

Bakalářská práce na téma:

Transgeneze pomocí spermiového přenosu

(Trangenesiis via sperm mediated gene transfer - SMGT)

Vypracoval: Lucie Tůmová
3. ročník, Biologie
Školitel: Ing. RNDr. Vladimír Krylov, PhD.

Praha, květen 2007

Obsah

Abstrakt	3
Klíčová slova	3
1. Úvod.....	4
2. Transformace spermie.....	4
2.1 Přirozená ochrana spermie proti vniku volných nukleových kyselin (NK)	4
2.2 Integrace exogenní DNA do spermie.....	5
2.2.1 Reverzní transkriptáza (RT).....	6
2.3 Integrace exogenní RNA do spermie.....	7
2.4 RT aktivita v buňce.....	8
3. Kvalita spermatu, pomocné metody transgeneze a metody fertilizace.....	9
3.1 Liposomy.....	9
3.2 TMGT.....	10
3.3 Fertilizační techniky.....	10
3.3.1 Umělá inseminace (AT).....	10
3.3.2 Oplození in vitro (IVF).....	11
3.3.3 TransgenICSI.....	11
3.4 LB-SMGT.....	11
4. Dosavadní aplikace SMGT a výsledky.....	12
4.1 Výsledky experimentů.....	13
5. SMGT a somatická genová terapie.....	14
6. Asistovaná reprodukce.....	15
7. Možnosti využití transgenních živočichů.....	16
7.1 Odolnost proti chorobám.....	17
7.2 Xenotransplantace.....	17
7.3 Produkce léčiv.....	18
7.4 Nové biomateriály.....	19
8. Závěr.....	19
Seznam použité literatury.....	21

ABSTRAKT

Transgenní organismy mají v dnešní době širokou škálu uplatnění. Pro budoucnost se otvírá obrovské pole využití pro transgenní živočichy, především hospodářská zvířata. Rýsují se 2 hlavní cesty – jednou je celosvětová potřeba vysoké produkce potravin, druhou je využití transgenních živočichů pro rozvoj vědy a humánní medicíny. Možností přípravy transgenních živočichů je mnoho, u savců například pomocí mikroinjekce, retrovirových vektorů, využitím embryonálních kmenových buněk nebo přenosem jader (klonování). Roku 1989 byly uveřejněny 2 nezávislé práce, upozorňující na to, že spermie může absorbovat exogenní DNA a přenést tuto transgenní informaci při oplodnění vajíčka do zygoty. Výsledkem je geneticky modifikovaný zárodek. Tato metoda byla pojmenována „sperm mediated gene transfer – SMGT“. Následující výzkumy se ukázaly jako slibné a metoda transgeneze pomocí spermiového přenosu by mohla v budoucnu poskytovat značné a levné výtěžky transgenních živočichů. Celý průběh procesu však ještě zdaleka není rozluštěn a výzkum na tomto poli může přinést i mnoho nových poznatků v oblasti molekulární i vývojové biologie.

ABSTRACT

Transgenic organisms enforce today in a wide scale. For the future there is a large field for the use of transgenic animals, especially farm animals. There are outlined 2 main ways – the first are global needs of high food-stuffs produce, the second is a usage of transgenic animals for the science envelopment and for a human medicine. There are many possibilities how to prepare transgenic animals, mammals for example by the microinjection, retroviral vector, through the use of embryonic stem cells or nuclear transfer (cloning). In the year 1989, 2 independent works were published, signaling that a sperm can carry exogenous DNA and transfer this transgenic information through fertilization into a zygote. The result was a genetically modified embryo. This method was called “sperm mediated gene transfer – SMGT”. Following researches seemed to be promising and the method of transgenesis via sperm mediated transfer could offer a large and cheap produce of transgenic animals in the future. But the whole process is still in its infancy and the research in this field could bring many new pieces of knowledge in the molecular and evolutionary area.

Klíčová slova: transgeneze, spermie, transgenní živočichové, fertilizace, exogenní DNA, SMGT

Key words: transgenesis, sperm, transgenic animals, fertilization, exogenous DNA, SMGT

1. Úvod

Transgenní organismy, hlavně rostliny a bakterie, mají v dnešní době pro člověka širokou škálu uplatnění. Pro budoucnost se zde také otvírá obrovské pole uplatnění pro transgenní živočichy, především hospodářská zvířata. Pro jejich využití se rýsují 2 hlavní cesty – jednou je celosvětová potřeba vysoké produkce potravin, druhou je využití transgenních živočichů pro rozvoj vědy a humánní medicíny.

Možností přípravy transgenních živočichů je mnoho, u savců například pomocí mikroinjekce, retrovirových vektorů, využitím embryonálních kmenových buněk nebo přenosem jader (klonování). Roku 1989 byly uveřejněny 2 nezávislé práce, upozorňující na novou metodu. Podle nich spermie může absorbovat exogenní DNA a přenést tuto genetickou informaci při oplodnění vajíčka do zygoty. Výsledkem je geneticky modifikovaný zárodek. Podobná zpráva byla poprvé uveřejněna roku 1971, byla však ignorována a až o 17 let později začala být tato nová metoda transgeneze brána v úvahu. Byla pojmenována **sperm mediated gene transfer – SMGT**.

Přes počáteční výsledky a úspěch se v experimentech vyskytly problémy se spolehlivostí metody, což zapříčinilo značnou nedůvěru. Následující výzkumy se však ukázaly jako slibné a metoda transgeneze pomocí spermiového přenosu by mohla poskytovat značné a levné výtěžky transgenních živočichů s mnohými možnostmi budoucího využití. Celý průběh procesu však ještě zdaleka není rozluštěn a výzkum na tomto poli může přinést i mnoho nových poznatků v oblasti molekulární i vývojové biologie.

2. Transformace spermie

2.1 Přirozená ochrana spermie proti vniku volných nukleových kyselin (NK)

Velký díl skepticismu k této metodě genetické modifikace organismů je dán logickou úvahou, že v reprodukčním traktu se nachází množství volných NK z buněk mrtvých nebo poškozených. Lze tedy předpokládat, že spermie budou vysoce odolné proti přirozené absorpci těchto molekul. Pokud by tomu tak nebylo, docházelo by mnohem častěji k mutacím a změnám v genetické informaci, které jsou ve většině případů nevýhodné nebo neslučitelné se životem a vedou k úhynu zárodku. To by vedlo k evolučnímu chaosu. Příroda tedy zřejmě vytvořila silné bariéry proti samovolnému vnikání cizorodé DNA do spermií. Vzhledem k úspěšným pokusům SMGT ale tyto bariéry nejsou absolutní. Úspěšné pokusy SMGT zřejmě poukazují na určité kritické faktory a prezentují neobvyklé situace, ve kterých se přirozené bariéry proti vniku DNA do spermie boří.

Byly objeveny minimálně 2 bariéry, které zabraňují spontánnímu, nežádoucímu vniknutí volných molekul do spermií vyšších živočichů. První z nich je **inhibiční faktor (IF-1)**, čteně se vyskytující v ejakulátu nebo navázaný na membráně spermií. IF-1 působí antagonisticky k DNA vazebným proteinům (DNA – bindings proteins), jež jsou za normálních okolností schopny vázat exogenní DNA a vlivem IF-1 tuto schopnost ztrácí. (Spadafora, 1998; Lavitrano et al., 2006) Druhou bariérou je **endogenní nukleázová aktivita**, kterou spouští interakce spermie s exogenními molekulami. Tato nukleázová aktivita zapříčiňuje degradaci exogenních sekvencí nebo, pokud množství DNA překročí prahovou hodnotu, vede k apoptóze takto „napadené“ buňky. (Spadafora, 1998; Smith and Spadafora, 2005)

Tyto způsoby ochrany před vedou skutečně k minimalizaci případů nežádoucí absorpce volných nukleových kyselin spermií. V malém procentu případů ale ochranné mechanismy selhávají. U savců je inhibiční faktor IF-1 pravděpodobně odbourán při přenosu spermie do samičího reprodukčního traktu, u vodních živočichů byla zjištěna ztráta IF-1 při promytí vodou s nízkou iontovou aktivitou (cca 0,8x zředěná mořská voda při pokusu s ježovkou). Podobné podmínky zřejmě mohou nastat i v přírodě, například v ústí řeky, kde je mořská voda zředěná vodou sladkou. (Lavitrano et al., 2006) To by vedlo k integraci exogenních sekvencí do milionů spermií různých živočichů. Jsou zde však další regulační bariéry, exogenní DNA nebo RNA je ve většině případů denaturována endogenními nukleázami. Přesto však v malém procentu případů transgenní informace přežívá.

2.2 Integrace exogenní DNA do spermie

V několika světových laboratořích byly provedeny výzkumy za účelem objasnění procesu, při kterém se volná nukleová kyselina váže na povrch spermie, překonává plazmatickou membránu a integruje se do genomu. Potvrdily se předpoklady, že tento proces rozhodně není nahodilý, ale je regulován množstvím faktorů.

Exogenní DNA interaguje s DNA vazebnými proteiny, které se nachází na povrchu spermatické buňky. (Spadafora, 1998; Lavitrano et al., 2006) Roli zde hrají také **MHC II. třídy** (major histocompatibility complex) a povrchové **CD4 receptory** – spermie myši s poškozeným MHC II. třídyjevily menší schopnost vázat exogenní DNA než spermie myši kontrolní. Oproti tomu spermie myši s konckoutem pro CD4 povrchové molekuly byly schopny exogenní DNA vázat, ale ztratily schopnost ji internalizovat. Integrace exogenní DNA do spermie může být u wild-type buněk inhibována preinkubací s anti-CD4 monoklonálními protilátkami (mAb S). Z toho vyplývá, že přítomnost MHC II. třídy je při spermatogenezi nutná pro vazbu exogenní DNA na povrch spermie a CD4 receptory jsou nutné pro její absorpci do buňky. (Lavitrano et al., 2006)

V další části procesu se internalizovaná DNA dostává do blízkosti chromozomální DNA, dochází k rekombinaci a v malém procentu případů je tak část exogenní DNA včleněna

do chromozomální DNA. Ukázalo se, že přístupné části chromatinu, na kterých k rekombinaci může dojít, jsou vázané pouze na **histonech** – oproti zbytku chromatinu vázanému na protaminech a tím zřejmě zneprístupněnému. Pozoruhodný je fakt, že přístupné části chromatinu jsou bohaté na **LINE-1 retroelementy**. (Smith and Spadafora; 2005) Procesu se také pravděpodobně účastní **topoizomeráza II**. (Lavitrano et al., 2006) Analýza sekvence pomocí pSV2CAT plasmidu ukázala začlenění transgenní sekvence do unikátní části spermatického genomu. (Lavitrano et al., 2006) Další pozorování ale také ukázala, že většina cizorodé DNA zůstává mimo chromozomy. (Smith and Spadafora, 2005)

Podstatné je také zjištění, že vnik exogenní molekuly do spermie spouští aktivitu endogenní reversní transkriptázy (RT). Tato RT aktivita je schopná přepisu exogenní RNA do cDNA (komplementární DNA syntetizovaná podle RNA řetězce), což naznačuje, že v SMGT hraje značnou roli retrotranspozomální/retrovirový aparát. (Smith and Spadafora, 2005; Pittogi et al., 2006)

2.2.1 Reverzní transkriptáza (RT)

Reversní transkriptáza je RNA-dependentní DNA polymeráza. Pro svoji funkci potřebuje RNA primer, podle kterého syntetizuje řetězec DNA za vzniku RNA/DNA hybridu. RNA řetězec poté odbourává RNázovou aktivitou a dosyntetizovává druhý, komplementární řetězec DNA dvojšroubovice. V minulosti byla reverzní transkriptáza spojována pouze s replikací retrovirů, později byly objeveny také 2 typy elementů vyskytujících se v eukaryotickém genomu: retrotranspozony a endogenní retroviry, souhrnně nazývané **retroelementy**. Tyto elementy čas od času mění svoji polohu v genomu a právě reverzní transkriptáza je klíčovým enzymem při jejich pohybu. Po rozluštění lidského a myšního genomu se zjistilo, že retroelementy tvoří až 45% lidského a 37% myšního genomu. Dříve byla tato část genetické informace považována za zbytky našeho evolučního vývoje a byla nazývána „odpadní DNA“, novější výzkumy ale poukazují na roli endogenní RT při přestavbě genomu. Stoupá počet důkazů, že tento enzym zodpovídá za mnohé genetické změny a hraje důležitou roli v evolučním vývoji. (Smith and Spadafora, 2005; Vondrejs, 2002)

RT geny jsou ve zvýšeném množství exprimovány v embryích, embryonálních tkáních, v zárodečných buňkách a v nádorech. Naopak potlačeny jsou geny kódující RT aktivitu v terminálně diferenciovaných buňkách. Zvýšenou expresi retrovirových/retrotranspozonových genů pozorujeme v genitáliích, v zárodečných buňkách a v gametách. Endogenní RT aktivitu lze sledovat hlavně v buňkách s vysokým proliferačním potenciálem a může být tedy zahrnuta v regulaci buněčného růstu a diferenciaci buňky. Bylo dokázáno, že inhibice endogenní RT aktivity zastaví vývoj embrya v časných stádiích vývoje a má také vliv na proliferaci a diferenciaci buněk v transformovaných buněčných liniích. (Spadafora, 2004; Smith and Spadafora, 2005)

2.3 Integrace exogenní RNA do spermie

Jak naznačuje předchozí úsek, RT aktivita zaznamenaná například v myších spermích je kódovaná frakcí chromatinu organizovanou v **aktivním nukleohistonovém komplexu** (tzn. vyvázanou z komplexů s protaminem) a obohacenou LINE-1 sekvencemi – nachází se v přístupné části chromatinu. Tento objev byl poměrně neočekávaný a vedl k dalším pokusům, které měly za úkol zjistit, zda může být exogenní RNA substrátem pro endogenní reverzní transkriptázu ve spermii.

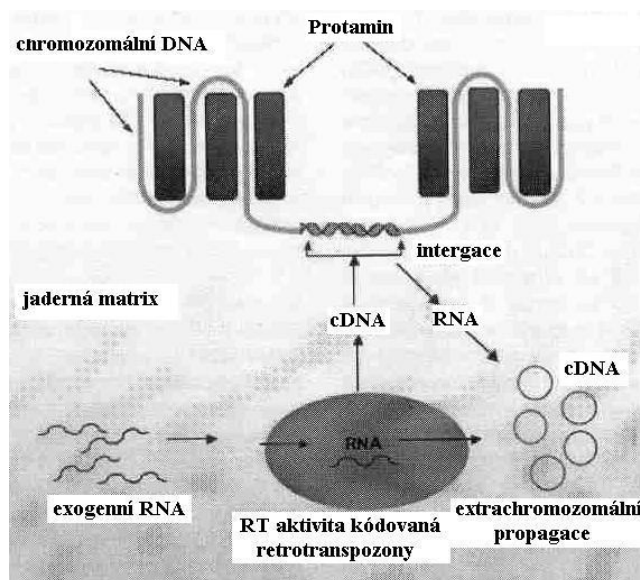
V jednom experimentu byly spermie inkubovány v roztoku volné RNA, označené genem pro β -galaktosidázu. Tento RNA vektor byl internalizován do spermie, v níž poté proběhla reverzní transkripce, dále bylo provedeno umělé oplození oocyty a byla sledována schopnost propagace genu do F_1 generace potomků. Výsledkem byla nejen mozaiková propagace genu v potomstvu - velmi dynamická a plastická propagace genetické informace, ale také exprese proteinu β -galaktosidázy ve tkáních F_0 (rodičů) i F_1 (potomků). (Smith and Spadafora, 2005)

V jiné laboratoři byl obdobný pokus proveden s RNA vektorem obsahujícím retrotranspozonovou kazetu s genem pro zelený fluorescenční protein (EGFP), přerušenu opačně orientovaným intronem. RNA vektor byl internalizován myšími spermii, retrotranskribován a bylo provedeno umělé oplození metodou IVF (viz. kap. 3.3.2). Embryo bylo implantováno do těla matky a vyvinulo se v myš, exprimující EGFP v endotelu cév několika různých orgánů. (Pittoggi and all, 2006)

Spermie tedy dokáže přijmout exogenní RNA a vytvořit transkripčně kompetentní sekvence, které jsou pak dále distribuovány do potomstva. Tento fenomén byl nazván „**sperm mediated reverse gene transfer**“ – reverzní genový přenos pomocí spermie.

Populace cDNA molekul, vzniklých reverzní transkripcí RNA vektoru, vykazuje jisté specifické rysy. Tyto sekvence jsou udržovány v nízkém počtu kopií. Je zde mozaiková propagace v rodičovské linii, sekvence jsou sexuálním rozmnožováním přenášeny na potomky, kde jsou opět mozaikově distribuovány, bez závislosti na mendelovské dědičnosti. Tato zjištění dokazuje, že sekvence přijaté RT aktivitou nejsou integrovány do chromozomu hostitelské buňky a jsou replikovány nezávisle na replikaci hostitelského genomu. Tomuto faktu by také odpovídaly většinou negativní výsledky v pokusech o identifikaci integrovaných reverzně transkribovaných cDNA kopií, například konstrukcí genomových knihoven. (Smith and Spadafora, 2005; Pittoggi et al., 2006)

Dosavadní výsledky ukazují, že retrotranskribované molekuly cDNA jsou většinou udržovány v buňce jako extrachromozomální struktury s autonomní replikací, které se do chromozomu spermie začlení jen velmi zřídka. Možný model průběhu procesu (obr.1):



Obr.1 – Pravděpodobný průběh internalizace exogenní RNA, převzato od Smith and Spadafora (2005) a upraveno

1. molekuly exogenní RNA migrují ve spermii do těsné blízkosti jádra, kde je lokalizována aktivita reverzní transkriptázy
2. reverzní transkripcí jsou generovány molekuly cDNA
3. podle zatím nepotvrzené hypotézy může dojít k rekombinaci malé části cDNA s chromozomální DNA spermie v přístupných místech (nukleohistonové komplexy)
4. molekuly extrachromozomální cDNA s autonomní replikací by tak mohly být podle této hypotézy generovány jak RT aktivitou z cizorodé RNA, tak z RNA vzniklé transkripcí integrovaných sekvencí, podobně jako u virového modelu

(Smith and Spadafora, 2005; Lavitrano et al., 2006; Pittoggi et al., 2006)

2.4 RT aktivita v buňce

Fakt, že extrachromozomální cDNA je udržována v embryu a přenášena poté dále do potomstva, není zcela překvapivý. Extrachromozomální struktury byly už dříve prokázány jako poměrně častý prvek v eukaryotickém jádře. Transgenní sekvence, přenášené v podobě extrachromozomálních struktur do dalších generací, byly laboratorně prokázány u savců, ptáků, ryb a dokonce i u hmyzu, pomocí SMGT a mikroinjekce DNA. (Wang et al., 2001; Lavitrano et al., 2003; Smith and Spadafora, 2005) Původ extrachromozomálních struktur, které objevujeme v eukaryotickém jádře transgenních organismů, je ale většinou nejasný. V závislosti na modelech pokusů s exogenní RNA a RT aktivitou se zdá, že produkt RT aktivity prezentuje **epizomální DNA** – sekvence reverzibilně integrovaná do chromozomu hostitele. (Smith and Spadafora, 2005; Lavitrano et al., 2006)

Objev nevratného zastavení embryogeneze v závislosti na inhibici RT aktivity vede k domněnce, že RT kódovaná retroelementy je nutná v dosud neznámé regulační dráze v časných stádiích vývoje. Zastavení vývoje je doprovázeno značným přeprogramováním

genové exprese. Citlivost k inhibici RT aktivity je ale omezena na stádia od pozdního jednobuněčného po čtyřbuněčné embryo. (Spadafora, 2004; Smith and Spadafora, 2005) Stále více prací představuje retrotranspozony jako regulátory transkripce, interference nebo jako epigenetickou kontrolu buněčných genů s funkcí umlčení některých iRNA dependentních genů v časném vývoji. (Smith and Spadafora, 2005) K těmto funkcím se nyní pravděpodobně přidává ještě genový přenos spermií reverzní cestou, jak bylo popsáno výše.

3. Kvalita spermatu, pomocné metody transgeneze a metody fertilizace

Spermie musí představovat kvalitní přenašeč pro transgenní sekvenci, je důležitá jejich pohyblivost, vitalita a schopnost absorpce exogenní DNA. Na kvalitu odebraného spermatu má vliv roční období, věk zvířete a frekvence odběru. Pohyblivost spermií musí být například u prasat po odběru nejméně 80% a po čistících procedurách nejméně 65%. Pro 90% absorpci a 70% integraci exogenní DNA do spermie je třeba 2-4 hodin inkubace spermií s DNA. (Lavitrano et al., 2006)

Aktuálně se používá několik metod transgeneze spermií, stejně jako existuje více možností následného oplodnění vajíčka transgenní spermií. Jednou možností integrace transgenu do spermie je inkubace spermií s nahou DNA (viz. předchozí odstavce). Lze také využít **elektroporace** pro usnadnění vstupu molekul do buňky. (Lavitrano et al., 2006) Elektroporace spočívá v aplikaci krátkého elektrického pulzu o vysokém napětí, díky němuž se v plazmatické membráně objeví dočasné otvory a DNA může snadněji vstupovat do buňky. (Vondrejs and Strochová, 1997) Zvýšení příjmu cizorodé DNA do spermií ale není příliš výrazné.

Další usnadnění při překonávání bariéry, jakou je plazmatická membrána, představuje využití **liposomů**.

3.1 Liposomy

Liposomy jsou uměle připravené uzavřené váčky tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou a vnitřním izolovaným kompartmentem obsahující vodný roztok. Připravují se např. působením ultrazvuku na vodnou suspensi polárních fosfolipidů, což lze kombinovat s gelovou permeační chromatografií a získat tak liposomy s úzkou distribucí velikostí. Nejčastěji se pro tento účel používá lecithin z vaječného žloutku. (Hampl, 2005) Pokud liposom vzniká ve vodném prostředí, obsahujícím rozpustné složky (soli, bílkoviny), jsou tyto složky uzavřeny do vnitřního prostředí váčku. Stejně tak v prostředí s množstvím volných molekul NK je část těchto molekul při vzniku liposomů do nich uzavřena.

Při inkubaci spermií s liposomy dochází k jejich přijetí ve formě endosomů nebo ke splynutí liposomu s plazmatickou membránou spermie. Při splynutí se do cytoplazmy spermie dostává volná DNA, z endosomů část transgenů DNA také často uniká a dostává se do cytoplazmy. Zde může interagovat s chromozomální DNA, nebo zde zůstat ve formě extrachromozomálních molekul. (Tanswell et al., 1998) Liposomy slouží jako účinná pomůcka k překonání bariéry plazmatické membrány.

3.2 TMGT

Jednou z obtíží SMGT je získávání spermií i oocytů a manipulace s nimi. Tento problém řeší nově vyvinutá metoda transgeneze buněk přímo ve varlatech – TMGT (**testis mediated gene transfer**). Spermie absorbují pomocí injekce do varlat nebo nadvarlat in vivo exogenní DNA nahou nebo zabalenou v liposomech a nic nebrání přirozenému páření živočichů.

První uveřejněné výsledky pocházely z pokusů na myších, kdy byl transgení konstrukt volné DNA vpíchnut injekcí do chámovodu (*vas deferens*) varlat myši. 60 - 70 % izolovaných spermií neslo transgen. Další výsledky ukázaly přenos tohoto transgenů do potomstva v 7,5 % případů. Podobných výsledků bylo dosaženo i použitím transgenických molekul zabalených v liposomech, vpíchnutím do nadvarlete (*epididymis*). (Sato et al., 2002; Smith and Spadafora, 2005) Také elektroporací in vivo došlo k zvýšení integrace transgení sekvence do spermií. Výsledky byly testovány pomocí fluorescenčních barviček Hoechst 33342 a EGFP (zelený fluorescenční protein 4 dny po aplikaci injekce. (Sato et al., 2002)

3.3 Fertilizační techniky

Existuje několik možností oplození oocytu transgení spermií. Při SMGT je využívá umělá inseminace (**AI** – artificial insemination), oplození in vitro (**IVF** – in vitro fertilization), v případě vodních živočichů přirozený způsob fertilizace (**via waterborn**). Pozdější studie pak využily **ICSI** – intracytoplazmatickou injekci spermie přímo do oocytu. (Smith and Spadafora, 2005)

3.3.1 Umělá inseminace (AI)

AI je nejstarší metodou umělého oplození. Je to přenos odebraných spermií do pohlavního ústrojí samice v době ovulace buďto přirozené, nebo vyvolané podáním hormonů. Zde pak dojde k oplození přítomného oocytu. Spermie se odebírají chirurgickým zákrokem z varlete či nadvarlete. (<http://www.emedicine.com>)

3.3.2 Oplození in vitro (IVF)

Při IVF je nutné pomocí hormonálních preparátů navodit zrání většího počtu folikulů ve vaječnicích. Těsně před ovulací se z nich operativním zákrokem odeberou vajíčka. Ta jsou umístěna do Petriho misky s kultivačním médiem a následně oplozována přidáním spermií promytých od zbytku ejakulátu. Následuje inkubace 12 až 18 hodin v podmínkách podobných tělu živočicha. Jestliže spermie pronikne do vajíčka, došlo k oplození in vitro. Embryo musí být dále kultivováno v médiu a u vyšších savců následuje přenos embrya do dělohy (ET – embryo transfer), aby se embryo mohlo správně vyvinout. Např. u člověka k tomu dochází po 2 až 3 dnech. (<http://www.emedicine.com>)

3.3.3 TransgenICSI

Při ICSI je spermie vpravena mikroinjekcí přímo do oocyty. Výhodou je potřeba malého počtu spermií. U pozdějších studií SMGT byla tato metoda použita pro spermie obsahující transgen do oocyty, proces je nazýván nazván **transgenICSI**. Spermie po inkubaci se samotnou exogenní DNA či s liposomy obsahujícími exogenní DNA jsou injekčně vpraveny do oocyty, čímž je zajištěna fertilizace. TransgenICSI byla využita v pokusech s opičími a prasečími embryi s úspěšností asi 35% transgenních embryí. (<http://www.emedicine.com>)

TransgenICSI byla testována i u makaků s použitím genu pro zelený fluorescenční protein (GFP) jako transgenu. Pro značení transgenní sekvence byl použit rhodamin. Při provedení IVF byl rhodaminový signál ztracen na povrchu oocyty, ale při transgenICSI se transgenní sekvence dostala dovnitř oocyty. Výsledkem byla 3 živá mláďata ze 7 provedených transgenICSI. (Chan et al., 2000) Transgen v mláďatech sice nebyl detekován, ale již úspěšné provedení metody u primátů poukazuje na perspektivu budoucího využití v přípravě transgenních živočichů.

3.4 LB-SMGT

Jako poslední novinka v SMGT byla představena metoda využívající označený linker – LB-SMGT (**termed linker based SMGT**). Zde je využívána **monoklonální protilátka**, specifická k povrchu spermie - **mAb C**, v komplexu s transgenní DNA. DNA po setkání s protilátkou mAb C vytváří iontovou vazbu, což bylo prokázáno pomocí gelové elektroforézy. Vzhledem ke schopnosti specifické vazby k povrchu spermie různých živočišných druhů je mAb C protilátka vhodná pro udržení transgenní sekvence na povrchu spermie. Vazba byla prokázána cytometrickou analýzou, histogramem s FITC fluorescentním signálem. (Chang et al., 2002; Smith and Spadafora, 2005) Metoda byla testována u prasete, myši, kura

domácího, skotu, hus, ovcí i u člověka. U ovce a husy se mAb C vážala na 2 ze 3 populací spermií. (Chang et al., 2002)

Po oplození byla transgenní DNA detekována v integrované formě v genomu prasečího i myšího embrya, přičemž účinnost přenosu do F₁ generace byla u prasete 37.5 % a u myši 33 %. Integrace transgenní sekvence do genomu embrya byla zaznamenána také u ryb. Přenos transgenní informace do F₂ generace byl prokázán pouze u prasete. (Chang et al., 2002; Smith and Spadafora, 2005) Výsledky při použití LB-SMGT jsou tedy přesvědčivé a tato metoda je velmi slibná pro zlepšení produkce transgenních živočichů s vysokými výtěžky.

4. Dosavadní aplikace SMGT a výsledky

Od roku 1989 do roku 2004 vyšlo více než 30 nezávislých studií zabývajících se přípravou transgenních živočichů metodou SMGT a potvrzujících její funkčnost. Bohužel jen málo z nich přesvědčivě prokázalo přenos transgenní informace do dalších generací. Vzácnost přenosu lze vysvětlit již výše zmíněným mechanismem interakce spermie a DNA, kdy jsou transgeny pouze epizomální DNA, většinou ztracenou pro další generace.

Některé laboratoře však prokázaly šíření transgenů do dalších generací, což nasvědčuje existenci dosud neznámých faktorů, které v některých experimentech navodily integraci transgenů do chromozomální DNA. Nejjasnějších výsledků byla zatím dosaženo pomocí transgenICSI a pomocných metod, jako je použití liposomů. Nejméně takových výsledků bylo pak zaznamenáno při použití samotné interakce spermie – DNA. Možné vysvětlení tkví v kritické roli plazmatické membrány spermie. Pokud je membrána nedotčená, jako tomu obvykle je u přímé interakce spermie – DNA, vazba exogenních molekul spouští obranné mechanismy vedoucí pouze ke vzniku extrachromozomálních molekul cDNA. Oproti tomu překonání plazmatické membrány, například použitím liposomů, usnadní interakci exogenní DNA s chromatinem a zvyšuje možnost rekombinace. Začlenění transgenní sekvence do genomu může proběhnout již ve spermii, nebo až později po fertilizaci, kdy je spermatické jádro konvertováno v projádru a připravováno ke spojení s projádrem oocyty. (Smith and Spadafora, 2005)

Obranné mechanismy mohou existovat hlavně na povrchu spermatické buňky a pokud DNA interaguje s povrchem spermie, produkt bude pouze epizomální. Tato hypotéza však vyžaduje další výzkumy a čeká na své ověření.

4.1 Výsledky experimentů

Metoda SMGT může být použita u mnoho druhů živočichů. Experimentálně to bylo prokázáno u savců, ptáků, obojživelníků, ryb i hmyzu. SMGT demonstruje velkou přizpůsobivost různým živočišným druhům právě díky různým metodám, jež lze použít. Zde je přehled některých výsledků, kterých bylo dosaženo: (Smith and Spadafora, 2005; Webster et al., 2005; Lavitrano et al., 2006)

SAVCI

Rod/druh	Metoda	Fertilizační metoda	Konečný výsledek
Myš (<i>Mus</i>)	DNA inkubace	IVF	transgenní živočichové a jejich potomci
	liposomy		
	TMGT	-	transgenní spermie
Krysa (<i>Rattus</i>)	TMGT	-	transgenní spermie
	liposomy	AI	transgenní živočichové
Králík	DNA inkubace	AI	embrya
	liposomy	IVF	transgenní živočichové a jejich potomci
Prase domácí (<i>Sus scrofa</i>)	DNA inkubace	IVF, AI	transgenní živočichové
	transgenICSI	ICSI	embrya
	značený linker	AI/IVF	transgenní živočichové
Tur domácí (<i>Bos primigenius</i>)	DNA inkubace	IVF	transgenní živočichové
	elektroporace	IVF	embrya
Makak rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	TransgenICSI	ICSI	embrya
Člověk (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	DNA inkubace	IVF	embrya

PTÁCI

Rod/druh	Metoda	Fertilizační metoda	Konečný výsledek
Kur domácí (<i>Gallus gallus</i>)	liposomy	AI	transgenní živočichové
	DNA inkubace	-	transgenní spermie

OBOJŽIVELNÍCI A RYBY

Rod/druh	Metoda	Fertilizační metoda	Konečný výsledek
Losos (<i>Salmo</i>)	elektroporace	IVF	transgenní živočichové
Danio pruhované (<i>Danio rerio</i>)	elektroporace	IVF	transgenní živočichové
	DNA inkubace		
	DNA inkubace	přirozené vnější oplodnění	transgenní živočichové a jejich potomci
Drápatka vodní (<i>Xenopus laevis</i>)	DNA inkubace	IVF	embrya
		přirozené vnější oplodnění	transgenní živočichové a jejich potomci
Kapr obecný (<i>Cyprinus Carpio</i>)	DNA inkubace	přirozené vnější oplodnění	transgenní živočichové
	elektroporace		
Parmička (<i>Labeo rohita</i>)	elektroporace	přirozené vnější oplodnění	transgenní živočichové

HMYZ

Rod/druh	Metoda	Fertilizační metoda	Konečný výsledek
Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	DNA inkubace	AI	transgenní živočichové a jejich potomci

Tab 1 – příklady úspěšně provedené SMGT

Je dobré upřesnit, že kladné výsledky u vodních živočichů se objevují častěji než u ostatních, SMGT je použitelná hlavně pro mořské živočichy. Přes nízkou frekvenci stabilní integrace do genomu může být frekvence fenotypové modifikace a celkové transgeneze (což zahrnuje i epizomální DNA) v některých experimentech až 80 %. (Smith and Spadafora, 2005) SMGT se však zatím nestala ustálenou metodou přípravy geneticky modifikovaných živočichů, v současnosti je stále obtížné využívat ji jako rutinní metodu transgeneze.

5. SMGT a somatická genová terapie

Somatická genová terapie je experimentální léčba, při níž jsou do somatických buněk v těle vneseny funkční alely poškozeného genu za účelem modifikace nesprávné funkce buňky. Mezi kandidátní onemocnění pro genovou terapii patří cystická fibróza,

kardiovaskulární onemocnění, infekční onemocnění jako např. AIDS a nádorová onemocnění. Realizace genové terapie má mnohá úskalí. Jedním z nich je nutnost vpravit terapeutické geny do organismu tak, aby nedošlo k jeho poškození. Je také třeba převzít kontrolu nad specifickými typy buněk, do kterých terapeutický gen vstupuje. Například působí-li porucha na funkci jater, terapeutický gen se potřebuje dostat právě k jaterním buňkám. Dále je třeba kontrolovat míru aktivity potřebnou ke korekci poruchy, nový gen musí v buňce fungovat normálně. (Batshaw, 1997; Doškář, 2004)

Při výzkumech možnosti použití SMGT v genové terapii somatických buněk se vychází z faktu, že transgenní informace v hostitelských buňkách je s použitím této metody ve většině případů epizomální. Transgenní sekvence neintegrováné do chromozomu jsou propagovány jako extrachromozomální DNA a šířeny do potomstva. Teoreticky by se tento fakt dal využít pro somatickou genovou terapii embrya či ranného plodu. To by oproti léčbě v pozdějších stádiích mělo výrazné výhody – možnost vyléčit celou tkáň nebo orgán pomocí malého množství terapeutického genu nebo vhodných klonovaných buněk (použití tohoto typu buněk je však také ještě otázkou budoucnosti) a vyvarování se imunitní odpovědi proti transgennímu vektoru, což u pozdějšího stádia vývoje představuje značnou překážku léčby. (Batshaw, 1997; Doškář, 2004; Smith and Spadafora, 2005)

Mnohé genové poruchy zabíjejí nebo velmi ztěžují životní podmínky víc a víc pacientům již v prvních měsících života. Existuje zde také nepřímý vztah mezi věkem pacienta a účinností genové terapie. Somatická genová terapie pomocí SMGT by poskytla možnost dřívější léčby a konečného řešení nevratného genového poškození u pacienta.

6. Asistovaná reprodukce

Tradiční úvahy okolo SMGT u živočichů, člověka nevyjímaje, se ubírají směrem, jak zajistit, aby spermie přijala transgenní sekvenci, integrovala ji do svého genomu a tato informace se pak šířila dál. Je ale dobré se na věc podívat z druhé strany – spermie, zbavená přirozených bariér, může pojmout exogenní sekvenci a začlenit ji do svého genomu. Při asistované reprodukci u člověka se používají samotné spermie, promyté od zbytku ejakulátu a tím také zbavené ochrany, kterou poskytuje inhibiční faktor IF-1. Může to znamenat potenciální risk, že tyto spermie mohou absorbovat exogenní DNA, která se vyskytne v jejich blízkosti a přenést ji při fertilizaci do embrya? Při asistované reprodukci, hlavně u člověka, by to byl jev velice nežádoucí. Navíc, vzhledem k RT aktivitě a reverzní transkripci hrozí zřejmě stejné nebezpečí i u exogenních RNA molekul, kdy může vznikat extrachromozomální genetická informace ve formě cDNA molekul, produkující odpovídající fenotyp a šířící se také dále v potomstvu. (Smith and Spadafora, 2005; <http://www.emedicine.com>)

Další nebezpečí se může skrývat v použití spermií HIV pozitivních mužů při asistované reprodukci. Pokud pár, kde muž je HIV pozitivní a žena negativní, chce mít dítě, je pro ně v současné době alternativou asistovaná reprodukce. V takovém případě muž poskytne ejakulát, spermie jsou důkladně promyty od zbytku ejakulátu, aby došlo k eliminaci virových partikulí HIV. V Evropě se obvykle provádí až 2000 cyklů promývání pro maximální zabezpečení, aby žena ani dítě nepřišly do styku s HIV virem. Předpokládá se, že virové partikule jsou asociovány s lymfocyty a promytím spermií od ostatních buněčných komponent dojde k jejich bezpečnému odstranění, takže spermie může být bezpečně použita k umělému oplodnění nejčastěji metodou IVF bez nebezpečí přenosu viru HIV. (Gilling-Smith, 2000; Smith and Spadafora, 2005)

Experimenty ale naznačují, že v některých případech by mohla spermie, zbavená své přirozené ochrany IF-1, absorbovat dokonce i velké virové partikule, jako například HIV nebo herpes virus, a přenést je při fertilizaci do embrya. Spermie může být tedy vektorem nejen pro malé nukleové kyseliny, ale i pro větší struktury, jako jsou virové partikule. Vzhledem k RT aktivitě ve spermii může být RNA retroviru reverzně transkribována do cDNA molekul a přenesena do embrya. Spermie může fungovat i jako **HIV-transgen**, což znamená riziko při použité spermatu HIV pozitivních dárců. (Gilling-Smith, 2000; Smith and Spadafora, 2005) SMGT tedy ukazuje možná úskalí v oblasti, která byla donedávna pokládána za bezpečnou.

7. Možnosti využití transgenních živočichů

SMGT je pouze jednou ze slibných experimentálních metod přípravy transgenních živočichů. Na co takové živočichy potřebujeme? Potenciál pro jejich uplatnění je obrovský. Změna vlastností hospodářských zvířat může vést ke zvýšení a zkvalitnění produkce živočišných potravin ve vyspělých zemích. Například produkce mléka dospěla v mnoha zemích do stádia, kdy producenti mají problémy s odbytem. To vytváří enormní ekonomický tlak na inovaci. Jednou z takových inovací může být zavedení zcela nových komodit na trh s mlékem a mléčnými výrobky. Významný podíl na těchto nových komoditách mohou mít produkty transgenních zvířat. Na druhé straně ale stoupá spotřeba potravin živočišného původu v rozvojových zemích, které tradičně zajišťovaly výživu obyvatelstva rostlinnými produkty. Roste tedy spotřeba rostlinných produktů nejen pro potřeby rostoucí lidské populace, ale i pro výkrm hospodářských zvířat a drůbeže. Tato situace opět vyvolává tlak na zefektivnění chovu hospodářských zvířat (konverze krmiv, odolnost vůči chorobám, zintenzivnění růstu). Neméně důležité možnosti nabízí produkce transgenních zvířat pro vědu a humánní medicínu. (Jaroslav, 2003; Collares et al., 2005)

Z těchto potřeb vyplývá zaměření na intenzitu růstu, odolnost proti chorobám, změnu kvality živočišných produktů, produkci transgenních zvířat pro xenotransplantace, produkci léčiv pro humánní medicínu a produkci nových surovin.

7.1 Odolnost proti chorobám

Odolnost vůči chorobám může významně ovlivnit efektivitu živočišné produkce. Zvláště zřejmé to je u chorob, které mohou mít charakter panzoozie (slintavka, kulhavka, prasečí mor) nebo jsou přenosné na člověka. Pomocí metody SMGT je možný přenos genů navozujících odolnost k chorobám a nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Příkladem takového genu je myší gen **Mx1**, jehož proteinový produkt se akumuluje v jádře a na úrovni primární transkripce zabraňuje replikaci viru chřipky, který jsou významným patogenem prasat nebo drůbeže. Poznání dalších podobných genů je v počátcích. (Stranden et al., 1993; Jaroslav, 2003; Collares et al., 2005)

7.2 Xenotransplantace

V současné době je limitujícím faktorem pro transplantace lidských orgánů nedostatek vhodných orgánů. Možnost transplantací zvířecích tkání a orgánů (xenotransplantace) by proto mohla zachránit život, zdraví a plnohodnotný život mnoha lidem. Člověk má ale rozdílnou stavbu orgánů danou například biopedním pohybem, který vede k jinému zatížení orgánů. Největší problém navíc spočívá v tom, že lidský imunitní systém zvířecí orgány odmítá. Obecně platí, že úspěšnost xenotransplantace je nepřímo úměrná fylogenetické vzdálenosti mezi biologickým druhem příjemce a druhem, k němuž patří dárce orgánu. Orgány příslušníků dvou různých řádů (v úvahu pro člověka přichází díky podobné morfologii a uspořádání orgánů hlavně prase) jsou po transplantaci odmítnuty během několika minut tzv. hyperakutní rejekcí. Na výsledném stavu se podílejí jak imunologické tak i neimunologické faktory. V organismu příjemce (člověka a dalších primátů) se totiž přirozeně vyskytují protilátky proti glykoproteinům a glykolipidům, především proti jejich alfa-1,3-galaktosylovým skupinám, a tyto protilátky jsou zapojeny do reakce proti xenotransplantátu. Výsledným efektem je aktivace komplementu a následné poškození membrán buněk endotelu v cévách, které zásobují krví transplantovaný orgán (Onions et al., 2000; Jaroslav, 2003) Tuto ultrarychlou reakci odhojení nelze zatím zvládnout potlačením funkce imunitního systému. Přítomnost lidských povrchových antigenů na xenotransplantátu by ale dokázala reakci významně redukovat. (Jaroslav, 2003)

Za slibné jsou považovány především **hDAF** (human decay accelerating factor), gen pro DAF protein; **hMCP** (tzv. human membrane cofactor protein), gen pro MCP protein; a lidský gen pro CD59. (Lavitrano et al., 2002; Jaroslav, 2003) Prasečí srdce nesoucí na

povrchu buněk antigen DAF vydrží 4hodinový průtok lidské krve bez zjevného poškození. Získání hDAF transgenních prasat bylo testováno s úspěšností 57% transgenních prasat při použití SMGT, což je výrazně vyšší výtěžek než při použití metody mikroinjekce. Makrofágy hDAF prasat přitom byly rezistentní k působení lidských protilátek a komplementu, na rozdíl od makrofágů netransgenních prasat, které byly lyzovány do 30 minut. (Lavitrano et al., 2002)

Významnou překážkou pro testy těchto orgánů ale představuje objev prasečích endogenních retrovirů (PERV), které by mohly za určitých podmínek infikovat lidské buňky. Byly analyzovány lidské buňky endotelu, vaskulární fibroblasty, buňky mezangia, hematopoetické kmenové buňky a buňky kostní dřeně. Výsledkem analýzy bylo, že PERV mohou být produktivní hlavně v buňkách endotelu, vaskulárních fibroblastech a v buňkách mezangia. (Martin et al., 2005)

7.3 Produkce léčiv

Humánní medicína zná několik desítek dědičných chorob vznikajících narušením genu, který pak produkuje defektní protein (např. degenerace Langerhansových ostrůvků slinivky, které by produkovaly insulin, což vede ke vzniku cukrovky). Léčba těchto chorob je možná podáváním plnohodnotného proteinu náhradou za chybějící nebo poškozený. Zvířecí proteiny mohou mít sice požadovaný účinek, ale mohou vyvolávat u některých jedinců alergické reakce. Lidské bílkoviny získávané například z krve dárců jsou velice drahé a navíc tu je i riziko přenosu některých chorob (před zavedením testů na virus HIV bylo mnoho hemofiliků nakaženo kontaminovanými preparáty, před poznáním prionových chorob došlo k přenosu Creutzfeldt Jakobovy choroby při léčbě poruch růstu růstovým hormonem získávaným z hypofýz zemřelých lidí).

Transgenní hospodářská zvířata mohou produkovat lidské proteiny mnohem levněji. Strukturní gen pro žádaný protein může být spojen s regulační sekvencí genů kódujících přirozené proteiny zvířete, například mléčnou bílkovinu. Lidský protein je pak uvolňován do mléka transgenního savce a odtud lze bílkoviny celkem snadno získat. Posttranslační modifikace, jako sestřih a glykosylace, nejsou vždy zcela bezchybné, průběh závisí i na typu tkáně. Produkce bílkoviny je ale řádově tisíckrát levnější než v případě produkce pomocí geneticky modifikovaných prokaryotních nebo eukaryotních buněk. Pro tyto účely je vhodný nejen skot, ale také ovce a prasata. V současnosti je tento způsob využití transgenních hospodářských zvířat zřejmě nejdynamičtější směr v transgenezi hospodářských zvířat. (Houdebine, 1995; Colman, 1996; Jaroslav, 2003; Collares et al., 2005)

7.4 Nové biomateriály

Na tomto poli se otevírá netušený prostor pro použití transgenních živočichů. Příkladem takové výroby je produkce materiálu BioSteel transgenními kozami. Do genomu těchto zvířat byl zabudován gen pro bílkovinu pavoučího vlákna. Strukturální gen pro bílkovinu pavoučího vlákna byl spojen s regulační sekvencí pro kozí mléčnou bílkovinu a tím byla zajištěna exprese genu v mléčné žláze koz a jeho vylučování v mléce. Zde se bílkovina nachází v rozpuštěném stavu a k jejímu vysrážení dojde snížením pH. Z takto získané bílkoviny je spřádáno vlákno využitelné v mnoha odvětvích lidské činnosti. Materiál v sobě spojuje nízkou hmotnost s mechanickou odolností. Je asi třikrát odolnější než kevlarové vlákno používané na výrobu neprůstřelných vest. Předpokládá se jeho využití pro vojenské účely nebo jako konstrukčního materiálu v leteckém průmyslu. Využití by měl BioSteel nalézt i v medicíně, kde by byl využíván jako materiál pro chirurgické šití při operacích oka nebo mozku. Kromě velké pevnosti je jeho obrovskou výhodou to, že jeho přítomnost dobře snáší lidský organismus a vlákno je po určité době beze zbytku vstřebáno. (Da Silva et al., 2003)

8. Závěr

Metoda transgeneze pomocí spermiového přenosu je zkoumána od roku 1989 jako experimentální metoda produkce transgenních živočichů. Od té doby byla částečně rozluštěna její molekulární podstata a průběh. Bylo objeveno několik možných modifikací, zjednodušení a zefektivnění této metody, jako je například použití liposomů, TMGT, použití monoklonální protilátky (LB-SMGT) nebo transgenICSI. SMGT je velmi slibná metoda pro budoucí produkci transgenních živočichů jak za účelem humánní medicíny nebo průmyslu, tak za účelem vědeckých výzkumů. Přesto zde však stále je několik nevyřešených otázek.

Za stěžejní považují nalezení odpovědí především na tyto otázky:

- Jaké jsou kritické faktory, při kterých selhávají přirozené bariéry obrany spermií proti nežádoucí mutagenezi přijetím molekul exogenních nukleových kyselin?
- Jak těchto kritických faktorů dosáhnout a cíleně využít a jak jim naopak spolehlivě zamezit?
- Za jakých podmínek dojde skutečně k rekombinaci exogenní DNA do chromatinu spermií?
- Jak spolehlivě zajistit rozšíření transgenu do potomstva?
- Jak spolehlivě regulovat fenotypový projev transgenu?

Na takové a podobné otázky by měl další výzkum hledat odpovědi. SMGT se stane použitelnou metodou až tehdy, bude-li dobře prozkoumána a objasněna, bude-li

předvídatelná a spolehlivá. Zdá se, že lze dosáhnout vysokých výtěžků transgenních živočichů s poměrně malými náklady, zatím však díky neznalosti některých procesů a podmínek narážíme místy na naprostý neúspěch. Věřím však, že další výzkum přinese nové informace, které budou přínosem nejen pro reálné použití SMGT v praxi, ale pro molekulární a vývojovou biologii jako takovou.

Seznam použité literatury

1. **Smith K, Spadafora C.** - Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*. 2005 May; 27(5):551-62
2. **Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A.** - Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev*. 2006; 18(1-2):19-23
3. **Spadafora C.** - Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*. 1998 Nov; 20(11):955-64.
4. **Spadafora C.** - Endogenous reverse transcriptase: a mediator of cell proliferation and differentiation. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 105(2-4):346-50.
5. **Pittoggi C, Beraldi R, Sciamanna I, Barberi L, Giordano R, Magnano AR, Torosantucci L, Pescarmona E, Spadafora C.** - Generation of biologically active retrogenes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. *Mol Reprod Dev*. 2006 Oct; 73(10):1239-46.
6. **Chang K, Qian J, Jiang M, Liu YH, Wu MC, Chen CD, Lai CK, Lo HL, Hsiao CT, Brown L, Bolen J Jr, Huang HI, Ho PY, Shih PY, Yao CW, Lin WJ, Chen CH, Wu FY, Lin YJ, Xu J, Wang K.** - Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol*. 2002 Apr; 19;2:5.
7. **Lavitrano M, Forni M, Bacci ML, Di Stefano C, Varzi V, Wang H, Seren E.** - Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev*. 2003 Mar; 64(3):284-91.
8. **Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalpra L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc Kenzie IF, Lavitrano M.** - Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*. 2005 Sep; 72(1):68-76.
9. **Wang H. J., Lin A. X., Zhang Z. C., Chen Y. F.** - Expression of porcine growth hormone gene in transgenic rabbits as reported by green fluorescent protein. *Agricult. and Biol. Sci*. 2001 Feb; 101-110
10. **Tanswell AK, Staub O, Iles R, Belcastro R, Cabacungan J, Sedlackova L, Steer B, Wen Y, Hu J, O'Brodovich H.** - Liposome-mediated transfection of fetal lung epithelial cells: DNA degradation and enhanced superoxide toxicity. *Am J Physiol*. 1998 Sep; 275(3 Pt 1):L452-60.
11. **Sato M, Ishikawa A, Kimura M.** - Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible in vivo gene transfer system via epididymal spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 2002 Jan; 61(1):49-56.
12. **Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G.** - TransgeniCSI reviewed: foreign DNA transmission by intracytoplasmic

- sperm injection in rhesus monkey. *Mol Reprod Dev.* 2000 Jun; 56(2 Suppl):325-8. Review.
13. **Gilling-Smith C.** - Assisted Reproduction in HIV - Discordant Couples. *AIDS Read* 2000; 10(10):581-587
 14. **Stranden AM, Staeheli P, Pavlovic J.** - Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology.* 1993 Dec; 197(2):642-51.
 15. **Lavitrano M, Bacci ML, 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, Rossi G.** - Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Oct; 99(22):14230-5. Epub 2002 Oct.
 16. **Onions D, Cooper DKC, Alexander TJL, Brown C, Claassen E, Foweraker JE, Harris DL, Mahy BWJ, Minor PD, Osterhaus ADME, Pastoret P-P, Yamanouchi K.** - An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2000 May; Volume 7, Number 2, 143-155(13)
 17. **Martin U, Winkler ME, Id M, Radeke H, Arseniev L, Takeuchi Y, Simon AR, Patience C, Haverich A, Steinhoff G.** - Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation.* 2000 May; 7(2):138-42.
 18. **Collares T, Bongalhardo DC, Deschamps JC, Moreira HLM.** – Transgenic animals: The melding of molecular biology and animal reproduction. *Anim. Reprod.* 2005 Jan; 2(1):11-27
 19. **Houdebine LM.** - The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reprod Nutr Dev.* 1995; 35(6):609-17.
 20. **Colman A.** - Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. *Am J Clin Nutr.* 1996 Apr; 63(4):639S-45S.
 21. **Da Silva LB, Sampaio RS, Da Silveira ML.** - Biosteel: a self-sustainable solution to produce seamless steel tubes directly from planted biomass. 4th Ironmaking Conference 2003 Nov; 115-122
 22. **Batshaw ML.** - Children with Disabilities: A Medical Primer. Hardcover. 1997 Sep
 23. **Vondrejs V, Strochová Z** - Genové inženýrství I. Katedra genetiky a mikrobiologie PŘF UK 1997
 24. **Vondrejs V.** - Genové inženýrství III. Katedra genetiky a mikrobiologie PŘF UK 2002
 25. **Doškář J.** - Nové možnosti genové inženýrství. Katedra genetiky a molekulární biologie PŘF UM 2004
 26. **Jaroslav P.** - Transgenní zvířata. Výzkumný ústav živočišné výroby 2003

27. **Jaroslav P.** - Xenotransplantace - zvířecí orgány lidem. Výzkumný ústav živočišné výroby 2003
28. **Hámpel F.** - Biomimetika – Organizované vrstvy, liposomy. Ústav organické chemie VŠCHT Praha 2005
29. <http://www.emedicine.com/>