

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
Katedra fyziológie živočíchov

Aneuploidia transgénnych králikov
Aneuploidy in transgenic rabbits

Autoreferát dizertačnej práce
na udelenie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
v študijnom programe doktorandského štúdia biotechnológie v štúdijskom odbore 5. 2. 25
Biotechnológie

Ing. Jozef Čurlej

Nitra, 2009

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre fyziológie živočíchov Fakulty Biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Jozef Čurlej
Katedra fyziológie živočíchov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: doc. Ing. Peter Chrenok, DrSc.
Ústav genetiky a reprodukcie HZ, CVŽV Nitra- Lužianky

Oponenti: doc. Ing. Jozef Trandžík, PhD.
Katedra zoológie a antropológie, Fakulta prírodných vied
Univerzita Konštantína filozofa v Nitre

prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Katedra genetiky a plemenárskej biológie, Fakulta agrobiológie a
potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

prof. Ing. Ján Grolmus, CSc.
Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského
Univerzita Komenského v Bratislave

Autoreferát bol rozoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra fyziológie živočíchov FBP SPU v Nitre.

Obhajoba doktorandskej práce sa koná dňa oh. pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác doktorandského študijného programu **biotechnológie** v študijnom odbore 5. 2. 25 Biotechnológie na Fakulte biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre.

Miesto konania: Miestnosť:
Katedra fyziológie živočíchov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva SPU v Nitre.

.....
prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.
predseda komisie

ABSTRAKT

Cytogenetické analýzy transgénnych zvierat sú nápomocnými pri eliminácii geneticky podmienených ochorení u týchto jedincov a ich potomstva. Za cieľový zdroj buniek pre analýzy sme zvolili lymfocyty kostnej drene a periférnej krvi. Zistená priemerná hodnota aneuploidie pri detekcii z lymfocytov kostnej drene u transgénnych králikov bola 65,5% v porovnaní s netransgénymi králikmi (56,3%). Signifikantné rozdiely ($p < 0,05$) boli zistené v zastúpení chromozomálne korektných (diploidných) buniek medzi transgénymi (24%) a netransgénymi jedincami (36,8%) línie II pri detekcii z kostnej drene. Pri analýzach chromozómov z lymfocytov periférnej krvi, sme nezaznamenali signifikantné rozdiely v zastúpení aneuploidných buniek medzi transgénymi (37,78%) a netransgénymi jedincami (37,22%). Podobné výsledky sme zaznamenali v skupine diploidných buniek s 57,78% u transgénnych a 59,44% u netransgénnych králikov.

Pri detekcii zastúpenia aneuploidných metafáz u oocytov a preimplantačných embryí králika, sme dosiahli 100%, 86,1% a 92,2% podiel blastomér úspešne blokových v štádiu metafázy pre 2-, 4- a 8- bunkové embryá pri použití cytostatika kolcemid (Gibco BRL, USA) o výslednej koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$. Pri štatistickom porovnávaní celkovej aneuploidie χ^2 -testom medzi oocytmi a jednotlivými embryonálnymi štádiami, sme zistili preukazný rozdiel ($p < 0,01$) v skupine oocytov a 2- bunkových embryí 40,7% vs. 62,5%.

FISH- TSA analýzy pri lymfocytoch z periférnej krvi králikov, zamerané na mapovanie hFVIII transgénu na králičích chromozómoch, viedli k označeniu chromozómov 3p, 7p, 8q, 9p a 18q pri F2 samcovi. Jedinec 24s vykázal signál na chromozóme 3 v pozícii p ramien. U králika 35s z F3 generácie boli identifikované dva cieľové chromozómy 3p a 7p.

Na základe výsledkov možno konštatovať, že transgénne králiky vykazujú vyššiu frekvenciu zastúpenia aneuploidných buniek v porovnaní s netransgénymi jedincami. Zastúpenie aneuploidných buniek je vyššie pri detekcii aneuploidie z kostnej drene v porovnaní s periférnou krvou. Lokalizácia ľudského faktora VIII na chromozómoch králikov F2 a F3 generácie poukázala na vertikálne prerozdelenie jednotlivých lokusov. FISH-TSA analýza uskutočnená s próbou pre vlastný králičí FVIII gén odhalila terminálnu pozíciu na q ramenách chromozómu X.

Kľúčové slová: Králik, transgenéza, hFVIII, chromozómy, lymfocyty, oocyty, embryá, aneuploidia, FISH

ABSTRACT

Cytogenetical analyses of transgenic animals are helpful in the process of elimination of genetically related diseases in transgenic individuals and their offspring. In our experiments, focused on the aneuploidy detection, we chose lymphocytes, as a target cells isolated from the bone marrow and peripheral blood. Average aneuploidy level detected from bone marrow lymphocytes was at 65,5% occurrence in transgenic rabbits vs. 56,3% in non-transgenic ones. In the group of diploid bone marrow lymphocytes we have found a significant difference ($p < 0,05$) between transgenic (24%) and non-transgenic rabbits (36,8%) of line II. Chromosomal analyses from peripheral blood lymphocytes point out similar aneuploidy occurrence in transgenic (37,78%) and non-transgenic rabbits (37,22%). Moreover, diploid cells were found at similar proportions in transgenic (57,78%) and non-transgenic individuals (59,44%).

In the experiment part focused on aneuploidy detection from rabbit preimplantation embryos, we have recorded 100%, 86,1% and 92,2% success in the cell synchronization up to metaphase stage in case of 2-, 4- and 8-cell embryos using colcemid (Gibco BRL, USA) addition at 1 $\mu\text{g/ml}$ concentration. Statistical analyses performed by χ^2 - test between oocytes and preimplantation embryos, revealed significant difference ($p < 0,01$) in aneuploidy rate between oocytes (40,7%) and 2- cell embryos (62,5%).

FISH- TSA analyses from peripheral blood lymphocytes of transgenic rabbits, focused on localization of hFVIII transgene on rabbit chromosomes, identified 3p, 7p, 8q, 9p and 18q chromosomes of F2 male. Transgenic rabbit 24s remitted on 3p chromosome signal, rabbit 35s from F3 transgenic generation revealed signal on 3p and 7p chromosomes.

According to our results we can state, that transgenic rabbits exhibit higher aneuploidy level compared to non-transgenic ones. Higher level of aneuploid cells was recorded in case of bone marrow lymphocytes, compared to peripheral blood lymphocytes. Chromosomal localization of the human *FVIII* transgene in rabbits of F2 and F3 generation clearly showed the vertical separation of individual loci. FISH-TSA analysis provided by orthologous rabbit FVIII gene, revealed terminal position on q arms of X chromosome.

Key words: Rabbit, transgenesis, hFVIII, chromosomes, lymphocytes, oocytes, embryos, aneuploidy, FISH

POUŽITÉ OZNAČENIE

| Použitá skratka | Vysvetlivka |
|---|--|
| cDNA | - komplementárna DNA |
| DAPI | - 4',6-diamidino-2-phenylindole, fluorescenčné značenie DNA |
| FISH (fluorescent <i>in situ</i> hybridization) | - fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia |
| hFVIII (human faktor VIII) | - ľudský faktor VIII |
| mWAP (murine whey acid promotor) | - myší kyslý srvátkový proteín |
| PGD | - preimplantačné genetické diagnózy |
| p/q | - krátke/dlhé rameno chromozómu |
| RT-PCR | - real time PCR |
| TCM 199 (tissue culture medium199) | - 199 médium pre kultiváciu tkanív |
| TSA (tyramide signal amplification) | - tyramídová signálová amplifikácia |

OBSAH

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY | 9 |
| 2.1 | Produkcia transgénnych zvierat | 9 |
| 2.1.1 | Transgénne králiky..... | 9 |
| 2.1.1.1 | <i>Králik ako biologický model</i> | 9 |
| 2.1.1.2 | <i>Transgénne králiky s integrovaným hFVIII génom</i> | 9 |
| 2.2 | Chromozómy | 10 |
| 2.2.1 | Zmeny na úrovni chromozómov- chromozomálne aberácie..... | 10 |
| 2.2.1.1 | <i>Štrukturálne zmeny chromozómov</i> | 10 |
| 2.2.1.2 | <i>Numerické zmeny chromozómov</i> | 11 |
| 2.2.2 | Analýzy oocytov a embryí | 12 |
| 2.2.2.1 | <i>Preimplantačné genetické diagnózy (PGD)</i> | 12 |
| 3 | CIEĽ PRÁCE | 13 |
| 4 | MATERIÁL A METÓDY | 14 |
| 4.1 | Materiál | 14 |
| 4.2 | Metódy | 14 |
| 4.2.1 | Transgenéza- mikroinjekcia cudzej DNA..... | 14 |
| 4.2.2 | Hodnotenie chromozomálnej aneuploidie..... | 14 |
| 4.2.2.1 | <i>Kultivácia lymfocytov kostnej drene králika</i> | 14 |
| 4.2.2.2 | <i>Chromozómy z kultúry lymfocytov periférnej krvi</i> | 15 |
| 4.2.2.3 | <i>Cytogenetická metodika- Oocyty, Embryá</i> | 16 |
| 4.2.3 | Detekcia integrácie hFVIII transgénu prostredníctvom FISH z lymfocytov periférnej krvi králika..... | 18 |
| 4.2.4 | Štatistika..... | 19 |
| 5 | VÝSLEDKY | 20 |
| 5.1 | Detekcia aneuploidie z lymfocytov kostnej drene transgénnych králikov | 20 |
| 5.2 | Detekcia aneuploidie z lymfocytov periférnej krvi transgénnych králikov | 20 |
| 5.3 | Detekcia aneuploidie- oocyty a embryá | 21 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.4 | Detekcia integrácie hFVIII transgénu prostredníctvom FISH z lymfocytov perifernej krvi králika..... | 21 |
| 5.5 | Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy..... | 22 |
| 6 | ZÁVER..... | 24 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATÚRA..... | 25 |
| 8 | ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU..... | 27 |

1 ÚVOD

V súčasnom období zaznamenávame intenzívny rozvoj biologických vied zameraných na kontrolu a modifikácie biologických procesov. Genetické technológie umožňujú indukovať zmeny a využívať vlastnosti organizmov v prospech ľudstva, ktorých podstatou je zásah do genetickej výbavy organizmov.

Biotechnológie ako multidisciplinárne technológie využívajú poznatky molekulárnej a bunkovej biológie, genetiky a génového inžinierstva, biochémie a ďalších disciplín umožňujú produkciu geneticky modifikovaných organizmov. Cieľavedomá zmena genómu hospodárskych zvierat metódami transgenézy a vytvorenie geneticky modifikovaných organizmov umožňuje realizovať nielen tvorbu špecifických genotypov, ale aj zabezpečiť produkciu nových biologicky aktívnych látok.

Práve za najvhodnejšie modelové organizmy sa považujú hospodárske zvieratá, ako napríklad hovädzí dobytok, ošípané, kozy, ovce a králiky. Ich prednosťou je vysoká schopnosť produkcie dostatočného množstva žiadaných účinných látok, krátky interval na získanie novej transgéennej generácie, vysoká stabilita expresie a relatívne nízke náklady.

Novým trendom v oblasti biotechnológií živočíchov sa stávajú kmeňové bunky, ktoré sú schopné delenia a diferenciácie na bunky rôznych tkanív celého organizmu, čo znamená, že kmeňové bunky by mohli nahradiť odumierajúce bunky rôznych orgánov a vyliečiť mnohé degeneratívne ochorenia cez genetickú modifikáciu. Náhodná integrácia génových konštruktov môže mať za následok narušenie funkcie regulácie endogénnych génov, v dôsledku čoho vznikajú inzertné mutácie, respektíve aneuploidia chromozómov. Aneuploidia môže mať letálny účinok, alebo môže viesť k nárastu genetickej poruchy. Niektoré chromozomálne abnormality nevedú k vzniku ochorenia u nositeľov, ako napríklad translokácie alebo inverzie, hoci môžu viesť k zvýšenej pravdepodobnosti potomstva s chromozomálnou poruchou. Transgéenne králiky sa stali vhodným živočíšnym modelom pre štúdium mechanizmov ľudských ochorení ako napríklad ateroskleróza, Parkinsonová choroba, skleróza multiplex, hemofília a iné. Poskytujú alternatívny model pre produkciu terapeutických proteínov v mlieku a sú vhodným modelovým organizmom pre štúdium genómu, génovej expresie a regulácie. Cytogenetické analýzy transgéenných zvierat môžu byť nápomocnými pri eliminácii geneticky podmienených ochorení u potomkov.

2 PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Produkcia transgénnych zvierat

2.1.1 Transgénne králiky

2.1.1.1 Králik ako biologický model

Králik (*Oryctolagus cuniculus*) je fylogeneticky zaradovaný skôr k primátom ako k hlodavcom (Grau et al., 1996). Transgénny králik je zaujímavý aj z hľadiska jeho využitia ako prechodný biologický model medzi malými laboratórnymi cicavcami a veľkými hospodárskymi zvieratami. Je najmenším domestikovaným zvieratom, ktoré môže byť použité na produkciu rekombinantných proteínov. Králik patrí z hľadiska reprodukčných vlastností medzi najvhodnejší biologický model (Chrenek, 2002) pre účely mikromanipulácie s embryami.

Transgénne králiky sú vhodným modelovým organizmom pre štúdium genómu, génovej integrácie, expresie, regulácie a produkcie rekombinantných proteínov v mliečnej žľaze (Stromqvist et al., 1997). Transgénne králiky exprimujúce ľudské gény sú používané ako model pre kardiovaskulárne ochorenia, AIDS a výskum rakoviny. Sú nezastúpiteľným modelovým organizmom v štúdiu humánnych ochorení a predstavujú alternatívu v produkcii terapeutických proteínov pre liečbu ľudských chorôb. Rekombinantné proteíny môžu byť produkované v mlieku transgénnych králikov v pomerne širokej škále. Mikroinjekcia je v súčasnosti najčastejšie používanou metódou tvorby transgénnych králikov, pokrok v klonovaní zvierat otvára nové možnosti v produkcii transgénnych králikov, transfér jadier somatických buniek sa stáva trendom budúcnosti (Fan a Watanabe, 2003).

2.1.1.2 Transgénne králiky s integrovaným hFVIII génom

Súčasťou našich experimentov bola chromozomálna analýza transgénnych králikov vytvorených podľa Chrenek et al. (2005) s integrovaným ľudským génom hFVIII. Význam produkcie týchto jedincov spočíva v poznaní mechanizmu integrácie tohto ľudského génu v genóme transgenézou vyprodukovaného jedinca, následne jeho vertikálny prenos do ďalších

generácii a v neposlednom rade produkcia ľudského faktora VIII v mliečnej žľaze kráľika. Izoláciou z mlieka transgénnych zvierat je možné využiť tento faktor ako terapeutikum v liečbe ochorenia Hemofília typu A u ľudí.

2.2 Chromozómy

Chromozómy sú najvýznamnejšie jadrové komponenty, ktoré obsahujú genetickú informáciu bunky a odovzdávajú ju nasledujúcej generácii buniek (Jakolev, 1976). Zohrávajú dôležitú úlohu pri zabezpečovaní presného rozdelenia genetického materiálu do dcérskych buniek počas meiotického a mitotického delenia materských buniek.

Cytogenetika predstavuje biologicko- medicínsky subjekt študujúci cytologicko-dedičné faktory. Zaoberá sa mikroskopickou štruktúrou chromozómov vo vzťahu ku genotypu respektíve fenotypu jedinca. Štúdium metafáznych chromozómov umožňuje poznanie ich štruktúry, na základe karyotypu bunky je ďalej možné zistiť odchýlky na chromozomálnej úrovni. Cytogenetika môže byť takto nápomocná v procese šľachtenia zvierat, ako jeden zo selekčných faktorov, na základe numerických a štrukturálnych chromozomálnych aberácií. Ideálne bunky pre analýzy chromozómov musia spĺňať požiadavky rýchleho rastu a rýchleho delenia sa. Nositeľmi týchto vlastností sú aj lymfocyty získané z kostnej drene alebo z periférnej krvi (Moorhead et al., 1960).

2.2.1 Zmeny na úrovni chromozómov- chromozomálne aberácie

Za chromozomálne aberácie sa v širšom slova zmysle považujú všetky odchýlky chromozómov štrukturálneho a numerického charakteru zistené bežnými cytogenetickými metódami. Ich vznik je dôsledkom mutačných procesov na chromozomálnej úrovni. Vo všetkých populáciách sa vyskytujú štrukturálne alebo numerické varianty štandardného karyotypu (Parkányi et al., 2006).

2.2.1.1 Štrukturálne zmeny chromozómov

Štrukturálne zmeny vznikajú v dôsledku chromozómových zlomov a sú sprevádzané vznikom abnormálnych chromozomálnych kombinácií. Medzi štrukturálne chromozomálne zmeny radíme: inverzie, duplikácie a translokácie. Za účelom identifikácie štrukturálnych

zmien u chromozómov boli vytvorené tzv. prúžkovacie metódy: Q- metóda farbenia, C- metóda farbenia, G- metóda farbenia, R- metóda farbenia.

2.2.1.2 Numerické zmeny chromozómov

Numerické zmeny chromozómov sú zapríčinené stratou respektíve nadbytkom celého chromozómu alebo chromozómov. Môžu sa vyskytovať u autozómov aj u pohlavných chromozómov. Všeobecne strata chromozómu má väčší vplyv na jedinca ako nadbytočný chromozóm, hoci aj ten môže zapríčiniť viaceré zmeny. Numerické chromozomálne abnormality vyvolávajú chyby v procese implantácie embrya. Ich hlavnou príčinou býva nondisjunkcia počas gametogenézy. Vo všeobecnosti existujú dva typy numerických zmien na chromozomálnej úrovni a to *polyploidia* a *aneuploidia*. Polyploidné bunky sú tie, u ktorých je počet chromozómov celým násobkom základného respektíve haploidného počtu (n). Strata chromozómu bunky sa označuje ako *monozómia* pre daný chromozóm, kým chromozóm navyše sa označuje ako *trizómia* pre daný chromozóm.

Aneuploidná varianta

Predstavuje zmenu v počte chromozómov v chromozomálnych sádach (Weaver a Hedrick, 1995). Hlavnou príčinou je non-disjunkcia počas mitotického resp. meiotického delenia, kedy dochádza k nerovnomernému rozdeleniu páru chromozómov do dcérskych buniek. Kým jedna dcérska bunka obsahuje obidva chromozómy, druhá neobsahuje ani jeden (Bond a Chandley, 1983). Non-disjunkcia je bežná v meióze I. Zriedkavo sa môže vyskytnúť aj v meióze II. Ak sa vyskytne počas meiotického delenia, všetky bunky, ktoré sa z príslušnej zygoty s aneuploidným počtom chromozómov vyvinú budú aneuploidné. Ak nastáva počas mitotického delenia, postihnutá je iba časť somatických buniek (Parkányi et al., 2004). K nondisjunkcii môže dôjsť v procese fertilizácie, čím dochádza k formovaniu embrya mozaiky u ktorého môžu byť súčasne prítomné chromozomálne korektné, monosomické a trizomické blastoméry. Aneuploidia je častou príčinou vzniku rôznych ochorení, sterility, vedie k tvorbe nádorov respektíve až k úhynu jedinca. Aneuploidné počty blízke diploidnému počtu chromozómov ako napríklad peridiploidia možno označiť za *hyperdiploidné*. Na druhej strane, chromozomálne sady s počtom chromozómov zníženým oproti diploidnému počtu sa označujú ako *hypodiploidné*. Strata genetickej informácie v dôsledku monozómie je menej tolerovaná ako nadbytok genetickej informácie v dôsledku trizómie. Zmeny v karyotype

druhov, ktoré vyvolávajú zmeny v počte chromozómov sú teda označované ako aneuploidie respektíve polyploidie.

Dôsledky vzniku numerických chromozomálnych porúch

Celkove, aneuploidia má za následok vznik vývojových abnormalít a znižuje vitalitu organizmu. Niektoré chromozomálne chyby nevytvárajú zásadné zmeny v genóme, avšak vyvolávajú nepravidelnosti v procese meiózy. Fenotypový efekt chromozomálnej zmeny závisí od času, kedy došlo jej k vzniku. Na základe pozorovania stupňa mozaicizmu u tkanív získaných z troch embryonálnych zárodočných vrstiev je možné stanoviť, v ktorom štádiu vývoja došlo k vzniku danej aberácie (Torres et al., 2007). Beatty (1957) poukázal na to, že iba časť buniek vnútrobunkovej masy embrya sa podieľa na formovaní plodu. Mnohé formujú embryonálne membrány a placentu. Na základe tohto poznania, aberantné bunkové línie sa môžu normálne vyvíjať, pričom nemajú rozhodujúcu úlohu na embryonálny vývin. Hoci chromozomálne aberácie sa objavujú príležitostne a spontánne, môžu byť v populácii v určitom čase a mieste inkorporované do genómu a to buď ako prenosný respektíve stabilný polymorfizmus. Väčšina z nich nie je prospešná a býva eliminovaná. Niektoré nepriaznivo pôsobiace zmeny majú za následok zníženú fertilitu jedinca, vyvolávajú embryonálnu smrť respektíve potrat. Iné zapríčiňujú nepatrné modifikácie v procese ontogenézy, čím zvyšujú riziko predčasného úhynu plodu.

2.2.2 Analýzy oocytov a embryí

2.2.2.1 Preimplantačné genetické diagnózy (PGD)

Preimplantačné genetické diagnózy prinášajú dôležité informácie o chromozomálnej stavbe embrya. Zavedenie PGD metód v procese asistovanej reprodukcie umožňuje včasné odhalenie rizika výskytu geneticky podmienených ochorení, ešte pred samotným prenosom embrya do recipientky. Adaptácia týchto metód sa významne podieľa na znižovaní rizika výskytu a následného vývinu embryí s aneuploidným počtom chromozómov. Preimplantačné genetické diagnózy a ďalšie techniky eliminácie chromozomálne abnormálnych embryí zvyšujú úspešnosť techník embryu transferu.

3 CIEĽ PRÁCE

- porovnanie výskytu aneuploidie u hFVIII transgénnych a netransgénnych králikov analýzou:
 - a) z lymfocytov kostnej drene
 - b) z lymfocytov periférnej krvi

- detekcia aneuploidie u králičích *in vitro* preimplantačných embryí v rôznych vývojových štádiách a u králičích oocytov

- identifikácia miesta integrácie hFVIII transgénu na chromozónoch králikov F2 a F3 transgénnej generácie prostredníctvom FISH analýz

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Materiál

Biologický materiál

V našich experimentoch sme použili transgénne králiky s integrovaným mWAP-hFVIII (Chrenek et al., 2005; 2007) a netransgénne králiky brojlerových línií novozélandského bieleho a kalifornského plemena z chovu CVŽV- Ústav malých hospodárskych zvierat Nitra vo veku od 4 mesiacov.

4.2 Metódy

4.2.1 Transgenéza- mikroinjekcia cudzej DNA

Mikroinjekciu sme uskutočnili pomocou manuálnych mikromanipulačných jednotiek (Alcatel a Narishige, Japonsko) umiestnených na mikroskope Olympus (IMT-2, Japonsko) s Nomarského optikou. Selektované vajíčka v štádiu prvojadier na základe morfológického posúdenia boli injektované génovou konštrukciou hFVIII použitím mikroinjektora do prvojadra vajíčka. Fixáciu vajíčok sme zabezpečili podtlakom pomocou holdera (sklenná kapilára napojená na piest mikromanipulátora) a samotná mikroinjekcia bola realizovaná pomocou mikroinjekčnej pipety do prvojadra oplodnených králičích vajíčok. Injektovaný objem do každého prvojadra bol asi 1-2 pl (Chrenek et al., 2005).

4.2.2 Hodnotenie chromozomálnej aneuploidie

4.2.2.1 Kultivácia lymfocytov kostnej drene králika

Králik bol usmrcovaný technológiou používanou na Ústave malých hospodárskych zvierat- elektrickým prúdom. Po usmrtení sme vypreparovali femur, z ktorého sme vyplavili kostnú dreň použitím 2 ml média TCM 199 (Gibco BRL, USA) a 10% FCS (foetal calf serum; Gibco BRL, USA). Po resuspendovaní peletu nasledovala centrifugácia buniek kostnej drene počas 7 minút pri 1200 ot./min. Po centrifugácii sme odstránili supernatant (médium

s tukom) a k bunkám, ktoré ostali usadené na dne skúmavky sme pridali 2 ml média TCM 199 (Gibco BRL, USA). Po ďalšom resuspendovaní sme pridali 100 µl cytostatika KaryoMAX Colcemid (Gibco BRL, USA) z koncentrácie 10µg/ml, pričom sme dosiahli finálnu koncentráciu 0,50 µg kolcemidu / 1 ml média. Vzorku sme následne inkubovali 40 minút pri teplote +37°C. Po inkubácii nasledovala centrifugácia 7 minút pri 1200 ot./min. Následne po centrifugovaní sme prebytočný supernatant odsali a skúmavku s bunkami doplnili so 4 ml hypotonického 0,075 M roztoku KCl (Gibco BRL, USA), ktorý bol pred použitím inkubovaný pri +37°C. Hypotonický roztok sme nechali pôsobiť na bunky kostnej drene 20 minút pri +37°C. Po uplynutí daného času sme obsah skúmaviek centrifugovali pri 1200 ot./min. počas 7 minút. Po odstránení prebytočného supernatantu a po resuspendovaní peletu sme pridali 4 ml vopred pripraveného fixátora (1 diel kyseliny octovej + 3 diely metanolu). Spočiatku sme pridali 0,5 ml fixátora po kvapkách a po premiešaní dodali zvyšných 3,5 ml fixátora. Obsah skúmavky sme opäť centrifugovali počas 7 minút pri 1200 ot./min. Ako ďalší krok nasledovalo odsatie prebytočného supernatantu. Pridanie fixátora, centrifugáciu a odsávanie supernatantu sme opakovali ešte dvakrát. Po tretej fixácii sme odstránili supernatant, pričom sme ponechali približne 0,5 ml peletu. Ďalším krokom izolácie chromozómov bola aplikácia 2 až 3 kvapiek resuspendovaného peletu na vopred vyčistené a vychladené podložné sklíčko. Po uschnutí vzorky sme chromozómy farbili 2% roztokom Giemsa (farbivo Giemsa + MILLI Q voda) po dobu 7. minút. Následne sme vzorku opláchli destilovanou vodou a nechali uschnúť pri izbovej teplote. Po uschnutí bolo možné vzorku ihneď vyhodnocovať pomocou svetelného mikroskopu.

4.2.2.2 Chromozómy z kultúry lymfocytov periférnej krvi

Vzorku krvi sme získali z ušnej vény kráľika sterilnou ihlou a injekčnou striekačkou s antikoagulačným prípravkom Heparin (Léčiva, ČR). Ušnica kráľika bola dezinfikovaná benzylalkoholom. Ušnú venu sme napichli sterilnou ihlou a krv v objeme (0,5-1ml) sme odobrali do striekačky s antikoagulačným prípravkom. Ako kultivačné médium sme použili médium PB Karyomax (Gibco BRL, USA). Pri zakladaní kultúry sme do nameraného kultivačného média (2ml) pridali 3 kvapky krvi, obsah premiešali. Uzavreté nádoby sme kultivovali v termostate cca 66-72 hodín pri teplote 37°C. Počas kultivácie sme vzorku premiešali 2-3 krát. Po kultivácii sme pridali 120 µl cytostatika Colcemid (Gibco BRL, USA) a opäť prebieha kultivácia v termostate po dobu 1 hodiny za občasného premiešania. Po uplynutí 1 hodiny sme kultúru z termostatu centrifugovali 7 minút pri 1200 ot./min. Väčšinu

supernatantu sme odstánili a pelet buniek sme pretrepaním uvoľnili od stien nádoby. V ďalšom kroku sme pridali 4ml hypotonického roztoku KCl (Gibco BRL, USA) a opäť sme vzorku vložili do termostatu na 20 minút za občasného premiešania počas kultivácie. Potom sme vzorku centrifugovali, odstránili supernatant a bunky uvoľnili zo stien nádoby. Po kvapkách sme pridali 4ml fixátora (metanol : kyselina octová v pomere 3:1). Vzorku sme následne centrifugovali 7 minút pri 1200 ot/min. Odstránili sme supernatant a opäť sme pridali fixátor, tieto kroky sme opakovali 3x. Po poslednej centrifugácii sme ponechali pelet cca 0,5 ml a resuspendovali ho. Na prípravu chromozómových preparátov sme použili namrazené podložné sklíčka, na ktoré sme naniesli 2-3 kvapky suspenzie buniek vo fixátore. Na farbenie preparátov sme použili 2% roztok Giemsa (Gibco BRL, USA) počas 7. minút. Po opláchnutí destilovanou vodou a uschnutí bola vzorka pripravená na vyhodnotenie pomocou svetelného mikroskopu.

4.2.2.3 Cytogenetická metodika- Oocyty, Embryá

Získavanie oocytov a embryí

Oocyty (18hPC) sme získali od samíc kráľika plemena Novozélandsky biely respektíve Kalifornský po pripustení vazektomovaným samcom. Embryá v štádiu 2- buniek (24hPC) sme získavali od samíc rovnakého plemena po pripustení overenými samcami. Po usmrtení samice v porážkarni a odobratí vajcovodov spolu s vaječníkmi a rohom maternice boli vajcovody s vaječníkmi sterilne prenesené do laboratória. Oocyty respektíve embryá sme vyplavili zohriatym PBS (Gibco BRL, USA) na 37°C. Následne boli 3x premyté v zohriatom (37°C) CO₂ independent médiu (Gibco BRL, USA) s prídavkom 10% FCS (Gibco BRL, USA). V danom médiu sme oocyty a embryá selektovali na základe morfológických kritérií.

Kultivácia embryí a synchronizácia bunkového cyklu

Vyselektované embryá sme okamžite preniesli do k-DMEM kultivačného média (Gibco BRL, USA) doplneného o 10% FCS v 96-jamkovej kultivačnej miske (Nunc, Dánsko) v podmienkach CO₂ inkubátora pri 5% CO₂ a 39°C. Mitotický blok bol dosiahnutý pridaním cytostatika kolcemid (Gibco BRL, USA) o výslednej koncentrácii 1 µg/ml do kultivačného k-DMEM média po dobu pôsobenia 7, 12 respektíve 13 hod. pri 2-, 4- a 8- bunkových embryách. V každom pokuse sme ponechali niekoľko embryí bez ošetrenia cytostatikom ako

kontrolu fázy mitotického cyklu, tieto slúžili ako indikátor dĺžky pôsobenia kolcemidu na embryá.

Izolácia chromozómov z embryí

Mitoticky blokové embryá sme preniesli do 0,5% pronázy (Sigma, USA) zohriatej na 39°C v podmienkach CO₂ inkubátora počas 16-20 minút za účelom odstránenia *zóny pellucida* a mukózne vrstvy. Blastoméry po odstránení *zóny pellucida* sme následne 3x premývali v zohriatom CO₂-independent médiu (37°C) za účelom eliminácie neželaného ďalšieho pôsobenia pronázy na obnažené embryonálne bunky. Za účelom hypotonizácie sme použili 1% roztok citrátu sodného (Mikrochem, SR) obohatený o 0,25% foetal bovine serum-FBS (Gibco BRL, USA) a kolcemid 1 µg/ml (Gibco BRL, USA) v podmienkach termostatu pri 37°C a 15 minútach pôsobenia. Fixácia blastomér prebiehala vždy čerstvo pripraveným fixačným roztokom pozostávajúcim z metanolu (Mikrochem, SR) a z kyseliny octovej (Lachema, ČR) v pomere 3:1 zohriatym na izbovú teplotu, pri konštantnom mikroskopickom pozorovaní v 4- jamkových kultivačných miskách (Nunc, Dánsko), pokiaľ sa cytoplazma stala transparentnou. Fixované bunky sme prenášali na čisté a odmastnené mikroskopické sklíčka do kvapky hypotonického roztoku. Finálnu fixáciu buniek sme uskutočnili aplikáciou kvapky fixačného roztoku (metanol: kyselina octová, 3:1) vychladeného na 4°C z približne 4cm výšky. Schnutie a následné farbenie chromozómov prebiehalo po dobu 8. minút 2% rozokom Giemsa (Gibco BRL, USA) pri izbovej teplote.

Izolácia chromozómov z oocytov

Kumulárne bunky z oocytov sme odstránili pôsobením 0,5% roztokom hyaluronidázy (Sigma, USA) za pomoci pipety. Následne *zonu pellucida* sme odstránili pôsobením 0,5% roztokom pronázy (Sigma, USA) po dobu 4. minút v podmienkach termostatu pri 37°C. Hypotonizáciu a izoláciu chromozómov sme uskutočnili rovnakým spôsobom ako v prípade embryí.

Hodnotenie chromozómov

Zafarbené preparáty 2% roztokom Giemsa (7 minút farbenia) sme pozorovali použitím svetelného mikroskopom Leica (Leica Microsystems, Nemecko) pri 40 násobnom zväčšení

objektívu. Nájdené metafázne platničky boli prostredníctvom kamery prenesené do počítača, kde sme ich selektovali na základe kritérii ako prekryvanie sa chromozómov, rozptyl chromozómov na ploche. Následne sme počítali počty chromozómov v jednotlivých chromozomálnych sadách.

4.2.3 Detekcia integrácie hFVIII transgénu prostredníctvom FISH z lymfocytov periférnej krvi kráľíka

Príprava chromozomálnych preparátov

Suspenzia fixovaných buniek v štádiu metafázy bola pripravená z periférnej krvi kráľíkov na základe metodiky Parkányi et al. (2004). Nakvapkanie suspenzie buniek a predprípravu sklíčka pred samotnou FISH hybridizáciou sme uskutočnili na základe metodiky Krylov et al. (2007).

Sekvenovanie králičieho FVIII génu

Primery pre králičí FVIII gén pre RT-PCR boli navrhnuté na základe ENSOCUT00000000145, sekvenčné fragmenty boli získané z Ensembl databázy. Sedem cDNA amplifikátov zahrňujúcich 6667 bp čiastočnej kódujúcej sekvencie bolo naklonovaných použitím TOPO XL klon kitu (Invitrogen, USA). Sekvenovanie bolo dokončené AGOWA (Berlin, Nemecko).

Príprava prób a FISH-TSA

Próba pre hFVIII transgén bola pripravená vymedzením WAP-hFVIII vektora s *KpnI*. Vhodný DNA fragment (1250 bp) zbavený všetkých repetitívnych sekvencií bol izolovaný z agarózového gélu a následne purifikovaný v stĺpci gélového extrakčného kitu (Qiagen, Holandsko). Označenie 1 µg templátovej DNA sa uskutočnilo na základe náhodnej primer techniky (DecaLabel DNA labelling kit, Fermentas, Litva) s Dig-11-dUTP nukleotidom (Roche, Švajčiarsko), na základe užívateľskej príručky. Purifikácia reakčnej zmesi bola ukončená na stĺpci gélového extrakčného kitu (Qiagen). Templátová DNA pre prípravu próby králičieho génu bola amplifikovaná PCR reakciou použitím sekvenovaného cDNA klonu

a nasledovných primerov: 5' CAAGCCGGCCATATAACATC 3' a 5' TGGCATATTTGGGGATCCTA 3'. Purifikácia PCR amplifikátu (1310 bp) a jeho značenie bolo uskutočnené na základe rovnakého protokolu ako pre ľudskú transgénnu próbu. FISH-TSA sa uskutočnila podľa Krylova (Krylov et al., 2007). V skratke, chromozómy boli súčasne denaturované pod krycím sklíčkom po dobu 5 min. pri 70 °C s približne 30 ng vhodnej próby v jednoduchom hybridizačnom pufri (50% formamid, 2x SSC – 300 mM NaCl, 30 mM citrát sódný, pH 7,0) a inkubované počas noci (12–16 h) pri 37 °C. Posthybridizačné premývanie sa uskutočnilo 3x v 50% formamide v 2x SSC pri 42 °C, 2x SSC pri izbovej teplote a 1x v TNT pufri (100 mM Tris/ HCl; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,5) pri izbovej teplote, v každom kroku po 5 minút. Vizualizácia hybridizovanej próby bola ukončená antidigoxigenin-POD, Fab fragmentové protilátky (Roche, Švajčiarsko). Amplifikácia FISH signálov sa uskutočnila použitím TSA-tetramethylrhodamine kitu (NEN, Life Science, USA) na základe užívateľskej príručky. Následne sklíčka boli vložené do Mowiol-DAPI (4', 6'-diamino-2-phenylindole, 500 ng/ml) a pozorované pomocou fluorescenčného mikroskopu použitím vhodných filtrov. Zábery jednotlivých FISH signálov a metafáznych platní boli následne zlúčené dokopy.

4.2.4 Štatistika

Pre štatistické spracovanie výsledkov pri hodnotení aneuploidie u kostnej dreni, periférnej krvi, oocytach a embryí sme použili χ^2 test.

Pri detekcii integrácie hFVIII transgénu prostredníctvom FISH metódy, označené chromozómy boli identifikované na základe pomeru p/q ramien a ich relatívnej veľkosti v porovnaní s celkovou dĺžkou najdlhšieho chromozómu 1- použitým ako štandard. U DAPI značených metafáz boli vyrátané jednotlivé pomery. Tie boli identické s ideogramom publikovaným Hayesom (Hayes et al., 2002). Zlúčovanie obrázkov a meranie chromozómov sa uskutočnilo použitím ACC (Sofa, ČR) softvéru pre analýzy obrázkov.

5 VÝSLEDKY

5.1 Detekcia aneuploidie z lymfocytov kostnej drene transgénnych králikov

Do pokusu sme zahrnuli 10 transgénnych jedincov F4 generácie s integrovaným hFVIII transgénom a ako kontrolu sme použili 10 netransgénnych jedincov v rovnakom veku. Vo výsledkoch sme nezaznamenali preukazné rozdiely pri výskyte chromozomálnej aneuploidie medzi transgénnymi (61 a 70%) a netransgénnymi králikmi (51,27 a 61,4%) línie I a línie II. Signifikantné rozdiely ($p < 0,05$) boli zistené v zastúpení chromozomálne korektných (diploidných) buniek medzi transgénnymi a netransgénnymi jedincami línie II. Aneuploidia bola zapríčinená predovšetkým kategóriou hypodiploidných buniek ($2n < 44$) v rozpätí (23-57%) u oboch sledovaných skupín. Percentuálne zastúpenie hyperdiploidných buniek ($2n > 44$) bolo nízke (3-30%) u transgénnych a netransgénnych králikov. Polyploidné bunky sa vyskytovali vo veľmi nízkom zastúpení u oboch sledovaných skupín králikov (0-17%). V priemere, transgénne králiky oboch línií boli charakterizované 65,5% aneuploidiou v porovnaní s netransgénnymi a ich 56,3% priemernou hodnotou aneuploidie. Transgénne králiky oboch línií vykázali nižšie priemerné zastúpenie korektných somatických buniek (29,5%) v porovnaní s netransgénnou kontrolou (39,1%).

5.2 Detekcia aneuploidie z lymfocytov periférnej krvi transgénnych králikov

Periférnu krv sme získali jej sterilným odberom z ušnej vény králikov. Následnú analýzu sme uskutočnili u 6 transgénnych králikov s integrovaným hFVIII transgénom pochádzajúcich z F2 a F3 generácie, ako kontrolu sme použili 6 netransgénnych jedincov. Zistili sme podobné percentuálne zastúpenie aneuploidných metafáz u transgénnych (37,78%) a netransgénnych králikov (37,22%). Podobné výsledky boli zaznamenané v skupine diploidných buniek s 57,78% zastúpením pri transgénnych a 59,44% pri netransgénnych králikoch. Na aneuploidii sa u oboch skupín králikov podieľali predovšetkým hypodiploidné bunky s 31,11 a 33,89% priemerným zastúpením. Hyperdiploidné boli nájdené len v 3,33% zastúpení u netransgénnych a 6,67% zastúpení u transgénnych králikoch. Výskyt polyploidných buniek bol zistený v nízkom percentuálnom zastúpení pri transgénnych a

netransgénnych králikoch 3,33 a 4,44%. Zistené rozdiely v zastúpení aneuploidných a diploidných buniek medzi transgénnymi a netransgénnymi jedincami boli v oboch prípadoch nepreukazné.

5.3 Detekcia aneuploidie- oocyty a embryá

V tejto časti sme hodnotili výskyt aneuploidie u 27 oocytov a 58 embryí po *in vitro* kultivácii. Podiel blastomér úspešne blokováných v štádiu metafázy predstavoval 100%, 86,1% a 92,2% pre 2-, 4- a 8- bunkové embryá. Nie všetky metafázne jadrá nájdené na mikroskopickom sklíčku boli detekovateľné v dôsledku nedostatočného rozostúpenia sa izolovaných chromozómov a ich prekrývania sa. Podiel analyzovateľných blastomér dosiahnutý v tejto štúdii predstavoval 58,8%, 83,9% a 59,8% pre 2-, 4- a 8- bunkové embryá. Pri oocytoch bolo zistené 59,3% zastúpenie haploidných chromozomálnych sád. Ďalej sme zaznamenali 35%, 53,85% a 37,5% zastúpenie blastomér nesúcich korektné počty chromozómov u 2-, 4-, 8- bunkových preimplantačných embryálnych štádií. Z aneuploidnej formy hlavné zastúpenie mala hypodiploidia pri embryách, hypoploidia pri oocytoch (29,6% pri oocytoch; 52,5%; 30,8%; 54,7% pri 2-, 4-, 8 bunkových embryách). Hyperdiploidia (hyperploidia) bola pozorovaná v malom zastúpení u troch analyzovaných skupín (11,1% pri oocytoch, 10% a 3,85% pri 2- a 4- bunkových štádiách). Celková hodnota aneuploide v jednotlivých skupinách poukázala na 62,5% výskyt v dvoj-bunkovom štádiu a 54,7% v štádiu ôsmych buniek. Nižšia úroveň aneuploidie bola zistená pri oocytoch 40,7% a 34,65% u štvorbunkových embryí. Blastoméry s polyploidným počtom chromozómov boli zistené iba v nízkom počte pri 2- bunkových (2,5%) a pri 8- bunkových embryách (3,1%). Výskyt haploidie bol zistený pri 4- a 8- bunkových embryách v 11,5% a 4,7% zastúpení. Pri štatistickom porovnávaní celkovej aneuploidie χ^2 - testom, medzi oocytmi a jednotlivými embryonálnymi štádiami, sme zistili preukazný rozdiel ($p < 0,01$) v skupine oocytov a 2-bunkových embryí 40,7% vs. 62,5%.

5.4 Detekcia integrácie hFVIII transgénu prostredníctvom FISH z lymfocytov periférnej krvi králika

Do pokusu boli zaradení jedinci: samec- rodič z F2 generácie transgénnych králikov a dvaja potomkovia (F3 generácia). Pre kontrolu boli použítí netransgénni jedinci na základe

náhodného výberu. Ako zdroj buniek pre detekciu transgénu sme zvolili izolované lymfocyty z periférnej krvi králikov. Jednotlivé DAPI- farbené chromozómy boli rozpoznané na základe pomeru p/q ramien a pomeru medzi celkovou dĺžkou hodnoteného chromozómu a dĺžkou najväčšieho chromozómu 1- použitý ako štandard.

FISH-TSA analýza

FISH-TSA sa uskutočnila za účelom identifikácie chromozomálnej pozície ľudského koagulačného faktora VIII (hFVIII) u F2 transgénneho samca (jedinec 1-3-8) a u dvoch potomkov (F3 generácia – ♂24s a ♀35s). Pri F2 samcovi, hybridizácia hFVIII próby viedla k označeniu chromozómov 3p, 7p, 8q, 9p a 18q. Jedinec 24s vykázal signál na chromozóme 3 v pozícii p ramien. U králika 35s z F3 generácie boli identifikované dva cieľové chromozómy 3p a 7p. Pre vylúčenie možnosti značenia vlastného králičieho génu próbou, gén bol sekvenovaný a uskutočnila sa FISH-TSA analýza. Kódujúca sekvencia bola publikovaná v Gen- Bank databáze pod číslom EU447260. Zoskupenie nukleotidov ľudských a králičích cDNA sekvencií vykázalo 86% podobnosť a 21 rozdielov. Príslušná štruktúra proteínov poukázala na 78% identitu a 86% pozitivitu v porovnaní s ľudskými kópiami. Králičia cDNA próba (1310 bp) je lokalizovaná na géne umiestnenom na konci q ramena X chromozómu. Lokalizácia ľudského FVIII transgénu na chromozómoch u králikov F2 a F3 generácie jasne poukázala na vertikálne prerozdelenie jednotlivých lokusov. Značka pre ľudský chromozóm X hybridizovala jedine s vlastným králičím X chromozómom. Toto zistenie spolu so súčasnými výsledkami mapovania génu poukazuje na silnú X chromozóm konzerváciu medzi oboma druhmi.

5.5 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy

Transgénne zvieratá často vykazujú nekontrolovanú expresiu inzertovaného génu, vedúcu k zhoršeniu ich zdravotného stavu, k poruche úžitkovosti, respektíve k úhynu. U zdanlivo zdravých, geneticky modifikovaných hospodárskych zvierat, môžu zdravotné problémy prepuknúť počas života ako dôsledok neprítomnosti genetickej kontroly cudzieho génu. Včasnou diagnostikou, liečbou a vhodnými opatreniami je možné uchrániť nemalé hodnoty v intenzívnych chovoch. Jedincov nesúcich geneticky podmienené nežiaduce zmeny, je nutné z hľadiska potenciálneho prenosu chybných genetickej informácie na potomstvo

z reprodukčného procesu vylúčiť. U všetkých typov ochorení, je dôležitá schopnosť včasne rozpoznať výskyt ochorenia, na základe znalostí jednotlivých symptómov sprevádzajúcich to ktoré ochorenie a následné potvrdenie, respektíve vyvrátenie ich výskytu vhodnou metódou. Analýzy zamerané na hodnotenie korektnosti chromozomálnej stavby u živých zvierat, umožňujú správne selektovať jedincov, pri podozrení na ochorenie genetickej podstaty, a tým predísť riziku prenosu ochorenia do nasledujúcich generácií. Detekcia chromozomálnych aberácií pri *in vitro* oocytoch a *in vitro* preimplantačných embryí, umožňuje včasne selektovať tento genetický materiál pred samotným embryo transferom. FISH analýzy u transgénnych jedincov, umožňujú ich selekciu na základe počtu kópii a miesta integrácie transgénu na chromozómoch.

6 ZÁVER

Závery vyplývajúce z realizovaných experimentov sú:

- Transgénne králiky v dôsledku náhodnej integrácie transgénu vykazujú vyššiu frekvenciu zastúpenia aneuploidných buniek v porovnaní s netransgénymi, rozdiely v aneuploidii medzi transgénymi a netransgénymi králikmi po štatistickom vyhodnotení χ^2 - testom neboli preukazné.
- Zastúpenie aneuploidných buniek je vyššie pri detekcii aneuploidie z kostnej drene v porovnaní s periférnou krvou.
- Aplikácia cytostatika vo vhodnej koncentrácii a správne načasovanie dĺžky jeho pôsobenia, nám priniesli zvýšenie úspešnosti synchronizácie bunkového cyklu do štádia metafáza pri izolácii chromozómov z blastomér preimplantačných embryí. Získané úspešnosti: 100% pre 2- bunkové embryá; 86,1% pre 4- bunkové embryá; 92,2% pre 8-16 bunkové embryá.
- Lokalizácia ľudského FVIII transgénu na chromozómoch u králikov F2 a F3 generácie poukázala na vertikálne prerozdelenie jednotlivých lokusov. FISH-TSA analýza uskutočnená s próbou pre vlastný králičí FVIII gén odhalila terminálnu pozíciu na q ramenách chromozómu X.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- BEATTY, R. A. 1957. *Chromosome constancy in the corneal epithelium of the mouse*. Chromosoma 8(6), 1957, 585-96.
- BOND, D. J. – CHANDLEY, A. C. 1983. *Aneuploidy*. Oxford: Oxford University Press, 1983, 198s.
- FAN, J. – WATANABE, T. 2003. *Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models*. Pharmacol Ther. 99(3), 2003, 261-282.
- GRAU, D. – DURET, L. – GONY, M. 1996. *Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies)*. Nature 379, 1996, 333-335.
- HAYES, H. – ROGEL-GAILLARD, C. – ZIJLSTRA, C. - de HAAN, N. A. – URIEN, C. – BOURGEOUX, N. – BERTAUD, M. – BOSMA, A. A. 2002. *Establishment of an R-banded rabbit karyotype nomenclature by FISH location of 23 chromosome-specific genes on both G- and R-banded chromosomes*. Cytogenetic and genome research 98, 2002, 199-205.
- CHRENEK, P. 2002. *Genetické manipulácie s embryami*. Nitra: VÚŽV, 2002, 35-42.
- CHRENEK, P. – RYBAN, L. – VETR, H. – MAKAREVICH, A. V. – UHRIN, P. – PALEYANDA, R. K. – BINDER, B. R. 2007. *Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits*. Transgenic Res. 16, 2007, 353-361.
- CHRENEK, P. – VAŠÍČEK, D. – MAKAREVICH, A. – JURČÍK, R. – SUVEGOVÁ, K. – BAUER, M. – PARKÁNYI, V. – RAFAY, J. – BÁTOROVÁ, A. – PALEYANDA, R.K. 2005. *Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos*. Transgenic Res. 14, 2005, 417-428.
- JAKOLEV, A. F. 1979. *Issledovanie chromosom sel'skochozjajstvennykh životnykh. Metodicheskiye rekomendacii*. Leningrad, 1976.
- KRYLOV, V. - TLAPAKOVA, T. - MACHA, J. 2007. *Localization of the single copy gene Mdh2 on Xenopus tropicalis chromosomes by FISH-TSA*. Cytogenet. Genome Res. 116, 2007, 110-112.
- MOORHEAD, P. S. – NOWELL, P. C. – MELLMAN, W. J. – BATTIPS, D. M. – HUNGERFORD, D. A. 1960. *Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood*. Exp. Cell Res. 20, 1960, 613-616.
- PARKÁNYI, V. – CHRENEK, P. – RAFAY, J. – SUVEGOVÁ, K. – JURČÍK, R. – MAKAREVICH, A. V. – PIVKO, J. – HETÉNYI, L. – PALEYANDA, R. K. 2004. *Aneuploidy in the transgenic rabbit*. Folia Biologica (Praha) 50, 2004, 194-199.

PARKÁNYI, V. – CHRENEK, P. – RAFAY, J. – SUVEGOVÁ, K. – JURČÍK, R. – MAKAREVICH, A. V. – PIVKO, J. – HETÉNYI, L. – PALEYANDA, R. K. 2006. *Aneuploidia u transgénnych králikov*. SCPV Nitra: Produkcia a analýza transgénnych králikov. Monografia publikácia, , 2006, 95-124, ISBN 80-88872-54-5. (Stromqvist et al., 1997)

TORRES, E. M. – SOKOLSKY, T. – TUCKER, C. M. – CHAN, L. Y. – BOSELLI, M. – DUNHAM, M. J. - AMON A. 2007. *Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast*. Science 317, 2007, 916-924.

WEAVER - HEDRICK. 1995. *Basic genes*. Wm C Brown Publishers, 1995.

8 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

ADC Vedecké práce publikované v recenzovaných vedeckých časopisoch- karentované:

CURLEJ, J. – PARKANYI, V. – BULLA, J. –JURCIK, R. –CHRENEK, P. 2007. *The Effect of hFVIII Transgene on the Chromosomal Aneuploidy Rate in Rabbits*. Folia biologica (Kraków) 55, 2007, 161-164.

KRYLOV, V. - TLAPAKOVA, T. - MACHA, J. - CURLEJ, J. - RYBAN, L. – CHRENEK, P. 2008. *Localization of Human Coagulation Factor VIII (hFVIII) in Transgenic Rabbit by FISH-TSA: Identification of Transgene Copy Number and Transmission to the Next Generation (rabbit / hFVIII / transgenesis / FISH-TSA)*. Folia Biologica (Praha) 54, 2008, 121-124.

ROYCHOUDHURY, S. - BULLA, J. - ČURLEJ, J. – CHRENEK, P. 2008. *Hypodiploidy as a prominent attributor to chromosomal aneuploidy in transgenic rabbit embryos*. Czech J. Anim. Sci. 53 (9), 2008, 388–397.

ADE Vedecké práce publikované v recenzovaných vedeckých časopisoch- nekarentované, zahraničné:

MAHMOUD, K. - CURLEI, J. – PARKANYI, V. – CHRENEK, P. 2008. *Cytogenetic Analysis of Transgenic Rabbit Offspring Resulting from the F4 Generations*. Cytologia 73 (1), 2008, 15-19.

ADF Vedecké práce publikované v recenzovaných vedeckých časopisoch- nekarentované, domáce:

ČURLEJ, J. – ROYCHOUDHURY, S. -. OMELKA, R. – CHRENEK, P. 2007. *Level of Chromosomal Aneuploidy Detected from Peripheral Blood and Bone Marrow in Transgenic Rabbits*. Slovak J. Anim. Sci. 40, 2007, 5-8.

BDE Odborné práce publikované v recenzovaných odborných časopisoch- zahraničné:

ČURLEJ, J. – CHRENEK, P. 2009. *Onemocnění genetické podstaty u vybraných hospodářských zvířat*. Chovatelský magazín 1, 2009, 27-29.

BDF Odborné práce publikované v recenzovaných odborných časopisoch- domáce:

ČURLEJ, J. – CHRENEK, P. 2008. *Geneticky podmienené ochorenia hospodárskych zvierat*. Slovenský chov 9, 2008, 22s.

AFC Vedecké práce publikované v zborníkoch z konferencií- medzinárodné recenzované vydané v zahraničí:

ČURLEJ, J. – CHRENEK, P. – MAKAREVICH, A. V. 2008. *Chromosomal evaluation of transgenic rabbits in several generations*. České Budějovice: Biotechnology 2008- University of South Bohemia, 2008, 81-83, ISBN 80-85645-58-0.

ROYCHOUDHURY, S. – BULLA, J. – CURLEJ, J. – CHRENEK, P. 2007. Chromosomal ploidy in transgenic rabbits. Eurobiotech 2007

AFD Vedecké práce publikované v zborníkoch z konferencií- domáce zborníky s medzinárodnou účasťou:

ČURLEJ, J. – ROYCHOUDHURY, S. – BULLA, J. – CHRENEK, P. 2006. *Chromosomal analyse of transgenic rabbits*. Nitra: Acta fytotechnica et zootechnica, 2006, 57-59., ISSN 1335-258X.

ČURLEJ, J. – PARKÁNYI, V. – ROYCHOUDHURY, S. – CHRENEK, P. 2006. *Aneuploidy of the transgenic rabbits*. Nitra: 7. Vedecká konferencia doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov- FPV UKF, 2006, 132-137. ISBN 80-8050-950-3.

ČURLEJ, J. – MASSÁNYI, P. - CHRENEK, P. 2007. *Effect of nickel and zinc on rabbit numerical chromosomal aberrations*. Nitra: Rizikové faktory potravného reťazca-zborník SPU, 2007, 41-44, ISBN 978-80-8069-948-2.

Predložené na schválenie:

CURLEJ, J. - BULLA, J. – CHRENEK, P. *Occurrence of chromosomal aneuploidy in rabbit oocytes and embryos at different developmental stages*. Odoslané do ZYGOTE dňa 27.5.2009 (reg. č.: Zygote 020/09)

Ocenenie:

IV. ročník súťaže mladých vedeckých pracovníkov (predsedníctvo SAPV), kategória- najlepšie práce s vedeckým prínosom (Nitra 13.5.2008): 2. miesto Ing. Jozef Čurlej, z odboru živočíšnej výroby SAPV za prácu: ČURLEJ, J. - PARKÁNYI, V. – BULLA, J. – JURČÍK, R.

– CHRENEK, P. 2007. *The effect of hF VIII transgene on the Chromosomal Aneuploidy Rate in Rabbits*. Folia Biologica (Kraków) 55, 2007, 161-164.

Pod'akovanie:

Práca bola finančne podporovaná prostredníctvom projektu APVV LPP 0126-06.