedra genetiky a mikrobiologie

bakalářská práce

# Myší kongenní kmeny

Mouse congenic strains

Řešitel: Petr Flachs

Vedoucí: Ing. Zdeněk Trachtulec, Dr.

Akademický rok: 2006 / 2007

## Obsah

1. Abstrakt.....	3
2. Abstract (english) .....	3
3. Úvod .....	4
4. Křížení a standardní myší kmeny.....	5
5. Příprava myšího kongenního kmene.....	8
6. Historie .....	10
7. Moderní přístup k přípravě kongenního kmene .....	11
8. Další aspekty šlechtění a práce s kongenními kmeny .....	14
9. Využití .....	15
10. Závěr .....	16
11. Použité zkratky .....	17
12. Klíčová slova .....	17
13. Poděkování .....	17
14. Seznam použité literatury .....	18

## **1. Abstrakt**

Kongenní kmeny jsou speciální typy inbredních kmenů, ve kterých je s náležitou selekcí zpětně křížen dárcovský kmen s kmenem recipientním. Na tento kmen se tak přenese část genomu, která odpovídá selektovanému znaku dárcovského kmene. Kongenní kmeny jsou proto hojně využívaným genetickým nástrojem pro záměry rozličných typů lidského bádání. Pro myš, jakožto modelový organismus, byl ve čtyřicátých letech minulého století vyvinut deseti-generační protokol na přípravu kongenního kmene. Klasický protokol je od té doby stále používán, ale pozměňován a vylepšován pro různé potřeby experimentálního použití. V některých případech je vhodnější použít odvozené typy myších kmenů, jako například konsomické (chromosomálně substituční) kmeny. Úloha kongenů v genetickém výzkumu je ale stále nezpochybnitelná a jejich využití pomohlo k mnoha současným výsledkům, vedoucím k objasnění procesů některých chorob a tím i k usnadnění jejich budoucí léčby.

## **2. Abstract (english)**

Congenic strains are special inbred strains in which part of the genome of one mouse strain is transferred to another, by backcrossing the donor mouse strain to the receiver strain with appropriate selection. Congenic strains are widely used as a genetic tool for various purposes of research. In the 40`s of the last century the first method to produce a mouse congenic strain was invented. From then this classical ten-generation breeding protokol is still in use, although changed and adapted for different experimental needs. In some situation it may be more convenient to utilize a chromosomal substitution strain. However the role for congenics is still significant in genetic research. Their use has helped to explain mechanisms of some diseases and thus to facilitate their treatment.

### 3. Úvod

Cílem každého výzkumu je, aby jeho poznatky vedly v důsledku k poznání světa kolem nás, nebo přímo k prospěchu člověka. Myš se pro tuto úlohu hodí dokonale, s člověkem sdílí přibližně 99% svých genů. (Waterston et al., 2002). Jak myš, tak člověk trpí na stejné choroby ať už dědičné polygenně nebo podle mendelových zákonů (např. diabetes, ateroskleróza, srdeční choroby, anemie, hypertenze, obezita, osteoporóza, poruchy krvácivosti, astma a různé neurologické potíže). Tyto nemoci samozřejmě postihují i jiné savce, ale krátká generační doba (minimálně pět týdnů od narození do reprodukčního věku) a díky malým tělesným rozměrům relativně nízké náklady na chov dělají z myši přesto perfektní modelový organismus. Zřejmě nejpodstatnější jsou však genetické znalosti a informační i zvířecí zdroje získané za sto let výzkumu (Luanne et al., 2007). Navíc myš je jediný obratlovec, u kterého jsou dostupné tzv. „knock-out“ modely, při nichž dochází buď k úplnému vyřazení genu z funkce ("knock-out") nebo k utlumení jeho exprese.

Laboratorní myš se dnes používá v nejrůznějších odvětvích lidského bádání. Snad největší přínos má v experimentech farmakologických, toxikologických, chemoterapeutických a genetických. Poprvé byla myš využita k vědeckým účelům v roce 1664 v Anglii. Sledovali se na ni účinky zvýšeného tlaku vzduchu (Knotek, 1999).

Myš je poměrně plaché laboratorní zvíře, které váží v dospělosti 40 až 50 gramů a měří asi 15 až 20 centimetrů. Dožívá se v průměru dvou let, přičemž do pohlavní zralosti dospěje během dvou až pěti měsíců. Po 20 dnech březosti vrhne samice nejčastěji 6 až 12 mláďat. Během jednoho roku může vrhnout až dvanáctkrát (Knotek, 1999).

## 4. Křížení a standardní myší kmeny

### 4.1. Typy křížení

Pro zvířata, která mají mezi sebou daný genetický vztah, existuje několik základních typů křížení.

První typ křížení, který bývá i obvykle na začátku experimentu, je tzv. *outcross*. Nazývá se tak křížení mezi dvěma nepříbuznými kmeny zvířat. Potomci takového křížení se nazývají první filiální generace, nebo také  $F_1$  generace. Z faktu, že členové inbredního kmene jsou v celém svém genotypu homozygoti, vyplývá důležitý poznatek. Jestliže se při *outcrossu* jedná právě o jedince dvou inbredních kmenů a křížení je prováděno stejným směrem (t.j., samice z jednoho a samec z druhého kmene), pak jejich potomci budou navzájem identičtí a heterozygoti ve všech znacích rozdílných mezi rodičovskými kmeny.  $F_1$  generace z opačných křížení se mohou lišit pohlavními chromosomy a mitochondriální DNA. Ovšem nebudou-li oba jedinci pocházet z inbredního kmene, pak samozřejmě  $F_1$  potomci identičtí být nemohou.

Další typ křížení se nazývá zpětné křížení (*backcross*). V tomto křížení se  $F_1$  generace zkříží s jedním z kmenů, z něhož pocházeli jejich rodiče. Podle prvního Mendelova zákona o segregaci alel potom můžeme určit, že potomci generace zpětného křížení budou zhruba v 50% znaků, rozdílných mezi rodičovskými kmeny, heterozygoti a v 50% znaků homozygoti.

Pro křížení mezi sourozenci se používá termín příbuzenské křížení (*intercross*). A pokud se jedná o potomky první filiální generace, jejichž oba rodiče byli členové inbredního kmene, pak vyvodíme obdobný závěr o distribuci alel jejich potomků. Opět bude přibližně 50% heterozygotů. Potomci zvířat *intercrossu*  $F_1$  se nazývají druhá filiální generace ( $F_2$  generace).

*Incross* je termín označující křížení mezi jedinci téhož inbredního kmene. Je zřejmé, že jejich potomci budou homozygoti ve všech znacích jako jejich rodiče. Tento typ křížení se používá právě pro udržení inbredních kmenů. Zachovává se tak homozygotita a genetická definovanost zvířat v celém genomu.

## 4.2. Typy myších kmenů

### 4.2.1. Inbrední kmen

Zmíněný inbrední kmen je vlastně nejvýznamější typ myšího kmene. Právě svou přesnou genetickou definovaností je to základní kámen a nástroj genetiky.

Bude-li se pokračovat v křížení potomků  $F_1$  generace, pak se další generace bude nazývat  $F_2$ , následující  $F_3$  a tak dále, dokud budou křížení stále jen potomci stejné generace. Postupně tak narůstá procento homozygoty a celý tento proces se označuje jako *inbreeding*, neboli příbuzenecké křížení. Jak se podíl homozygoty genomu jednotlivých po sobě následujících generací zvyšuje, přibližuje se chovatel k vytvoření nového inbredního kmene. Dvacátá filiální generace se již někdy považuje za inbrední kmen, ovšem podíl homozygoty genomu  $F_{20}$  generace ještě není absolutní. Bylo doloženo přesné procento (Green, 1981 citováno v Silver, 1995).

### 4.2.2. Kongenní kmen

Kongenní kmen je takový kmen, který má díky cílenému křížení téměř stejnou genetickou výbavu s rodičovským inbredním kmenem. Jediný rozdíl je v tzv. *diferenciálním chromosomálním segmentu*. Tento segment na chromosomu může být například lokus, který obsahuje nějaký fenotypový znak. Kongenní myš se pak bude vyznačovat tímto znakem na fenotypovém pozadí zvoleného inbredního kmene. Tento kmen se nazývá *recipientní* a kmen, ze kterého pochází přenášený segment, je dárcovský neboli *donorový*. Pro přípravu kongenního kmene je v klasickém protokolu třeba asi deseti generací zpětných křížení. Podrobný popis přípravy kongenního kmene je probrán v následující (5.) kapitole.

### 4.2.3. Chromosomálně substituční kmen

Chromosomálně substituční neboli konsomický kmen je speciální varianta kongenních kmenů. Zpětným křížením se však v tomto případě přenáší specificky jeden kompletní chromosom na pozadí jiného inbredního kmene. Pro přípravu chromosomálně substitučního kmene je opět potřeba přibližně 10 generací zpětných křížení.

### 4.2.4. Rekombinantní inbrední kmen

Při produkci rekombinantních inbredních kmenů se vychází z křížení dvou odlišných inbredních kmenů. Tímto křížením získáme první filiální generaci -  $F_1$ , jejíž jedinci jsou z definice identičtí, heterozygotní v celém rozsahu genomu. Křížením jedinců  $F_1$  se získá druhá filiální generace, ve které dojde k segregaci alel obou parentálních kmenů, i například včetně

vloh pro zkoumané znaky. Poté se náhodně vyberou dvojice samec-samice z F2 populace, a tito se stanou základem pro jednotlivé budoucí rekombinantní inbrední kmene. Dále se pokračuje klasickým inbreedingem, tedy opakovaným křížením bratr x sestra po více než 20 generací. Takto ustavené kmene jsou inbrední a každý kmen ve svém genomu nese specifickou kombinaci alel rodičovských kmenů.

#### **4.2.5. Rekombinantní kongenní kmen**

Příprava rekombinantního kongenního kmene se zahajuje obdobně jako příprava kmene kongenního. První krok představuje opět křížení dvou odlišných inbredních kmenů. Znovu se přistupuje ke zpětnému křížení, tentokrát se ovšem s jedním vybraným rodičovským kmenem provádí jen dvakrát. Dále následuje 14 generací incrossu, tedy křížení mezi bratrem a sestrou. Tímto bude inbreeding kompletní a nový kmen je hotov. Tento nový kmen bude obsahovat úseky dárcovského kmene tvořící přibližně jednu osminu genomu. Zbylých sedm osmin bude patřit recipientnímu kmeni a bude tak představovat genetické pozadí pro přenášené segmenty (Demant a Hart, 1986).

Stojí za zmínku, že například při mapování nějakého genu či souboru genů se často tvoří celé skupiny rekombinantních inbredních kmenů pro jeden typ úvodního křížení. Každý nový kmen z celé skupiny bude obsahovat jiné fragmenty dárcovské genetické informace a proto je možné tímto způsobem obsáhnout většinu genotypu dárce.

Při úvodních zpětných kříženích je možná i selekce, například genotypizováním, na určitý segment dárcovského podílu.

#### **4.2.6. Ostatní typy kmenů**

Existuje více typů myších kmenů a mezi ty významnější ještě patří například takzvané outbrední linie, tedy kmene, u nichž není plemenitba cílena pouze na příbuzenské křížení. Zvířata se páří náhodně, jejich genom je převážně heterozygotní a tudíž nejsou geneticky definovaná. Jsou ovšem výrazně levnější, odolnější a mají větší vrhy, s nižším procentem novorozenecké úmrtnosti.

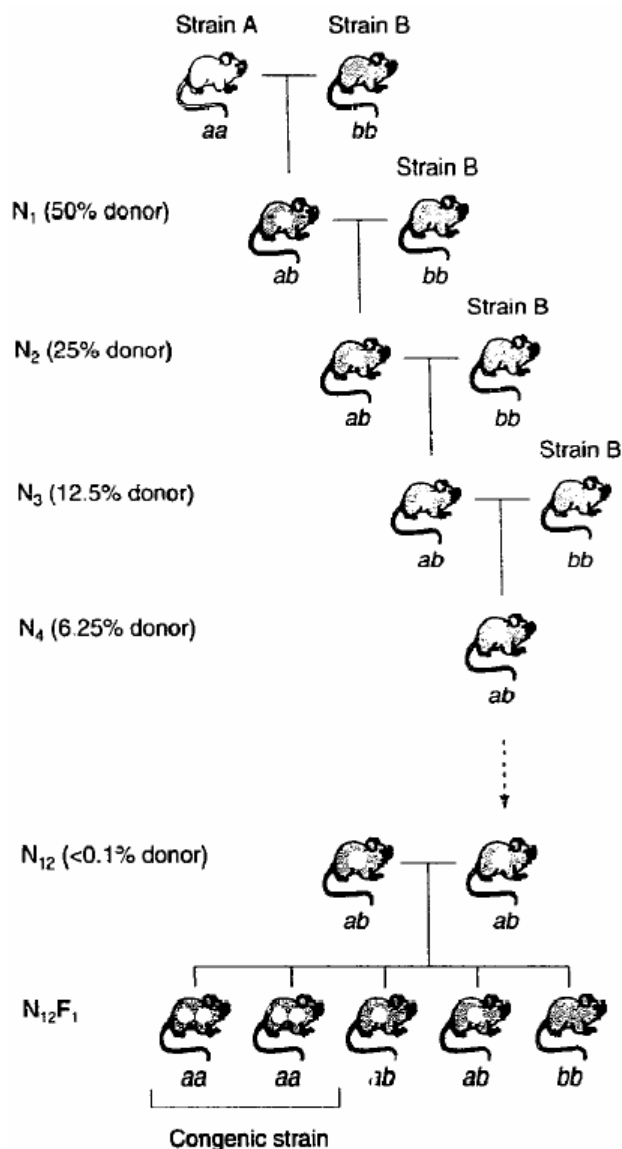
Velice podobné mutantní a koisogenní kmene jsou odvozeny od kmenů inbredních, cíleným zafixováním nějaké mutace. V případě koisogenních linií nastala mutace spontánně, kdežto mutantní kmene jsou mutagenizovány záměrně.

Je-li do myšího genomu transgenními technikami zaveden nový gen, jedná se o kmen transgenní. Vnesený gen nemusí nutně pocházet ze stejného druhu. Není-li transgen vnášen do

inbredního kmene, z transgenních zvířat se často připravují kongenní kmeny, aby se minimalizoval vliv pozadí genomu na fenotyp transgenu.

## 5. Příprava myšího kongenního kmene

Pro odstartování přípravy kongenního kmene je jako první křížení uskutečňován outcross mezi dvěma inbredními kmeny nebo inbredním kmenem a outbrední linií či divokou myší (obrázek 1). Pro účely vytváření kongenních zvířat bývá obvykle recipientní kmen inbrední. Všechna následující křížení jsou zpětná (backcross) a uskutečňují se právě s původním recipientním inbredním kmenem. Pro tato křížení se vždy vybírá zvíře, které



obdrželo přenášenou alelu, jež je právě součástí onoho diferenciálního chromosomálního lokusu. Při selekci se z časových i ekonomických důvodů zpravidla upřednostňuje samec, protože může oplodnit hned několik samic recipientního kmene. Po dokončení předepsaných zpětných křížení se nakonec mezi sebou zkříží příslušníci poslední generace zpětného křížení. Při tomto křížení jsou vybráni dva homozygotní jedinci a následným incrossem (tj. křížením mezi bratry a sestrami) se vytvoří stálý inbrední kongenní kmen (Silver (1995).

◀ *Obrázek 1: Na obrázku je popsána situace, kdy se z kmene A (dárce) přenáší alela a na genetické pozadí kmene B (recipient). Jednotlivé generace jsou značeny N<sub>1</sub> až N<sub>2</sub>, což je označení pro generace zpětného křížení. U každé generace je ještě vyznačeno postupně se zmenšující teoretické procento dárcovského genomu. (Wakeland et al., 1997).*



## 5.1. Matematický výpočet

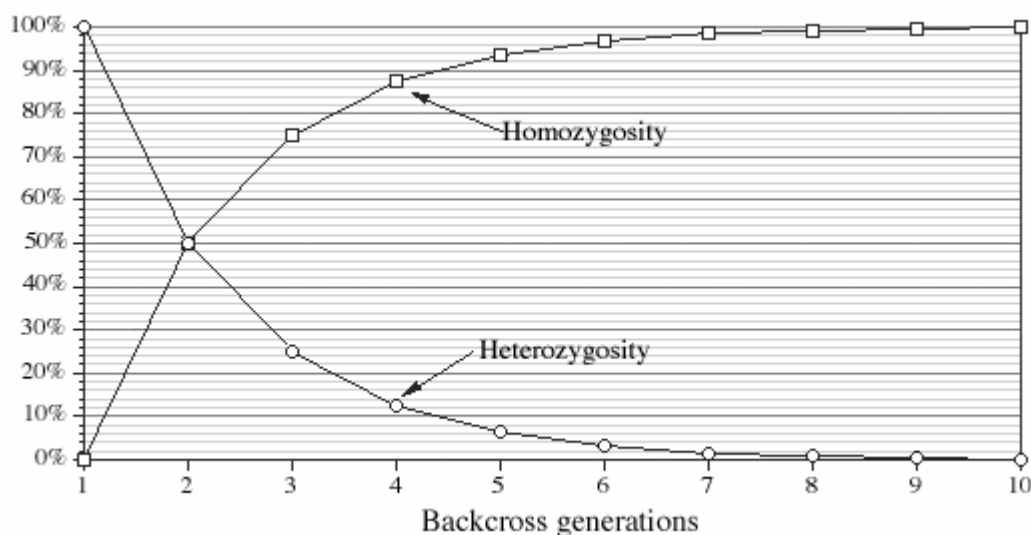
Z teoretických výpočtů je patrné, kolik zpětných křížení je třeba provést pro vytvoření kvalitního kongenního kmene. Podíl úseků, které jsou při zvyšujícím se počtu zpětných křížení stále ještě heterozygotní, se spočítá podle vzorce:

$$(1/2)^{N-1},$$

kde N je počet zpětných křížení. Analogicky se potom vyvozuje zbylá, tedy homozygotní část:

$$1-(1/2)^{N-1}.$$

Znamená to například, že již po čtvrtém zpětném křížení bude nová kongenní linie přibližně z 94% identická s rodičovským inbredním kmenem. Po desátém křížení se tento podíl zvýší přibližně na 99,8% a to už je hranice, při níž se může nově vzniklý kmen považovat za kongenní. Změny podílů heterozygotních a homozygotních oblastí při přípravě kongenního kmene je znázorněn na grafu 1.



▲ Graf 1: Křivky, znázorňující procentuální podíl (osa y) heterozygotních a homozygotních oblastí. Osa x udává počet zpětných křížení (Silver, 1995).

## 6. Historie

### 6.1. Vývoj inbredních kmenů

Na počátku 20. století bylo hodně pozornosti soustředěno na výzkum dědičnosti některých myších nádorových onemocnění. Vznikla zde silná potřeba geneticky uniformních kmenů a možnosti provádět reprodukovatelné křížení. Když byl v roce 1909 C. C. Littlem připraven první myší inbrední kmen, byly tak položeny samé základy výzkumu myší genetiky (Pangen 2003).

Od roku 1909 až do roku 1980 bylo vytvořeno a popsáno přes 300 nových inbredních kmenů (Staats 1980). U žádného jiného eukaryotního organismu není zatím k dispozici tolik typů geneticky jednotných kmenů, z nichž se na počátku experimentu může vycházet.

### 6.2. První kongenní kmen

Pojmový základ pro vytvoření kongenního kmene podal ve čtyřicátých letech George Snell (Snell 1944, citováno v Silver 1995). Pracoval na tzv. *histokompatibilních lokusech* – nebo také H lokusech (Klein 2001). Při transplantaci tkáně jsou tyto lokusy zodpovědné za to, že imunitní systém organismu rozezná tělu cizí tkáň a tu se snaží odhrojit. Snell se pokoušel popsat do té doby neznámý počet a typ jednotlivých genů, patřících do skupiny histokompatibilních lokusů. Díky poznatkům té doby se soudilo, že k odlišení všech jednotlivých nepříbuzných jedinců je třeba velké množství těchto lokusů. Předpokládalo se totiž, že jednotlivé lokusy se vyznačují zhruba stejným polymorfním charakterem a že jsou většinou jen dvou- až tříalelické (Silver 1995). Pro experimentátory tedy vyvstával problém, jakým způsobem izolovat jednotlivé lokusy od všech ostatních, aby je bylo možno identifikovat a charakterizovat.

Pro vyřešení tohoto úkolu bylo použito právě mnoho-generačního protokolu, založeného na opakovaném zpětném křížení. Pro další šlechtění byli vybíráni vždy jedinci tkáňově nekompatibilní s recipientním inbredním kmenem. Dosáhlo se tak řady kongenních kmenů, u kterých se vytrídily jednotlivé H lokusy dárcovského kmene na genetickém pozadí recipientního kmene.

Nakonec se ukázalo, že se ve většině kmenů izoloval tentýž lokus, pojmenovaný H-2 lokus. Dnes se tento určující prvek histokompatibility, obsahující množinu velice úzce spjatých genů, nazývá H2 komplex. Navzdory předpokladům se v rámci tohoto komplexu nachází skupina tzv. genů I. třídy a tyto geny vykazují vůbec nejvyšší míru polymorfismu se

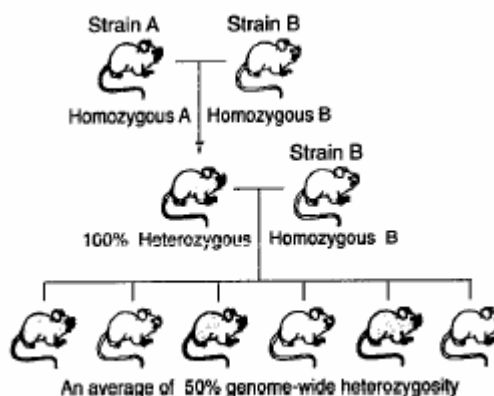
stovkami alel v jednotlivých lokusech. Pro označení tohoto komplexu se u myší a všech ostatních savců užívá obecný termín *MHC - major histocompatibility complex*. Z historických důvodů se u lidí také někdy používá termín *HLA – human leukocyte antigen*.

## 7. Vylepšení technologie šlechtění pomocí marker-asistované strategie a příprava tzv. ‚rychlých kongenů‘

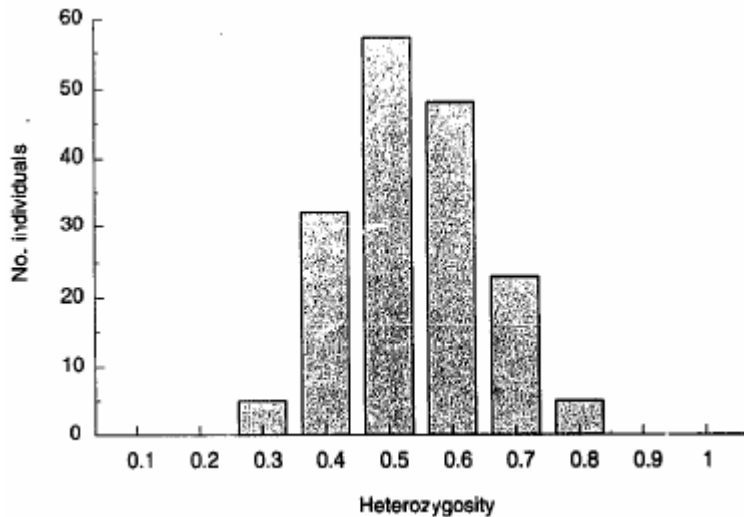
Klasický protokol přípravy myších kongenních kmenů je časově velmi náročný. Pro dosažení přibližně 99,9 % podílu genetické informace recipientního kmene v úseku asi 20 cM je zapotřebí minimálně 10 generací zpětného křížení. Tento proces trvá obvykle 2,5 – 3 roky. Existují proto postupy, které zkracují dobu potřebnou pro vyšlechtění kongenního kmene asi o 18 - 24 měsíců (Markel et al., 1997).

Tyto chovatelské postupy jsou založeny na použití tzv. *marker-asistované* selekci zvířat vhodných pro další křížení. Při této metodě se využívá tzv. *mikrosatelitů* - polymorfních genetických markerů rozestých po myším genomu. Díky zmapovaným myším mikrosatelitům, je možné stopovat zděděné geny nebo celé úseky genetické informace (Love et al., 1990). Polymorfismus v délce mikrosatelitů se snadno rozlišuje pomocí polymerázové řetězové reakce (*PCR – Polymerase chain reaction*) a gelové elektroforézy. Ještě rychlejší, ale finančně náročnější, by bylo paralelní genotypování zmapovanými jednonukleotidovými polymorfismy na DNA čipu (Petkov et al., 2004). Při použití marker-asistované strategie šlechtění není chovatel při výběru chovného zvířete odkázán jen na fenotypové projevy daného znaku. Genotypizací totiž může přímo určit, které zvíře nese kýžený lokus ve svém genomu. Navíc může experimentátor vybrat zvíře s nejvyšším podílem genetické informace recipientního inbredního kmene. Tímto způsobem se pak může snížit počet generací nutných pro výrobu kongenního kmene.

► *Obrazek 2: Graficky znázorněná situace prvního - outcrossového křížení a druhého - backcrossového, tedy zpětného křížení. Potomci  $N_1$  generace jsou přibližně z 50% heterozygotní. Skutečné rozložení popisuje graf 2 (Wakeland et al., 1997).*



U potomků druhé backcrossové generace se ze statistiky předpokládá, že podíl heterozygotních genotypů (dárcovský kmen/recipientní kmen) a homozygotních genotypů (recipientní kmen) bude přibližně 50 na 50 (Obrázek 2). Tato průměrná hodnota vyjadřuje, že počet potomků s 50% podílem heterozygotnosti bude nejvyšší, ale také to znamená, že malá část potomků bude obsahovat 30% respektive 70% heterozygotnosti, jak ukazuje graf 2.



◀ Graf 2. Grafické znázornění rozložení heterozygotnosti v potomcích prvního zpětného křížení. Osa x vyjadřuje podíl heterozygotních úseků a osa y udává počet jedinců (Wakeland et al., 1997).

Chovatel pak při výběru pro další křížení zvolí zvíře, které obsahuje žádaný přenášený gen a vykazuje nejnižší podíl heterozygotních úseků v genomu. Takto se postupuje i u dalších křížení a při čtvrté až páté generaci jsou potomci z méně než jednoho procenta heterozygotní (Markel, 1997), a tato část představuje přenášený gen z dárcovského kmene a jeho nejbližší okolí. Výsledný počet nutných generací přitom závisí na hustotě rozmístění použitých markerů a počtu typizovaných zvířat.

### 7.1. Analýza marker-asistovaných chovných strategií pro myší kongenní kmene

Maximální nutný počet generací potřebný pro přípravu kvalitního kongenního kmene je měřítko účinnosti jednotlivých chovných strategií. Kvalita vyprodukovaného kmene je určena pravděpodobností výskytu neidentifikovaných heterozygotních oblastí na pozadí recipientního inbredního kmene. Je zřejmé, že při snaze co nejvíce snížit podíl neidentifikovaných heterozygotních oblastí, musí být zcela zachován kýžený úsek genetické informace dárcovského kmene.

Byly publikovány počítačové simulace vlivu rekombinace a účinnosti jednotlivých marker-asistovaných chovných protokolů. Tato chovná schémata se například lišila použitím různých poměrů množství zpětných křížení, mláďat jednotlivých generací a genotypizací na myš. Jedna z těchto simulací byla navržena pro různou hustotu použitých polymorfních markerů. Rozložení markerů bylo navrženo přibližně v úsecích po 5 cM, 10 cM a 20 cM. Potřebné množství nově narozených zvířat se uvažovalo od 10 do 50 mláďat.

Z výsledků je patrné, že se ekonomicky a časově vyplatí používat markery s densitou okolo 10 cM, protože výsledky pokusů s vyšší densitou (5 cM) se podstatně nelišily, zato finanční a časová náročnost byla neporovnatelně vyšší. Z obdobných důvodů nemá smysl produkovat více než 50 potomků jednotlivých křížení (Armstrong 2006).

Významný vliv na výsledek má také velikost hledaného úseku genotypu dárcovského kmene. Mohou to být celé chromosomy u chromosomálně-substitučních (konsomických) kmenů nebo například QTL, tedy soubory genů pro kvantitativní znaky (*quantitative trait loci*). U kongenních kmenů se může jednat právě o QTL nebo jednotlivé, případně knock-outované (vyřazené z funkce) geny. Míra vlivu rekombinace je dána délkou přenášené DNA. Čím delší úsek, tím se v něm nerekombinantní zvířata hledají hůře a musí se tedy typizovat větší počet myší.

## **8. Další aspekty šlechtění a práce s kongenními kmeny**

### **8.1. Modifikátorové geny**

Při šlechtění kongenních kmenů je často zapotřebí vybírat vhodná zvířata podle fenotypových projevů daného znaku, který je cílem přenosu. Tyto fenotypové projevy se mohou ovšem velice lišit v závislosti na mnoha faktorech, jakými jsou třeba: věk sledovaného zvířete, prostředí, atd. Pro spolehlivou selekci je třeba s těmito okolnostmi počítat a zařídit se tak, aby jejich vliv byl co nejnižší.

Jedním z těchto faktorů se mohou stát i takzvané modifikátorové geny. Jsou to geny recipientního zvířete, které interagují se sledovaným znakem a mění jeho fenotypové projevy. Změny mohou nastat v penetranci (pronikavosti), míře exprese, změně dominantního postavení alely a nebo mohou tyto geny společně vytvořit zcela nový fenotypový výraz (Nadeau, 2001).

Zjistí-li se na samém počátku šlechtění, že zvolený inbrední kmen pro tvorbu genetického pozadí zřejmě obsahuje modifikátorový gen, je lépe vybrat jiný výchozí inbrední kmen. Znak by se totiž v tomto případě mohl projevovat méně často, v nižší míře a nebo třeba jako úplně nový fenotyp, čímž by se stala selekce méně spolehlivá a mnohem náročnější, nebo dokonce nemožná.

### **8.2. Význam použití konsomiků místo kongenů**

V určitých případech může být vhodnější použít místo kongenních kmenů kmene chromosomálně substituční neboli konsomické. Pro některé kmene jsou již připraveny panely konsomických linií pro každý chromosom a jejich výběr tak může ušetřit spoustu času a výdajů, jinak potřebných pro naplnění desetigeneračního protokolu přípravy kongenního kmene.

### **8.3. Produkce kongenů „nadvukovou“ rychlostí**

Rychlost šlechtění kongenů se dá také zvýšit pomocí metody superovulace, která spočívá v hormonální stimulaci třítýdenních nedospělých samic ke zvýšené ovulaci. Získaná vajíčka se oplodní *in vitro* a použijí se k embryonálnímu přenosu do těla jiné dospělé samičky. Od oplození vajíčka k porodu mláďate je třeba třech týdnů a pro postnatální vývoj dalších třech týdnů, kdy je opět možnost odebrat samicím vajíčka. Znamená to, že od oplození až do další generace zpětného křížení uplyne šest týdnů. Je-li podle klasického protokolu na vyšlechtění kongenního kmene potřeba minimálně deset zpětných křížení, pak by tento kmen mohl být

hotov již za něco málo přes rok (šedesát týdnů). V kombinaci s marker-asistovanou chovnou strategií by se potřebná doba zkrátila ještě více (Behringer, 1998).

## 9. Využití

### 9.1. Kongenní kmeny

Kongenní kmeny představují velice důležitý prostředek při zkoumání znaků, jejichž projev závisí na spletité interakci vícero genů. Tato metoda umožňuje specifickým šlechtěním odděleně zkoumat všechny úseky genomu, které společně utváří sledovaný znak a zbytek genetického pozadí organismu. Je tak možné nejen jednotlivé, předtím neznámé, geny identifikovat a mapovat, ale i podrobněji zkoumat jejich funkci (Rogner a Avner, 2004). Publikací, které zmiňují myší kongeny, je několik tisíc, a proto jich uvedu jen několik.

Jedním z nejlepších příkladů využití kongenních kmenů je částečné objasnění příčin IDDM (*insulin-dependent diabetes mellitus*), to je lidské autoimunitní onemocnění způsobující cukrovku. Speciální myší kmen NOD (*non-obese diabetic*) trpí podobnými poruchami jako způsobuje lidské IDDM. Vytvořením kongenů z tohoto kmene na genetickém pozadí resistantních inbredních kmenů umožnilo sledovat geny určující tento znak (Adorini et al., 2002).

Byly také konstruovány myší kongenní linie, u kterých se sledovala zvýšená citlivost na uspávací účinky ethanolu. Tento efekt je totiž také projevem komplexního působení několika genů (Benett a Johnson, 1998).

### 9.2. Rekombinantní kongenní kmeny

Odvozené myší rekombinantní kongenní kmeny jsou v některých experimentech vhodnější, například pomocí těchto kmenů byl sledován průběh a interakce genů tzv. diaobezity, to je obezity způsobené cukrovkou typu dva. (Reifsnyder, 2002).

Dalším příkladem může být použití rekombinantních kongenů při mapování tzv. TMG`s (*tumor modifying genes*). Nádorové bujení je nejvíce studovaný komplexní znak a na rezistenci nebo naopak náchylnosti k této nemoci mají významný vliv i TMG`s. Jsou to geny organismu, které mohou měnit projevy tohoto znaku a zdánlivě s ním nesouvisí. (Müllerová, 2004).

## 10. Závěr

Myší kongenní kmeny jsou jedním z velice důležitých nástrojů molekulární genetiky. První kongenních kmeny pomohly například objasnit, které geny jsou odpovědné za transplantační netoleranci. I dnes je klasický protokol přípravy kongenních kmenů neustále vylepšován a upravován, především co se týká časové i finanční náročnosti. Zároveň se ale vyvíjejí nové a specifitější metody šlechtění pro rozmanité potřeby experimentátorů.

Kongenní kmeny je samozřejmě možné připravovat i z jiných organismů, ať už se jedná o živočichy nebo rostliny. Jediným předpokladem je existence inbredního kmene u vybraného modelového organismu. Myš je vhodný organismus nejen proto, že u tohoto druhu existují stovky inbredních kmenů.



## **10. Použité zkratky**

MHC – major histocompatibility complex

HLA – human leukocyte antigen

QTL – quantitative trait loci

PCR – polymerase chain reaction

IDDM – insulin-dependent diabetes melitus

NOD – non-obese diabetic

TMG`s - tumor modifying genes

## **11. Klíčová slova**

Kongenní kmen, genotyp, fenotyp

## **12. Poděkování**

Děkuji mému školiteli bakalářské práce, Ing. Zdeňku Trachtulcovi, Dr. za obětavost a pomoc při shromažďování literárních pramenů a poskytování cenných rad při sepisování práce.

### 13. Seznam použité literatury

- Adorini, L., Gregori, S., Harrison, L., C., (2002) Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models, Trends in molecular medicine, vol 8: 31-38
- Armstrong, N., J., Brodnicki, T., C., Speed, T., P., (2006) Mind the gap: analysis of marker-assisted breeding strategies for inbred mouse strains, Mammalian genome, vol. 17: 273-287
- Behringer, R., Supersonic congenics?, (1998) Nature genetics, vol 18:108
- Bennett, B., Johnson, T., E., (1998) Development of congenics for hypnotik sensitivity to ethanol by QTL-marker-assisted counter selection, Mammalian genom, vol 9: 969-974
- Demant, P., Hart, A., A., (1986) Recombinant congenic strains-a new tool for analyzing genetic trakte determined by more than one gene, Immunogenetics, vol. 24: 416-422
- Klein, J., (2001) George Snell`s first forey into the unexplored territory of the major histocompatibility complex, Genetics vol 159: 435-439
- Knotek, Z., Chov a využití pokusných zvířat, Ediční středisko veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 1999
- Love, J., M., Knight, A., M., McAleer, M., A., Todd, J., A., (1990) Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites, Nucleic acid research, vol. 18: 4123-4130
- Markel, P., Shu P., Ebeling, Ch., Carlson, G., A., Nagle, D., L., Smutko, J., S., Moore, K., J., (1997) Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains, Nature Genetics vol 17: 280-284
- Müllerová, J., Hozák, P., (2004) Use of recombinant congenic strains in mapping disease-modifing genes, News physiol sci, vol 19: 105-109

- Nadeau, J., H., (2001) Modifier genes in mice and humans, Nature reviews, Genetics, vol. 2: 165-174
- Pangen, K., (2003) One hundred years of mouse genetics: an intellectual history, Genetics, vol. 163: 1-7
- Peters, L., L., Robledo, R., F., Bult, C., J., Churchill, G., A., Pangen, B., J., Svenson, K., L., (2007), The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis, Nature reviews, Genetics, vol. 8: 58-69
- Petrov, P.,M., Ding, Y., Cassell, M.,A., Zhang, W., Wagner, G., Sargent, E.,E., Asquith, S., Crew, V., Johnson, K.,A., Robinson., P., Scott., V.,E., Wales, M.,V., (2004) An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships, Geonome research, vol. 14: 1806-1811
- Reifsnyder, P., C., Liter, E., H., (2002) Deconstructing and reconconstructing obesity-induced diabetes (diabesity) in mice, Diabetes, vol 51: 825-832
- Rogner, U., C., Avner, P., (2004) Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders, Nature reviews, Immunology, vol 3: 243-252
- Silver, L.,M., Mouse genetics, concepts and applications, Oxford University press, 1995
- Staats, J., (1980) Standardized nomenclature for inbred strains of mice: seventh listing, Cancer research, vol. 40: 2083-2128
- Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., Longmate, J., (1997) Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking), Imunnology today, vol 18: 472-477.
- Waterston, R., H., (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genom, Nature, vol. 420: 520-562