

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE**

Oddělení vývojové biologie a imunologie

Praha 2006

**Bakalářská práce**

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ INKORPORACI  
DNA A RNA DO SPERMIE A INTEGRACI  
DNA DO GENOMU U SPERMIOVÉHO  
PŘENOSU**

Jonáková Jana

školitel: Ing., RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

## Obsah

1. Úvod.....	2
2. Spermii-zprostředkovaný genový přenos.....	3
3. První experimentální důkazy schopnost spermii vázat exogenní DNA.....	4
4. Vazba DNA molekul.....	5
4.1. Inkubace spermii s DNA.....	5
4.1.1. DNA vazebné proteiny spermie (DBP) a inhibiční faktor IF-1.....	6
4.1.2. Role MHC proteinů II. třídy při vazbě exogenní DNA.....	8
5. Internalizace cizorodé DNA do jádra spermie.....	9
5.1. Role CD 4 molekul při internalizaci DNA do jádra.....	9
5.2. Aktivace endogenních nukleáz.....	10
5.2.1. Charakterizace DNA oblastí hypersensitivních k nukleázám.....	10
6. Integrace cizorodých sekvencí do genomu spermie.....	11
6.1. REMI.....	12
7. Optimalizace vazby DNA.....	13
8. Vazba RNA molekul.....	14
9. Posílení efektivity inkorporace exogenní DNA.....	15
9.1. Vliv elektroporace.....	15
9.2. Užití liposomů.....	19
9.3. Testes-zprostředkovaný genový přenos.....	21
10. Závěr.....	22
11. Přehled literatury.....	23

# 1. Úvod

Schopnosti spermií internalizovat exogenní DNA (RNA) a přenášet jí během oplození na potomstvo se využívá v spermií-zprostředkovaném genovém přenosu (SMGT – sperm mediated gene transfer). Jedná se o metodu, která by v budoucnu mohla umožnit hromadnou produkci transgenních zvířat, nenáročnou na vybavení, speciální podmínky ani finanční prostředky ve srovnání s běžně užívanou mikroinjekcí exogenní DNA do samčího prvojádra oplozeného oocyty, jejíž úspěšnost se pohybuje mezi 1 – 8 %. Nicméně osud exogenních sekvencí přenášených spermií není dosud přesně předpověditelný, v některých případech je cizorodá DNA integrována, jindy ke stabilní modifikaci genomu nedochází. Jedním z kritických kroků celého procesu je vazba exogenní DNA spermií, která může ovlivňovat i další osud exogenních sekvencí. Ačkoli v přírodě existují bariéry bránící tomuto procesu, je nepravděpodobné, že budou absolutně neporušitelné. Genom sexuálně se reprodukcujícími zvířaty může být vystaven změnám, plynoucím z interakce s exogenními DNA sekvencemi nesenými spermií, které mohou mít evoluční význam (Smith, 2002). Tento krok je ovlivňován řadou faktorů, jejichž charakterizace a pochopení umožňující jejich experimentální kontrolu, by vedly k optimalizaci protokolů SMGT a k stabilním výtěžkům transgenních potomků, stejně jako k provedení nezbytných opatření bránících riziku přenosu exogenní DNA při lidské asistované reprodukci. Zkoumáním těchto faktorů se zabývala řada studií. Pokus o jejich shrnutí je obsahem této práce.

## 2. Spermii-zprostředkovaný genový přenos (SMGT)

Jedná se o metodu využívající schopnosti spermií vázat a internalizovat exogenní DNA a přenášet ji během oplození na potomstvo (Arezzo, 1989, Lavitrano et al., 1989). K vazbě exogenní DNA může docházet prostou inkubací spermií zbavených semenné tekutiny s exogenní DNA (Brackett et al., 1971, Lavitrano et al., 1992, Zani et al., 1995) nebo tato schopnost může být posílena elektroporací (Gagne et al., 1991, Horan et al., 1992) či užitím liposomů (Bachiller et al., 1991, Rottmann et al., 1992). Spermie nesoucí exogenní DNA jsou poté užity k oplození oocytů, k němuž může dojít inseminací (AI) (Brackett et al., 1971), *in vitro* fertilizací (IVF) (Arezzo, 1989, Lavitrano et al., 1989) či intracytoplasmatickou injekcí spermie (ICSI) (Chan et al., 2000). K oplození přirozenou cestou může dojít v případě, že spermie byly transfekovány *in vivo* po injekci exogenní DNA do semenotvorných tubulů varlat samců při testes-zprostředkovaném genovém přenosu (TMGT – testis-mediated gene transfer) (Yonezawa et al., 2001, Celebi et al., 2002).

Byla provedena řada experimentů s *in vitro* vazbou exogenních DNA konstruktů spermii různých živočišných druhů zahrnujících zástupce hmyzu, měkkýšů, ryb, obojživelníků, ptáků i savců. V některých případech byl konstrukt spermií pouze internalizován (Atkinson et al., 1991, Camaioni et al., 1992), jindy došlo k přenosu do embryí (Brackett et al., 1971) a v některých případech byla produkována životaschopná F0 zvířata, která obsahovala exogenní DNA sekvence integrované do genomu či v extrachromosomální podobě. Byly popsány i případy přenosu na F1 potomky a další generace (Lavitrano et al., 1989).

Schopnost vazby exogenní DNA byla pozorována kromě myších (Lavitrano et al., 1989) a králičích spermií (Brackett et al., 1971) u spermií ježovky (Arezzo, 1989), kančích spermií (Horan et al., 1991), býčích spermií a spermií *Lucilia cuprina* a *Apis mellifera* (Atkinson et al., 1991), spermií *Cyprinus carpio*, *Clarias gariepinus* a *Oreochromis niloticus* (Muller et al., 1992), lidských spermií (Camaioni et al., 1992), kohoutích spermií (Rottmann et al., 1992), spermií *Danio rerio* (Patil and Khoo, 1996), spermií *Xenopus laevis* (Habrova et al., 1996), spermií ušně (Tsai et al., 1997), spermií zlatého křečka (Fernandez et al., 1999), spermií *Bombyx mori* (Shamila and Mathavan, 2000), spermií *Macaca mullata* (Chan et al., 2000), lososích spermií (Sin et al., 2000) a dalších.

### 3. První experimentální důkazy schopnosti spermie vázat exogenní DNA

První důkaz o schopnosti savčí spermie inkorporovat heterologní genom a následně ho přenést do vajíčka během oplození pochází z roku 1971. Brackett et al. (1971) objevili, že králíčí spermie zbavené semenné tekutiny mají schopnost adsorbovat opičí virus SV 40 (simian virus). Podle výsledků autoradiografie spermií vystavených SV 40 značeného  $^3\text{H}$  thymidinem, které prokázaly absenci radioaktivního materiálu uvnitř spermie, nedocházelo k přenosu SV 40 přes membránu. V dalším experimentu byl ale radioaktivní materiál nalezen v postakrozomální oblasti hlavičky spermie u většiny z 30 – 35 % spermií, které radioaktivní materiál obsahovaly. Po fúzi spermií vystavených SV 40 DNA s buňkami CV 1 linie ledvinných buněk afrického kočkodana byl izolován infekční SV 40, stejně jako po kultivaci CV 1 buněk s oplozenými vajíčky získanými děložním oplozením samic králíků spermiemi infikovanými SV 40 DNA. Buňky vystavené neoplozeným vajíčkům, zonae pellucidae či polárním tělískům z neoplozených vajíček nevykazovaly cytopatický efekt (Brackett et al., 1971). Tato práce zůstala téměř 20 let prakticky nepovšimnuta.

Další zprávy o schopnosti spermie vázat a přenášet exogenní DNA se objevují až v roce 1989, kdy Arezzo (1989) prokazuje tuto schopnost u spermií ježovky a nezávisle Lavitrano et al. (1989) u myších spermií. Bylo pozorováno, že zralé myší epididymální spermie inkubované s klonovanou DNA v izotonickém pufru vychytávají DNA molekuly během 15 minut. Spermie inkubované s pSV2 CAT plasmidem v cirkulární nebo lineární formě byly užity k oplození myších vajíček in vitro. Přibližně u 30 % z 200 potomků byly Southern blot analýzou identifikovány komplementární sekvence k pSV2 CAT. Z DNA pozitivních myší, jež byly transfekovány lineárním plasmidem, byla konstruována genomová knihovna. Byly identifikovány tři pozitivní klony a dva sousedící Hinc II restriční fragmenty 240 a 370 bp odhalily identické sekvence odpovídající fragmentům plasmidu pSV2 CAT. O přenosu DNA na F1 generaci svědčila genová exprese chloramfenykolacetyltransferázy (CAT), která byla detekována v tkáních dospělých F1 jedinců, především v očasech a svalech. Z těchto výsledků vyplývá, že spermie může být využita jako vektor cizorodé DNA při produkci transgenních myší (Lavitrano et al., 1989).

Toto zjištění se stalo předmětem dalšího zkoumání. Záhy vyvstal problém obtížné reprodukovatelnosti těchto výsledků. Pokus o zopakování experimentu provedeného Lavitrano et al. (1989) v jiné laboratoři se nezdařil. Mezi 1300 testovanými zvířaty nebyla

nalezena žádná transgenní myš (Brinster et al., 1989). Navzdory zpochybňování tohoto přístupu a jeho výsledků, byly provedeny další experimenty pokoušející se identifikovat faktory ovlivňující vazbu exogenních DNA molekul spermií. Tyto práce prokázaly, že tento děj je nenáhodný, vysoce regulovaný, zprostředkovaný specifickými molekulami a probíhá u spermií mnoha živočišných druhů. Pokus provedený Lavitrano et al. (1989) se podařilo zopakovat v roce 1998. Bylo prokázáno, že inkorporace DNA do hlavičky spermie je skutečně možná. Frekvence inkorporace byla uniformní (90 %), podíl transgenních zárodků byl však velmi variabilní (Maione et al., 1998).

## **4. Vazba DNA molekul**

K vazbě exogenních DNA molekul spermiemi může docházet několika způsoby. Původním a nejjednodušším způsobem je inkubace spermií zbavených semenné tekutiny a suspendovaných ve vhodném médiu s příslušnou DNA (virová, plasmidová apod.). Vazba je zprostředkována specifickými proteiny, které se podílí nejen na vazbě, ale i internalizaci exogenní DNA do jádra (viz dále). Z důvodu zvýšení efektivity vazby exogenní DNA se zejména u některých druhů používá elektroporace, ať už spermií suspendovaných v roztoku s cizorodou DNA in vitro, nebo elektroporace in vivo v kombinaci s injekcí DNA do semenotvorných tubulů. Další možností zvýšení efektivity vazby DNA je užití liposomů, které může být také spojeno s testes-zprostředkovaným genovým přenosem (TMGT). Jedná se o variantu spermií-zprostředkovaného genového přenosu (SMGT), kdy je DNA v podobě nechráněných molekul či uzavřená v liposomech vpravena přímo do semenotvorných tubulů varlat samců, interaguje se spermiemi in vivo a může být přenesena během oplození, které probíhá přirozenou cestou nebo inseminací.

### **4.1 Inkubace spermií s DNA**

Již první Brackettův experiment prokázal, že vazba exogenní DNA nastává v subakrosomálním segmentu hlavičky spermie, jak bylo později potvrzeno dalšími (Brackett et al., 1971, Lavitrano et al., 1992, Camaioni et al., 1992). Schopnost vychytávat exogenní DNA je omezena pouze na živé spermie (Cabrera et al., 1997, Anzar and Buhr, 2005). Interakce spermie s exogenními molekulami je iontová, reversibilní, nezávislá na sekvenci a kromě DNA se týká i dalších negativně nabitých makromolekul (Lavitrano et al., 1992). Pokus o identifikaci specifické sekvence usnadňující nebo inhibující vazbu nebyl úspěšný

(Cabrera et al., 1997). Podařilo se určit, že vazba je zprostředkována třídou spermiových proteinů o velikosti 30 – 35 kDa. Bylo zjištěno, že pouze epididymální a ejakulované spermie zbavené veškeré semenné tekutiny v postupných promývacích krocích jsou schopné navázat cizorodou DNA (Lavitrano et al., 1992, Zani et al., 1995). Nezralé spermie vazby cizorodé DNA schopné nejsou. Byly zjištěny rozdíly v expresi povrchových proteinů u zralých a nezralých spermií (Carballada a Esponda, 2001). Semenná tekutina silně brání vazbě exogenní DNA (Lavitrano et al., 1992). Byl identifikován inhibiční protein IF-1, nacházející se v semenné tekutině savců a na povrchu spermií druhů, u nichž se semenná tekutina nevyskytuje (např. ježovka). Podařilo se získat hrubý extrakt IF-1 ze spermií ježovky, částečně ho purifikovat a funkčně charakterizovat jako glykoprotein, jehož inhibiční účinnost je spojena s polysacharidovou komponentou. IF-1 se selektivně váže na subakrosomální segment spermie, tj. stejný buněčný kompartment, který je cílem vazby exogenní DNA (Zani et al., 1995). Tento fakt naznačuje, že IF-1 hraje v přírodě významnou roli jako bariéra a ochrana spermií před vstupem cizorodých molekul a náhodnou transfekcí cizorodou DNA, která by mohla být přítomna v genitálním traktu z bakteriálních či virových zdrojů a mohla by ohrozit integritu spermie a genetickou identitu potomstva (Camaioni et al., 1992). Mezi IF-1 a DNA je vysoká reciproká afinita, kompetiční experimenty ukázaly, že IF-1 je schopen odstranit DNA z nukleoproteinového komplexu složeného mezi 30 – 35 kDa třídou proteinů a DNA (Zani et al., 1995).

#### **4.1.1 DNA vazebné proteiny spermie (DBP) a inhibiční faktor IF-1**

Při identifikaci molekulární podstaty spontánních interakcí exogenní plasmidové DNA s epididymálními spermii bylo zjištěno, že exogenní DNA je navázána po 15 – 20 minutách, specificky lokalizována na hlavičce spermie, vazba je reversibilní, DNA může být kompetičně vytlačena nadbytkem studeného kompetitoru DNA nebo jiných polyaniontů (heparin, dextran sulfát), naproti tomu poly-L-lysin (polykation) napomáhá vychytávání. Velké DNA molekuly (7 kbp) jsou ve srovnání s menšími (150 – 750 bp) navázány přednostně. Dochází i k vazbě kyselých proteinů, které jsou soustředěovány ve stejné oblasti spermie jako navázaná DNA (Lavitrano et al., 1992).

Autoradiografickou analýzou bylo stanoveno, že spermie různých savčích druhů (myš, kanec, býk, člověk) vystavené radioaktivně značené plasmidové DNA (pSV2 CAT plasmid) ji mohou vázat ve specifické oblasti hlavičky spermie (ekvatoriální segment a postakrosomální oblast) s rychlou kinetikou asociace (maxima bylo dosaženo mezi 20 – 40 minutami).

Procento značení (s výjimkou lidských spermií) bylo 39 – 78 %. Signál byl detekován na povrchu a uvnitř jádra spermie (Camaioni et al., 1992).

South western analýzou extraktu proteinů hlavičky spermie byly identifikovány 3 hlavní třídy DNA vazebných proteinů: 1. třída o molekulové hmotnosti okolo 50 kDa, 2. třída 30 – 35 kDa a 3. třída do 20 kDa, která pravděpodobně obsahuje protaminy. Pouze 2. třída obsahuje proteiny, které jsou v intaktní spermii přístupné pro exogenní DNA, zároveň ze srovnání myších epididymálních spermií s ejakulovanými (dobytek, prase, člověk) je jediná přítomná u různých živočišných druhů. Purifikované 30 – 35 kDa proteiny interagují in vitro s exogenní DNA za vzniku samostatných protein/DNA komplexů. V přítomnosti inhibičního faktoru IF-1 identifikovaného v semenné tekutině savců a ve spermiích ježovky ztrácí 30 – 35 kDa proteiny schopnost vázat cizorodou DNA. Inhibiční aktivita je asociována se silně glykosilovaným proteinem (37 kDa v glykosilované formě). Inhibiční efekt IF-1 na vychytávání DNA myšími spermiemi byl vizualizován autoradiografií. Alikvoty  $10^6$  myších spermií byly inkubovány se vzrůstajícím množstvím IF-1 preparátu z ježovky po 30 minut a následně smíchány s koncově značenou plasmidovou DNA a inkubovány dalších 30 minut. Preinkubace s IF-1 totálně zrušila vazbu exogenní DNA ve srovnání s kontrolními spermiemi inkubovanými jen s koncově značenou DNA. Kontrolní experimenty ukázaly, že s IF-1 není spojena žádná proteázová aktivita a faktor sám není toxický pro spermie. U ježovky lze inhibiční aktivitu odstranit mírným hypotonickým šokem v zředěné mořské vodě. Po působení N-glykosilázy ztrácí IF-1 95 % inhibiční aktivity. Z toho vyplývá, že IF-1 je biologicky aktivní pouze v glykosilované formě (Zani et al., 1995).

Další experimenty prokázaly, že zralé spermie získané z cauda epididymis jsou na rozdíl od spermií nezralých schopné inkorporovat cizorodou DNA v pufru obsahujícím pouze sole a vápník. Tento jev je nejspíš způsoben nedostatkem funkčních receptorů v membráně spermie. Jakmile je tato membrána porušena sonikací, DNA je detekována v postakrozomální oblasti jádra spermie se stejnou distribucí jako u spermie zralé. Porušení membrány zralých spermií sonikací neovlivnilo ani distribuci exogenní DNA ani procento značení. Pozorování zralých sonikovaných spermií v elektronovém mikroskopu ukázalo, že většina hlaviček postrádala akrozóm, což prokazuje, že absence vazby DNA v anteriorní oblasti není zapříčiněna přítomností akrozómu. Podařilo se také identifikovat další komponenty semenné tekutiny, které by mohly mít inhibiční účinek na vazbu DNA. Jedná se o kalcium-dependentní DNázu přítomnou v tekutině semenného váčku a několik DNA vazebných proteinů sekretovaných ventrální prostatou. Po přidání EDTA v koncentraci vyšší než 50 mM nedošlo



k úplnému potlačení DNázové aktivity, což naznačuje přítomnost dalších DNáz, jejichž aktivita není regulována dvojmocnými kationty (Carballada a Esponda, 2001).

Vazba DNA ke spermii může být zprostředkována pomocí linkerového proteinu. Monoklonální protilátka (mAb C) reaguje s povrchovými antigeny všech testovaných druhů (prase, myš, kuře, kráva, koza, ovce, člověk). Jedná se o bazický protein, který váže exogenní DNA díky iontovým interakcím, což dovoluje specifické spojení spermie/DNA. Populace spermií, která povrchový protein neexprimuje, s mAb C neinteraguje (Chang et al., 2002).

#### **4.1.2 Role MHC při vazbě exogenní DNA**

Wu et al. (1990) objevili důkaz exprese MHC molekul II. třídy na myších spermích. Bylo zjištěno, že vazba cizorodé DNA byla zprostředkována komplexní strukturou MHC molekul II. třídy lokalizovaných v posteriorní oblasti hlavičky spermie. Tato vazebná aktivita byla závislá na čase, teplotě a životaschopnosti. Kompletní inhibice bylo dosaženo inkubací spermií s myším anti Iak sérem. Normální myší sérum inhibiční efekt nemělo. Scatchard analýza této vazebné aktivity také ukázala jediný typ receptorů na spermatických buňkách. Tyto výsledky byly přímo potvrzeny morfologicky, použitím autoradiografie spermie s navázanou cizorodou DNA (Wu et al., 1990).

Naproti tomu se nepodařilo detekovat expresi MHC molekul II. třídy na hlavičce myších epididymálních spermií užitím monoklonálních protilátek. Nicméně spermie MHC II knockout myši mají o 50 % redukovanou schopnost vázat exogenní DNA ve srovnání se spermii divokého typu. Navzdory klesající efektivitě vazby DNA spermii, poměr internalizace cizorodé DNA do jádra u MHC II knockout myši byl porovnatelný s poměrem u zvířat divokého typu (18 – 20 % celkové vazby). Výsledky naznačují, že vazba exogenní DNA je spojena s expresí MHC molekul II. třídy. Ačkoli MHC molekuly II. třídy pravděpodobně nejsou přítomny na membráně zralých spermií, zdá se, že jejich exprese je vyžadována během spermatogeneze k produkci spermií schopných vázat cizorodou DNA (Lavitrano et al., 1997).

## 5. Internalizace cizorodé DNA do jádra spermie

Do jádra spermie je internalizováno konstantní množství DNA, a to 15 – 22 %. Podíl DNA internalizované do jádra byl stanoven s využitím koncově značené plasmidové DNA na izolovaných jádrech. Autoradiografická analýza ukázala, že propustnost jádra pro exogenní DNA je rozšířeným jevem zahrnujícím většinu jader spermií. Cizorodá DNA inkubovaná se spermii po různě dlouhou dobu byla nalezena v 45 % (10 minut) – 60 % (2 hodiny) jader spermií. Ultrastrukturální autoradiografie tenkých řezů myšimi nadvarlaty a býčích ejakulovaných promytých spermií ukázala, že exogenní DNA je internalizována do jádra a integrována do chromatinu spermie (Francolini et al., 1993).

Internalizace DNA do jádra byla rovněž dokázána konfokální mikroskopií v lipofekovaných myších spermii (Bachiller et al., 1991) a autoradiografií v býčích spermii (Atkinson et al., 1991). Ultrastrukturální in situ hybridizace tenkých řezů spermií *Danio rerio* prokázala internalizaci exogenní DNA do jádra a posílení této internalizace elektroporací (Patil and Khoo, 1996).

### 5.1 Role CD 4 molekul při internalizaci DNA do jádra

Spermie CD 4 konckout myši jsou plně schopné vázat exogenní DNA, postrádají ale schopnost ji internalizovat do jádra. Inkubace spermií divokého typu s monoklonálními anti-CD 4 protilátkami také zabránila jaderné internalizaci exogenní DNA. Podíl internalizované DNA byl redukován na 3 % oproti 18 % u kontrolních jader. Inkubace s anti-CD 8 a anti-CD 3 monoklonálními protilátkami neměla vliv na podíl internalizované DNA. Internalizace navázané DNA nastává během minut od vazby a je zprostředkována CD 4 molekulami přítomnými na plasmatické membráně hlavičky spermie, a to v subakrosomální oblasti, kde byly detekovány imunofluorescenční i Western blot analýzou (Lavitano et al., 1997).

Existuje hypotetický model internalizace exogenní DNA. Formace nukleoproteinových komplexů DNA/DBP (DNA vazebný protein) spouští CD 4 zprostředkovanou internalizaci exogenní DNA. Komplex DNA/DBP/CD 4 proniká hluboko do jádra skrz jaderný pór, dosáhne jaderné matrix, kde je exogenní DNA disociována z DBP/CD 4 komplexu a dostává se do těsného kontaktu s chromosomální DNA spermie. Zda je komplex DBP/CD 4 recyklován na membránu může být pouze spekulováno (Spadafora, 1998).

## 5.2 Aktivace endogenních nukleáz

Interakce spermií s exogenní DNA aktivuje endogenní nukleázy jako odpověď na internalizaci exogenní DNA spermií. Jejich aktivita vzrůstá se stoupající koncentrací DNA. Plasmidové molekuly izolované z jádra spermií inkubovaných s nízkou dávkou DNA (1 – 10 ng/10<sup>6</sup> spermií) zůstávají intaktní. V případech, kdy spermií byly inkubovány s vyšším množstvím DNA (100 – 500 ng/10<sup>6</sup> spermií), DNA byla těžce degradována a vykazovala vzorce hypersenzitivních míst. Nukleázová aktivita je účinná v epididymálních spermiích. V ejakulovaných a promytých spermiích je naproti tomu velmi snížena, kdy ke spuštění dochází až při inkubaci s vysokým množstvím DNA (500 ng/10<sup>6</sup> spermií). Nukleázy jsou Ca<sup>2+</sup> dependentní, jsou inhibovány preinkubací s kyselinou aurintrikarboxylovou a aktivovány Ca<sup>2+</sup> ionoforem A 23187. Tyto sločeniny také inhibují nebo aktivují apoptózu v somatických buňkách. Southern blot analýza ukázala, že internalizovaná DNA je endonukleázami rozštěpována specificky a také odhalila typické fragmentační zákonitosti lokalizované hypersenzitivity. Navíc aktivace nukleáz způsobila také částečnou degradaci endogenní chromosomální DNA spermií. Rozštěpané DNA fragmenty jsou ze spermií uvolněny do média. Tyto informace naznačují, že v jádře maturované spermií je po interakci s exogenní DNA spuštěn metabolicky aktivní proces podobný apoptóze, jehož výsledkem je smrt buňky (Maione et al., 1997).

Rozdílná reaktivita endogenních nukleáz epididymálních a ejakulovaných spermií může být jednou z příčin rozdílného stupně reproducibility u SMGT pokusů u různých živočišných druhů. Výsledkem nižší reaktivity ejakulovaných spermií je vyšší stabilita internalizované exogenní DNA, i vyšší přežívání spermií, které exogenní DNA nesou. Stabilizující efekt může být důsledkem působení některé komponenty přítomné v semenné tekutině. Tyto skutečnosti mohou vysvětlovat obtížnější práci se spermiemi druhů, u nichž lze získat pouze spermií epididymální (např. myš), ve srovnání s druhy, kde jsou k dispozici spermií ejakulované (např. prase, skot). Tím, že u epididymálních spermií dochází k aktivaci endogenních nukleáz a degradaci exogenní DNA, ustavuje se negativní selekce, která působí přednostně proti spermiím nesoucím exogenní DNA (Spadafora, 1998).

### 5.2.1 Charakterizace DNA oblastí hypersenzitivních k nukleázám

Byly izolovány, klonovány a charakterizovány oblasti chromatinu hypersenzitivní k nukleázám. Gelová elektroforéza uvolněných, koncově značených, fragmentů DNA ukázala typickou nukleozomální distribuci. Imunofluorescenční vizualizace odhalila, že nukleohistony

jsou v jádru spermie distribuovány periferně. Bylo zjištěno, že uvolněná DNA je obohacena retrotranspozonovou DNA různých rodin. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a imunofluorescenční analýza ukázaly, že retrotranspozonová DNA a nukleohistonový chromatin kolokalizují a v jádru spermie jsou distribuovány periferně. Hlavní satelitní DNA sonda (užitá jako kontrola) kolokalizovala s vysoce kondenzovaným chromatinem v centrální oblasti jádra spermie. S frakcí hypersenzitivního chromatinu byly také uvolněny jaderné proteiny Ran a RCC 1 (regulátor chromozomální kondenzace), které byly také vizualizovány na dorzálním okraji jader spermií. Tyto výsledky naznačují, že v myších spermiích je přítomna nukleohistonová frakce chromatinu s typickými rysy aktivního chromatinu (hypersenzitivní ke štěpení nukleázami, obohacená o retrotranspozonovou DNA a organizovaná v nukleozomálních doménách). Tato frakce představuje pouze malou část genomu spermie (Pittogi et al., 1999). Je pravděpodobné, že v místech výskytu endogenní retrotranspoziciční aktivity může docházet k integraci exogenních DNA molekul (Pittogi et al., 2000).

## **6. Integrace cizorodých sekvencí do genomu spermie**

Plasmidová DNA internalizovaná do jádra se pevně váže s jaderným lešením, dochází k jejím přestavbám a podstupuje rekombinaci s genomovou DNA spermie (Zoragi and Spadafora, 1997, Magnano et al., 1998). Exogenní DNA opakovaně asociuje se specifickou oblastí jaderné matrix, tato oblast jádra koreluje s ekvatoriálním segmentem hlavičky spermie, což bylo detekováno fluorescenční analýzou. S rostoucí dobou inkubace vzrůstá počet značených jader (McCarthy and Ward, 2000). Konstrukcí DNA knihovny z DNA extrahované ze spermií inkubovaných s pSV2 CAT DNA bylo získáno několik klonů, kde sekvence plasmidu rekombinovala s myší chromosomální DNA. Sekvenční analýza dvou náhodně vybraných klonů ukázala, že DNA fragmenty z plasmidu jsou integrované v genomu myší spermie. Místa integrace byla identická v obou klonech, z toho plyne, že se pravděpodobně nejedná o náhodný jev, ale integrace se odehrává v preferenčních místech. S jedním koncem integračního místa sousedí konsensus sekvence topoizomerázy II, což naznačuje možnou roli tohoto enzymu v procesu nehomologní rekombinace (Zoragi and Spadafora, 1997).

Přítomnost míst rozpoznávaných topoizomerázou II ukazuje na možnost vzniku dvouvláknových zlomů. Asociace těchto míst s jaderným lešením dává tušit, že veškeré sekvence obsahující integrační místa mohou být asociovány s jadernou matrix (Gasser and

Laemmli, 1986, Adachi et al., 1989, Sperry et al., 1989). Dvouvláknové zlomy, stejně jako těsná asociace s jaderným lešením typická pro oblasti DNA vážící jadernou matrix (MARs), mohou lokálně měnit strukturální organizaci chromatinu spermie. Výsledkem mohou být místa, ve kterých chromosomální DNA není v komplexu s protaminy v těsně sbalených smyčkových doménách (Ward, 1993). Tato místa mohou být přístupná pro integraci exogenní DNA. Nehomologní rekombinace mezi těmito místy a cizorodými DNA sekvencemi může být katalizována enzymatickými aktivitami asociovanými s jaderným lešením (Spadafora, 1998). Tato domněnky potvrzuje zjištění, že frakce chromatinu spermie hypersenzitivní k nukleázám je v jádru lokalizována periferně a představuje pouze malou část genomu. Nedošlo u ní k nahrazení histonů protaminy, je tedy organizována v nukleozomálních doménách. Je obohacena o retrotranspozonovou DNA a přístupná pro integraci exogenních molekul (Pittogi et al., 1999, Pittogi et al., 2000).

## 6.1 REMI

Restrikčním enzymem zprostředkovaná integrace (REMI - restriction enzyme-mediated integration) využívá lipofekci linearizovaného plasmidu a odpovídající restrikční enzym pro integraci do genomové DNA, který generuje jednořetězcové kohezní konce. Lineární DNA s jednořetězcovými kohezními konci spolu s příslušným restrikčním enzymem je vpravena do cílových buněk lipofekcí nebo elektroporací, restrikční enzym pak rozštěpí genomovou DNA v místech, které umožňují cizorodé DNA díky párujícím kohezním koncům do genomu integrovat (Kuspa and Loomis, 1992).

Kroll a Amaya (1996) touto metodou připravili transgenní embrya *Xenopus laevis*, která stabilně a nemozaikovitě exprimovala klonovaný gen. Linearizovaná plasmidová DNA byla introdukována do dekonzenzovaného jádra spermie in vitro užitím REMI. Tato jádra byla transplantována do neoplozených vajíček. Byly získány stovky normálních diploidních embryí, která se vyvíjela do pokročilých stádií a exprimovala integrovaný plasmid (Kroll and Amaya, 1996).

Pomocí této techniky se podařilo připravit i transgenní spermie skotu. Bovinní spermie byly lipofekovány Not I linearizovaným pEGFP a odpovídajícím restrikčním enzymem. Spermie byly inkubovány v přítomnosti <sup>32</sup>P značeného pEGFP, promyty a ošetřeny DNázou I, podíl pEGFP zadrženého lipofekovanými spermii byl 80 %. DNA spermii byla extrahována a štěpena Eco R1, separována gelovou elektroforézou a amplifikována PCR se specifickými GFP primery. Sekvence GFP (green fluorescent protein - zeleného

fluorescenčního proteinu) byla nalezena výhradně v DNA z lipofekovaných spermii s Mr 1300 – 3000 bp. Toto pozorování bylo potvrzeno Southern blot analýzou. Tyto experimenty prokázaly, že touto metodou je možné do genomové DNA spermie před fertilizací integrovat exogenní DNA v Not I senzitivních místech (Shemesh et al., 2000).

## 7. Optimalizace vazby DNA

U druhů, u nichž se užívají ejakulované spermie s výskytem individuálních rozdílů ve schopnosti spermii vázat exogenní DNA, lze stanovit parametry, které by mělo sperma splňovat a vybrat tak nejvhodnějšího dárce, který může sloužit opakovaně v mnoha experimentech, na rozdíl od dárců spermii epididymálních, kterým lze sperma odebrat pouze jednou. U býků nehraje individuální původ spermii významnou roli (Anzar and Buhr, 2005), na rozdíl od prasat. Parametry, které by mělo splňovat kančí sperma popisuje Lavitrano et al. (2003). Základní parametry se shodují s těmi, jenž se používají při hodnocení kvality spermatu v konvenčních programech křížení zvířat. Jedná se o objem ejakulátu (více než 100 ml), koncentraci spermii (více než  $1 \times 10^6$  spermii/ml), přítomnost abnormálních spermii (méně než 20 %), motilitu v čase odběru (více než 70 %) a vysoce progresivní motilitu po dvou hodinách. Specifickým parametrem je schopnost spermii vázat a internalizovat exogenní DNA. Kvalita spermatu je ovlivňována mnoha faktory, jako je roční období (v teplém období klesá), frekvence odběru (ne častěji než každé čtyři dny), plemeno, věk dárce a další. Schopnost vazby DNA koreluje s kvalitou ejakulátu, zvláště pokud jde o vysoce progresivní motilitu spermii po promývací proceduře. U každého dárce je třeba provést optimalizaci podmínek vychytávání exogenní DNA (teplota, množství exogenní DNA, koncentrace BSA). Inkubace při teplotě 17 – 20 °C byla shledána nejlepším kompromisem mezi efektivitou vazby exogenní DNA a kvalitou spermii po inkubaci, navíc došlo ke snížení nukleázové aktivity. Důležitým parametrem pro optimalizaci množství exogenní DNA internalizované spermii je rezistence spermie k vzrůstající koncentraci DNA molekul, protože přetížení spermie vede k poklesu internalizace DNA spermii. Přetížení spermie by mohlo vést k jejímu poškození či znevýhodnění při fertilizaci ve srovnání s normálními spermii, umělé inseminace může toto znevýhodnění dále zesilovat. Stanovení okamžiku přidání DNA, její množství i doby inkubace se spermii bylo provedeno interakcí promytých spermii s koncově značenou DNA v různých časech po odběru. Bylo zjištěno, že ideální doba přidání DNA se kryje s časným stupněm kapacitace, což je přibližně 30 minut po promytí spermii, ale

ne později než po 60 minutách. Doba inkubace spermií s DNA během níž dojde k interakci je 2 – 4 hodiny, kapacitace musí po tu dobu probíhat normální rychlostí. Toho lze dosáhnout užitím média bez vápenatých iontů, které zároveň snižuje pravděpodobnost, že exogenní DNA bude rozštěpena endogenními nukleázami a dojde ke spuštění apoptotické reakce (Lavitrano et al., 2002, Lavitrano et al., 2003).

## 8. Vazba RNA molekul

Schopnost spermií vázat exogenní molekuly není omezena pouze na molekuly DNA. Protože interakce DNA vazebných proteinů spermie s exogenními molekulami má iontový charakter, týká se i dalších negativně nabitých makromolekul (Lavitrano et al., 1992). Spermie mohou tedy vázat RNA stejně jako DNA molekuly. Navíc přítomnost funkční reversně transkriptázové aktivity, která byla objevena v myších epididymálních spermiích umožňuje přepis exogenních RNA molekul do molekul cDNA, které mohou být přenášeny během oplození stejně jako exogenní DNA molekuly internalizované spermií. Mimo to byl na základě předběžných výsledků předpokládán retrotranskripční krok i u procesu integrace exogenní internalizované DNA do genomu spermie (Magnano et al., 1998).

Přítomnost reversně transkriptázové aktivity v myších epididymálních spermiích byla objevena v roce 2000. Giordano et al. prokázali, že spermie inkubované s RNA lidského polioviru (virus dětské obrny) mohou vázat exogenní RNA molekuly a internalizovat je do jádra. Internalizace RNA do jádra byla potvrzena fluorescenční mikroskopií, molekuly RNA se preferenčně soustřeďovaly v subakrosomální oblasti hlavičky. Přímá PCR amplifikace DNA extrahované ze spermií inkubovaných s RNA ukázala, že RNA polioviru je reversně transkribována na cDNA fragmenty, které pravděpodobně zůstávají v jádru v neintegrovaném stavu. Fragmenty cDNA jsou během *in vitro* fertilizace přenášeny do vajíčka. Molekuly reversní transkriptázy jsou specificky a stabilně asociovány s jaderným lešením spermie, kde mohou být vizualizovány elektronovou mikroskopií s využitím imunologicky vázaného zlata (Giordano et al., 2000).

Sciamanna et al. (2003) dále zkoumali, jaká RNA je vhodným substrátem pro reversní transkriptázu ke generování nových funkčních genů. Spermie byly preinkubovány s RNA z hybridního vektoru obsahujícího murine leukemia virus/virus like 30 S (MLV/VL 30)  $\beta$ -gal gen (kódující  $\beta$ -galaktosidázu). Výsledky ukázaly, že došlo k inkorporaci RNA do spermií. Během *in vitro* fertilizace došlo k přenosu do embryí, jež následně vykazovala mozaikovou

propagaci v F0 a následně v F1 generaci. Proteinová exprese  $\beta$ -gal byla detekována v různých tkáních F0 (9 z 11 testovaných orgánů) i F1 zvířat. Přestože  $\beta$ -gal sekvence neintegrovala do genomu, z pohledu exprese funkčního proteinového produktu byla kompetentní. Výsledky prokázaly, že spermie může reversně transkribovat exogenní RNA a generovat transkripčně kompetentní sekvence, které jsou během fertilizace přenášeny na potomky (Sciamanna et al., 2003).

Při dalším zkoumání tohoto mechanismu byly spermie inkubovány s plasmidem nesoucím retrotranspoziční kazetu přerušenu intronem v opačné orientaci než GFP (green fluorescent protein) gen. Bylo zjištěno, že ve spermiích vzniká reversně transkribovaná sestřižená EGFP DNA sekvence, která je přenesena do embryí při in vitro fertilizaci. Myši, jež se z těchto embryí vyvinuly, exprimovaly EGFP v endotelu krevních kapilár různých orgánů. Sekvence cDNA kódující EGFP byly v pozitivních tkáních detekovány jako extrachromosomální mozaikovitě roztroušené struktury udržované v nízkém počtu kopií (< 1 kopie/genom). Docházelo k mozaikovému přenosu těchto struktur z F0 na F1 potomstvo. Výsledkem je zjištění, že ve zralých spermiích je přítomný mechanismus, který umožňuje transkripci, sestřih a reversní transkripci exogenních RNA molekul (Pittogi et al., 2006).

## 9. Posílení efektivity inkorporace exogenní DNA

Efektivita inkorporace exogenní DNA může být posílena užitím různých technik, které umožňují přímý vstup exogenních molekul bez interakce s povrchovými proteiny nebo usnadňují interakci s povrchovými strukturami.

### 9.1 Vliv elektroporace

Elektroporace je proces měnící permeabilitu buněčné membrány působením elektrického pole. Aplikace elektrického pulsu na buněčnou suspenzi vyvolává polarizaci membránových komponent žijících buněk a vyvíjí na membráně elektrický potenciál. Když rozdíl potenciálů vně a uvnitř buňky dosáhne kritické hodnoty, membránové komponenty se v ohraničených oblastech reorganizují do pórů a buňka se stává permeabilní pro makromolekuly (Knight, 1981; Knight and Scurttton, 1986). Změna permeability je přechodná, způsobená elektrickým pulsem, který nesmí přesáhnout kritický limit pro jednotlivé buňky (Tsong, 1983, Serpensu et al., 1985).



Elektroporace umožňuje zvýšení efektivity inkorporace exogenní DNA spermii, má ovšem negativní vliv na motilitu. Spermie skotu byly elektroporovány s využitím šesti různých kombinací napětí (500, 1000, 1500 V) a kapacity (1 a 25  $\mu\text{F}$ ) v přítomnosti plasmidové DNA (pR6H 527). Elektroporované spermie zachytávaly plasmidovou DNA s větší efektivitou (4,3 – 6,8 %) než neelektroporované (1 %). U elektroporovaných spermii zůstalo 3,5 – 6,3 % plasmidu vázáno na akrozomální membránu, u neelektroporovaných to bylo pouze 0,7 %. Elektrické pole významně neindukovalo akrozomální reakci. Aplikace elektrického pole měla ale výrazný vliv na významné snížení motility spermii (Gagne et al., 1991).

Vliv elektroporace na asociaci exogenní DNA s prasečími spermii byl zkoumán s užitím koncově značených a metodou náhodných primerů značených Hind III lambda DNA fragmentů. Bylo prokázáno, že DNA fragmenty po elektroporaci interagují se spermii. K zjištění, zda značená DNA se spermii asociovala, byly vzorky centrifugovány a důkladně promyty. Po pěti promývacích krocích bylo s  $1,5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  pohyblivých spermii asociováno přibližně  $10^8$  molekul DNA. Přítomnost lambda Hind III fragmentů v elektroporovaných spermii byla prokázána gelovou elektroforézou a autoradiografií. In situ vizualizační studie s biotin značenou DNA odhalily, že přibližně 75 % pohyblivých spermii přenáší DNA vázanou v postakrozomální oblasti. Intenzita vazby byla ale rozdílná. Při autoradiografické analýze s užitím  $^3\text{H}$  dCTP značené DNA bylo pozitivních přibližně 70 % spermii. U elektroporovaných vzorku vzrostlo množství DNA vázané spermii o 5 – 10 % (Horan et al., 1992).

První zpráva o úspěšné aplikaci elektroporace spermii v produkci transgenních ryb pochází z roku 1992. Rybí spermie suspendované ve zředěném citrátovém roztoku byly inkubovány s plasmidovou DNA, pro zvýšení vazby, inkorporace, případně obojího, byly následně aplikovány pulsy elektrického pole o vysoké intenzitě. K hodnocení genového přenosu byl testován tkáňový homogenizát a extrakt genomové DNA z volně plavajícího potěru, jenž se vyvinul z vajíček oplozených elektroporovanými spermii. Dot blot hybridizace a analýza genové exprese prokázala přítomnost a expresi reportérového genu vneseného v 2,6 – 4,2 % případů z několika stovek testovaných larev *Cyprinus carpio* L., *Clarias glar iepinus* a *Oreochromis niloticus*. U potěru vniklého v paralelním experimentu bez elektroporace spermii nebyl nalezen žádný přenos genů (Muller et al., 1992). Powers et al. (1992) v témže roce prováděli experimenty s využitím elektroporace k vnesení cizorodé DNA nejen do spermii, ale i do vajíček před oplozením, krátce po něm a ve stádiu prvního buněčného dělení u *Ictalurus punctatus* a *Cyprinus carpio*. Jedince nesoucí introdukované cizí

geny určovaly PCR a Southern blot analýzou. Elektroporaci byla shledána jako efektivní metoda pro vnášení cizorodých genů do rybích gamet a embryí (Powers et al., 1992). Také Sin et al. (2000) zhodnotili elektroporaci jako metodu, která umožňuje ošetřeným lososím spermii spolehlivější a efektivnější internalizaci exogenní DNA i následný přenos do lososích embryí. Udržení a integrita internalizované DNA byla prokázána PCR analýzou (Sin et al., 2000).

Vliv elektroporace byl studován i na zástupci bezobratlých živočichů. U japonské ušně nebyl pozorován negativní účinek elektroporace na motilitu spermii. Ta byla u elektroporovaných spermii v mořské vodě či fyziologickém roztoku mořských bezobratlých srovnatelná s kontrolní skupinou. Spermie byly po elektroporaci inkubovány s DNázou, aby byla odstraněna neinternalizovaná DNA, genom spermii byl analyzován PCR analýzou. Přenos genu byl prokázán pomocí PCR a Southern blot analýzy, která rovněž prokázala integraci DNA do genomu.  $10^6 - 10^7$  spermii elektroporovaných při 10 kV a  $2^7$  pulsech na šest cyklů bylo užito k oplození dvou stovek vajíček. Nebyly zjištěny žádné rozdíly ve schopnosti oplození u neelektroporovaných spermii a spermii elektroporovaných v nepřítomnosti cizorodé DNA. U spermii elektroporovaných v přítomnosti DNA byla schopnost oplození podobná jako u kontrolní skupiny (Tsai et al., 1997). Další experiment porovnával vliv napětí užitého během elektroporace na motilitu spermii mřenky a ušně. U spermii mřenky motilita postupně klesala, pokud byla amplituda zvyšována nad 8 kV. Jestliže bylo užito 10 kV, spermie byly zcela imobilní. Naproti tomu u spermii ušně k poklesu motility nedocházelo pokud byla amplituda zvyšována od 2 do 10 kV. Bylo zjištěno, že motilita spermii, podíl fertilizace, líhnutí, přenosu genu i abnormalit získaných spermii primárně závisí na hladině napětí a koncentraci DNA během elektroporace (Tsai., 2000).

Vliv elektroporace na internalizaci exogenní DNA do jádra byl prokázán v experimentu se spermii *Danio rerio*. Zralé spermie byly inkubovány a elektroporovány v přítomnosti radioaktivně značené nebo neznačené plasmidové DNA při napětí 500, 1000 a 1500 V/cm. Z podílu radioaktivně značeného plasmidu zadržného spermii bylo zjištěno, že některé spermie vykazovaly schopnost DNA internalizovat spontánně, elektroporace tuto schopnost posílila 1 – 2x. Výsledkem oplození zralých vajíček elektroporovanými spermii byl přenos plasmidové DNA na potomky. Frekvence transgenních jedinců vzrůstala při 500 V/cm jen omezeně, při 1000 V/cm více než dvojnásobně a při užití 1500 V/cm téměř dvojnásobně v porovnání s neelektroporovanými skupinami. Vzrůstající intenzita pole měla negativní účinek na motilitu spermii, při vysokém napětí docházelo k jejich shlukování. Autoradiografie elektroporovaných spermii prokázala, že plasmidová DNA byla asociována

s většinou spermií, ale až ultrastrukturální in situ hybridizace umožnila prokázat, že exogenní DNA je internalizována do jádra a elektroporace tuto internalizaci posiluje. Tyto výsledky poskytly přímý důkaz, že nejen savčí spermie jsou schopné internalizace exogenní DNA do jádra (Patil and Khoo, 1996).

Vliv elektroporace spermií na embryonální vývoj oocytů oplozených těmito spermii a na možnost integrace konstruktů byl hodnocen na bovinních spermii. Samotný proces elektroporace embryonální vývoj neovlivnil, nicméně oocyty oplozené elektroporovanými spermii nesoucími DNA se vyvíjely za šestnácti-buněčné stádium ve významně nižších proporcích (27 a 34 % podle typu konstruktů) ve srovnání s kontrolami bez DNA (44 %). Užití elektroporace významně zvýšilo internalizaci DNA, stoupl i počet homologních rekombinačních událostí z 3,5 % bez elektroporace na 46,5 % po elektroporaci. Homologní integrace s jádrem elektroporovaných spermií před oplozením detekována nebyla. Celkově byl efekt elektroporace spermií s DNA na embryonální vývoj zhodnocen jako negativní, zvláště byl-li užit homologní konstrukt (Reith et al., 2000).

Vliv elektroporace in vivo na zlepšení inkorporace exogenní DNA je využíván při testes-zprostředkovaném genovém přenosu (TMGT). Například Yamazaki et al. (2000) užívají kombinaci DNA injekce do semenotvorných tubulů a následné lokální elektroporace in vivo jako efektivní a výhodný pokusný systém pro spermatogenně-specifickou genovou expresi během spermatogeneze myši. Možnost této techniky produkovat transgenní potomstvo hodnotí užitím GFP jako markeru. Expresí GFP po in vivo genovém přenosu byla monitorována fluorescenčním mikroskopem na povrchu varlat. Přirozeným pářením s normálními samicemi bylo stanoveno, že u 65 % samců byla zachována oplozovací schopnost a mohli normálně produkovat potomky. Přenos GFP vektoru zárodečnou linií na potomstvo byl hodnocen fluorescenční mikroskopií, ale nebyl detekován žádný transgenní potomek (Yamazaki et al., 2000). Sato et al. popisují in vivo elektroporaci přes cauda epididymis pomocí elektrod pinzetového typu ihned po injekci EGFP expresního vektoru v komplexu s liposomy jako metodu, která okamžitě zlepšuje inkorporaci cizorodé DNA epididymálními epiteliálními buňkami. Cizorodou DNA ve spermii prokazují pomocí PCR (Sato et al., 2002).

## 9.2 Užití liposomů

Liposomy jsou užívány jako vektor exogenních molekul do buněk. Využívají se k přenosu mnoha různých látek. Může se jednat například o enzymy, hormony, protinádorová a jiná léčiva. Do cílových membrán, s kterými fúzí, mohou přinášet nové lipidy a tak měnit jejich lipidové složení. Příkladem experimentálního využití může být výzkum signalizace vedoucí k aktivaci spermií, kde byly liposomy užívány k dopravení molekul nepřecházejících přes membránu do cytoplasmy spermií (Garrett et al., 1999). Optimalizaci a kvantifikaci fúze liposomů s membránou býčích spermií popisují Anzar et al. (2002). Fúzi liposomů s membránou spermií kvantifikují průtokovou cytometrií. Při koncentraci  $100 \times 10^6$  spermií/ml bylo zjištěno více fúzí liposomů se spermiemi než při nižších koncentracích. Dynamika fúze se lišila v závislosti na lipidovém složení. Zároveň nebyl zjištěn vliv vápenatých iontů. Procento spermií fúzujících s liposomy se lišilo nejen v závislosti na lipidovém složení a poměru liposomy/spermie, ale také u jednotlivých zvířat (Anzar et al., 2002). K přenosu exogenní DNA jsou liposomy užívány zvláště u in vivo transfekcí při TMGT.

Užití liposomů k transfekci exogenní DNA do hlavičky myší spermie popisuje Bachiller et al. (1991). Ačkoli byl přenos velmi efektivní a nebylo detekováno žádné zřejmé snížení frekvence fertilizace, nedošlo k produkci transgenních potomků (Bachiller et al., 1991).

O rok později byly liposomy užity u ptáků při genovém přenosu exogenní DNA kohoutí spermií do vajíčka (Rottmann et al., 1992). Liposomy u ptáků užili také Nakanishi a Iritani (1993), kteří zjistili, že dopravení exogenní DNA do kohoutí spermie pomocí liposomů produkovalo životaschopnější spermie a dovolovalo transfekci vajíček oplozených těmito spermiemi ve větším procentu případů ve srovnání se spermiemi elektroporovanými či inkubovanými s volnou DNA (Nakanishi and Iritani, 1993). Podobnou problematikou se také zabývali Squires and Drake, (1993).

Interakci liposom/DNA komplexu s myšími epididymálními spermiemi in vitro studovali Kim et al. (1997). Spermie transfekované liposom/DNA komplexem byly analyzovány průtokovou cytometrií a in situ hybridizací. Bylo zjištěno, že transfekce spermií tímto komplexem byla efektivní, s vysokou frekvencí vazby exogenní DNA. Vazba exogenní DNA byla rezistentní k působení DNázy I, což ukazuje na přítomnost exogenní DNA uvnitř spermie. Expres cizorodé DNA v embryích vzniklých po in vitro fertilizaci ale detekována nebyla. Exogenní DNA byla nalezena v cytoplasmě, nikoli v jádru. K vazbě samotné

exogenní DNA spermiemi nedocházelo. Výsledky naznačují, že liposom/DNA komplex sice může být efektivně vázán spermií, nicméně exogenní DNA nemůže být integrována do chromosomální DNA spermie. Naproti tomu, při transfekci *in vivo*, kde byly vyvíjející se samčí zárodečné buňky zničeny alkylačním činidlem (busulfan) a do semenotvorných tubulů byl vpraven komplex liposom/bakteriální Lac Z gen použitím mikroinjekční jehly, epididymální spermie obsahovaly cizorodou DNA integrovanou do genomu, což bylo potvrzeno PCR analýzou (Kim et al., 1997). Vliv liposomů na efektivitu vazby exogenní DNA byl také hodnocen u králíčích spermií. Pokud byly králíčí spermie inkubovány s exogenní DNA v přítomnosti lipofectinu, 66 % spermií neslo exogenní DNA (Wang et al., 2003).

Lipofekce se dá využít také u metody REMI. Komplexem linearizovaného pEGFP plasmidu a příslušného restriktivního enzymu, uzavřených v liposomech, byly lipofekovány bovinní spermie (Shemesh et al., 2000).

Příkladem využití lipofekce *in vivo* může být produkce transgenních potkanů, kdy komplex liposom/DNA byl injikován do jejich varlat. Bylo testováno osm liposomů a provedeno srovnání, pouze dva vedly k zvýšení relativního podílu potkanů majících pozitivní spermie. Přítomnost exogenní DNA v epididymálních spermiích byla potvrzena PCR analýzou. Přenos exogenní DNA na potomstvo byl potvrzen Southern dot blot analýzou, která detekovala DNA v játrech a ocasu novorozeňat, integrace do genomu byla pouze předpokládána (Yonezawa et al., 2001). Celebi et al. využívají mikroinjekce cirkulárního plasmidu nesoucího Lac Z gen spolu s kationtovými lipidy do semenotvorných tubulů myši. Gen byl přenesen na potomky, ale zůstával v episomální podobě. Byl nalezen v ocasech mladých zvířat, u dospělých nalezen nebyl. Plasmid zůstal pouze v některých tkáních, jako skeletální a srdeční svaly. Při užití cirkulární DNA nebyly nalezeny žádné integrativní formy (Celebi et al., 2002). Shen et al. používají komerčně dostupné liposomy jako kontrolu při DMSO-spermií-zprostředkovaném genovém přenosu, kdy jsou spermie transfekovány komplexem DNA/DMSO (dimetylsulfoxid). Myší spermie mohou být touto metodou transfekovány přímo injekcí do varlat nebo *in vitro* plasmidovou DNA obsahující GFP. Kontrolní transfekce králíků s využitím liposomů probíhala *in vivo*. Liposomy byly využity k přenosu vektoru pGBC2htPAm, jež byl připraven k expresi htPAm (human tissue plasminogen activator mutant) v mléčných žlázách zvířat. Samičky transgenních králíků, jež byly v tomto experimentu získány, byly v dospělosti schopné produkovat htPAm v buňkách prsních žláz. Přesto Shen et al. (2006) došli k závěru, že DMSO je finančně méně nákladné

než komerční liposomy a efektivita zprostředkování genového přenosu je vyšší (56,3 % transgenních potomků oproti 39,6 a 47,8 % při užití liposomů) (Shen et al., 2006).

### **9.3 Testes-zprostředkovaný genový přenos (TMGT)**

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o variantu spermií-zprostředkovaného genového přenosu, kdy je DNA v podobě nechráněných molekul či uzavřená v liposomech vpravena přímo do reprodukčního traktu samců, interaguje se spermiemi a dalšími buňkami reprodukčního traktu *in vivo* a může být přenesena během oplození, které probíhá přirozenou cestou nebo artifiční inseminací. Efektivita inkorporace exogenní DNA může být posílena také *in vivo* elektroporací.

Huguet a Esponda (1998) analyzovali *in vitro* a *in vivo* inkorporaci exogenní DNA myšimi a potkaními epididymálními spermiemi s užitím dvou konstruktů. Při *in vitro* inkorporaci byly promyté epididymální spermie 2 hodiny inkubovány v přítomnosti linearizované exogenní DNA. Při *in vivo* inkorporaci byla DNA injikována do proximální oblasti vas deferens, spermie byly odebrány o 6 hodin později. Lokalizace exogenních genů ve spermiích byla provedena *in situ* hybridizací s využitím fluorescenčních markerů a elektronové mikroskopie. Přesná lokalizace exogenní DNA ve spermii byla vizualizována trojrozměrnou rekonstrukcí užitím konfokální laserové mikroskopie. Bylo prokázáno, že k inkorporaci exogenní DNA došlo u 60 – 70 % spermií po *in vitro* nebo *in vivo* působení. Byl získán pozitivní signál z jádra spermie, nebyl ovlivněn působením DNázy. Inkorporace exogenní DNA byla potvrzena PCR analýzou, sekvence izolované DNA a původního plasmidu se shodovala na 98,6 %. Byla prokázána schopnost spermií *in vivo* inkorporovat exogenní DNA, možnost DNA dosáhnout jádra a že epididymální sekret ani sekret vas deferens nebrání tomuto procesu (Huguet and Esponda, 1998).

Další příklady užití této metody byly uvedeny v souvislosti s využitím liposomů či *in vivo* elektroporace.

## 10. Závěr

Cílem této práce bylo pokusit se shrnout faktory ovlivňující vazbu nukleových kyselin spermií a integraci DNA do genomu u spermiového přenosu. Proces vazby DNA a RNA spermií je nenáhodný, vysoce regulovaný, zprostředkovaný specifickými DNA vazebnými proteiny nacházejícími se na povrchu spermie a inhibovaný faktory přítomnými v sekretech žláz reprodukčního traktu. Inhibice vazby je kompetiční nebo zprostředkována enzymatickou aktivitou. Schopnost vazby exogenních molekul mají živé, zralé epididymální spermie či ejakulované spermie zbavené semenné tekutiny. Schopnost vazby DNA může být posílena využitím dalších technik jako je elektroporace, užití vektorů (liposomy, linker proteiny apod.), které lze kombinovat také s transfekcí *in vivo*. Internalizace navázané DNA je zprostředkována molekulami přítomnými na membráně spermie, internalizováno je konstantní množství DNA molekul. Internalizované DNA molekuly mohou podstoupit rekombinaci s chromosomální DNA spermie. Integrační místa se nacházejí v oblasti chromatinu asociovaného s jaderným lešením. Předpokládá se role topoisomerázy II, není vyloučen ani retrotranskripční krok. Internalizované RNA molekuly mohou být reversně transkribovány na transkripčně kompetentní sekvence, které mohou být přenášeny na potomstvo během oplození stejně jako exogenní DNA.

## 11. Přehled literatury

**Adachi, Y., Kas, E. and Laemmli, U. K.** (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold attachment regions. *EMBO J* **8**: 3997 – 4006.

**Anzar, M., Kakuda, N., He, L., Pauls, K. P. and Buhr, M. M.** (2002). Optimizing and quantifying fusion of liposomes to mammalian sperm using resonance energy transfer and flow cytometric methods. *Cytometry* **49**: 22 – 27.

**Anzar, M. and Buhr, M. M.** (2005). Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. *Theriogenology* **65**: 683 – 690.

**Arrezo, F.** (1989). Sea-urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biol Int Rep* **13**: 391 – 404.

**Atkinson, P. W., Hines, F. R., Beaton, S., Matthaei, K. I., Reed, K. C. and Bradley, M. P.** (1991). Association of exogenous DNA with cattle and insect spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* **29**: 1 – 5.

**Bachiller, D., Schellander, K., Peli, J. and Ruther, U.** (1991). Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev* **30**: 194 – 200.

**Brackett, B. G., Baranska, W. and Sawicki, W.** (1971). Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 353 – 357.

**Brinster, R. L., Sandgren, E. P., Behringer, R. R. and Palmiter, R. D.** (1989). No simple solution for making transgenic mice. *Cell* **59**: 239 – 241.

**Cabrera, M., Chan, P. J., Kalugdan, T. H. and King, A.** (1997). Transfection of the inner cell mass and lack of a unique DNA sequence affecting the uptake of exogenous DNA by sperm as shown by dideoxy sequencing analogues. *J Assist Reprod Genet* **14**: 120 – 124.

**Camaioni, A., Russo, M. A., Odorisio, T., Gandolfi, F., Fazio, V. M. and Siracusa, G.** (1992). Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *J Reprod Fertil* **96**: 203 – 212.

**Carballada, R. and Esponda, P.** (2001). Regulation of foreign DNA uptake by mouse spermatozoa. *Exp Cell Res* **262**: 104 – 113.

**Celebi, C., Auvray, P., Benvegna, T., Plusquellec, D., Jegou, B. and Guillaudeux, T.** (2002). Transient transmission of transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev* **62**: 477 – 482.

**Fernandez, M. A., Mani, S. A., Rangarajan, P.N. and Seshagiri, P. B.** (1999). Sperm-mediated gene transfer into oocytes of the golden hamster: assessment of sperm function. *Indian J Exp Biol* **37**: 1085 – 1092.



- Francolini, M., Lavitrano, M., Lamia, C. L., French, D., Frati, L., Cotteli, F. and Spadafora, C.** (1993). Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Mol Reprod Dev* **34**: 133 – 139.
- Gagne, M. B., Pothier, F. and Sirard, M. A.** (1991). Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev* **29**: 6 – 15.
- Garrett, F. E., Goel, S., Yasul, J. and Koch, R. A.** (1999). Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. *Biochim Biophys Acta* **1417**: 77 – 88.
- Gasser, S. M. and Laemmli, U. K.** (1986). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J* **5**: 511 – 517.
- Giordano, R., Magnano, A. R., Zaccagnini, G., Pittoggi, C., Moscufo, N., Lorenzini, R. and Spadafora C.** (2000). Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol* **148**: 1107 – 1113.
- Habrova, V., Takac, M., Navratil, J., Macha, J., Ceskova, N. and Jonak, J.** (1996). Association of rous sarcoma virus DNA with *Xenopus laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Mol Reprod Dev* **44**: 332 – 342.
- Horan, R., Powell, R., McQuaid, S., Gannon, F. and Houghton, J. A.** (1991). Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch Androl* **26**: 83 – 92.
- Horan, R., Powell, R., Bird, J. M., Gannon, F. and Houghton, J. A.** (1992). Effects of electropermeabilization on the association of foreign DNA with pig sperm. *Arch Androl* **28**: 105 – 114.
- Huguet, E. and Esponda, P.** (1998). Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **51**: 42 – 52.
- Chan, A. W. S., Luetjens, C. M., Dominko, T., Ramalho-Santos, J., Simerly, C. R., Hewitson, L. and Schatten, G.** (2000). Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* **6**: 26 – 33.
- Chang, K., Quian, J., Jiang, M., Liu, Y. H., Wu, M. Ch., Chen, Ch. D., Lai, Ch. K., Lo, H. L., Hsiao, Ch. T., Brown, L., Bolen, J. Jr., Huang, H. I., Ho, P. Y., Shih, P. Y., Yao, Ch. W., Lin, W. J., Chen, Ch. 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.
- Kim, J. H., Jung-Ha, H. S., Lee, H. T. and Chung, K. S.** (1997). Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev* **46**: 515 – 526.
- Knight, D. E.** (1981). Rending cells permeable to exposure to electric fields. *Tech Cell Physiol* **113**: 1.

- Knight, D. E. and Scrutton, M. C.** (1986). Gaining access to the cytosol: the technique and some application of electroporation. *Biochem J* **234**: 497 – 506.
- Kroll, K. L. and Amaya, E.** (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**: 3173 – 3183.
- Kuspa, A. and Loomis, W. F.** (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **89**: 8803 – 8807.
- 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**: 717 – 723.
- Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L. and Spadafora, C.** (1992). The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev* **31**: 161 – 169.
- Lavitrano, M., Maione, B., Forte, E., Francolini, M., Sperandio, S., Testi, R. and Spadafora C.** (1997). The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Exp Cell Res* **233**: 56 – 62.
- Lavitrano, M., Bacci, M. L., Forni, M., Lazzereschi D., Di Stefano, C., Fioretti, D., Giancotti, G., 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 USA* **99**: 14230 – 14235.
- Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M. L., Di Stefano, C., Varzi, V., Wang, H. and Seren, E.** (2003). Sperm mediated gene transfer in pig: selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev* **64**: 284 – 291.
- Magnano, A. R., Giordano, R., Moscufo, N., Baccetti, B. and Spadafora C.** (1998). Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome. *J Reprod Immunol* **41**: 187 – 96.
- Maione, B., Pittoggi, C., Achene, L., Lorenzini, R. and Spadafora, C.** (1997). Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* **16**: 1087 – 1097.
- Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora C. and Kiessling, A. A.** (1998). Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* **50**: 406 – 409.
- McCarthy, S. and Ward, W. S.** (2000). Interaction of exogenous DNA with nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **56**: 235 – 237.
- Muller, F., Ivics, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvath, L. and Maclean, N.** (1992). Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol Mar Biol Biotechnol* **1**: 276 – 281.

**Nakanishi A. and Iritani, A.** (1993). Gene transfer in the chicken by sperm mediated methods. *Mol Reprod Dev* **36**: 258 – 261.

**Patil, J. G. and Khoo, H. V.** (1996). Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool* **274**: 121 – 129.

**Pittogi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrassi, F., Giordano, R., Magnano, A. R., Lorenzini, R., Lavia, P., Spadafora, C.** (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* **112**: 3537 – 3548.

**Pittogi, C., Zaccagnini, G., Giordano, R., Magnano, A. R., Baccetti, B., Lorenzini, R. and Spadafora, C.** (2000). Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. *Mol Reprod Dev* **56**: 248 – 251.

**Pittogi, C., Beraldi, R., Sciamanna, I., Barberi, L., Giordano, R., Magnano, A. R., Torosantucci, L., Pescarmona, E. and Spadafora, C.** (2006). Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. *Mol Reprod Dev* (Epub ahead of print).

**Powers, D. A., Hereford, L., Cole, T., Chen, T. T., Lin, C. M., Kight, K., Creech, K. and Dunham, R.** (1992). Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol Mar Biol Biotechnol* **1**: 301 – 308.

**Reith, A., Pothier, F. and Sirard, M. C.** (2000). Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Mol Reprod Dev* **57**: 338 – 345.

**Rottmann, O. J., Antes, R., Hofer, P. and Maierhofer, G.** (1992). Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. *J Anim Breed Genet* **109**: 64 – 70.

**Sato, M., Ishikawa, A. and Kimura, M.** (2002). Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **61**: 49 – 56.

**Sciamanna, I., Piccoli, S., Barberi, L., Zaccagnini, G., Magnano, A. R., Giordano, R., Campedelli, P., Hodgson, C., Lorenzini, R. and Spadafora, C.** (2000). DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* **56**: 301 – 305.

**Serpescu, E. H., Kinosita, K. Jr. and Tsong, T. Y.** (1985). Reversible and irreversible modification of erythrocytes by electrical breakdown. *Biochim Biophys Acta* **816**: 322.

**Shamila, Y. and Mathavan, S.** (2000). Sperm/DNA interaction: DNA binding proteins in sperm cell of silkworm *Bombyx mori*. *Mol Reprod Dev* **56**: 289 – 291.

**Shemesh, M., Gurevich, M., Harel-Markowitz, E., Benvenisti, L., Shore, L. S. and Stram, Y.** (2000). Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev* **56**: 306 – 308.

**Shen, W., Li, L., Pan, Q., Min, L., Dong, H. and Deng, J.** (2006). Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev* **73**: 589 – 594.

**Sin, F. Y. T., Walker, S. P., Symonds, J.E., Mukherjee, U. K., Khoo, J. G. I. and Sin, I. L.** (2000). Electroporation of salmon sperm for gene transfer: efficiency, reliability, and fate of transgene. *Mol Reprod Dev* **56**: 285 – 288.

**Smith, K. R.** (2002). The role of sperm-mediated gene transfer in genome mutation and evolution. *Med Hypotheses* **59**: 433 – 437.

**Spadafora, C.**(1998). Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* **20**: 955 – 964.

**Sperry, A. O., Blasquez, V. C. and Garrard, W. T.** (1989). Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked to matrix association regions and topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5497 – 5501.

**Squires, E. J. and Drake, D.** (1993). Liposome-mediated DNA transfer to chicken sperm cells. *Anim Biotechnol* **4**: 71 – 88.

**Tsai, H. J., Lai, C. H. and Yang, H. S.** (1997). Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis divorsicolor supertexta*). *Transgenic Res* **6**: 85 – 95.

**Tsai, H. J.** (2000). Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. *Mol Reprod Dev* **56**: 281 – 284.

**Tsong, T. Y.** (1983). Voltage modulation of membrane permeability and energy utilization in cells. *Biosci Rep* **3**: 487 – 505.

**Wang, H. J., Lin, A. X. and Chen, Y. F.** (2003). Association of rabbit sperm cells with exogenous DNA. *Anim Biotechnol* **14**: 155 – 165.

**Ward, W. S.** (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* **48**: 1193 – 1201.

**Wu, G. M., Nose, K., Mori, E. and Mori, T.** (1990). Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure. *Am J Reprod Immunol* **24**: 120 – 126.

**Yamazaki, Y., Yagi, T., Ozaki, T. and Imoto, K.** (2000). In vivo gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool* **286**: 212 – 218.

**Yonezawa, T., Furuhata, Y., Hirabayashi, K., Suzuki, M., Takahashi, M. and Nishihara M.** (2001). Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* **60**: 196 – 201.

**Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S. and Spadafora C.** (1995). Mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells - factors controlling the DNA uptake. *Exp Cell Res* **217**: 57 – 64.

**Zoragi, G. and Spadafora C.** (1997). Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA Cell Biol* **16**: 291 – 300.