

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - 17.3.2014

Asistovaná reprodukce živočichů a klonování

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



search



Testimonials

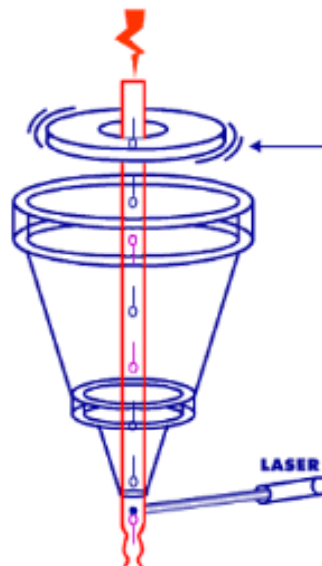
"If you run the economics of using semen, particularly in flushing, you make a whole lot more money using sexed semen than conventional semen.

I've done 5 flushes now, and I would not use conventional semen for flushes if I had Sexed Semen available from a variety of bulls.

Conception rates on embryos are as good as they are with regular semen."

- Jack A. Dutton -Dutton Simmentals

Sorting Process



1. A piezo electric crystal is undulated approximately 90,000 times/second, which breaks the stream into droplets at a particular point in time. The location of the last-attached droplet in the stream is highly controllable.
2. An X- or Y-bearing sperm is compared to a preset sort criteria.
3. After a time delay, the insertion rod is charged.
4. A charge is applied at the time the cell reaches the tip.

Bulls

Beef Cattle Bulls

- [Gray Brahman](#)
- [Red Brahman](#)
- [Angus](#)
- [Red Angus](#)
- [Red Brangus](#)
- [Simmental](#)
- [Braunvieh](#)
- [Beefmaster-Hereford-Wagyu](#)
- [Gyr-Guzerat-Bucking](#)
- [AI Recommendations Beef](#)

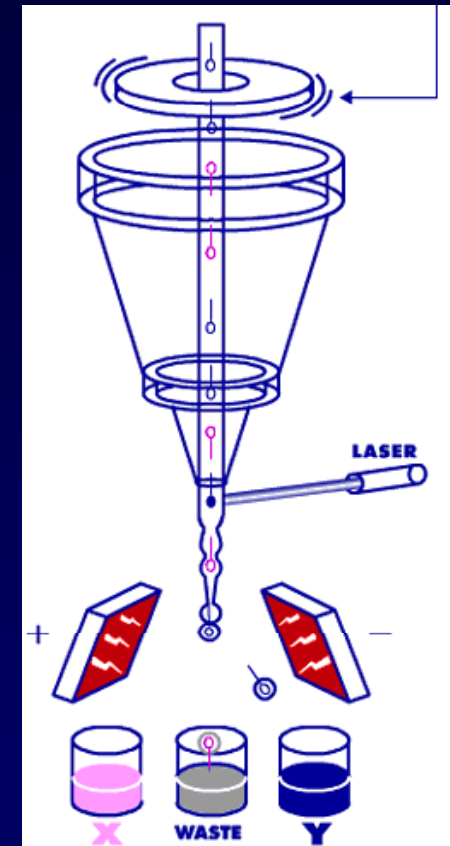
Program přednášky:

- asistovaná reprodukce u živočichů
přehled a praktické aplikace
- klonování živočichů
partenogeneze
splitting techniky
klonování pomocí tvorby chimér
metoda transferu jader (SCNT)
tvorba cybridů

ASISTOVANÁ REPRODUKCE U ŽIVOČICHŮ

Inseminace u hospodářských zvířat:

- možnost kryokonzervace spermií (40. léta 20. stol.)
- minimalizace počtu chovných býků
- experimenty s transplantací spermatogonií: umělá produkce vynikajících plemenů
- třídění spermií →
(uplatnění v cíleném chovu skotu na mléko nebo na maso)
úspěšnost ~90%



Asistovaná reprodukce u hospodářských zvířat:

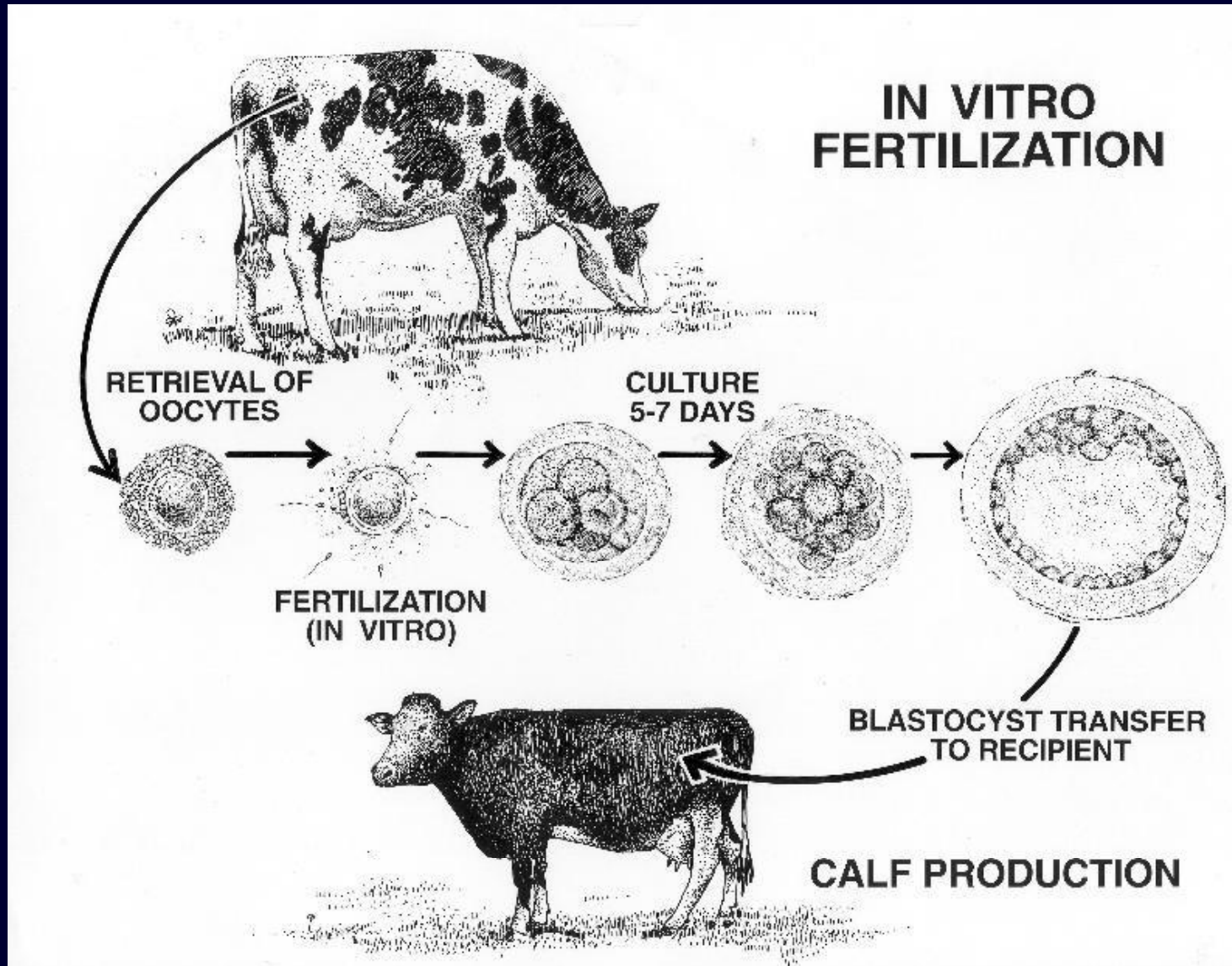
- hormonální stimulace → superovulace → inseminace → výplach embryí → transfer embryí (ET) / kryokonzervace embryí
- úspěšnost: 60-75% po transferu čerstvých embryí
35-45% po kryoembryotransferu

Ryuzo Yanagimachi (1998)

- experimenty s lyofilizací spermií
- nutnost ICSI



In vitro fertilizace u hospodářských zvířat:



Obchodování s embryi skotu

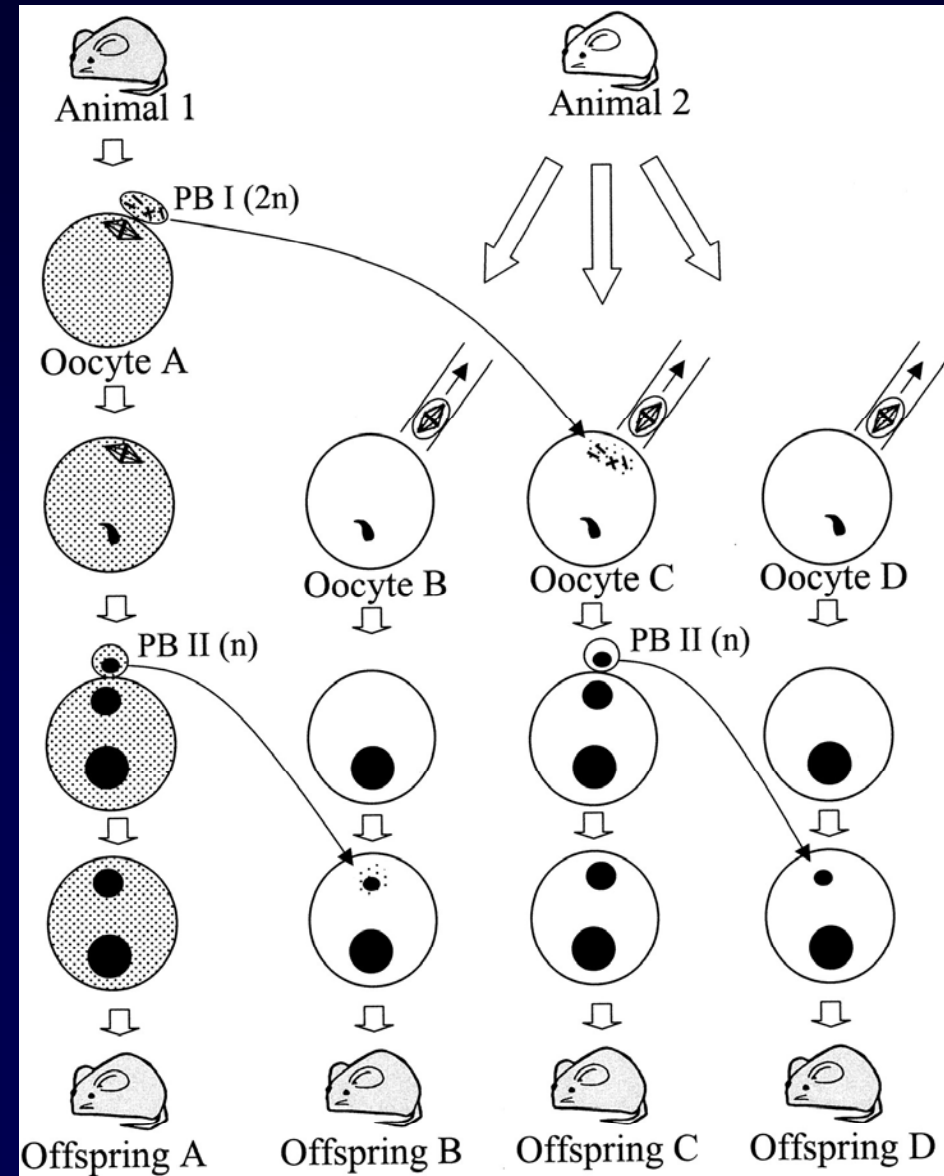
- rychlé zkvalitnění chovu zvířat (aukce embryí)
- superovulace , inseminace , výplach embryí
(od 1 krávy 5-6 embryí, max. kolem 20)
- produkce embryí pomocí IVF
(odběr oocytů z těl krav na jatkách nebo živých zvířat - opakovaně i během březosti)

Problémy u ostatních hospodářských zvířat:

- ovce, kozy - neekonomické
- prasata - problémy s polyspermií při IVF
- koně - nutnost ICSI

Teruhiko Wakayama a Ryuzo Yanagimachi (1998)

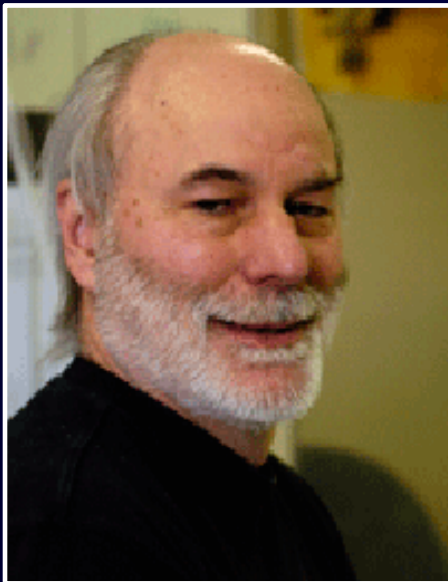
- vytváření funkčních oocytů transferem jádra z pólocytu u myši (úspěšnost metody 30-57%)



Snaha získat potomstvo od zvířat v co nejnižším věku

- hormonální stimulace nedospělých zvířat (jehničky: 6 týdnů, jalovice: 2-6 měsíců)
- odběr oocytů z nenarozených samičích plodů

John Eppig (Jackson Lab)



živé potomstvo z primordiálních oocytů kompletně kultivovaných in vitro

(myšák Egbert)



Využití technik AR pro záchranu ohrožených druhů

- **panda obrovská** (*Ailuropoda melanoleuca*):
IUI, získávání spermatu elektroejakulací
kryokonzervace spermatu
odběr spermatu *post mortem*
(další biotechnologie pouze na úrovni experimentů)



Využití technik AR pro záchranu ohrožených druhů

- 2014: **žralůček skvrnitý** (*Chiloscyllium punctatum*): IUI u samice v Sea Life Melbourne



- výhledově snaha o záchranu žraloka písečného

KLONOVÁNÍ ŽIVOČICHŮ

Metody klonování živočichů

- partenogeneze
- splitting techniky
- tvorba chimér
- přenos jádra somatické buňky
(SCNT, Somatic Cell Nucleus Transfer)

- vnitrodruhové klonování
- mezidruhové klonování = tvorba cybridů
(= cytoplazmatických hybridů)

(1) PARTENOGENEZE

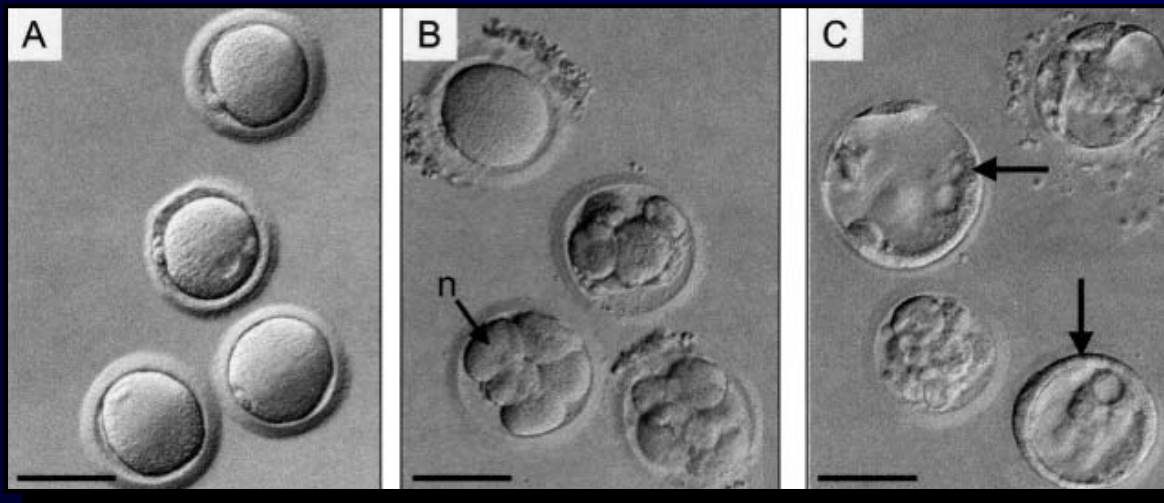
- přirozeně u bezobratlých (hmyz) i obratlovců (ještěrky, hadi, ryby, obojživelníci)

Savci - aktivace partenogeneze *in vitro*:

- myš (forelimb bud stage), ovce, kráva, prase, králík (11 dní), opice, primáti (implantační stádium)
- poruchy v regulaci diferenciaci (extraembryonální tkáně a mesoderm) – genetický imprinting
- životaschopné myši (partenoti) – rekonstruovaná embryo ze dvou maternálních genomů (Kono et al., Nature 428, 860-864, 2004)

Partenogeneze u člověka

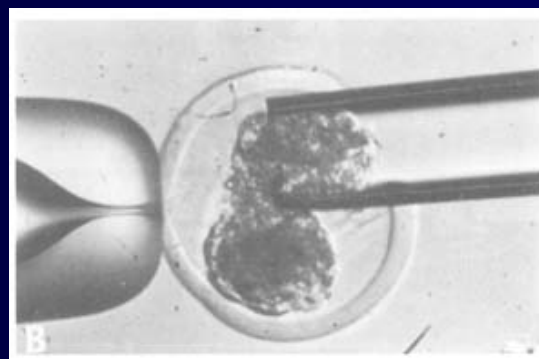
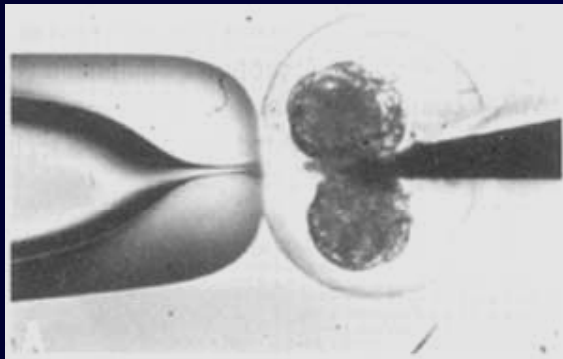
- spontánně *in vivo* u některých typů germinálních tumorů (teratomy ovarií)
- partenogenetický chimerismus u pacientů s vývojovými nebo sexuálními poruchami
- indukovaná partenogeneze *in vitro* (stádium blastocysty: 5-6 dní vývoje)

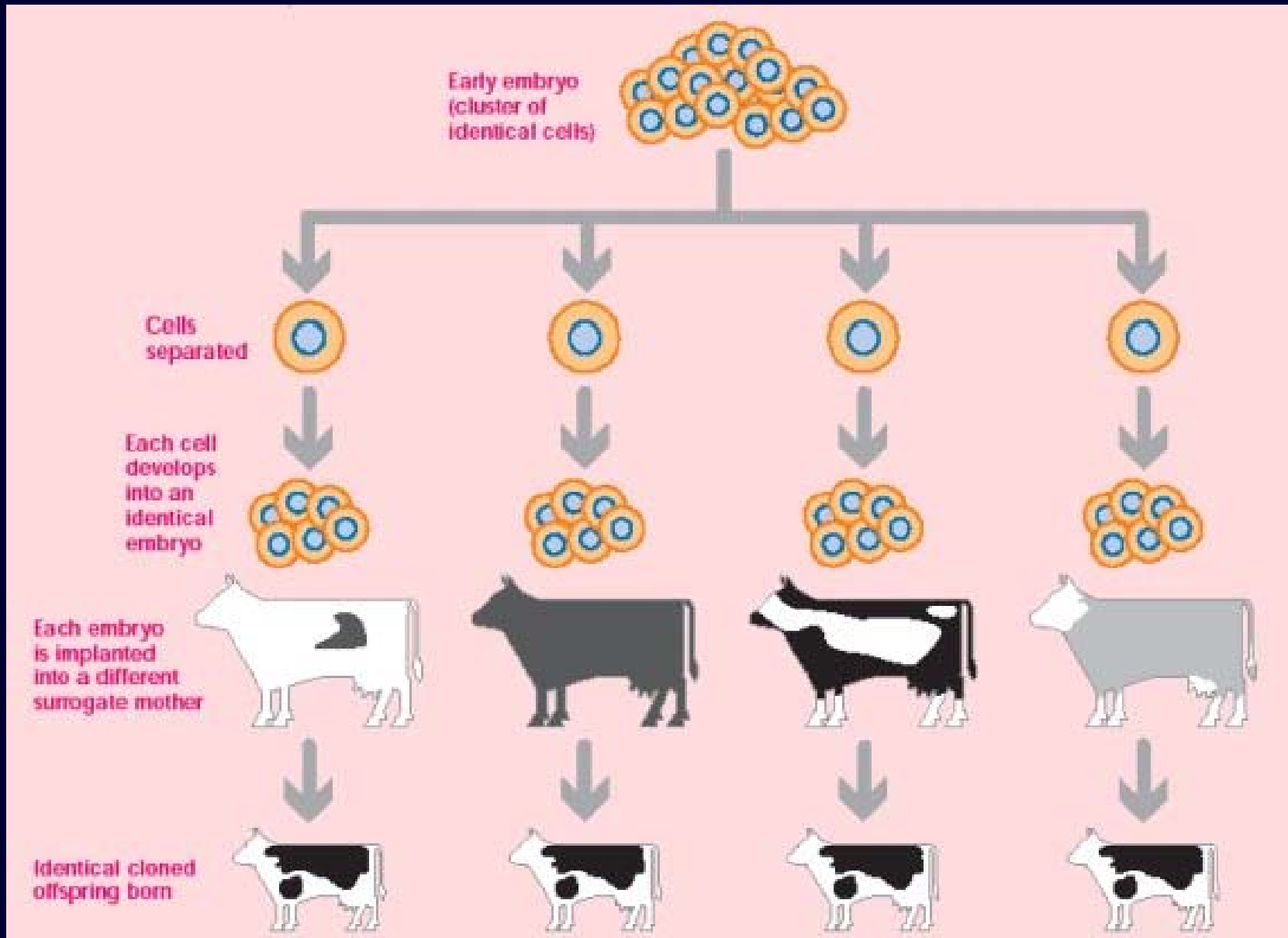


Cibelli et al., 2001
Advanced Cell Technology

(2) SPLITTING TECHNIKY

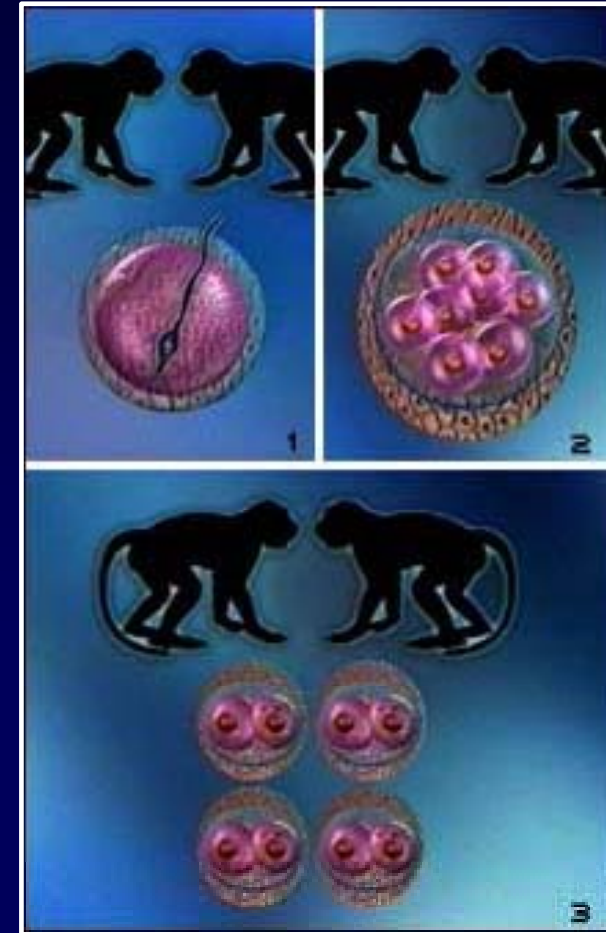
- rozdělení embrya během časných stádií vývoje mikromanipulačními technikami
- 1892 – Hans Driesch (mořská ježovka)
1902 – Hans Spemann (žába)
- **praktické aplikace v chovu skotu** (v kombinaci s dalšími metodami AR)
- **úspěšnost při dělení na max. 4 části**





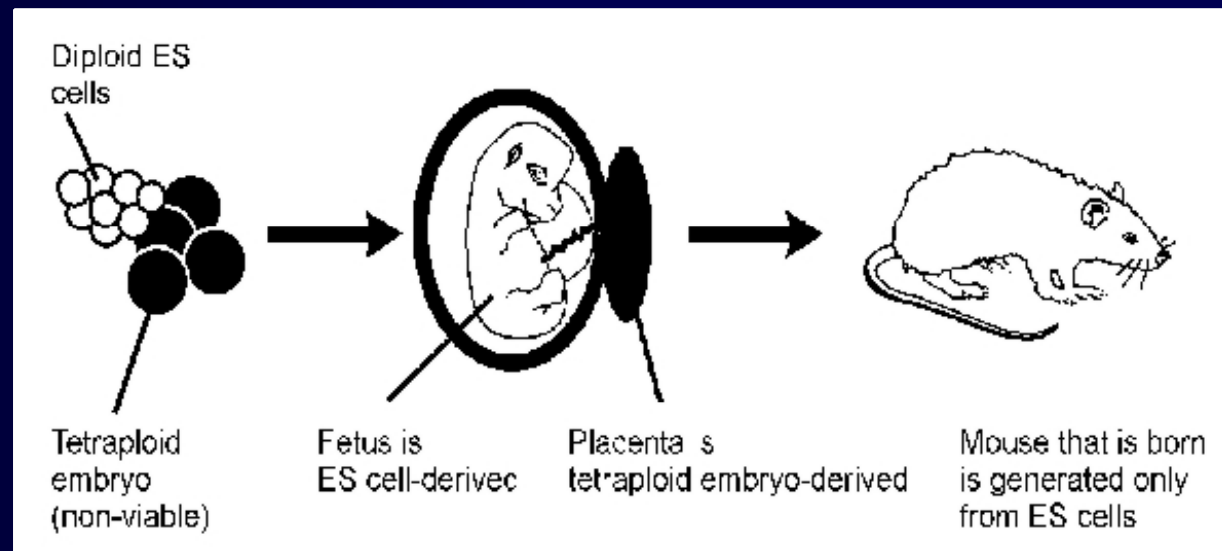
2000 - Gerald Schatten

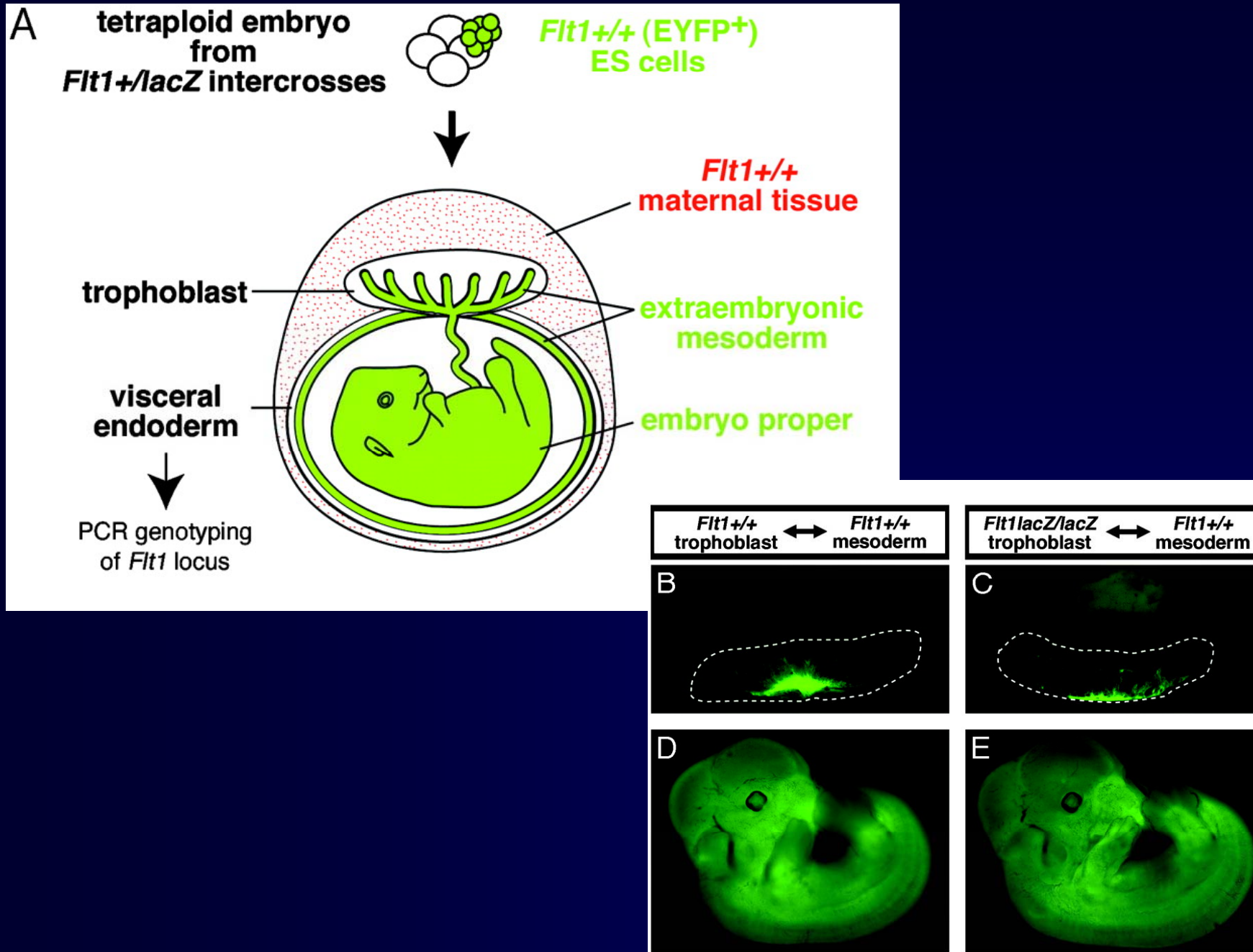
- klonování makaka splitting technikou
- rozdělení embrya na 4 části:
1 živé mládě - **samička Tetra**



(3) KLONOVÁNÍ METODOU TVORBY CHIMÉR

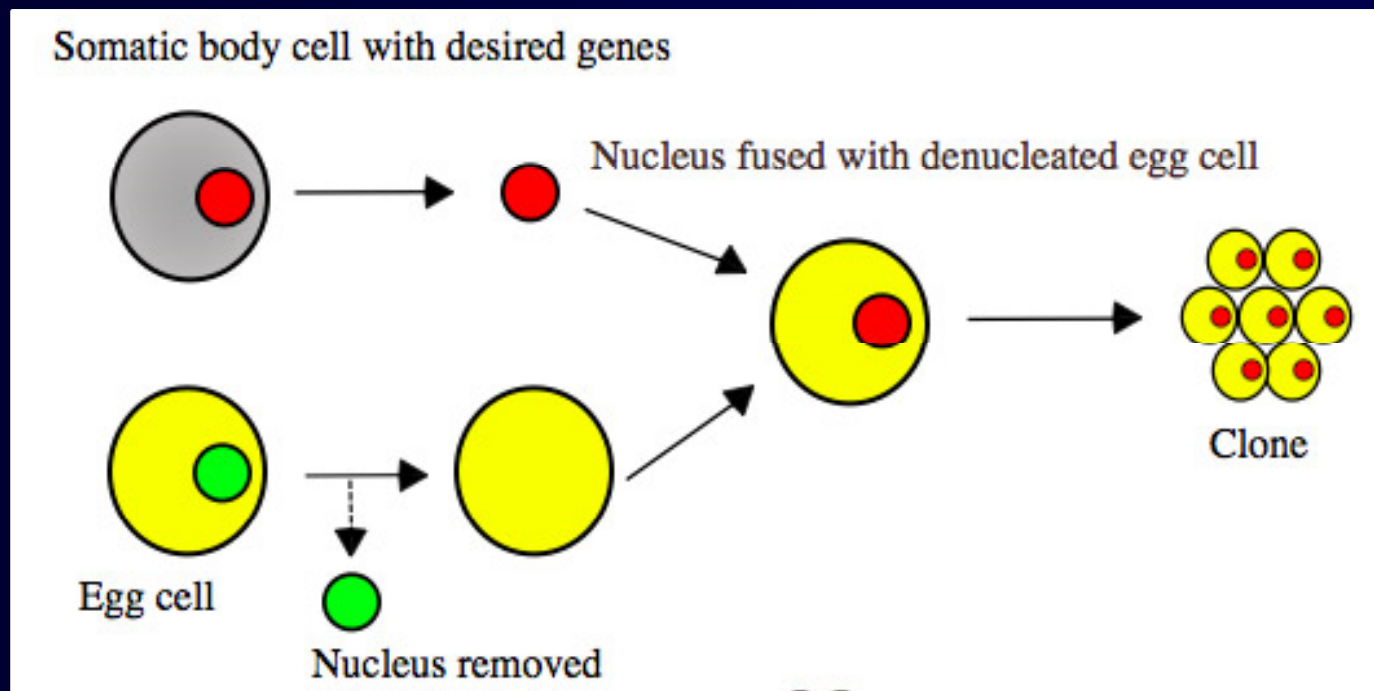
- fúze embryonálních kmenových buněk = ESCs (somatické buňky) s tetraploidním embryem:
tetraploidní buňky → trofoblast
diplodní ESCs → embryoblast
- **Janet Rossant et al. (PNAS 1993): klony myši**

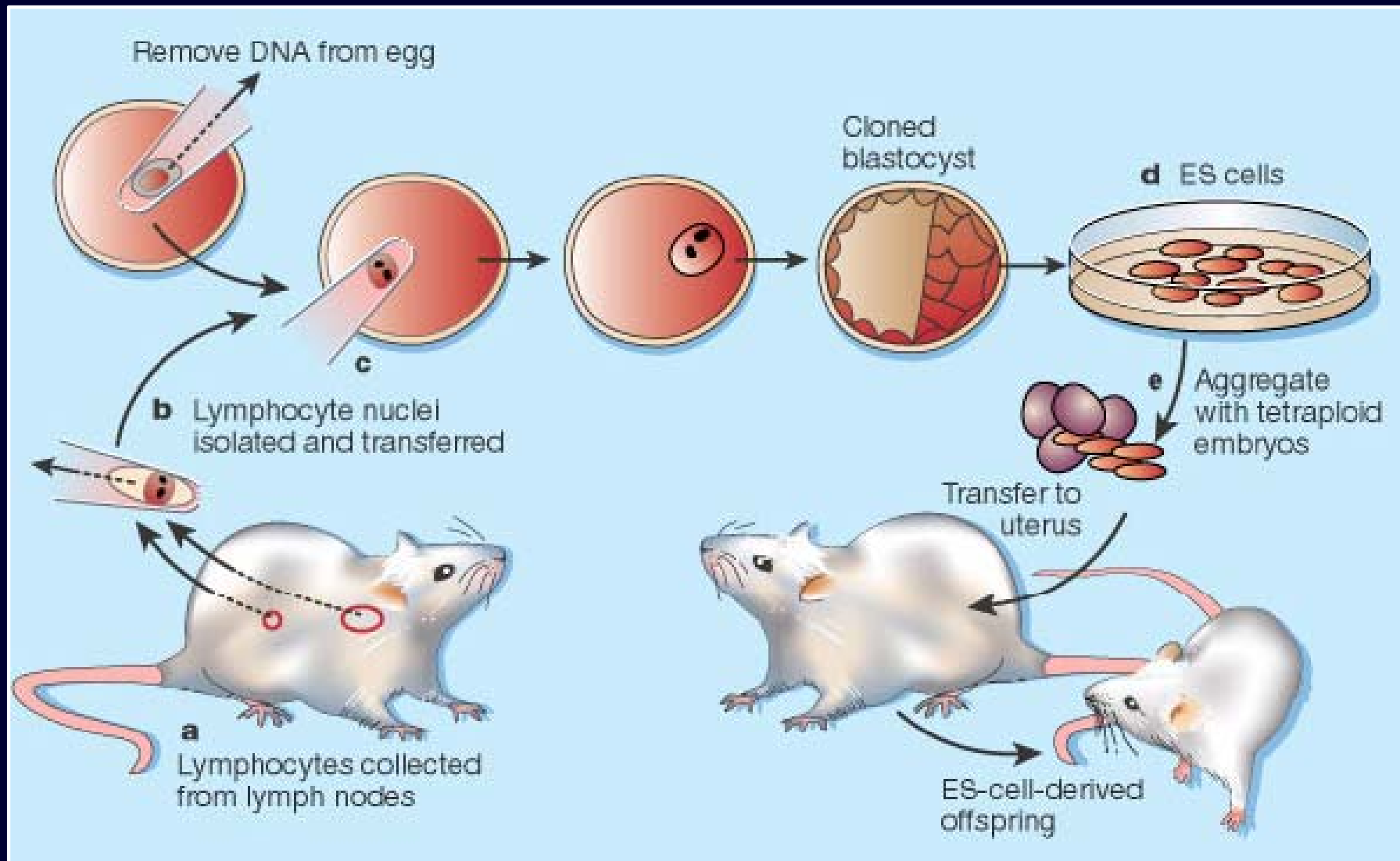




(4) PŘENOS JÁDRA SOMATICKÉ BUŇKY (SCNT)

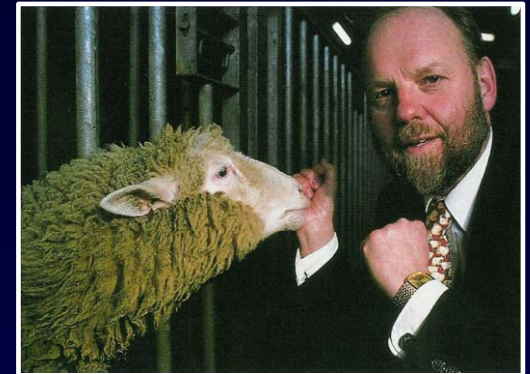
- jádro somatické buňky vneseno do enukleovaného oocytu:
 - a) elektrofúze
 - b) intracytoplazmatická injekce diploidního jádra





tzv. dvojité metoda klonování

- 50. a 60. léta 20.stol.: experimenty na obojživelnících, rybách
- později SCNT embryonální buňky savců
- **Dolly: poprvé SCNT buňky dospělého savce (Ian Wilmut et al. 1997, Roslin Institute, UK)**
- dosud metodou SCNT **naklonováno 19 druhů savců:** ovce, kráva, myš, koza, gaur (tur), prase, jelen, muflon, mula, kůň, kočka, králík, potkan, fretka, pes, bizon, vlk, pyrenejský kozorožec, velbloud
- **neúspěchy při klonování primátů** (poruchy mitotického aparátu v důsledku enukleace)



1952 – SCNT u obojživelníků (žáby)



Robert Briggs (A ; 1911-1983)
Thomas J. King (B ; 1921-2000)

- ² Steinbach, H. B., *Am. J. Physiol.*, **167**, 284 (1951).
³ Lorente de No, R., *J. Cell. & Comp. Physiol.*, **33**, suppl. (1949).
⁴ Tobias, J. M., *Ibid.*, **36**, 1 (1950).
⁵ Levi, H., and Ussing, H. H., *Acta Physiol. Scand.*, **16**, 232 (1948).

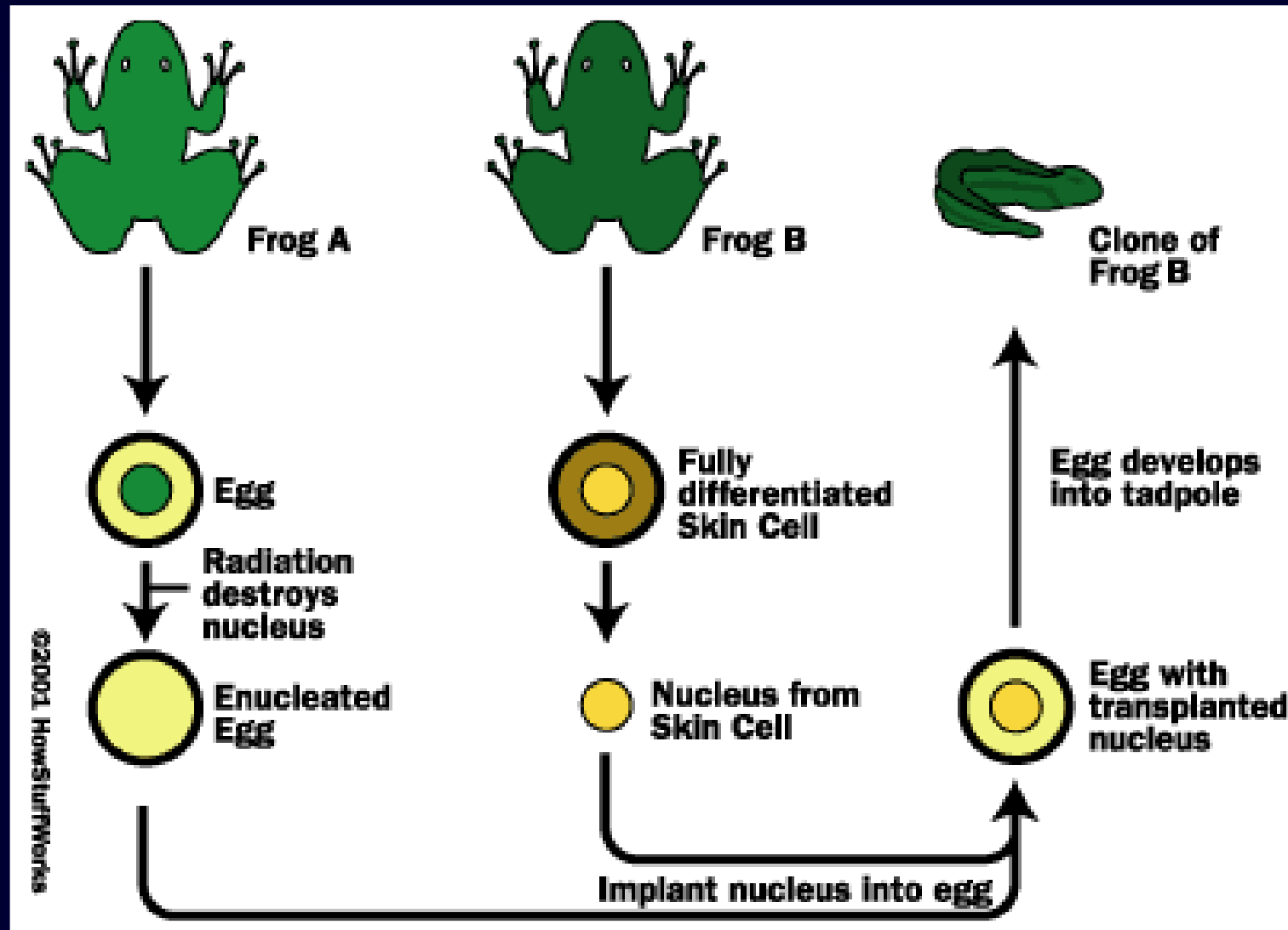
*TRANSPLANTATION OF LIVING NUCLEI FROM BLASTULA
CELLS INTO ENUCLEATED FROGS' EGGS**

BY ROBERT BRIGGS AND THOMAS J. KING

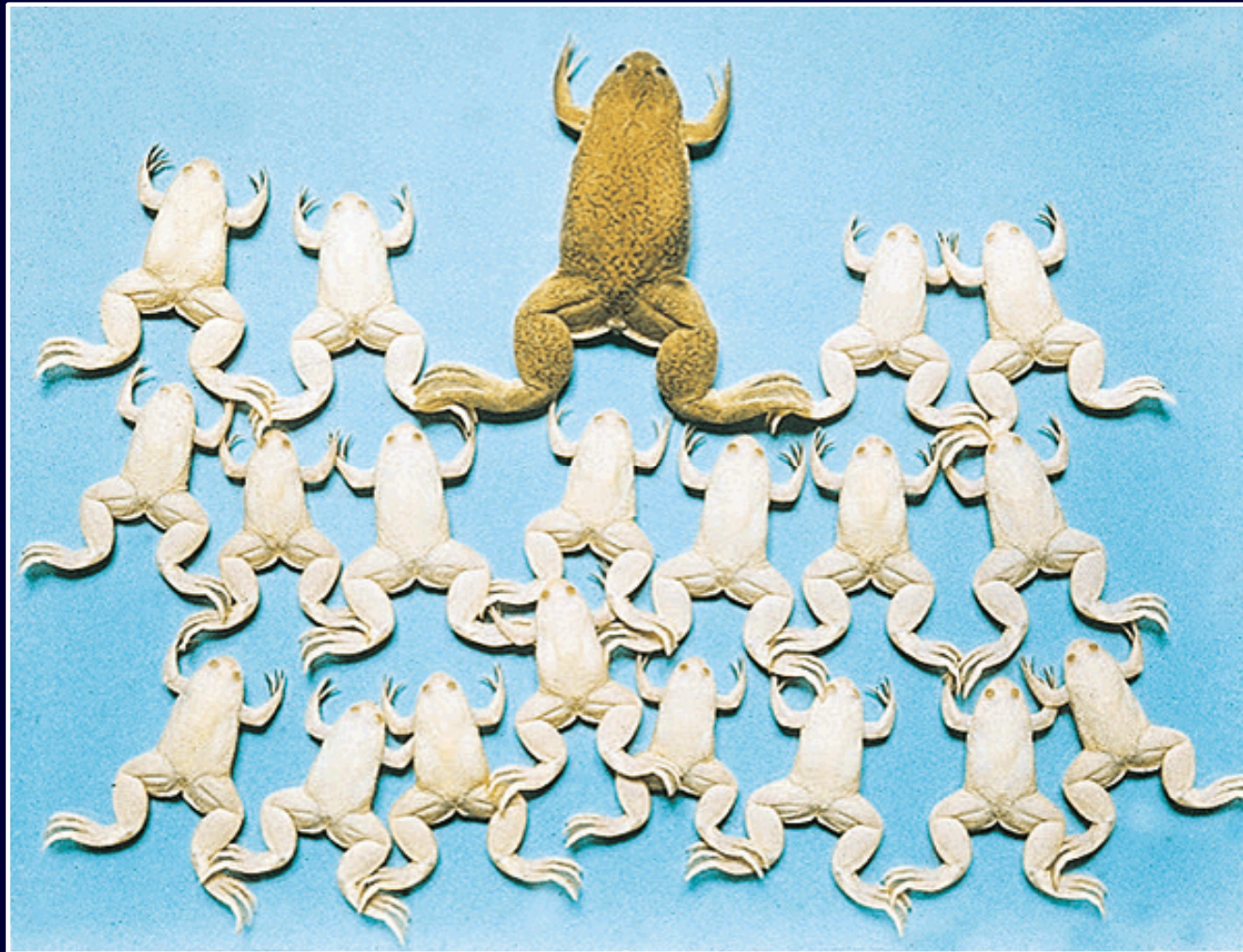
INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH AND LANKENAU HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE,
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA

Communicated by C. W. Metz, March 15, 1952

Introduction.—The role of the nucleus in embryonic differentiation has been the subject of investigations dating back to the beginnings of experimental embryology. At first it was supposed by Roux, Weismann and others that differentiation is the result of qualitative nuclear divisions,



1970: John Gurdon

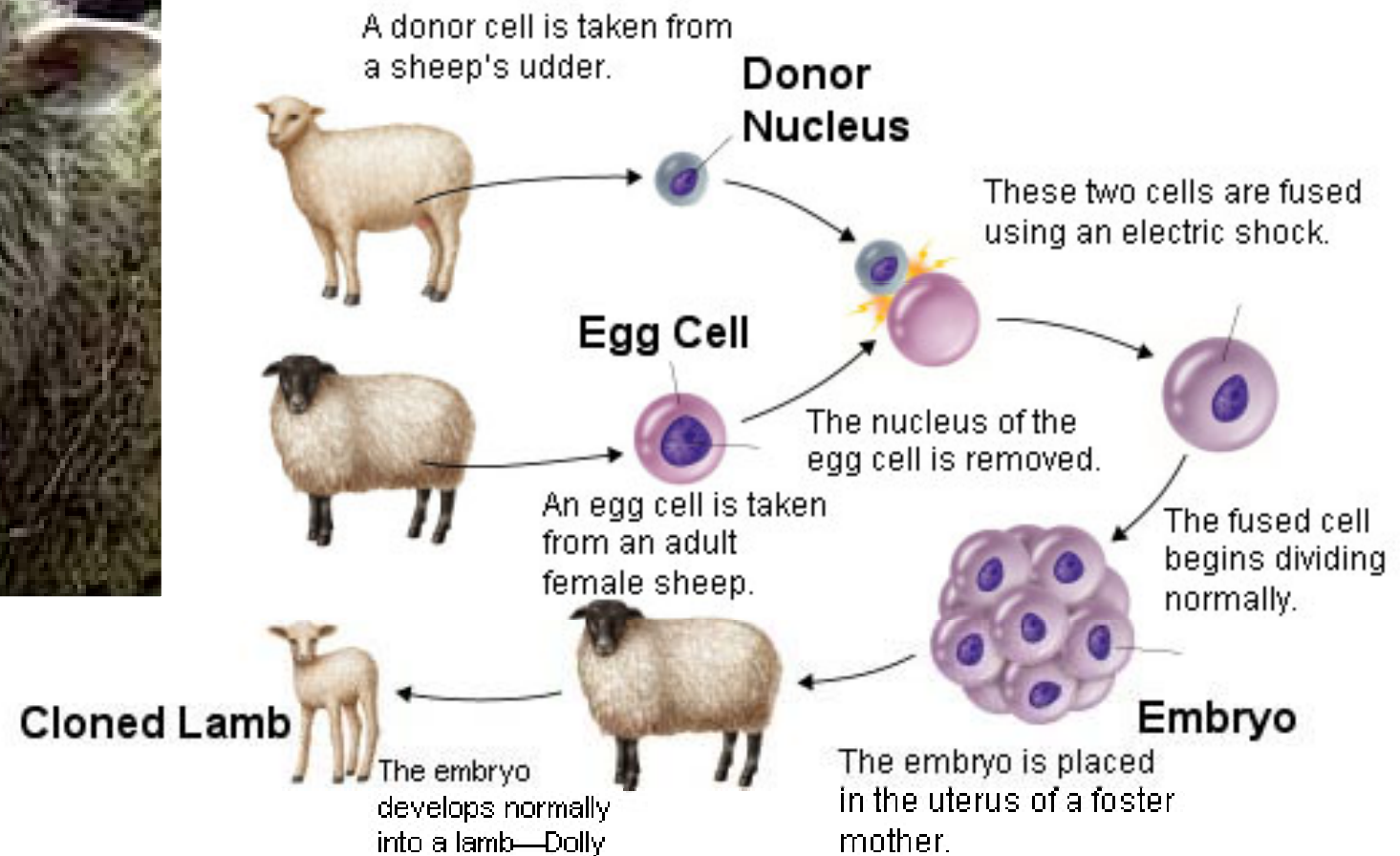


1984 (1986) – Steen Willadsen

- poprvé klonování ovcí metodou SCNT
- jádro z buněk rýhujícího se embrya, enukleovaný oocyt



???



Dolly

1996 - 2003

Dolly



Bonnie



The Maternal Nucleolus Is Essential for Early Embryonic Development in Mammals

Sugako Ogushi,^{1,2,3*} Chiara Palmieri,⁵ Helena Fulka,^{3,4} Mitinori Saitou,² Takashi Miyano,¹ Josef Fulka Jr.³

With fertilization, the paternal and maternal contributions to the zygote are not equal. The oocyte and spermatozoon are equipped with complementary arsenals of cellular structures and molecules necessary for the creation of a developmentally competent embryo. We show that the nucleolus is exclusively of maternal origin. The maternal nucleolus is not necessary for oocyte maturation; however, it is necessary for the formation of pronuclear nucleoli after fertilization or parthenogenetic activation and is essential for further embryonic development. In addition, the nucleolus in the embryo produced by somatic cell nuclear transfer originates from the oocyte, demonstrating that the maternal nucleolus supports successful embryonic development.

www.sciencemag.org **SCIENCE** VOL 319 1 FEBRUARY 2008

613

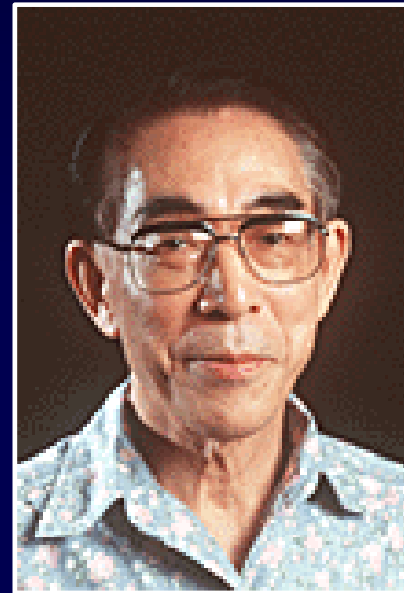
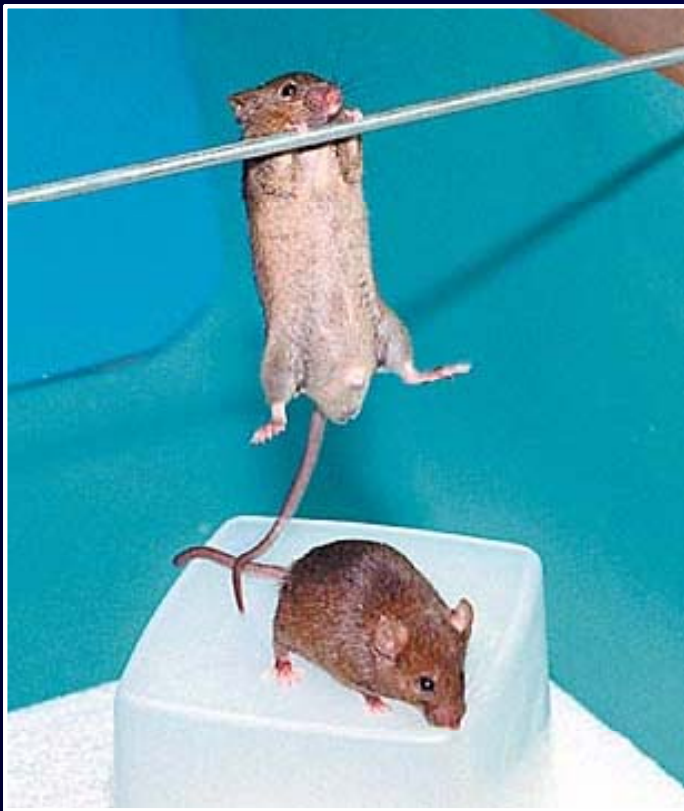
1998, Japonsko (Ishikawa):

- 2 klonovaná telata
- "Roslin method", druhé klonování dospělého savce



1998, USA (Honolulu, Hawaii):

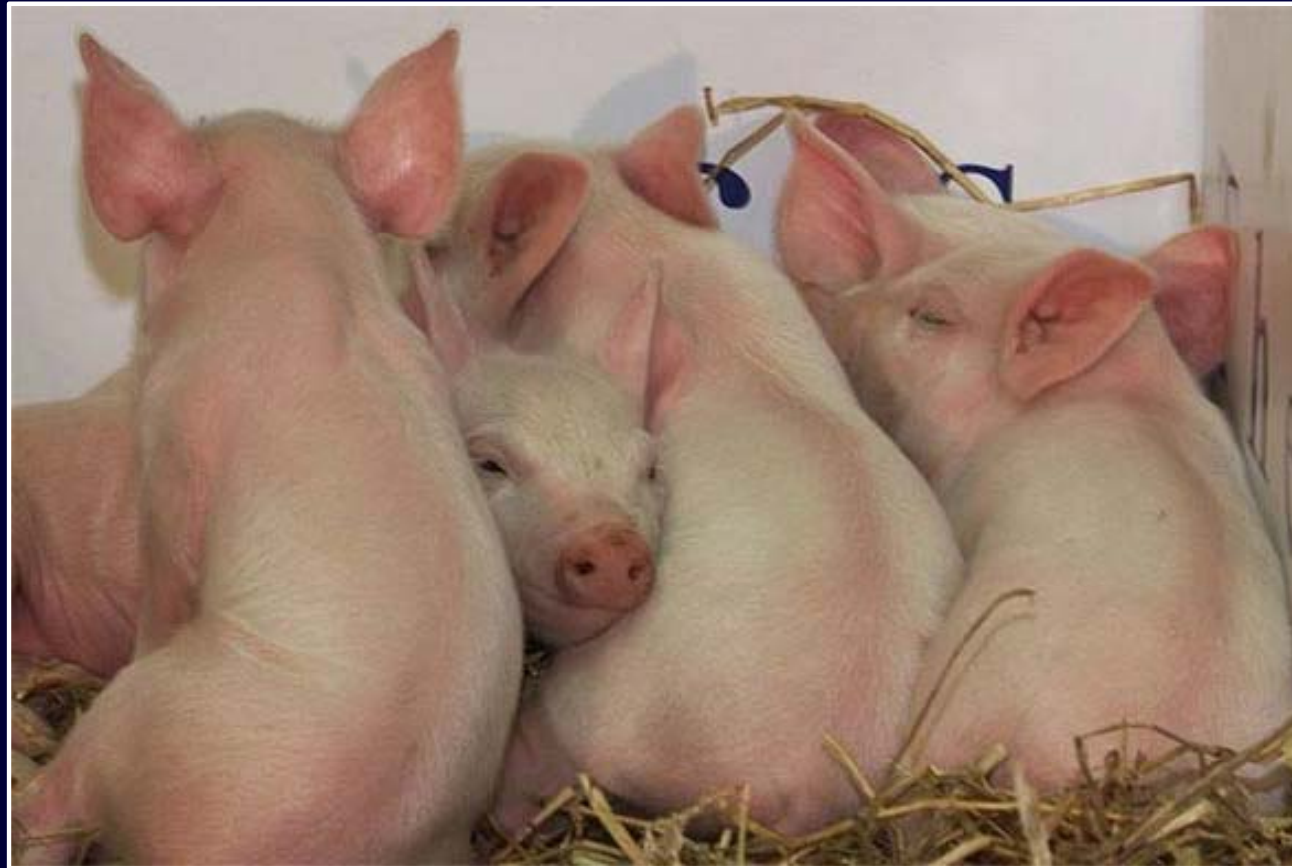
- myšák Fibro
- první samčí klon (fibroblasty ze špičky ocásku dospělého samce)



Ryuzo Yanagimachi
Teruhiko Wakayama

2000, USA (Virginia) – PPL Therapeutics:

- 5 klonovaných selat
- modifikovaná metoda (tzv. dvojité)



2001, USA (Texas):

- kočka Cc (Copy cat, Carbon copy)
- "Roslin method"



2003, USA (University of Idaho):

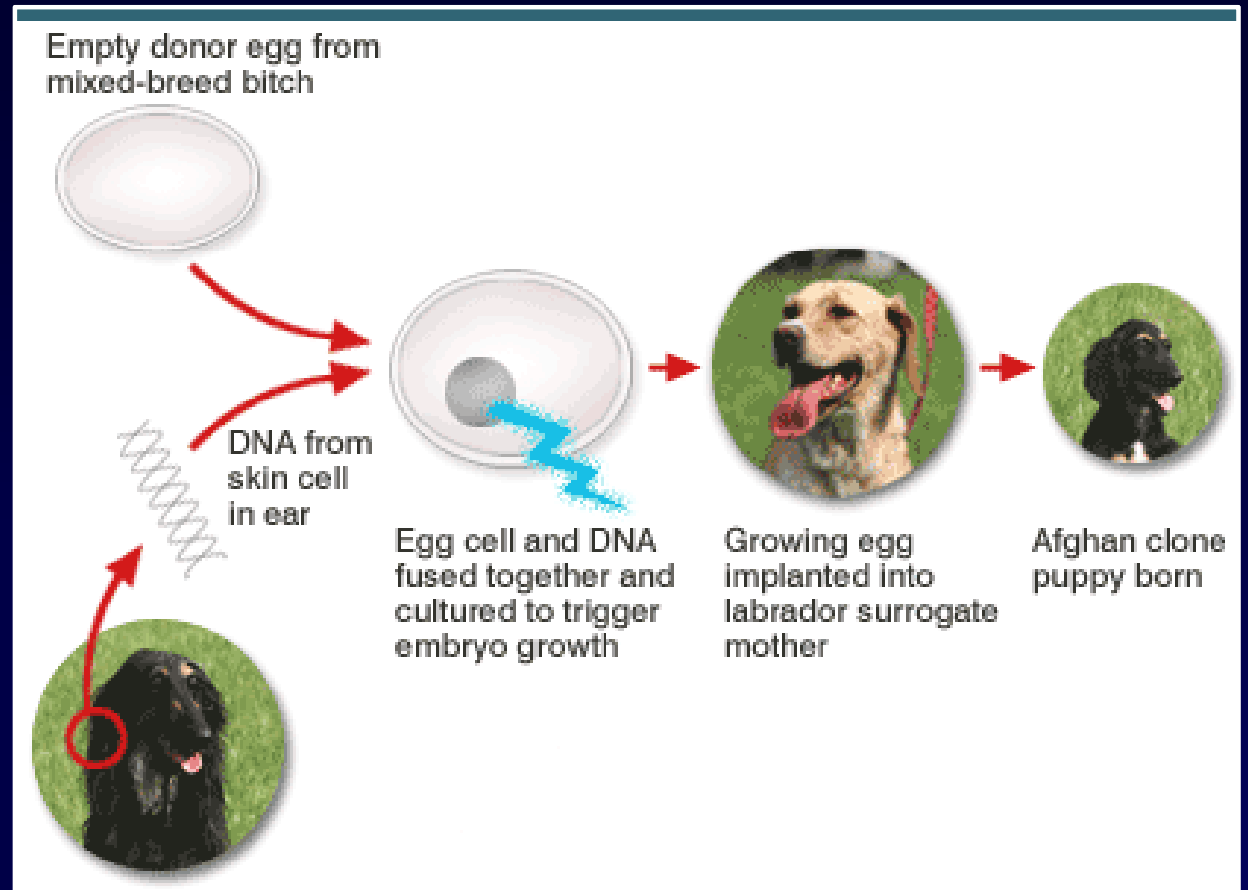
- mula – hřebeček Idaho Gem
- fetální fibroblasty muly, enukleované oocyty koně



2005, Korea (Seoul National University):

- štěně SNUPPY (= Seoul National University Puppy)







2008 - první komerční klonování zvířat

- RNL Bio (South Korea) - zaváděcí cena 50 000 USD
- pitbull Booger → 5 klonovaných štěňat





2008 – myš klonovaná z buňky mrtvé myši, která byla zamražena 16 let při teplotě -20°C

- Wakayama et al. 2008, PNAS
- metoda: ntESCs + tetraploidní embryo

2009, Spojené arabské emiráty:

- velbloudice Injaz



2009, Jižní Korea: Ruppy (Ruby Puppy)

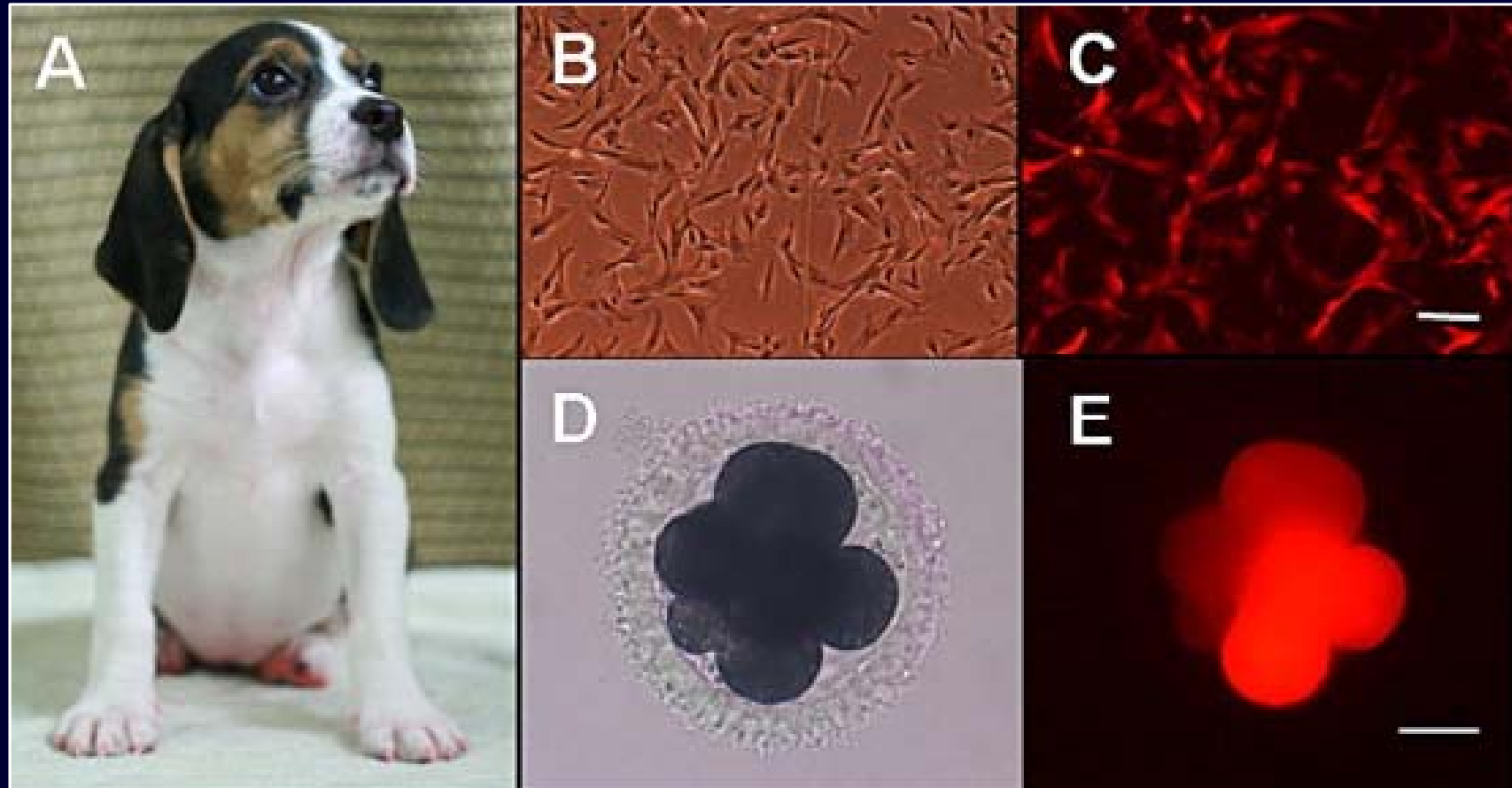
První klonovaný transgenní pes na světě:

- příprava transgenní linie psích fibroblastů (gen pro RFP z mořské sasanky)
- reprodukční klonování s využitím této linie (SCNT)



2009, Jižní Korea:

- štěně Ruppy (Ruby Puppy)



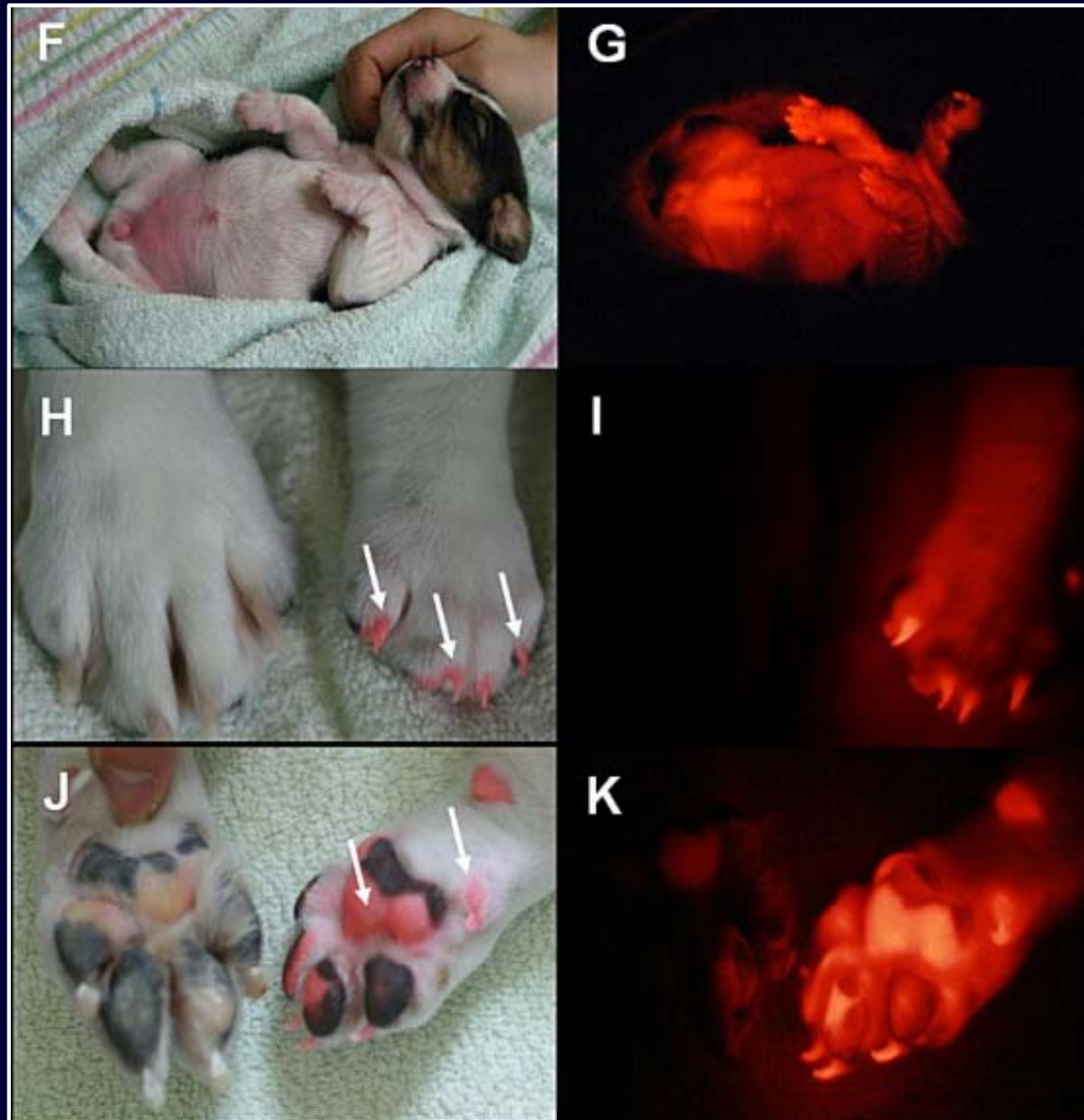


Table 1. Summary of cloned dog production.

Cloned dogs (breed)	Donor cells (age)	Delivery	Abortion or neonatal death
Two male dogs (Afghan hound)	Adult ear fibroblasts (3-year)	Caesarean section	One neonatal death
Three female dogs (Afghan hound)	Adult ear fibroblasts (2-month)	Caesarean section	—
Two female wolves (Grey wolf)	Adult ear fibroblasts (1-year)	Caesarean section	—
A small breed dog (Toy poodle)	Adult ear fibroblasts (14-year)	Caesarean section	One absorption Two still birth and
Three male wolves (Gray wolf)	Post-mortem adult ear fibroblasts (3-year)	Caesarean section	One neonatal death
Two female dogs (Beagle)	Fetal fibroblasts (28 day after pregnancy)	Natural delivery	—
Four male dogs (Beagle)	Adult fibroblasts (1-year)	Natural delivery/caesarean section	One dead pup
Three male and one female (Golden retriever)	Adult fibroblasts (2-year: male, 6-year: female)	NA*	One dead pup
			Three dead pups
Seven male dogs (Labrador retriever)	Adult ear fibroblasts (7-year)	Caesarean section/natural delivery	One fetal death

Jang G, Kim MK, Lee BC:

Current status and applications of somatic cell nuclear transfer in dogs.

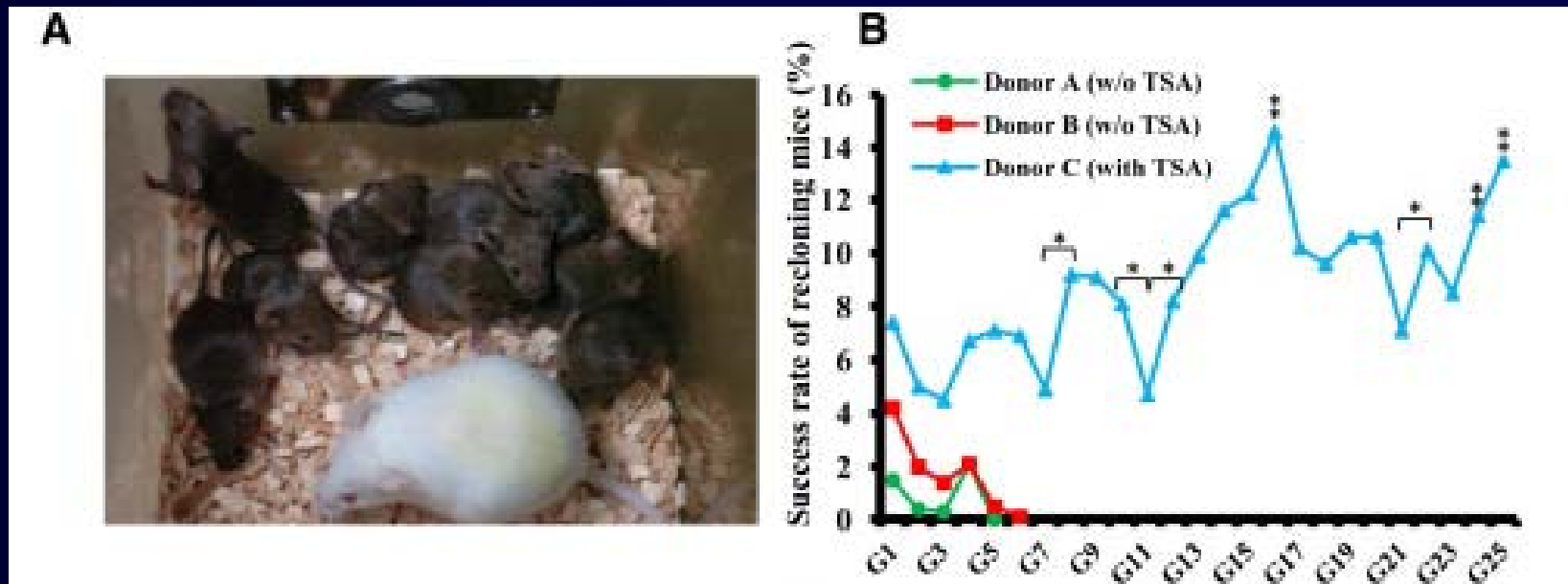
Theriogenology 74: 1311-1320, 2010



Březen 2013: Sériové "reklonování" myši

Wakayama et al.: Cell Stem Cell 12, 293-297, 2013

- ve 25 generacích celkem 598 klonovaných myší
- stejná efektivita klonování s využitím inhibitoru histonových deacetyláz (TSA)



Klonování metodou tvorby cybridů

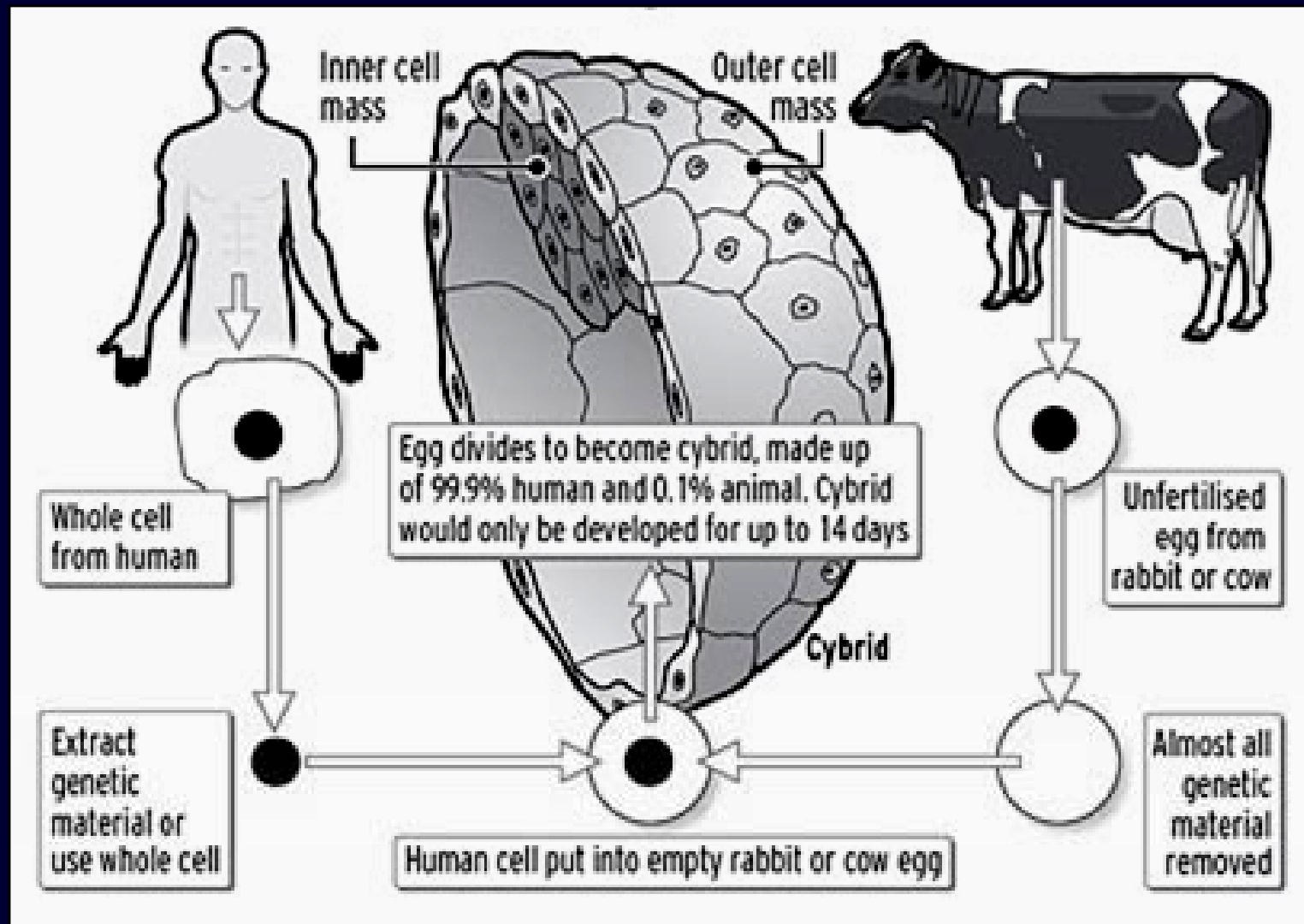
Cybrid (cytoplazmatický hybrid)

- organismus / embryo vznikající vnesením jádra somatické buňky jednoho živočišného druhu do enukleovaného oocyty jiného druhu (SCNT)
- 2000 – muflon (→ ovce), gaur (→ kráva)

září 2007: v UK povoleno experimentování s cybridy

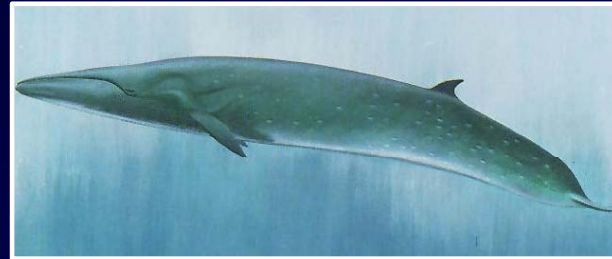
- vkládání jádra lidské somatické buňky do zvířecího enukleovaného oocyty (kráva, králík)
- cílem izolace hESCs
- cybridy budou udržovány max. 14 dní *in vitro*

Postup při tvorbě cybridů

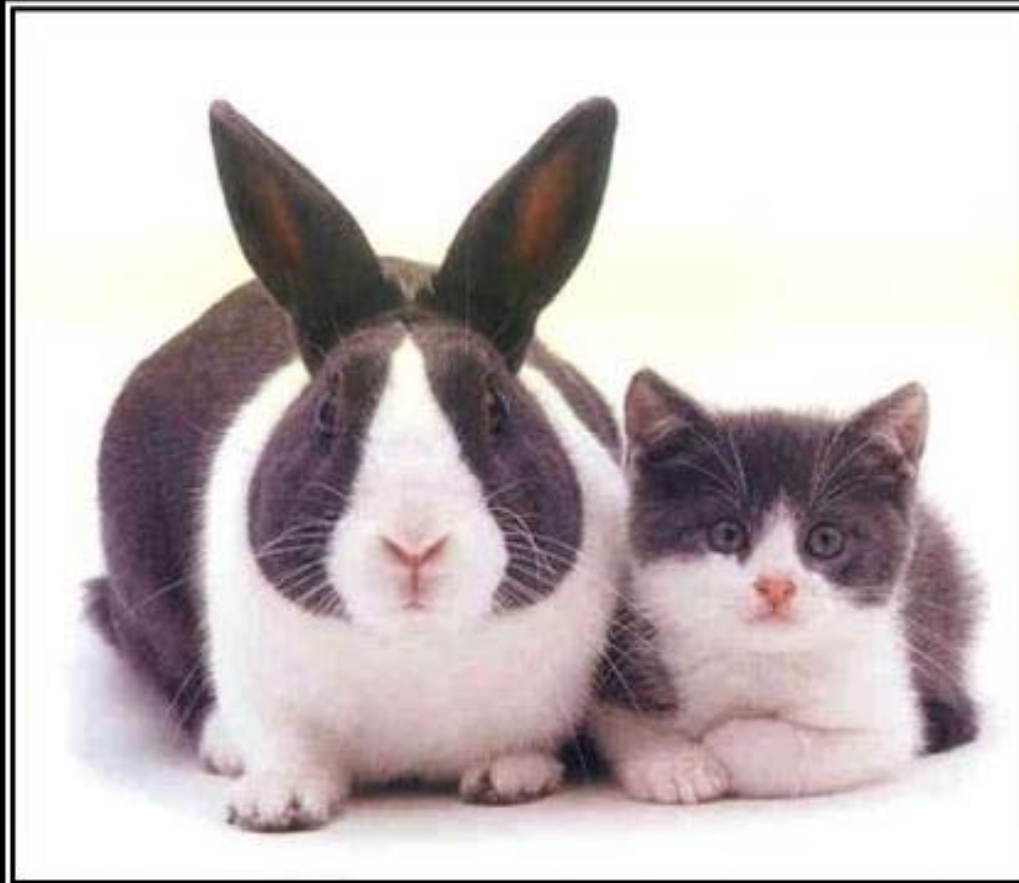


Klonování metodou tvorby cybridů

- plejtvák sejval (*Balaenoptera borealis*) → prase
- krysa → prase
- makak → kráva
- šimpanz → kráva
- panda červená (*Ailurus fulgens*) → králík



- člověk → kráva, králík, koza



CLONING

Results may vary