

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΟΝΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΜΕ
ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΥΓΕΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΚΑΙ
ΕΜΒΡΥΑ ΑΡΧΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ**

ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ : ΠΡΑΠΑ ΕΡΜΙΟΝΗ-ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2011

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: κ. Καθηγητής Βαμβακόπουλος Νικόλαος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

κ. Καθηγητής Βαμβακόπουλος Νικόλαος

κ. Καθηγητής Ιωάννης Μεσσήνης

κ. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τσέζου Ασπασία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1 Γενικά.....	4
1.2 Γονιδιακή θεραπεία.....	4
1.2.1 Σωματική και γαμετική γονιδιακή θεραπεία.....	5
2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΥΓΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΑ ΑΡΧΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ.....	6
2.1 Συστήματα μεταφοράς γονιδίου.....	6
2.1.1 Ικός.....	7
2.1.2 Μη-ικός.....	7
2.1.3 Φυσικός.....	7
2.2 Τεχνικές μετασχηματισμού της γαμετικής σειράς και των εμβρύων αρχικού σταδίου.....	8
2.2.1 Μεταφορά γονιδίου σε έμβρυα αρχικού σταδίου με ανασυνδυασμένους ρετροϊούς και λεντοϊούς.....	9
2.2.2 Μικροέγχυση DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου.....	13
2.2.3 Γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου σε βλαστικά κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου.....	16
2.2.4 Μεταφορά γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων (sperm-mediated gene transfe).....	17
2.2.4.1 Εισαγωγή εξωγενούς DNA στα σπερματοζωάρια.....	17
2.2.4.2 Μηχανισμός πρόσληψης εξωγενούς DNA από τα σπερματοζωάρια.....	19
2.2.4.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων.....	21
3. Συζήτηση.....	27
4. Βιβλιογραφία.....	29

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα κληρονομικά χαρακτηριστικά κάθε ζωντανού οργανισμού καθορίζονται από το γονιδίωμα, το σύνολο δηλαδή του γενετικού του υλικού. Δομικά το γονιδίωμα αποτελείται από διάφορες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, που ονομάζονται γονίδια. Κάθε γονίδιο αποτελείται από συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, καταλαμβάνει συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα και κωδικοποιεί μέσω πολύπλοκων διαδικασιών τη παραγωγή συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον κατάλληλο τόπο και χρόνο [1].

Αλλαγές της αλληλουχίας των γονιδίων σε επίπεδο βάσεων, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μεταλλάξεων. Μεταλλάξεις, που επηρεάζουν τη δομή των πρωτεϊνών και αλλοιώνουν τη φυσιολογική τους λειτουργία, μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση γενετικών διαταραχών στους οργανισμούς που τις φέρουν [human genome project information].

Με την ολοκλήρωση του προγράμματος χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος σε συνδυασμό με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA, δημιουργήθηκε το νέο ελπιδοφόρο πεδίο της γονιδιακής θεραπείας γενετικών νοσημάτων σε επίπεδο γονιδίου (Εικόνα 1) [2,3,4,5, 6].



Εικόνα 1. Προόδοι προς την πορεία της γονιδιακής θεραπείας.

1.2 Γονιδιακή θεραπεία

Ο όρος γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού (DNA ή RNA) με σκοπό την διόρθωση φαινοτυπικών ή γονοτυπικών ανωμαλιών ή την εισαγωγή νέων χαρακτηριστικών και λειτουργιών στους οργανισμούς [7, 6]. Οι οργανισμοί που προκύπτουν ονομάζονται διαγονιδιακοί,

όρος που εισήγαγαν οι Gordon και Ruddle το 1981 για να χαρακτηρίσουν τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που παρήχθησαν μετά από επιτυχή μεταφορά ξένου DNA σε έμβρυα αρχικού σταδίου [8]. Επομένως, η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα εργαλείο γενετικής τροποποίησης [7] με δυνατότητα να εξυπηρετεί τόσο θεραπευτικούς όσο και ερευνητικούς σκοπούς [9,10].

Οι βασικές προϋποθέσεις για την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας σε έναν οργανισμό είναι [11]:

- Το μεταφερόμενο γονίδιο να είναι γνωστό και διαθέσιμο.
- Η ύπαρξη κατάλληλου συστήματος-φορέα γονιδιακής μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου μέσα στο σώμα του δέκτη με
 - δυνατότητα ενσωμάτωσης μέγιστου μεγέθους γονιδίου, και
 - υψηλή ικανότητα ειδικής και μόνιμης ενσωμάτωσης αυτού στο DNA του δέκτη.
- Η ύπαρξη σωστού πρωτοκόλλου θεραπείας γονιδίου το οποίο θα έχει τον ελάχιστο κίνδυνο πρόκλησης βλαβών στο DNA του δέκτη και θα επιτρέπει την ακριβή και ελεγχόμενη έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου.
- Τα κύτταρα στόχοι ή ο ιστός στόχος να είναι προσιτά στη μέθοδο μεταφοράς του γονιδίου.
- Χαμηλό κόστος [12].

Η γονιδιακή θεραπεία διακρίνεται σε σωματική, δηλ. θεραπεία διπλοειδών σωματικών κυττάρων και γαμετική, δηλ. θεραπεία απλοειδών γαμετών.

1.2.1 Σωματική και γαμετική γονιδιακή θεραπεία

Στη σωματική γονιδιακή θεραπεία, η γενετική τροποποίηση περιορίζεται αποκλειστικά στα σωματικά κύτταρα, χωρίς καμία επίδραση στους γαμέτες.

Στη γαμετική γονιδιακή θεραπεία, το θεραπευτικά τροποποιημένο γονίδιο εισάγεται σε όλα ή σε μία κατηγορία κυττάρων του σώματος συμπεριλαμβανομένων και των γαμετικών κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων των ωοθηκών ή των όρχεων που δίνουν γένεση στα ωάρια ή στα σπερματοζώρια αντίστοιχα. Εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου μπορεί να γίνει και απευθείας σε ώριμα ωάρια και σπερματοζώρια πριν γονιμοποιηθούν με τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF). Το αποτέλεσμα είναι ότι το τροποποιημένο γονίδιο μπορεί να μεταβιβαστεί και στις επόμενες γενιές.

Μέχρι σήμερα, η έρευνα στο πεδίο της γονιδιακής θεραπείας είχε επικεντρωθεί σχεδόν αποκλειστικά στο μετασηματισμό σωματικών κυττάρων [7] με σκοπό τη θεραπεία νοσημάτων όπως η ανοσοανεπάρκεια της ADA (ανεπάρκεια του ενζύμου απαμινάση της αδενοσίνης) [13], της X-φυλοσύνδετης σοβαρής ανοσοανεπάρκειας (SCID) [14], της κυστικής ίνωσης [15] και της β-Μεσογειακής

αναιμίας. Σε αντίθεση, η στοχευμένη έρευνα για το μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια. Οι μελέτες που δημοσιεύθηκαν αφορούν αποκλειστικά ζωικά μοντέλα, με επίφαση στον ποντικό [16,17,10].

Η γονιδιακή θεραπεία γαμετών υπολείπεται επειδή: α) η διαδικασία περιλαμβάνει πολλά στάδια τα οποία είναι ελάχιστα κατανοητά και οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν, β) θα ανοίξει το δρόμο για το γενετικό μετασχηματισμό των χαρακτηριστικών του ανθρώπου με προφανείς κοινωνικές και ηθικές επιπτώσεις, γ) είναι ακριβή, δ) είναι δύσκολη η ενσωμάτωση του εισαγόμενου γονιδίου στην κατάλληλη θέση του γονιδιώματος με αποτέλεσμα η έκφραση αυτού να γίνει στα κατάλληλα κύτταρα, ιστούς ή όργανα για να λειτουργήσει φυσιολογικά στον δέκτη και τους απογόνους του και στ) έχει όφελος μόνο για τους απογόνους και όχι για τον ίδιο τον πάσχοντα [7]. Έχει όμως και σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως: α) η δυνατότητα απόκτησης υγιών απογόνων από γονείς φορείς μιας κληρονομικής γενετικής ασθένειας. Με την τεχνική αυτή μπορούμε να έχουμε από το μηδέν την δημιουργία απογόνων που δε θα πάσχουν από την εκάστοτε κληρονομήσιμη γενετική ασθένεια, αποφεύγοντας το μεταγενέστερο στάδιο της επιλογής υγιών εμβρύων μέσω του προεμφυτευτικού ελέγχου (PGD). β) Δίνεται η δυνατότητα σε υπογόνιμα ζευγάρια, τα οποία καταφεύγουν λόγω ανδρικού παράγοντα υπογονιμότητας, στις τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (IVF), να αποκτήσουν άρρενα παιδιά που δεν θα φέρουν την υπεύθυνη για την υπογονιμότητα μεταλλαγή και γ) το τροποποιημένο γονίδιο μπορεί να μεταβιβαστεί και στις επόμενες γενιές.

2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΥΓΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΕΜΒΡΥΑ ΑΡΧΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ

Στόχος της εργασίας είναι η παρουσίαση των τεχνικών μετασχηματισμού της γαμετικής σειράς και των εμβρύων αρχικού σταδίου με σκοπό τη δημιουργία διαγονιδιακών ζώων που θα φέρουν το θεραπευτικό γονίδιο για κάποια μονογονιδιακή ασθένεια, καθώς επίσης και των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που εμπερικλείει η κάθε μία, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα.

2.1 Συστήματα μεταφοράς γονιδίου

Προκειμένου να επιτύχουμε το μετασχηματισμό της γαμετικής σειράς, η εισαγωγή του τροποποιημένου γονιδίου πρέπει να πραγματοποιηθεί στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου[7], που πραγματοποιείται ο διαχωρισμός της σωματικής και της γαμετικής σειράς [8]. Αυτό συνεπάγεται άμεσα, πως τα υποψήφια κύτταρα για μεταφορά του επιθυμητού γονιδίου είναι: α) κύτταρα της ανδρικής γαμετικής σειράς, β) μη γονιμοποιημένο ωάριο, γ) γονιμοποιημένο ωάριο-εμβρυϊκό στάδιο ενός κυττάρου και δ) κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου.

Προϋπόθεση όμως για τον μετασχηματισμό είναι η ύπαρξη κατάλληλου συστήματος-φορέα μεταφοράς του επιθυμητού θεραπευτικού γονιδίου στο κύτταρο στόχο. Ως φορέα μεταφοράς ορίζουμε το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί για να διευκολύνει τη μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου στο κύτταρο στόχο του.

Υπάρχουν τρία κύρια είδη φορέων μεταφοράς γονιδίου σε ένα κύτταρο: 1) ιϊκός, 2) μη-ιϊκός, 3) φυσικός.

2.1.1 Ιϊκός

Χρησιμοποιήθηκαν πολλοί διαφορετικοί ιοί ως φορείς μεταφοράς γονιδίου, όπως: α) ρετροϊοί και μία ειδική κατηγορία ρετροϊών, β) λεντοϊοί, γ) αδenoϊοί και δ) αδeno-συνδεόμενοι ιοί [18]. Οι δύο πρώτοι ανήκουν στην κατηγορία των RNA ιών, ενώ οι δύο τελευταίοι στην κατηγορία των DNA ιών. Το σύστημα ιϊκής μεταφοράς είναι καλά μελετημένο και εκμεταλλεύεται τις φυσικές ιδιότητες των ιών να μολύνουν τα κύτταρα στόχους. Συγκεντρώνει αρκετά πλεονεκτήματα όπως αποτελεσματική μεταφορά και ενσωμάτωση του θεραπευτικού γονιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου καθώς επίσης και τη μακροχρόνια έκφρασή του. Από τα σημαντικά του μειονεκτήματα είναι, η απαιτητική παραγωγή ανασυνδυασμένων ιϊκών φορέων, η μεταλλαγή λόγω τυχαίας ενσωμάτωσης (κυρίως για τους RNA ιούς) και η πρόκληση ανοσολογικής αντίδρασης στο δέκτη.

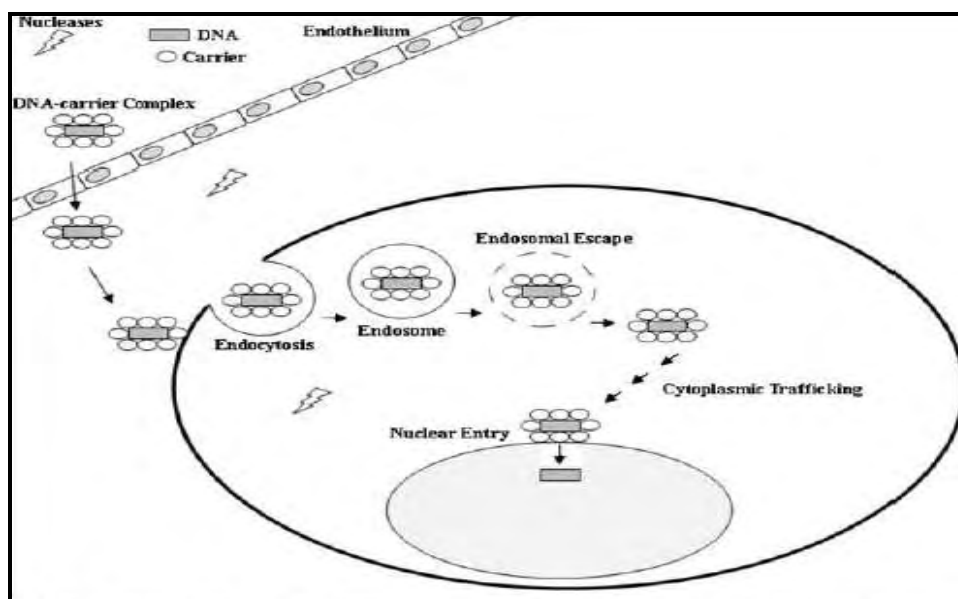
2.1.2 Μη ιϊκός

Σε αντίθεση με το ιϊκό σύστημα μεταφοράς, οι μη ιϊκές τεχνικές χρησιμοποιούν συνθετικά ή φυσικά συστατικά ή φυσικές δυνάμεις προκειμένου να μεταφέρουν DNA στο κύτταρο. Σε σύγκριση με τους ιούς, τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι λιγότερο τοξικά και δεν προκαλούν ανοσολογικές αντιδράσεις στον δέκτη, γεγονός που επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη χρήση τους. Αρκετά ανατομικά, μοριακά και κυτταρικά εμπόδια όπως οι νουκλεάσες στο εξωκυττάριο υγρό, η κυτταρική μεμβράνη, τα λυσοσώματα του κυτταροπλάσματος και η πυρηνική μεμβράνη περιορίζουν την λειτουργική μεταφορά των εισαγόμενων τμημάτων DNA (εικόνα 2)[19]. Έχουν επίσης χαμηλότερη ικανότητα ενσωμάτωσης του επιθυμητού γονιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου και πιο μικρή διάρκεια έκφρασής του. Σε αυτήν την κατηγορία συμπεριλαμβάνεται η τεχνική της εισαγωγής στο κύτταρο γυμνού DNA (naked DNA) και η τεχνική έγκλεισης DNA σε λιπιδική διπλοστοιβάδα (λιποσώματα) για απορρόφηση του περιεχομένου της από το κύτταρο στόχο [18,19].

2.1.3 Φυσικός

Τις τελευταίες δεκαετίες ερευνήθηκαν πολλές φυσικές μέθοδοι για μεταφορά γονιδίων. Σύμφωνα με αυτές, το θεραπευτικό γονίδιο μεταφέρεται από τον εξωκυτταρικό χώρο στον πυρήνα μέσω παροδικών ανοιγμάτων που δημιουργούνται στην κυτταρική μεμβράνη χρησιμοποιώντας φυσικές δυνάμεις, όπως ηλεκτρικούς

παλμούς, υπέρηχους, διάτρηση με λέιζερ και μηχανική πίεση [19,20]. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τεχνικές απευθείας μικροέγχυσης γενετικού υλικού στο κύτταρο στόχο, ηλεκτροδιάτρησης και gene gun [18,19].



Εικόνα 2. Περιορισμοί μεταφοράς γονιδίων μέσω μη-ϊικών φορέων (*The AAPS Journal*, Vol 11 No4 December 2009).

2.2 Τεχνικές μετασχηματισμού της γαμετικής σειράς και των εμβρύων αρχικού σταδίου

Από το σύνολο των τεχνικών αυτών, τρεις διαφορετικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως στην παραγωγή διαγονιδιακών ζώων μέσω μετασχηματισμού της γαμετικής σειράς ή των εμβρύων αρχικού σταδίου. Αυτές είναι: α) μεταφορά γονιδίων σε έμβρυα αρχικού σταδίου με ανασυνδυασμένους ρετροϊούς και λεντοϊούς, β) μικροέγχυση DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου και γ) γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου σε βλαστικά κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου [8].

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε τέταρτη μέθοδος μεταφοράς θεραπευτικού γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων, των οποίων η πλασματική μεμβράνη της κεφαλής είχε υποστεί ειδική επεξεργασία [8]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν τεχνικές που στοχεύουν στον *in vivo* ή *ex vivo* μετασχηματισμό των αρσενικών γαμετών με απώτερο σκοπό τη γέννηση διαγονιδιακών ατόμων [21].

2.2.1 Μεταφορά γονιδίου σε έμβρυα αρχικού σταδίου με ανασυνδυασμένους ρετροϊούς και λεντοϊούς

Ρετροϊοί

Το πρώτο ιϊκό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας στη σωματική γονιδιακή θεραπεία ήταν ο ρετροϊός [6]. Σ' αυτό συνέβαλαν η καλή κατανόηση της βιολογίας του και η αποτελεσματικότητα μεταλλαγής του [22]. Γρήγορα όμως η ικανότητα ρετροϊικού μετασχηματισμού ζωικών μοντέλων εδραίωσε τη χρήση τους στην γαμετική σειρά [11].

Το ρετροϊκό γονιδίωμα αποτελείται από μονόκλωνο μόριο RNA. Αφού εισέλθει στο κύτταρο ο ρετροϊός χάνει το κάλυμμά του και το RNA του αντιγράφεται σε DNA χρησιμοποιώντας το ιϊκό ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή. Ακολούθως, το ιϊκό DNA αντίγραφο ενσωματώνεται σταθερά στο γονιδίωμα του ξενιστή όπου μπορεί να μείνει σε ηρεμία ή να μεταγραφεί και να παράγει πολλά αντίγραφα ιϊκού RNA που αφού πακεταριστούν αποκτούν ιϊκή ενεργότητα και μπορεί να οδηγήσουν σε νέους κύκλους μόλυνσης.

Ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούνται κατά κανόνα οι ρετροϊοί στη γονιδιακή θεραπεία φαίνεται στην εικόνα 3. Τα φυσιολογικά γονίδια του ιού gag, pol και env, αφαιρούνται και αντικαθίστανται από το θεραπευτικό γονίδιο προς μεταφορά. Οι φορείς αυτοί διαμολύνουν ειδικά σχεδιασμένες κυτταρικές σειρές που ονομάζονται κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος. Τα κύτταρα αυτά έχουν κατασκευαστεί έτσι ώστε να διαθέτουν τις αλληλουχίες ενός ελλειμματικού ρετροϊού που εκφράζει τα ιϊκά γονίδια gag, pol και env. Από αυτόν τον βοηθητικό ιό λείπει ένα σημαντικό τμήμα DNA που χρησιμεύει ως αλληλουχία πακεταρίσματος (Ψ) και είναι απαραίτητο για την αναγνώριση του ιϊκού γενωμικού RNA και την συναρμολόγηση του ώριμου ιϊκού σωματιδίου [23]. Σε αντίθεση με τον ελλειμματικό βοηθητικό ιό, ο ειδικά κατασκευασμένος ιϊκός φορέας διατηρεί την αλληλουχία πακεταρίσματος. Έτσι, οι ιϊκές πρωτεΐνες του καψιδίου που παράγονται από τον βοηθητικό ιό είναι ανίκανες να πακετάρουν το RNA του, αλλά ικανές να πακετάρουν το RNA του φορέα της γονιδιακής θεραπείας και να σχηματίσουν λοιμογόνα ιϊκά σωματίδια που απελευθερώνονται από το κύτταρο. Οι ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί, που παράγονται με τον παραπάνω τρόπο, συλλέγονται στη συνέχεια και χρησιμοποιούνται για να μολύνουν τα κύτταρα-στόχους. Τα κύτταρα, στα οποία εισήχθη επιτυχώς ο ρετροϊικός φορέας φέρουν μόνιμα το θεραπευτικό γονίδιο και είναι ικανά να το μεταφέρουν στα θυγατρικά τους με κυτταρική διαίρεση.

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι οι ζυγώτες μπορούν να επωαστούν σε καλλιεργητικό μέσο με υψηλές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένων ρετροϊών. Εναλλακτικά μπορούν να δημιουργηθούν στρώματα κυτταρικών σειρών που έχουν μολυνθεί με ανασυνδυασμένους ιούς, πάνω στα οποία μπορούν να συνκαλλιεργηθούν έμβρυα σε στάδιο ζυγωτού. Με οποιοδήποτε από τους παραπάνω δύο τρόπους, ένα ποσοστό της τάξης του 90% των επιζώντων εμβρύων θα επιμολυνθούν επιτυχώς και η επακόλουθη μεταφορά τους σε δεκτικά θηλυκά θα δώσει γένεση σε διαγονιδιακούς απογόνους [11]. Η μοριακή γενετική ανάλυση των διαγονιδίων που

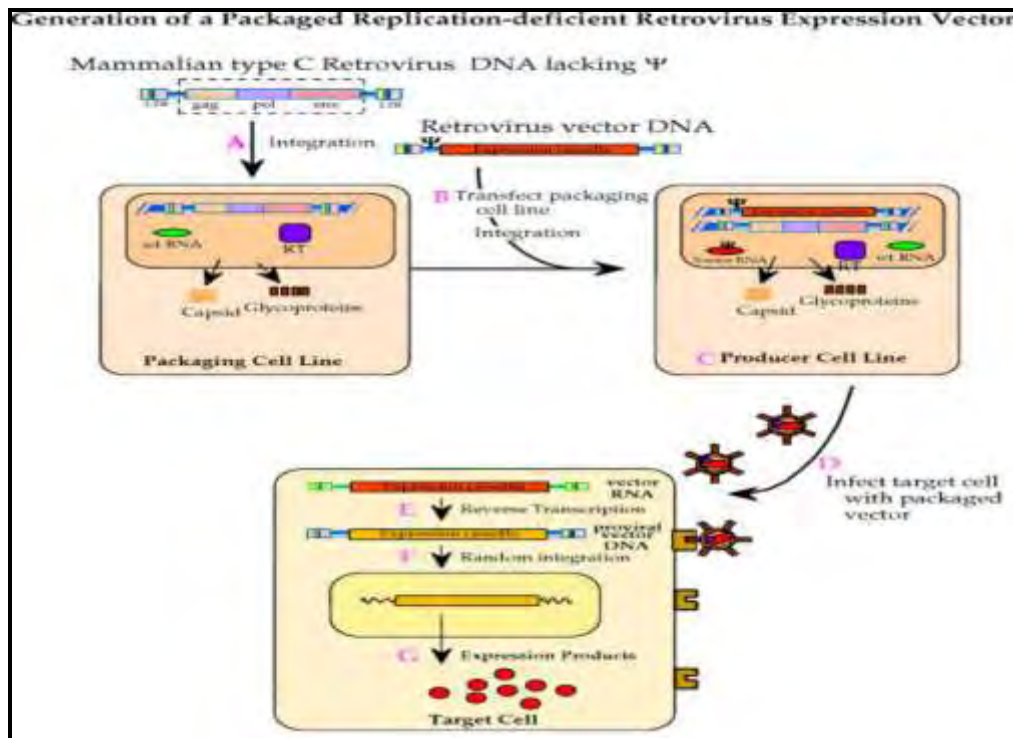
παράγονται με αυτόν τον τρόπο, δείχνει συνήθως ενσωμάτωση ενός προϊκτικού αντιγράφου σε μία δεδομένη χρωμοσωμική θέση. Αναδιατάξεις του γονιδιώματος του ξενιστή, φυσιολογικά περιορίζονται σε μικρές κάθετες επαναλήψεις στη θέση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου στο χρωμόσωμα [11].

Επιπρόσθετα αξίζει να αναφερθεί, μία ακόμη τεχνική στο πλαίσιο του ρετροϊκού συστήματος γονιδιακής μεταφοράς, η οποία αποδείχτηκε επιτυχής στα βοοειδή και συνδυάζει την τεχνική της απευθείας μικροέγχυσης στο κύτταρο στόχο με αυτήν των ρετροϊών [24]. Σύμφωνα με αυτήν, εισήχθη αρχικά ο ρετροϊκός φορέας με μικροέγχυση στον περιλεκιθικό χώρο 224 ώριμων ωοκυττάρων τα οποία την στιγμή της μικροέγχυσης βρισκόταν στην μετάφαση της μίτωσης II, όπου ο πυρηνικός φάκελος είναι κατακερματισμένος [25], έτσι ώστε να μπορεί επιτρέπεται η είσοδος του φορέα στον πυρήνα. Από τα 20 έμβρυα που μεταφέρθηκαν, τρία ζώα γεννήθηκαν εκ των οποίων ένα ήταν διαγονιδιακό. Επιπλέον ένα αποβληθέν ζεύγος διδύμων ήταν επίσης διαγονιδιακό. Αν και η τεχνική αυτή είναι πιο περίπλοκη, είναι η μόνη που έδωσε γέννηση διαγονιδιακών ατόμων στα πρωτεύοντα σε ποσοστό 1,3% [26] και η περαιτέρω ανάπτυξή της κρίνεται απαραίτητη.

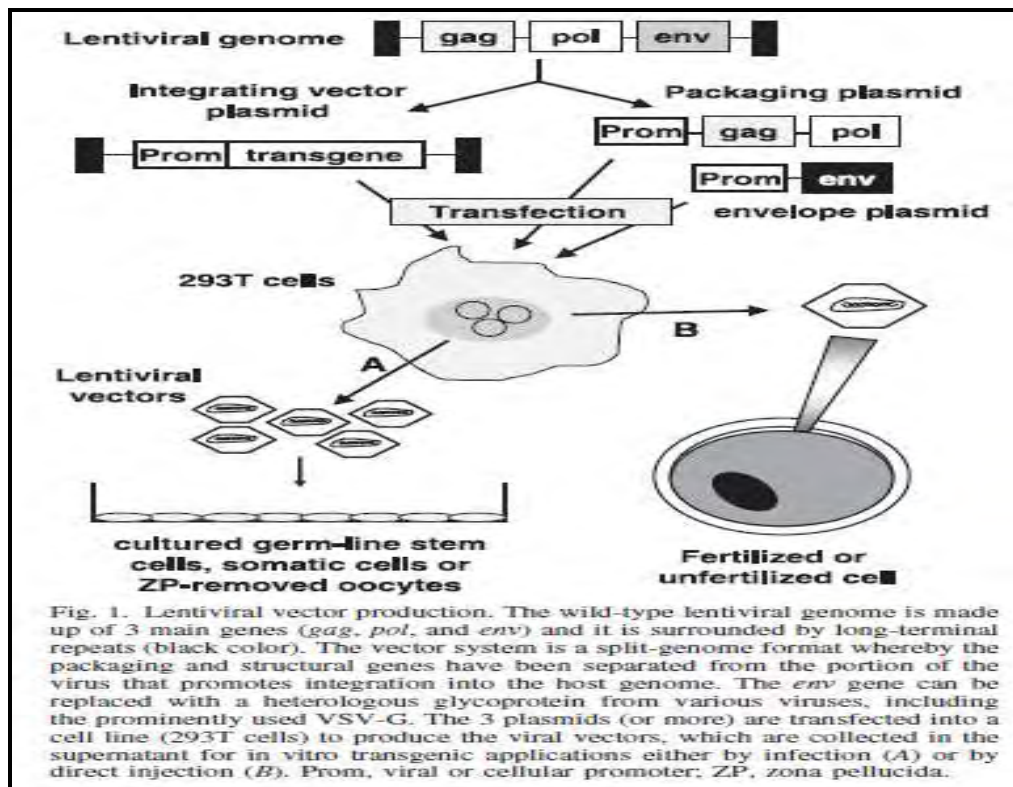
Παρόλα αυτά όμως υπάρχουν και σημαντικά μειονεκτήματα σ' αυτή τη προσέγγιση. Αν και η ενσωμάτωση του διαγονιδίου είναι μόνιμη, η έκφραση του φαίνεται να είναι παροδική εφόσον μελέτες δείχνουν ότι η ανίχνευσή του μπορεί να γίνει από μέρες μέχρι μερικές εβδομάδες μετά την επιμόλυνση στα περισσότερα κύτταρα *in vivo* [18]. Επιπλέον, το ρετροϊκό γονιδίωμα είναι περιορισμένου μεγέθους, με αποτέλεσμα οι ρετροϊκοί φορείς να μπορούν να μεταφέρουν μόνο μικρά ή μεσαίου μεγέθους γονίδια της τάξης των 8Kb. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ενσωμάτωση του ρετροϊκού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή προϋποθέτει το κύτταρο να βρίσκεται σε φάση κυτταρικής διαίρεσης. Η απαίτηση αυτή περιορίζει σημαντικά την ποικιλία των κυττάρων στα οποία μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία η μεταφορά DNA μέσω ρετροϊκού φορέα, αποκλείοντας τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα. Επίσης σημαντικό μειονέκτημα είναι τα υψηλά επίπεδα μωσαϊκισμού που παρατηρούνται από τη χρήση κλασσικών ανασυνδυασμένων ρετροϊκών φορέων [6].

Ίσως το πιο σημαντικό όμως εμπόδιο στην ευρεία χρήση των ρετροϊκών φορέων είναι οι πιθανές επιπλοκές που μπορεί να έχει η ενσωμάτωση του προ-ϊκτικού DNA στο χρωμόσωμα. Το σημείο της ένθεσης είναι τυχαίο, οπότε υπάρχει πάντα ο κίνδυνος της διακοπής της συνέχειας ενός σημαντικού για το κύτταρο γονιδίου ή της ανεξέλεγκτης έκφρασης ενός παρακείμενου γονιδίου υπό τον έλεγχο της ιϊκής ρυθμιστικής περιοχής. Αν και είναι γενικότερα αποδεκτό ότι μία μοναδική μετάλλαξη λόγω ένθεσης δεν είναι ικανή να προκαλέσει κακοήθεια, είναι γεγονός ότι δημοσιεύθηκαν ένα περιστατικό λευχαιμίας σε ζωϊκό μοντέλο [27] και 2 ακόμα περιστατικά λευχαιμίας σε ανθρώπους [28] μετά από χρήση ρετροϊκών φορέων για θεραπευτικούς σκοπούς.

Σε αντίθεση με τη θεωρία της τυχαίας ενσωμάτωσης του διαγονιδίου, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ ενός μοντέλου στοχευμένης ενσωμάτωσης σε ενεργά μεταγραφικές περιοχές [29, 30], που ίσως επιλύσει τα προβλήματα μεταλλαγής λόγω ένθεσης.



Εικόνα 3. Τρόπος παραγωγής ρετροϊκών φορέων.



Εικόνα 4. Τρόπος παραγωγής λεντοϊκών φορέων (*Physiology Genomics* 31: 159-173, 2007).

Table 2. Summary of lentiviral vector applications using female and male pluripotent cells

Species	Promoter	Transgene	% Embryo Viability (No. of Viable Treated Cells/Total Cells)	% Born (No. of Birth/ Transferred Embryos)	No. of Fo, Transgenic/ Total Examined (Transgene Expression)	Fo Vector Copy No.	No. of F ₁ Transgenic/Fo 1 Examined (Transgene Expression)	Method	Ref. No(s).
<i>Female cells</i>									
Rat	UbC	GFP	90% (210/233)	17% (22/130)	13/22 (9)	1-7	NP	PVZ	Ref. 74
Rat	UbC	GFP	57% (65/114)	43% (28/65) [†]	13/28 (12)	1-4	18/64 (18)	PVZ	Ref. 131
Rat	CAG	GFP	100% (121/121)	50% (60/121)	13/60	1-4	68/139	PVZ	Ref. 81
Rat	SYN	GRIP1	40% (20/50)	55% (11/20)	5/11 (2)	>1	15/44 (9)	PVZ	Ref. 90
Rat	U6	DAZL	NP	NP	10/75 (6)	N/D	33/400	PVZ	Ref. 21
Mouse	UbC	shRNA	86% (231/270)	21% (92/446)	63/73 (88)	1-21	NP	PVZ	Ref. 74
Mouse	MH	GFP	81% (86/106)	15% (11/74)	11/15 (3/7)	2-15	NP	PVZ	Ref. 74
Mouse	UbC	GFP	NP	13 (19/146)	19/31 (19) [†]	1-12	NP	INEZ	Ref. 74
Mouse	CAG	GFP	NP	10% (3/29)	3/3 (3)	N/D	NS	INF M	Ref. 105
Mouse	CAG	GFP	NP	25% (28/110)	15/23 (2)*	1-8	NP	INF T	Ref. 52
Mouse	CMV	GFP	NP	18% (7/40)	7/7 (5/6)*	N/D	4/7 (4)	INF T	Ref. 52
Mouse	Rho	GFP	NP	22% (13/60)	9/11 (1)*	N/D	NS	INF T	Ref. 52
Mouse	RG	GFP	NP	30% (18/60)	14/18 (1)*	N/D	NS	INF T	Ref. 52
Mouse	K12	GFP	NP	8% (5/60)	5/5 (2)*	N/D	NS	INF T	Ref. 52
Mouse	PGK	GFP	95% (187/197)	NP	1/2*	N/D	NP (37/40)	PVZ	Ref. 110
Mouse	PGK	GFP	93% (94/101)	NP	4/7 (0)	N/D	NS	PVZ + Pt	Ref. 110
Mouse	UbC	GFP	80% (163/203)	20% (32/163)	31/32 (31)	3-31	12/12	INVI Z	Ref. 141
Mouse	UbC	GFP	64% (97/151)	18% (37/97)	17/37 (17)	1-14	10/14	PVZ	Ref. 141
Mouse	CAG	GFP	61% (51/83)	34% (53/156)	NP/53	3-11	NP	INF T	Ref. 95
Mouse	CAG	GFP	100% (81/81)	43% (78/180)	NP	1-9	NP	INF B	Ref. 95
Mouse	HI	GFP shRNA	NP	NP	2/5	13-21	2/15 (2)	INF T	Refs. 111,112
Mouse	U6	CD8 shRNA	NP	NP	16/32 (8)*	2-6	NS	PVZ	Refs. 111,112
Mouse	U6	CD25 shRNA	NP	NP	11/42	N/D	NS	PVZ	Refs. 111,112
Mouse	U6	P53 shRNA	NP	NP	5/22	N/D	NS	PVZ	Refs. 111,112
Mouse	U6	Sic11a1	NP	NP	3 (2)	N/D	NP	PVZ	Ref. 63
Mouse	U6	Ryk shRNA	NP	45% (18/40)	8/18 (8)	1-5	NP	PVZ	Ref. 75
Mouse	CMV	hGM-CSF	100% (95)	37% (35/95)	24/35 (24)	1-8	NS	PVZ	Ref. 107
Chicken	CMV	GFP	27% (20/73) [†]	N/A	1/1	1-5	20/44 (5) [†]	SGC	Ref. 80
Chicken	CMV	lacZ	27% (20/73) [†]	N/A	13/19	1-4	72/487 (13) [†]	SGC	Ref. 80
Chicken	PGK	GFP	4% (19/473)	N/A	3/6 ^c	N/D	4/637 (4)	SGC	Ref. 15
Chicken	OVA	miR24	NP	N/A	1/NP	N/D	19/463 (7)	SGC	Ref. 73
Chicken	hIFNβ1a	hIFNβ1a	NP	N/A	1/NP	1	2/NP (1) [†]	SGC	Ref. 73
Chicken	hIFNβ1a	hIFNβ1a	NP	N/A	3/NP	1	12/NP (3)	SGC	Ref. 117
Quail	SYN	GFP	10% (8/80)	N/A	8/8 (2) [†]	1	19/143 (18)	SGC	Ref. 48
Porcine	PGK	GFP	NP	19% (46/244)	32/46 (30)	1-20	NS	PVZ	Ref. 48
Porcine	K14	GFP	NP	19% (16/86)	2/16 (2)	1-12	NS ^b	PVZ	Ref. 137
Porcine	CMV	GFP	82% (120/147)	33% (40/120)	37/40 (35)	1-5	NS	PVZ	Ref. 137
Porcine	PGK	GFP	NP	NP	3 (3)	1-2	14/26 (9)	PVZ	Ref. 47
Bovine	PGK	GFP	45 ± 22% (22/7)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 48
Bovine	PGK	GFP	40 ± 17% (22/7)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 48
Bovine	PGK	GFP	58 ± 7% (18/2)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 30
Bovine	PGK	GFP	NS ± 6% (2/48)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 30
Bovine	PGK	GFP	14 ± 7% (1/26)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 30
Bovine	UbC	GFP	30% (42/139)	NS	NS	NS	NS	LM INF	Ref. 34
Bovine	PGK	GFP	25% (1/248)	NS	NS	NS	NS	PVZ	Ref. 49
Bovine	PGK	GFP	22% (79/357)	50% (4/8)	4/4 (4)	4/12	1/1 (1)	PVZ	Ref. 49
Bovine	PGK	GFP	NP	22% (4/17)	0/4 (0)	NS	NS	PVZ	Ref. 49

Continued

Πίνακας 1. Σύνοψη εφαρμογών λεντοϊκών φορέων (*Physiology Genomics* 31: 159-173, 2007).

Λεντοϊοί

Οι λεντοϊοί είναι μία κατηγορία ιϊκών φορέων που φέρουν αρκετά χαρακτηριστικά του ρετροϊκού συστήματος μεταφοράς. Ουσιαστικά είναι μία κατηγορία ρετροϊών που αποτελούνται από 2 μόρια RNA, ένα καψίδιο, πρωτεΐνες ιϊκού φακέλου, διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ένζυμα όπως η ιντεγράση, αντίστροφη μεταγραφάση και βοηθητικές πρωτεΐνες [31]. Ένας χαρακτηριστικός λεντοϊός είναι ο HIV. Εισήχθησαν στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας από τους Lois et al [32] και Pfeifer et al [33] και θεωρούνται η πιο αποτελεσματική μέθοδος δημιουργίας διαγονιδιακών απογόνων (πίνακας 1) [34]. Ο τρόπος παραγωγής τους είναι ανάλογος αυτού των ρετροϊών όπως παρουσιάζεται συνοπτικά στην εικόνα 4. Οι λεντοϊοί έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να επιμολύνουν τόσο διαιρούμενα όσο και μη διαιρούμενα κύτταρα σε αντίθεση με τους ρετροϊούς, που επιμολύνουν μόνο διαιρούμενα κύτταρα [34,31,35]. Μετά την μεταφορά, το διαγονίδιο εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά και παραμένει ανιχνεύσιμο μετά την πάροδο 6 μηνών [35].

Το σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των φορέων έναντι των κλασσικών ρετροϊών είναι η σημαντική μείωση των ποσοστών μωσαϊκισμού [36,35,37]. Επίσης οι λεντοϊκοί φορείς δεν αυξάνουν την θνησιμότητα των εμβρύων και μεταφέρουν επιτυχώς το θεραπευτικό γονίδιο σε αυτά και τους απογόνους της επόμενης γενιάς, σε ποσοστό 70-80% στα ποντίκια, τους αρουραίους, τα γουρούνια και τις αγελάδες [11,38]. Γι' αυτό το λόγο θεωρούνται καλοί υποψήφιοι φορείς μετασχηματισμού της ανθρωπίνης γαμετικής σειράς.

Παρόλο αυτά, το σημαντικό μειονέκτημα του μικρού γονιδιώματος τους που επιτρέπει την μεταφορά τμημάτων DNA μεγέθους 9-10 kb, θα αποτελεί βασικό πρόβλημα της εφαρμογής τους στον άνθρωπο καθώς τα περισσότερα θεραπευτικά γονίδια θα αποκλείονται για μεταφορά [11]. Προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα του περιορισμένου μεγέθους, τα γονίδια προς μεταφορά τέθηκαν υπό τον έλεγχο των μακρών τελομερικών επαναλήψεων (LTRs), αν και η αύξηση του μεγέθους του εισαγόμενου γονιδίου ανέδειξε σοβαρά προβλήματα έκφρασής τους [34].

2.2.2 Μικροέγχυση DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου

Πρώτος ο Jon Gordon το 1980 έδειξε ότι εξωγενές DNA μπορεί να εισαχθεί στην γαμετική σειρά απλά και μόνο με φυσική έγχυση διαλύματος που περιέχει κλωνοποιημένο DNA στον προπυρήνα του ζυγωτού [16]. Ως επακόλουθο, η μικροέγχυση (microinjection) τμημάτων DNA έγινε τα τελευταία 20 χρόνια η πιο διαδεδομένη μέθοδος μεταφοράς γονιδίων στην γαμετική σειρά παρά το ότι παραμένει ακριβή και εργαστηριακά απαιτητική [11,7,8]. Η τεχνική εδραιώθηκε στα ποντίκια, αν και μεταφορά γονιδίων μέσω απευθείας μικροέγχυσης σε προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε άλλα θηλαστικά όπως ποντίκια και κουνέλια [11,7]. Αντίστοιχα, πιστεύεται ότι και στο ζυγωτό του

ανθρώπου η μεταφορά γενετικού υλικού με την τεχνική αυτήν θα είναι εφαρμόσιμη με παρόμοιο τρόπο [11].

Στις μελέτες που έγιναν στα ποντίκια, τα γονιμοποιημένα ωάρια συλλέχθηκαν από τη σάλπιγγα θηλυκών ατόμων που προηγουμένως είχαν υποστεί ορμονική διέγερση και ακολούθως σπερματέγχυση 13.5h μετά την χορήγηση της hCG. Οι προπυρήνες στον ποντικό είναι εμφανείς κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου, όταν δηλαδή λαμβάνει χώρα διπλασιασμός DNA. Ο θηλυκός προπυρήνας εντοπίζεται κοντά στο δεύτερο πολικό σωματίο με την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης μετά την γονιμοποίηση. Μετά από 6h και οι δυο προπυρήνες αυξάνουν σε μέγεθος και μετακινούνται προς το κέντρο του γονιμοποιημένου ωαρίου (εικόνα 5). Για την μικροέγχυση επιλέγουμε συνήθως τον αρσενικό προπυρήνα για το λόγο ότι είναι μεγαλύτερος και σε καλύτερη θέση σε σύγκριση με τον θηλυκό (εικόνα 6).

Οι δύο προπυρήνες διαφέρουν στη δομή του DNA που περιέχουν. Στον θηλυκό, το μητρικό DNA είναι οργανωμένο σε ινίδια χρωματίνης με την βοήθεια των ιστονών, ενώ το αρσενικό γενετικό υλικό εισέρχεται πακεταρισμένο με πρωταμίνες που αντικαθίστανται στη συνέχεια από τις ιστόνες του γονιμοποιημένου ωαρίου. Παρόλο αυτά, δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μικροέγχυσης σε θηλυκό ή αρσενικό προπυρήνα και αριθμό διαγονιδιακών απογόνων (Bristen et al 1985).

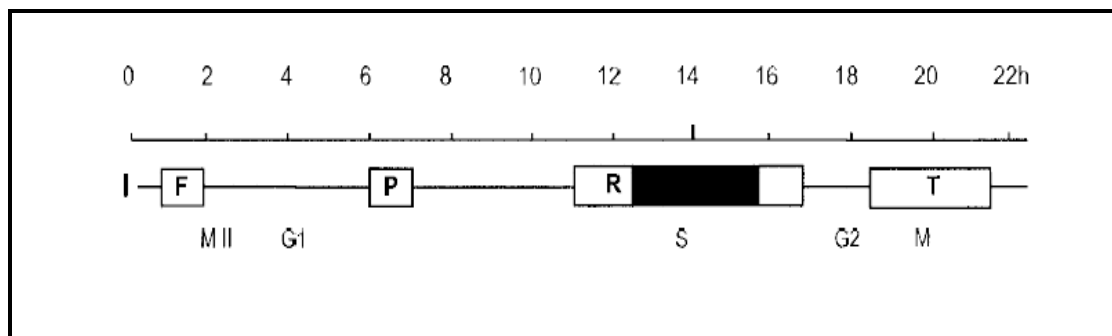
Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μικρογονιμοποίηση, οι ζυγώτες ακινητοποιούνται με την βοήθεια της πιπέτας holding κάτω από το ανάστροφο μικροσκόπιο και με την χρήση μικρής γυάλινης πιπέτας, μεταφέρεται ποσότητα 1-2 pI από το διάλυμα DNA (200 μόρια DNA) σε έναν προπυρήνα. Από την διαδικασία επιβιώνει το 40-90% των ωοκυτάρων και περίπου το 20% αυτών όταν μεταφερθούν σε θηλυκά φτάνουν σε γέννηση [30]. Η ενσωμάτωση του DNA στο γενετικό υλικό του γονιμοποιημένου ωαρίου είναι τυχαία και φαινόμενα ομόλογου ανασυνδυασμού φαίνεται να μη λαμβάνουν χώρα [39]. Επιβεβαίωση ενσωμάτωσης γίνεται με *in situ* υβριδισμό. Από το 20% των απογόνων που προκύπτουν ένα 20% αυτών είναι διαγονιδιακοί, καταλήγοντας σε ένα ολικό ποσοστό μετασχηματισμού της τάξης του 1.2-3.2% [8,34].

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι αν και η τεχνική της μικροέγχυσης θα μπορούσε να αποβεί ιδιαίτερα χρήσιμη για το μετασχηματισμό της ανθρώπινης γαμετικής σειράς, το πρόβλημα της χαμηλής ενσωμάτωσης του διαγονιδίου όπως προκύπτει από συγκριτικές μελέτες στα θηλαστικά [11] την καθιστά λιγότερο ιδανική. Επίσης η έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου φαίνεται να είναι χαμηλή, καθότι μόνο το 60% των διαγονιδιακών απογόνων που προέκυψαν από την τεχνική της μικροέγχυσης σε ποντίκια εκφράζουν το επιθυμητό γονίδιο.

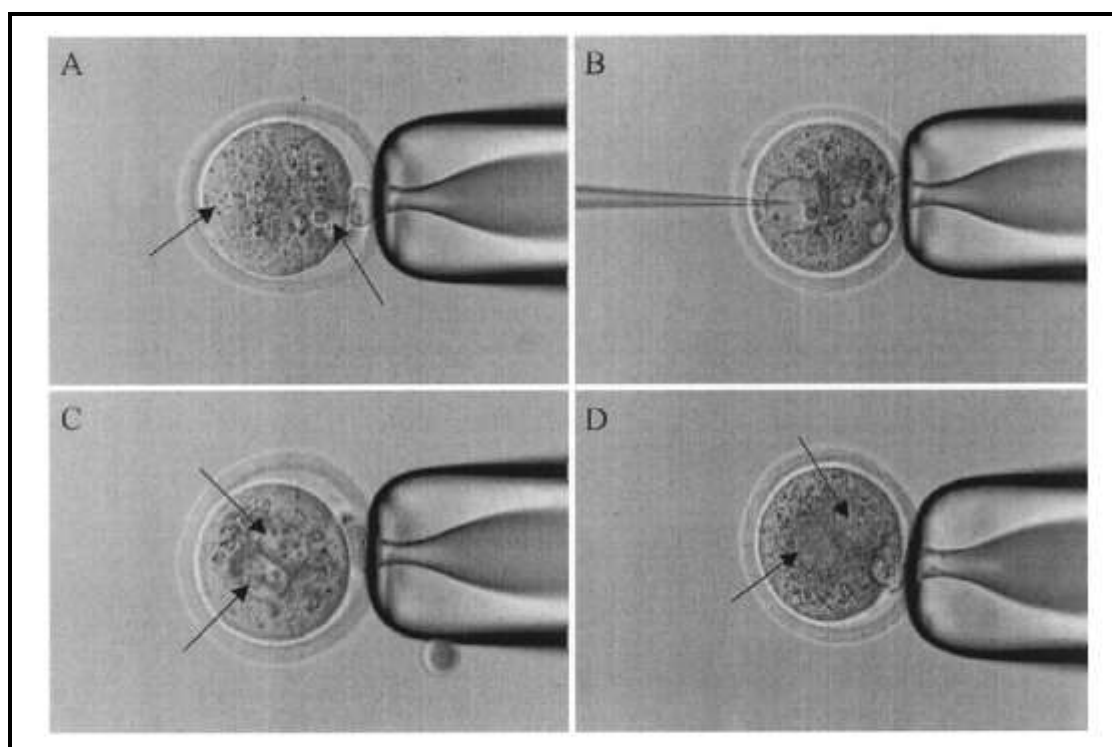
Πέρα από το πρόβλημα της χαμηλής ενσωμάτωσης ένα ακόμη μειονέκτημα που πρέπει να επισημανθεί και φαίνεται να υπάρχει είναι αυτό του μωσαϊκισμού. Ακόμη και αν η μικροέγχυση DNA σε έναν προπυρήνα οδηγήσει σε επιτυχή ενσωμάτωση του θεραπευτικού γονιδίου στο κύτταρο στόχο, μόνο το 50% των βλαστομεριδίων που θα προκύψουν αναμένεται να φέρει το επιθυμητό γονίδιο [11]. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το DNA που εγχέεται στον προπυρήνα του γονιμοποιημένου ωαρίου δεν ενσωματώνεται αμέσως στο γονιδίωμα του ωαρίου αλλά μπορεί να παραμείνει σε μορφή ελεύθερων μορίων για αρκετές ημέρες.

Επομένως τα βλαστομερίδια που προκύπτουν από τις πρώτες αυλακώσεις πιθανώς διαφέρουν ως προς την ποσότητα του εισαγόμενου DNA που περιέχουν [8].

Προκειμένου συνεπώς η τεχνική της απευθείας μικροέγχυσης DNA σε προπυρήνα γονιμοποιημένων ωαρίων να εφαρμοστεί στον άνθρωπο, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες.



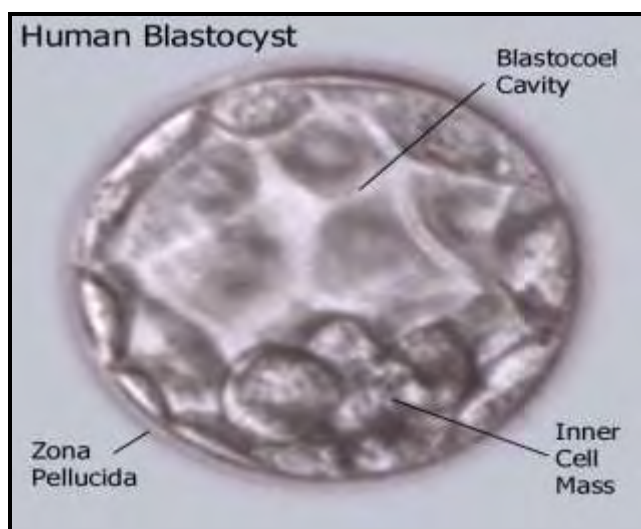
Εικόνα 5: Ο πρώτος κυτταρικός κύκλος του ποντικού μετά την σπερματέγχυση. Η σπερματέγχυση πραγματοποιήθηκε 13.5h μετά τη χορήγηση hCG . I, insemination; P, start formation of pronuclei; R, DNA replication S time period for microinjection; T, first cell division; M II, meiosis II; G, gap phase; S, DNA synthesis; M, mitosis (*Experimental Physiology*, 2000, 85.6. 589-601).



Εικόνα 6. Ανάπτυξη προπυρήνων και μικροέγχυση DNA σε ζυγωτό ποντικού. A και C, ανάπτυξη προπυρήνων μετά από 20 και 26 ώρες από την χορήγηση hCG; B, DNA μικροέγχυση σε αρσενικό προπυρήνα; D, εξαφάνιση προπυρήνων πριν από την πρώτη κυτταρική διαίρεση (*Experimental Physiology*, 2000, 85.6. 589-601).

2.2.3 Γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου σε βλαστικά κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου

Την 5^η προς 6^η ημέρα της ανάπτυξης, το έμβρυο αποτελείται από 100 περίπου κύτταρα και έχει την μορφή κοίλης σφαίρας, που αποκαλείται βλαστοκύστη. Έχει μια εσωτερική κεντρική κοιλότητα γεμάτη με υγρό, κοιλότητα της βλαστοκύστης, την έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη και την έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη [40]. Σε γενικές γραμμές η έσω κυτταρική μάζα παράγει το μεγαλύτερο μέρος του εμβρύου, ενώ η έξω κυτταρική μάζα αποτελεί την κύρια πηγή των υμένων του πλακούντα (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Βλαστοκύστη. Διακρίνονται η έσω κυτταρική μάζα και η βλαστοκοίλη

Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας, είναι ουσιαστικά τα βλαστικά κύτταρα του εμβρύου (ESCs) και σε αντίθεση με άλλες κυτταρικές σειρές έχουν την ιδιότητα να διατηρούν το φυσιολογικό τους καρύοτυπο ακόμη και μήνες μετά στη καλλιέργεια, κατά την διάρκεια της οποίας διατηρούν την ολοδυναμία τους, την ικανότητα τους δηλαδή να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο. Επίσης, τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας μπορούν αφού απομονωθούν από μία βλαστοκύστη να εμφυτευτούν πάλι πίσω στην ίδια ή σε άλλη. Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά δίνουν στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα τη δυνατότητα να σχηματίζουν χίμαιρες όταν εισάγονται μέσα σε βλαστοκύστες ή όταν συναθροίζονται με τα βλαστομερίδια του μοριδίου [11]. Τα έμβρυα που προκύπτουν μπορούν να μεταφερθούν σε θηλυκά άτομα και περίπου το 50% αυτών θα φτάσουν σε τελειώμηνη κύηση. Από το σύνολο των απογόνων σχεδόν το 50% αυτών θα είναι χιμαιρικά. Τα κύτταρα αυτά θα συνεισφέρουν στο 80% όλων των κυττάρων του ατόμου, συμπεριλαμβανομένων και των γαμετικών.

Κατά την διάρκεια της καλλιέργειας, τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας μπορούν να μετασχηματιστούν [11]. Πολλά συστήματα μεταφοράς γονιδίου στα ESCs όπως ιϊκή μεταφορά, λιποσώματα, ηλεκτροδιάτρηση είναι αποτελεσματικά.

Παρόλα αυτά η χρήση τους είναι περιορισμένη εξαιτίας του γεγονότος ότι μέχρι στιγμής ο ποντικός είναι το μόνο ζώο μοντέλο στο οποίο πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η τεχνική της γονιδιακής μεταφοράς μέσω κύτταρων της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να εδραιωθεί η χρήση τους και σε άλλα είδη.

Σημαντικός σταθμός στα πλαίσια της τεχνικής αυτής είναι η απομόνωση βλαστοκυττάρων από την έσω κυτταρική μάζα του εμβρύου στον άνθρωπο το 1998 από τον Thomson et al. [11]. Ακολούθησαν πολλοί ερευνητές που απομόνωσαν ανθρώπινα ESCs [11] και λίγα χρόνια αργότερα επιτεύχθηκε μετασχηματισμός τους [11] με αποτέλεσμα να προκύψει ένα νέο πεδίο στη βιολογία. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα για γέννηση χιμαιρικών παιδιών στους ανθρώπους. Επιπρόσθετα η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί επιτρέπει τη δημιουργία knock-out ποντικών, στους οποίους το γονίδιο στόχος αφαιρείται με ομόλογο ανασυνδυασμό μέσω κατάλληλης τεχνικής όπως είναι το σύστημα Cre-Lox [41].

2.2.4 Μεταφορά γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων (sperm-mediated gene transfer)

2.2.4.1 Εισαγωγή εξωγενούς DNA στα σπερματοζωάρια

Η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια πρόσληψης γυμνού DNA (naked DNA) από σπερματοκύτταρα πραγματοποιήθηκε το 1971 από τον Brackett et al. [12] επωάζοντας φρέσκα σπερματοζωάρια με τον DNA ιό SV40 και επακόλουθη μεταφορά τους σε ωάρια. Αν και δεν προέκυψαν ζωντανοί διαγονιδιακοί απόγονοι, η μελέτη αυτή καθιέρωσε την ενσωμάτωση ετερόλογου γενετικού υλικού σε σπερματοζωάρια. Αργότερα δύο ακόμη ανεξάρτητες μελέτες επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι τα σπερματοζωάρια μπορούν να δεσμεύσουν εξωγενές γενετικό υλικό και να το μεταφέρουν στα ωάρια που θα γονιμοποιήσουν, με αποτέλεσμα δημιουργία διαγονιδιακών απογόνων για πρώτη φορά [42]. Η μεταφορά γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων έφερε λοιπόν στο προσκήνιο την ιδέα της μαζικής παραγωγής διαγονιδιακών ζώων τόσο για ερευνητικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Στην επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν πάνω από 70 αναφορές επιτυχούς πρόσληψης εξωγενούς DNA από τα σπερματοκύτταρα πολλών ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (πίνακας 2) [11,10,42] με σκοπό την δημιουργία διαγονιδιακών απογόνων μέσω διαφόρων τεχνικών όπως η τεχνητή σπερματέγχυση (AI), η κλασική in vitro γονιμοποίηση (IVF) και η ενδοκυτταροπλασματική μικροέγχυση σπέρματος (ICSI). Το σύνολο των τεχνικών αυτών πλαισιώνουν τον τομέα της μεταφοράς γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων (sperm-mediated gene transfer) [12].

Table 1 A survey of successful gene transfer experiments by germ cells in mammals from 1970's to 2008						
Species	Strain	Target/vector for gene transfer	Approach	Fertilization method	Latest stage in which transgenes were found/expressed	Reference
Rabbit	New Zealand White	Sperm	DNA incubation	AI	Embryos	Brackett et al., 1971
Mouse	B6D2F1	Sperm	DNA incubation	IVF	F ₁ offspring	Lavitrano et al., 1989
Mouse, bull, buffalo, and goat	B6D2F1, Holstein, Murrah, French-alpine	Sperm	DNA incubation	(NA)	Sperm	Castro et al., 1990
Mouse	B6SJLF1	Sperm	Liposomes	IVF	Viable offspring	Bachiller et al., 1991
Bull		Sperm	EP	IVF	Embryos	Gagné et al., 1991
Pig	Landrace	Sperm	DNA incubation	(NA)	Sperm	Horan et al., 1991
Mouse		Sperm	DNA incubation	(NA)	Sperm	Lavitrano et al., 1992
Mouse and bull		Sperm	DNA incubation	(NA)	Sperm	Francolini et al., 1993
Rat	F344	Testis	TMGT	(NA)	Seminiferous epithelium and principal cells	Blanchard and Boekelheide, 1997
Mouse	ICR	Seminiferous tubules	EP/TMGT	(NA)	Sperm	Yamazaki et al., 1998
Mouse	B6D2F1	Sperm	TransgenICSI	ICSI	Embryos	Perry et al., 1999
Mouse	ICR	Testis	TMGT	Natural	F ₂ offspring	Sato et al., 1999a
Mouse	ICR	Testis	TMGT	Natural	Viable offspring	Sato et al., 1999b
Rhesus Monkey	<i>Macaca mulatta</i>	Sperm	TransgenICSI	ICSI	Embryos	Chan et al., 2000
Mouse and pig		Sperm	DNA incubation	IVF	Viable offspring	Sciamanna et al., 2000
Bull		Sperm	REMI	AI/IVF	Viable offspring	Shemesh et al., 2000
Mouse	B6C3F1	Ovary	IOI/EP	(NA)	Follicles, thecal cells	Carballada et al., 2000
Mouse	B6/129F2, C57BL/6	Spermatogonial Stem Cell	RVT	Natural	Three generations	Nagano et al., 2001
Rat	Wistar-Imamichi	Testis	TMGT	Natural	Viable offspring	Yonezawa et al., 2001
Mouse	Swiss	Seminiferous tubules	TMGT	Natural	F ₂ offspring	Celebi et al., 2002
Pig and mouse	Yorkshire, FVB/N	Sperm	Antibody linked	Surgical AI/IVF	F ₂ offspring of pig, F ₁ offspring of mouse	Chang et al., 2002
Rat	Wistar-Imamichi	Sperm	LPD	IVF	Viable offspring	Yonezawa et al., 2002
Rabbit and goat	Japanese big-Eared white	Testis and spermatiductus	TMGT	Natural	F ₁ offspring	Gao et al., 2003
Rabbit	New Zealand White	Sperm	Liposomes	IVF	Viable offspring	Wang et al., 2003
Mouse	B6D2F1	Sperm	RVT	(NA)	Sperm	De Miguel and Donovan, 2003
Pig		Sperm	TransgenICSI	ICSI	Embryos	Nagashima et al., 2003
Mouse	B6C3F1	Ovary	OMGT/EP	(NA)	Ovarian cells	Sato et al., 2003
Mouse	B6D2F1	Sperm	TransgenICSI	ICSI	Embryos	Szczgiel et al., 2003
Mouse	C57BL/6, C3H, BALB/C, A	Spermatogonial stem cell	RVT	Natural	F ₂ offspring	Kanatsu-Shinohara et al., 2004
Mouse	ICR	Sperm	TransgenICSI	ICSI	Viable offspring	Moreira et al., 2004
Mouse	B6C3F1	Testis	TMGT	Natural	Viable offspring	Sato and Nakamura, 2004a
Mouse	B6C3F1	Testis	TMGT	Natural	F ₁ offspring	Sato and Nakamura, 2004b
Mouse	ICR	Rete and interstitial testis	EP/TMGT	(NA)	Sperm	Kubota et al., 2005
Goat		Testis	TMGT	IVF	Embryos	Li et al., 2005
Mouse	B6D2	Sperm	TransgenICSI	ICSI	Embryos	Moreira et al., 2005
Mouse	B6D2F1, B6, ICR	Sperm	TN-ICSI, TN-ROSI	ICSI, ROSI	Viable offspring	Suganuma et al., 2005

Πίνακας 2. Παραδείγματα μεταφοράς γονιδίου σε κύτταρα της ανδρικής γαμετικής σειράς (*Journal of genetics and genomics* 35, 2008, 701-714).

Species	Strain	Target/vector for gene transfer	Approach	Fertilization method	Latest stage in which transgenes were found/expressed	Reference
Mouse	B6D2F1, C57BL/6N	Sperm	Transgen/ICSI	ICSI	Viable offspring	Osada et al., 2005
Mouse	ICR	Interstitial testis	EP/TMGT	Natural	Viable offspring	Umemoto et al., 2005
Bull		Sperm	DNA incubation	IVF	Embryos	Alderson et al., 2006
Mouse	MF1	Rete testis	TMGT/EP	(NA)	Sperm	Coward et al., 2006
Mouse	ICR	Testis	TMGT	Natural	F ₁ offspring	He et al., 2006
Hamster	Golden Syrian	Rete testis	TMGT	(NA)	Sperm	Hibbitt et al., 2006
Pig	Duroc	Sperm	DNA incubation	ICSI and SCNT	Viable offspring	Kurome et al., 2006
Rabbit	Japanese Big-Eared white	Sperm	DNA incubation	IVF	Viable offspring	Li et al., 2006
Pig	Taihu	Testis	TMGT	Natural	Viable offspring	Xiao et al., 2006
Bull		Sperm	DNA incubation	IVF	Embryos	Hoelker et al., 2007
Pig		Sperm	Transgen/ICSI	ICSI	Embryos	Miao et al., 2007
Mouse	ICR	Spermatogonial stem cell	RVT	IVF	Viable offspring	Takehashi et al., 2007
Mouse	Kunming	Ovary	OMGT	Natural	F ₂ offspring	Yang et al., 2007
Mouse and goat	B6C3	Testis	RVT	IVF	Embryos	Honaramooz et al., 2008
Pig	Landrace	Sperm	DNA incubation	AI	Viable offspring	Wu et al., 2008

AI, artificial insemination; EP, electroporation; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, *in vitro* fertilization; LPD, liposome-peptide-DNA; OMGT, ovary-mediated gene transfer; REMI, restriction enzyme mediated insertion; ROSI, round spermatids injection; RVT, retroviral vector transduction; SCNT, somatic cell nuclear transfer; TMGT, testis-mediated gene transfer.

Πίνακας 2. (Συνέχεια) (*Journal of genetics and genomics* 35, 2008, 701-714).

2.2.4.2 Μηχανισμός πρόσληψης εξωγενούς DNA από τα σπερματοζώαρια

Το μεγάλο ερώτημα όμως ήταν αν η πρόσληψη εξωγενούς DNA από τα σπερματοζώαρια ήταν ένα τυχαίο φυσικό γεγονός. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν εκτενείς μελέτες σε ποντίκια, που έδειξαν πως τα μόρια DNA δεν προσδένονται τυχαία στα σπερματοζώαρια, αλλά έχουν μία επιλεγμένη θέση πρόσδεσης που εντοπίζεται στο τέλος του ακροσώματος της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Η κύρια ιδιότητα η οποία φαίνεται να επιτρέπει την πρόσδεση του μορίου DNA στη κεφαλή είναι το αρνητικό του φορτίο. Στην πραγματικότητα και άλλα αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια όπως ηπαρίνη και πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό φορτίο κάτω του 7 μπορούν να προσδεθούν στην ίδια θέση της κεφαλής του σπερματοζωαρίου με παρόμοιο τρόπο με αυτό του DNA [10].

Περαιτέρω μελέτες συμπλήρωσαν πως πέρα από το αρνητικό του φορτίο, ένα ακόμη στοιχείο που συμβάλλει στην πρόσδεση DNA είναι η παρουσία εξειδικευμένων πρωτεϊνικών υποδοχέων στην επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Υπάρχουν τρεις κύριες ομάδες πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA και λειτουργούν ως υποστρώματα για την αλληλεπίδραση DNA με την κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Εξ αυτών η ομάδα πρωτεϊνών 30- με 35-kDa είναι η μόνη με διατηρημένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα στα διάφορα είδη θηλαστικών (ποντικός, γουρούνι, βοοειδή και άνθρωπος), καθώς επίσης στα ψάρια και τα εχινοειδή [10] και η μόνη ομάδα πρωτεϊνών που προσδένει εξωγενές DNA σε μη επεξεργασμένα σπερματοζωάρια.

Κάποιες νέες μελέτες επίσης προτείνουν ότι οι πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II αποτελούν μέρος του μηχανισμού πρόσδεσης του DNA. Πράγματι, σπερματοζώαρια στα οποία είχε αφαιρεθεί το

γονίδιο που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες αυτές, εμφάνιζαν μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης DNA σε σύγκριση με αυτά του άγριου τύπου. Παρόλα αυτά, ο ρόλος των μορίων αυτών δεν έχει εξακριβωθεί καθώς η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων σε ώριμα σπερματοζωάρια δεν είχε λειτουργικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, έγινε η υπόθεση ότι η έκφραση των πρωτεϊνών του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II, είναι απαραίτητη μόνο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης ώστε να παραχθούν ώριμα σπερματοζωάρια ικανά να δεσμεύουν εξωγενές DNA [10].

Από την άλλη μεριά μελέτες υποστηρίζουν πως ένα τμήμα του προσδεμένου DNA εσωτερικεύεται μέσα στο σπερματοζωάριο και μπορεί να βρεθεί ακόμη και μέσα στον πυρήνα του. Αυτό το φαινόμενο, θα περίμενε κάποιος να το δει αν είχε εφαρμόσει την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης και των λιποσωμάτων προκειμένου να μεταφέρει το γενετικό υλικό στα σπερματοζωάρια. Με την απλή επώαση όμως των σπερματοζωαρίων με γυμνό DNA κάτι τέτοιο δεν είναι αναμενόμενο. Οι μελέτες που υποστηρίζουν τη θεωρία αυτή, προτείνουν ότι τα CD4 αντιγόνα πρωταγωνιστούν στην εσωτερίκευση και μεταφορά στον πυρήνα του εξωγενούς DNA, καθώς CD4 knock-out ποντίκια στερούνται αυτής της ιδιότητας [10].

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το ερώτημα, ότι αν τα σπερματοζωάρια μπορούσαν να δεσμεύουν τόσο εύκολα εξωγενές γεννητικό υλικό, πως θα μπορούσε να διατηρηθεί η ταυτότητα των προγόνων. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στο πεδίο αυτό, έδειξαν ότι τα σπερματοζωάρια στο εκσπερμάτισμα είναι αδιαπέραστα σε εξωγενές DNA, εκτός αν αφαιρεθεί τελείως το σπερματικό πλάσμα. Το σπερματικό πλάσμα περιέχει τον παράγοντα αναστολής IF-1, που αποτρέπει τη δέσμευση εξωγενούς DNA στο 30- με 35-kDa DNA-προσδεόμενο υποδοχέα [10] και κατά συνέπεια το μετασχηματισμό των σπερματοζωαρίων.

Από τη στιγμή που το DNA εισέρχεται στον πυρήνα με την βοήθεια των 30- με 35-kDa πρωτεϊνών και των CD4 μορίων, απουσία του παράγοντα αναστολής IF-1, ενεργοποιείται ένα σηματοδοτικό μονοπάτι παρόμοιο με αυτό της απόπτωσης, το οποίο καταστρέφει τόσο το εξωγενές γενετικό υλικό όσο και το ίδιο το κύτταρο. Εντούτοις, το μονοπάτι αυτό έχει βρεθεί ότι ενεργοποιείται μόνο στα σπερματοζωάρια της επιδιδυμίδας, καθότι η εισαγωγή εξωγενούς DNA στα ώριμα σπερματοζωάρια της εκσπερμάτισης δεν ενεργοποιεί κανένα αποπτωτικό μονοπάτι. Αυτή η παρατήρηση προσθέτει νέες πληροφορίες στους περίπλοκους μηχανισμούς διατήρησης της γενετικής ακεραιότητας των προγόνων, καθότι τα σπερματοζωάρια της επιδιδυμίδας που σε φυσιολογικές συνθήκες είναι πιο εκτεθειμένα σε εξωγενές γενετικό υλικό, αποκλείονται από περαιτέρω ωρίμανση μέσω του προαναφερθέντος μηχανισμού.

Μέσα στον πυρήνα, το εξωγενές DNA αναδιατάσσεται εκτενώς και κάποια στιγμή υποβάλλεται σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό με το γενωμικό DNA του σπέρματος. Μέχρι να λάβει χώρα ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός, το εξωγενές DNA παραμένει ως επίσωμα [42]. Οι θέσεις ενσωμάτωσης δεν φαίνεται να είναι συγκεκριμένες αν και όλες φέρουν παρόμοιες αλληλουχίες προτείνοντας ένα μηχανισμό πιο στοχευμένης ενσωμάτωσης, με το ένζυμο τοποϊσομεράση II να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του μη ομόλογου ανασυνδυασμού [10]. Πρόσφατα περιγράφηκε η πρόσληψη μορίων RNA από τα σπερματοζωάρια και

η ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα των σπερματοζωαρίων με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή που εκφράζεται φυσιολογικά στα σπερματοζωάρια των τρωκτικών [42].

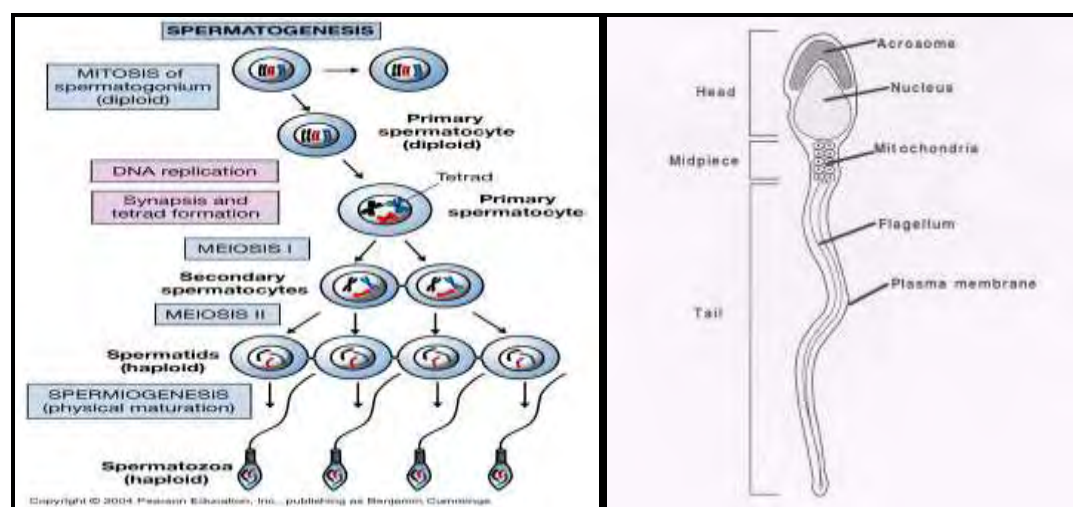
2.2.4.3 Δημιουργία διαγονιδιακών ζώων

Δεδομένου ότι τα σπερματοζωάρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν εξωγενές DNA, οι έρευνες στράφηκαν στην δημιουργία διαγονιδιακών ζώων, χρησιμοποιώντας ως φορέα μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου τα ίδια τα κύτταρα της ανδρικής γαμετικής σειράς.

Ο μετασχηματισμός των κυττάρων της ανδρικής γαμετικής σειράς μπορεί να γίνει τόσο στα ώριμα σπερματοζωάρια της εκσπερμάτισης όσο και στους όρχεις. Όσον αφορά τους όρχεις, ο μετασχηματισμός μπορεί να γίνει *ex vivo* αλλά και *in vivo*.

Ωριμα σπερματοζωάρια

Στα αρσενικά άτομα, μετά τον καθορισμό του φύλου τα γαμετικά κύτταρα εισέρχονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης (εικόνα 8). Τα μιτωτικά γαμετικά κύτταρα των όρχεων ονομάζονται σπερματογόνια. Τα κύτταρα αυτά υπόκεινται σε συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις και μετά τη τελευταία μιτωτική διαίρεση το αρσενικό γαμετικό κύτταρο ονομάζεται πρωτογενές σπερματοκύτταρο. Το πρωτογενές σπερματοκύτταρο υποβάλλεται σε 2 μειωτικές διαιρέσεις στο τέλος των οποίων παράγονται τέσσερις απλοειδείς σπερματίδες κάθε μία από τις οποίες θα ωριμάσει με την διαδικασία της σπερμιόγνεσης αποκτώντας την μορφή ώριμου σπερματοζωαρίου. Το ώριμο σπερματοζωάριο στο οποίο διακρίνονται τρία τμήματα κεφαλή, λαιμός και ουρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετασχηματισμό και δημιουργία διαγονιδιακών απογόνων.



Εικόνα 8. Διαδικασία σπερματογένεσης και ώριμο σπερματοζωάριο στο οποίο διακρίνονται η κεφαλή, ο λαιμός και η ουρά (Pearson Education, *Spermatogenesis*, 2004).

Η πρώτη τεχνική μετασχηματισμού των ώριμων σπερματοζωαρίων που πραγματοποιήθηκε το 1971 από τον Brackett et al, αφορούσε την απλή επώαση ανέπαφων σπερματοζωαρίων με τον σεσημασμένο με ^3H - θυμιδίνη DNA ιό SV40. Εμμένοντας στη λογική αυτή, οι μελέτες που ακολούθησαν προσπάθησαν να εξετάσουν την δημιουργία διαγονιδιακών απογόνων με απλή επώαση σπερματοζωαρίων και γυμνού (naked) DNA. Συνολικά σε 75 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε δύο ανεξάρτητα εργαστήρια, από το σύνολο των 1775 εμβρύων που δημιουργήθηκαν μόνο το 7% έφερε το επιθυμητό γονίδιο [10] αν και άλλες μελέτες με σπερματοζωάρια επεξεργασμένα με DMSO ανέβασαν το ποσοστό των διαγονιδιακών απογόνων στο 30% [43]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι μπορούσαν να δημιουργηθούν απόγονοι με τη μέθοδο αυτή αν και τα ποσοστά μετασχηματισμού δεν ήταν ικανοποιητικά.

Μέχρι και σήμερα, η πιο διαδεδομένη τεχνική μετασχηματισμού των σπερματοζωαρίων παραμένει η επώασή τους σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό παρουσία DNA, αφού προηγουμένως αφαιρεθεί το πλάσμα του σπέρματος. Σύμφωνα με πρόσφατη καινοτόμο προσέγγιση της μεθόδου αυτής, τα σπερματοζωάρια των ποντικών θανατώνονται με διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της κατάψυξης-απόψυξης και της έκθεσης στο Triton X-100, πριν την σύντομη επώαση με κλωνοποιημένο πλασμιδιακό DNA και στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα ώριμων ωοκυττάρων με τεχνική ICSI. Το 94% των βλαστοκύστεων που προκύπτουν 3.5 μέρες μετά την μικροέγχυση εκφράζουν το διαγονίδιο και το 17-20% των εμβρύων που γεννήθηκαν ήταν διαγονιδιακά. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή το 72% μεταβίβασαν το εισαγόμενο γονίδιο στους απογόνους της επόμενης γενιάς.

Η λογική που κρύβεται πίσω από την τεχνική αυτή είναι ότι με τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των σπερματοζωαρίων (κατάψυξης-απόψυξης και έκθεσης στο Triton X-100) προκαλείται διάρρηξη της σπερματικής μεμβράνης και κατάτμηση του πυρηνικού DNA σε μονόκλωνα τμήματα. Και τα δύο αυτά γεγονότα συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του εξωγενούς DNA με τις πυρηνικές δομές του σπερματοζωαρίου, ενισχύοντας την σταθερή ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ωοκυττάρου και κατ'επέκταση του εμβρύου. Συνεπώς, με το να διευκολύνεται η είσοδος εξωγενούς DNA στα σπερματοζωάρια, ενισχύεται το ποσοστό μετασχηματισμού [10].

Άλλες μελέτες στράφηκαν στις τεχνικές ηλεκτροδιάτρησης και λιποσωμάτων προκειμένου να ενισχύσουν την δέσμευση εξωγενούς DNA στις κεφαλές ώριμων σπερματοζωαρίων.

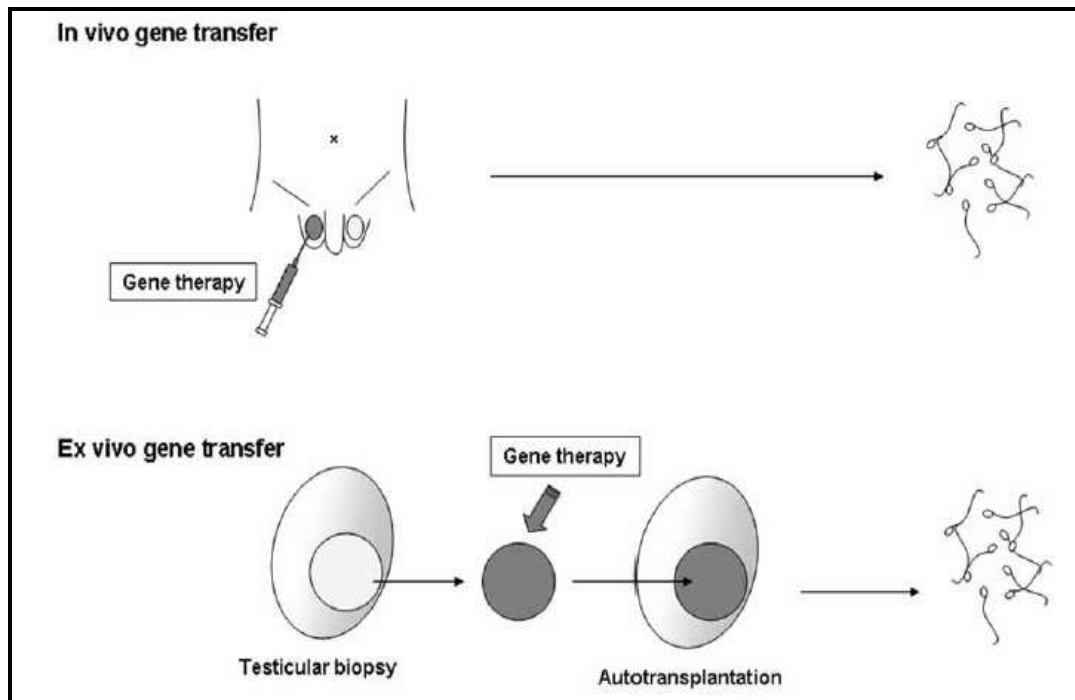
Η τεχνική ηλεκτροδιάτρησης, αυξάνει παροδικά τη διαπερατότητα της μεμβράνης της κεφαλής των σπερματοζωαρίων και κατά συνέπεια και τη δυνατότητα πρόσληψης εξωγενούς γενετικού υλικού, σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα σπερματοζωάρια [43]. Ο Gagne et al. [44] δημοσίευσε πως με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης το ποσοστό πρόσδεσης του DNA στις κεφαλές των σπερματοζωαρίων αυξήθηκε κατά 5-10%. Το ποσοστό όμως των εμβρύων που αναπτύχθηκαν πέρα από το στάδιο των 16 κυττάρων μειώθηκε πάνω από 50% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Από την άλλη μεριά, με την τεχνική της μεταφοράς γενετικού υλικού μέσω λιποσωμάτων, το αρνητικά φορτισμένο DNA αλληλεπιδρά με θετικά φορτισμένα κατιονικά λιπίδια και το θετικά πια φορτισμένο σύμπλεγμα DNA-λιπιδίων δεσμεύεται πιο εύκολα από την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη της κεφαλής των σπερματοζωαρίων ενισχύοντας την εσωτερίκευση του εξωγενούς DNA [43]. Εντούτοις, παρά την αποδοτικότητα της μεθόδου και των υψηλών ποσοστών ανάπτυξης των γονιμοποιημένων εμβρύων μετά την ICSI, δεν ήταν δυνατή η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων. Σύμφωνα με τον Ball et al. [45] σε έμβρυα 7-10 ημερών που δημιουργήθηκαν με αυτήν την τεχνική, υπήρχε μηδενική έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου. Σε μία άλλη μελέτη σε ποντίκια [46], τα αποτελέσματα είναι κοινά καθώς έκφραση του επιθυμητού γονιδίου δεν μπορούσε να ανιχνευθεί σε έμβρυα 10 ημερών αν και η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του εμβρύου είχε πιστοποιηθεί με τεχνική PCR.

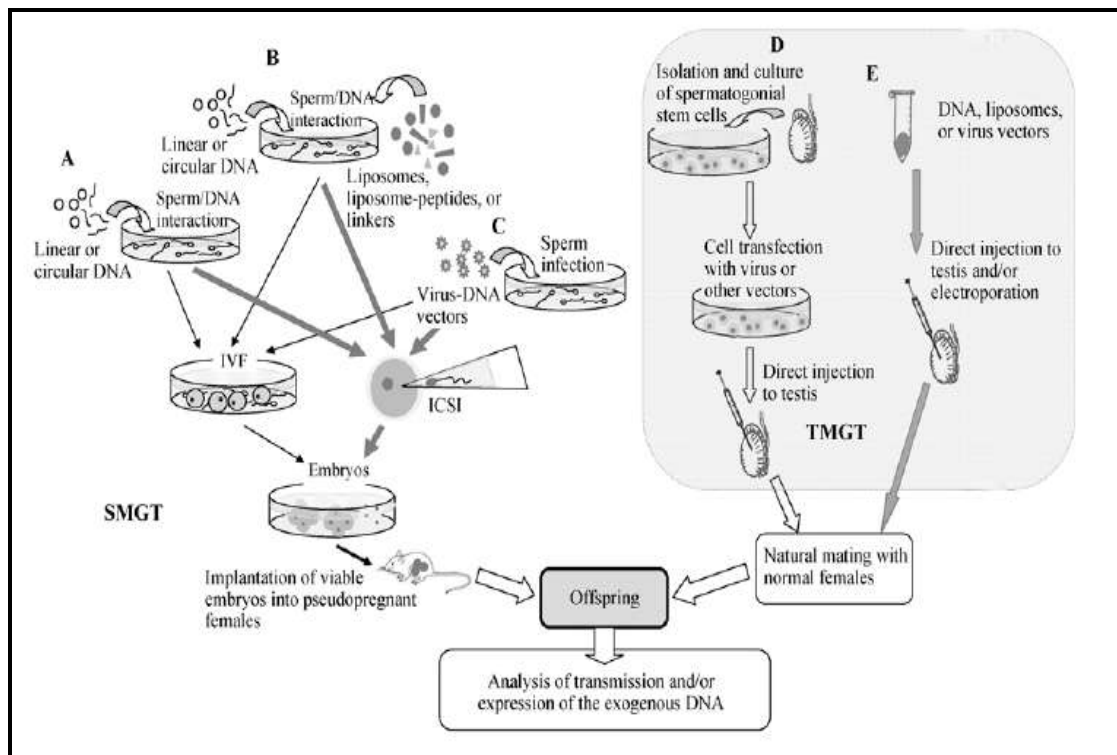
Όρχεις

Οι όρχεις είναι αναπαραγωγικό όργανο του άρρενα με δύο κύριες λειτουργίες: παραγωγή σπέρματος και έκκριση απαραίτητων στεροειδών ορμονών για την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Αποτελείται από τρεις κατηγορίες κυττάρων, τα γαμετικά κύτταρα, τα κύτταρα Sertoli και τα κύτταρα Leydig. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες κυττάρων ρυθμίζουν την ωρίμανση των γαμετικών κυττάρων μέσα στα σπερματικά σωληνάρια των όρχεων (εικόνα). Τα γαμετικά κύτταρα των όρχεων μπορούν να αποτελέσουν στόχο γονιδιακής θεραπείας με σκοπό την παραγωγή ανασυνδυασμένων ώριμων σπερματοζωαρίων και κατ' επέκταση διαγονιδιακών ατόμων.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι μεταφοράς γονιδίου στους όρχεις: η *in vivo* μεταφορά και η *ex vivo* μεταφορά (Εικόνα 10) [43]. Στην *in vivo* μεταφορά γίνεται απευθείας μικροέγχυση του επιθυμητού DNA μέσα στα σπερματικά σωληνάρια των όρχεων ενώ στην *ex vivo* μεταφορά σπερματικά κύτταρα απομονώνονται από τους όρχεις, μετασχηματίζονται *in vitro* με επώαση επιθυμητού DNA και στη συνέχεια μεταμοσχεύονται ξανά πίσω σε αυτόν [41,43]. Τόσο στην *in vivo* όσο και στην *ex vivo* τα συστήματα μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου που χρησιμοποιούνται είναι τα ίδια και αφορούν την εισαγωγή γυμνού DNA (naked DNA), τα λιποσώματα, την ηλεκτροδιάτρηση και τους RNA ιούς (ρετροϊούς-λεντοϊούς)(Εικόνα 11) [41,43,21].



Εικόνα 9. Τρόποι εφαρμογής γονιδιακής θεραπείας στους όρχεις (*Current Gene Therapy, 2008, Vol.8, No 2*).



Εικόνα 10. Σύνοψη μεθόδων μετασηματισμού κυττάρων ανδρικής γαμετικής σειράς (*Journal of Genetics and Genomics 35, 2008, 701-714*).

Βιβλιογραφικά, η εισαγωγή γυμνού DNA (naked DNA) απευθείας στον σπερματικό πόρο έχει σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή εξωγενούς DNA στα σπερματοζωάρια σε ποσοστό της τάξης του 60-70%. Μετά το ζευγάρωμα αυτών των αρσενικών ατόμων με θηλυκά που δεν φέρουν το επιθυμητό γονίδιο, προέκυψαν απόγονοι από τους οποίους το 7.5% έφεραν στο γονιδίωμα τους το επιθυμητό γονίδιο, όπως πιστοποιήθηκε με τεχνική PCR. Η έκφραση του διαγονιδίου πιστοποιήθηκε μόνο σε μερικούς ιστούς [43].

Αρκετές μελέτες δημοσιεύθηκαν σχετικά με την μεταφορά γονιδίων στους όρχεις μέσω λιποσωμάτων. Τα αποτελέσματα στον ποντικό δείχνουν ότι είναι δυνατή η μεταφορά σε ποσοστό 40-60%, αλλά με την πάροδο του χρόνου η παρουσία του διαγονιδίου περιορίζεται στις πιο ανώριμες μορφές των σπερματοζωαρίων. Η μεταφορά του διαγονιδίου στο έμβρυο μετά από γονιμοποίηση ανευρίσκεται σε ένα ποσοστό 80% στο στάδιο του μοριδίου αλλά πέφτει σημαντικά με τη πρόοδο της ανάπτυξης [43]. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η μεταφορά πλασμιδιακού DNA στους όρχεις με την τεχνική αυτή είναι εφικτή, συγκεκριμένα δε στην επιδιδυμίδα όπου αλληλεπιδρά με τα σπερματοζωάρια και τα μετασχηματίζει.

Όσον αφορά την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης, μετά την έγχυση του κλωνοποιημένου DNA στους όρχεις, προσαρμόζεται μηχανισμός ηλεκτροδίων που τους διαπερνά ρυθμικά με ηλεκτρικούς παλμούς 20-50V [43]. Η έκφραση του εξωγενούς γονιδίου παρατηρήθηκε στα σπερματογόνια, τα σπερματοκύτταρα και τις σπερματίδες 48h μετά την ηλεκτροδιάτρηση. Παρατηρήθηκε επίσης έκφραση σε σπερματοζωάρια που απομονώθηκαν από την επιδιδυμίδα, σε ποσοστό 65% μετά από 40 ημέρες. Στους απογόνους όμως των ατόμων αυτών δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του επιθυμητού γονιδίου [43].

Από την άλλη μεριά η χρήση RNA ών εμφανίζει διαφορούμενα αποτελέσματα καθώς υπάρχουν μελέτες στις οποίες έκφραση του εξωγενούς γονιδίου στα γαμετικά κύτταρα μετά την μικροέγχυση ρετροϊών στους όρχεις δεν ήταν δυνατό να ανιχνευτεί σε αντίθεση με άλλες οι οποίες προτείνουν τους ρετροϊούς ως ένα δυνατό εργαλείο στον τομέα της μεταφοράς γονιδίου στους όρχεις, καθώς παρήχθησαν διαγονιδιακοί απόγονοι σε ποσοστό 4,5% [43,21]. Η χρήση λεντοϊών, οι οποίοι μπορούν να εισέλθουν τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα φαίνεται να έχει πιο σταθερά αποτελέσματα. Οι όρχεις που μολύνθηκαν με τους λεντοϊούς, εκφράζουν το διαγονίδιο χωρίς να επηρεάζεται η γαμετογένεση. Έκφραση παρατηρήθηκε τόσο στα γαμετικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα Sertoli. Με απευθείας εισαγωγή των λεντοϊών στους όρχεις δεν προέκυψαν διαγονιδιακοί απόγονοι σε αντίθεση με την ex vivo επιμόλυνση των γαμετικών κυττάρων που κατέληξε στην παραγωγή διαγονιδιακών απογόνων σε ποσοστό 60%.

Τέλος μία καινούργια προσέγγιση της μεταφοράς γονιδίων στους όρχεις, προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα της χαμηλής ενσωμάτωσης και έκφρασης του διαγονιδίου τόσο στα γαμετικά κύτταρα όσο και στους απογόνους των ατόμων αυτών, προτείνει στοχευμένο μετασχηματισμό σπερματικών βλαστικών κυττάρων. Τα σπερματικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε πολύ μικρά ποσοστά στους όρχεις και αποτελούν το 0.2% με 0.3% του πληθυσμού των κυττάρων τους [47,48]. Είναι παρόμοια με τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, μπορούν να

μεταβιβάσουν την γενετική πληροφορία στην επόμενη γενιά και έχουν δυνατότητα αυτο-ανανέωσης. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες τεχνικές οι οποίες δεν έχουν ως συγκεκριμένο στόχο ένα μεμονωμένο τύπο σπερματοκυττάρων, η νέα αυτή προσέγγιση στοχεύει αποκλειστικά στο μετασχηματισμό τους, με βασικό της πλεονέκτημα την μόνιμη ενσωμάτωση και μεταβίβαση του διαγονιδίου σε όλα τα σπερματοζώαρια που παράγονται από το αρσενικό στη διάρκεια της ζωής του. Η τεχνική περιλαμβάνει απομόνωση και καλλιέργεια για δημιουργία κυτταρικών σειρών, στις οποίες εφαρμόζοντας πρωτόκολλα ανασυνδυασμένου DNA θα μπορούμε να εισάγουμε ή να απομακρύνουμε το επιθυμητό γονίδιο. Μεταμόσχευση των κυττάρων αυτών στους όρχεις δημιουργεί μετασχηματισμένα ώριμα σπερματοζώαρια με δυνατότητα μεταβίβασης του γονιδίου στην επόμενη γενιά [47,48].

Μελλοντικά, όλες αυτές οι τεχνικές θα μπορούσαν να έχουν μεγάλη εφαρμογή στην θεραπεία της ιδιοπαθούς ανδρικής υπογονιμότητας, της ανδρικής υπογονιμότητας λόγω ενδοκρινικών διαταραχών και υπογονιμότητας λόγω κρυπορχίας (πίνακας 3). Αναγκαία όμως κρίνεται οι διεκπεραίωση περισσότερων μελετών πριν την εφαρμογή των τεχνικών αυτών στον άνθρωπο.

	Present Treatment	Future Treatment
Idiopathic male infertility	TESE-ICSI	Gene Therapy
Varicocele Cryptorchidism	Surgery and/or TESE-ICSI	Surgery and/or Gene therapy
Endocrine disorders	Hormone therapy and/or TESE-ICSI	Hormone therapy and/or Gene therapy

Πίνακας 3. Μελλοντικές προοπτικές θεραπείας της ανδρικής υπογονιμότητας (*Current Gene Therapy, 2008, Vol.8, No 2*).

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύσταση του γονιδιώματος των οργανισμών παίζει κυρίαρχο ρόλο στην διαμόρφωση των χαρακτηριστικών τους. Μεταλλάξεις στην αλληλουχία του που επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών, μπορεί να προκαλέσουν γενετικές διαταραχές στους φέροντες οργανισμούς. Ενώ μέχρι σήμερα ήταν δυνατό να θεραπεύσουμε μόνο τα συμπτώματα μιας κληρονομικής ασθένειας, η γονιδιακή θεραπεία και οι σύγχρονες προσεγγίσεις της έρχονται να διορθώσουν τις αλλαγές αυτές και να θεραπεύσουν ριζικά τις εκάστοτε διαταραχές στη μοριακή τους βάση.

Η γονιδιακή θεραπεία της γαμετικής σειράς και των εμβρύων αρχικού σταδίου, είναι μία τέτοια ελπιδοφόρα προσέγγιση που υπόσχεται δημιουργία υγιών διαγονιδιακών ατόμων με ικανότητα μεταβίβασης της θεραπευμένης γενετικής τους πληροφορίας στους απογόνους τους.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού αναπτύχθηκε σειρά μοριακών και φυσικών τεχνικών όπως: α) μεταφορά γονιδίου σε έμβρυα αρχικού σταδίου με ανασυνδυασμένους ρετροϊούς και λεντοϊούς, β) μικροέγχυση DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου, γ) γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου σε βλαστικά κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου και δ) μεταφορά γονιδίων μέσω σπερματοζωαρίων (sperm mediated gene transfer).

Στην επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες για κάθε μία προσέγγιση που προβάλλουν τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματα εκάστης. Δυστυχώς δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες συγκριτικής αξιολόγησης των μεθόδων που να υποστηρίζουν μια μέθοδο επιλογής. Από τα δεδομένα όμως που υπάρχουν, φαίνεται να έχουν προβάδισμα η μικροέγχυση DNA απευθείας στον προπυρήνα γονιμοποιημένου ωαρίου και η μεταφορά γονιδίων σε έμβρυα αρχικού σταδίου με ανασυνδυασμένους λεντοϊούς. Ο συνδυασμός των δύο αυτών τεχνικών ίσως θα μπορούσε να έχει ακόμη πιο θετικά αποτελέσματα από τη κάθε μέθοδο ανεξάρτητα.

Παρόλο αυτά δεν μπορούμε να απορρίψουμε τελείως και τις άλλες τεχνικές καθότι τόσο η μεταφορά γονιδίων σε βλαστικά κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας της βλαστοκύστης του εμβρύου όσο και η μεταφορά γονιδίου μέσω σπερματοζωαρίων έχουν κάποια αποτελεσματικότητα και σημαντικά πλεονεκτήματα. Το υψηλό όμως ποσοστό μωσαϊκισμού της πρώτης και το χαμηλό ποσοστό ενσωμάτωσης του διαγονιδίου της δεύτερης σε συνδυασμό με το υψηλό κόστος και το εξειδικευμένο προσωπικό που απαιτεί η διεκπεραίωσή της, είναι σημαντικά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν.

Ακόμη και αν μερικές τεχνικές φαίνεται μέχρι πρότινος να είναι πιο αποτελεσματικές από κάποιες άλλες, είναι γενικά αποδεκτό ότι τα δύο μεγαλύτερα εμπόδια των τεχνικών αυτών είναι το χαμηλό ποσοστό ενσωμάτωσης του εξωγενούς γονιδίου καθώς επίσης και το ακόμη πιο χαμηλό ποσοστό έκφρασής του.

Όσον αφορά το πρώτο, το εξωγενές γενετικό υλικό αφού εισέλθει στο κύτταρο στόχο, εκφυλίζεται ή αναδιατάσσεται πλήρως παραμένοντας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ως επίσωμα εκτός των χρωμοσωμάτων. Ενδεχομένως η παρουσία κάποιων στοιχείων που θα ενίσχυαν τον ομόλογο ή μη ομόλογο

ανασυνδυασμό του εξωγενούς DNA με το γονιδίωμα του κυττάρου στόχου, θα έλυνε το πρόβλημα αυτό. Κάποιες μελέτες που έχουν γίνει προς τη πλευρά αυτή δοκιμάζουν την λειτουργικότητα συστημάτων όμως του Cre-Lox, της Rec-A και των τρανσπονζονίων, που δεν αναφέρθηκαν επειδή τα δεδομένα που υπάρχουν είναι ασαφή.

Από τη άλλη μεριά, σχετικά με το πρόβλημα της χαμηλής έκφρασης, μία σημαντική παράμετρος που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη προκειμένου να γίνεται ορθή ανάλυση των αποτελεσμάτων που υπάρχουν στην βιβλιογραφία, είναι το στάδιο της ανάπτυξης του οργανισμού στο οποίο ελέγχεται η έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου καθώς επίσης και η μοριακή τεχνική ανίχνευσης που εφαρμόζεται. Και αυτό επειδή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης το μοτίβο έκφρασης διαφόρων γονιδίων αλλάζει και προσαρμόζεται ανάλογα με τις απαιτήσεις του οργανισμού την εκάστοτε χρονική στιγμή. Επίσης οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης τροποποιούν και καθορίζουν το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται στον οργανισμό σε μία δεδομένη χρονική στιγμή. Εξαιτίας αυτού ακόμη και αν η αλληλουχία DNA είναι ίδια σε όλα τα κύτταρα ο φαινότυπος και η λειτουργία τους διαφέρουν. Πρέπει συνεπώς ο έλεγχος της έκφρασης ενός διαγονιδίου θα πρέπει να γίνεται σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο την κατάλληλη χρονική στιγμή και να μην περιορίζεται στα αρχικά μόνο στάδια της ανάπτυξης, όπως στις περισσότερες μελέτες. Επιπρόσθετα η χρήση κατάλληλων υποκινητών και αλληλουχιών στοχευμένης μεταφοράς θα ενίσχυαν την διαδικασία ενσωμάτωσης του εξωγενούς γενετικού υλικού σε ειδικές θέσεις στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου ευνοώντας την έκφρασή του. Οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και έκφρασης του διαγονιδίου, θα πρέπει με τη σειρά τους να είναι πολύ ευαίσθητες και ειδικές. Θα πρέπει να έχουν την δυνατότητα να πιστοποιούν την ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου και όχι την παρουσία του ως επίσωμα στον πυρήνα ή ως υπολείμματα από την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη και να ανιχνεύουν το προϊόν έκφρασης ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Έτσι θα αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα.

Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι με την εισαγωγή γονιδίων σε γαμετικά κύτταρα και έμβρυα αρχικού σταδίου, παρεμβαίνουμε στο γεννητικό τους υλικό με σκοπό να τους αποδώσουμε κάποια νέα χαρακτηριστικά. Αποκτούμε με άλλα λόγια την δυνατότητα να προκαθορίζουμε την γενετική σύσταση ενός ατόμου καθώς επίσης και των απογόνων του. Η παρέμβαση μας θα πρέπει να περιορίζεται για θεραπευτικούς μόνο σκοπούς σε άτομα πάσχοντες ή φορείς κάποιας σοβαρής μονογονιδιακής κληρονομικής ασθένειας και όχι για τροποποίηση των χαρακτηριστικών τους για άλλους λόγους. Τέτοια μόνο προσέγγιση γονιδιακής θεραπείας είναι ηθικά αποδεκτή.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Benjamin Lewin, Genes, 2004
2. Κωνσταντίνος Τριανταφυλλίδης, Βιοτεχνολογία Ζώων, 2006
3. Tesarik J, Mendoza C. Treatment of severe male infertility by micromanipulation-assisted fertilization: an update. Front Biosci. 2007 Jan 1;12:105-14. Review
4. Borges E Jr, Rossi LM, Locambo de Freitas CV, Guilherme P, Bonetti TC, Iaconelli A, Pasqualotto FF. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. Fertil Steril. 2007 Feb;87(2):316-20. Epub 2006 Nov 1.
5. Anderson WF. Human gene therapy. Nature. 1998 Apr 30;392(6679 Suppl):25-30. Review.
6. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg, Principles of medical genetics, 2003
7. Smith KR. Gene therapy: theoretical and bioethical concepts. Arch Med Res. 2003 Jul-Aug;34(4):247-68. Review
8. T. R. ulicke, U. H. abscher. Gene manipulation and integrative physiology. Experimental Physiology (2000) 85.6, 589-601 Review
9. Yasuhiro Y. et al. 2007, Biology of reproduction, 77, 803-812
10. Gandolfi F. Sperm-mediated transgenesis. Theriogenology. 2000 Jan 1;53(1):127-37. Review
11. Smith KR. Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline. Int J Med Sci. 2004;1(2):76-91. Epub 2004 Jun 1.
12. Pereyra-Bonnet F, Gibbons A, Cueto M, Sipowicz P, Fernández-Martín R, Salamone D. Efficiency of sperm-mediated gene transfer in the ovine by laparoscopic insemination, in vitro fertilization and ICSI. J Reprod Dev. 2011 May;57(2):188-96. Epub 2010 Nov 10.
13. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S, BJORKEGREN E, Bayford J, Brown L, Davies EG, Veys P, Fairbanks L, Bordon V, Petropoulou T, Kinnon C, Thrasher AJ. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. Sci Transl Med. 2011 Aug 24;3(97):97ra80
14. Cavvazano-Calvo, 2000
15. Mueller C, Flotte TR. Gene therapy for cystic fibrosis. Clin Rev Allergy Immunol. 2008 Dec;35(3):164-78. Review.
16. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Dec;77(12):7380-4
17. Moreira PN, Pozueta J, Pérez-Crespo M, Valdivieso F, Gutiérrez-Adán A, Montoliu L. Improving the generation of genomic-type transgenic mice by ICSI. Transgenic Res. 2007 Apr;16(2):163-8. Epub 2007 Feb 16. Review.
18. Navarro J. et al Gene therapy and intracytoplasmic sperm injection 2008 Review
19. Mohamed S. et al nonviral gene therapy 2009 Review
20. De Laporte L, Cruz Rea J, Shea LD. Design of modular non-viral gene therapy vectors. Biomaterials. 2006 Mar;27(7):947-54. Epub 2005 Oct 21. Review.
21. Yidong N. et al Progress in gene transfer by germ cells in mammals 2008 Review
22. Youngsuk Y. et al Retroviral gene therapy 2005
23. Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. Curr Top Microbiol Immunol. 2010;343:195-224. Review.

24. Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science. 2001 Jan 12;291(5502):309-12
25. Μαργαρίτης X. Βιολογία κυττάρου 2004
26. Chan AW, Chong KY, Martinovich C, Simerly C, Schatten G. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. Science. 2001 Jan 12;291(5502):309-12
27. Li Y, Kniss DA, Lasky LC, Yang ST. Culturing and differentiation of murine embryonic stem cells in a three-dimensional fibrous matrix. Cytotechnology. 2003 Jan;41(1):23-35
28. Haisen-Bey-Abina et al.,2003
29. shroder et al 2002
30. Wu et al., 2003
31. Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010 Apr;58(2):107-19. Epub 2010 Feb 9. Review.
32. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science. 2002 Feb 1;295(5556):868-72. Epub 2002 Jan 10.
33. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19;99(4):2140-5.
34. Moysyadi S. et al use of intracytoplasmic sperm injection to generate transgenic animals 2009
35. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science. 2002 Feb 1;295(5556):868-72. Epub 2002 Jan 10.
36. Ikawa M et al generation of transgenic mice, 2002
37. Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. Hum Gene Ther. 1991 Spring;2(1):5-14. Review.
38. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? Physiol Genomics. 2007 Oct 22;31(2):159-73. Epub 2007 Aug 7. Review.
39. Bristen et al 1989
40. Εμβρυολογία του ανθρώπου, William J. Larsen,1996
41. Celebi C, Guillaudeux T, Auvray P, Vallet-Erdtmann V, Jégou B. The making of "transgenic spermatozoa". Biol Reprod. 2003 May;68(5):1477-83. Epub 2002 Dec 27. Review
42. Smith K, Spadafora C. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. Bioessays. 2005 May;27(5):551-62.
43. Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene transfer to sperm and testis: future prospects of gene therapy for male infertility. Curr Gene Ther. 2008 Apr;8(2):121-34. Review.
44. Gagné MB, Pothier F, Sirard MA. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. Mol Reprod Dev. 1991 May;29(1):6-15.
45. Ball BA, Sabeur K, Allen WR. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. Equine Vet J. 2008 Jan;40(1):76-82.
46. Sasaki S, Kojima Y, Kubota H, Tatsura H, Hayashi Y, Kohri K. [Effects of the gene transfer into sperm mediated by liposomes on sperm motility and fertilization in vitro]. Hinyokika Kiyō. 2000 Aug;46(8):591-5. Japanese.

47. Shinohara T, Kanatasu-Shinohara M. [Culture and genetic modification of mouse male germline stem cells]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2007 Dec;52(16 Suppl):2092-6. Review.
48. Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. Dev Growth Differ. 2010 Apr;52(3):303-10. Epub 2010 Feb 10. Review