

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Katedra Fyziológie živočíchov

**Vplyv integrácie hFVIII, EGFP génov a vitrifikácie na kvalitu
králičích embryí**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie akademického titulu „doktor“ („philosophiae doctor“)
v študijnom programe doktorandského štúdia Biotechnológie
v študijnom odbore 5-2-25 Biotechnológie

Mgr. Zuzana Turanová

Nitra, 2009

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre Fyziológie živočíchov, Fakulty Biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, v spolupráci s CVŽV Nitra .

Doktorand: Mgr. Zuzana Turanová
Katedra Fyziológie živočíchov
Fakulta Biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc.
Ústav genetiky reprodukcie hospodárskych zvierat, CVŽV Nitra

Oponenti: prof. MVDr. Imrich Maraček, DrSc.
Katedra anatómie, histológie a fyziológie
Ústav fyziológie
Univerzita Veterinárneho Lekárstva v Košiciach

prof. MVDr. Pavel Šťastný, DrSc.
Katedra Veterinárnych disciplín
Fakulta Agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

doc. Ing. Jozef Trandžík, PhD.
Katedra zoológie a antropológie
Fakulta Prírodných vied
Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre

Autoreferát bol odoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra Fyziológie živočíchov, Fakulta Biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa 09.09.2009 o h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác doktorandského študijného programu Biotechnológie, v študijnom odbore 5-2-25 Biotechnológie na Fakulte Biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Miesto konania: Katedra Fyziológie živočíchov
Fakulta Biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť:

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty Biotechnológie a potravinárstva.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom programe Biotechnológie (5-2-25).

.....
Prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

ABSTRAKT

Podstatou mnohých biotechnológií je cielečné zasahovanie do organizmu až na génovej úrovni a vytváranie geneticky modifikovaných organizmov. Jednou z metód tvorby GMO je mikroinjekcia transgénu do prvojadra oplodneného vajíčka. Takto získaný genetický materiál je potrebné uchovať pre ďalšie analýzy, výskum a prax, napr. vitrifikáciou (kryokonzerváciou) v tekutom dusíku. Prežívateľnosť králičích embryí po mikroinjekcii, integrácii transgénu a vitrifikácii sme hodnotili sledovaním preimplantačného vývoja do dosiahnutia štádia voľnej blastocysty („hatching“), zisťovali sme celkový počet buniek v embryu, počet buniek v ICM oblasti, percentuálne zastúpenie apoptotických buniek a merali diameter embryí. V prvom experimente sme hodnotili 2 skupiny nevitrifikovaných transgénnych (EGFP, hFVIII) embryí a 1 skupinu intaktných králičích embryí. Všetky tri hodnotené skupiny embryí dosiahli v podmienkach *in vitro* štádium voľnej blastocysty (100%). Signifikantný rozdiel ($p < 0,05$) v celkovom počte buniek sme zistili medzi kontrolnou a EGFP skupinou embryí. Najvyšší podiel apoptotických buniek sme zaznamenali u EGFP embryí (6%). V prípade zisťovania vplyvu vitrifikácie na vývojovú potenciú králičích embryí sme v druhom experimente zistili štatisticky vysoko preukazný rozdiel ($p < 0,01$) pri porovnaní embryí kontrolných s vitrifikovanými transgénnymi (EGFP - 68% vs. hFVIII - 69%). Vo vývoji sa v tomto experimente zastavilo 20% EGFP a 25% hFVIII vitrifikovaných embryí. Štatisticky vysoko významný rozdiel ($p < 0,01$) sme zistili v prípade apoptotických buniek (EGFP vs. kontrola, EGFP vs. hFVIII, kontrola vs. hFVIII), pričom najvyššie percento (2,90%) sa potvrdilo u EGFP skupiny vitrifikovaných embryí. Podiel apoptotických buniek v kontrolnej skupine bol 2,50%, najmenej ich bolo pozorovaných v hFVIII skupine vitrifikovaných králičích embryí (0,70%). Relatívnym objemom jednotlivých bunkových štruktúr (normálnych i s patologickými zmenami), sme hodnotili kvalitu transgénnych (EGFP) a mikroinjektovaných vitrifikovaných králičích embryí na ultraštrukturálnej úrovni v treťom experimente. Zvýšený podiel (7,96%) tukových kvapôčok a najviac porušených mikroklkov (1,62%) sme zistili u EGFP skupiny. Cytoplazmatická, jadrová membrána aj medzibunkové kontakty boli najviac poškodené u mikroinjektovanej skupiny (1,30% resp. 0,82% resp. 0,56%). Transgénne embryá vykazovali najvyšší podiel patologických zmien v prípade mitochondrií (4,12%), drsného endoplazmatického retikula (2,37%) a Golgiho aparátu (1,32%). V súvislosti s chromozomálnou výbavou králičích embryonálnych buniek sme sledovali zastúpenie aneuploidných sád chromozómov. Úspešnosť blokácie blastomér v štádiu metafáz bola 100%,

86,1% a 92,2% u 2-, 4- a 8-bunkových králičích embryí. Ako cytostatikum bol použitý kolcemid (Gibco, BRL, USA) v koncentrácii 1µg/ml. χ^2 – testom sme zistili štatisticky vysoko významný rozdiel ($p < 0.01$) medzi oocytmi a 2- bunkovými embryami (40,7% vs. 62,5%). Transgénne králiky vykazujú vyššiu frekvenciu výskytu aneuploidných sád chromozómov v porovnaní s kontrolnou skupinou. FISH-TSA analýzy boli upriamené na potvrdenie transgénu v králičom chromozóme a dospeli k označeniu chromozómov 3p, 7p, 8q, 9p a 18q u samca F2. U jedinca 24s bol zistený signál v pozícii p ramien 3. chromozómu. Chromozómy 3p a 7p boli identifikované u králika 35s z F3 generácie.

Na základe našich výsledkov možno skonštatovať, že znížená prežívateľnosť transgénnych vitrifikovaných embryí do štádia blastocysty, má za následok skôr proces vitrifikácie, než vlastná mikroinjekcia, či integrácia a expresia transgénu v bunkách. Patologické zmeny v ich ultraštruktúre možno pripísať kombinácii mikroinjekcie a vitrifikácie.

Kľúčové slová: mikroinjekcia, integrácia, vitrifikácia, „hatching“ blastocysta, apoptóza, ultraštruktúra, aneuploidia, FISH metóda

ABSTRACT

Biotechnology in a process of GMO production is focused to modifications on the gene level. The most common way in GMO production is the microinjection of a foreign gene into pronuclei of fertilized eggs. The approach of vitrification of genetically modified material is useful for a future experimental works. Our experiments were aimed at determining how the microinjection, transgene integration and vitrification processes can influence rabbit embryo development up to hatching blastocyst stage. Subsequently, total cell number, number of cells in the ICM area, number of apoptotic cells and embryo diameter were measured. In the first experiment we evaluated two groups of non-vitrified transgenic embryos and one group of control rabbit embryos. About 100% of embryos either in the control or experimental (EGFP and hFVIII) groups reached the hatching blastocyst stage. Significant differences ($p < 0,05$) in total cell number were recorded between the control and EGFP-positive embryos. The highest apoptotic cell occurrence (6%) was found in the EGFP-positive embryos produced by the microinjection. Statistically significant differences ($p < 0,01$) in detection of embryo developmental potency after

vitrification were found between the control embryos and both the EGFP (68%) and the hFVIII-positive embryos (69%), respectively. Developmental arrest was observed in 20% of the EGFP embryos and in 25% of the hFVIII embryos. The highest proportion of apoptotic cells (2,90%) was detected in the EGFP-positive embryos. In the control embryos 2,5% and in the hFVIII embryos only 0,7% of apoptotic cells were revealed.

Ultrastructural study was performed for a quality control of transgenic/microinjected and vitrified rabbit embryos. Both morphologically normal and pathologically changed embryos were analyzed. A higher proportion of lipid droplets (7,96%) and destructed trophoblastic microvilli (1,62%) was found in the EGFP embryos. Damages in cytoplasmic (1,30%), nuclear (0,82%) membranes and in junctional contacts (0,56%) were found in the microinjected embryos. Pathological changes in mitochondria (4,12%), rough endoplasmic reticulum (2,37%) and Golgi apparatus (1,32%) were detected at highest level in the EGFP embryos.

Other part of our experiments was an evaluation of aneuploidy rate in rabbit embryonal cells. Synchronization of embryo cells into metaphase stage was achieved at 100%, 86,1% and 92,2% success for 2-, 4- and 8-cell stage, respectively. For mitotic arrest at the metaphase stage colcemid (Gibco, BRL, USA) at 1µg/ml final concentration was used. Significant difference ($p < 0.01$) in aneuploidy occurrence between oocytes and 2-cell embryos stage was found (40,7% vs. 62,5%). Generally, transgenic rabbits exhibited higher aneuploidy occurrence compared to non-transgenic ones. FISH-TSA analyses were performed for a localization of the hFVIII transgene on rabbit chromosomes. Probe signals were detected on 3p, 7p, 8q, 9p and 18q chromosomes of F2 male. Rabbit 24s signal is shown on 3p chromosome. Transgenic rabbit female of F3 generation exhibited 3p and 7p target chromosomes.

In conclusion, decreased survival of transgenic embryos is primarily caused by consequences of the vitrification process. Pathological changes on embryo ultrastructural level are caused by vitrification and microinjection processes.

Key words: microinjection, integration, vitrification, „hatching“ blastocyst, apoptosis, ultrastructure, aneuploidy, FISH

POUŽITÉ OZNAČENIE

| | |
|----------|---|
| cDNA | komplementárna (kópiová) deoxyribonukleová kyselina |
| CMVIE | cytomegalovírusový promótor |
| DMSO | dimetylsulfoxid |
| EG | etylénglykol |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein – zosilnený zeleno fluoreskujúci proteín |
| FISH | fluorescent <i>in situ</i> hybridization |
| FISH-TSA | fluorescent <i>in situ</i> hybridizácia – tyramid-selektovaná amplifikácia |
| hCG | ľudský chóriový gonadotropín |
| hPC | hodiny <i>post coitum</i> |
| FSH | folikuly stimulačný hormón |
| GFP | green fluorescent protein – zeleno fluoreskujúci proteín |
| hFVIII | human factor VIII – ľudský faktor VIII |
| ICM | inner cell mass – vnútorná bunková masa |
| kDa | kiloDalton |
| kb | kilo báza |
| k-DMEM | knockout DMEM médium – kultivačné médium |
| mWAP | murine whey acid promoter – myšie srvátkový kyslý promótor |
| OPS | open pulled straw – vitrifikačná metóda |
| PBS | phosphate buffered solution – fosfátový tlmivý roztok |
| PMSG | pregnant mare serum gonadotropin - sérový gonadotropín izolovaný zo séra žrebných kobýl |
| PC | <i>post coitum</i> |
| TEM | transmisná elektrónová mikroskopia |
| TUNEL | Transferase Biotin – dUTP Nick End Labeling |

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD | 8 |
| 2 PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY | 9 |
| 2.2 Mikroinjekcia cudzej DNA do prvojadra oplodneného vajíčka..... | 9 |
| 2.3 Génové konštrukcie..... | 10 |
| 2.3.1 hFVIII..... | 10 |
| 2.3.2 EGFP | 10 |
| 2.4 Kryokonzervácia biologického materiálu | 10 |
| 2.5 Chromozomálne zmeny..... | 11 |
| 2.6 Lokalizácia transgénu metódou FISH | 11 |
| 2.7 Ultraštruktúrna analýza | 11 |
| 3 CIEĽ DOKTORANDSKEJ PRÁCE..... | 12 |
| 4 MATERIÁL A METÓDY | 13 |
| 4.1 Produkcia transgénnych králičích embryí s EGFP génom v podmienkach <i>in vitro</i> a... s hFVIII génom v podmienkach <i>in vivo</i> | 13 |
| 4.2 Detekcia integrácie a expresie EGFP | 13 |
| 4.3 Vitifikácia / devitifikácia transgénnych králičích embryí | 13 |
| 4.4 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality transgénnych králičích embryí..... | 14 |
| 4.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov | 14 |
| 5 VÝSLEDKY | 15 |
| 5.1 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality transgénnych králičích embryí..... | 15 |
| 5.2 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality vitifikovaných transgénnych králičích embryí.. | 15 |
| 5.3 Ultraštruktúrna analýza vitifikovaných transgénnych / mikroinjektovaných | 15 |
| králičích embryí..... | 15 |
| 5.4 Kvalita králičích embryí na základe sledovania aneuploidie | 16 |
| 5.5 Potvrdenie lokalizácie transgénu metódou FISH | 16 |
| 6 NÁVRHY NA VYUŽITIE PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY | 17 |
| 7 ZÁVER..... | 18 |
| 8 POUŽITÁ LITERATÚRA..... | 20 |
| 9 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH | 22 |
| S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU | 22 |

1 ÚVOD

Biotechnológie sa snažia zmeniť a využívať vlastnosti živých organizmov v prospech ľudstva, pričom ich podstatou je zásah do organizmu až na génovej úrovni. Genetické technológie na úrovni DNA boli schopné zdolať prekážky medzidruhového kríženia, ktorého výsledkom boli zväčša sterilné a pre človeka neakceptovateľné vlastnosti východiskových organizmov. Človek sa aktívne snaží meniť genóm pomocou metód transgenézy a vytvoríť geneticky modifikované organizmy, a tiež chce zabezpečiť produkciu nových aktívnych látok, ktoré by boli biologicky účinné. Pre vysokú schopnosť produkcie dostatočného množstva žiadaných účinných látok, krátky interval na získanie novej transgéennej generácie, vysokej stability expresie génov a relatívne nízkych nákladov, sa za najvhodnejší biologický model považuje králik. Transgéenne králiky sa stali vhodným modelom pre štúdium mechanizmov ľudských ochorení akými sú napríklad hemofília či ateroskleróza. Je prirodzené, že biologický materiál sa v podmienkach *in vitro* líši kvalitou i životaschopnosťou od materiálu *in vivo*. Pri transgenéze sa používajú mikromanipulačné techniky na mikroinjekciu cudzieho génu do oplodneného vajíčka v podmienkach *in vitro*. Hlavným problémom pri tejto technológii je znížená prežívateľnosť a následné vývojové anomálie embryí. Faktory, ktoré potencióálne ovplyvňujú ich kvalitu sú nedostatočná stabilita integrovaných génov, následná detekcia a lokalizácia počtu kópii transgénu v genóme embrya a tiež aj zmrazovanie – vitrifikácia, a rozmrazovanie – devitifikácia tohto geneticky cenného materiálu (Chrenek, 2002b).

2 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Transgenéza a metódy tvorby transgénnych zvierat

Možnosť zabudovať cudzí gén do genómu jedinca predstavuje jeden z najväčších úspechov v genetike v poslednom období. Jedinca, ktoré majú vo svojom genóme integrovaný cudzí gén s následnou expresiou a schopnosťou prenášať tento gén na potomstvo, označujeme ako transgénne (geneticky modifikované). Prvé úspešné experimenty s cieľom pozmeniť genóm jedinca, uskutočnil Munro (1968) s kurčatami. Za typický prípad genetickej manipulácie na úrovni celého organizmu možno považovať tvorbu transgénnych jedincov. Hovoríme o prenose cudzej DNA (pripravenej génovej konštrukcie) do genómu jedinca. O transgénnom jedincovi hovoríme vtedy, ak tento má vo svojom genóme integrovaný (zabudovaný) cudzí gén s následnou expresiou (fenotypovým prejavom) a je schopný prenášať tento gén na potomstvo (Houdebine, 1998).

Vo všeobecnosti možno prenos génov živočíchov uskutočniť:

- prenosom génov do gonád
- prenosom génov do gamét
- prenosom génov do embrya
- prenosom génov do somatického tkaniva (Chrenek, 2002b).

2.2 Mikroinjekcia cudzej DNA do prvojadra oplodneného vajíčka

Táto metóda umožňuje preniesť génovú konštrukciu (úsek DNA) do prvojadra oplodneného králičieho vajíčka, ktorého výsledkom je náhodná integrácia v genóme jedinca. Celkový objem injektovanej DNA je asi 1-2 pl, čo pri koncentrácii 1-2 ng/μl predstavuje okolo 200-400 kópií DNA, záleží však na type génovej konštrukcie. Po mikroinjekcii a krátkej, resp. dlhšej kultivácii embryí v podmienkach *in vitro* sú embryá prenášané do vajcovodu resp. maternice hormonálne pripravených samíc alebo použitím vazektomovaných samcov. Úspešnosť tvorby transgénnych králikov touto technikou sa pohybuje v rozmedzí 0,5 – 3%, keď berieme do úvahy počet prenesených mikroinjektovaných vajíčok na počet narodených transgénnych králikov (Bösze a kol., 2003).

2.3 Génové konštrukcie

2.3.1 hFVIII

Ľudský faktor VIII (hFVIII), nazývaný aj antihemofilický faktor A, je plazmatický glykoproteín, ktorého molekulová hmotnosť je 330 kDa (Matýšková a kol., 1999). Nízka koncentrácia, aktivita alebo abnormality humánneho koagulačného faktora VIII (hFVIII) spôsobuje hemofiliu typu A. Jedná sa o humánnu recesívne dedičnú chorobu. Terapeutická stratégia sa zameriava na alternatívne spôsoby liečby nahradenia defektných alebo chýbajúcich proteínov krvnej plazmy. Preto produkcia rekombinantného humánneho FVIII (rhFVIII) mliečnou žľazou transgénnych zvierat, by mohla byť jedným z riešení tohto problému (Chrenek a kol., 2004).

2.3.2 EGFP

Zelene fluoreskujúci proteín GFP (Green Fluorescent Protein) sa stal veľmi populárny ako neinvazívny marker v živých bunkách pre detekciu pozitívnych transfektovaných klonov (Hsiao-Sheng L. a kol., 1999), no napriek viacerým bunkovým líniam s integrovaným GFP génom, efektivita vytvorenia stabilných bunkových líní je nízka (Hsiao-Sheng L. a kol., 1999). Variant GFP, ktorý bol obohatený o „enhancer“ známy pod skratkou EGFP (enhanced green fluorescent protein), má dvojitú mutáciu, kedy je fenylalanín na 64. pozícii zamenený za leucín a serín na 65. pozícii je zamenený za threonín (F64L/S65T). Tento pozmenený typ GFP je stabilnejší a fluoreskuje niekoľkonásobne intenzívnejšie ako „divý“ typ GFP (wtGFP) (Chalfie a Kain, 2005).

2.4 Kryokonzervácia biologického materiálu

Kryokonzervácia buniek zahŕňa mrazenie buniek a ich uskladnenie pri teplote, keď sú všetky metabolické procesy zastavené (Özkavukcu a Erdemli, 2002). Moce a kol. (2005) vo svojej štúdiu uvádza, že kryokonzervácia je najviac používanou metódou konzervácie (uchovávaní) embryí. Kryouchovávanie biologického materiálu zahŕňa šesť krokov: prvotné vystavenie kryoprotektívu, ochladenie (rýchle, pomalé) pod bod mrazu, uskladnenie v tekutom dusíku pri -196°C , rozmrazenie, zriedenie a vyplavenie kryoprotektíva a prenesenie biologického materiálu do fyziologických podmienok (Popelková, 2006). Embryá môžu byť počas kryokonzervovania poškodené šiestimi spôsobmi poškodenia (Kasai a kol., 2002): chemickou toxicitou kryoprotektíva, intracelulárnym formovaním kryštálov ľadu, osmotickým zmrštením, osmotickým naboptnaním, prasknutím extracelulárnou

kryštalizáciou. Vitifikácia ponúka 2 významné výhody oproti konvenčnému pomalému zmrazeniu. Prvou výhodou je, že sa eliminuje potenciálne poškodenie ľadovými kryštálkami, ktoré sa počas rýchleho zmrazovania nevytvárajú. Druhou výhodou je podstatné skrátenie času zmrazovania a tiež redukcia prístrojového vybavenia na kryochovávanie embryí. Najčastejšie používané médium pre vitifikáciu je fyziologický roztok s fosfátovým pufróm: phosphate – buffered saline (PBS). Kryoprotektívne látky sú nevyhnutné pre úspešné kryochovávanie živých buniek. Popelková, (2006) kryoprotektíva rozdeľuje na prestupujúce (glycerol, etylén glykol (EG), dimetyl sulfoxid (DMSO)) a neprestupujúce (sacharidy, proteíny a polyméry).

2.5 Chromozomálne zmeny

Z hľadiska chromozomálnych aberácií rozoznávame 2 typy chromozomálnych zmien : štrukturálne a numerické. Štrukturálne zmeny vznikajú v dôsledku chromozómových zlomov a sú charakterizované vznikom abnormálnych chromozomálnych kombinácií. Medzi numerické zmeny chromozómov patrí euploidia (počet chromozómov je celistvým násobkom čísla n , a aneuploidia, ktorá predstavuje zmenu v počte chromozómov v sadách chromozómov (Weaver a Hedrick, 1995).

2.6 Lokalizácia transgénu metódou FISH

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) umožňuje výskum formou vizualizácie a mapovania genetického materiálu v jednotlivých bunkách, vrátane špecifických génov alebo časti génov. Je dôležitou pre pochopenie rozličných chromozomálnych abnormalít a ďalších genetických mutácií.

2.7 Ultraštruktúrna analýza

Pod pojmom ultraštruktúra rozumieme detailnú štruktúru biologických vzoriek ako sú bunky, tkanivá i celé orgány, ktoré sú pozorované pod elektrónovým mikroskopom, (Anonymus C, 2009).

3 CIEĽ DOKTORANDSKEJ PRÁCE

1. získať transgénne králičie embryá v podmienkach *in vitro* (mikroinjekcia EGFP génu do prvojadra oplodneného králičieho vajíčka).
2. získať transgénne králičie embryá v podmienkach *in vivo* (využitie existujúcich transgénnych králikov s hFVIII, Chrenek a kol., 2005).
3. vitifikácia transgénnych králičích embryí v preimplantačnom vývojovom štádiu „morula“.
4. porovnať kvalitu vitifikovaných/devitifikovaných králičích transgénnych embryí na základe:
 - a) prežívateľnosti (vývojovej potencie)
 - b) počtu buniek v embryoblaste (ICM)
 - c) výskytu chromozomálnej aneuploídie
 - d) apoptózy
 - e) ultraštruktúrálnej analýzy pomocou TEM (transmisná elektrónová mikroskopia).
5. lokalizácia transgénu na chromozóme metódou FISH (fluorescenčná *in-situ* hybridizácia).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Produkcia transgénnych králičích embryí s EGFP génom v podmienkach *in vitro* a s hFVIII génom v podmienkach *in vivo*

Hormonálne ošetrované (PMSG, hCG) donorky králikov brojlerovej línie novozélandského bieleho a kalifornského plemena z chovu ÚMHz CVŽV Nitra, sme pripárovali samcami rovnakého plemena. Po odporazení samíc sme z nich vystrihli vajcovody s časťou maternice. Oplodnené vajíčka v štádiu prvojadier (19-20 hPC) sme vyplavili z lievika vajcovodu a umiestnili do *in vitro* podmienok. Na mikroinjekciu sme použili génovú konštrukciu EGFP (enhanced green fluorescent protein), ktorá pozostávala s vlastného génu EGFP a cytomegalovírusového promotóra CMVIE. Je komerčne dostupná od firmy CLONTECH (USA) (pEGFP-N1) o veľkosti 4,7kb (Genbank U57608). Druhá génová konštrukcia pozostávala z 2,5 kb myšieho srvátkového proteínu ako promotór (mWAP), 7,2 kb cDNA faktora VIII (hFVIII) a 4,6 kb mWAP génu (Chrenek a kol., 2005). Transgénne králiky (F4 generácia) s potvrdenou integráciou a expresiou ľudského faktora VIII (génová konštrukcia mWAP-hFVIII, Chrenek a kol., 2005) sme navzájom krížili na produkciu transgénnych oplodnených vajíčok, vyplavených v štádiu prvojadier, ktoré boli kultivované v podmienkach *in vitro* až do štádia moruly, kedy sme ich vitrifikovali.

4.2 Detekcia integrácie a expresie EGFP

Vajíčka po mikroinjekcii sme preniesli ústnou pipetou do 4-dierových kultivačných platničiek (Nunc, Dánsko) do *in vitro* podmienok a potom v štádiu 32- blastomér, sme ich použitím flourescenčného mikroskopu (Leica, Nemecko) selektovali na pozitívne (transgénne – zelený signál) a negatívne (bez signálu) a následne vitrifikovali.

4.3 Vitifikácia / devitifikácia transgénnych králičích embryí

Kultivované embryá v štádiu moruly, sme vitrifikovali metódou OPS (Open Pulled Straw) bližšie popísanou v práci Vajta a kol. (1998) s malými modifikáciami (Popelková a kol., 2005).

4.4 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality transgénnych králičích embryí

Prežívateľnosť transgénnych králičích embryí (vitrifikovaných i nevitrifikovaných) sme hodnotili percentom dosiahnutia štádia voľnej blastocysty („hatching“). Kvalitu sme hodnotili zisťovaním celkového počtu buniek a počtu buniek v ICM oblasti diferenciálnym farbením (Chrenek a kol., 2005b), počtom apoptotických buniek metódou TUNEL v súlade s návodom apoptotickej súpravy reagentov MEBSTAIN Direct Apoptosis Detection Kit (Immunotech, Marseilles, Francúzsko) (Makarevich a kol., 2005), meraním diametra embryí podľa Makarevicha a kol., (2006). Hodnotili sme tiež kvalitu vitrifikovaných transgénnych králičích embryí na úrovni ultraštruktúry v súlade s metodikou Popelková a kol., 2005, pričom sme zisťovali relatívny objem jednotlivých bunkových štruktúr (normálnych i s patologickými zmenami). Objemová hustota bunkových štruktúr bola stanovená použitím bodovej sčítacej metódy (point-count method) (Weibel & Bolender, 1973) a zisťovaním počtu chromozómov v chromozomálnej sade jednotlivých blastomér (chromozomálnu aneuploidiu). Pomocou metódy FISH v spolupráci s Krylov a kol., (2007), sme potvrdili prítomnosť transgénu hFVIII na chromozómoch transgénnych králičích embryí.

4.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Hodnotenie bolo matematicko-štatisticky realizované na základe metód popísaných v práci Grofík a Flák (1990) pričom pre vlastné hodnotenie sme použili štatistické balíky Statistix 8 resp. 9. a GLM procedúru SAS 8.

5 VÝSLEDKY

5.1 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality transgénnych králičích embryí

Pri sledovaní vývojovej potencie sme zistili 100% úspešnosť dosiahnutia voľnej blastocysty. Pri hodnotení celkového priemerného počtu buniek v embryách boli zistené štatisticky vysoko významné rozdiely pri porovnaní hFVIII skupiny ku kontrolnej a EGFP, 3: (1, 2)** ($p < 0.01$) a tiež štatisticky významný rozdiel kontrolnej a EGFP skupiny (1:2*), ($p < 0.05$). Pri analýze priemerného počtu buniek ICM oblasti embrya, sme zistili štatisticky významný rozdiel medzi kontrolnou a EGFP skupinou (1:2*) a štatisticky vysoko významné rozdiely pri porovnaní hFVIII skupiny ku kontrolnej a EGFP skupine, 3: (1, 2)**. Štatisticky vysoko významné rozdiely sme zistili i v počte apoptotických buniek, pri porovnávaní kontrolnej skupiny k hFVIII skupine (1:3)** a EGFP skupiny králičích embryí ku kontrolnej a hFVIII skupine, 2: (1, 3)**. V prípade diametra sme získali úplne rovnaké štatistické porovnania ako v prípade apoptotických buniek, 1:3** ; 2: (1, 3)**.

5.2 Hodnotenie prežívateľnosti a kvality vitrifikovaných transgénnych králičích embryí

V prípade vývojovej potencie vitrifikovaných transgénnych králičích embryí sme zistili jej pokles, a teda štatisticky vysoko významné rozdiely medzi skupinou kontrolnou a skupinou EGFP a hFVIII embryí 1:(2, 3)** . K rovnakým výsledkom sme dospeli aj v prípade zastavenia preimplantačného vývoja králičích embryí. V zastúpení fragmentovaných embryí bol zistený štatistický rozdiel iba medzi intaktnými a EGFP králičími embryami (1:2*). Priemerný celkový počet buniek v embryu odhalil štatisticky významný rozdiel medzi kontrolnou a hFVIII skupinou, 1:3*. V priemernom počte buniek v ICM oblasti embrya sme medzi kontrolnou a EGFP skupinou králičích embryí, (1:2*), zistili štatisticky významný rozdiel. V počte apoptoticky pozitívnych buniek sme zistili štatisticky vysoko preukazné rozdiely medzi hFVIII skupinou vo vzťahu k skupine kontrolnej a k skupine EGFP embryí 3: (1,2)** .

5.3 Ultraštruktúrna analýza vitrifikovaných transgénnych / mikroinjektovaných králičích embryí

Experimentami sme zistili, že u vakuol, celulárneho debrisu, flokulentných vezikul, jadrovej membrány a medzibunkových kontaktov existujú štatisticky vysoko významné rozdiely pri porovnaní skupiny mikroinjektovaných embryí s kontrolnou a EGFP skupinou,

3: (1, 2)** . V prípade cytoplazmatickej membrány, mikroklkov a mitochondrií sú štatisticky významné rozdiely pri porovnaní kontrolnej skupiny so skupinou EGFP i mikroinjektovaných králičích embryí, 1: (2,3)* , pričom u mitochondrií sme zistili aj štatisticky významný rozdiel medzi transgénymi skupinami embryí navzájom (2:3*). V počte tukových kvapôčok a drsného endoplazmatického retikula sú v porovnaní EGFP skupiny ku kontrolnej a mikroinjektovanej skupine embryí, 2:(1,3)** štatisticky vysoko významné rozdiely.

5.4 Kvalita králičích embryí na základe sledovania aneuploidie

Pri oocytoch, ktoré slúžili v našich experimentoch ako kontrola, bolo zistené 59,30% zastúpenie haploidných chromozomálnych sád. Zhodnotili sme 35%, 53,85% a 37,50% zastúpenie blastomér, ktoré niesli korektné počty chromozómov u 2-, 4-, 8- bunkových embryách ich preimplantačného vývoja. Zastúpenie aneuploide v jednotlivých skupinách embryí bolo nasledovné: 62,5% výskyt v 2-bunkovom štádiu a 54,7% v 8-bunkovom štádiu. Nižší výskyt aneuploidie bol zistený pri oocytoch - 40,70% a 34,65% u 4-bunkových embryí. Polyploidia bola v našich experimentoch zastúpená najmenej, v prípade 2-bunkových embryí to bolo 2,50 %-né zastúpenie a v prípade 8-bunkových králičích embryí sa polyploidia vyskytovala v 3,10 % všetkých hodnotených blastomér. Polovičný počet chromozómov bol zistený pri 4- a 8- bunkových embryách, v 11,5% a 4,7% zastúpení.

5.5 Potvrdenie lokalizácie transgénu metódou FISH

FISH-TSA bola uskutočnená pre identifikáciu chromozomálnej pozície ľudského koagulačného faktora VIII (hFVIII) u F2 transgénnych samcoch (jedinec 1-3-8) a dvoch potomkoch F3 generácie (♂24s a ♀35s). Príslušná štruktúra proteínov poukázala na 86% pozitivitu a 78% identitu pri porovnávaní s ľudskými kópiami. Králičia cDNA próba (1310 bp) je lokalizovaná na géne umiestnenom na konci q ramena X chromozómu.

6 NÁVRHY NA VYUŽITIE PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

Technika mikroinjekcie, ktorou získavame transgénne embryá i vitrifikácia v tekutom dusíku má v oblasti vedy veľké uplatnenie i využitie. Integrácia cudzích génov technikou mikroinjekcie je bežne používanou metódou, ktorá slúži k získavaniu ďalších transgénnych jedincov, ale už v podmienkach *in vivo*. V základnom výskume možno mikroinjekciu použiť na pochopenie a štúdium integrácie a expresie transgénov v genóme organizmu. Vitrifikácia embryí slúži na uchovávanie biologického materiálu (embryí, oocytov i spermií) v anabiotickom stave, kedy sú všetky biologické funkcie zastavené. Tento fakt v prípade embryí je dôležitým, pretože otvára otázku hodnotenia kvality embryí, ktoré prešli stresujúcim procesom vitrifikácie, na základe rôznych aspektov (vývojová potencia, fragmentácia, apoptotické bunky). Kryokonzervácia embryí z hľadiska praxe umožňuje vytváranie banky embryí s ich potenciálny následny prenos do recipientiek. Tvorba génovej banky umožňuje uchovávať najkvalitnejší biologický materiál (oocyty, spermie, embryá). Naše výsledky môžu rozširujú poznanie a na ich základe je možné stále optimalizovať a zefektívňovať techniku mikroinjekcie ako aj vitrifikačných protokolov i médií. Hodnotenie výskytu chromozomálnych aberácií u embryí dokáže zabezpečiť ich riadenú selekciu a vylúčiť ich z reprodukčného cyklu a zamedziť tak prenos geneticky podmieneného ochorenia na potomstvo.

7 ZÁVER

Experimenty, ktorých výsledky sú uvedené v našej dizertačnej práci, sú dokumentáciou vplyvu integrovaného transgénu v genóme králičích embryí a tiež poukazujú na vplyv vitrifikácie na kvalitu králičích embryí.

Sledovali sme prežívateľnosť a kvalitu dvoch typov transgénnych králičích embryí (EGFP pozitívnu a hFVIII pozitívnu skupinu). Kontrolnou skupinou vo všetkých experimentoch boli intaktné králičie embryá. Analýzami sme zistili:

- mikroinjekcia transgénu do prvojadra oplodneného králičieho vajčka ani integrácia v genóme negatívne neovplyvňuje schopnosť dosiahnutia voľnej blastocysty
- v celkovom počte buniek sme zistili štatisticky vysoko významné rozdiely medzi transgénnymi skupinami navzájom a medzi kontrolnou a hFVIII pozitívnou skupinou králičích embryí
- podiel apoptotických buniek bol najvyšší v EGFP pozitívnych králičích embryách, čo je štatisticky vysoko významné v porovnaní s kontrolnou skupinou i s hFVIII pozitívnymi skupinami. Štatisticky vysoko signifikantný rozdiel sme zistili i v porovnaní kontrolnej skupiny s hFVIII pozitívnymi embryami.

Okrem vplyvu integrácie transgénu sme sledovali aj vplyv vitrifikácie na prežívateľnosť a kvalitu transgénnych králičích embryí. Výsledky týchto experimentov dokumentujú:

- prežívateľnosť vitrifikovaných/devitifikovaných embryí bola preukazne nižšia v porovnaní s kontrolnou skupinou
- v prípade transgénnych embryí sme zaznamenali zastavenie preimplantačného vývoja i fragmentáciu embryí
- priemerný celkový počet buniek je preukazne vyšší u hFVIII pozitívnych embryí v porovnaní s kontrolnou skupinou
- počet apoptotických buniek bol najnižší u hFVIII pozitívnych embryí, čo je signifikantne menej v porovnaní s kontrolnou i EGFP pozitívnou skupinou.

Kvalitu na ultraštruktúrálnej úrovni sme hodnotili u vitrifikovaných (EGFP pozitívnych a EGFP negatívnych - mikroinjektovaných) králičích embryí, pričom sme zistili:

- najvyšší podiel patologických zmien bol v prípade vitrifikovaných transgénnych králičích embryí.

- *in vitro* získané EGFP pozitívne embryá, mali najvyšší podiel poškodenia mikroklkov, drsného endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu i mitochondrií, ktoré možno považovať sa senzitívne indikátory zmien a porušení v bunkách
- medzibunkové kontakty, cytoplazmatická a jadrová membrána niesli zvýšené patologické zmeny u mikroinjektovaných králičích embryí.

Pri sledovaní abnormálneho počtu chromozómov v blastomérach králičích embryí a pri potvrdení lokalizácie ľudského faktora VIII (hFVIII) na chromozónoch sme dospeli k záveru:

- pri porovnávaní oocytov ako kontroly a 2-bunkového preimplantačného embryonálneho štádia, bol štatisticky vysoko významne vyšší podiel aneuploidie v embryách ($p < 0,01$)
- u králikov F2 a F3 generácie bol na chromozónoch lokalizovaný hFVIII a to poukázalo na vertikálne prerozdelenie jednotlivých lokusov. Silnú X chromozóm konzerváciu medzi človekom a králikom potvrdila FISH metóda, pretože vlastný králičí FVIII gén je lokalizovaný v podobnej oblasti (q ramená X chromozómu) ako u ľudí (Xq28)

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

- BÖZSE, Z – HIRIPI, L. – CARNWATH, J.W. – NIEMAN, H. 2003. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. In: *Transgenic Res* 12. 2003. s. 541-553.
- CHALFIE, M. - KAIN, S.R. 2005. Green fluorescent protein: properties, applications and protocols. 2. vydanie. USA:Wiley-interscience, 2005, s. 443. ISBN 0-471-73682-1
- CHRENEK, P. 2002b. Genetické manipulácie s embryami. Monografia. Publikácie VÚŽV Nitra 7. s. 83. 2002. ISBN 80-88872-25-1.
- CHRENEK, P. - VASICEK, D. - MAKAREVICH, A.V. - JURCIK, R. - SUVEGOVA, K. - PARKANYI, V. - BAUER, M. – RAFAY, J. - BATOROVA, A. - PALEYANDA, R.K. 2005. Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos. In: *Transgenic Research* 14 . 2005. s. 417-428.
- CHRENEK, P. – MAKAREVICH, A.V. 2005b. Production of rabbit chimeric embryos by aggregation of zona-free nuclear transfer blastomeres. In: *Zygote*, 13. 2005. s. 39-44.
- GROFÍK R. - FLAK P. 1990. Štatistické metódy v poľnohospodárstve. Bratislava: Príroda. s. 344. ISBN 80-07-00018-6.
- HOUDEBINE, L. M. (1998) *Les animaux transgeniques. Techniques and Documentation*. Inra, Jouy-en-Josas, 180.
- HSIAO – SHENG L., MING – SHION J., CHAO – KAI CH., PING – HONG CH., NIR – JIHN K. 1999. Is green fluorescent protein toxic to living cells? *Biochemical and biophysical reserach communications* 260. 1999. s. 712 – 717.
- KASAI, M. - ITO, K. - EDASHIGE, K. 2002. *Morfological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury*. In: *Human Reproduction*, 17. 2002. s. 1863 – 1874.
- KRYLOV, V. – TLAPÁKOVÁ, T. – MÁCHA, J. 2007. Localization of the single copy gene *Mdh2* on *Xenopus tropicalis* chromosomes by FISH-TSA. In: *Cytogenetic and genome research*.116 (1-2). 2007. s. 110-2.
- MAKAREVICH, A.V. - CHRENEK, P. - ZILKA, N. - PIVKO, J. - BULLA, J. 2005. *Preimplantation development and viability of in vitro cultured rabbit embryos derived from in vivo fertilized gene – microinjected eggs: apoptosis and ultrastructure analyses*. In: *Zygote*, 13. 2005. s. 125 – 137.

- MAKAREVICH, A.V. – CHRENEK, P. – FLAK, P. 2006. *The influence of microinjection of foreign gene into the pronucleus of fertilized egg on the preimplantation development, cell number and diameter of rabbit embryos*. In: Asian-Aust. J. Anim. Sci., 19 (1). 2006. s. 1-5.
- MATÝŠKOVÁ A KOL. 1999. Hematologie pro zdravotní laboranty. Institut pro další Vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno. 1999. In. <http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/fiagg.htm>
- MOCE, M.L. - SANTACREU, M.A. – CLIMENT, A. - PEIRO, R. - BLASCO, A. 2005. In vivo development of vitrified rabbit embryos: effects on prenatal survival. In: *World rabbit science*, 13. 2005 s. 279-298.
- MUNRO, S. 1968. Basic research laboratory. Hy-line Poultry farms. Monograph, 1968, s. 320.
- ÖZKAVUKCU, S. - ERDEMLI, E. 2002. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. In: *Journal Of Ankara Medical School*, 4 (24). 2002. s. 187 – 196.
- POPELKOVÁ, M. - CHRENEK, P. - PIVKO, J. - MAKAREVICH, A.V. - KUBOVIČOVÁ, E. - KAČMÁRIK, J. 2005. Survival and ultrastructure of gene - microinjected rabbit embryos after vitrification. In: *Zygote*, 13. 2005. s. 283-293.
- POPELKOVÁ, M. 2006. *In vitro* manipulácie s embryami hovädzieho dobytku a kráľika. Dizertačná práca. UVL Košice. s. 105.
- VAJTA, G. - HOLM, P. - KUWAYAMA, M. - BOOTH, P.J. - JACOBSEN, H. GREVE, T. & CALLESEN, H. 1998. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. In: *Mol. Reprod. Dev.* 51. 1998. s. 53–58.
- WEAVER - HEDRICK. 1995. Basic genes. In: *Wm C Brown Publishers*, 1995.
- WEIBEL, E.R. – BOLENDER, R.P. 1973. Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques for Electron Microscopy*, 3. 1973. s. 237.

9 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

MAKAREVICH, A.V. – CHRENEK, P. – OLEXÍKOVÁ, L. – POPELKOVÁ, M. – TURANOVÁ, Z. – OSTRÓ, A. – PIVKO, J. 2008. Post-thaw survival, cell death and actin cytoskeleton in gene-microinjected rabbit embryos after vitrification. In: *Theriogenology*, 70 (4). 2008. s. 675-681.

POPELKOVÁ, M. – TURANOVÁ, Z. – KOPRDOVÁ, L. – OSTRÓ, A. – TOPORCEROVÁ, S. – MAKAREVICH, A.V. – CHRENEK, P. 2008. Effect of vitrification technique and assisted hatching on rabbit embryo developmental rate. In: *Zygote*, 17. 2008. s. 57 – 61.

ADF Vedecké práce v domácich nekarentovaných časopisoch

TURANOVÁ, Z. – KOPRDOVÁ, L. – BAUER, M. – OLEXÍKOVÁ, L. - MAKAREVICH, A.V.- OSTRÓ, A. – ZIVCAK, P. - CHRENEK, P. 2008. Quality of rabbit transgenic embryos. In: *Slovak J. Anim. Sci.*, 41 (3). 2008. s. 109-112.

AED Vedecké práce v domácich recenzovaných zborníkoch

POPELKOVÁ, M. – TURANOVÁ, Z. – KOPRDOVÁ, L. - ET. AL. 2007. Vplyv vitrifikačnej metódy a asistovaného hatchingu na vývojovú potenciú králičích embryí. In: *16. Schwarzov deň – Nové trendy v asistovanej reprodukcii – zborník prác*. Košice. 2007. ISBN – 978 – 80 – 232 – 0285 – 4.

ŽDILOVÁ, V. – TURANOVÁ, Z. – OLEXÍKOVÁ, L. – ET. AL. 2007. Králičie embryo ako model pre kryokonzerváciu embryí v humánnej asistovanej reprodukcii. In: *16. Schwarzov deň – Nové trendy v asistovanej reprodukcii – zborník prác*. Košice. 2007. ISBN – 978 – 80 – 232 – 0285 – 4.

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

TURANOVÁ, Z. – MAKAREVICH, A.V. – BAUER, M. – CHRENEK, P. 2007. Viability of preimplantation rabbit transgenic embryos. In: *Zborník abstraktov zo VII. Celoslovenského seminára z fyziológie živočíchov. FBP SPU Nitra*. 2007. ISBN – 978-80-8069-885-0.

KOPRDOVÁ, L. – TURANOVÁ, Z. – CHRENEK, P. 2007. Vplyv mikroinjekcie a vitrifikácie na prežívateľnosť králičích embryí. In: *Zborník z VIII. vedeckej konferencie doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov*. FPV UKF. Nitra. 2007. ISBN – 978-80-8094-105-5.

TURANOVÁ, Z. – OLEXÍKOVÁ, L. – MAKAREVICH, A.V. – CHRENEK, P. 2008. Quality of rabbit transgenic embryos after vitrification. In: *Biotechnology 2008*. s. 405-407. ISBN – 80-85645-58-0.

KOPRDOVÁ, L. – BAUER, M. - **TURANOVÁ, Z.** – CHRENEK, P. 2008. Effect of gene concentration on transgene integration and expression. In: *Biotechnology 2008*. ISBN – 80-85645-58-0.

TURANOVÁ, Z. – PIVKO, J. – CHRENEK, P. 2009. Pathological changes of ultrastructure in transgenic rabbit embryos. In: *Mladí vedci 2009 – zborník vedeckých prác doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov*. FPV UKF Nitra. s. 249-254. ISBN – 978-80-8094-499-5.

BDF Odborné práce v nekarentovaných domácich časopisoch

TURANOVÁ, Z. – KOPRDOVÁ, L. - CHRENEK, P. 2008. Zásady konzervovania embryí. In: *Slovenský chov*, 7. 2008. 10s.

Práca bola finančne zabezpečená z projektu **APVV LPP-0126-06**.

