

Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie
Oddělení vývojové biologie

bakalářská práce

Transgenní techniky založené na přenosu buněk

Transgenic techniques based on the cell transfer

Řešitel: Monika Šídová

Vedoucí: Ing. RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

Akademický rok: 2006 / 2007

Obsah:

Abstrakt	4
Abstract in english language	4
1. Úvod	5
1.1. Využití transgeneze	5
1.2. Techniky transgeneze	5
2. Spermiový přenos	7
2.1. Podstata a počátek genového přenosu pomocí spermií	7
2.2. Vazba spermií a exogenní DNA	7
2.2.1. Vazebné místo a molekuly	7
2.2.2. Inhibitor vazby	8
2.3. Zvyšování účinnosti spermiového přenosu	8
2.3.1. Monoklonální protilátky	8
2.3.2. ICSI	8
2.3.3. REMI	9
2.4. Využití spermiového přenosu při xenotransplantacích	9
3. Přenos primordiálních pohlavních buněk do varlat	10
3.1. Podstata přenosu primordiálních pohlavních buněk	10
3.2. Intratestikulární transfekce	10
3.3. In vitro kultura spermatogonií	11
3.4. Virová modifikace spermií	11
4. Přenos transgenních embryonálních kmenových buněk do blastocysty	12
4.1. Pluripotentní buňky	12
4.2. EC buňky	12
4.3. ES buňky	12
4.4. EG buňky	13

5. Přenos jádra transgenní somatické buňky do enukleovaného oocytu	15
5.1. Podstata jaderného přenosu a jeho počátky	15
5.2. Využívané donorové buňky	15
5.3. Kultivace a transfekce donorových buněk	16
5.3.1. Kultivace	16
5.3.2. Transfekce	16
5.4. Výhody NT a jeho limitující faktory	17
5.4.1. Výhody NT oproti klasické DNA mikroinjekci	17
5.4.2. Limitující faktory NT	18
5.5. Využití jaderného přenosu v medicíně	18
6. Závěr	20
7. Použité zkratky	21
8. Klíčová slova	21
9. Poděkování	22
10. Použitá literatura	22

Abstrakt

Transgenní techniky mají široké uplatnění jak v primárním výzkumu z hlediska studia funkcí genů, tak i v aplikovaném výzkumu z pohledu medicíny nebo zemědělství. Podle způsobu vnášení exogenní DNA lze rozdělit techniky transgeneze do tří základních oblastí: 1) metody spojené s mikroinjikací DNA do prvojádra oplozeného oocytu, 2) metody transgeneze založené na infekci virovými částicemi, 3) metody spojené s přenosem celých transgenních buněk do příjemcovského embrya či organismu. V této práci se budu zabývat třetí zmíněnou skupinou transgenních technik. Konkrétně zde rozeberu: a) spermiemi zprostředkovaný genový přenos, kdy dochází k vazbě spermie/exogenní DNA a následné fertilizaci oocytu, b) vnitrodruhový i mezidruhový přenos primordiálních pohlavních buněk do varlat sterilních samců, c) přenos transgenních embryonálních kmenových buněk do blastocysty a následný vznik chimér, d) přenos jádra transgenní somatické buňky do enukleovaného oocytu.

Abstract in english language

Transgenic techniques are widely used in primary research (in a view of gene functions) and in applied research (in a view of medicine and agriculture). One can divide these techniques to three groups on the basic of DNA delivery: 1) methods associated with DNA microinjection into pronuclei of fertilized oocyte, 2) transgenic methods based on the infections by viral particle, 3) methods linked with whole transgenic cells transfer into the recipient embryo or organism. In this work I deal with the third mentioned group of transgenic technique. Concretely I describe: a) sperm-mediated gene transfer, which is established on the interaction sperm/exogenous DNA and after that the sperm is used to eggs fertilization, b) intraspecies and interspecies primordial cells transfer into testis of infertile males, c) transgenic embryonic stem cells transfer into blastocysts and consequent formation of chimeras, d) transfer of transgenic somatic cells nuclei into enucleated oocyte.

1. Úvod

1.1. Využití transgeneze

Transgenní technologie se využívá hlavně v primárním výzkumu ke studiu funkcí genů (studium promotorových oblastí) a k rozeznání jednotlivých genů v komplexních sítích genové spolupráce. Studium genů je založené na knock-outu nebo knock-inu (Rathkolb et al., 2000). U knock-inu jde o vložení transgenů do genomu příjemce. U knock-outu jde o vyřazení řídicí (promotorové) nebo kódující sekvence pomocí homologní rekombinace, kdy dojde k výměně funkční kopie genu za konstrukt, který má gen přerušen známým markerem. Tím je tento gen vyřazen z funkce. Opakem je genová terapie, kde dochází homologní rekombinací k výměně nefunkčního genu za funkční.

Transgeneze se využívá i v aplikovaném výzkumu (medicína a zemědělství). V medicíně je uplatňována při studiu lidských onemocnění, k produkci biomedicínsky významných proteinů za pomoci tzv. živých bioreaktorů (lidský srážecí faktor IX produkovaný do mléka) (Garner and Colman, 1998) nebo k produkci orgánů a tkání pro transplantace (Platt, 1998). V zemědělství se studium zaměřuje na růstový výkon, tělní kompozice (Pursel, 1998), produkci mléka (Zuelke, 1998), reprodukci, rezistenci k nemocím nebo imunitní citlivost (Muller and Brem, 1998).

1.2. Techniky transgeneze

Techniky transgeneze lze rozdělit do tří základních oblastí:

1. Metody spojené s mikroinjikací DNA do prvojádra oplozeného oocyty,
2. Metody transgeneze založené na infekci virovými částicemi,
3. Metody spojené s přenosem celých transgenních buněk do příjemcovského embrya či organismu.

Metoda mikroinjekce DNA do prvojádra oplozeného oocyty je spojena s částečným narušením chromatidové struktury, které následně nastartuje reparační pochody. Ty posléze umožní integraci exogenní DNA do embryonálního genomu (Brem et al., 1985). Celková účinnost DNA mikroinjekce však klesá od myši (3%) po skot (1%) (Hodgens and Stice, 2003).

Metody spojené s infekcí virovými partikulami využívají retroviry, adenoviry aj. Jeanisch (1976) produkoval transgenní myši pomocí retrovirové infekce. Myši infikoval exogenním Moloney leukemia virem (M-MuLV), jehož DNA byla radioaktivně označena. Genom retroviru kóduje reversní transkriptázu, která přepisuje virový RNA intermediát do DNA. Takto vzniklá DNA byla pomocí integrázy začleněna do hostitelského genomu. Nevýhodou retrovirového přenosu je limitovaná délka sekvence, která může být přenesena ($\leq 10\text{kb}$) (Wolf et al., 2000).

V této práci se budu zabývat transgenními technikami, které jsou založeny na přenosu celých buněk.

- 1) Spermiový přenos.
- 2) Přenos transgenních primordiálních pohlavních buněk do varlat.
- 3) Přenos transgenních embryonálních kmenových buněk do blastocysty.
- 4) Přenos jádra transgenní somatické buňky do enukleovaného oocyty.

2. Spermiový přenos

2.1. Podstata a počátek genového přenosu pomocí spermií

Technika genového přenosu zprostředkovaného spermiemi využívá spermie jako vektory k přenosu cizí DNA do oocyty. Celá tato metoda spočívá v inkubaci spermií s exogenní DNA a s následnou fertilizací pomocí in vitro oplozením, intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI) či inseminace (AI). První, kteří demonstrovali skutečnost, že savčí spermie jsou schopny vázat exogenní DNA, byli Brackett et al. (1971). DNA viru SV40 označili pomocí radioaktivního [³H]-thymidinu. Potom tuto DNA inkubovali s králičími spermiemi. Ve 30-35% spermií byla v post-akrozomální oblasti nalezena radioaktivně označená exogenní DNA.

2.2. Vazba spermie a exogenní DNA

2.2.1. Vazebné místo a molekuly

Spermie mají přirozenou schopnost vázat exogenní DNA a tato vazba není náhodná. Jako preferenční oblast se ukázala post-akrozomální část hlavičky spermie (Atkinson et al., 1991). To, co reguluje vazbu DNA na spermii, je negativní náboj molekuly (Lavitrano et al., 1992). Z toho vyplývá, že na vazebné místo se může navázat i jiná podobně nabitá molekula, jako např. heparin nebo proteiny s isoelektrickým bodem nižším než 7. Vazba DNA ve spermii je reversibilní. DNA může být z vazebného místa vytlačena výše zmíněnými molekulami (Lavitrano et al., 1992). Francolini et al. (1993) provedli studii, která ukázala, že část navázané DNA se může integrovat do jádra spermie. Southern blot analýzy odhalily, že internalizovaná exogenní DNA je specificky štěpena endonukleázami, které se nacházejí ve spermii. Endonukleázy štěpí jak exogenní DNA, tak i jadernou DNA spermie a jejich aktivita je závislá na Ca²⁺ a roste s koncentrací přidané DNA (Maione et al., 1997). Vlastní integrace se odehrává na principu nehomologní rekombinace. Při tomto ději hraje důležitou roli topoisoméráza II. (Zaraqi and Spadafora, 1997).

Zani et al. (1995) identifikovali tři různé skupiny DNA vazebných proteinů DBPs (DBPs = DNA binding proteins), které jsou zodpovědné za interakci mezi DNA a hlavičkou spermie. DBPs jsou rozděleny do tří tříd na základě molekulové hmotnosti. I. třída: 50kDa, II. třída: 30-35kDa, III. třída: 20kDa, přičemž se nejvíce uplatňuje II. třída.

Lavitrano et al. (1997) posléze identifikovali další dvě molekuly účastnící se vazby DNA na spermii (CD4 a MHCII). Myší spermie s knock-outem pro MHCII ztratily schopnost vazby exogenní DNA. CD4 knock-out způsobil defekt v procesu integrace. Vazba na membránu spermie ovlivněna však nebyla.

2.2.2. Inhibitor vazby

Na interakci spermie /exogenní DNA se negativně podílí inhibitor IF-1 (inhibitory factor1), v jehož přítomnosti 30-35kDa DBPs (popsány výše) ztrácí svoji schopnost vázat exogenní DNA. IF-1 byl izolovaný se seminální plasmy, z čehož vyplývá, že ejakulované spermie musejí být nejdříve zbaveny této plasmy, aby mohly interagovat s exogenní DNA (Zani et al., 1995).

2.3. Zvyšování účinnosti spermiového přenosu

2.3.1. Monoklonální protilátky

Chang et al. (2002) se pokusili zvýšit účinnost spermiového přenosu pomocí monoklonální protilátky specifické proti povrchovému antigenu na membráně spermie. Tato protilátka byla konjugovaná s exogenní DNA a následně použita pro transgenní experimenty. U více než 30% došlo k narození transgenního zvířete. Transgen byl exprimován a přenášen na potomky. Zajímavé je, že ty samé protilátky rozpoznávaly tytéž antigeny u několika savců, zahrnujících i člověka a i nižší obratlovce.

2.3.2. ICSI

Perry et al. (1999) zvýšili účinnost spermiového přenosu spojením s technikou intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI). Použili neporušené myší spermie nebo spermie s narušenou membránou (narušení Tritonem X-100, zmražením a rozmražením), které vázaly exogenní DNA s vloženou GFP nebo β -galaktosidázovou kazetou. Neporušené spermie vázaly DNA s nižší účinností (26%) než spermie s narušenou membránou (82%). Takto ošetřené spermie byly následně použity pro oplození technikou ICSI. Výsledkem byla embrya (64% - 94%), která exprimovala exogenní DNA. Tento pokus mimo jiné i ukázal, že i mrtvé spermie (s narušenou membránou) jsou schopny dát vzniknout životaschopnému potomstvu.

U hospodářských zvířat je aplikace tohoto postupu omezena poměrně nízkou úspěšností ICSI metody. Z 699 ovčích oocytů, která byla oplodněna intracytoplazmatickou spermiovou injekcí, pouze 8,5% došlo do stádia blastocysty. Po jejich vnesení do náhradní matky se narodila jenom dvě mláďata (Gomez et al., 1998). Kim and Shim (2000) se podařilo výše uvedeným způsobem získat transgenní prasečí embrya.

2.3.3. REMI

REMI (restriction enzyme mediated integration) je technika založená na koinkubaci exogenní DNA s restriční endonukleázou a spermiovými jádry s dekonzenzovaným chromatinem. Kroll and Amaya (1996) mikroinjekcí takto upravených spermiových jader do oocytů *Xenopus Laevis* docílili vývoje embryí stabilně exprimujících vložený gen. Marsh – Armstrong et al. (1999) ve svém pokusu poukázali na rozdílnost potomků F₀ generace po použití REMI metody. Bylo to dáno restričními enzymy, které způsobily integraci exogenní DNA na různých místech.

Shemesh et al. (2000) stejnou techniku aplikovali u skotu. Spermie s vneseným GFP konstruktem použili pro IVF (in vitro fertilization). PCR i Southern blot analýsy výsledných morul potvrdily přenos GFP genu na potomky.

2.4. Využití spermiového přenosu při xenotransplantacích

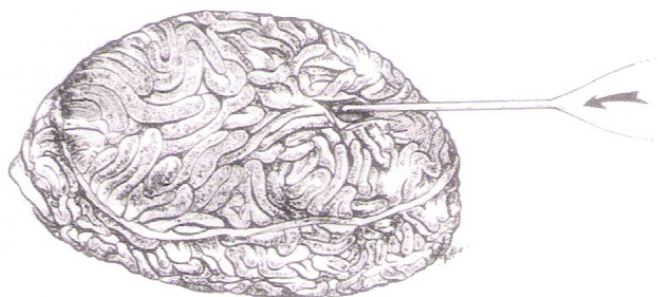
Spermie, jako vektory přenosu cizích genů, se dají využít i k tvorbě transgenních zvířat, která by se mohla použít pro xenotransplantace. Jako nejvhodnější se z tohoto pohledu jeví prasata. Jejich orgány mají podobnou velikost a uspořádání jako u člověka. Xenotransplantace obecně jsou spojeny s vysokým rizikem, tzv. hyperakutní rejekce orgánu (HAR). Lavitrano et al. (1999) pomocí techniky spermiového přenosu připravili prasata exprimující lidský hDAF (Human Decay Accelerating Factor). Jedná se o gen, který kóduje protein schopný zmírnit následky imunitní odpovědi při xenotransplantacích. Narodilo se 93 prasat. Z toho 53 neslo transgen. RNA hDAF byla detekovaná v srdci, plicích, játrech, slezině, svalů, varlatech, nadvarlatech, mízních uzlinách a aortě.

3. Přenos primordiálních pohlavních buněk do varlat

3.1. Podstata přenosu primordiálních pohlavních buněk

Další technikou, jak produkovat transgenní zvířata, je přenos transgenních primordiálních pohlavních buněk. Brinster and Zimmerman (1994) provedli studii, která se týkala transplantace spermatogoniální linie buněk (diploidní buňky) z varlete, které izolovali od donorového myšáka. Tyto buňky následně injekčně vpravili do semenotvorných kanálků varlat sterilního myšáka. Ukázalo se, že spermatogonie jsou schopné znovu osídlit varlata, prodělat morfologicky normální spermatogenezí a produkovat zralé spermie (spermatogenezise u myši trvá asi 35 dní).

Samec, který přijal spermatogonie od dárce, byl schopný produkovat zdravé a plodné potomky s genetickou výbavou odpovídající donoru (Brinster and Avarbock, 1994).



Obr.1) Injekce donorových buněk do semenotvorných kanálků příjemce.

Varlata sterilního recipientního myšáka se vyoperují a pomocí mikroinjekční pipety se do semenotvorných kanálků zavedou spermatogonie z varlat

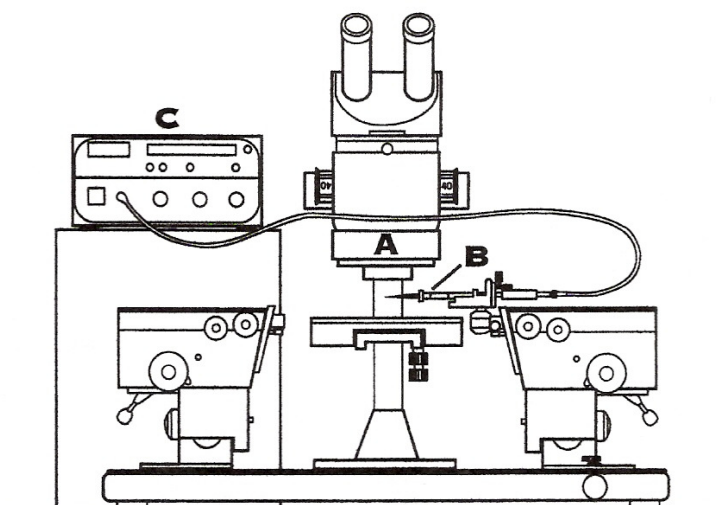
donorového myšáka. Vnější průměr mikropipety je 1mm a vnitřní průměr je 0,75mm.
(převzato od Brinster and Zimmermann, 1994)

3.2. Intratestikulární transfekce

Podobný pokus jako Brinster a Zimmermen provedli Kim et al. (1997). Samce myši a prasete vystavili působení alkylačního činidla busulfanu za účelem zničení vývoje pohlavních buněk. Poté byl do semenotvorných kanálků mikroinjekční jehlou vpraven komplex liposom/lacZ expresní vektor. U myši 8-14,8% semenotvorných kanálků exprimovalo zavedený lacZ gen a 7-13% spermií z nadvarlat obsahovalo cizí DNA (zjištěno pomocí PCR). U prasat se exogenní DNA včlenila do samčích zárodečných buněk s vyšší účinností - 15-25% semenotvorných kanálků obsahovalo pohlavní buňky exprimující lacZ gen.

3.3. In vitro kultura spermatogonií

In vitro kulturu spermatogoniální linie kmenových buněk se podařilo vytvořit Kanatsu-Shinoharovi et al. (2003). Tyto buňky odebrali od čerstvě narozených GFP exprimujících myší. Médium obsahovalo neurotrofický faktor, epidermální růstový faktor, fibroblastový růstový faktor a LIF (leukemia inhibitory factor). Spermatogonie pak byly použity k transplantaci do semenotvorných kanálků neplodných myšáků. Výsledkem bylo, že původně neplodní myšáci produkovali potomstvo, které exprimovalo GFP.



Obr. 2) Aparatura pro mikroinjekci varlat.

A) Mikroskop s pracovním stolkem. Myš v anestezii s vyoperovanými varlaty je položena na pracovním stolkem. Zvětšení přibližně 120x.

B) Držák na injekční mikropipetu.

C) Mikroinjektor. Mikropipeta je hadičkou spojena s mikroinjektorem, kterým lze aplikovat donorové spermatogonie do varlat sterilního myšáka.

Injekce mikropipetou je ještě kontrolována mikromanipulátorem, který je umístěn po stranách.

(převzato od Brinster and Zimmermann, 1994)

3.4. Virová modifikace spermií

Nagano et al. (2001) provedli studii, která ukazuje modifikaci spermií pomocí retrovirového vektoru. Retrovirový vektor, který obsahoval β -galaktosidázovou kasetu jako známý marker, byl použit k transfekci spermatogoniální linie buněk dospělého a nedospělého myšáka. Výsledkem *in vitro* přenosu byla stabilní integrace a exprese transgenu ve 2-20% kmenových buněk. Takto získané spermatogonie byly

transplantovány do varlat neplodného myšáka, u kterého způsobily, že přibližně 4,5% jeho potomků bylo transgenních. Všichni potomci byli plodní, s tím že transgen byl předáván do další generace.

4. Přenos transgenních embryonálních kmenových buněk do blastocysty

4.1. Pluripotentní buňky

Embryonální kmenové buňky jsou tzv. pluripotentní buňky, což znamená, že nejsou schopny dát vzniknout celému organismu, ale dokáží se vyvinout do mnoha buněčných typů zahrnujících i zárodečné buňky. Jejich schopnost homologní rekombinace je vyšší než u savčích somatických (tělních) buněk (Houdebine, 2002). Tento mechanismus slouží k cílenému knock-outu zkoumaného genu v genomu. Zasažené buňky se následně vyselektují a poté použijí k mikroinjekci do blastuly nebo moruly. Tímto postupem vznikne chiméra. Chimerismus může zasahovat až do pohlavních buněk. Důkazem toho jsou práce provedené u prasat (Wheeler, 1994) a u králíků (Schoonjans et al., 1996).

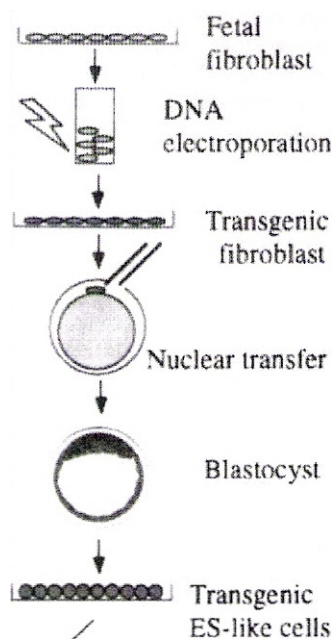
4.2. EC buňky

Prvním zdrojem pluripotentních buněk u myši byly EC buňky (embryonic carcinoma cells). Jsou to buňky izolované z teratokarcinomu (Martin and Evans, 1975), který je schopný se diferencovat buď *in vivo* nebo *in vitro* (Evans and Kaufman, 1981). *In vivo* diferenciaci zahrnuje zaočkování EC buňky do peritonea myši, jehož následkem se uvnitř začne vyvíjet nádor. Při *in vitro* diferenciaci se EC buňky ve vhodném médiu mohou rozlišit do mnoha buněčných typů. Díky této možnosti byly nástrojem ke studiu determinace a diferenciaci buněk v definovaném médiu (Martin and Evans, 1975).

4.3. ES buňky

Dalším zdrojem pluripotentních buněk jsou embryonální kmenové buňky (ES cells), které lze izolovat z vnitřní buněčné masy pozdní blastocysty (Martin, 1981). Cibelli et al. (1998 A) v experimentu použili ES-like buňky odvozené z bovinních plodových fibroblastů, který vystavili elektroporaci s DNA. Takto upravené

fibroblasty přenesli do enukleovaného oocytu. Vznikla blastocysta, ze které izolovali transgenní ES-like buňky. Tyto buňky pak mikroinjikovali do morul, které následně přenesli do náhradních matek. U šesti ze sedmi narozených telat byl prokázán chimérismus ve svalech, plicích, mozku a slezině. Výsledek je důkazem toho, že ES buňky mají potenciál přispět ke vzniku tkání ze všech tří zárodečných listů (ektoderm, mesoderm, entoderm).



Obr. 3) Produkce ES-like buněk z plodového fibroblastu.

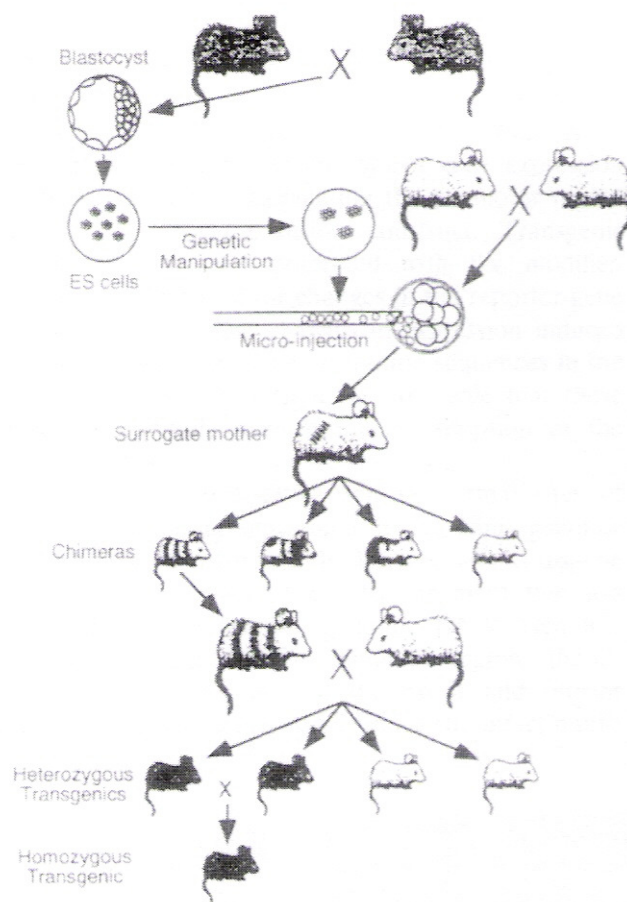
Bovinní plodové fibroblasty byly vystaveny DNA elektroporaci. Takto vzniklé transgenní fibroblasty byly pomocí NT přeneseny do enukleovaného oocytu. Tímto postupem vznikla transgenní blastocysta, ze které byly izolovány ES buňky, které byly použity k tvorbě chimér a k důkazu, že ES buňky mají potenciál přispět ke vzniku všech tří zárodečných listů.

(převzato od Cibelli et al., 1998)

Podobný pokus provedli i Bradly et al. (1984), kteří vytvořili kulturu ES buněk (ze samčího embrya). Po jejich mikroinjekci do blastocyst přes 50% narozených potomků tvořilo chiméry. U sedmi samců se prokázal funkční chimérismus i v zárodečné linii buněk.

4.4. EG buňky

Třetím zdrojem pluripotentních buněk jsou embryonální zárodečné buňky (EG cells), které jsou získávány z primordiálních zárodečných buněk (PG cells). Diferencují se *in vitro* i *in vivo* stejně jako ES buňky (Matsui et al., 1992).



Obr. 4) Vznik chimér a jejich křížení.

Z vnitřní buněčné masy blastocysty se izolují embryonální kmenové buňky (ES cells). Ty se mohou geneticky upravit a následně mikroinjekcí vpravit do recipientní blastocysty. Vytvořené zárodky se transplantují do náhradní matky. Mezi narozenými potomky jsou chiméry. Jejich křížením s divokým typem myši získáme v 50% heterozygoty. Křížením těchto heterozygotů navzájem získáme s 25% pravděpodobností recesivní homozygoty v daném znaku (F3 generace). (převzato od Brenin et al., 1997)

5. Přenos jádra transgenní somatické buňky do enukleovaného oocytu

5.1. Podstata jaderného přenosu a jeho počátky

Technika jaderného přenosu (nuclear transfer = NT) je založena na přenosu donorového jádra (karyoplastu) do enukleovaného (zbaveného jádra) oocytu v metafázi II. Pro splynutí recipientní a donorové buňky se využívá elektrofúze.

První jaderný přenos provedli Briggs a King roku 1952, kteří transplantovali jádra z blastuly a gastruly do enukleovaného žabího oocytu. V roce 1962 přivedl John Gurdon na svět prvního klonovaného obratlovce – *Xenopus Laevis*, pomocí přenosu jádra z embryonální buňky do enukleovaného oocytu (Tsunoda and Kato, 2002).

5.2. Využívané donorové buňky

Počáteční experimenty NT u hospodářských zvířat používaly donorová jádra blastomer, které byly ve stádiu 8 nebo 16 buněk (Willadsen, 1986). Později se ukázalo, že nejenom buňky embryonálního původu, ale i buňky odvozené z tkáně plodu nebo i dospělce (fibroblasty, prvotní pohlavní buňky, linie buněk mléčné žlázy, mléčné buňky, Sertoliho buňky, buňky kůže, jater aj.) se dají s různou účinností používat při NT. Wilmut et al. (1997) použil buňky z mléčné žlázy šestileté ovce, která byla v posledním trimestru gravidity. Výsledkem bylo narození ovce Dolly. Další studií, která potvrzovala možné využití plodových buněk při NT, provedli Cibelli et al. (1998 B) na skotu. Cibelli použil známým markerem značený fetální fibroblast, vytvořil jejich kulturu, a následně tyto buňky použil k elektrofúzi s bovinním oocytem. Z 28 embryí, která byla transplantována do náhradních matek, se narodila 3 zdravá telata.

NT používající různé donorové buňky byl studován u ovce (Wells et al., 1997), skotu (Kato et al., 1998), kozy (Baguisi et al., 1999), prasete (Betthausen et al., 2000) a myši (Wakayama et al., 1998). Wakayama jako první použil při jaderném přenosu pouze jádro (jádro z kumulativních buněk). V ostatních laboratořích se převážně používají celé donorové buňky, které se pomocí elektrofúze spojí s enukleovaným oocytem.

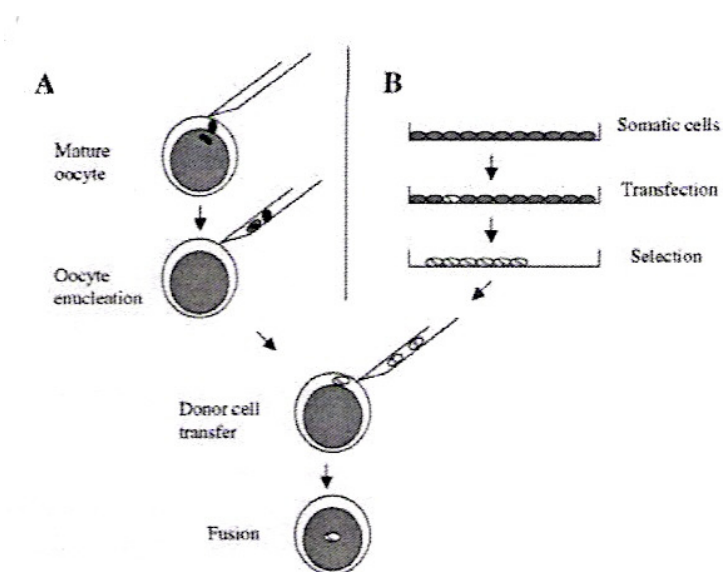
5.3. Kultivace a transfekce donorových buněk

5.3.1. Kultivace

Donorové buňky se pro zvýšení výnosnosti transgenních potomků ještě před jaderným přenosem kultivují. Při kultivaci dojde k indukci klidového stádia (G_0 fáze buněčného cyklu) s následnou remodelací chromatinu umožňující reprogramování jádra. Vývoj embrya je závislý na interakci mezi donorovým jádrem a cytoplasmou recipientního oocyty (Campbell et al., 1996).

5.3.2 Transfekce

Kultivace donorových buněk umožňuje tyto buňky ještě před NT transfekovat. Během transfekce dochází k umělému přenosu izolované části DNA (genového konstrukt), což poskytuje nový směr v produkci transgenních zvířat.



Obr. 5) NT somatické buňky

A) Zralý oocyt je zbaven svého jádra pomocí skleněné kapiláry.

B) Kultivované somatické buňky jsou transfektovány transgenem a je provedena selekce, aby došlo k izolaci klonované populace somatických buněk. Takto získaná buňka je přenesena pod zonu pellucidu enukleovaného oocyty.

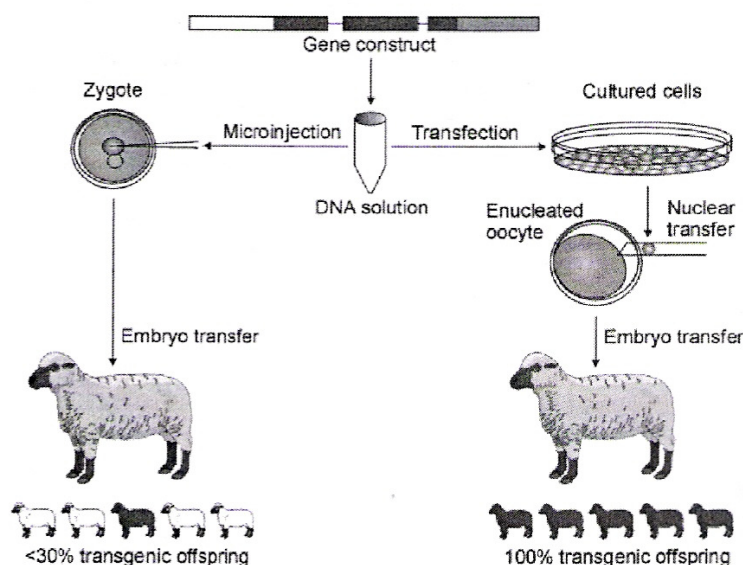
(převzato od Hodges a Stice, 2003)

Využití této metody umožnila produkci lidského srážecího faktoru IX v ovčím mléce (Schnieke et al., 1997). Ovčí plodové fibroblasty se v kultuře transfekovaly konstruktem kódujícím hFIX a následně se použily jako donorové buňky pro jaderný přenos do enukleovaného ovčího oocyty. Tento pokus zároveň poukázal na jednu z výhod NT oproti DNA mikroinjekci, protože bylo zapotřebí v průměru 20,8 ovcí na jednu hledanou, což je zhruba o polovinu méně, než kdyby se použila technika DNA mikroinjekce.

5.4. Výhody NT oproti klasické DNA mikroinjekci

5.4.1. Výhody NT oproti klasické DNA mikroinjekci

Jak bylo výše demonstrováno na studii Schnieke et al. (1997), transgeneze pomocí jaderného přenosu, která využívá transfekované buňky, přináší mnoho výhod oproti klasické DNA mikroinjekci: (a) mohou se použít jak samčí, tak i samičí buněčné linie, (b) začlenění a případnou expresi přenesené sekvence lze prozkoumat v kultuře ještě před použitím donorové buňky, (c) transfekované buňky mohou být do zásoby zmrazeny, (d) všechny buňky v klonovaném zvířeti obsahují zavedený gen, což vylučuje chimérismus a zajistí zárodečný přenos na další generace, (e) čas, náklady a počet zvířat jsou menší (Stice et al., 1998).



Obr. 6) Porovnání DNA mikroinjekce a NT s použitím transfekovaných donorových buněk
(převzato od Wolf et al., 2000)

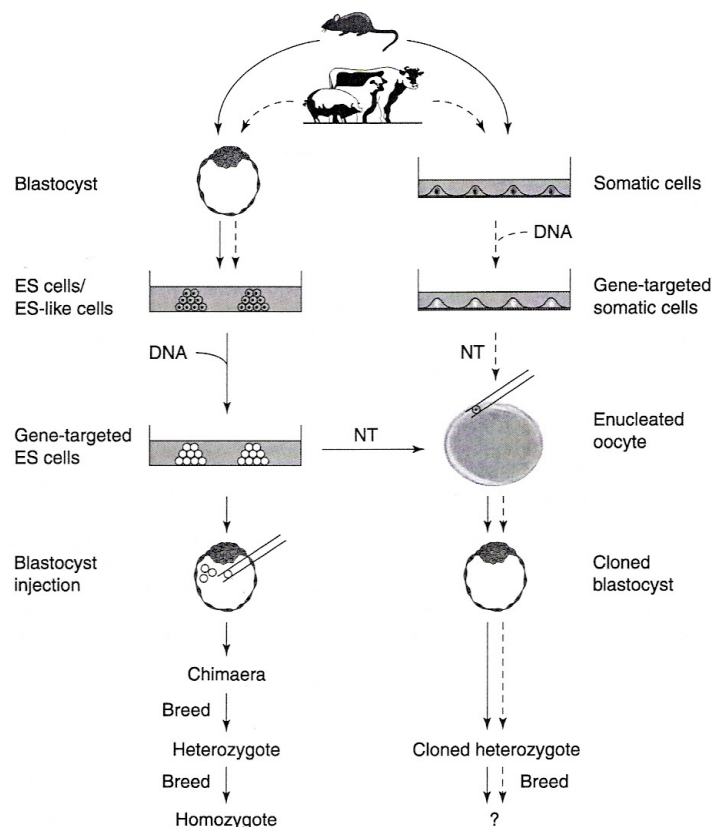
5.4.2. Limitující faktory NT

Limitující fakt jaderného přenosu je, že se donorová DNA začleňuje do genomu náhodně (DNA se může začlenit do místa, které nepovolí expresi transgenů), proto je důležitá selekce používaných donorových buněk (Suraokar and Bradley, 2000). Dalším faktorem je, že dochází ke spontánním abortům nebo k úmrtí transgenních potomků krátce po porodu.

5.5. Využití jaderného přenosu v medicíně

Jak bylo popsáno výše, transgeneze pomocí NT nabízí cílenou genetickou modifikaci u hospodářských druhů zvířat, které se využívají k produkci biomedicínsky významných proteinů. Příkladem je studie Schnieke et al. (1997) (viz kap. 5.3.2.) nebo McCreath et al. (2000). McCreath vytvořil transgenní ovci pomocí specifického genového vektoru z mléčné žlázy pro lidský α 1-antitrypsin (AAT). Tento gen byl cíleně vložen do ovčího plodového fibroblastu, konkrétně do α 1 (I)-prokolagenového lokusu (COL1A1), který byl vybrán hlavně z důvodu jeho velké exprese v tomto typu fibroblastu.

Dalším důležitým příkladem využití transfekovaných buněk pro NT je genetická modifikace prasat pro xenotransplantaci (viz kapitola 2.4.). Orgány od „normálních“ prasat jsou již během transplantace zničeny díky hyperakutnímu odmítnutí (HAR), které vyplývá z reakce protilátek v plazmě člověka s antigenem Gal α 1,3Gal na povrchu prasečích buněk. Inaktivací enzymu α 1,3galaktosyltransferáza (α 1,3 GT) se zruší exprese antigenu. Důkazem jsou knock-outované myši v genu pro α 1,3GT, které velmi redukovaně vázaly lidské protilátky (Wolf et al., 2000).



Obr. 7) Srovnání cest vedoucí k transgenímu zvířeti u myši (plná čára) a hospodářských zvířat (čárkovaná čára) .

Znázorněné cesty: a) levá (injekce do blastocysty), z blastocysty se odeberou buňky, geneticky se modifikují a mikroinjekcí se vpraví zpátky. Takto vznikne chiméra. Křížením chimér s divokým kmenem získáme z 50% heterozygoty. V následné F3 generaci lze očekávat s 25% pravděpodobností recesivně homozygotní jedince.

b) pravá (NT), kultivované somatické buňky jsou geneticky pozměněny a následně vpraveny do enukleovaného oocyty. Výsledkem je blastocysta, ze které se vyvine heterozygot.

Rozdíl spočívá v tom, že myší heterozygoti mohou vznikat cestou a) i b), kdežto heterozygoti hospodářských zvířat vzniknou pouze cestou NT, což je dáno tím, že zatím existují značné překážky v kultivaci ES buněk.

(převzato od Denning and Priddle, 2003)

6. Závěr

V této práci jsem se snažila alespoň z části popsat transgenní techniky založené na přenosu celých transgenních buněk do recipientního embrya či organismu a vystihnout jejich důležitost. Jak již bylo řečeno v úvodu, transgenní metody jsou používány jak v primárním výzkumu, tak i v medicíně a zemědělství. Z pohledu snížení HARu u xenotransplantací jsou důležité dvě studie. První provedli Lavitrano et al. (1999), kdy připravili pomocí metody genového přenosu zprostředkovaného spermii prasata exprimující lidský hDAF, který zmírňuje následky imunitní odpovědi. V druhé jaderným přenosem transfekovaných buněk s knock-outem pro enzym α 1,3 GT byla produkována prasata, která neexprimovala na povrchu orgánů antigen Gal α 1,3Gal a tím pádem nedocházelo k reakci s lidskými protilátkami. Celkově metoda NT transfekovaných buněk je významná z pohledu přípravy hospodářských zvířat produkujících biomedicínsky důležité proteiny (lidský srážecí faktor IX ...) v mléce. Používání transgenních embryonálních kmenových buněk je přínosné z hlediska studia funkcí genů. Je to dáno zvýšenou schopností homologní rekombinace ES buněk vedoucí k cílenému knock-outu vybraného genu.

Transgenní techniky jsou a nadále budou jedním z nejdůležitějších nástrojů lidského bádání vedoucího k lepšímu poznání a zkvalitnění života.

7. Použité zkratky:

AAT – α 1-antitrypsin

CD4 - cluster of differentiation 4 (povrchový antigen)

COL1A1 – α 1(I)-prokolagenový lokus

DBPs – DNA binding proteins (DNA vazebné proteiny)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EC – embryonic carcinoma cells

EG - embryonic germ cells

ES – embryonic stem cells

FGF – fibroblast growth factor

G₀ – G fáze buněčného cyklu (buňka neroste)

GFP – green fluorescent protein

HAR – hyperacute rejection (hyperakutní odmítnutí u xenotransplantací)

hDAF - Human Decay Accelerating Factor

hFIX – human coagulation faktor IX

ICSI – intracytoplasmic sperm injection

IF-1 - inhibitory factor 1

IVF - in vitro fertilization

kDa – kilo dalton (jednotka hmotnosti proteinů)

LIF - leukemia inhibitory factor

MHC II. – major histocompatibility complex class II.

M-MuLV – Moloney leukemia virus

NT – nuclear transfer

PCR – polymerase chain reaction

PG – primordial germ cells

REMI - Restriction Enzyme Mediated Integration

RNA – ribonukleová kyselina

8. Klíčová slova

transgenní techniky, spermie, spermatogonie, jaderný přenos, kmenové buňky, transfekce, chiméry.

Keywords

transgenic techniques, sperm cells, spermatogonia, nuclear transfer, stem cells, transfection, chimeras.

9. Poděkování:

Děkuji mému školiteli bakalářské práce Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, PhD. za obětavost a pomoc při shromažďování literárních pramenů a poskytování cenných rad při sepisování práce.

10. Použitá literatura:

- Atkinson, P. W., Hines, E. R., Beaton, S., Matthaei, K. I., Reed, K. C., Bradley, M. P., (1991) Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. *Molekular Reproduction and Development*, 29: 1-5.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W., Echelard, Y., (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, 17: 456-461.
- Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilerstein, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S., Bishop, M., (2000) Production of cloned pigs from in vitro systéme. *Nature Biotechnology*, 18: 1055-1059.
- Brackett, B. G., Baranska, W., Sawichi, W., Koprowski, H., (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. National Academy of Sciences USA*, 68: 353-357.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., Robertson, E., (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309: 255-256.
- Brem, G., Brenig, B., Goodman, H. M., Selden, R. C., Graf, F., Kruff, B., Springmann, K., Hondele, J., Meyer, J., Winnacker, E. L. and Krausslich, H., (1985) Produktion if transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*, 20: 251-252.

- Brenin, D. R., Talamonti, M. S., Iannaccone, P. M., (1997) Transgenic technology: an overview of approaches useful in surgical research. *Surgical Oncology*, 6: 99-110.
- Brinster, R. L. and Avarbock, M. R., (1994) Germ line transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. National Academy of Sciences USA*, 91: 11303-11307.
- Brinster, R. L. and Zimmermann, J. W., (1994) Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. National Academy of Sciences USA*, 91: 11298-11302.
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I., (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- Chang, K., Qian, J., Jiang, M., Liu, Y. H., Wu, M. C., Chen, C. D., Lai, C. K., Lo, H. L., Hsiao, C. T., Brown, L., Bolen, J., Huang, H. I., Ho, P. Y., Shih, P. Y., Yao, C. W., Lin, W. J., Chen, C. H., Wu, F. Y., Lin, Y. J., Xu, J., Wan, K., (2002) Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnology*, 19: 2-5.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, A., Robl, J. M., (1998 A) Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nature Biotechnology*, 16: 642-646.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, A., Robl, J. M., (1998 B) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblast. *Science*, 280: 1256-1258.
- Denning, Ch. and Priddle, H., (2003) New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction*, 126: 1-11.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H., (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryo. *Nature*, 292: 154-156.
- Francolini, M., Lavitrano, M., Lamia, C. L., French, D., Frati, L., Cotelli, F., Spadafora, C., (1993) Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Molecular Reproduction and Development*, 34: 133-139.
- Garner, I. and Colman, A., (1998) Therapeutic proteins from livestock. *Animal Breeding – Technology for the 21st Century*, 215-227.
- Gomez, M. C., Catt, J. W., Evans, G., Maxwell, W. M. C., (1998) Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 49: 1143-1154.

- Hodges, C. A., Stice, S. L., (2003) Generation of bovine transgenics using somatic cell nuclear transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:81
- Houdebine, L.-M., (2002) The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *Journal of Biotechnology*, 98: 145-160.
- Jeanisch, R., (1976) Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. National Academy of Sciences USA*, 73: 1260-1264.
- Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., Shinohara, T., (2003) Long-Term proliferation in culture and germ-line transmission of mouse male germ-line stem cells. *Biology of Reproduction*, 69: 612-616.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. & Tsonuda, Y., (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 2095-2098.
- Kim, J. H., Jung Ha, H. S., Lee, H. T., Chung, K. S., (1997) Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 46: 515-526.
- Kim, J. H. and Shim, H., (2000) Intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Embryo Transfer Newsletter*, 18: 10-13.
- Kroll, K. L. and Amaya, E., (1996) Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulations. *Development*, 122: 3173-3183.
- Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., Spadafora, C., (1992) The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Molekular Reproduction and Development*, 31: 161-169.
- Lavitrano, M., Maione, B., Forte, E., Francolini, M., Sperandio, S., Testi, R., Spadafora, C., (1997) The interaction of sperm cells with exogenous DNA – a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Experimental Cell Research*, 233: 56-62.
- Lavitrano, M., Stoppacciaro, A., Bacci, M. L., Forni, M., Fioretti, D., Pucci, L., Di Stefano, C., Lazzereschi, D., Rughetti, A., Ceretta, S., Zannoni, A., Rahimi, H., Moioli, B., Rossi, M., Nuti, M., Rossi, G., Seren, E., Alfani, D., Cortesini, R., Frati, L., (1999) Human Decay Accelerating Factor Transgenic Pigs for Xenotransplantation Obtained by Sperm-Mediated Gene Transfer. *Transplantation Proceedings*, 31: 972-974.
- Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R., Spadafora, C., (1997) Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biology*, 16: 1087-1097.

- Marsh-Armstrong, N., Huang, H., Berry, D. L., Brown, D. D., (1999) Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. Proc. National Academy of Sciences USA, 96: 14389-14393.
- Martin, G. R., (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. National Academy of Sciences USA, 78: 7634-7638.
- Martin, G. R., Evans, M. J., (1975) Differentiation of Clonal Lines of Teratocarcinomas Cells-Formation of Embryoid Bodies In Vitro. Proc. National Academy of Sciences USA, 72: 1441-1445.
- Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B. L., (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell, 70:841-847.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H. S., Colman, A., Schnieke, A. E. and Kind, A. J., (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature, 405: 1066-1069.
- Muller, M. and Brem, G., (1998) Transgenic approaches to the increase of disease resistance in farm snímal. Revue Scientifique et technique,17: 365-378.
- Nagano, M., Brinster, C. J., Orwig, K. E., Ryu, B.-Y., Avarbock, M., Brinster, R., (2001), Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. Proc. National Academy of Sciences USA, 98: 13090-13095.
- Perry, A. C. F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R., (1999) Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. Science, 284: 1180-1183.
- Platt, J. L., (1998) New directions for organ transplantation. Nature, 392: 11-17.
- Pursel, V., (1998) Modification of production trakte. Animal Breeding – Technology for the 21st Century, 183-200.
- Rathkolb, B., Fuchs, E., Kolb, H. J., Renner-Muller, I., Krebs, O., Balling, R., Hrabe de Angelis, M., Wolf, E., (2000), Large-scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of mice-from phenotypes to genes (review). Experimental Physiology, 85: 635-644.
- Shemesh, M., Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Benvenisti, L., Shore, L. Sl., Stram, Y., (2000) Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. Molekular Reproduction and Development, 53: 306- 308.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., Campbell, K. H. S., (1997) Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblast. Science, 278: 2130-2133.

- Schoonjans, L., Albright, G. M., Li, J. L., Collen, D., Moreadith, R. W., (1996) Pluripotential rabbit embryonic stem cells (ES) are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, 45: 439-443.
- Stice, S. L., Robl, J. M., Ponce de Leon, F. A., Jerry, J., Golueke, P. G., Cibelli, J. B., Kane, J. J., (1998) Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 49: 129-138.
- Suraokar, M. and Bradley, A., (2000) Targeting sheep. *Nature*, 405: 1004-1006.
- Tsunoda, Y. and Kato, Y., (2002) Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation*, 69: 158-161.
- Wakayama, T., Perry, A. C. F., Zuccotti, M., Johnson, K. R., Yanagimachi, R., (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374.
- Wells, D. N., Misica, P. M., Day, T. A. and Tervit, H. R., (1997) Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biology of Reproduction*, 57: 385-393.
- Wheeler, M. B., (1994) Development and validation of swine embryonic stem cells (review). *Reproduction, Fertility and Development*, 6: 563-568.
- Willandsen, S. M., (1986) Nuclear transplantation in sheep embryo. *Nature*, 320: 63-65.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S., (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813.
- Wolf, E., Scherthaner, W., Zakhartchenko, V., Prella, K., Stojkovic, M., Brem, G., (2000) Transgenic technology in farm animals – progress and perspectives (review). *Experimental Physiology*, 85: 615-625.
- Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S., Spadafora, C., (1995) The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Experimental Cell Research*, 217: 57-64.
- Zoraqi, G. and Spadafora, C., (1997) Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA Cell Biology*, 16: 291-300.
- Zuelke, K. A., (1998) Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reproduction, Fertility and Development*, 10: 671-676.