

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce na téma:

Lentiviry jako nástroj transgeneze u hospodářských zvířat

Petr Kašpárek

Školitel: Ing. RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.

Poděkování patří mému školiteli Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a podnětnou kritiku.

Obsah:

Abstrakt	4
1. Úvod	5
2. Transgenní techniky	6
2.1. Mikroinjekce DNA do prvojádra	6
2.2. Spermiový přenos.....	8
2.3. Přenos jader transfektovaných buněk.....	9
2.4. Přenos genů virovými vektory	10
3. Lentiviry jako nástroj transgeneze	11
3.1. Lentiviry	11
3.2. Lentivirové vektory	12
3.3. Využití lentivektorů při transgenezi	15
3.4. Nedostatky u transgeneze využívající lentivektory.....	20
3.5 Perspektivy	21
4. Závěr.....	23
Seznam literatury:	24

Abstrakt

V posledních letech bylo dosaženo mnoha pokroků v oblasti produkce transgenních zvířat. Příkladem může být rozvoj spermiového přenosu nebo přenosu jader. I přesto jsou současné transgenní techniky považovány za nespolehlivé a neefektivní. To je velkou překážkou zejména při tvorbě transgenních hospodářských zvířat, což je kvůli nízké efektivitě vysoce nákladná činnost. Novou metodou je využití lentivirových vektorů pro transgenezi. Tato technika se ukázala jako vysoce efektivní a dosud byla použita u mnoha živočišných druhů včetně hospodářských zvířat. I přes některá omezení a nedostatky, jež tuto metodu provázejí, jde dost možná o nejperspektivnější transgenní techniku současnosti.

Klíčová slova: lentivirové vektory, transgeneze, transgenní zvířata, hospodářská zvířata

Abstract

Although there have been numerous recent developments in animal transgenesis, such as sperm-mediated gene transfer or nuclear transfer, current techniques that are used to generate transgenic animals are still considered to be unreliable and inefficient. This is a serious limitation, especially in generating transgenic farm animals, which is extremely costly due to its inefficiency. A novel approach is the use of lentiviral vectors for introducing transgenes into animals. It has been reported as a highly efficient transgenic technique and it has been used in many species, including farm animals, so far. Despite some drawbacks and limitations of this method, it may be currently the most promising transgenic technique.

Key words: lentiviral vectors, transgenesis, transgenic animals, farm animals

1. Úvod

Transgenní hospodářská zvířata nacházejí uplatnění v celé řadě biomedicínských a komerčních aplikací. V mléčných žlázách transgenních zvířat mohou být produkovány farmaceuticky významné látky, které jsou následně extrahovány z mléka (gene pharming) (shrnutí v Rudolph, 1999). Lze připravit transgenní prasata, která v krvi obsahují lidský hemoglobin, což otevírá nové možnosti v oblasti krevních náhrad (Swanson *et al.*, 1992) a orgány geneticky modifikovaných prasat mohou být využity při xenotransplantacích (Dieckhoff *et al.*, 2008). Nelze také opomenout fakt, že hospodářská zvířata mohou sloužit jako modelové organismy pro studium mnoha lidských chorob, přičemž jsou pro tyto účely mnohdy vhodnější než dostupnější a levnější transgenní myši. Další široké spektrum možností pro využití transgenních hospodářských zvířat nabízí zemědělství, kde je cílem urychlení růstu, zvýšení produkce mléka, zlepšení kvality srsti nebo produkce zvířat, která jsou rezistentní k chorobám.

V současnosti je poměrně dobře zvládnutá transgeneze u laboratorních zvířat (myš, potkan), ale postupy využívané pro transgenezi hospodářských zvířat (prase, ovce, koza, skot) jsou většinou buď technicky náročné, nebo neefektivní, což má za následek vysoké finanční náklady.

Teprve nedávno byla popsána transgenní technika využívající lentivirové vektory (Lois *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2002). Záhy se ukázalo, že může být využita s vysokou efektivitou právě u hospodářských zvířat (Hofmann *et al.*, 2003).

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o transgenezi pomocí lentivirových vektorů s důrazem na její využití u hospodářských zvířat. V první části jsou stručně popsány jednotlivé transgenní techniky, které se v současnosti u hospodářských zvířat uplatňují, druhá část je již detailně zaměřena na využití lentivirových vektorů pro přenos genů.

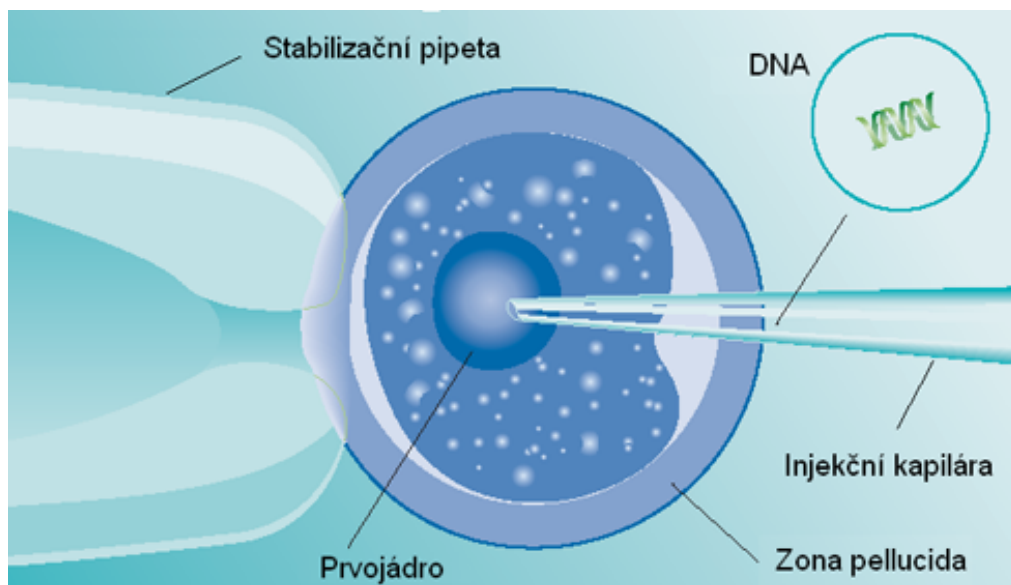
2. Transgenní techniky

Jako transgenní lze označit takové organismy, které ve svém genomu obsahují rekombinantní DNA vnesenou lidským zásahem. Pro přípravu transgenních hospodářských zvířat lze v současnosti využít čtyři techniky: mikroinjekci DNA do prvojádra, spermiový přenos (SMGT – Sperm Mediated Gene Transfer), přenos jader (NT – Nuclear Transfer) a přenos genů virovými vektory. Kromě těchto technik lze pro transgenezi ještě použít geneticky modifikované kmenové buňky. Tento přístup se však u hospodářských zvířat dosud neseťkal s úspěchem a navíc většiny výhod, které přináší, lze dosáhnout i využitím přenosu jader somatických buněk. Proto se touto technikou nebudu v bakalářské práci podrobněji zabývat.

2.1. Mikroinjekce DNA do prvojádra (Pronuclear DNA microinjection)

Mikroinjekce DNA do prvojádra je jednou z nejstarších a také nejčastěji používaných technik pro vnášení cizorodých genů do zvířat. Poprvé byla využita pro transgenezi myši v roce 1980 (Gordon *et al.*, 1980) a o pět let později díky ní vznikla i první transgenní hospodářská zvířata (Hammer *et al.*, 1985).

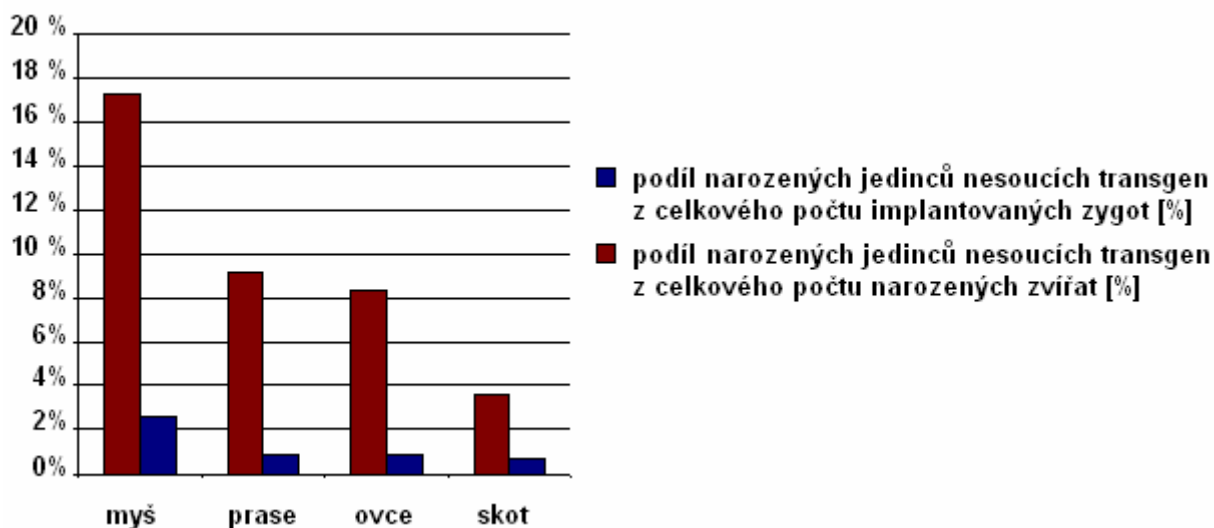
Optimální postupy při injikaci DNA do prvojádra se mírně odlišují v závislosti na živočišném druhu, ale základní princip je vždy stejný. Prvním krokem je příprava oplozených vajíček. Ta mohou být získána buď z čerstvě oplodněných samic, u kterých byla navozena vícečetná ovulace (Hirabayashi *et al.*, 2001), nebo z ovarií poražených zvířat, jejichž oocyty jsou *in vitro* maturovány a oplodněny (Krimpenfort *et al.*, 1991). U některých druhů (prasata, skot) musí být prvojádra nejprve vizualizována pomocí centrifugace, tak aby se neprůhledná cytoplazmatická granula nahromadila v jedné části vajíčka. Poté může být do prvojádra injikována DNA. Pro tuto proceduru se používá specializovaný mikroskop vybavený mikromanipulátory. Vajíčko je na jedné straně uchyceno skleněnou pipetou a z opačné strany je do něj vpravena tenká kapilára obsahující roztok s cizorodou DNA (obr. 1). Poté, co špička kapiláry pronikne do jednoho z prvojader (častěji je díky své velikosti voleno samčí), je DNA vypuzena z kapiláry ven. Vajíčka jsou následně implantována do vejcovodu pseudopregnantní náhradní matky.



Obr. 1: Schematické znázornění injikace DNA do prvojádra (upraveno dle Fassler, 2004)

Přestože je tato transgenní technika velice rozšířená a byla již úspěšně vyzkoušena na mnoha živočišných druzích (myš, potkan, prase, skot, ovce aj.) (shrnutí ve Wall, 1996), má celou řadu nevýhod. Injikovaná DNA se do hostitelského genomu integruje náhodně, což může vést k inzerčním mutacím (Rijkers *et al.*, 1994), a navíc je po integraci ovlivňována okolní DNA (tzv. poziční efekt), což má za následek variabilní expresi transgenů. Zdaleka největším handicapem této techniky, zvláště u hospodářských zvířat, je pak velice nízká efektivita přenosu genu. Z celkového množství použitých zygotů se obvykle narodí jen malé množství životaschopných jedinců a i mezi nimi je jen malý podíl těch, kteří mají v genomu integrovanou transgenní DNA (Graf 1). Navíc i v případě, že zvířata mají transgen v genomové DNA integrovaný, je jen cca 50 % šance, že bude docházet k jeho expresi (shrnutí ve Wall, 1996).

Vzhledem k nízké efektivitě je tato transgenní technika u hospodářských zvířat extrémně finančně náročná a je zde silná poptávka po alternativních metodách přenosu genů.



Graf 1: Efektivita přenosu genu pomocí mikroinjekce DNA do prvojádra u různých živočišných druhů (data převzata z Wall, 1996)

2.2. Spermiový přenos (Sperm-mediated gene transfer)

Bylo prokázáno, že spermie mohou vázat exogenní DNA a být tak využity pro transgenezu zvířat (Lavitrano *et al.*, 1989). První pokusy v této oblasti byly provedeny v roce 1970 týmem B. G. Bracketta. Králíčími spermii inkubovanými spolu se značenou DNA viru SV40 byly oplozeny oocyty, což vedlo k vývoji transgenních embryí (Brackett *et al.*, 1971). První životaschopná transgenní zvířata (myši) byla připravena v roce 1989 (Lavitrano *et al.*, 1989).

Velkým kladem spermiového přenosu je jeho jednoduchost a s tím související nižší náklady. Transfektované spermie se obvykle získávají odmytím seminální plasmy z ejakulátu (popř. odebráním přímo z nadvarlete) a inkubací ve vhodném médiu s cizorodou DNA. Poté mohou být využity buď k *in vitro* oplození oocytů, nebo k umělé inseminaci (shrnuto v Smith a Spadafora, 2005). Pro zvýšení účinnosti inkorporace exogenní DNA je možno spermie vystavit působení elektrického pole (elektroporace) (Rieth *et al.*, 2000). Jinou možností je smíchání exogenní DNA s monoklonálními protilátkami, které rozeznávají antigen na povrchu spermie (Chang *et al.*, 2002).

Kromě výše popsané metody spermiového přenosu existuje ještě několik alternativních technik využívajících spermie pro tvorbu transgenních zvířat. Jednou z nich je intracytoplazmická injekce spermie (ICSI – Intracytoplasmic Sperm Injection), při které jsou do oocyty injikovány hlavičky spermií spolu s exogenní DNA (Perry *et al.*, 1999). Další alternativou je izolace a *in vitro* transfekce samčích zárodečných kmenových buněk, které jsou poté transplantovány do semenotvorných kanálků pokusných zvířat. Ta potom mohou produkovat transgenní spermie (Nagano *et al.*, 2001). Oba tyto postupy vedly u myši k vyšší efektivitě přenosu genu.

Transgeneze s využitím spermiového přenosu již byla úspěšně provedena na celé řadě živočišných druhů včetně skotu (shrnuto v Smith a Spadafora, 2005) a prasat, u kterých se ukázala jako potenciálně vysoce efektivní (Lavitrano *et al.*, 2002). Stále ještě je však třeba dalšího vývoje, aby se stala plně etablovanou technikou. Mezi její nedostatky patří například kolísavá úspěšnost při transgenních experimentech nebo slabá exprese transgenu u některých narozených zvířat (shrnuto v Smith a Spadafora, 2005). Z těchto důvodů není tato technika ještě považována za zcela spolehlivou, byť má do budoucna velký potenciál.

2.3. Přenos jader transfektovaných buněk (Nuclear transfer using transfected cells)

Pokud je do enukleovaného (jádra zbaveného) oocyty vpraveno jádro somatické buňky a je navozeno jeho splynutí s cytoplasmou pomocí elektrofúze, může to při zachování správných chemických a mechanických podmínek vést k vývoji životaschopného jedince (Wilmot *et al.*, 1997). Při použití jader pocházejících z transfektovaných buněk lze tuto techniku využít pro tvorbu transgenních zvířat (Schnieke *et al.*, 1997). Velkou výhodou je skutečnost, že při použití přenosu jader odpadá riziko vzniku chimérických jedinců a navíc lze předem vyselektovat pouze dárcovské buňky obsahující transgen, což zvyšuje efektivitu přenosu genu (Melo *et al.*, 2005). Zřejmě největším přínosem je pak možnost využití cílených mutací pomocí homologní rekombinace, díky čemuž je možno zcela vyřadit konkrétní gen (*gene knock-out*) (McCreath *et al.*, 2000).

Přenos jader byl již mnohokrát využit pro tvorbu transgenních hospodářských zvířat (Schnieke *et al.*, 1997; Cibelli *et al.*, 1998; Baguisi *et al.*, 1999), přesto tato technika trpí některými nedostatky, jako je vysoké riziko vzniku deformovaných plodů (Hill *et al.*, 1999), nízká efektivita nebo poměrně vysoká technická náročnost.

2.4. Přenos genů virovými vektory (Viral vector-mediated gene transfer)

Tato transgenní technika využívá přirozené schopnosti některých virů vstupovat do hostitelských buněk a začleňovat vlastní genetický materiál do jejich genomu. Integrovaná virová DNA je poté vertikálně přenášena v somatické nebo germinální linii. Pokud je integrována v germinální buněčné linii, může být děděna podle Mendelových pravidel jako tzv. endogenní provirus.

První úspěšné pokusy o produkci transgenních zvířat (myši) byly spojeny právě s použitím virových vektorů (Jaenisch, 1976). Jako vektor pro přenos genu sloužil upravený virus MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), který patří mezi tzv. onkoretroviry. Bylo zjištěno, že jednoduché retroviry jako např. MMLV (v kontextu transgeneze též někdy označovány jako „prototypické retroviry“), mohou být využity i pro produkci transgenního skotu (Chan *et al.*, 1998) nebo prasat (Cabot *et al.*, 2001). Přestože umožňují mnohem vyšší efektivitu přenosu genu, než je tomu při použití mikroinjekce DNA (shrnutí ve Wall, 1996), nikdy nenalezly široké uplatnění při transgenních pokusech. Největší překážkou je zejména skutečnost, že provirová DNA bývá v transgenních zvířatech inaktivována na úrovni transkripce, takže exprese transgenu je buď výrazně omezená, nebo k ní nedochází vůbec (Chan *et al.*, 1998).

Právě tento problém se zdá být překonaným, pokud jsou jako vektory pro přenos genů použity komplexnější retroviry – lentiviry. Ty v sobě kombinují jak vysokou efektivitu přenosu genu, tak vysokou míru jeho exprese v narozených jedincích. Využitím lentivirových vektorů pro transgenezi se podrobně zabývá následující kapitola této bakalářské práce.

3. Lentiviry jako nástroj transgeneze

3.1. Lentiviry

Lentiviry patří do skupiny retrovirů, tj. obalených single-strand RNA virů, které při amplifikaci svého genomu využívají reverzní transkripci (přepis RNA do DNA). Jejich název je odvozen od dlouhé inkubační doby onemocnění, která tyto retroviry vyvolávají (*lentus* = pomalý). Mezi lentiviry patří například virus visna-maedi, vyvolávající plicní a mozkové onemocnění ovcí, virus artritidy a encefalitidy koz (CAEV – Caprine Arthritis-Encephalitis Virus), virus infekční anemie koní (EIAV – Equine Infectious Anemia Virus), virus opičího imunodeficitu (SIV – Simian Immunodeficiency Virus) nebo virus lidského imunodeficitu (HIV – Human Immunodeficiency Virus). Právě HIV patří mezi nejlépe prostudované lentiviry a první lentivirové vektory využité pro tvorbu transgenních zvířat byly odvozeny od toho viru (Lois *et al.*, 2002).

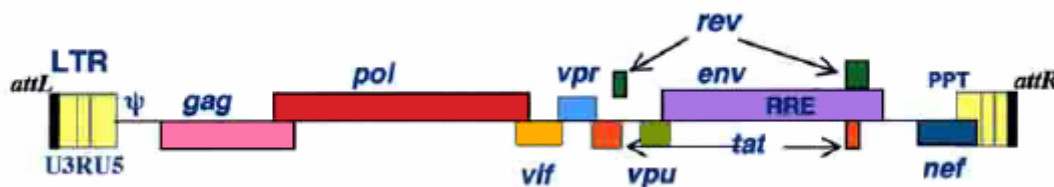
Stejně jako u všech retrovirů, i reprodukční cyklus lentivirů začíná reverzní transkripcí. Po vstupu virové částice do buňky je genomová RNA viru přepsána reverzní transkriptázou (RNA dependentní DNA polymerázou, která je přítomna v infekční částici) do DNA intermediátu. Ten je následně integrován do genomové DNA hostitele jako tzv. provirus. Transkripční aparát hostitelské buňky poté může přepisovat provirovou DNA zpět do RNA, která se uplatňuje jako mRNA pro syntézu virových proteinů a jako genomová RNA nově vznikajících virionů. Replikační cyklus prototypických retrovirů je závislý na mitóze, při které dochází k rozpadu jaderné membrány, což umožňuje virové DNA vstup do jádra buňky (Roe *et al.*, 1993). Virová DNA lentivirů je oproti tomu aktivně transportována (jako součást tzv. preintegračního komplexu) do buněčného jádra a lentiviry tak mohou transdukovat i nedělicí se buňky (Follenzi *et al.*, 2000). Právě díky této vlastnosti se staly atraktivními jakožto vektory pro přenos genů.

Genomová RNA všech retrovirů obsahuje geny *gag* a *pol*, které kódují proteiny virové nukleokapsidy, a gen *env* kódující proteiny virového obalu. V genomu lentivirů se navíc nachází několik dalších genů. V případě viru HIV-1 to jsou geny *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* a *nef* (obr. 2). Protein kódovaný genem *tat* se uplatňuje při stimulaci transkripce provirové DNA. Z hlediska využití lentivirů pro přenos genů je významný protein Rev, který umožňuje export virové mRNA z jádra do cytoplasmy. Exportu virových transkriptů brání specifická sekvence uvnitř vznikající RNA nazývané CRS (Cis-acting Repressive Sequences). Protein Rev jejich

účinek eliminuje kooperativní vazbou do specifických oblastí vznikajících transkriptů (RRE – Rev Responsive Elements) (Neville *et al.*, 1997). Funkce genů *vif*, *vpr*, *vpu* a *nef* není dosud beze zbytku objasněna, nicméně pro správnou funkci lentivirových vektorů nejsou tyto geny nezbytné (Zufferey *et al.*, 1997).

Kromě CRS a RRE se v RNA (DNA) lentivirů nacházejí ještě další nekódující sekvence. Mezi nejvýznamnější patří tzv. enkapsidační signál (ψ), který zprostředkovává sbalení virové RNA do kapsidy, nebo polypurinová sekvence (PPT – Polypurine Tract), která slouží jako primer plus DNA řetězce při syntéze provirové DNA.

Provirová DNA je ohraničena dlouhými koncovými repeticemi (LTR – Long Terminal Repeats), které se uplatňují při integraci proviru a zároveň se v nich nacházejí promotorové sekvence využívané pro transkripci provirové DNA.



Obr. 2: Schematické znázornění provirové DNA viru HIV-1 (převzato z Chang a Gay, 2001)

3.2. Lentivirové vektory

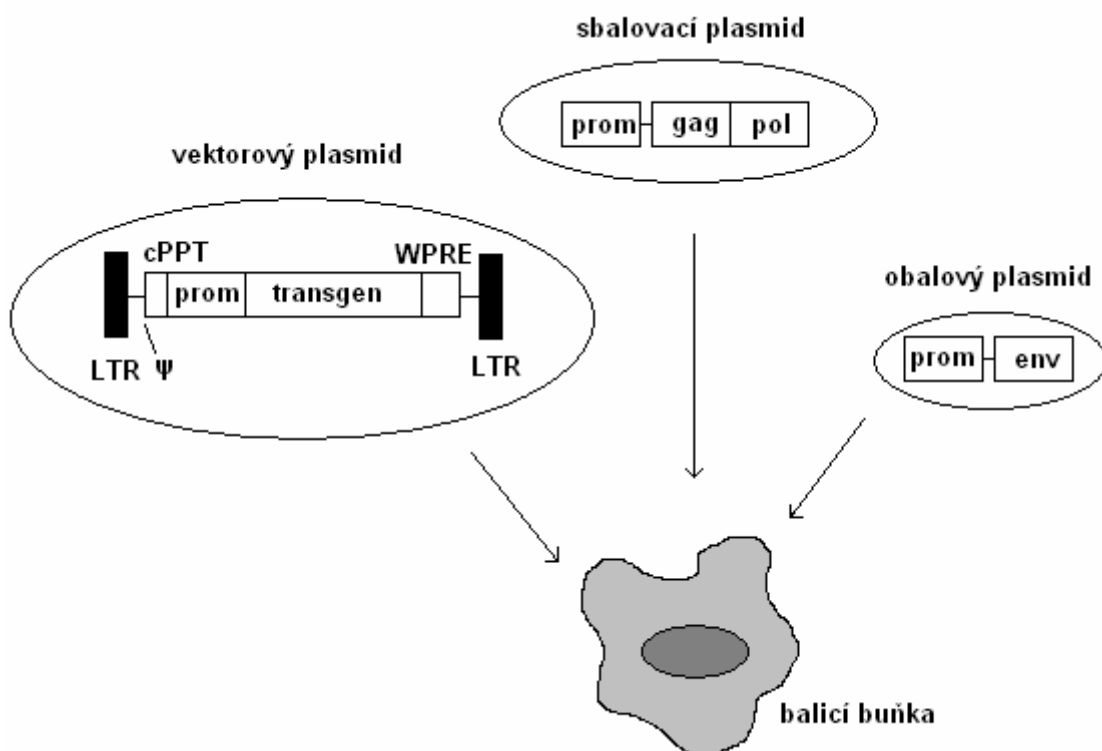
První lentivirové vektory (lentivektory) byly odvozeny od viru HIV-1 a od počátku se počítalo s jejich využitím při genové terapii u člověka (Naldini *et al.*, 1996). Z tohoto důvodu byl při jejich vývoji kladen velký důraz na bezpečnost, tak aby při použití virového vektoru nemohlo dojít k ohrožení zdraví hostitele.

Jedním z potenciálních nebezpečí je možná aktivace buněčného onkogenu po integraci vektorové DNA do hostitelského genomu. Z tohoto důvodu byly vyvinuty tzv. sebe-inaktivující vektory (SIN = Self-Inactivating Vectors), v jejichž LTR byly deletovány enhacerové a promotorové sekvence viru (Miyoshi *et al.*, 1998). Použití sebe-inaktivujících vektorů při transgenezi přináší tu výhodu, že u nich většinou nedochází k umlčování (silencingu) exprese transgenů (Pfeifer *et al.*, 2002). Právě promotorové sekvence v LTR totiž

bývají terčem transkripčních represorů buňky, které brání v přepisu provirové DNA (Prince a Rigby, 1991). Toto byl jeden z hlavních problémů při transgenezi využívající vektory odvozené od prototypických retrovirů (Pfeifer et al., 2002).

Vzhledem k absenci virových promotorů v LTR je třeba zajistit expresi transgenu pomocí promotoru uměle vneseného. Pro tyto účely se používá například promotor lidského genu pro fosfoglycerát kinázu (PGK = Phosphoglycerate kinase) (Follenzi et al., 2000) nebo promotor lidského genu pro ubiquitin-C (Lois et al., 2002). Tyto promotory jsou aktivní ve všech tkáních organismu. Volbou vhodného promotoru lze dosáhnout i tkáňově specifické exprese transgenu. Příkladem je promotor genu pro lidský keratin K14. Ten je aktivní pouze v bazálních keratinocytech, vlasových folikulech a v oblastech orálního epitelu (Vassar et al., 1989).

Viriony nesoucí vektorovou RNA jsou produkovány v tzv. balicích buňkách (packaging cells). Pro tyto účely jsou nejčastěji využívány buňky HEK 293T, které jsou současně transfektovány sbalovacím (packaging) plasmidem, obalovým (envelope) plasmidem a vektorovým (vector) plasmidem (obr. 3) (Naldini et al., 1996). Použitím většího množství samostatných konstruktů se snižuje riziko rekombinace, která by dala vzniknout viru schopného samostatné replikace.



Obr. 3: Zjednodušené znázornění produkce lentivirového vektoru.

Sbalovací plasmid kóduje virové proteiny, které jsou třeba pro vznik infekčních partikulí. Při použití současných lentivektorů třetí generace odvozených od HIV-1 jsou ve sbalovacím plasmidu nezbytné již jen geny *gag* a *pol*. Geny *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* a *nef* mohou být v zájmu bezpečnosti deletovány, zatímco gen *rev* je kódován samostatným konstruktem (Dull *et al.*, 1998). Sbalovací plasmid neobsahuje enkapsidační signál, proto se jeho transkripční produkty nemohou dostat do vznikajících virionů.

Vektorový plasmid kódující vektorovou RNA je na obou koncích ohraničen LTR a v kódující oblasti se nachází transgen a jeho promotor. Všechny virové geny jsou deletovány a přítomny bývají pouze *cis*-regulační úseky, které se uplatňují při tvorbě vektoru nebo při inkorporaci vektorové DNA do hostitelského genomu. Takovým úsekem je například centrální polypurinový trakt (cPPT), který hraje významnou roli při transportu preintegračního komplexu do jádra hostitelské buňky (Follenzi *et al.*, 2000). Dalším *cis*-regulačním elementem je WPRE (Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element), jehož zabudování do vektoru zvyšuje expresi transgenů v hostitelské buňce (Zufferey *et al.*, 1999). Díky přítomnosti enkapsidačního signálu je RNA vzniklá transkripcí vektorového plasmidu inkorporována do formujících se virionů.

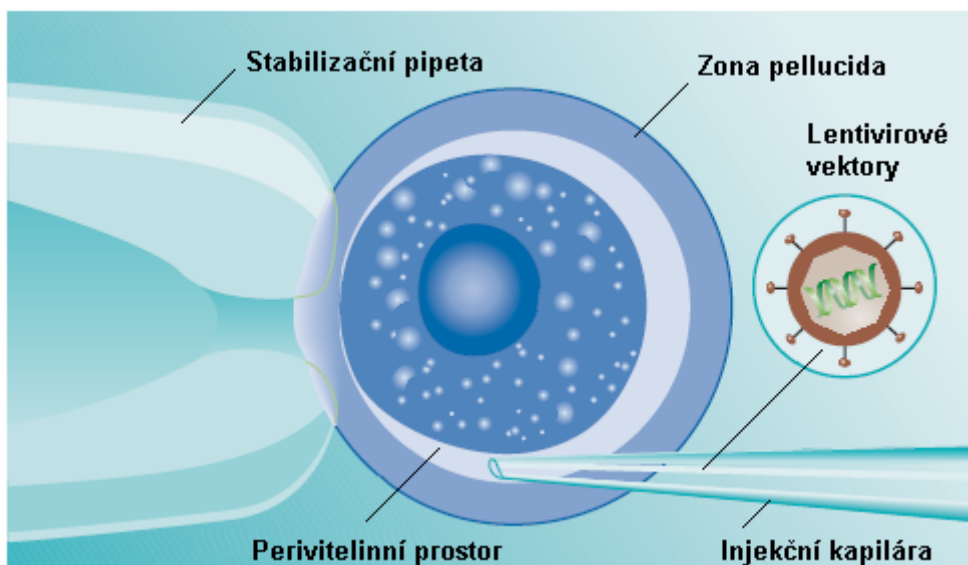
V balicích buňkách je syntetizován i virový protein Rev, který je vyžadován pro expresi genů *gag* a *pol* a zároveň pro expresi nesestřížené vektorové RNA. Jak ve sbalovacím, tak ve vektorovém plasmidu se proto nacházejí *cis*-regulační sekvence RRE, na které se po jejich transkripci tento protein váže (Dull *et al.*, 1998).

Lentiviry infikují hostitelské buňky receptorem zprostředkovanou fúzí virového obalu s plasmatickou membránou. Právě obalové glykoproteiny viru jsou zodpovědné za jeho specifitu k hostitelským buňkám. Vzhledem k nízkému počtu přirozených hostitelů lentivirů je nutné původní virový obal nahradit obalem jiného viru, tak aby se spektrum potenciálních hostitelů rozšířilo. Proces změny obalu virové částice se označuje jako *pseudotyping*. Jako náhradní obalový glykoprotein je pro lentivirové vektory nejčastěji využíván VSV-G, který pochází z viru vezikulární stomatitidy (Akkina *et al.*, 1996). Za buněčný receptor pro virus vezikulární stomatitidy byl dlouho považován všudypřítomný membránový lipid fosfatidylserin (Schlegel *et al.*, 1983), nedávno bylo ovšem zjištěno, že tímto receptorem není, byť je do procesu vstupu viru do buňky zapojen (Coil *et al.*, 2004). Virus obalený tímto glykoproteinem má tedy velice široké rozpětí potenciálních hostitelských buněk. Virové částice s VSV-G obalem jsou navíc vysoce stabilní, což umožňuje jejich koncentraci ultracentrifugací (Burns *et al.*, 1993). Glykoproteiny virového obalu jsou v balicích buňkách kódovány obalovým plasmidem.

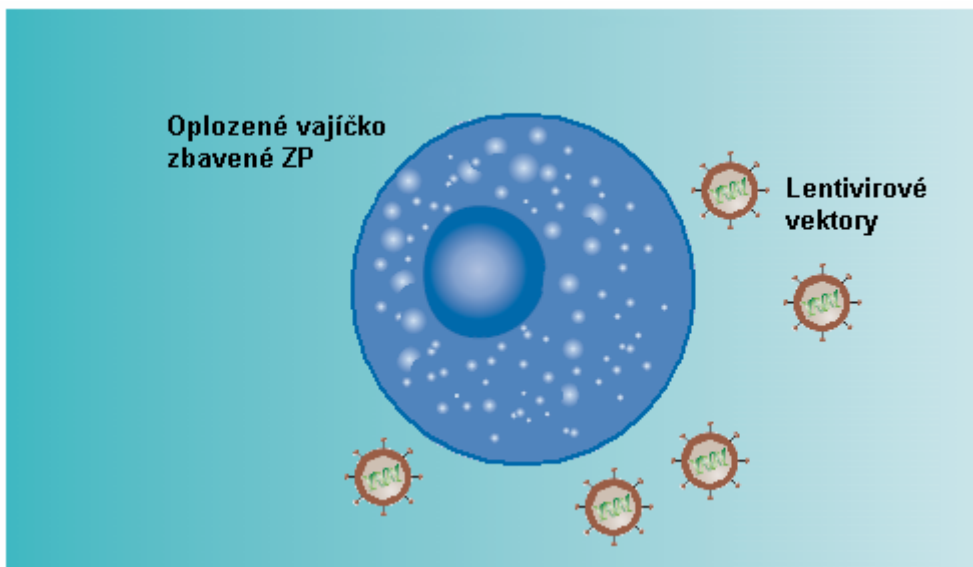
3.3. Využití lentivektorů při transgenezi

Prvním krokem při tvorbě transgenních zvířat pomocí lentivektorů je obvykle infekce oplozených vajíček virovými částicemi, které nesou vektorovou RNA. Oocyty se získávají podobným způsobem, jako při mikroinjekci DNA do prvojádra (viz výše). Pokud jsou transdukována časná embrya, uplatňuje se oplození vajíček *in vitro*, nebo se embrya získávají operativně z oplodněných samic (Whitelaw *et al.*, 2004).

Vajíčka a časná embrya savců jsou obklopena vrstvou glykoproteinů (*zona pellucida*), která mj. brání virové infekci (Pfeifer *et al.*, 2002). Pro překonání této překážky se používají dvě techniky – injekce virových částic pod *zonu pellucidu* (SI = Subzonal Virus Injection) (Lois *et al.*, 2002) (Obr. 4) nebo přímá inkubace virových částic s vajíčky (nebo s časnými embryi), ze kterých byla *zona pellucida* odstraněna (CI = Viral Co-Incubation) (Pfeifer *et al.*, 2002) (Obr. 5). *Zonu pellucidu* je možno odstranit buď úplně působením speciálního solného roztoku (Pfeifer *et al.*, 2002), nebo ji jen lokálně perforovat pomocí laseru (Ewerling *et al.*, 2006). Použitím CI lze lépe ovlivnit množství provirových DNA, které integrují do hostitelského genomu (Lois *et al.*, 2002), a samotná technika není tak náročná na přístrojové vybavení a technickou zručnost. Na druhou stranu po injekci lentivektorů pod *zonu pellucidu* byl zaznamenán vyšší počet embryí, která se vyvinula v životaschopné jedince, než tomu bylo v případě CI (Lois *et al.*, 2002). Transgenní embrya jsou posléze implantována do pseudopregnantních náhradních matek.



Obr. 4: Schematické znázornění injikace lentivirových vektorů pod *zonu pellucidu* (do perivitelinálního prostoru) (upraveno dle Fassler, 2004).



Obr. 5: Schematické znázornění inkubace lentivirových vektorů s oplozeným vajíčkem, ze kterého byla odstraněna *zona pellucida* (ZP).

První úspěšné transgenní pokusy využívající lentivektory byly provedeny v roce 2002 na myších (Lois *et al.*, 2002). Ukázalo se, že lentivirová transgeneze je vysoce efektivní jak ve smyslu množství embryí, ze kterých se vyvinou životaschopní jedinci (27 %), tak ve smyslu množství zvířat nesoucích transgen (80 % z celkového množství narozených zvířat). U 90 % transgenních zvířat navíc docházelo k expresi transgenu, což je výrazná změna oproti transgenezi využívající prototypické retroviry, kdy nebyl transgen exprimován buď vůbec, nebo jen krátce po narození zvířete (Chan *et al.*, 1998).

Vzhledem k efektivitě, která byla významně vyšší než při použití mikroinjekce DNA do prvojádra, byly záhy zahájeny pokusy o využití lentivirů při transgenezi i jiných živočišných druhů, než je myš. Zejména u hospodářských zvířat by takto efektivní transgenní technika mohla vést k jejich výraznému zlevnění a větší dostupnosti.

Prase

Transgenní prasata vytvořená pomocí lentivirových vektorů byla poprvé představena v roce 2003 týmem A. Hofmanna (Hofmann *et al.*, 2003). Jako vektor byl použit upravený virus HIV-1 nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (GFP = Green Fluorescent Protein). Použití genu pro GFP umožňuje detekci jeho produktu pomocí přímé fluorescence, takže

transgenní jedinci mohou být snadno a rychle identifikováni. Transgen byl řízen promotorem pro fosfoglycerát kinázu (PGK), který umožňuje jeho expresi v celém organismu.

Virové částice byly injikovány pod *zonu pellucidu* oplozených vajíček, která byla následně implantována do náhradních matek. Z celkového počtu 244 implantovaných embryí se narodilo 46 selat, z nichž 32 mělo ve svém genomu integrovanou vektorovou DNA a u 30 docházelo k expresi transgenů (Hofmann *et al.*, 2003). Tyto hodnoty, stejně jako u myši, několikanásobně převyšují efektivitu dosaženou použitím mikroinjekce DNA do prvojádra (srovnáno s daty z Wall, 1996) (Tabulka 1).

K expresi transgenů docházelo v tkáních odvozených od všech tří zárodečných listů, konkrétně byla prokázána přítomnost GFP v kůži, ledvinách a slinivce. Při použití promotoru pro lidský keratin K14 bylo dosaženo tkáňově specifické exprese (transgen byl integrován mj. v ledvinách a ve slinivce, k jeho expresi ovšem docházelo pouze v kůži prasete). Efektivita přenosu genu však byla nižší než při použití vektoru obsahujícího promotor PGK (Hofmann *et al.*, 2003). Dále bylo prokázáno, že míra exprese GFP je přímo úměrná počtu kopií provirové DNA integrovaných v hostitelském genomu (Hofmann *et al.*, 2003). Následná studie ukázala, že je možný přenos provirové DNA do F1 generace (Hofmann *et al.*, 2006).

Kromě vektoru odvozeného od HIV-1 byl při transgenezi prasat úspěšně využit i lentivektor odvozený od viru EIAV (Whitelaw *et al.*, 2004). Vektorový konstrukt nesl gen pro GFP pod promotorem CMV β . Po implantaci 120 transdukovaných zygotů do náhradních matek se narodilo 40 selat, z nichž 37 bylo transgenních a u 35 docházelo k expresi vektorové DNA. Efektivita přenosu genu tak byla ještě vyšší, než při použití HIV-1 vektoru (Whitelaw *et al.*, 2004).

Skot

Dalším živočišným druhem, u kterého bylo dosaženo úspěšné transgeneze pomocí lentivektorů, je skot (Hofmann *et al.*, 2004). I u skotu byl v pilotní studii použit vektor odvozený od HIV-1 nesoucí gen pro GFP, který byl řízen promotorem PGK. Celkem 357 zygotů bylo infikováno (injikací virových částic pod ZP) a 22% z nich se vyvinulo do stadia blastocysty. 17 blastocyst bylo poté implantováno do náhradních matek, což vyústilo v narození 4 telat (Hofmann *et al.*, 2004). Na základě jejich analýzy bylo zjištěno, že žádné ze zvířat nemá ve svém genomu integrovanou vektorovou DNA.

Dosud není zcela objasněno, proč infekce zygot nevede u skotu k tvorbě transgenních zvířat. Tento problém lze ovšem překonat, pokud jsou místo zygot infikovány přímo neoplozené oocyty (Hofmann *et al.*, 2004). Pod ZP 48 oocytů byly injikovány virové částice a poté bylo provedeno oplození *in vitro*. Dvanáct embryí se vyvinulo do stádia blastocysty a 8 transgenních blastocyst bylo implantováno do náhradních matek. Celkem se narodila 4 telata. Všechna nesla v genomu transgen a u všech docházelo k jeho expresi (Hofmann *et al.*, 2004) (Tabulka 1). Stejně jako v případě prasat, i u skotu byla vektorová DNA exprimována ve všech zkoumaných tkáních (kůže, ledviny, slinivka, semenotvorné kanálky) (Hofmann *et al.*, 2004).

Ovce

Nedávno publikovaná studie popisuje úspěšné využití lentivirových vektorů (HIV-1) při transgenezi ovcí (Ritchie *et al.*, 2008). Injekcí lentivektorů pod ZP byly infikovány jak ovčí oocyty, tak jejich zygoty a v obou případech se vyvinuly transgenní blastocysty (infekce zygot byla mírně efektivnější než infekce oocytů). Ze tří blastocyst (všechny původem z infikovaných oocytů) implantovaných do náhradní matky se vyvinula 2 životaschopná jehňata, přičemž obě vykazovala expresi GFP (Ritchie *et al.*, 2008).

Druhým cílem této studie byla tvorba jednovaječných dvojčat, z nichž jedno nese transgen a druhé nikoliv (Ritchie *et al.*, 2008). Pro tyto účely byly ovčí oocyty *in vitro* oplozeny a po dosažení dvoubuněčného stádia byla embrya rozdělena na dvě části. Ze vzniklých blastomer byla odstraněna *zona pellucida* a jedna blastomera z každého páru byla následně inkubována spolu s infekčními částicemi lentivirového vektoru. Do náhradních matek bylo implantováno 24 transgenních blastocyst z nichž se narodila 3 transgenní zvířata (Ritchie *et al.*, 2008).

Přenos genů lentivirovými vektory tak u ovcí dosahuje, stejně jako u prasat a u skotu, výrazně vyšší efektivity než při použití mikroinjekce DNA do prvojádra (Tabulka 1).

	Transgeneze využívající lentivirové vektory				Mikroinjekce DNA
	Počet implantovaných embryí	Počet narozených zvířat	Počet transgenních zvířat	Narozená transgenní zvířata z celkového počtu implantovaných embryí [%]	Narozená transgenní zvířata z celkového počtu implantovaných embryí [%]
Prase	244	46	32	13 %	0,9 %
Skot	8	4	4	50 %	0,7 %
Ovce	3	2	2	67 %	0,9 %

Tabulka 1: Srovnání efektivity přenosu genu mikroinjekce DNA do prvojádra s transgenezí využívající lentivirové vektory. Hodnoty pro lentivirou transgenezi převzaty z Hofmann *et al.*, 2003 (transgeneze prasat); Hofmann *et al.*, 2004 (transgeneze skotu využívající přímou transdukcí oocytů) a Ritchie *et al.*, 2008 (transgeneze ovce využívající injekci viru pod ZP). Hodnoty pro Mikroinjekci DNA do prvojádra převzaty z Wall, 1996.

Odlišným přístupem, jak vytvářet transgenní zvířata pomocí lentivektorů, je využití lentivirů pro transdukcí somatických buněk a následné použití techniky přenosu jader (NT). Tato technika byla poprvé aplikována u skotu, při použití fetálních fibroblastů jako dárcovských buněk (Hofmann *et al.*, 2004). Ty byly infikovány virovým vektorem a jejich jádra byla přenesena do enukleovaných oocytů. Z 214 embryí se jich 76 vyvinulo do stadia blastocysty a 56 blastocyst bylo implantováno do náhradních matek. Narodilo se pouze jedno živé zvíře, u kterého docházelo k expresi GFP ve všech zkoumaných tkáních (Hofmann *et al.*, 2004).

Dalším druhem, u kterého byla užita kombinace lentivektorů a NT, byla koza (Golding *et al.*, 2006). Ze 158 klonovaných embryí došlo k dalšímu vývoji jen u jednoho. Po předčasném ukončení gravidity byla u plodu prokázána exprese transgenů (Golding *et al.*, 2006).

Nejnověji byla zkoumána možnost využití této techniky u prasat, kdy se ze 115 klonovaných a implantovaných embryí narodilo 7 transgenních selat (Dieckhoff *et al.*, 2008).

Oproti klasické infekci oocytů nebo zygot se tato transgenní technika jeví jako výrazně méně efektivní. Nízká efektivita ovšem odpovídá výsledkům studií, při kterých byl prováděn NT z netransdukovaných buněk (Zakhartchenko *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2006). Výhodou je možná tvorba transgenních zvířat, u nichž je vyřazen konkrétní gen (*gene knock-out*), což technika NT v principu umožňuje (Hofmann *et al.*, 2004).

Kromě myší, ovce, skotu, koz a prasat byly dosud lentiviry úspěšně využity i při tvorbě transgenních potkanů (Lois *et al.*, 2002) a kuřat (McGrew *et al.*, 2004).

3.4. Nedostatky u transgeneze využívající lentivektory

První výrazné omezení této transgenní techniky vyplývá ze samotné povahy lentivirů jako takových. Velikost genomové RNA retrovirů se pohybuje běžně okolo 10 kb, vektorová RNA tedy nemůže překročit tento limit (Lois *et al.*, 2002). Určitou část možné kapacity navíc zabírají LTR a *cis*-regulační úseky, jako je WPRE a cPPT, takže maximální velikost transgenu a jeho promotoru je tímto ještě více omezena. Všechny ostatní transgenní techniky přitom mohou přenášet řádově větší fragmenty DNA. Příkladem může být ICSI a přenos YAC (Yeast Artificial Chromozome) o velikosti 250 kb (Moreira *et al.*, 2004) nebo mikroinjekce DNA, při které bylo dosaženo ještě vyšší kapacity genového přenosu (Robl *et al.*, 2003).

Rané pokusy využívající lentivektory pro tvorbu transgenních zvířat naznačovaly, že provirová DNA integrovaná v hostitelském genomu nepodléhá silencingu genové exprese (Pfeifer *et al.*, 2002, Hofmann *et al.*, 2004). Pozdější analýzy ovšem ukázaly, že epigenetické regulační mechanismy buněk mohou přepis transgenů umlčovat, v závislosti na jejich lokalizaci v genomové DNA (Hofmann *et al.*, 2006).

Silencing genové exprese zpočátku unikal pozornosti z toho důvodu, že u většiny transgenních zvířat dochází k vícenásobné integraci proviru do jejich genomu (Hofmann *et al.*, 2006). Některé proviry tak sice mohou být transkripčně inaktivní, ale jiné jsou exprimovány v dostatečné míře. Při přenosu do F1 generace ovšem dojde k jejich segregaci a díky tomu je možná analýza jednotlivých integrantů. Takto bylo zjištěno, že některé proviry vykazují vysokou míru methylace CpG dinukleotidů, což má za následek umlčení (popř. snížení) exprese transgenu (Hofmann *et al.*, 2006). Z celkového počtu analyzovaných provirů jich bylo 33% hypermethylovných (Hofmann *et al.*, 2006). Všechny zkoumané proviry se vzájemně lišily pouze svým místem integrace v rámci hostitelského genomu, předpokládá se tedy, že rozdílná míra genové exprese (a s ní spojených epigenetických regulací) je určena pozičním efektem (Hofmann *et al.*, 2006). Tímto by mohla být vysvětlena i vyšší úroveň genového silencingu u prototypických retrovirů, které oproti lentivirům preferují jiná integrační místa (Schroder *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Jiným epigenetickým mechanismem, který se pravděpodobně podílí na genovém silencingu lentivektorů, je deacetylace histonů (Yao *et al.*, 2004).

Výše zmíněná segregace jednotlivých virových intergrantů při přenosu do F1 generace je další potenciální překážkou u této transgenní techniky. Bylo prokázáno, že míra exprese transgenu je přímo úměrná počtu provirů integrovaných v hostitelském genomu (Hofmann *et al.*, 2003). Pokud jsou ovšem zvířata s větším počtem kopií transgenu použita pro produkci F1 generace, segregace provirů povede k variabilní expresi genu u narozených zvířat. Tímto je komplikována tvorba ustálených linií. Možným řešením je použití zakladatelských zvířat, která mají v genomu začleněnou jen jednu kopii transgenu. Takové jedince ovšem může být problematické vytvářet. Inkubací denudovaných zygot v médiu s nízkou koncentrací virových částic sice lze dosáhnout nižšího počtu integrací do genomu, tato technika je ovšem spojena i s nízkou efektivitou (Lois *et al.*, 2002). U jedinců, kteří v genomu nesou jen jeden provirus, navíc hrozí, že bude transgen exprimován jen na nízké úrovni. Tento problém by ovšem mohl být eliminován volbou vhodného promotoru, který by zajistil dostatečně silnou expresi i z jediné kopie transgenu (Lois *et al.*, 2002).

Kromě těchto překážek a omezení lentivirových vektorů byl v rámci některých studií provedených na myších ještě pozorován genetický mosaicismus u narozených zvířat (Lois *et al.*, 2002). Tento jev však dosud nebyl popsán u hospodářských zvířat.

3.5 Perspektivy

Možnou aplikací lentivektorů u hospodářských zvířat je jejich využití pro tzv. *gene knock-down*. Jde o jednu z technik pro umlčení genu a tedy o alternativu pro *gene knock-out*, který umožňuje NT. Genový *knock-down* je založen na principu interferencí RNA (RNAi). K umlčení genu dochází na posttranskripční úrovni díky štěpení mRNA. Malé interferující RNA (siRNAs = small interfering RNAs) mohou v cytoplazmě interagovat s komplexem RISC (RNA Induced Silencing Complex), který pak na základě komplementarity mezi mRNA a siRNA zajišťuje degradaci mRNA (shrnuto v Caplen *et al.*, 2001). *Knock-down* genu může být navozen tak, že jsou buňky transfektovány molekulami siRNA (Elbashir *et al.*, 2001). Koncentrace vnesených siRNA se ovšem v buňkách po několika málo děleních naředí, takže jejich působení je jen dočasné (McManus *et al.*, 2002). Pokud je v buňkách zajištěna exprese shRNA (Short Hairpin RNA), které slouží jako prekurzory pro siRNA, může být cílový gen umlčen stabilně.

Lentivektory nesoucí promotory pro RNA polymerázu III (U6 nebo H1), která zajišťovala přepis shRNA, byly již několikrát úspěšně využity pro transgenezi myší, u kterých byl následně pozorován *knock-down* cílového genu (Rao *et al.*, 2006). Nedávné studie popisují i první úspěšné použití této techniky u hospodářských zvířat (Golding *et al.*, 2006; Dieckhoff *et al.*, 2008).

Cílem týmu M. Goldinga bylo potlačení exprese prionového proteinu (PrP) u koz. Pro tyto účely byl použit vektorový konstrukt kódující shRNA pod promotorem H1 a zároveň gen pro GFP, řízený promotorem pro ubiquitin-C. Po úspěšném přenosu genu a následné analýze transgenního plodu bylo pozorováno snížení exprese PrP o více než 90% (Golding *et al.*, 2006). Stejný vektor byl s úspěchem využit u skotu pro tvorbu transgenních blastocyst (Golding *et al.*, 2006). Lentivektory zprostředkovaná RNAi byla také využita pro inhibici exprese PERV (Porcine Endogenous Retrovirus) u prasat (Dieckhoff *et al.*, 2008).

Lentivirová transgeneze za účelem genového *knock-downu* může najít významné uplatnění nejen v základním výzkumu, ale i v mnoha praktických aplikacích. Příkladem může být právě eliminace endogenních retrovirů u zvířat, což je jeden z kroků k bezpečným xenotransplantacím (Dieckhoff *et al.*, 2008), nebo např. inhibice tvorby myostatínu u skotu (Grobet *et al.*, 1997), která by mohla najít uplatnění v zemědělství.

Další oblastí, ve které mohou najít lentivirové vektory uplatnění, je jejich možná kombinace s jinými transgenními technikami. Kromě již zmíněného využití lentivektorů při přenosu jader byly popsány i úspěšné pokusy o transdukcii zárodečných kmenových buněk myší pomocí lentivektorů. Buňky byly transplantovány do semenotvorných kanálků pokusných zvířat, která poté produkovala transgenní spermie (Nagano *et al.*, 2002). Dále bylo prokázáno, že různé retroviry mohou s vysokou efektivitou transdukovat spermatogonie (De Miguel a Donovan, 2003). V rámci poslední zmíněné studie sice nebyly zahrnuty lentiviry, lze se ovšem domnívat, že i ony by mohly najít uplatnění při různých variantách spermiového přenosu.

4. Závěr

Lentivirové vektory představují atraktivní alternativu k současným transgenním technikám, které jsou buď neefektivní, nebo dosud ne příliš spolehlivé. Transgeneze využívající lentivektory je spojena nejen s vysokou efektivitou přenosu genu, ale u drtivé většiny transgenních zvířat zároveň dochází k jeho expresi. To je výrazným krokem vpřed oproti mikroinjekci DNA do prvojádra, která se dosud při transgenezi uplatňovala nejčastěji. Z hospodářských zvířat byla tato transgenní technika dosud úspěšně využita u prasat, skotu a ovcí, přičemž u všech se ukázala jako mnohem efektivnější než zavedené způsoby přenosu genu. Právě u hospodářských zvířat může tato efektivita vést k významné redukci vysokých nákladů, které jsou s jejich produkcí spojeny.

I přes nesporné klady, které použití lentivektorů pro transgenezi provázejí, zde panují stále některá omezení, jež je třeba brát v potaz. Jsou to především nižší přenosová kapacita a silencing genové exprese, který byl pozorován u některých intergrovaných provirů. Další překážkou může být vyšší technická náročnost při injikaci virových vektorů, která ovšem nepřesahuje nároky vyžadované při přenosu jader nebo při mikroinjekci DNA.

Jako velmi slibné se jeví spojení transgeneze pomocí lentivektorů s technikami využívajícími RNA interference. Nedávné studie ukazují, že tato kombinace může být efektivně využita pro stabilní umlčení genové exprese v transgenních zvířatech.

Seznam literatury:

- Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V. and Chen, I. S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* **70**(4): 2581-5.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempes, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W. and Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* **17**(5): 456-61.
- Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W. and Koprowski, H. (1971). Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(2): 353-7.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8033-7.
- Cabot, R. A., Kuhholzer, B., Chan, A. W., Lai, L., Park, K. W., Chong, K. Y., Schatten, G., Murphy, C. N., Abeydeera, L. R., Day, B. N. and Prather, R. S. (2001). Transgenic pigs produced using in vitro matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol* **12**(2): 205-14.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9742-7.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A. and Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* **280**(5367): 1256-8.
- Coil, D. A. and Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol* **78**(20): 10920-6.
- Dieckhoff, B., Petersen, B., Kues, W. A., Kurth, R., Niemann, H. and Denner, J. (2008). Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* **15**(1): 36-45.
- De Miguel, M. P. and Donovan, P. J. (2003). Determinants of retroviral-mediated gene delivery to mouse spermatogonia. *Biol Reprod* **68**(3): 860-6.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**(11): 8463-71.

- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**(2): 188-200.
- Ewerling, S., Hofmann, A., Klose, R., Weppert, M., Brem, G., Rink, K., Pfeifer, A. and Wolf, E. (2006). Evaluation of laser-assisted lentiviral transgenesis in bovine. *Transgenic Res* **15**(4): 447-54.
- Fassler, R. (2004). Lentiviral transgene vectors. *EMBO Rep* **5**(1): 28-9.
- Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M. and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* **25**(2): 217-22.
- Golding, M. C., Long, C. R., Carmell, M. A., Hannon, G. J. and Westhusin, M. E. (2006). Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5285-90.
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. and Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7380-4.
- Grobet, L., Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* **17**(1): 71-4.
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**(6021): 680-3.
- Hill, J. R., Roussel, A. J., Cibelli, J. B., Edwards, J. F., Hooper, N. L., Miller, M. W., Thompson, J. A., Looney, C. R., Westhusin, M. E., Robl, J. M. and Stice, S. L. (1999). Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* **51**(8): 1451-65.
- Hirabayashi, M., Takahashi, R., Ito, K., Kashiwazaki, N., Hirao, M., Hirasawa, K., Hochi, S. and Ueda, M. (2001). A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes. *Exp Anim* **50**(2): 125-31.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., Brem, G., Wolf, E. and Pfeifer, A. (2006). Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther* **13**(1): 59-66.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhauve, M., Brem, G., Wolf, E. and Pfeifer, A. (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* **4**(11): 1054-60.
- Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E. and Pfeifer, A. (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* **71**(2): 405-9.

- Chan, A. W., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C. and Bremel, R. D. (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14028-33.
- Chang, K., Qian, J., Jiang, M., Liu, Y. H., Wu, M. C., Chen, C. D., Lai, C. K., Lo, H. L., Hsiao, C. T., Brown, L., Bolen, J., Jr., Huang, H. I., Ho, P. Y., Shih, P. Y., Yao, C. W., Lin, W. J., Chen, C. H., Wu, F. Y., Lin, Y. J., Xu, J. and Wang, K. (2002). Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol* **2**: 5.
- Chang, L. J. and Gay, E. E. (2001). The molecular genetics of lentiviral vectors--current and future perspectives. *Curr Gene Ther* **1**(3): 237-51.
- Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4): 1260-4.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R. and et al. (1991). Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production. *Biotechnology (N Y)* **9**(9): 844-7.
- Lavitrano, M., Bacci, M. L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., Fioretti, D., Giancotti, P., Marfe, G., Pucci, L., Renzi, L., Wang, H., Stoppacciaro, A., Stassi, G., Sargiacomo, M., Sinibaldi, P., Turchi, V., Giovannoni, R., Della Casa, G., Seren, E. and Rossi, G. (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14230-5.
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G. and Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* **57**(5): 717-23.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**(5556): 868-72.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H., Colman, A., Schnieke, A. E. and Kind, A. J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* **405**(6790): 1066-9.
- McGrew, M. J., Sherman, A., Ellard, F. M., Lilloco, S. G., Gilhooley, H. J., Kingsman, A. J., Mitrophanous, K. A. and Sang, H. (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* **5**(7): 728-33.
- McManus, M. T., Petersen, C. P., Haines, B. B., Chen, J. and Sharp, P. A. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **8**(6): 842-50.

- Melo, E. O., Sousa, R. V., Iguma, L. T., Franco, M. M., Rech, E. L. and Rumpf, R. (2005). Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. *Genet Mol Res* **4**(4): 812-21.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H. and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* **72**(10): 8150-7.
- Moreira, P. N., Giraldo, P., Cozar, P., Pozueta, J., Jimenez, A., Montoliu, L. and Gutierrez-Adan, A. (2004). Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* **71**(6): 1943-7.
- Nagano, M., Brinster, C. J., Orwig, K. E., Ryu, B. Y., Avarbock, M. R. and Brinster, R. L. (2001). Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(23): 13090-5.
- Nagano, M., Watson, D. J., Ryu, B. Y., Wolfe, J. H. and Brinster, R. L. (2002). Lentiviral vector transduction of male germ line stem cells in mice. *FEBS Lett* **524**(1-3): 111-5.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**(5259): 263-7.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I. and Rosbash, M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* **7**(10): 767-75.
- Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* **284**(5417): 1180-3.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I. M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2140-5.
- Prince, V. E. and Rigby, P. W. (1991). Derivatives of Moloney murine sarcoma virus capable of being transcribed in embryonal carcinoma stem cells have gained a functional Sp1 binding site. *J Virol* **65**(4): 1803-11.
- Rao, M. K. and Wilkinson, M. F. (2006). Tissue-specific and cell type-specific RNA interference in vivo. *Nat Protoc* **1**(3): 1494-501.
- Rieth, A., Pothier, F. and Sirard, M. A. (2000). Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev* **57**(4): 338-45.
- Rijkers, T., Peetz, A. and Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res* **3**(4): 203-15.

- Ritchie, W. A., King, T., Neil, C., Carlisle, A. J., Lilloco, S., McLachlan, G. and Whitelaw, C. B. (2008). Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol Reprod Dev.* (dosud nepublikováno)
- Robl, J. M., Kasinathan, P., Sullivan, E., Kuroiwa, Y., Tomizuka, K. and Ishida, I. (2003). Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. *Theriogenology* **59**(1): 107-13.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* **12**(5): 2099-108.
- Rudolph, N. S. (1999). Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol* **17**(9): 367-74.
- Shen, P. C., Lee, S. N., Wu, J. S., Huang, J. C., Chu, F. H., Chang, C. C., Kung, J. C., Lin, H. H., Chen, L. R., Shiau, J. W., Yen, N. T. and Cheng, W. T. (2006). The effect of electrical field strength on activation and development of cloned caprine embryos. *Anim Reprod Sci* **92**(3-4): 310-20.
- Schlegel, R., Tralka, T. S., Willingham, M. C. and Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* **32**(2): 639-46.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A. and Campbell, K. H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **278**(5346): 2130-3.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**(4): 521-9.
- Smith, K. and Spadafora, C. (2005). Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays* **27**(5): 551-62.
- Swanson, M. E., Martin, M. J., O'Donnell, J. K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C. T., Pinkert, C. A., Pilder, S. and Logan, J. S. (1992). Production of functional human hemoglobin in transgenic swine. *Biotechnology (N Y)* **10**(5): 557-9.
- Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A. and Fuchs, E. (1989). Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(5): 1563-7.
- Wall, R. J. (1996). Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* **45** (2): 57-68.
- Whitelaw, C. B., Radcliffe, P. A., Ritchie, W. A., Carlisle, A., Ellard, F. M., Pena, R. N., Rowe, J., Clark, A. J., King, T. J. and Mitrophanous, K. A. (2004). Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* **571**(1-3): 233-6.

- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**(6619): 810-3.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**(5626): 1749-51.
- Yao, S., Sukonnik, T., Kean, T., Bharadwaj, R. R., Pasceri, P. and Ellis, J. (2004). Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* **10**(1): 27-36.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prella, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. (1999). Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* **115**(2): 325-31.
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D. and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**(4): 2886-92.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**(9): 871-5.