

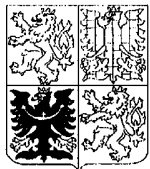
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3186

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.09.1999**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.04.2001**
(Věstník č. 4/2001)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 12 N 15/90

C 12 N 15/09

A 01 K 67/00

(71) Přihlašovatel:

BIOPHARM VÝZKUMNÝ ÚSTAV BIOFARMACIE
A VETERINÁRNÍCH LÉČIV, A.S., Pohoří-Chotouň,
CZ;

(72) Původce:

Trefil Pavel Ing. CSc., Praha, CZ;

(74) Zástupce:

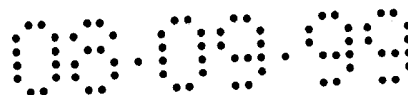
Červenka Josef, Husinecká 11a, Praha 3, 13000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob konstrukce transgenní drůbeže

(57) Anotace:

Konstrukce transgenní drůbeže přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk se provádí tak, že se varlata kohouta akceptora pomocí gama paprsků opakovaně ozáří o síle 8 Gy v jednom ozáření. Po ozáření dojde k úplnému zlikvidování původních prapohlavních spermatogoniálních buněk ve varlatech akceptora, který již nadále nemůže produkovat spermie, přičemž struktura varlat, včetně Sertoliho buněk, zůstane zachována pro implantaci cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora. Z těchto nově implantovaných prapohlavních spermatogoniálních buněk jsou dále produkovány spermie, které jsou oplození schopné a nesou celou genetickou informaci prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora. K implantaci dojde asi 85 až 100 dní od posledního ozáření. Příprava transgenní drůbeže touto cestou je snadná, protože spermatogoniální buňky kohouta donora mohou být transfekovány potřebnou žádanou genetickou informací a tak po jejich úspěšné implantaci do varlat kohouta akceptora dojde takto k tvorbě transgenního kohouta, který po inseminaci slepic jeho ejakulátem, či přirozenou plemenitbou, bude z 1/2 předávat genetickou informaci donora na svoje potomstvo.



ŽV1999-3186

62325

Způsob konstrukce transgenní drůbeže

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu konstrukce transgenní drůbeže využitím prapohlavních spermatogoniálních buněk pro přenos genetické informace u drůbeže.

Dosavadní stav techniky

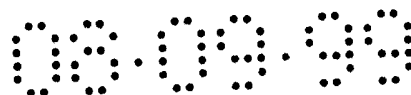
Biotechnologický výzkum v oblasti transgenní drůbeže není zdaleka tak úspěšný jako tomu je u savců. Hlavní příčinou tohoto stavu je unikátní rozmnožovací ústrojí ptáků.

Ptačí zygota na rozdíl od savců není přístupná a je spojena s mimořádně velkým žloutkovým vakem. Hmoty žloutků brání identifikaci pronukleů, v procesu oplodnění dochází k polyspermii a není možné určit které prvojádro se účastní tvorby embrya. Proto například přímá mikroinjekce do prvojádra používaná u myši je u drůbeže téměř nemožná. Práce v uvedené oblasti se u drůbeže proto zaměřily na manipulace s ještě nediferenciovanými drůbežími buňkami, ať již se jedná o blastodermální buňky, primordiální gonocyty či prapohlavní, spermatogoniální buňky.

Využití prapohlavních, spermatogoniálních buněk při konstrukci transgenních jedinců jako první popsal u myši Brinster, L.R. Avarbock, M.R. (1994) Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11303 – 11307.

Jedná se v podstatě o novou oblast možné produkce zárodečných chimér a to částečnou nebo úplnou destrukcí pohlavních buněk ve varlatech jedince a jejich opětovnou rekolonizací pohlavními buňkami jiného jedince. U drůbeže tato metoda nebyla popsána.

Prvním krokem zvládnutí výše uvedené techniky je sterilizace varlat akceptora, neboť destrukce právě těchto prapohlavních spermatogoniálních buněk (progenitorů spermií) není snadná a použití např. busulphanu není zcela odpovídající a dochází po jeho použití buď pouze k částečné sterilizaci donora Vick, L. Luke, G. Simkiss, K. (1993) Germ line chimaeras can produce both strains of fowl with high efficiency after partial sterilization. J.Reprod.Fertil., 98, 637 – 641., nebo při použití vyšších dávek naopak k jeho celkové retardaci - Smýkalová, Š. Kotrbová, A. Trefil, P. (1998) Effect of busulphan on growth and development of the chicken embryos, Vet.Med.-Czech, 43, 105 – 109., což v žádném případě není žádoucí.



Druhým nezbytným krokem úspěšného využití popsaného postupu je nutné zvládnutí přenosu spermatogoniálních prapohlavních buněk akceptora, tedy těch spermatogoniálních buněk, které umožní po přenosu funkční zabudování a rekolonizaci varlat akceptora a následnou produkci oplození schopných spermií. To zatím přináší řadu potíží a nejednoznačných výsledků.

Podstata vynálezu:

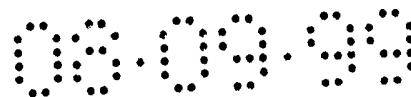
Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob konstrukce transgenní drůbeže, zejména přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se pouze varlata kohouta akceptora opakovaně ozáří gamma paprsky, načež se do jeho neporušených sterilních varlat v intervalu 60 dní až dvou let od posledního ozáření implantují cizí prapohlavní spermatogoniální buňky kohouta donora, z nichž se dále produkují oplození schopné spermie s celou genetickou informací od kohouta donora. Po inseminaci slepic těmito nově vzniklými spermii se vylíhne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora.

Způsob podle vynálezu se dále provádí tak, že se varlata kohouta akceptora 3x až 9x ozáří gamma paprsky o síle alespoň 8 Gy vždy v intervalu 3 až 9 dnů.

Výhodně se způsob podle vynálezu provádí tak, že se varlata kohouta akceptora 5x ozáří gamma paprsky o síle 8 Gy, vždy v týdenním intervalu.

Při tomto ozáření dojde na rozdíl od jiných současných technik k úplnému zlikvidování původních prapohlavních spermatogoniálních buněk ve varlatech akceptora, který již pak nadále nemůže produkovat spermie, přičemž struktura varlat včetně Sertoliho buněk zůstane zachována pro následnou implantaci cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora. V těchto nově implantovaných prapohlavních spermatogoniálních buňkách jsou dále produkovány spermie, které jsou oplození schopné a nesou genetickou informaci prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora, viz schéma č. 1 v příloze.

Příprava transgenní drůbeže způsobem podle vynálezu je snadná a se stoprocentním výsledkem, protože spermatogoniální buňky kohouta donora mohou být transfekovány potřebnou žádanou genetickou informací a tak po jejich úspěšné implantaci do varlat kohouta akceptora dojde takto k tvorbě transgenního kohouta, který po inseminaci, či při přirozené plemenitbě bude z 1/2 předávat genetickou informaci na svoje potomstvo.



Pouze fakt, že uvedený způsob přenosu prapohlavních spermatogoniálních buněk z jednoho jedince do druhého je funkční, je nesmírně cenný a kromě této vlastní skutečnosti nesmírně zajímavý právě při tvorbě transgenní drůbeže. Prapohlavní, spermatogoniální buňky lze snadno před vlastní implantací do kohouta akceptora *in vitro* transfekovat cizorodou genetickou informací, která bude dál z 1/2 přenášena na potomstvo v F1 generaci. Takto pravděpodobně bude otevřena reálná cesta pro využití drůbeže (drůbežího vejcovodu) jako bioreaktoru pro produkci specifických např. pro farmaceutický průmysl cenných proteinů.

Původci vynálezu bylo provedeno velké množství pokusů na ověření způsobu podle vynálezu, z nichž některé byly vybrány do následující příkladové části, která je dále podložena přílohou grafů, stránkou obrázků.

Příklady provedení

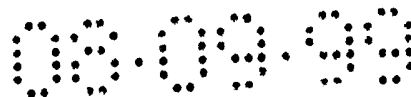
Příklad 1

– úplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou $I I$ v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován v boxu tak, aby bylo možné zevně z boční strany těla provést ozáření přesně na plochu velikosti varlat pomocí gama paprsků. Jako vhodný se ukázal přístroj Theratron T1000 a isotop ^{60}Co . Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje 5x za sebou v týdenním intervalu ozářena minimálně dávkou 8 Gy. Aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na zdravotním stavu a chovné kondici kohouta zhruba po 90 dnech po posledním ozáření ztratí kohout trvale schopnost produkce spermií a je připraven po uvedené době ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora, viz graf č. 1 a graf č. 2. a obrázek č. 1 v příloze.

– příprava a aplikace prapohlavních, spermatogoniálních buněk kohouta donora

Dospělému kohoutu inbrední linie plemene Minorka černá (černá barva peří způsobena recesivní alelou ii) produkujícím ejakulát byl pomocí biopsie odebrán vzorek tkáně z varlat obsahující jeho prapohlavní spermatogoniální buňky. Tyto buňky byly umístěny po dobu 4 hodin do média M 199 Sigma (obsahující 10 % hmotn. Fetal bovine serum, 2 % hmotn. chicken serum, 1 % hmotn. pyruvate sodium, 1 % hmotn. gentamycin) při poměru ředění 1 : 1 s uvedeným médiem. Inkubace buněk probíhala při standardních podmínkách: při 5 % hmotn. obsahu oxidu uhlíkového a při teplotě 40 °C. Poté byly prapohlavní spermatogoniální buňky v celkovém objemu suspenze 200 mikrolitrů aplikovány pomocí injekční sříkačky do každého ozářeného varlate kohouta



akceptora, v době ozáření kohout ztratí po ozáření jakoukoliv produkci ejakulátu, tedy 85 až 100 dní od posledního ozáření.

– *funkční produkce ejakulátu po přenesení prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora*

Ozářený kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá - akceptor s neexistujícími funkčními varlaty po provedeném ozáření začal do 2 měsíců po provedené aplikaci cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta inbrední linie plemene Minorka černá opět produkovat ejakulát s životaschopnými spermii.

– *biologická testace přenesených prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora*

Po provedené inseminaci slepice inbrední linie plemene Leghornka žíhaná (šedivá žíhaná barva způsobená recesivní alelou *ii* genem žíhanosti vázaným na pohlaví B/-) ejakulátem odebraným od ozářeného kohouta inbrední linie plemene Leghornka bílá - akceptora cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta inbrední linie plemene Minorka černá byla inseminovaná vejce dána do inkubátoru a po 21 dnech inkubace se vylíhla pouze černá kuřata.

Tato černá kuřata jsou jasným důkazem, že implantace a kolonizace prapohlavních, spermatogoniálních buněk kohouta donora byla úspěšná, protože vylíhnou-li se pouze černá nebo žíhaná kuřata, to ve své podstatě znamená nepřítomnost dominantní alely *II*, ale pouze přítomnost recesivní alely *ii*, tedy pouze přítomnost funkčních spermií kohouta s recesivním založením barvy peří *ii*, tedy v tomto případě s černou barvou peří, viz schéma č. 1 v příloze.

Příklad 2

– *neúplná sterilizace kohouta akceptora*

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou *II* v lokusu *I*) produkující ejakulát byl fixován po ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 18 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermií (oproti kontrole, graf č. 9 a č. 10), naopak po 150 dnech se koncentrace (viz. graf č. 3) a motilita (graf č. 4) vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.



Příklad 3

-neúplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou $I I$ v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován při ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 22 Gy. Kohout, aniž by se ozáření jakkoliv projevilo na jeho zdravotním stavu a chovné kondici, neztratil ani po 200 dnech sledování trvale schopnost produkce spermií, naopak po 160 dnech se koncentrace (viz. graf č.5) a motilita (graf č.6) sice o něco nižší vrátila do původních hodnot před ozářením a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními, spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

Příklad 4

-neúplná sterilizace kohouta akceptora

Dospělý kohout inbrední linie plemene Leghornka bílá (bílá barva peří způsobena dominantní alelou $I I$ v lokusu I) produkující ejakulát byl fixován pro ozáření stejně jako v příkladu 1. Varlata kohouta byla pomocí ozařovacího přístroje ozářena jednorázovou dávkou 26 Gy. Tato dávka se projevila negativně na zdravotním stavu kohouta, místo ozáření bylo na kůži lehce zduřelé a načervenalé kohout jevil známky únavy ještě několik dnů po ozáření. Kohout ztratil téměř po 160 dnech schopnost produkce spermií, viz graf č.7, ale produkce ejakulátu v nepatrné míře pokračovala a spermie vykazovaly i určitou motilitu, viz graf.č.8. Bylo možné konstatovat, že tato dávka byla poměrně vysoká, zatížila zdravotní stav kohouta, ale nebyla z pohledu ještě pokračující produkce ejakulátu dostatečná a kohout nebyl připraven ke kolonizaci varlat prapohlavními spermatogoniálními buňkami kohouta donora.

Průmyslová využitelnost

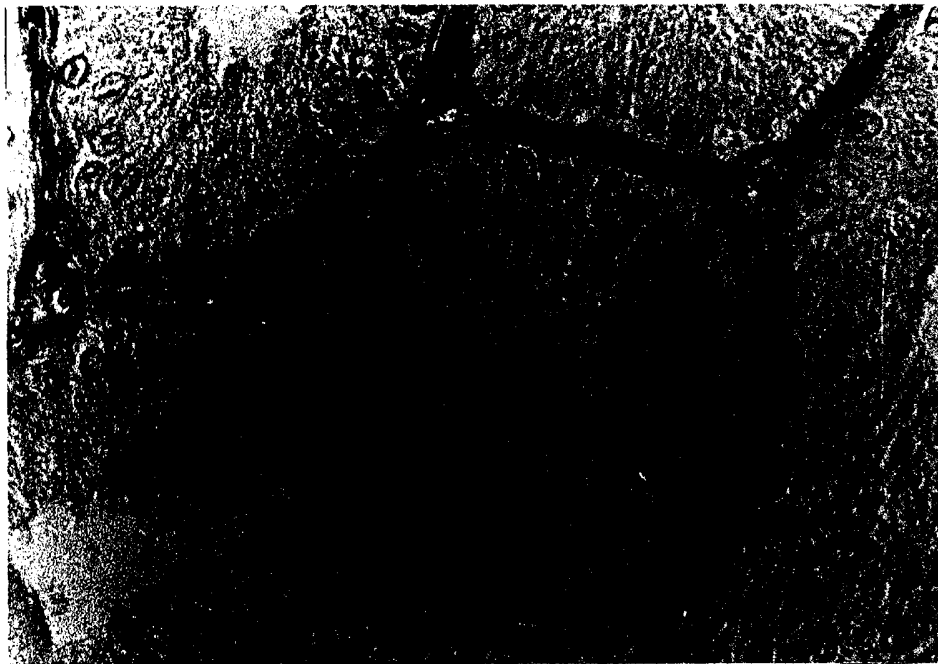
Opakovaným ozářením gamma paprsky varlat kohouta akceptora a implantací cizích prapohlavních spermatogoniálních buněk kohouta donora do neporušených sterilních varlat kohouta akceptora dojde u něj k opětovné produkci oplození schopných spermií s celou genetickou informací od kohouta donora. Po inseminaci slepic těmito produkovanými spermii vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora. Uvedený postup bude využíván průmyslovým způsobem drůbežářskými šlechtitelskými a biotechnologickými společnostmi.

PATENTOVÉ NÁROKY

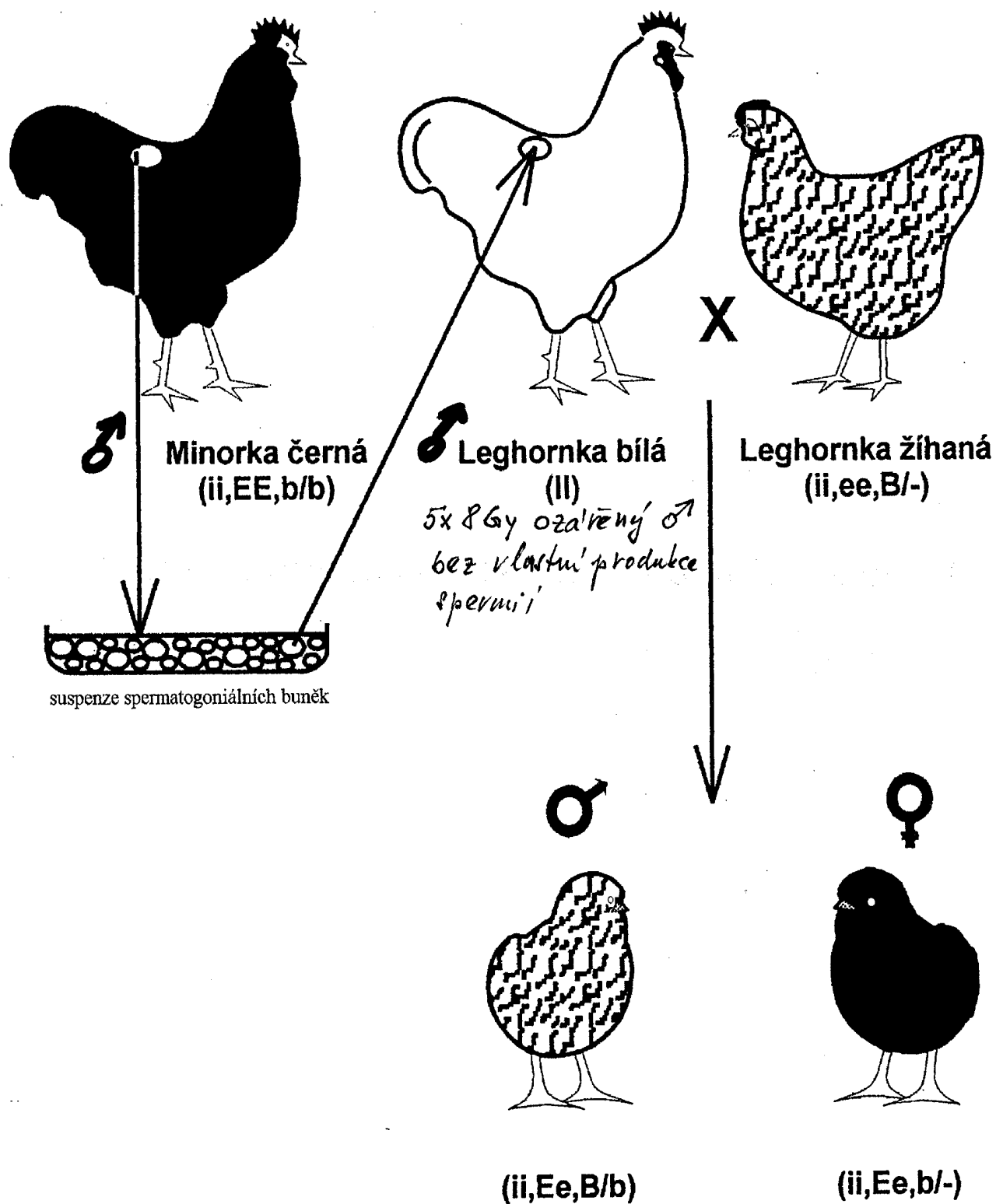
1. Způsob konstrukce transgenní drůbeže, zejména přenosem prapohlavních spermatogoniálních buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pouze varlata kohouta akceptora zevně opakovaně ozáří gama paprsky, načež se do jeho neporušených sterilních varlat v intervalu 60 dní až 2 let od posledního ozáření implantují cizí prapohlavní spermatogoniální buňky kohouta donora, z nichž se dále produkují oplození schopné spermie s celou genetickou informací od kohouta donora, z kterých po inseminaci slepic vznikne transgenní drůbež s 1/2 genetické informace od donora.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se varlata kohouta akceptora ozáří 3x až 9x gama paprsky o síle alespoň 8 Gy vždy v intervalu 3 až 9 dní.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se varlata kohouta akceptora ozáří 5x gama paprsky o síle 8 Gy vždy v týdenních intervalech.

PŘÍLOHY

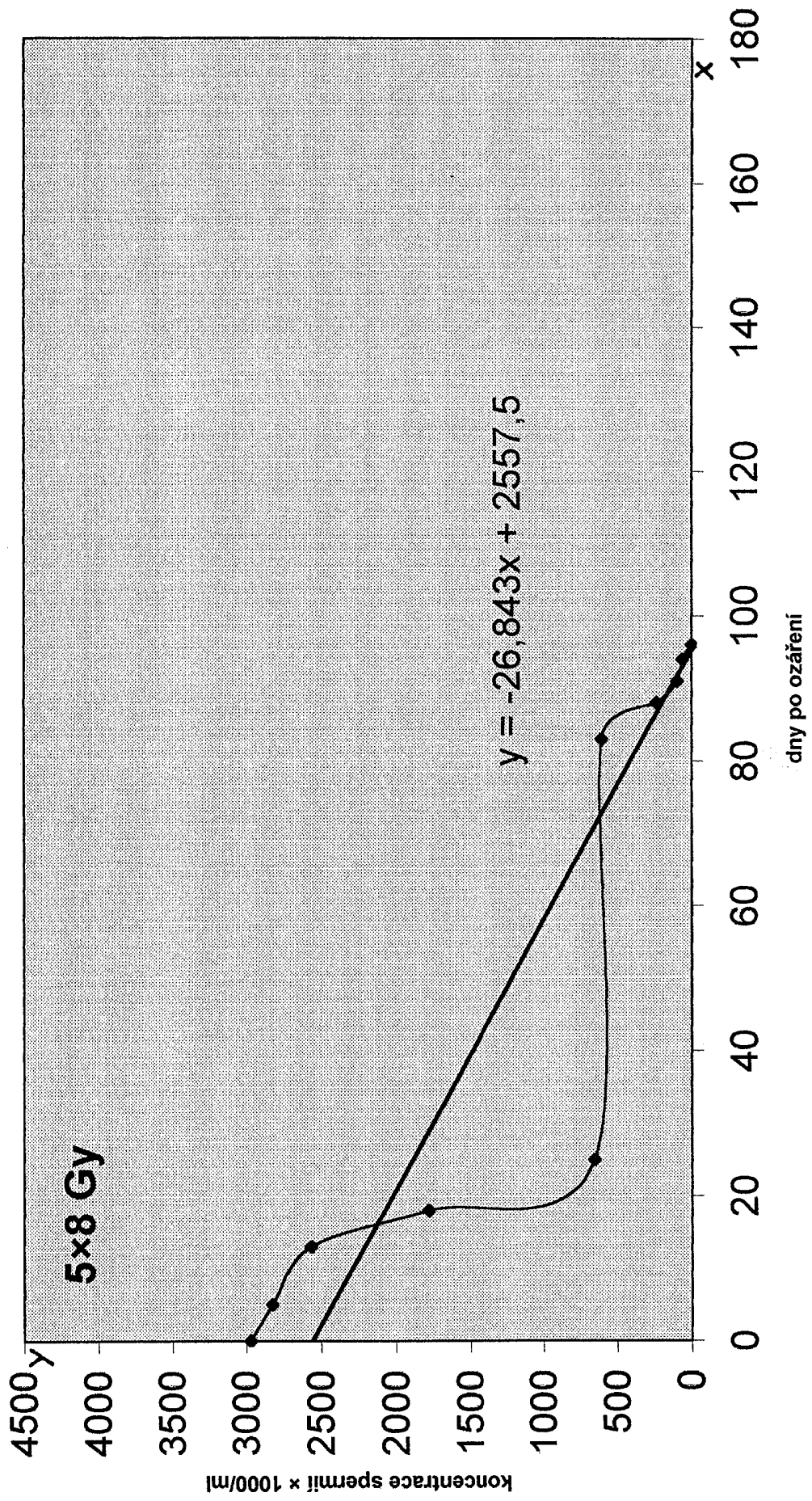
fotografie semenotvorných kanálků po opakovaném (5x8 Gy) ozáření varlat kohouta akceptora. V semenotvorných kanálkách jsou patrné pouze Sertoliho buňky, prapohlavní, spermatogoniální buňky nejsou patrné. (barveno Pas, x 400)



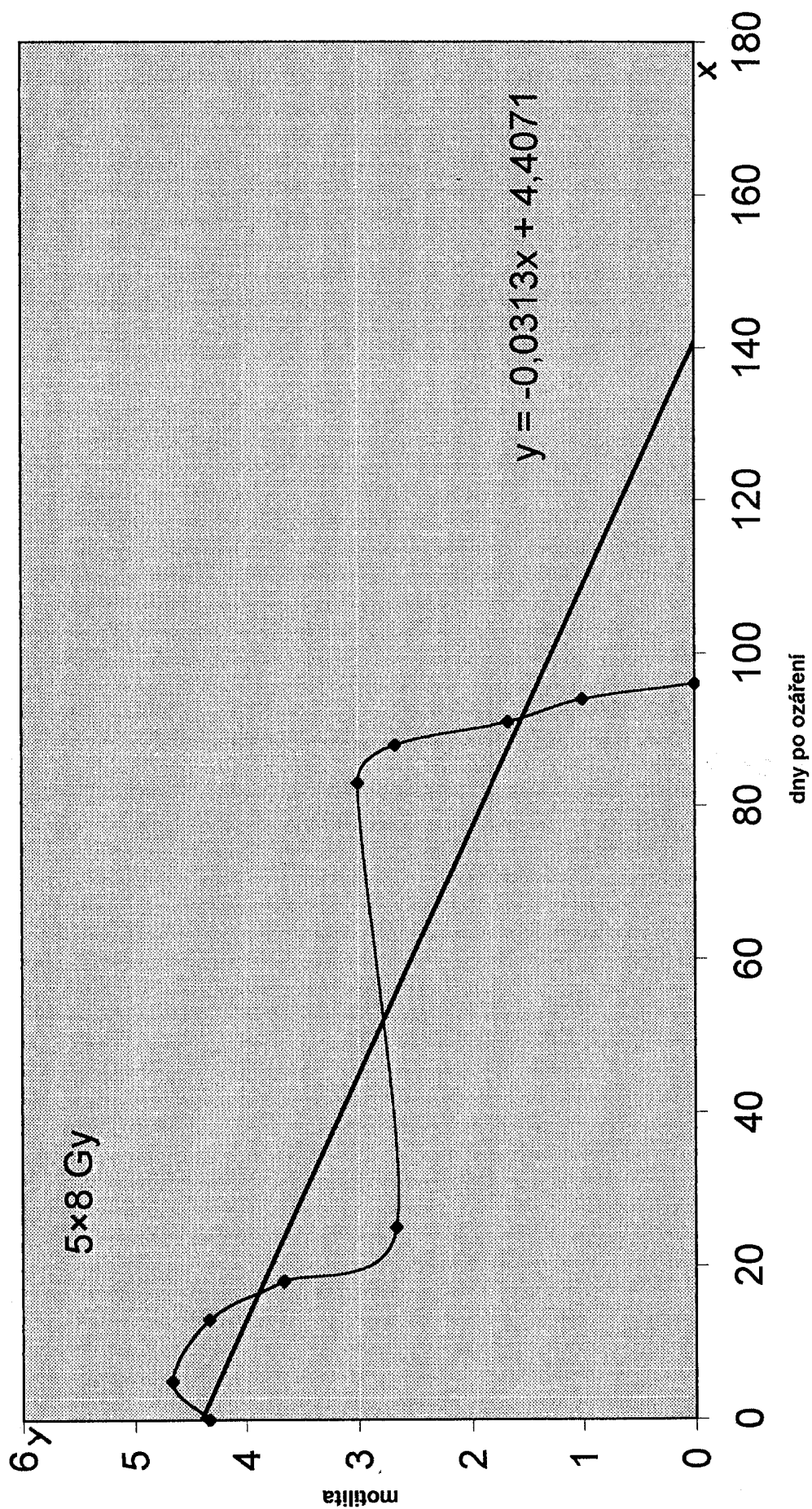
obr. č. 1



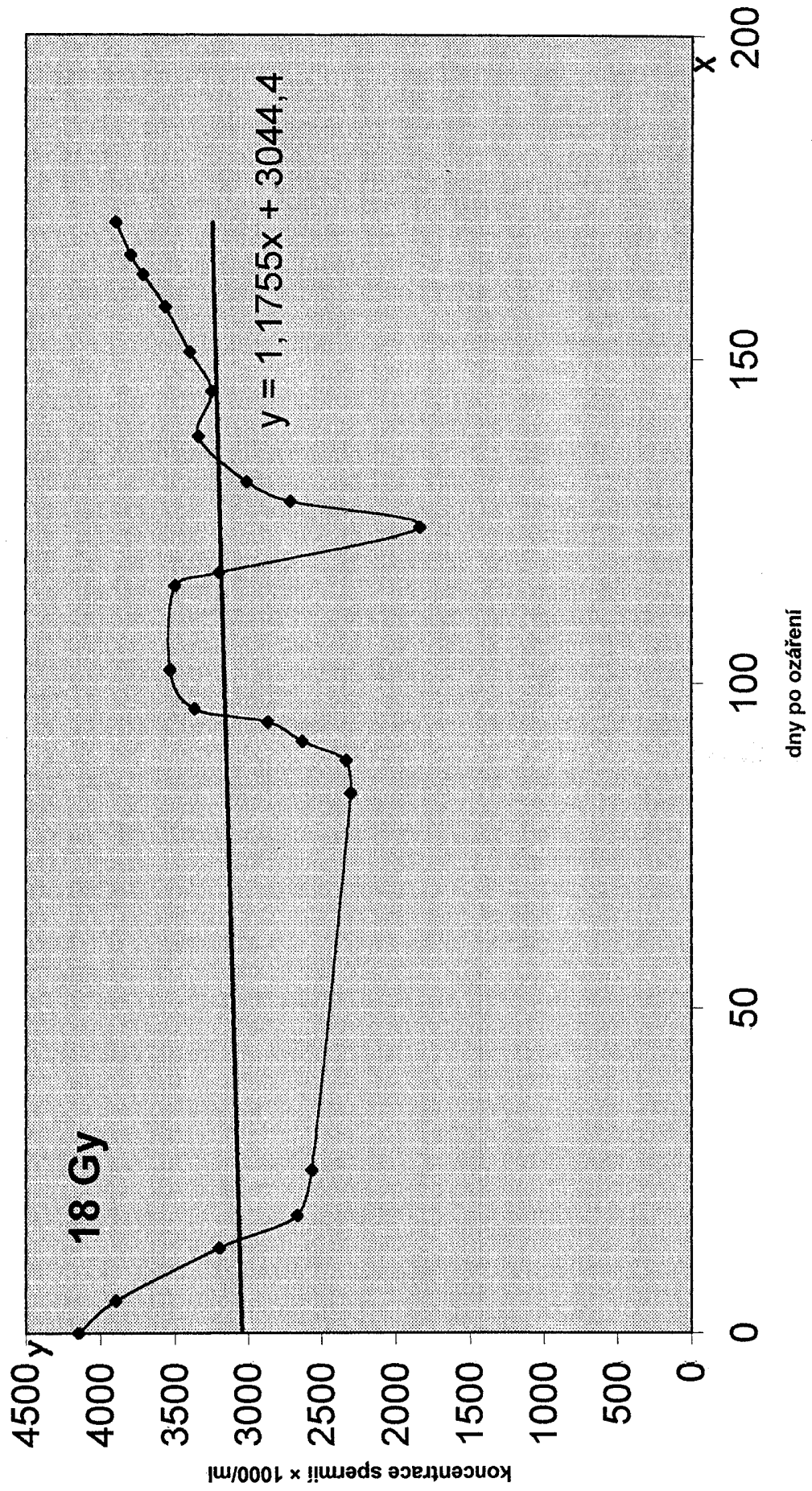
Graf č. 1



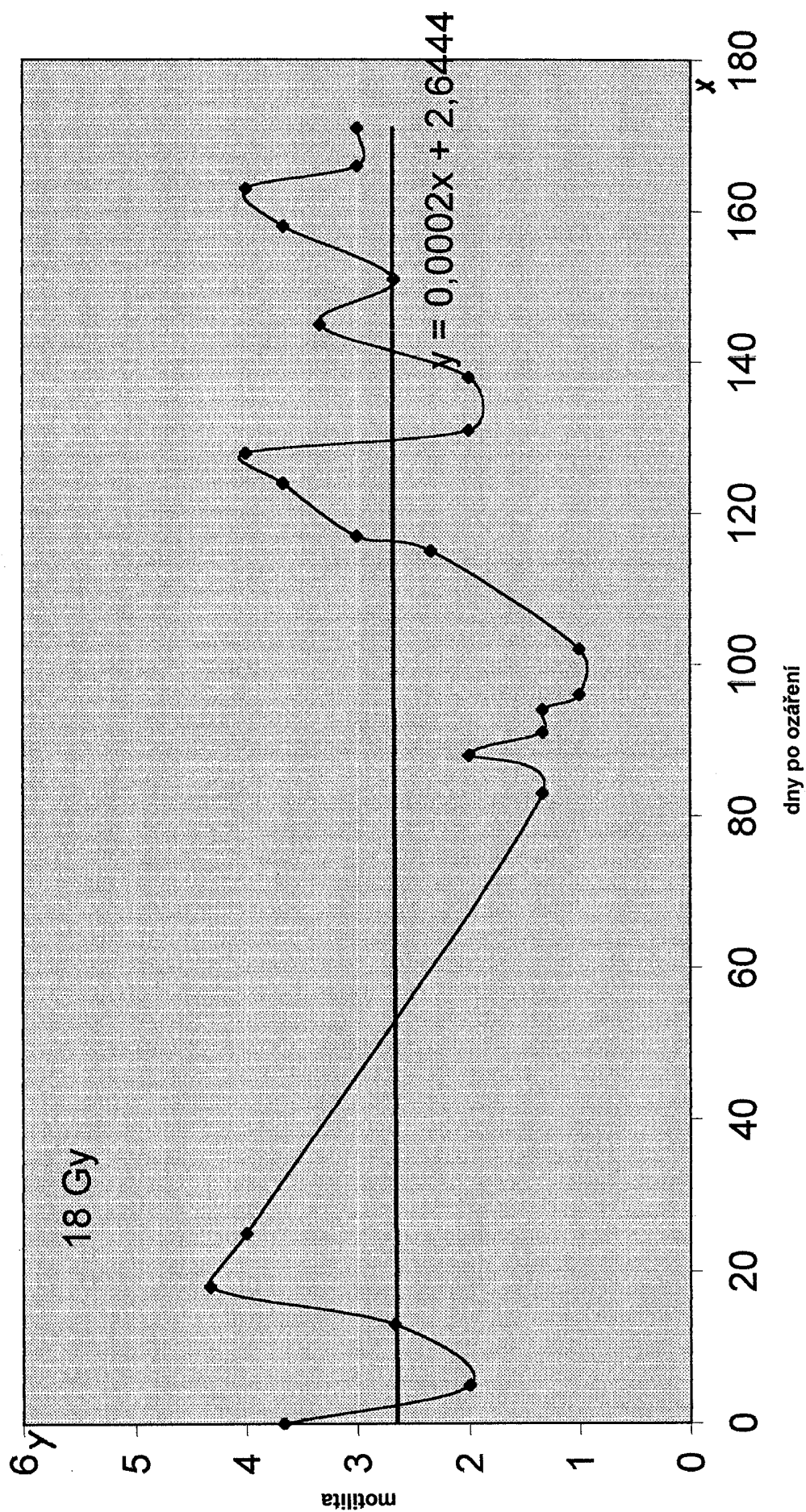
Graf č. 2



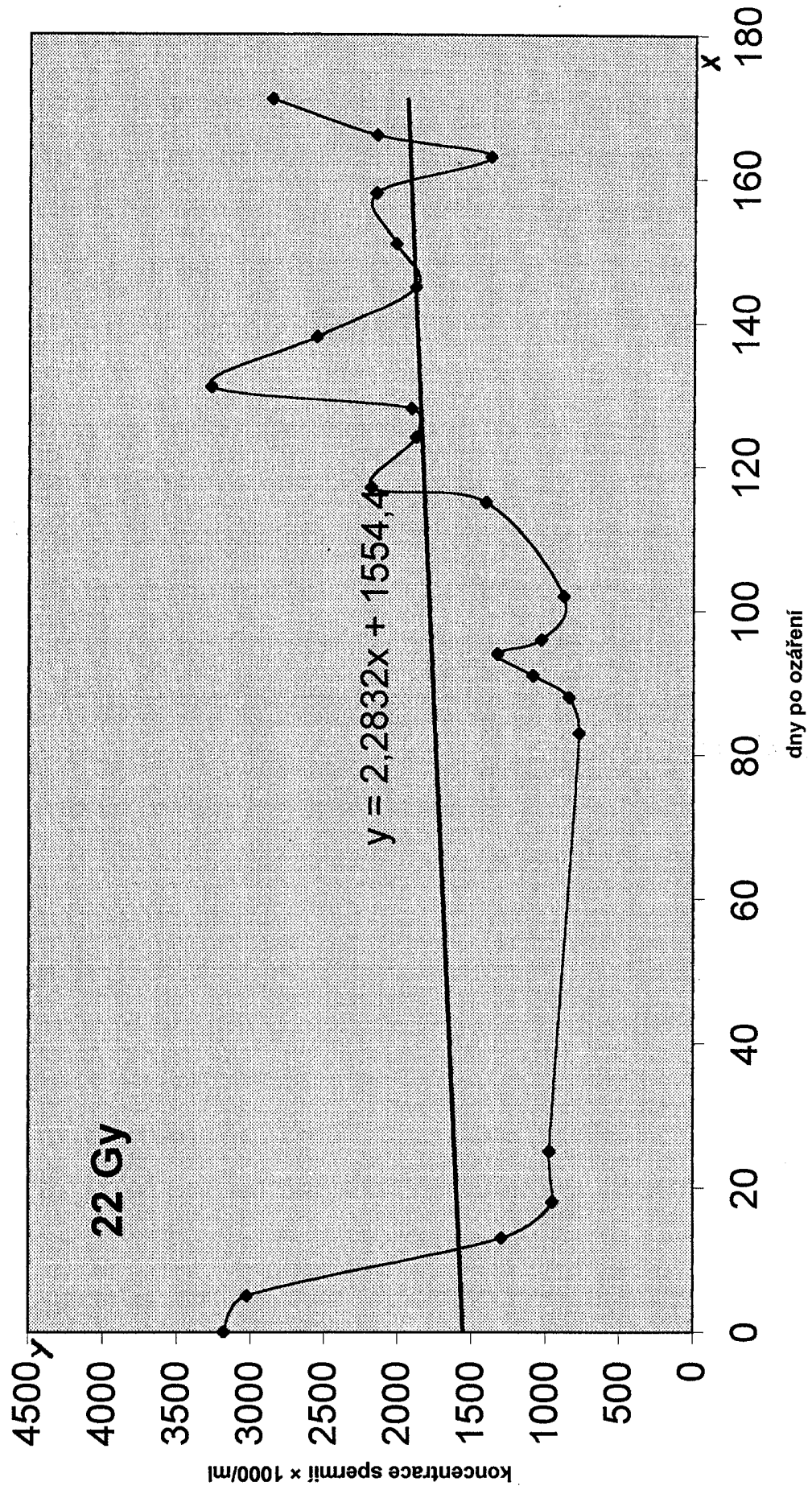
graf č.3



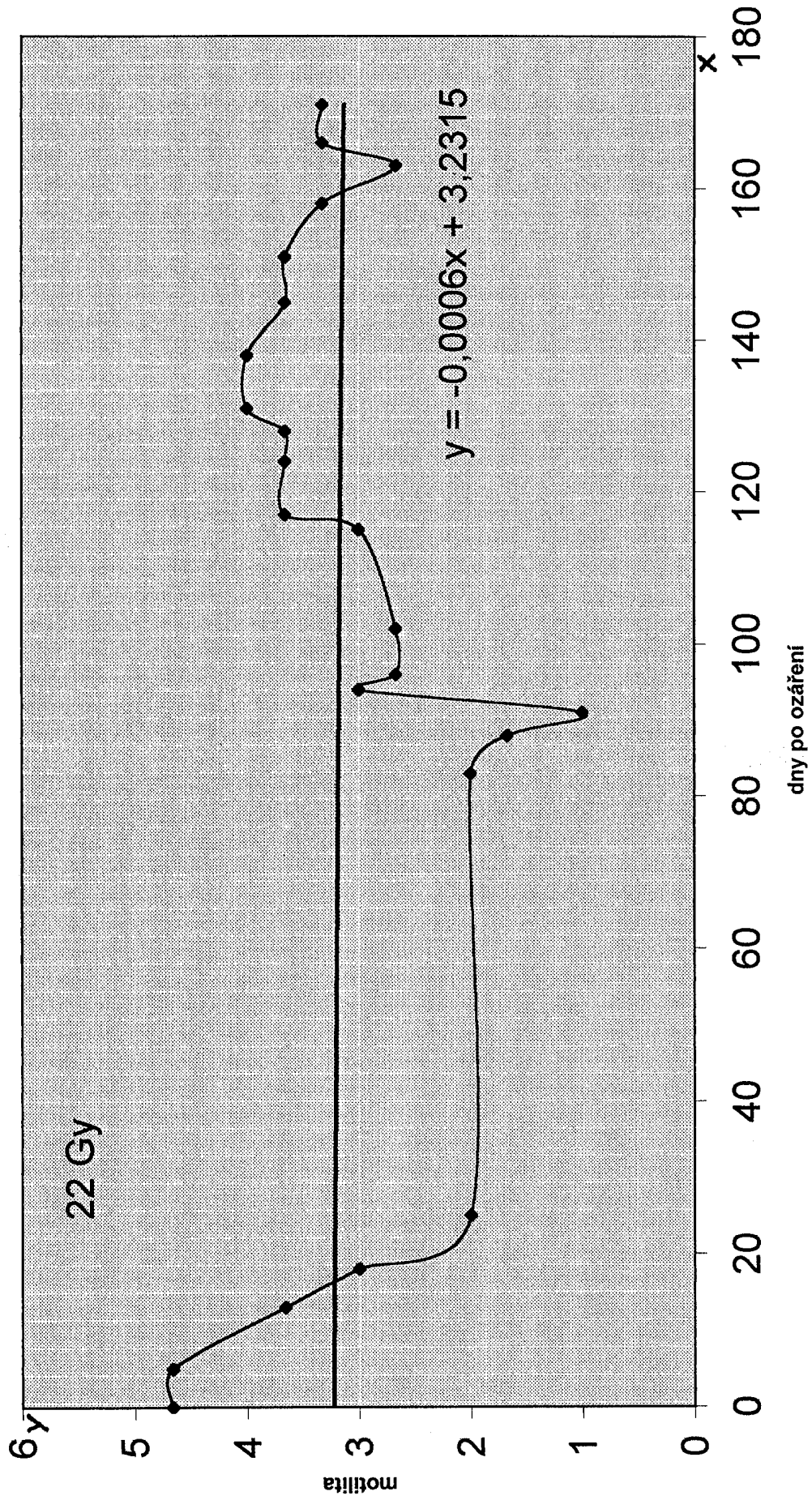
Graf č. 4



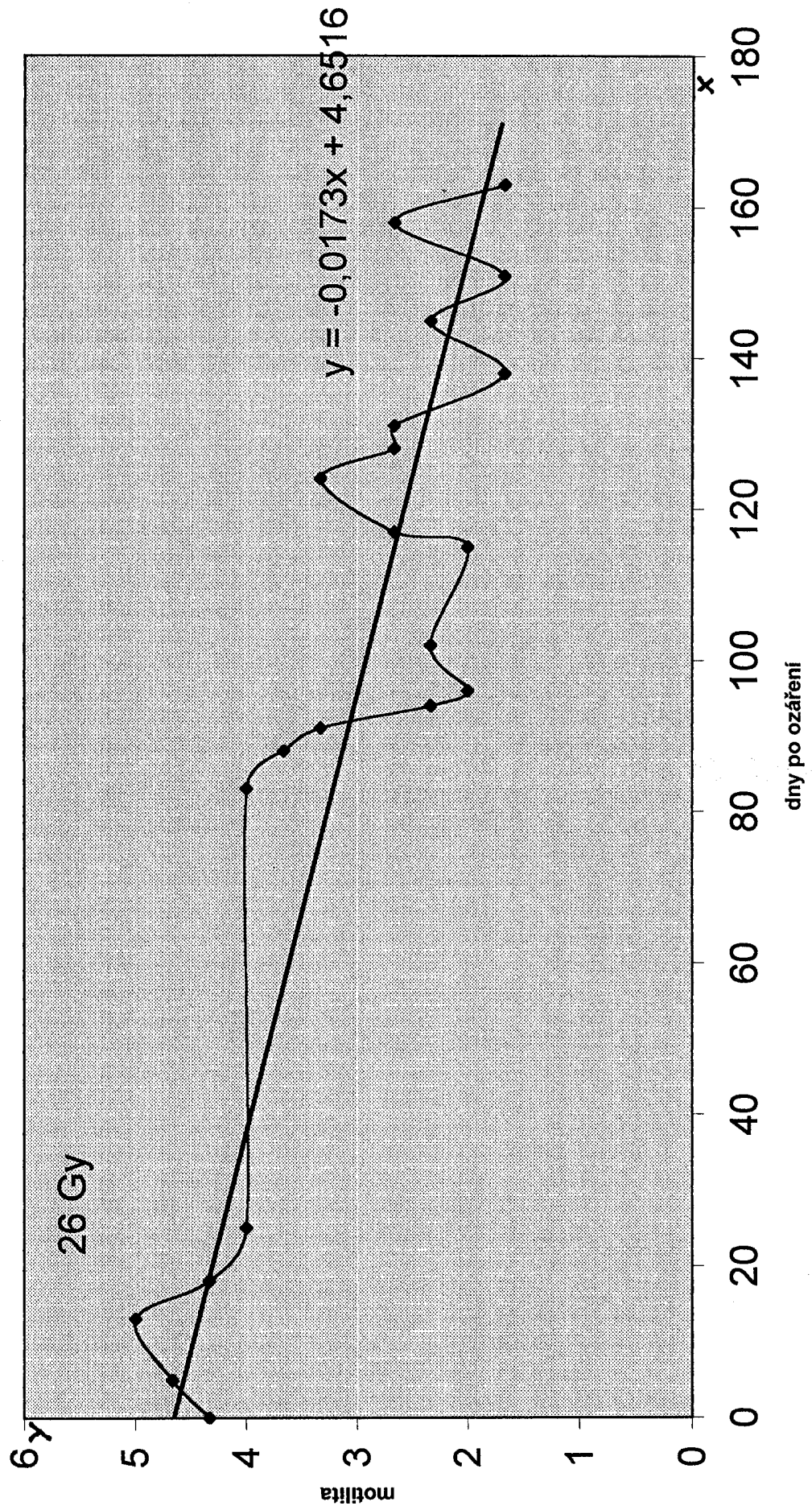
Graf č. 5



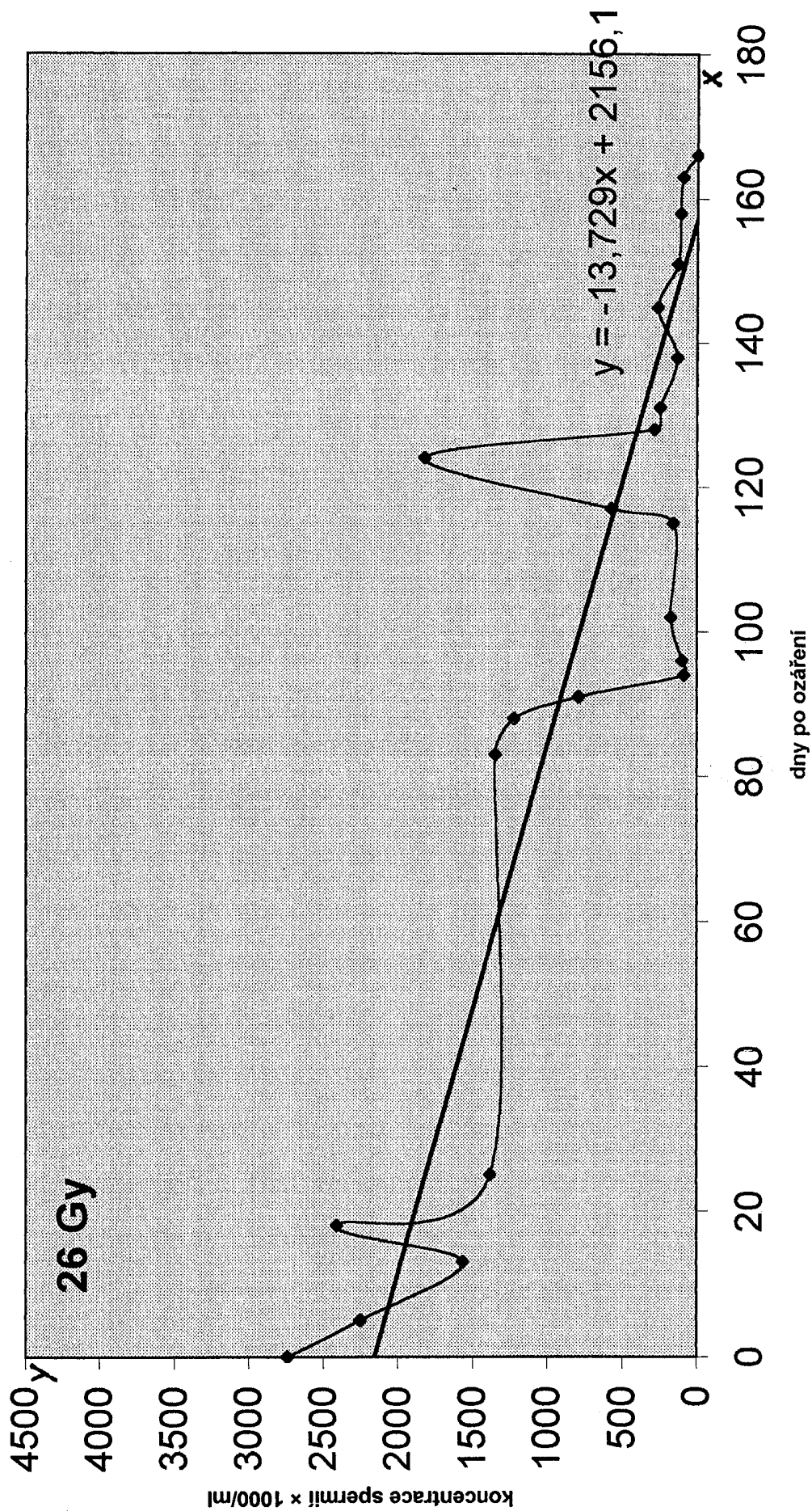
Graf č. 6



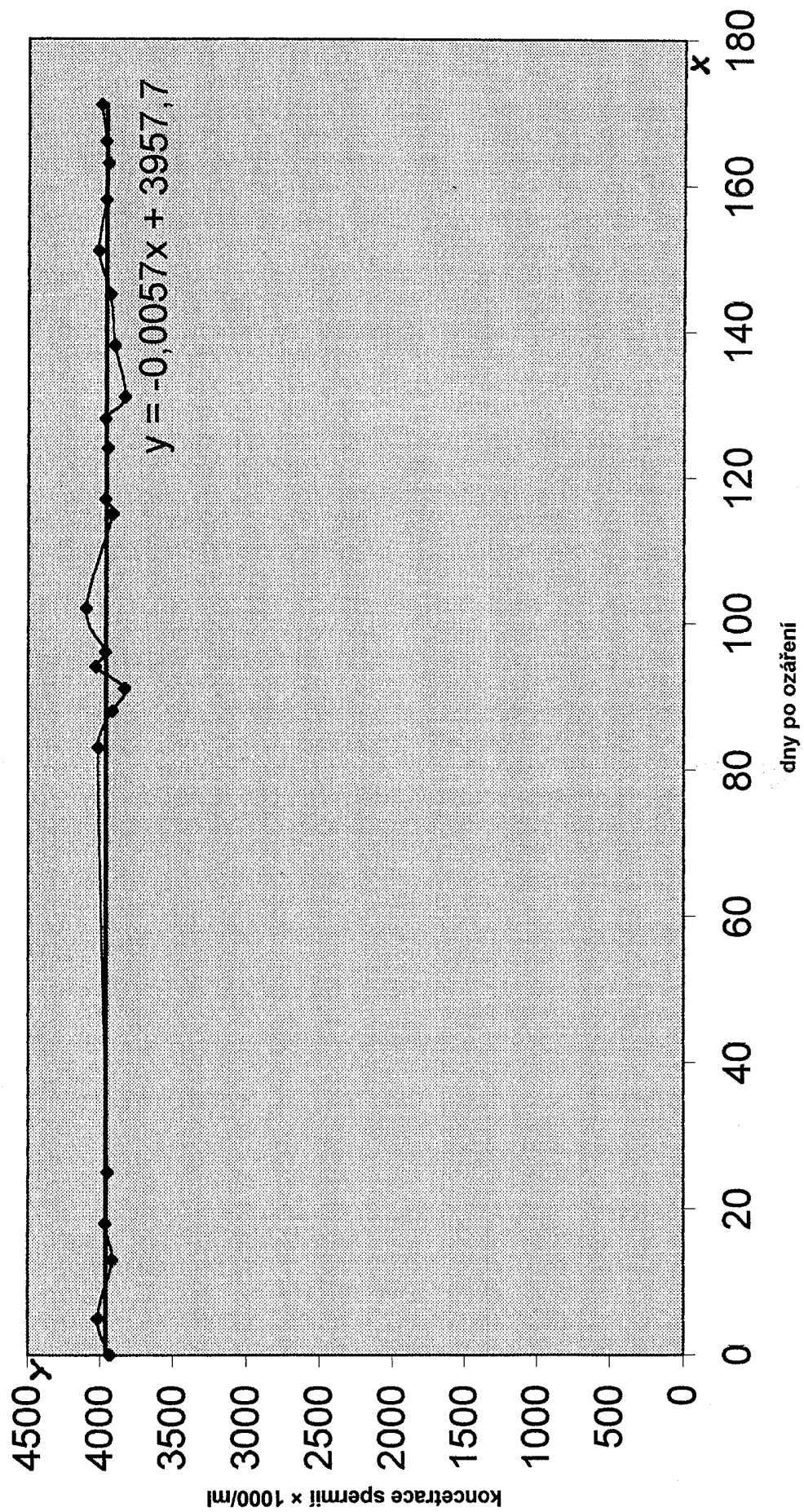
Graf č. 8



Graf č. 7



Graf č. 9 - kontrola



Graf č. 10 - kontrola

