

# ASISTOVANÁ REPRODUKCE ŽIVOČICHŮ A KLONOVÁNÍ



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



Because Your Business Begins at Conception

home history process semen collection in vitro fertilization embryo collection sales economic aids links contact testimonials



search



## Testimonials

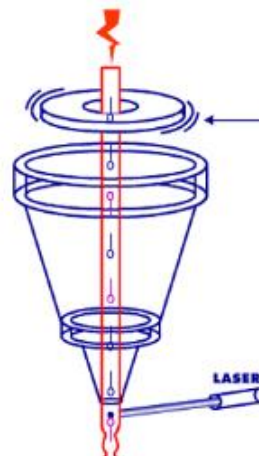
"If you run the economics of using semen, particularly in flushing, you make a whole lot more money using sexed semen than conventional semen.

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

## Bulls

### Beef Cattle Bulls

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

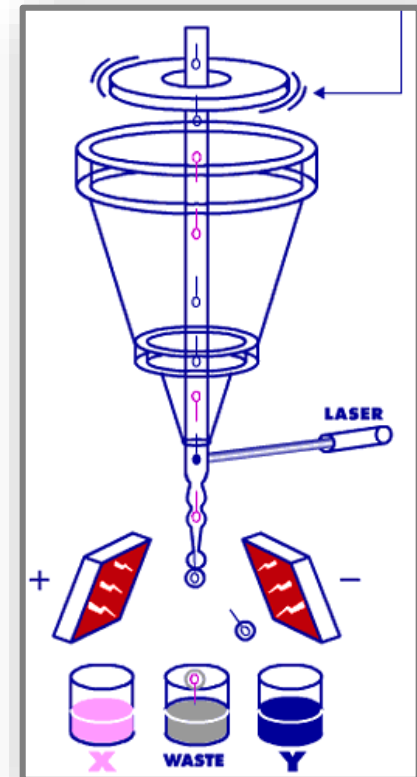
## Program přednášky:

- 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 plemeníků
- třídění spermií →  
uplatnění v cíleném chovu skotu  
(na mléko nebo na maso)  
úspěšnost ~90%



## Asistovaná reprodukce u hospodářských zvířat:

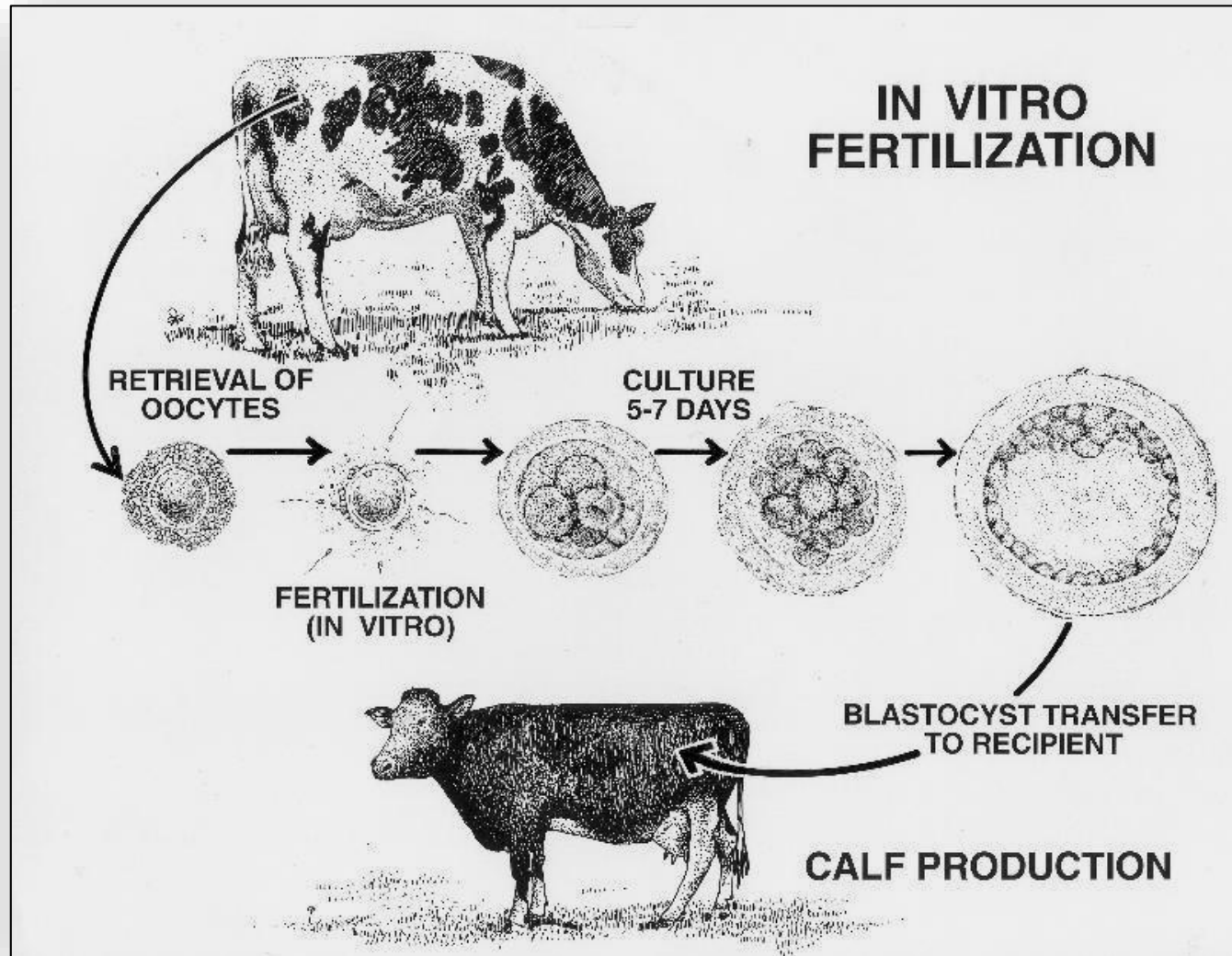
- hormonální stimulace → superovulace → inseminace → výplach embryí → transfer embryí (ET) / kryokonzervace embryí
- úspěšnost: 60-75% po transferu čerstvých embryí  
35-45% po kryoembryotransferu

### 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

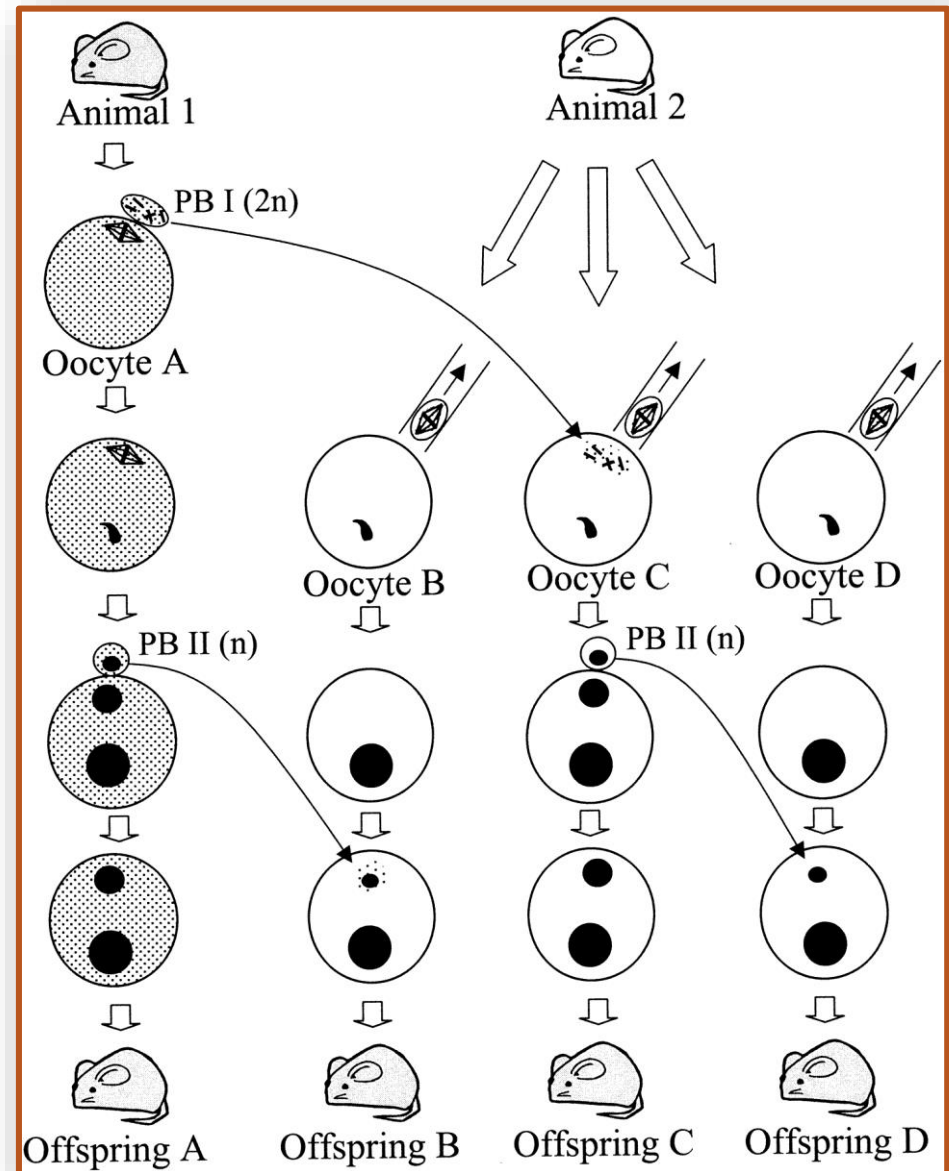
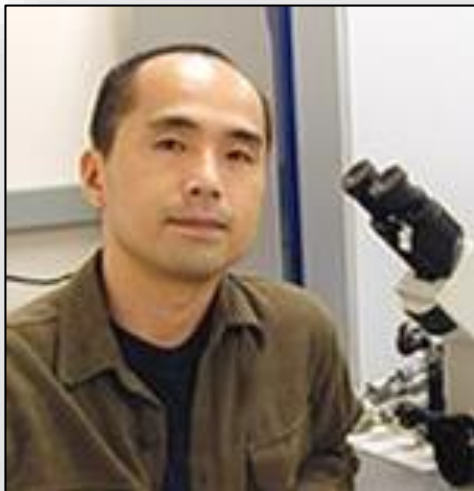
## **Problémy u ostatních hospodářských zvířat:**

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



# Teruhiko Wakayama Ryuzo Yanagimachi (1998)

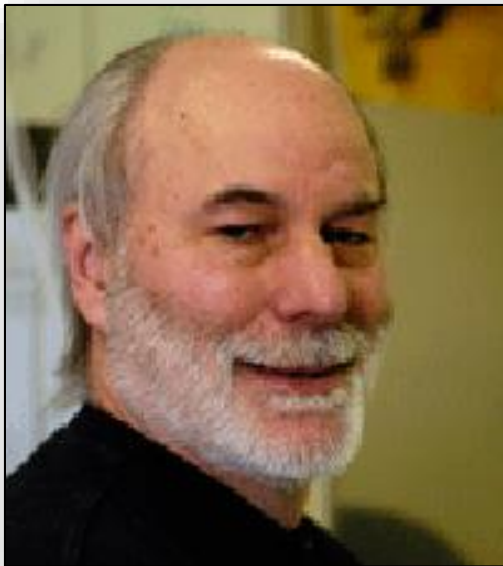
- vytváření funkčních oocytů transferem jadra z pólocyту u myši (úspěšnost metody 30-57%)



## 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 Laboratory, USA)



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

- 1) partenogeneze
  - 2) splitting techniky
  - 3) tvorba chimér
  - 4) přenos jádra somatické buňky  
(SCNT, Somatic Cell Nucleus Transfer)
- vnitrodruhové klonování
  - mezidruhové klonování = tvorba cybridů  
(= cytoplazmatických hybridů)

## (1) PARTENOGENEZE

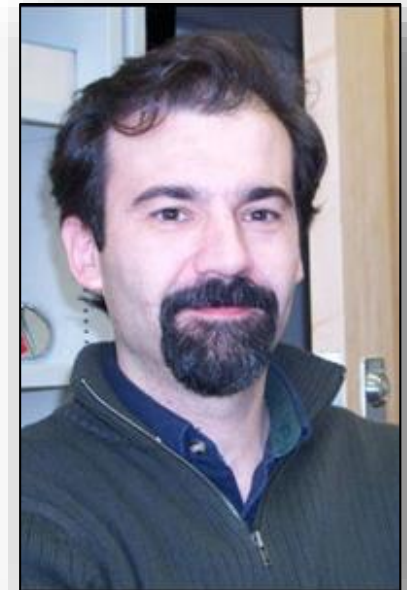
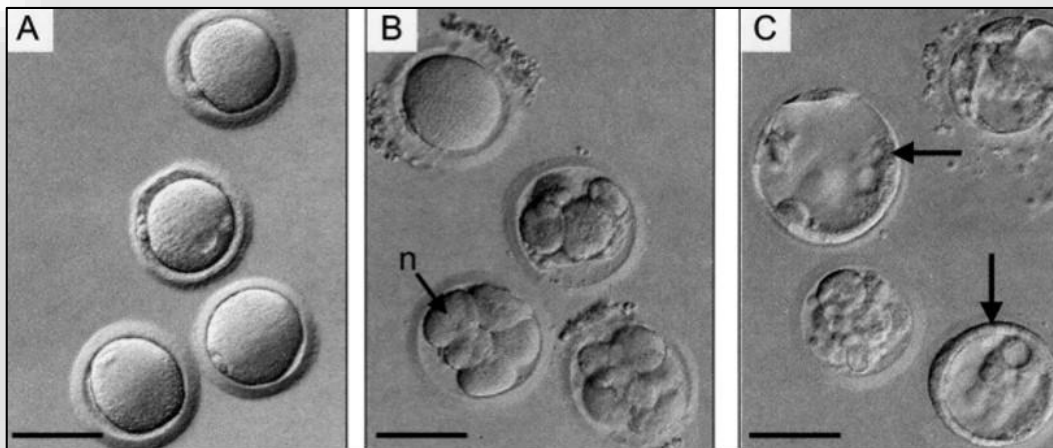
- přirozeně u bezobratlých (hmyz) i obratlovců (ještěrky, hadi, ryby, obojživelníci)

### 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
- **životascopné myši (partenoti)** – rekonstruovaná embrya 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)

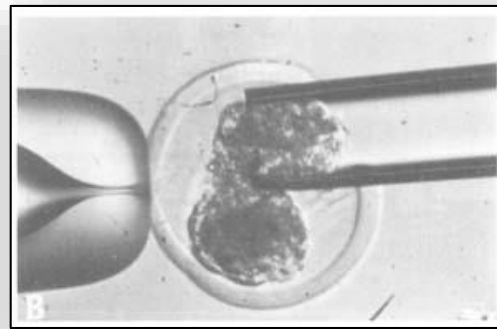
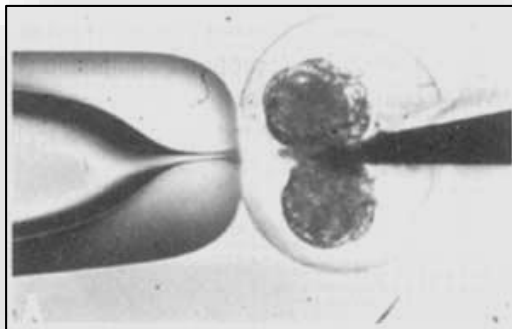


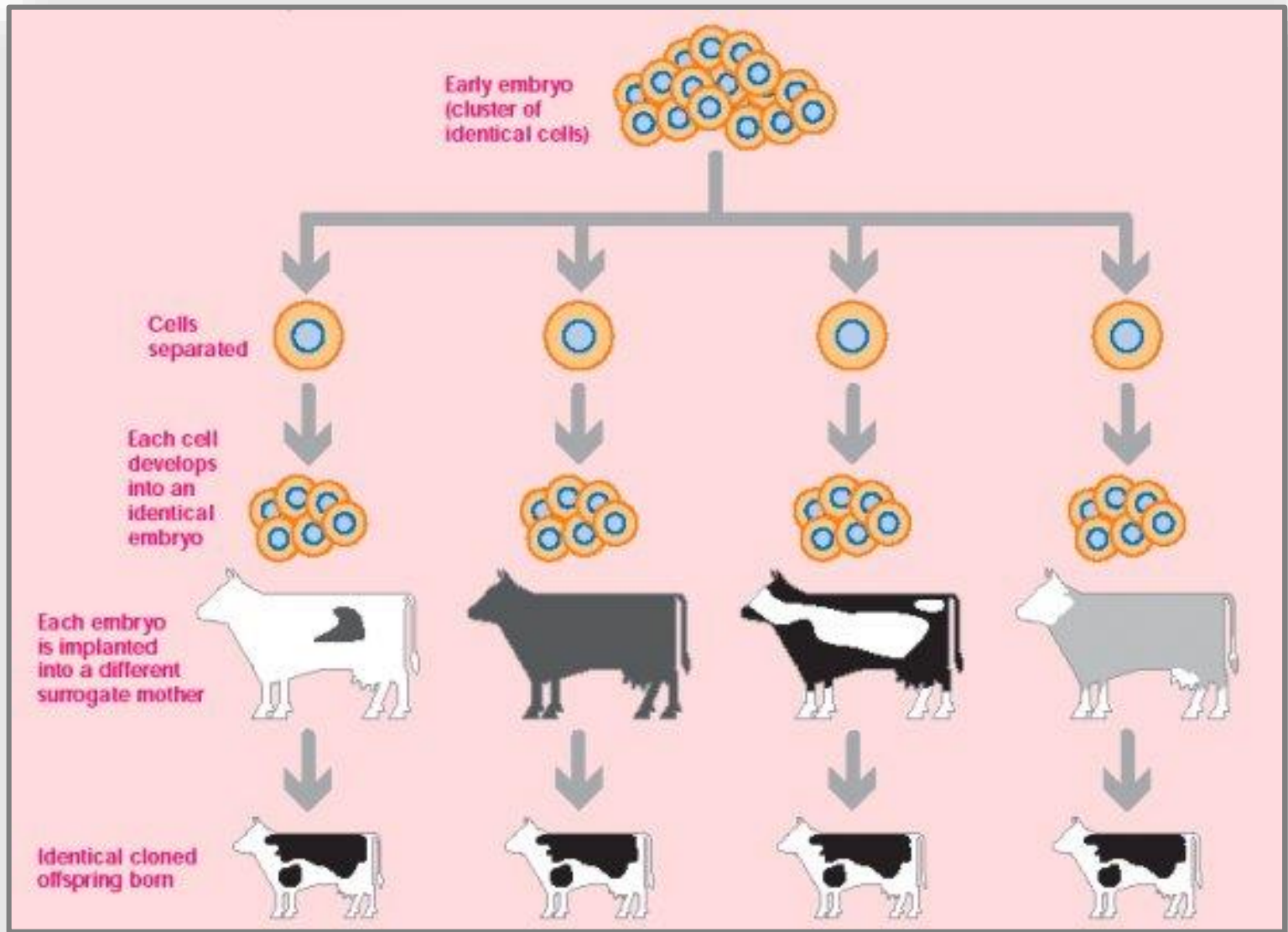
Advanced Cell Technology (2001): **José Cibelli**



## (2) SPLITTING TECHNIKY

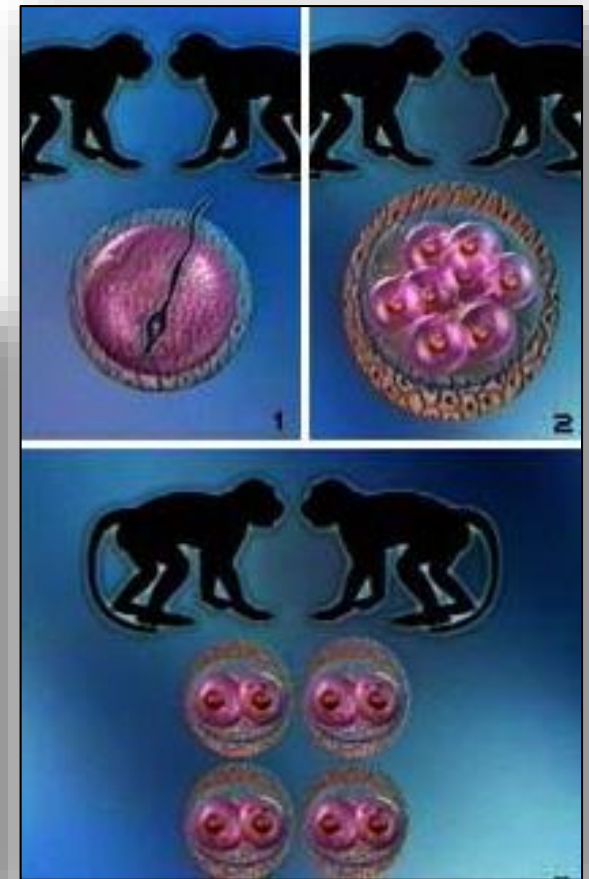
- rozdělení embrya během časných stádií vývoje mikromanipulačními technikami
- 1892 – Hans Driesch (mořská ježovka)  
1902 – Hans Spemann (žába)
- **praktické aplikace v chovu skotu**  
(v kombinaci s dalšími metodami AR)
- úspěšnost při dělení na max. 4 části





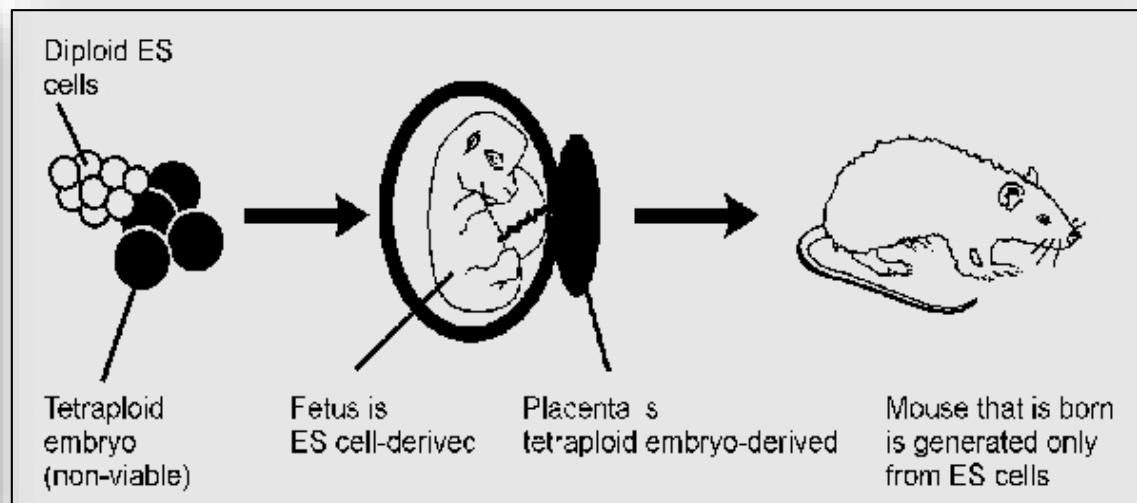
## Gerald Schatten

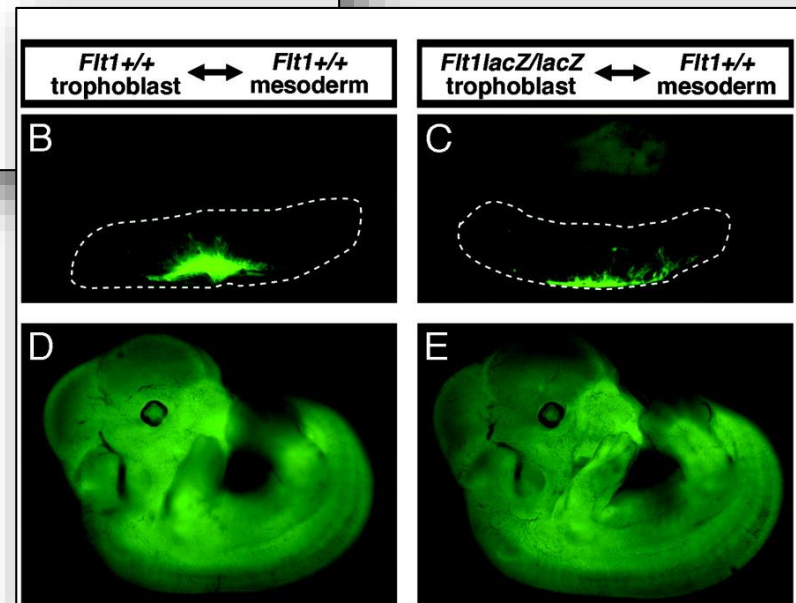
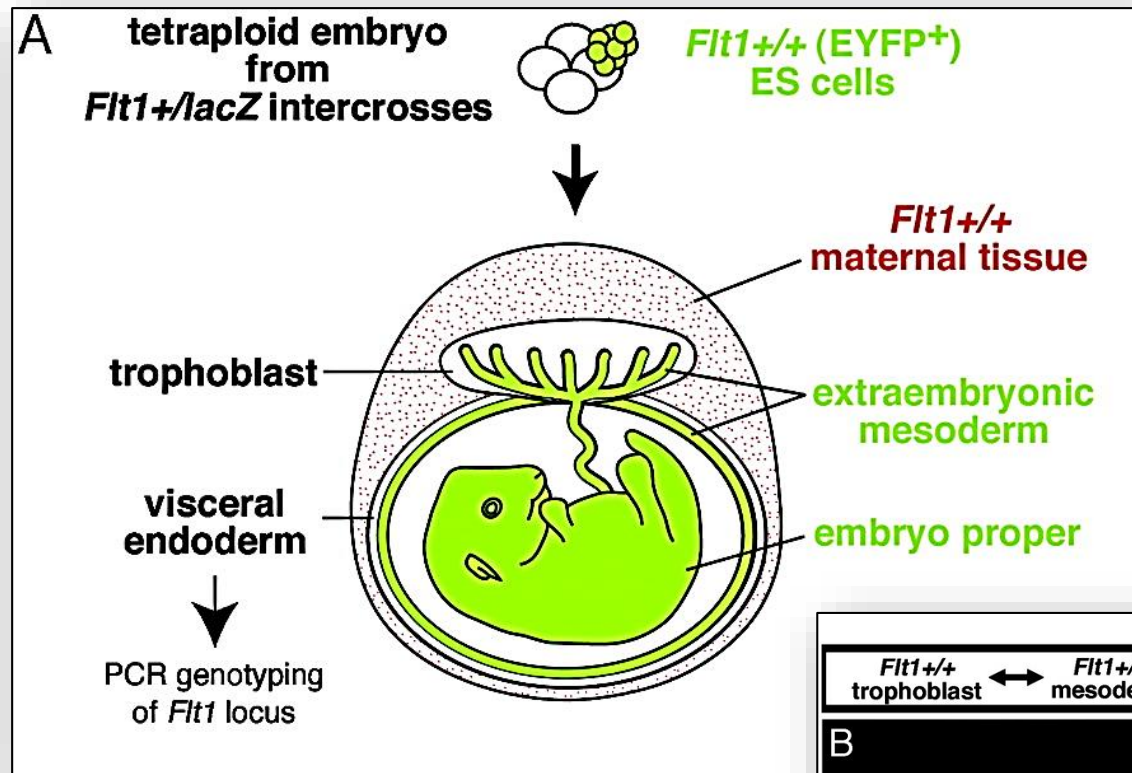
- 2000: klonování makaka splitting technikou
- rozdělení embrya na 4 části:  
1 živé mládě - **samička Tetra**



### (3) KLONOVÁNÍ METODOU TVORBY CHIMÉR

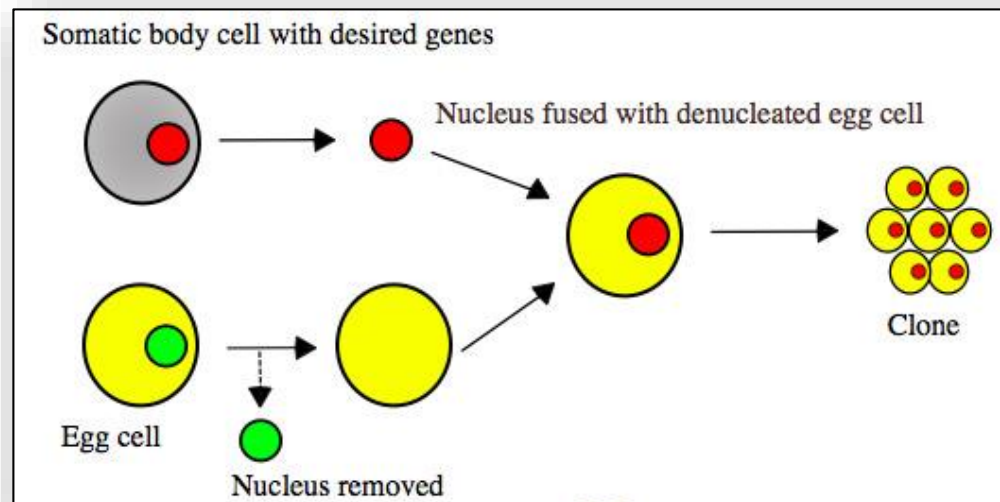
- fúze embryonálních kmenových buněk = ESCs (somatické buňky) s tetraploidním embryem:  
 tetraploidní buňky → trofoblast  
 diploidní ESCs → embryoblast
- **Janet Rossant** et al. (PNAS 1993): klony myši

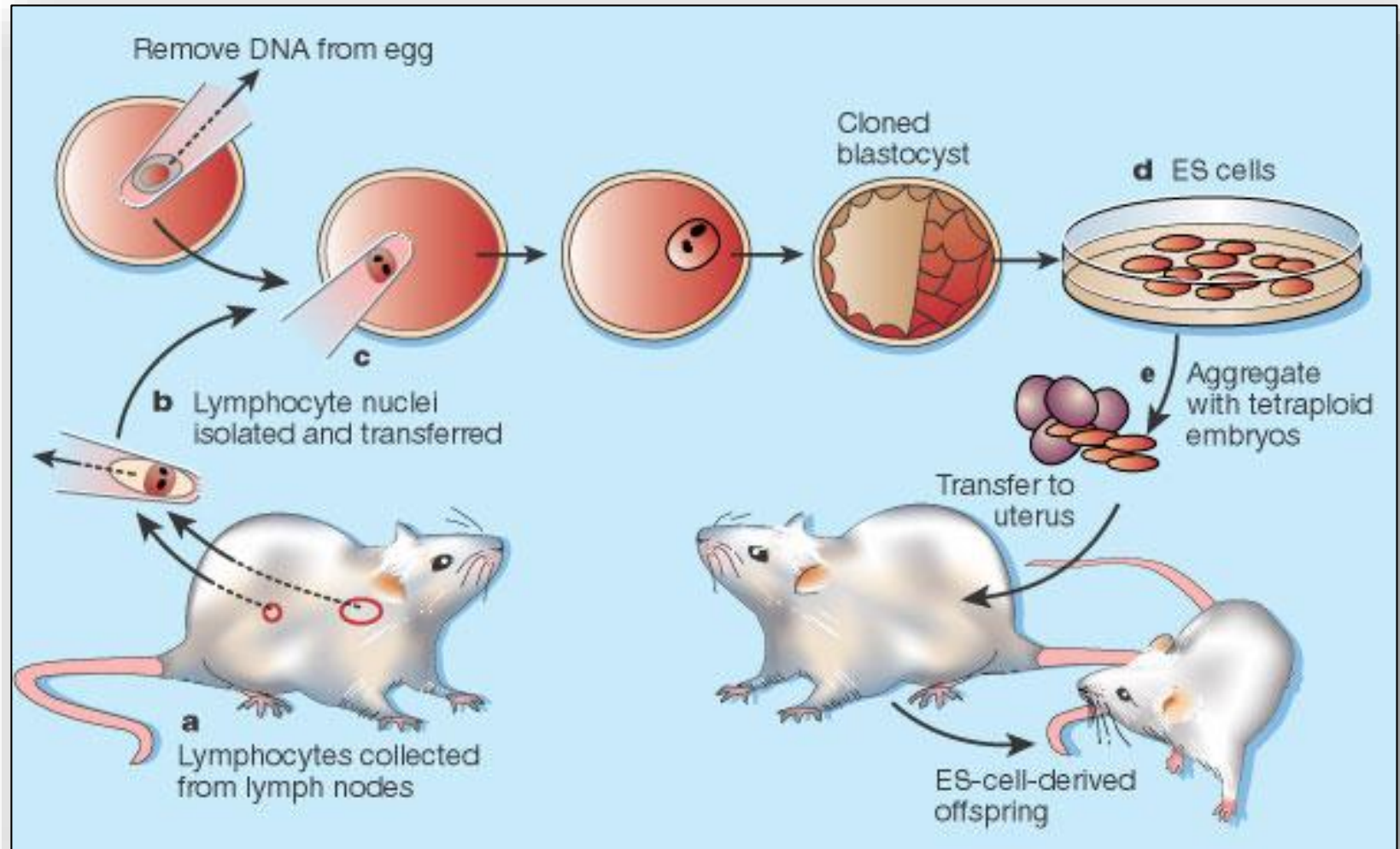




## (4) PŘENOS JÁDRA SOMATICKÉ BUŇKY (SCNT)

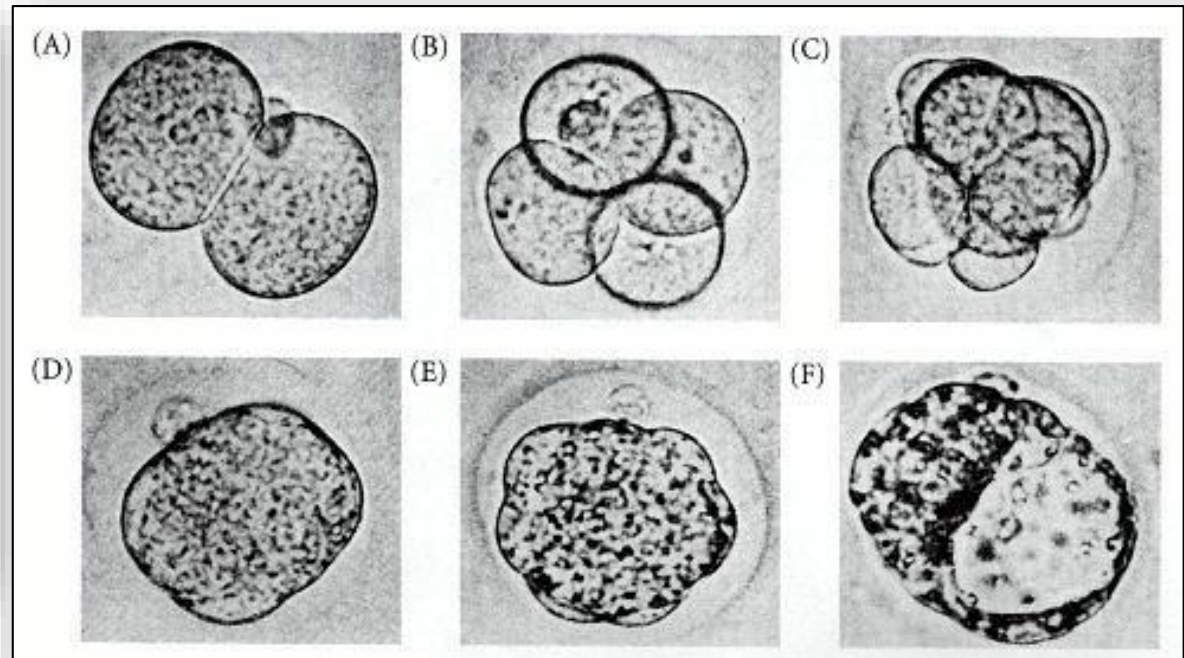
- SCNT = Somatic Cell Nuclear Transfer
- jádro somatické buňky vneseno do enukleovaného oocytu:
  - a) elektrofúze
  - b) intracytoplazmatická injekce diploidního jádra





tzv. dvojité metoda klonování

## 1928 – SCNT u obojživelníků (mloci)



**Hans Spemann** (1869 -1941)

1935 – Nobelova cena za fyziologii a lékařství

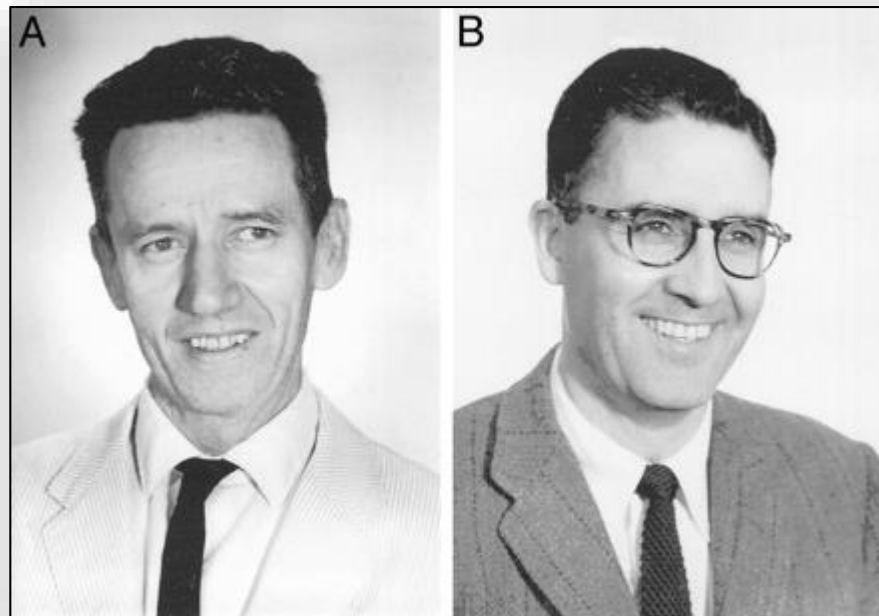


## Další vývoj klonování metodou SCNT:

- 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)

<sup>2</sup> Steinbach, H. B., *Am. J. Physiol.*, **167**, 284 (1951).

<sup>3</sup> Lorente de No, R., *J. Cell. & Comp. Physiol.*, **33**, suppl. (1949).

<sup>4</sup> Tobias, J. M., *Ibid.*, **36**, 1 (1950).

<sup>5</sup> 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

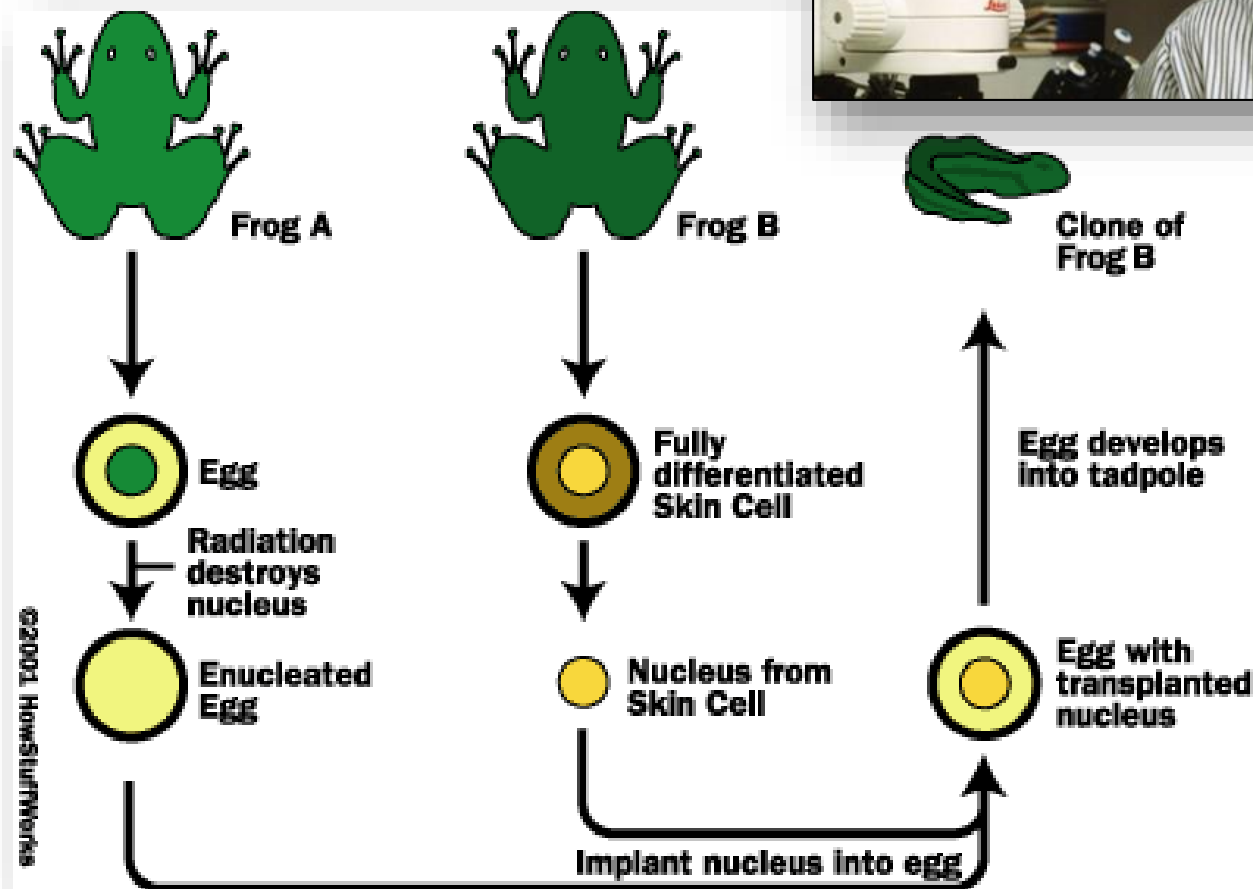
Communicated by C. W. Metz, March 15, 1952

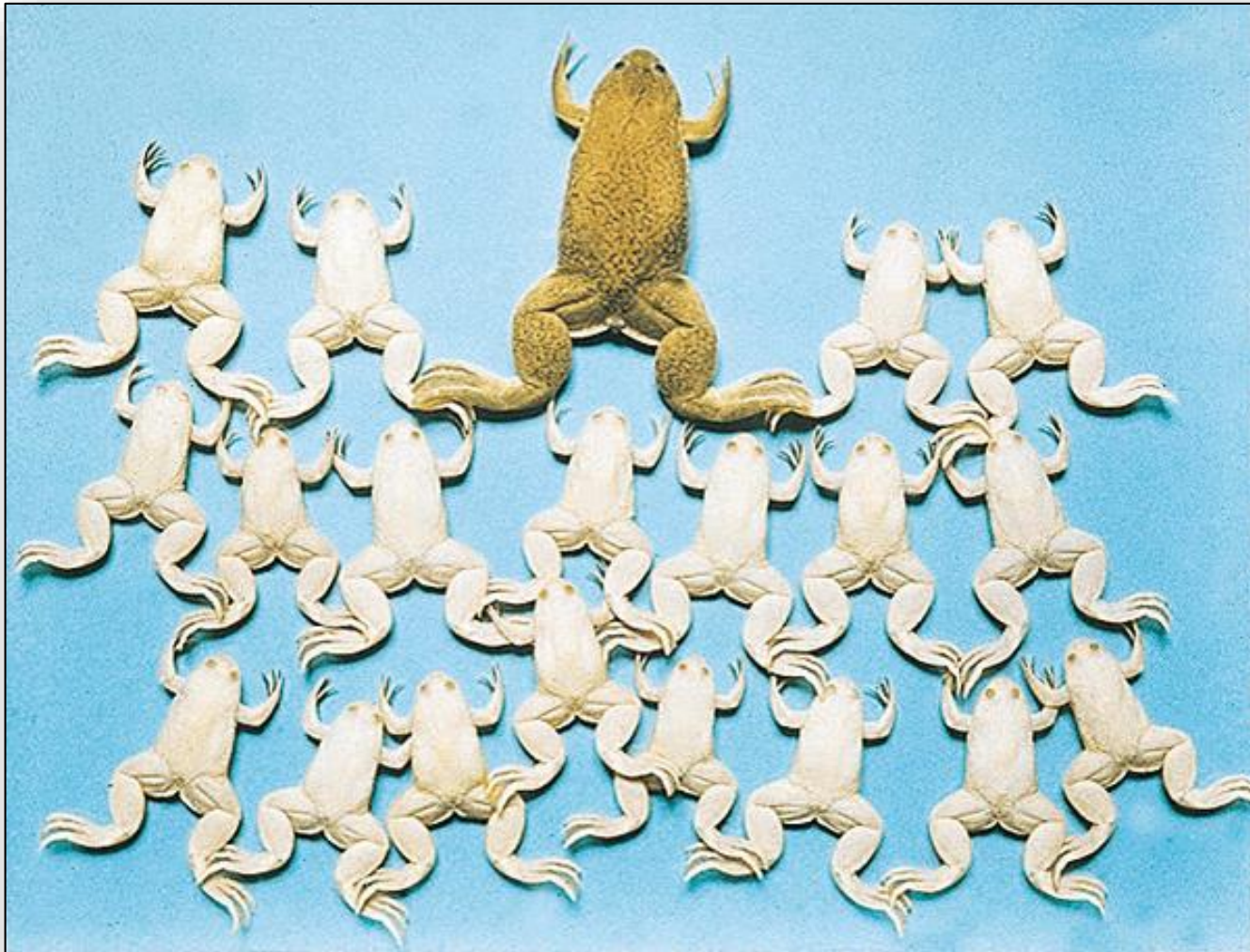
*Introduction.*—The role of the nucleus in embryonic differentiation has been the subject of investigations dating back to the beginnings of experimental embryology. At first it was supposed by Roux, Weismann and others that differentiation is the result of qualitative nuclear divisions,

1962:

## John Gurdon

první klon dospělé žáby

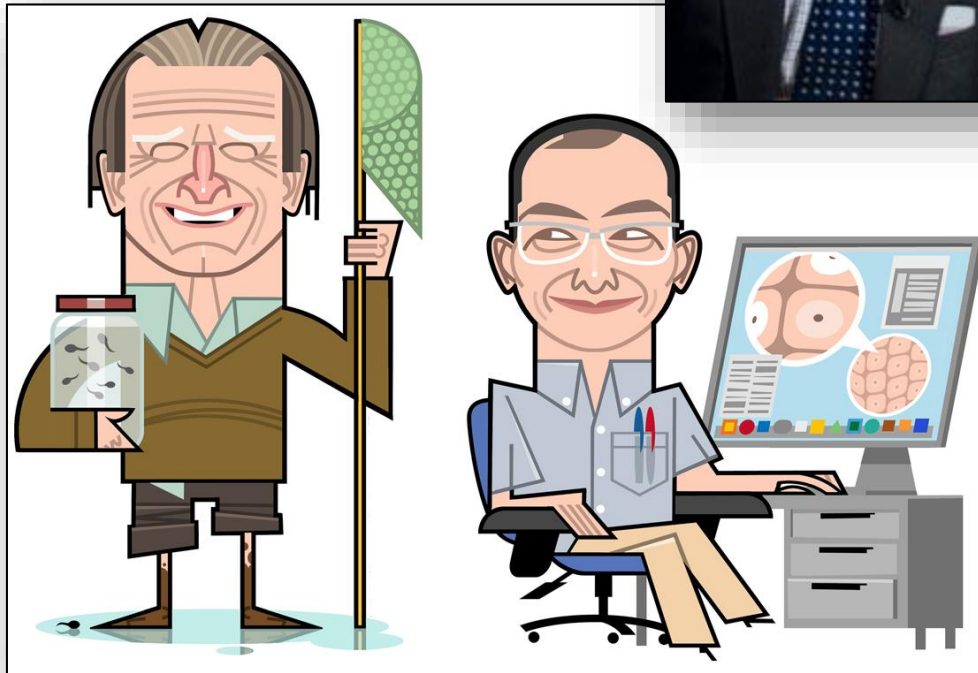




2012 – Nobelova cena za fyziologii a lékařství:

**John Gurdon**

**Shinya Yamanaka**



## 1984 (1986) – Steen Willadsen

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

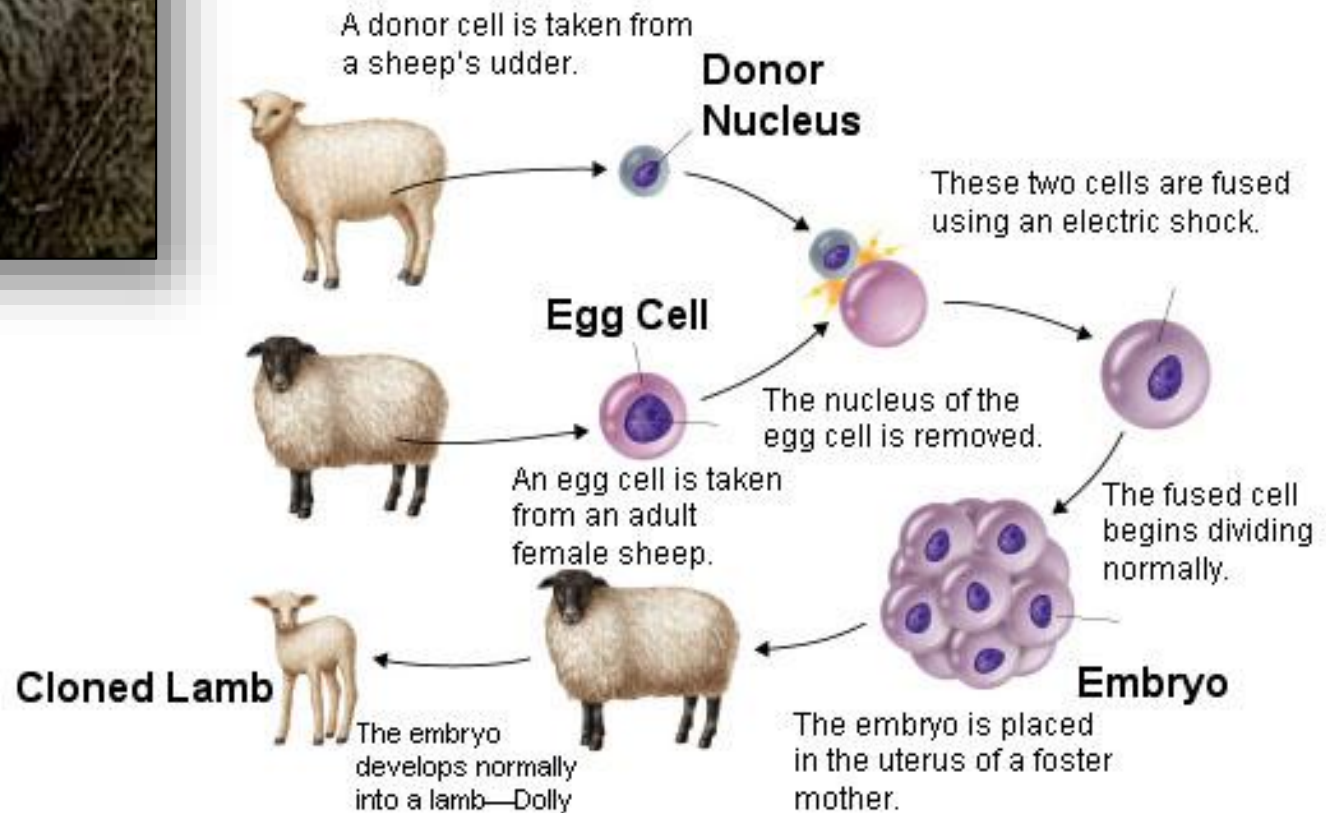


???



## ovce Dolly (1996-2003)

- Roslin Institute, UK
- Ian Wilmut et al. 1997







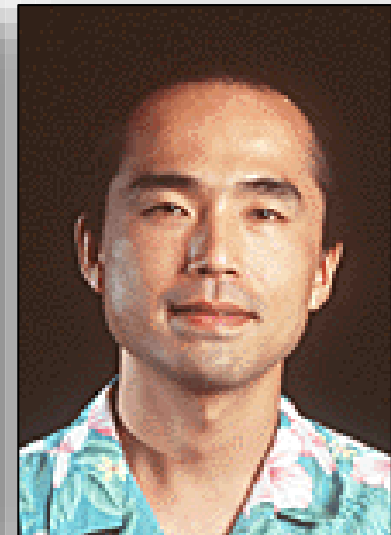
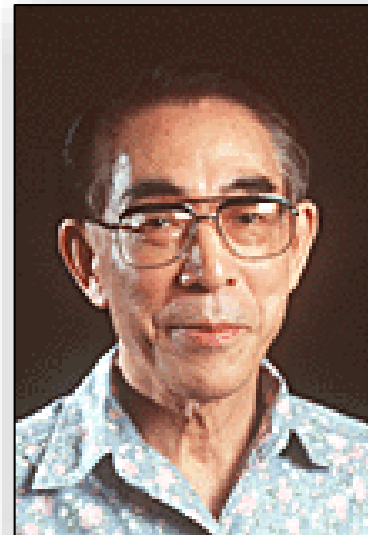
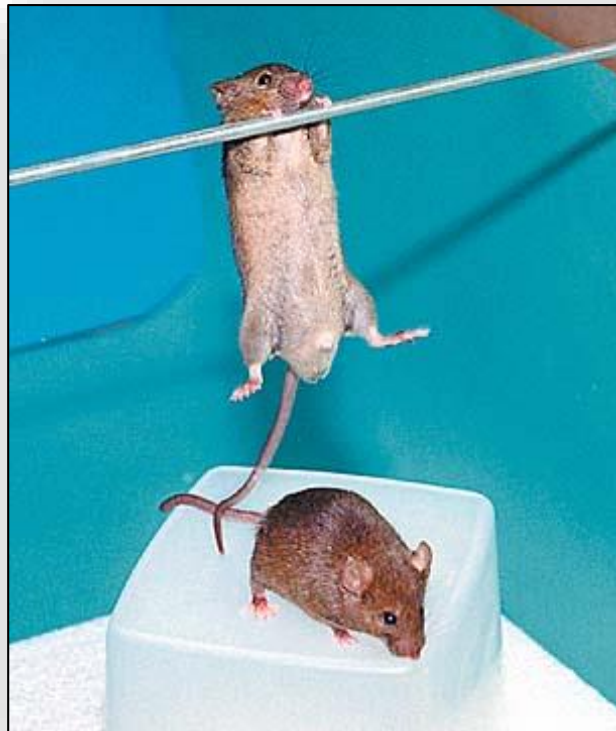
1998, Japonsko (Ishikawa):

- **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):

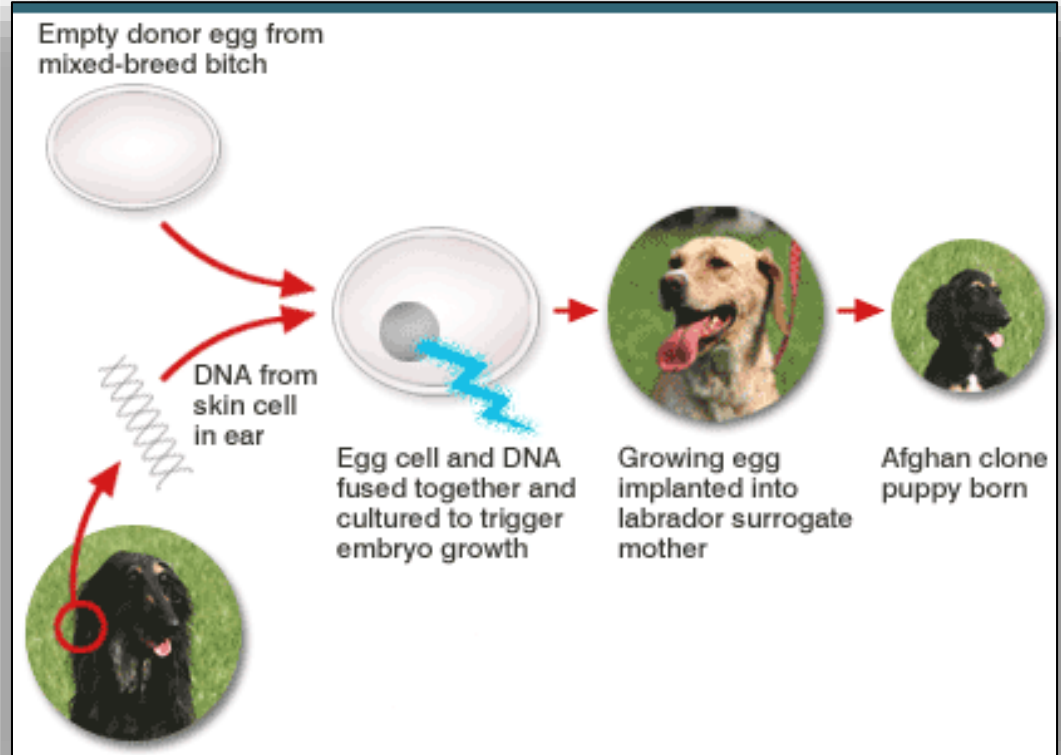
- mula – hřebeček Idaho Gem
- fetální fibroblasty muly, enukleované oocyty koně



2005, Korea (Seoul National University):

- **štěně SNUPPY** (= Seoul National University Puppy)









## 2008 - první komerční klonování zvířat

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



## 2008 – myš klonovaná z buňky mrtvé myši

- myš byla zamražena 16 let při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$
- **Wakayama** et al. 2008, PNAS
- metoda: ntESCs + tetraploidní embryo



# Klonování mamutů ???



## 2009, Spojené arabské emiráty:

- **velbloudice Injaz**

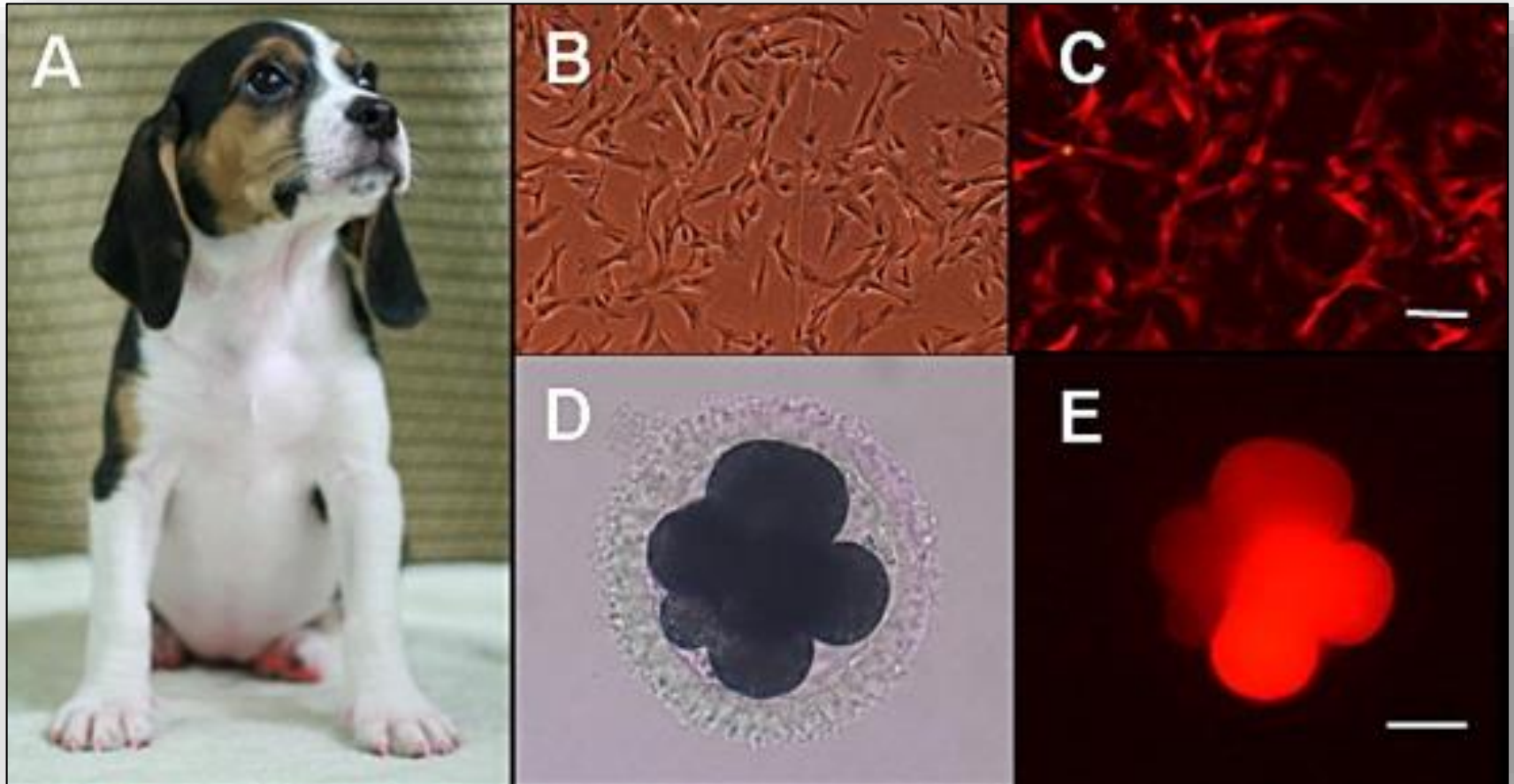


2009, Jižní Korea: Ruppy (Ruby Puppy)

První klonovaný transgenní pes na světě:

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





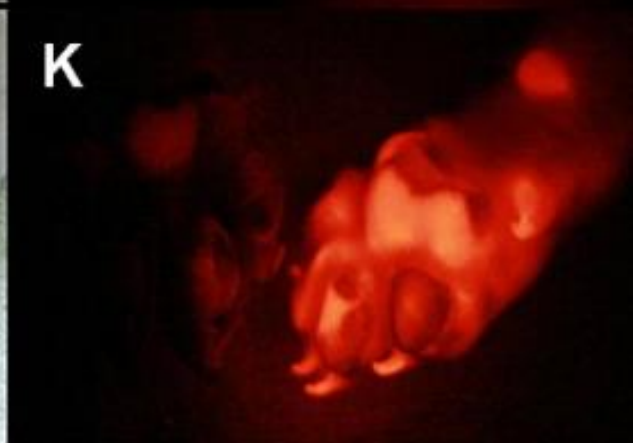
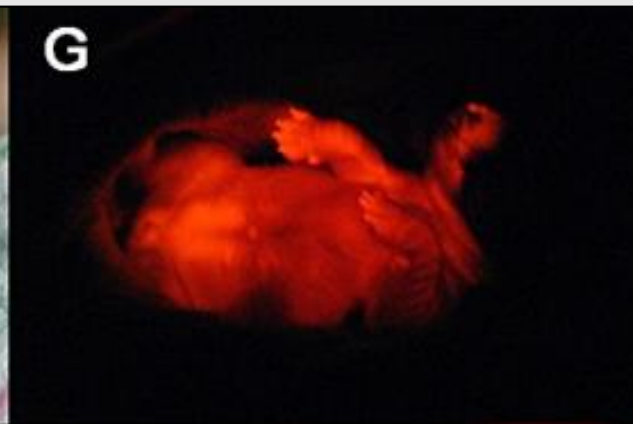




Table 1. Summary of cloned dog production.

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
Seven male dogs (Labrador retriever)	Adult ear fibroblasts (7-year)	Caesarean section/natural delivery	Three dead pups One fetal death

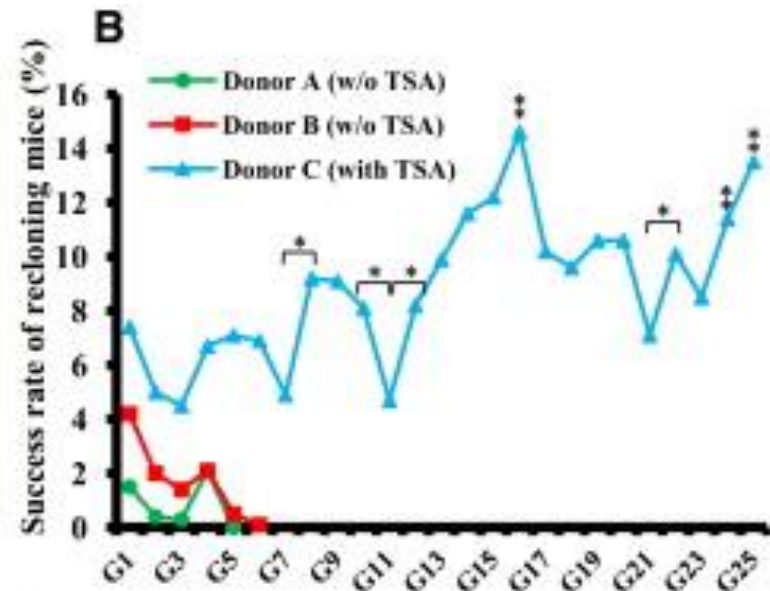
Jang G, Kim MK, Lee BC:  
 Current status and applications of somatic cell nuclear  
 transfer in dogs.  
 Theriogenology 74: 1311-1320, 2010

## 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)

A



# KLONOVÁNÍ METODOU TVORBY CYBRIDŮ

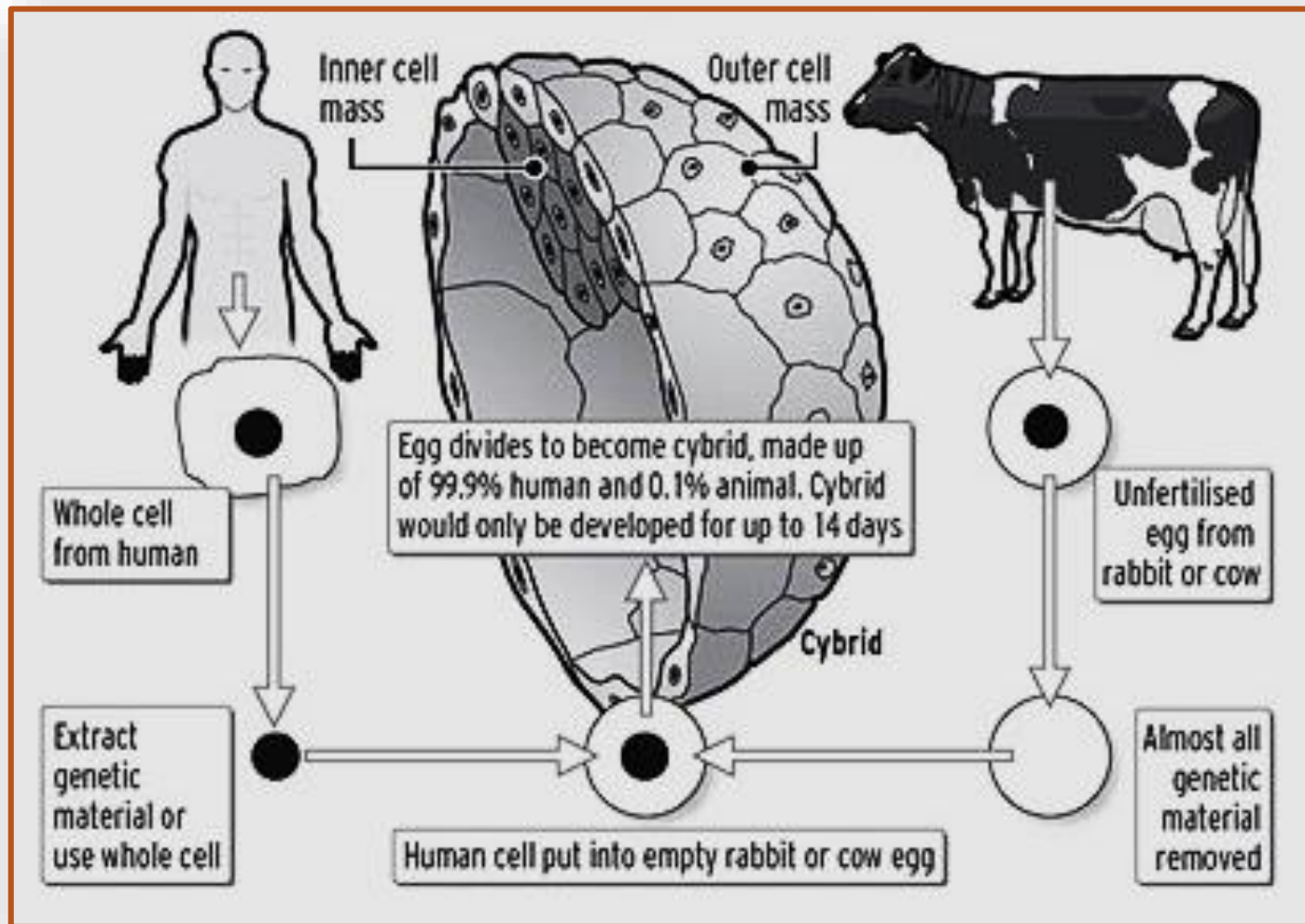
## Cybrid (cytoplazmatický hybrid)

- 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

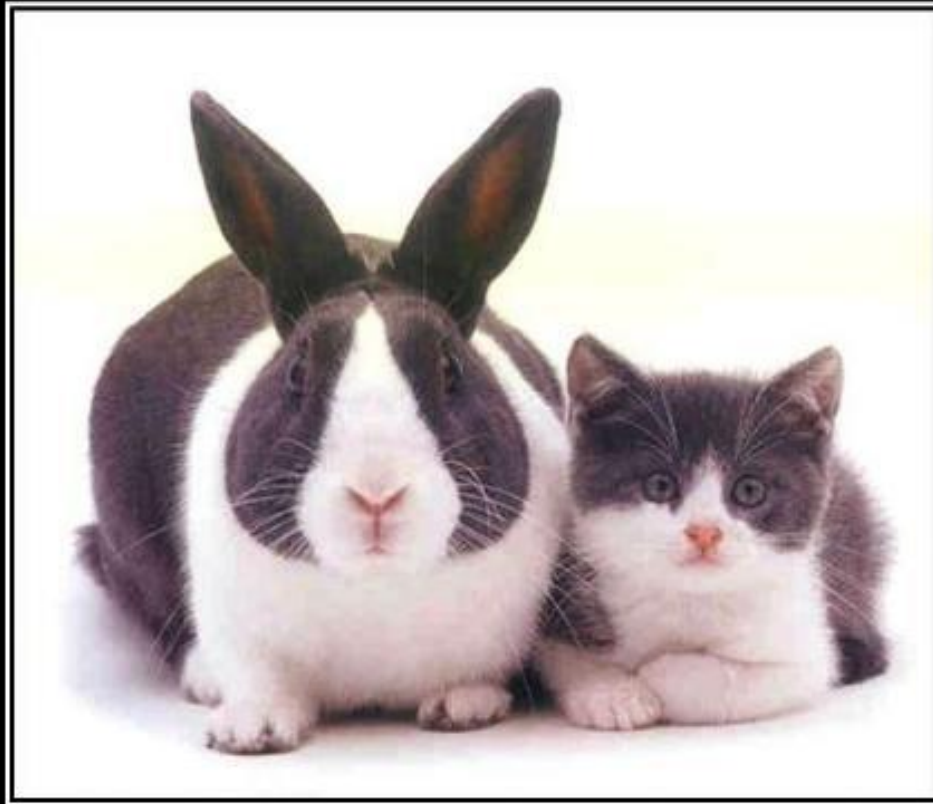


## Příklady klonování metodou tvorby cybridů

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



- člověk → kráva, králík, koza



# CLONING

Results may vary