

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



METODIKA PŘÍPRAVY TRANSGENNÍ MYŠI

Bakalářská práce

Gabriela Reslová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Metodika přípravy transgenní myši“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.7.2011 _____

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Kateřině Hortové PhD za ochotu, věnovaný čas a cenné rady. Velký dík patří také mé rodině za podporu a umožnění studia na vysoké škole.

Souhrn

Práce se zabývá problematikou přípravy transgenních myší a srovnáním jednotlivých metodologických postupů z hlediska efektivity a vhodnosti aplikace pro výzkumné účely. Techniky pro přenos genových konstruktů zahrnují preferovanou mikroinjekci DNA do pronuklea oplodněného vajíčka. Jakož i možnosti spojené s využitím spermií, jež přenášejí zabudovaný genový konstrukt do oocyty při *in vitro* oplození, nebo za využití retrovirových vektorů, kterými jsou oocyty infikovány. Přenos jader somatických buněk do enukleovaných oocytů, využití embryonálních kmenových buněk, které jsou vnášeny do cizích zárodků či transgeneze pomocí liposomů jsou techniky prozatím používané okrajově z důvodu nutnosti hlubšího probádání.

V další části seznamuje práce čtenáře s jednotlivými kroky, jež je nutné provést pro úspěšnost transgeneze. Předmětem zájmu je zde ovariální stimulace nutná pro získání dostatečného množství oocytů, ale také jako příprava pro embryo transfer, jakož i kapacitace spermií, která je zásadní pro *in vitro* oplození. Práce se rovněž zabývá zpětnou analýzou potvrzení pozitivivity exprese transgenů pomocí genotypizace potomků a křížením pozitivních transgenů a srovnává výhody a nevýhody získání homozygotní transgenní linie.

Klíčová slova:

Transgenní myš, perinukleární injekce, ovariální stimulace, kapacitace, *in vitro* fertilizace, embryo transfer

Abstract

The thesis deals with methods used for preparation of transgenic mice and with comparison of them in terms of efficiency and suitability of applications for research purposes. Technologies for the transfer of gene constructs involve microinjection of DNA into the pronucleus of fertilized oocyte, which seems to be the most reliable one. Another possibility is associated with the use of sperm, which carry the incorporated gene construct into the oocyte during *in vitro* fertilization, or with the use of retroviral vectors by which the oocytes are transfected. Somatic cell nuclear transfer into enucleated oocyte, the use of embryonic stem cells which are incorporated into strange embryo or transgenesis by liposomes are techniques far less explored and not so often used.

The next section of this thesis introduces to the reader individual steps which are necessary for successful transgenesis. It is focused on ovarian stimulation which is necessary to obtain sufficient amount of oocytes, as well as on stimulation of recipient mother in embryo transfer as well as on capacitation of sperm required for *in vitro* fertilization. The thesis also deals with backward analysis confirming positivity of transgene expression by genotyping of pups and by crossbreeding of transgene positive and compares advantages and disadvantages of obtaining homozygot transgenic lines.

Key words:

Transgenic mouse, perinuclear injection, ovarian stimulation, capacitation, *in vitro* fertilization, embryo transfer

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	9
2 Geneticky modifikovaný organismus	10
2.1 Charakteristika a historie GMO	10
2.2 Metody produkce transgenních živočichů	10
2.2.1 Mikroinjekce	10
2.2.2 Retrovirové vektory	12
2.2.3 Spermiový přenos	12
2.2.4 Přenos jader	13
2.2.5 Embryonální kmenové buňky	15
2.2.6 Liposomy	16
3 Ovariální stimulace myši	18
3.1 Vhodné kmeny myši	18
3.2 Vhodné stáří samic pro ovariální stimulaci	18
3.3 Hormony používané pro ovariální stimulaci myši	19
4 Kapacitace spermií	20
4.1 Kapacitační změny	20
4.1.1 Změny na povrchu spermie	20
4.1.2 Změny v cytoplazmatické membráně	21
4.1.3 Změny v cytoplazmě	21
4.2 Kapacitace <i>in vitro</i>	22
5 Integrace genového konstrukt	23
5.1 <i>In vivo</i> fertilizace	23
5.1.1 Izolace prezygotických pronukleárních stádií	23
5.2 <i>In vitro</i> fertilizace	24
5.2.1 Perinukleární injekce	24
5.2.2 Embryo transfer	25
5.3 Časový harmonogram	25

5.4	Genotypizace.....	26
5.5	Křížení pozitivních transgenů	27
6	Závěr.....	28
	Seznam použité literatury	29

Seznam použitých zkratek

AEA – arachidonylethanolamid, agonista endogenních kanabinoidních receptorů

ATP – adenosintrifosfát, buněčný zdroj energie

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, důležitá signální molekula

DAG – diacylglycerol, ester glycerolu ukotvený v plazmatické membráně

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

DOTMA - N-[1-(2, 3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamonium chlorid

ESC – embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)

FSH – folikulo-stimulační hormon

GMO – geneticky modifikovaný organismus

hCG – lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)

hMG – lidský menopauzální gonadotropin (human menopausal gonadotropin)

ICSI – intacytoplazmatická injekce spermie

IP₃ – inositol trifosfát, důležitá signální molekula

LH – luteinizační hormon

MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus, retrovirus schopný navodit rakovinu u myší

PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, membránový fosfolipid

PKA – proteinkináza A, serin/treonin kináza

PLD – fosfolipáza D, hydrolytický enzym štěpící molekuly fosfolipidů

PMSG – gonadotropin séra březích klisen používaný pro ovariální stimulaci

RNA – ribonukleová kyselina

1 Úvod

Rozvoj a nové poznatky v oblasti genetiky, molekulární biologie a živočišné reprodukce, jež byly v posledních letech zkoumány, a jejichž cílem byla především snaha o zefektivnění chovu hospodářských zvířat, vedly až k objevu možnosti modifikovat genetickou informaci jedince s využitím genů pocházejících z buněk nepříbuzného organismu. Výsledkem se staly transgenní zvířata, jejichž využití dnes nabízí velmi široké uplatnění.

Konkrétně pro porozumění biologie člověka a pro studium závažných lidských chorob se nejvýznamnějším modelovým organismem stala myš (*Mus musculus*), jež s člověkem sdílí výraznou homologii genů, její genom je přibližně stejně velký jako lidský, a dokonce i pořadí genů na chromozomech je u obou druhů nápadně podobné. Navíc je pro myš charakteristická poměrně krátká generační doba a produkce dostatečného množství potomků, což je pro výzkumné účely žádoucí.

V průběhu posledních desetiletí bylo navrženo a úspěšně aplikováno několik metod pro přípravu transgenních živočichů, jejichž protokoly, techniky a podmínky provedení jsou neustále optimalizovány a zdokonalovány za účelem získání co nejvyššího výnosu. Jednotlivé postupy pro generování transgenních kmenů myší se liší nejen výsledným počtem životaschopných jedinců, ale samozřejmě také časovou či technickou náročností a dalšími faktory.

Cílem této bakalářské práce je tedy porovnat dostupnost, výtěžnost, rizika jednotlivých metod a využití transgenů při studiu chování jak organismů, tak jednotlivých buněčných populací právě na nejtypičtějším a nejběžněji používaném savčím modelovém organismu, jakým je myš.

2 Geneticky modifikovaný organismus

2.1 Charakteristika a historie GMO

Geneticky modifikovaný organismus je takový, jenž ve svém genomu obsahuje rekombinantní DNA vnesenou lidským zásahem pomocí metod genového inženýrství. Tento vědní obor se rozvíjí v posledních desetiletích a umožňuje prorazit mezidruhovou bariéru pro využití genů a modifikovat dědičnou informaci buněk transgenních živočichů metodami, které zajistí u buněk přijetí, zabudování a projev genetických sekvencí z buněk dárcovského organismu.

Genové inženýrství vzniklo v 70. letech 20. století a jeho principy se začaly brzy používat v praxi, např. pro přípravu různých farmakologických preparátů. Jedněmi z prvních byly lidský inzulin či růstový hormon připravované v bakteriích. První transgenní myš byla připravena roku 1980 (Gordon *et al.*, 1980) a o dva roky později Ralph Brinster a Richard Palmiter úspěšně vložili do myších embryí krysí gen pro růstový hormon. Myš nesoucí tento cizí gen vyrostla do dvojnásobné velikosti ve srovnání se svými sourozenci.

Myš se tak stala nejtypičtějším a nejběžněji používaným savčím modelovým organismem a její transgenní kmeny se dnes využívají nejen pro studijní účely, ale slouží také jako významný model pro výzkum např. závažných lidských chorob.

2.2 Metody produkce transgenních živočichů

Pro přípravu transgenních živočichů lze použít postup *in vitro*, kdy jsou cizorodé geny vloženy do kultivovaných buněk či tkáně, nebo se uplatňují metody *in vivo*, kdy jsou geny vpraveny přímo do tkáně živého organismu.

U myší, jakožto mnohobuněčných organismů s oddělenou germinální a somatickou linií buněk, je většina metod pro přípravu transgenních zvířat směřována na zygotu. Běžně je používána technika mikroinjekce DNA do prvojádra, dále přenos genů pomocí retrovirových vektorů, spermiový přenos, přenos jader a lipofekce. Méně často se využívají embryonální kmenové buňky, které lze vnášet do cizích zárodků.

2.2.1 Mikroinjekce

Metoda mikroinjekce patří mezi nejběžněji používané metody pro přípravu transgenních myší. Genový produkt je vstříknut do jednobuněčného zárodku. Ten se dá u myší získat poměrně snadno a opakovaně ve velkém množství.

Nejprve je nutné připravit oplozená vajíčka. Ta se buď získávají z čerstvě oplodněných samic, u kterých byla před tím provedena ovariální stimulace, nebo je možné po stimulaci samic odebrat oocyty, jež se uvolnily do ampule oviduktu a následně u nich provést *in vitro* maturaci a oplození. Do prvojádra je injikována DNA za použití speciálního mikroskopu vybaveného mikromanipulátory. Vajíčko je imobilizováno stabilizační pipetou a pomocí skleněné mikrokapilární injekční pipety je do jednoho z pronucleí vpraveno malé množství roztoku s cizorodou DNA. Častěji se volí samčí pronucleus, protože je větší a aplikace je tedy jednodušší. Za těchto podmínek asi 25 % myší, které se vyvíjejí, zdědí jednu nebo více kopií injikované DNA. 15–30 injikovaných zygot je následně implantováno do vejcovodu pseudopregnanční recipientní matky.

Celková úspěšnost této metody se pohybuje okolo 5 %. Úspěšné zabudování cizorodé DNA do myších chromozomů je ovlivněno mnoha důležitými parametry. Roli zde hraje koncentrace DNA, velikost a forma DNA (nadšroubovicová vs. lineární forma s variabilními konci), stejně jako výběr místa vpravení injekce, jejíž obsah může být vstříknut do samčího či samičího pronuclea nebo do cytoplasmy. Celková účinnost závisí také na výběru vhodného kmene myší, například generování transgenních myší, které exprimují cizorodé geny pro růstový hormon je asi osmkrát jednodušší při použití hybridních myší C57Bl/6 x SJL než při použití inbredního kmene C57Bl/6 (Brinster *et al.*, 1985).

Nevýhodou metody je, že se injikovaná DNA integruje do hostitelského genomu náhodně, následkem čehož může docházet k inzerčním mutacím. Velice často se uplatňuje také poziční efekt, kdy je po integraci ovlivňována okolní DNA a následkem je variabilní exprese transgenů. Pokud je integrace úspěšná a zvířata mají zabudovaný transgen ve své genomové DNA, je jen přibližně 50% pravděpodobnost, že bude docházet k jeho expresi (Wall, 1996).

Metoda mikroinjekce jako techniky pro přípravu transgenních myší patří mezi nejstarší a je vzhledem k tomu dobře prozkoumána, také díky její relativně snadné dostupnosti patří stále navzdory svým nevýhodám k nejčastěji používané metodě pro přípravu geneticky modifikovaných myší.

2.2.2 Retrovirové vektory

Metoda využívající retroviry jako nástroj pro transgenezi myši je založena na schopnosti těchto RNA virů pronikat do hostitelských buněk a zabudovat svůj vlastní genetický materiál do dědičné informace hostitelské buňky. Tato tzv. provirová DNA se poté replikuje jako součást DNA hostitelské buňky a dává vznik novým virům.

Retroviry je možné zbavit jejich vlastních genů a místo nich vložit do viru genový konstrukt. Při přípravě takového vektoru je nutné zajistit, aby se nadále choval jako virus a vnášel tuto genetickou informaci do buňky a zároveň zamezit produkci nových plně životaschopných virových částic schopných zničit buňku. Následná integrace je sice náhodná avšak velice stabilní.

Zvláštní skupinou jsou tzv. endogenní retroviry, jejichž genetický materiál je integrován do germinální buněčné linie a může být děděn potomky. Právě tato forma viru MMLV (Moloney murine leukemia virus) byla použita jako vektor při přípravě první transgenní myši touto technikou (Jaenisch, 1976). Jelikož většina retrovirů je schopna infikovat buňku pouze nachází-li se v mitotické fázi buněčného cyklu, konkrétně v metafázi, kdy dochází k rozpadu jaderného obalu, je integrace retrovirového vektoru do samičích zárodečných buněk často úspěšná, protože oocyty setrvávají v metafázi druhého meiotického dělení, kdy též není přítomen jaderný obal, ve srovnání se somatickými buňkami po mnohem delší dobu (Chan *et al.*, 1998). Efektivita přenosu genu bývá tedy vyšší než např. při využití mikroinjekce DNA, avšak velkým omezením je délka genu, který lze do retroviru vložit, jež obvykle nepřesahuje délku 10 kb.

Hlavní důvod, proč tato metoda stále nemá při transgenních pokusech široké uplatnění, je spojen s obavami týkajícími se schopnosti retrovirů navodit nádorové bujení či způsobit infekci při aplikaci příliš vysokých koncentrací viru. Navíc, provirová DNA bývá v transgenních zvířatech často inaktivována na úrovni transkripce a exprese transgenu je tak výrazně omezena (Chan *et al.*, 1998).

2.2.3 Spermiový přenos

Tato metoda byla popsána v polovině 80. let 20. století, kdy bylo objeveno, že spermie mají schopnost vázat exogenní DNA a mohou být tedy použity jako vektory pro generování transgenních myši. Technika se ukázala být velmi jednoduchá a málo nákladná. Spermie jsou inkubovány na vhodném médiu, k němuž je přimíchán genový

konstrukt a po zabudování cizorodé DNA mohou být transfekované spermie použity k *in vitro* oplození oocytů. Účinnost metody dosahovala 30 % (Lavitrano *et al.*, 1989).

Většina pokusů tento experiment zopakovat však selhala a metoda se jevila jako neúčinná. Pro zvýšení pravděpodobnosti vstupu cizorodé DNA do spermií lze využít elektroporace či smíchat exogenní DNA s monoklonálními protilátkami, které se váží na povrchový antigen spermií (Chang *et al.*, 2002). Jinou zajímavou metodou je přímá injekce hlavičky spermie spolu s exogenní DNA do oocytu metodou známou jako intracytoplasmatická injekce spermie (ICSI), jež se u myší používá k přenosu dlouhých fragmentů DNA (shrnuto v Collares *et al.*, 2005).

U myší se jako velice efektivní jeví alternativní metoda izolace a následné retrovirové transfekce samčích zárodečných kmenových buněk. Ty jsou poté transplantovány do semenotvorných kanálků recipientních myší a vyvíjejí se z nich transgenní spermie. Úspěšnost zabudování a exprese transgenů se pohybuje okolo 4,5 % a následně je úspěšně přenesen a exprimován i v následující generaci (Nagano *et al.*, 2001).

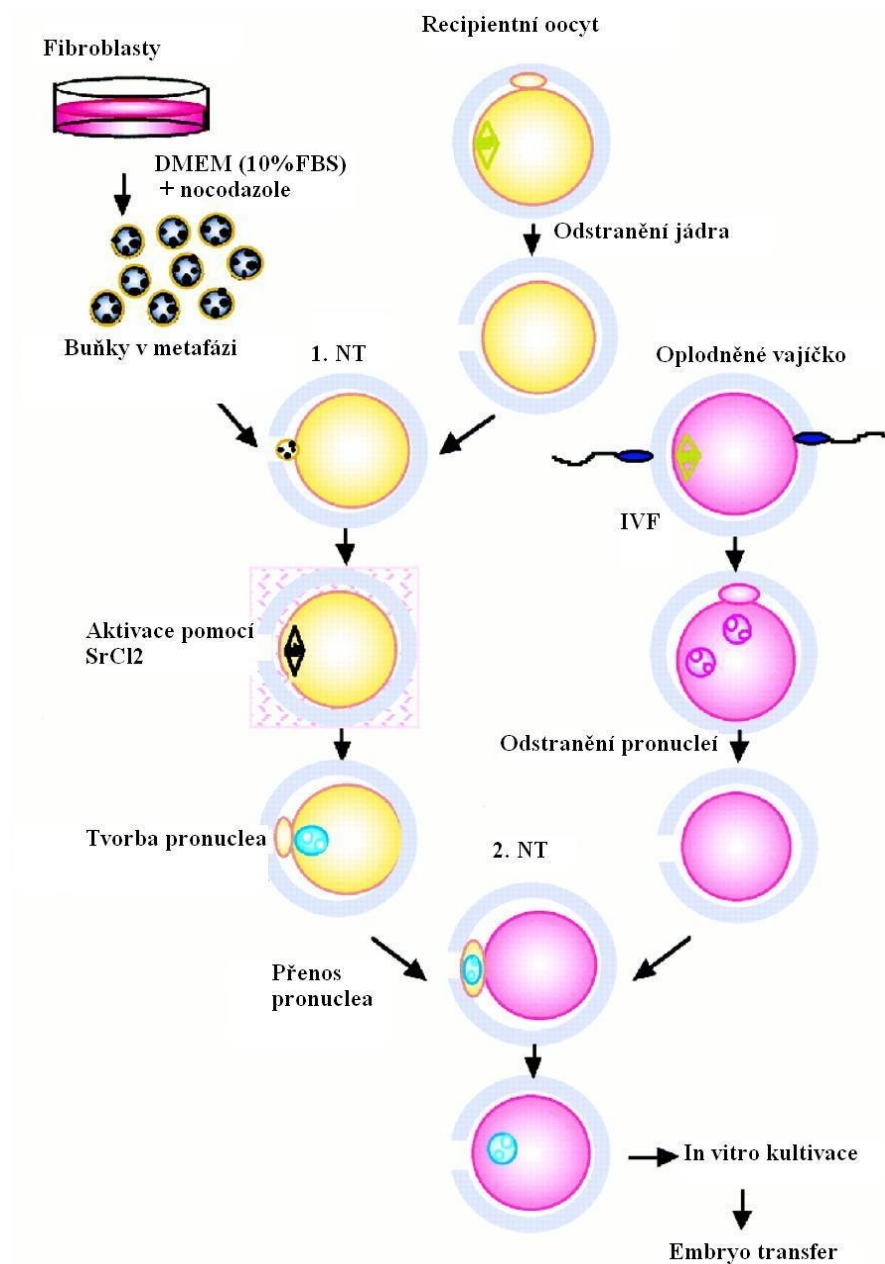
Výsledky v oblasti studia této techniky pro přípravu transgenních zvířat však stále ukazují, že je to metoda velice nespolehlivá. Její účinnost může v jednotlivých případech dosahovat více než 50 %, ale zároveň je velmi často nulová.

2.2.4 Přenos jader

Principem této metody, která je známější spíše pod označením klonování, je vpravení jádra somatické buňky do enukleovaného oocytu. Vývoj zárodka je pak spojen s nutným procesem reprogramování, kdy musí být zastavena diferenciace a naopak indukována pluripotence a exprese genů důležitých pro vývoj embrya. Vzniklý jedinec má totožnou genetickou informaci s jedincem, ze kterého byla odebrána buňka použitá ke klonování. Účinnost této techniky se v současné době pohybuje okolo 10 % narozených mláďat z celkového počtu klonovaných zárodků, které byly přeneseny do náhradních matek. Klony však velice často trpí syndromem velkého potomka, mají zvětšené orgány a tím způsobené problémy s dýcháním či krevním oběhem a vyznačují se zvýšenou náchylností k tvorbě nádorů, nebo trpí jinými defekty, které snižují jejich životaschopnost. Molekulární analýzy prováděné u klonovaných embryí či potomků ukázaly, že jsou tyto anomálie způsobeny abnormálními epigenetickými modifikacemi jako jsou např. DNA methylace nebo histonové modifikace, které vedou k chybnému

reprogramování (Dean *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007). Studie se tedy zaměřily na možnost prevence těchto epigenetických vad za účelem zvýšení úspěšnosti u klonování živočichů.

Efektivita je jednoznačně ovlivněna typem buňky, ze které bylo jádro odebráno. V současné době je možné klonovat přenosem jader z buněk nejrůznějších typů, které mohou pocházet z raných embryí, plodů i dospělých jedinců. Pozitivních výsledků u myši bylo dosaženo při použití jader izolovaných s fibroblastů nacházejících se v metafázi buněčného dělení a následným provedením sériového jaderného přenosu, jehož postup je znázorněn na obrázku 1 (Ono *et al.*, 2001).



OBR. 1: Sériový jaderný přenos (převzato a upraveno dle Ono, 2001)

Velmi pozitivní výsledek byl pozorován také u myších oocytů s transplantovanými jádry, která byla ošetřena inhibitory histon deacetyláz, konkrétně suberoylanilidhydroxamovou kyselinou, jejíž použití vedlo k celkovému zlepšení ve vývoji klonovaných myší a celková výtěžnost životaschopných jedinců dosáhla 16 % (Ono *et al.*, 2010).

Výhodou produkce transgenních myší pomocí klonování je, že lze vybrat buňky, do kterých byl genový konstrukt úspěšně vpraven a každý narozený potomek je tedy transgenní. Při postupu pomocí mikroinjekce genu je možné ověřit úspěch procesu až u malé části narozených myší, proto je produkce transgenních zvířat mikroinjekcí oproti klonování časově i finančně náročnější (shrnuto v Collares *et al.*, 2005).

2.2.5 Embryonální kmenové buňky

Myší embryonální kmenové buňky (ESC-embryonic stem cells) jsou získávány z vnitřní buněčné vrstvy blastocyst a následně jsou kultivovány *in vitro*. Díky jejich schopnostem se neustále dělit a diferencovat se v jakoukoli linii buněk kromě trofektodermu, našlo jejich využití široké uplatnění v přípravě geneticky modifikovaných jedinců. Na základě homologní rekombinace je možné připravovat životaschopné myši s genovým knockoutem či myši s konkrétními bodovými mutacemi. Díky myším se zacílovanými geny jsou vědci schopni připravit zvířecí modely, které simulují lidské geneticky podmíněné choroby a umožňují, tak jejich studium (Limaye *et al.*, 2009).

Další vlastností totipotentních kmenových buněk je možnost jejich inkorporace do vyvíjejících se cizích zárodků. Tím vzniká tzv. chiméra neboli jedinec, jehož tělo je tvořeno buňkami pocházejícími ze dvou různých jedinců. Pokud embryonální kmenové buňky vytvoří pohlavní žlázy chiméry, je genetická informace v nich obsažená přenesena na potomky těchto jedinců.

U kmenových buněk vyizolovaných z embryí daného kmene dojde po provedení genového knockoutu k vyřazení exprese konkrétního genu, následně jsou buňky injikovány do vyvíjejících se embryí jiného kmene myši a vloženy do náhradní matky. Narozené chiméry jsou následně kříženy s normálními jedinci a dle zjevného fenotypu potomků, lze určit, které chiméry mají germinální linii buněk vytvořenou z implantovaných kmenových buněk a jejich potomstvo se tedy vyznačuje heterozygotitou pro sledovaný gen. Genový konstrukt je do embryonálních kmenových

buněk vnesen pomocí elektroporace a stále častěji se využívají také viry. Jeden z prvních experimentů spojený s genovou manipulací ESC zahrnoval přenos exogenní DNA právě pomocí retrovirového vektoru (Robertson *et al.*, 1986). Transdukce byla provedena také pomocí adenovirů či lentivirových vektorů (Smith-Arica *et al.*, 2003; Kosaka *et al.*, 2004) a tento typ přenosu se v některých případech vyznačoval větší účinností transdukce a menší cytotoxicitou než metoda elektroporace.

Většina kmenových buněk je odvozena z myšního kmene 129/Sv (Doetschman *et al.*, 1985), protože v minulosti byly tyto myši nejčastěji využívány pro studium embryonálního vývoje a dále slouží jako model pro studium biologie zárodečných buněk a rakoviny varlat (Jiang a Nadeau, 2001). Od tohoto kmene odvozené ESC se lépe kultivují *in vitro* ve srovnání s ESC, odvozenými od jiných myších kmenů, které se hůře inkorporují do blastocysty. Dalšími populárními kmeny jsou BALB/c myši, které jsou velmi často používány v imunologických experimentech (Dinkel *et al.*, 1999) a kmen C57Bl/6.

Tato metoda má velký potenciál a význam ve výzkumu chorob včetně rakoviny, v současné době se podařilo vypěstovat embryonální kmenové buňky u dalších živočišných druhů včetně člověka. Značné etické problémy však možný rozsah využití ESC utlumují.

2.2.6 Liposomy

Liposomy jsou uměle vytvořené modely buněčných membrán, které ve svém nitru uzavírají vodný roztok. Stěna liposomu dokáže splynout s cytoplazmatickou membránou a jeho obsah se tak uvolní do nitra buňky. Této vlastnosti bylo využito krátce po prvním popisu liposomů, které byly následně aplikovány k dodávce látek do buněk. Pokud je ve vodné fázi přítomen genový konstrukt, dostane se do nitra liposomu a následně může být přenesen do buňky.

Pro přenos cizorodé DNA se nejčastěji používají kationické liposomy, které jsou pozitivně nabitě a s molekulami DNA vytvářejí stabilní komplex. Jedním z nejčastěji využívaných kationických lipidů je lipofectin, poprvé popsán roku 1987 (Felger *et al.*, 1987). Jedná se o směs N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylamonium chloridu (DOTMA) a drogy. Po přidání a zabudování určitých molekul, např. protilátek, do stěny liposomu, je možné tyto modely membrán zacílit na určitý typ buněk v organismu.

Technika je velice jednoduchá, vysoce reproduktivní a účinnější než např. vpravování cizorodé DNA do somatických buněk pomocí elektroporace.

3 Ovariální stimulace myši

Jelikož většina metod přípravy transgenní myši je zaměřena na zygotu a pro maximální výtěžnost experimentu je zapotřebí velkého počtu oocytů, je nezbytně nutné provést ovariální stimulaci myši, jejímž principem je vyvolání růstu u většího počtu sekundárních (antrálních) folikulů, než v normálním cyklu a jejich ovulace, která je nejčastěji vyvolána pomocí lidského choriového gonadotropinu hCG (Human Chorion Gonadotropin) imitujícího funkce luteinizačního hormonu (LH).

Oocyty, které jsou uvolněny do ampule vejcovodu, jsou následně odebrány a oplodněny *in vitro*, nebo je samice připuštěna, k oplození dochází *in vivo* a poté jsou odebrány embrya v určitých stádiích vývoje.

3.1 Vhodné kmeny myší

Laboratorní myši hrají stále důležitější roli v oblasti biomedicínského výzkumu a vzhledem k mutagenезi, transgenезi a cílování genů se počet dostupných myších kmenů stále zvyšuje (http://jaxmice.jax.org/manual/breeding_strategies_manual.pdf).

Často používaný kmen pro transgenезi jsou BALB/c myši. Tento albinotický laboratorně vypěstovaný kmen hraje důležitou roli v imunologických výzkumech a ve studiích rakoviny. Nejběžněji se ovšem využívá kmen C57Bl/6 vzhledem k snadné dostupnosti kongenních kmenů, jednoduchému chovu a jejich robustnosti.

Výsledky ovariální stimulace jsou na vhodném výběru kmene závislé vzhledem k odlišnému chování myši či specifickým vývojovým patologiím, jejichž frekvence jsou u některých kmenů zvýšené. Je také prokázáno, že obecně pozitivnějších výsledků je dosažováno u hybridních kmenů, které se vyznačují menší genetickou zátěží než kmeny inbrední.

3.2 Vhodné stáří samic pro ovariální stimulaci

Stáří samic, které mohou být použity pro ovariální stimulaci se samozřejmě také liší v závislosti na kmeni, obecně však platí, že se používají samičky, které jsou těsně po dosažení pohlavní dospělosti, tedy po objevení prvního estru, k čemuž dochází většinou mezi 21. - 30. dnem stáří. Myši jsou savci polyestriční a jsou tedy reprodukčně aktivní po celý rok. Jednotlivé estrální cykly jsou vázány na cyklus den-noc, proto je nejlepší pokud je i v chovech dodržen pravidelný a neměnný cyklus světla a tmy. Nejčastěji se používá cyklus 12 hodin světlo a 12 hodin tma.

Pro některé pokusy jsou vyžadovány samice již dospělé, u nichž se ovariální stimulace dá provést v kterémkoli dni estrálního cyklu. U stimulace pomocí PMSG (gonadotropin séra březích klisen) bylo však prokázáno, že podání hormonu v prvním dni estrálního cyklu bylo efektivnější než aplikace hormonu až druhý či třetí den cyklu. Zvýšil se počet i kvalita oocytů, získaná embrya se vyznačovala větším počtem buněk tvořících blastocystu a naopak se snížilo procento apoptických buněk v blastocystě (Tarin *et al.*, 2002).

3.3 Hormony používané pro ovariální stimulaci myší

PMSG je glykoproteinový komplex získávaný ze séra březích klisen. Je produkován endometriem dělohy mezi 40.-130. dnem gravidity. Vykazuje folikulostimulační vlastnosti a vlastnosti luteinizačního hormonu. Přesto, že je méně čistý než např. extrakty získávané z hypofýzy ovcí či koz, vyznačuje se PMSG delším biologickým poločasem a stačí ho tedy aplikovat pouze jednou během stimulace. Podává se ve většině případů peritoneálně.

Růst folikulů může být navozen také pomocí lidského menopauzálního gonadotropinu (hMG), což je směs FSH a LH. hMG je obsažen v moči žen po menopauze odkud je získáván purifikací. Aplikuje se typicky ve formě intramuskulární injekce a díky kratšímu biologickému rozpadu se podává ve dvou dávkách v průběhu stimulace.

Funkci LH simuluje lidský choriový gonadotropin (hCG), jež vyvolává ovulaci. Získáván je purifikací z moči.

4 Kapacitace spermií

Kapacitace je označení maturačních změn spermie, které probíhají v pohlavním traktu samice u savců a učiní spermie schopné oplození. Přesněji řečeno tyto změny připravují spermie na kontakt se *zona pellucida* samičího oocytu a umožní jim podstoupit akrozomální reakci. Molekulární podstata kapacitace stále není dostatečně prozkoumána, je však evidentní, že ejakulovaná spermie není ještě zralá, teprve po strávení určité doby v reprodukčním traktu samice, kde interaguje se složkami ovidukální tekutiny, jež napomáhají kapacitačnímu procesu, je umožněno oplození.

Po dokončení kapacitace dochází u spermií vždy k jevu zvanému hyperaktivace. Jedná se o změny v pohybu spermie, která se začne pohybovat v kruhu následkem asymetrického zvětšení vlnění bičíku. Takovýto typ ohýbání bičíku usnadňuje spermii dostat se k plazmatické membráně oocytu. Hyperaktivované spermie lépe prostupují viskózními tekutinami, a proto mnohem efektivněji pronikají hlenovitým sekretem, který se tvoří v oviduktu samic a extracelulární matrix kumulárního oophoru (Suarez, 1996).

Spermie nekapacitují všechny najednou, ale po určité minimální době inkubace v ovidukální tekutině, nebo v kapacitačním médiu při kapacitaci *in vitro*, se ustanoví populace kapacitovaných spermií o velikosti 2-12 % z celkového počtu, která se udržuje po určité době (Cohen-Dayag et al., 1995). Kapacitované spermie, které se nedostanou k oocytu po krátké době hynou.

4.1 Kapacitační změny

Maturační změny, ke kterým dochází v průběhu kapacitace se týkají proteinového obalu, cytoplazmatické membrány i cytoplazmy spermie.

4.1.1 Změny na povrchu spermie

Na savcích modelech včetně myši bylo prokázáno, že při průchodu oviduktem vytvářejí spermie rezervoár, který prodlužuje životnost spermií v oviduktu a zvyšuje se tak pravděpodobnost početí. To je umožněno díky povrchovým proteinům nacházejícím se v rostrální oblasti hlavičky, jež umožní spermii navázat se na stěnu oviduktu a zabrání jim v průchodu samčím pohlavním traktem. V průběhu kapacitace dochází k ovlivnění těchto povrchových vazebných míst a spermie se uvolňují z epitelu oviduktu (Lefebvre a Suarez, 1996). K tvorbě rezervoáru spermií přispívá

arachidonylethanolamid (AEA), který je sekretován epiteliálními buňkami oviduktu. Přestavba povrchu spermií, jež je způsobena působením kapacitačního signálu, zapříčiní ztrátu afinity spermií k AEA (Talevi et al., 2010).

4.1.2 Změny v cytoplazmatické membráně

V průběhu kapacitace dochází k odstranění většiny cholesterolu z cytoplazmatické membrány, který je vyvazován rozpustnými albuminy obsaženými v inkubačním mediu a zároveň dochází k pohybu fosfolipidů v rámci membrány. Na základě poměru cholesterol/fosfolipidy se dá tedy zjistit, v jakém stadiu kapacitace se spermie nachází, čím menší tento poměr je, tím více se zvětšuje fluidita membrány a dochází k aktivaci určitých iontových kanálů. Asymetrie membrány je narušena přechodem fosfatidylethanolaminu a fosfatidylserinu do vnější vrstvy membrány (Nolan a Hammerstedt, 1997).

Všechny tyto procesy vedoucí ke změně složení cytoplazmatické membrány způsobí její destabilizaci, čímž připravují spermii na akrozomální reakci a umožňují účinnější fúzi s vajíčkem.

4.1.3 Změny v cytoplazmě

Na základě morfologických a funkčních změn, ke kterým dochází během kapacitace v cytoplazmatické membráně je spuštěna signalizační kaskáda, jež umožní spermii kontakt a fúzi s oocytem. Do spermie nacházející se v izotonickém roztoku vstupují pomocí specifických kanálů ionty Ca^{2+} a zároveň pomocí $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotransporteru ionty HCO_3^- . Na zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů se podílí také Ca^{2+} -ATPáza, jejíž aktivita je utlumena vlivem limitace dostupnosti ATP při inkubaci spermií v mediu se sníženou koncentrací glukózy (Adeoya-Osiguwa a Fraser, 1993). Zvýšená koncentrace HCO_3^- vede ke zvýšení intracelulárního pH a k aktivaci HCO_3^- dependentní adenylyl cyklázy. Narůstá koncentrace cAMP uvnitř spermie, důsledkem čehož se aktivuje proteinkináza A (PKA) a následně dochází k fosforylaci tyrozinu některých cytoplazmatických proteinů. Tento efekt může být způsoben také přítomností reaktivních kyslíkových radikálů, například H_2O_2 též napomáhá k aktivaci adenylyl cyklázy, prostřednictvím jejíhož produktu se zapíná funkce PKA (Rivlin et al., 2003).

Aktivace tyrozin kinázy je důležitá pro aktivaci fosfolipázy D (PLD), jejímž působením se v cytoplazmě přítomný aktin G začne polymerovat na aktin F. Následná

vazba kapacitované spermie na *zona pellucida* vajíčka vede k aktivaci a přesunu fosfolipázy C z cytoplazmy do cytoplazmatické membrány, kde hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP₃), který pozitivně působí na Ca²⁺ kanály přítomné ve vnější akrozómové membráně. Zvyšující se intracelulární koncentrace vápenaných iontů stimuluje velmi rychlou depolymerizaci F aktinu a umožňuje tím akrosomovou reakci (Breitbart *et al.*, 2005).

4.2 Kapacitace *in vitro*

Podstatou kapacitace *in vitro* je inkubace spermií v kapacitačním médiu, které napodobuje fyziologickou tekutinu v oviduktu a časově závislá destrukce či inaktivace inhibičních faktorů nacházejících se na povrchu spermií centrifugací a resuspendováním v médiu. Jako ideální čas preinkubace se jeví 120 minut, v takovémto případě jsou spermie v cca 90-ti procentech schopné oplození (Fraser, 1984). Kapacitačních médií je celá řada, společným důležitým znakem je přítomnost glukózy, která je hlavním zdrojem energie pro spuštění kapacitačních procesů (Hoppe, 1976), iontů Ca²⁺, HCO₃⁻ a sérového albumínu. *In vitro* kapacitace je důležitým krokem při přípravě transgenních zvířat metodou spermiového přenosu, kdy je spojena s inkubací spermií s plasmidovou DNA.

Její potřeba pro efektivní *in vitro* fertilizaci byla prokázána v pokusech prováděných v 70. letech 20. století (Iwamatsu a Chang, 1970). Díky pre-inkubaci spermií v kapacitačním médiu se efektivita oplození zvýšila o zhruba 20 % a k úspěšnému průniku spermií do oocytů došlo v mnohem kratším časovém intervalu. Po inkubaci trvající 2 hodiny je zhruba polovina oocytů oplodněna po 30-ti minutách a po jedné hodině dochází k oplození téměř všech oocytů. Kapacitace je dnes rutinní metodou a díky ní se *in vitro* fertilizace stala užitečnějším nástrojem pro výzkumné účely.

Navzdory výhodám, jež *in vitro* kapacitace poskytuje v procesu oplození je nutné zmínit fakt, že na úkor tohoto objevu dochází ke ztrátám laboratorních zvířat, jež musejí být kvůli odběru spermií usmrcena.

5 Integrace genového konstruktů

Zajištění exprese transgenu v odlišných buněčných typech je dosaženo použitím fúzního genového konstruktů, ve kterém je cílová sekvence umístěna ve směru downstream od specifického buněčného promotoru a upstream vzhledem k polyadenylační [p(A)] signální sekvenci. Genový konstrukt je následně pomocí mikroinjekce vpraven do jednoho z pronukleí oplodněného myšího vajíčka, které je poté vpraveno do oviduktu pseudopregnantní náhradní matky. U potomstva je následně prováděna analýza zjišťující, zda došlo k integraci transgenu a pozitivní myši jsou následně kříženy. Jejich potomstvo je dále sledováno pro expresi transgenu a pokud je úspěšná, jsou myši použity pro vyšlechtění transgenní linie se stálou integrací a expresí transgenu (<http://cancer.ucsd.edu/research-training/shared-resources/transgenic-core/services/Pages/pronuclear-injection.aspx>).

5.1 *In vivo* fertilizace

5.1.1 Izolace prezygotických pronukleárních stádií

Oplodněná vajíčka se získávají ze samic, které byly po ovariální stimulaci připuštěny přes noc k samcům odpovídajícího kmene, a u nichž je druhý den přítomna vaginální zátka, která je spolehlivým znakem proběhlé kopulace. Tvoří se po ejakulaci v důsledku koagulace sekretu semenných váčků a prostaty samce s vaginálním sekretem samice a slouží k zabránění odtoku spermatu z vaginy a rovněž zabraňuje následné kopulaci s jiným samcem. Po 16 až 24 hodinách se zátka rozpouští. Oplodněná vajíčka jsou izolována z vejcovodů, inkubovány v manipulačním M2 médiu s hyaluronidázou, čímž dojde k odstranění kumulárních buněk. Purifikované buňky jsou poté inkubovány při 37°C.

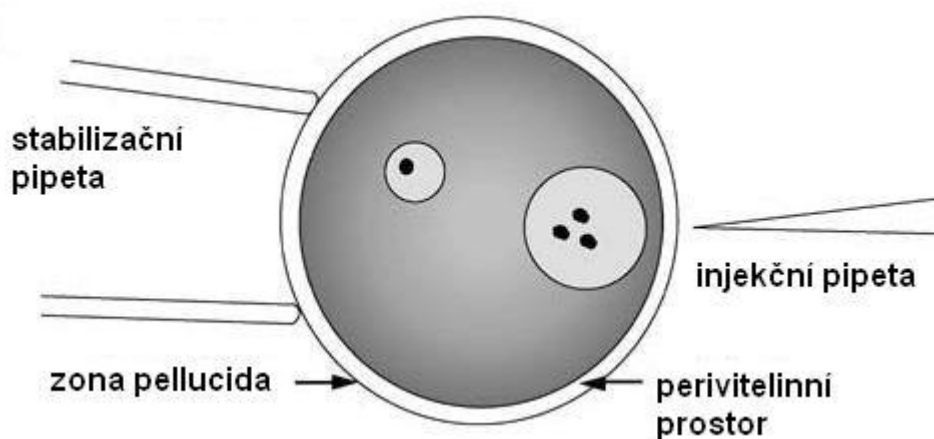
Na kvalitu a kvantitu vajíček, které jsou následně použity pro mikroinjekci má vliv několik biologických faktorů, z nichž klíčovou roli hraje kmen myši. Nejčastěji se používají kmeny hybridní, protože se vyznačují vhodnými reprodukčními charakteristikami a zvýšenou kvalitou vajíček. Avšak i u hybridních kmenů účinnost páření, výnosy a kvalita vajíček nepředvídatelně kolísají. Úspěšnost procesu je výrazně snížena při použití velmi běžných inberdních kmenů (např. SJL/J či BALB/c), v některých případech jsou výnosy tak nízké, že zabraňují užití pro důležité výzkumné účely. Velmi často je využíván kmen CB6, jehož zástupci jsou F1 hybridy mezi myšmi

BALB/c a C57Bl/6 (<http://cancer.ucsd.edu/research-training/shared-resources/transgenic-core/services/Pages/pronuclear-injection.aspx>). Navíc je produkce transgenní linie u tohoto kmene méně časově náročná ve srovnání s produkcí linie inbrední a tedy i náklady jsou zde poněkud nižší.

5.2 *In vitro* fertilizace

5.2.1 Perinukleární injekce

Technicky nejnáročnějším krokem při přípravě transgenních myší je mikroinjekce DNA do pronuklea oplodněného vajíčka. 20-50 zygot je pod stereomikroskopem přeneseno do kapky manipulačního M2 média o objemu 18 μ l umístěné na čistém podložním sklíčku a překryté tenkým filmem minerálního oleje, který zabraňuje evaporaci a tedy zmenšení vajíček a poškození *zona pellucida*. Sklíčko se vzorkem je vloženo do mikroskopu vybaveného za účelem mikroinjekce cizorodé DNA a vajíčka jsou imobilizována pomocí stabilizační pipety. Skleněná mikrokapilární injekční pipeta je naplněna 0,5-1 μ l plazmidové DNA a s její pomocí je DNA vstříknuta do samčího pronuklea, jak je znázorněno na obrázku 2. Pokud je injekce úspěšná dojde ke zduření pronukleu (Ittner a Götz, 2007).



OBR. 2: Perinukleární injekce (převzato a upraveno dle Conner, 2004)

Kopie cizorodého genu se integrují do hostitelského genomu náhodně, což může mít za následek potlačení exprese transgenu či některých genů hostitele. Obvykle dochází při této technice k produkci transgenních mozaiek a navíc spousta zygot je z hlediska technické náročnosti při experimentu poškozena a neschopná použití. Kvůli

těmto limitacím je žádoucí pro experiment použít co největší počet prezygotických stádií, řádově stovky až tisíce (Houdebine, 2002).

Tento krok je kritický a ke zvládnutí jeho provedení jsou od pracovníků laboratoří vyžadovány značné technické dovednosti a trénink.

5.2.2 Embryo transfer

Po úspěšném provedení perinukleární injekce je 15-30 zygot přeneseno do oviduktu pseudopregnanční náhradní matky, u které byla pozorována vaginální zátka signalizující proběhlou kopulaci s vasektomizovaným samcem. Pokud v den injekce nejsou k dispozici žádné pseudopregnanční samice, jeví se jako alternativní metoda kultivace injikovaných zygot přes noc v médiu M16 a následný transfer embryí ve stádiu dvou buněk.

Nejlépeších výsledků je dosahováno v případě, že je synchronizováno postkoitální stádium dárcovských a recipientních matek (Fekete a Little, 1942). Pro manipulovaná embrya je výsledek vysoce variabilní a velmi záleží na kvalitě injikované DNA. Ideální je takový stav, kdy je přeneseno dostatečné množství embryí, aby velikost vrhu byla asi 5-7 mlád'at. Pokud je množství embryí vyvíjejících se v děloze co nejmenší, zvyšuje se pravděpodobnost, že se potomci narodí bez zjevných poškození. Ovšem některé samice se mohou o svá mlád'ata přestat starat, pokud je velikost vrhu příliš malá. Naopak, pokud je velikost vrhu velká (více než 10 mlád'at), hrozí, že se někteří jedinci budou vyvíjet pomalu, čímž se u nich zvyšuje riziko budoucí sterility. Pokud jsou embrya o stejném genotypu přenesena do dvou recipientních matek, mohou být tyto samice po embryo transferu umístěny do stejné klece a následně si budou vzájemně pomáhat zvýšit společné vrhy (Nagy *et al.*, 2003).

Dalším faktorem ovlivňujícím úspěšný embryo transfer jsou technické problémy spojené s přenosem. Kapilára určená k přenosu musí být dostatečně silná, aby umožnila nasátí bez poškození zygot a zároveň dostatečně tenká, aby byl umožněn její průnik do infundibula vejcovodu, následné vyfukování zygot nesmí být moc silné, aby nedošlo k jejich vylití do dutiny břišní (Ittner a Götz, 2007).

5.3 Časový harmonogram

Po náročných přípravách konstruktu nesoucího cizorodou DNA, které mohou zabrat 14 dní až 2 měsíce následují 4 dny určené k ovariální stimulaci samic, preparace spermií a následná kapacitace a preparace připravené DNA. Oplození je krok,

který je proveden v průběhu jednoho dne, vyjímečně dvou dní (viz výše) a časový harmonogram vypadá přibližně takto: 1-2 hodiny preparace zygot; 1-3 hodiny perinukleární injekce; 15-30 minut embryo transfer na jednu náhradní matku.

Po dvou měsících zahrnujících 20 dní gestace a PCR analýzu třítýdenních potenciálních transgenních zvířat následuje křížení k získání F0 generace a po 6-12-ti měsících je možné získat F1 a následující generace.

5.4 Genotypizace

U potomků narozených náhradním matkám se ve věku tří týdnů provádí genotypizace. Z ocásku je jim odebrán vzorek, z něhož se izoluje DNA, která je naštěpena restrikcními enzymy, provede se polymerázová řetězová reakce (PCR) a vzorky jsou následně nanášeny na elektroforézu a vyhodnocovány. Druhou možností analýzy je metoda Southern blotu.

PCR metoda umožňuje amplifikaci velmi malého množství DNA za použití specifických oligonukleotidových primerů v krátkém čase. DNA izolovaná z tkáně je očištěna od proteinů pomocí detergentů a preoteinkinázy K a vzorek je naředěn v neutralizačním bufferu. Vzorek může být odebrán také proděravěním ušních boltců, což se jeví jako méně stresující pro mladé myši, navíc ušní tkáň obsahuje méně pojivové tkáně, naštěpení vzorku zabere méně než jednu hodinu a vzorek může být tedy rovnou použit pro PCR amplifikaci. Tato metoda je velice efektivní a spolehlivá díky vysoké rozmanitosti a dostupnosti amplifikačních primerů. Výhodou je získání optimálního výsledku během několika hodin a množství netransgenních zvířat může být tedy vyřazeno v časném stádiu pokusu (Chen a Evans, 1993).

Southernův blotting je přenos molekul DNA separovaných gelovou elektroforézou na nitrocelulóзовou membránu, vysušením nebo ozáření UV světlem je DNA imobilizována a hybridizována s radioaktivně značenou sondou, která na základě komplementarity bazí hybridizuje pouze s molekulami DNA, jež obsahují sledovanou nukleotidovou sekvenci. Oproti PCR umožňuje Southernův přenos možnost studovat vložený transgen z hlediska počtu kopií a zaznamenat přestavby či vícečetné integrace, jež by mohly zapříčinit zeslabení, nebo dokonce úplnou inhibici exprese transgenů a přenosu do další generace, je tedy žádoucí při analýze F0 generace a jakmile jsou identifikovány užitečné pozitivní transgeny, nevyžaduje již analýza dalšího potomstva Southernovu metodu, ale může být provedena již jen pomocí PCR.

5.5 Křížení pozitivních transgenů

Okolo šestého týdne věku mohou být pozitivní hemizygotní transgenní myši (diploidní jedinci, jež ve svém genomu obsahují pouze jednu alelu příslušného vneseného genu) použity k vyšlechtění trvalé transgenní linie. Nejprve je provedeno zpětné křížení s jedinci rodičovské homozygotní netransgenní linie (tzv. wild-type). Ve většině případů je transgen přenášen dle Mendelovské dědičnosti a je tedy předán zhruba 50-ti procentům potomstva tvořícího F1 generaci. Avšak asi ve 30-ti procentech případů je transgen přenášen na potomstvo s menší frekvencí, nebo dokonce není přenášen vůbec. Běžně je zastáván názor, že ne-Mendelovská dědičnost je výsledkem vzniku transgenních mazaiek v rámci germinální buněčné linie, což může být důsledek pozdní integrace transgenů během embryonálního vývoje (Wall, 1996). Ve vzácných případech, kdy je transgen integrován do více míst v genomu může být frekvence přenosu naopak vyšší než je běžné pro Mendelovskou dědičnost. Jednodušším a produktivnějším způsobem je připouštění hemizygotních transgenních samců k netransgením samičkám, jelikož jeden samec se může po určité době pářit s více samičkami. Toto dlouhodobější udržování transgenů v hemizygotním stavu slouží k minimalizaci komplikací, které mohou být zapříčiněny inserčními mutacemi, nebo postupnou ztrátou fertility později pozorované v důsledku inbreedingu (Nagy *et al.*, 2003).

Homozygotní transgenní linie myši je vyšlechtěna následným křížením pozitivních geneticky příbuzných potomků F1 generace mezi sebou. V F2 generaci, je přibližně jedna čtvrtina potomstva tvořena homozygotními jedinci pro transgen, polovina je hemizygotní a zbylou čtvrtinu tvoří netransgenní jedinci. Jelikož však přibližně 5-15 % náhodných integrací cizorodé DNA do genomu transgenních myši může vést k produkci recesivních letálních mutací, ne všechny transgenní linie mohou být vyšlechtěny až do stádia trvalé homozygotní linie (Nagy *et al.*, 2003). Pro ověření homozygosity jsou transgenní jedinci nakonec ještě zpětně kříženi s původními netransgenními wild-type jedinci za vzniku 100 % pozitivních heterozygotů.

6 Závěr

Všechny metody popsané v této bakalářské práci mají své výhody i nevýhody, jež se odrážejí v jejich využití a dostupnosti. Na základě vlastnosti, že jsou techniky zaměřeny na genové modifikace germinální linie buněk, zygot či raných embryonálních stádií, z nichž se následně vyvíjí transgenní potomstvo, je tedy optimální získat pro tyto účely co největší množství kvalitních oocytů a spermií, což vede ke společnému problému, jímž je velká spotřeba laboratorních zvířat. Zároveň se metody vyznačují nízkou úspěšností, jež je spojena se stresem buněk navozeným mikromanipulací. Naopak společným pozitivem je jednoznačně široké uplatnění pro výzkumné účely a perspektivní využití v budoucnosti.

Většina laboratoří volí pro přípravu transgenních zvířat metodu mikroinjekce DNA, jež se ve srovnání s jinými technikami nevyznačuje přílišnou výtěžností a produkce transgenního potomstva je poměrně časově i finančně náročná, avšak stále platí za nejspolehlivější díky dlouholetému používání, zaběhnuté technice a konstantním výsledkům. Ostatní metody jsou prozatím stále ve stádiu výzkumu a pozorování. Jejich výtěžnost bývá často spojena s riziky vzniku vývojových vad u embryí a oslabenou životaschopností potomků. Studie se tedy zaměřují na molekulární příčiny těchto anomálií, které jsou často epigenetického původu a snaží se o jejich zamezení. Stále nových poznatků a pozitivních výsledků je dosáhováno u technik přenosu jader a embryonálních kmenových buněk, jež mají do budoucna velký potenciál ve využití, avšak jejich rozvoj je ovlivňován etickými problémy, s nimiž jsou tyto metody spojené.

Využití transgenních myších modelů napomáhá objasnit role specifických genů v molekulárních a fyziologických procesech, jež jsou spojené s vývojem zárodků a vznikem chorob. Rozvoj, výzkum a prezentace metod a jejich alternativ, jež zvyšují efektivitu transgenních technik v budoucnu dozajista povedou k objevu nových poznatků využitelných v aplikované biologii.

Seznam použité literatury

Primární zdroje:

- Adenoya-Osiguwa, S. A., Fraser, L. R. (1992). A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99, 187-194.
- Boiani, M. (2010). Is the perfect mouse cloning experiment in sight? *Biology of reproduction*, 83(6), 887-9.
- Breitbart, H., Cohen, G., & Rubinstein, S. (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(3), 263-8.
- Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Yagle, M. K., & Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(13), 4438-42.
- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S., & Eisenbach, M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11039-43.
- Collares, T., Bongalhardo, D. C., Deschamps, J. C., & Moreira, H. L. M. (2005). Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. *Main*, (March), 11-27.
- Cross, N. L. (1998). Role of Cholesterol in Sperm Capacitation 1. *Advancement Of Science*, 11, 7-11.
- Dvořáková-Hortová, K., Šandera, M., Jursová, M., Vašinová, J., Pěkníková, J. (2008). The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*, 108, 154-170.
- Eisenbach, M. (1999). Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Developmental genetics*, 25(2), 87-94.
- Ertzeid, G., & Storeng, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(2), 221-5.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., et al. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413-7.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., & Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7380-4.
- Chan, A. W., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C., & Bremel, R. D. (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14028-33.

- Chang, K., Qian, J., Jiang, M., Liu, Yi-Hsin, Wu, C., Chen, Chi-Dar, et al. (2002). Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnology*, *13*, 1-13.
- Chen, S., Evans, G. A. (1993). Use of Polymerase Chain Reaction for Screening Transgenic Mice. In: White, B. A. PCR Protocols: Current Methods and Applications. *Humana Press Inc.*, 75-81.
- Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., et al. (2003). Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biology of reproduction*, *69*(4), 1394-400.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2007). Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nature protocols*, *2*(5), 1206-15.
- Jaenisch, R. (1976). Germ Line Integration and Mendelian Transmission of the Exogenous Moloney Leukemia Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *73*(4), 1260-1264.
- Kaji, K., & Kudo, A. (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction (Cambridge, England)*, *127*(4), 423-9.
- Lefebvre, R., & Suarez, S. S. (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of reproduction*, *54*(3), 575-82.
- Limaye, A., Hall, B., Kulkarni, A. B. (2009). Manipulation of Mouse Embryonic Stem Cells for Knockout Mouse. *Curr Protoc Cell Biol.*, *19*, 1324.
- Maudlin, I., & Fraser, L. R. (1977). The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, *50*(2), 275-80.
- Nagano, M., Brinster, C. J., Orwig, K. E., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2001). Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(23), 13090-5.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003). Manipulating the mouse embryo. *CSHL Press*, 289-359.
- Nolan, P., & Hammerstedt, R.H. Regulation reaction of membrane in mammalian stability sperm and the acrosome. *The FASEB Journal*, 670-682.
- Suarez, S. S. (1996). Hyperactivated Motility in Sperm. *Journal of Andrology*, *17*(4).
- Tarin, J. J. (2001). Cellular and Morphological Traits of Oocytes Retrieved from Aging Mice after Exogenous Ovarian Stimulation. *Biology of Reproduction*, *65*(1), 141-150.
- Van der Auwera, I., & D'Hooghe, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human reproduction (Oxford, England)*, *16*(6), 1237-43.
- Wall, R. J. (1996). Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology*, *45*, 57-68

Sekundární zdroje:

- Babcock, D. F., & Pfeiffer, D. R. (1987). Independent elevation of cytosolic [Ca²⁺] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 262(31), 15041-7.
- Bradley A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-256.
- Conner, A.D. (2004). Transgenic Mouse Production By Zygote Injection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 23(9).
- Davis, B. K. (1978). Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. In: Kabara, J. J. Symposium on the Pharmacological Effect of Lipids. Champaign, IL: *The American Oil Chemists Society*, 145-157.
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 13734-13738.
- Dinkel, A., Aicher, W. K., Warnatz, K., Bürkic, K., Eibel, H., & Ledermann, B. (1999). Efficient generation of transgenic BALB/c mice using BALB/c embryonic stem cells. *Journal of Immunological Methods*, 223(2), 255-260.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formativ of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*, 87, 27-45.
- Esponda, P. (2005). Transfection of Gametes: A Method to Generate Transgenic Animals. *International Journal of Morphology*, 23(3), 281-284.
- Fekete, E. & Little, C. C. (1942). Observation on the mammary tumour incidence of mice born from transferred ova. *Cancer Res.*, 2, 525-530.
- Fraser, L. R. (1984). Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *Journal of reproduction and fertility*, 72(2), 373-84.
- Hirabayashi, M., Takahashi, R., Ito, K., Kashiwazaki, N., Hirao, M., Hirasawa, K., et al. (2001). A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 50(2), 125-31.
- Hoppe, P. C. (1976). Glucose Requirement for Mouse Sperm Capacitation in vitro. *Biology of Reproduction*, 15, 39-45.
- Houdebine, L. M. (2002) The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol*, 98, 145-160.
- Iwamatsu, T., Chang, M. C. (1970). Further investigation of capacitation of sperm and fertilization of mouse eggs in vitro. *J Exp Zool*, 175:271.
- Jiang I.L., & Nadenau, J.H. (2001). 129/Sv mice - a model system for studying germ cell biology and testicular cancer. *Mammalian genome*, 12, 89-94.

- Kosaka, Y., Kobayashi, N., Fukazawa, T., Totsugawa, T., Maruyama, M., Yong, C., Arata, T., Ikeda, H., Kobayashi, K., Ueda, T., Kurabayashi, Y. and Tanaka, N. (2004). Lentivirus-based Gene Delivery in Mouse Embryonic Stem Cells. *Artificial Organs*, 28, 271–277.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., & de Boer, H. (1991). Generation of Transgenic Dairy Cattle Using 'in vitro' Embryo Production. *Nature Biotechnology*, 9, 844-847.
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., & Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell*, 57(5), 717-723.
- Ono, T., Li, C., Mizutani, E., Terashita, Y., Yamagata, K., & Wakayama, T. (2010). Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biology of reproduction*, 83(6), 929-37.
- Ono, Y., Shimosawa, N., Ito, M., & Kono, T. (2001). Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biology of reproduction*, 64(1), 44-50.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A., & Florman, H. M. (2000). Ca²⁺ entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Molecular biology of the cell*, 11(5), 1571-84.
- Palmiter R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnberg, N. C., & Evans, R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-615.
- Rijkers, T., Peetz, A., & Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res*, 3, 203-15.
- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 70(2), 518-22.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., & Evans, M. (1986). Germ-line transmission of gene introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, 323, 445-448.
- Smith, K. and Spadafora, C. (2005), Sperm-mediated gene transfer: Applications and implications. *BioEssays*, 27, 551–562.
- Smith-Arica, J. R., Thomson A. J., Ansell, R., Chiorini, J., Davidson, B., & McWhir, J. (2003). Infection Efficiency of Human and Mouse Embryonic Stem Cells Using Adenoviral and Adeno-Associated Viral Vectors. *Cloning and Stem Cells*, 5(1), 51-62.
- Suarez, S. S., Dai, X. (1992). Hyperactivation Enhances Mouse Sperm for Penetrating Viscoelastic Media. *Biology of Reproduction*, 46, 686-691.
- Suarez, S. S., & Katz, F. (1991). Evidence for the of Hyperactivated Motility in Sperm1 of California. *Biology of Reproduction*, 381, 375-381.

- Talevi, R., Barbato, V., De Iorio, S., Mollo, V., Capriglione, T., Ricchiari, L., Samo, A., Gueltieri, R. (2010). Is there a role for endocannabinoids in sperm-oviduct interaction? *Hum Reprod Update*, 17, 347-361
- Tanimoto, Y., Iijima, S., Hasegawa, Y., Suzuki, Y., Daitoku, Y., Mizuno, S., et al. (2008). Embryonic stem cells derived from C57BL/6J and C57BL/6N mice. *Comparative medicine*, 58(4), 347-52.
- Tarin, J.J., Perez-Albala, S., Gomez-Piquer, V., Hermenegildo, C., and Cano, A. (2002). Stage of the estron cycle at the time of pregnant mare´s serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 398-405.
- Truett, E. G. (2006). Preparation of genomic DNA from Animal Tissues. In: Kieleczawa, J. DNA sequencing II: optimizing preparation and cleanup, *Jones and Bartlett Publishers*, 33-46
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., et al. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependant pathway. *Development*, 121, 1139-1150.
- Wang, F., Kou, Z., Zhang, Y., Gao, S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 77, 1007-1016.
- Wheeler, M. B. (2003). Production of transgenic livestock : Promise fulfilled. *Journal of Animal Science*, 81, 32-37.
- Wilmut, I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., & Campbell, K. H. S. (2007). Viable Offspring Derived from Fetal And Adult Mammalian Cells. *Cloning and Stem Cells*, 9(1), 3-7.

internetové zdroje:

<http://cancer.ucsd.edu/research-training/shared-resources/transgenic-core/services/Pages/pronuclear-injection.aspx> dostupné online 11. 7. 2011

http://jaxmice.jax.org/manual/breeding_strategies_manual.pdf dostupné online 26. 6. 2011