



**Gesellschaft für
Versuchstierkunde**
Society for Laboratory
Animal Science

GV-SOLAS

Ausschuss für Genetik und Labortierzucht

Typen gentechnisch veränderter Tiere

Stand: Februar 2007

Inhalt

1	Einleitung
1.1	Definition
1.2	Zielsetzung
1.3	Allgemeiner Ablauf zur Erstellung transgener Tiere
2	Transgene
2.1	Nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom
2.1.1	Additiver Gentransfer
2.1.2	Gezielte Unterdrückung von Wirtsgenprodukten
2.1.3	Trap-Konstrukte
2.2	Homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom
2.3	Regulierbarkeit des Transgens
2.3.1	Transgeninduktion
2.3.2	Konditionale Mutagenese
3	Methoden zur Erstellung transgener Tiere
3.1	Transgenintegration durch nicht-homologe Rekombination
3.1.1	DNA-Mikroinjektion
3.1.1.1	Standardtechnik
3.1.1.2	Genotyp der Tiere
3.1.1.3	Technische Entwicklungen
3.1.2	Virale Vektoren
3.1.2.1	Standardtechnik
3.1.2.2	Genotyp der Tiere
3.1.3	Spermienvermittelter Gentransfer
3.2	Transgenintegration durch homologe Rekombination
3.2.1	Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
3.2.1.1	Standardtechnik
3.2.1.2	Genotyp der Tiere
3.2.1.3	Technische Entwicklungen
3.2.2	Somatischer Kerntransfer (Klonen)
3.2.2.1	Standardtechnik
3.2.2.2	Genotyp der Tiere
3.2.2.3	Technische Entwicklungen
4	Literatur
4.1	Übersichtsliteratur
4.2	Tierartspezifische Übersichtsartikel
4.3	Technische Entwicklungen

1 Einleitung

Die vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) veröffentlichten Versuchstierdaten zeigen, dass etwa ein Viertel der in Deutschland im Tierversuch verwendeten Mäuse transgene Tiere sind. Weitere transgene Tiere werden in nennenswertem Umfang vor allem in Tierversuchen mit Ratten und Fischen eingesetzt.

Das Genom transgener Tiere ist durch die Übertragung von Erbmaterial experimentell verändert. Transgene Tiere werden für Untersuchungen der Genfunktion und Genregulation im Gesamtorganismus (funktionale Genomanalyse), zur Erstellung von Krankheitsmodellen sowie zur Herstellung biologisch aktiver Proteine oder modifizierter Produkte tierischen Ursprungs (*gene farming*) verwendet. Hierfür wird *in vitro* ein versuchszweckspezifisches DNA-Konstrukt (Transgen) erstellt, das mit Hilfe von verschiedenen Transfermethoden in das Wirtsgenom übertragen werden kann. Je nach Versuchszweck ist mit jedem der ca. 30.000 Säugergene die Herstellung einer Vielzahl von verschiedenen transgenen Linien möglich.

1.1 Definition

Gentechnisch veränderte oder transgene Tiere sind durch die Übertragung von Erbmaterial (Transgen) experimentell hergestellte Mutanten, die in ihrem Erbgut verändert (Transgenintegration) sind. Tiere mit stabiler Erbgutveränderung in ihren Keimbahnzellen (Keimbahn-Gentransfer) und Funktionsfähigkeit des Transgens dienen zur Zucht von transgenen Linien. Die Transgenität wird durch den Nachweis des Transgens im Wirtsgenom festgestellt. Die Funktionalität des Transgens wird durch den Nachweis der vom Transgen abgeschriebenen mRNA, des entsprechenden Proteins (Transgenexpression) und/oder der durch das Transgen ausgelösten Veränderungen im Phänotyp des Wirtes geprüft. Die Verwendung einfach nachweisbarer Markergene (*reporter gene*) erleichtert die Identifizierung transgener Tiere mit funktionsfähigem Transgen.

Die Auswahl von Tierart und Tierstamm zur Erstellung transgener Tiere richtet sich nach dem jeweiligen Versuchsziel und umfasst neben den klassischen Laborsäugetern (Maus, Ratte, Kaninchen) auch Nutztiere (Schwein, Wiederkäuer) und weitere Wirbeltiere (Vögel, Amphibien, Fische).

Bei der Verwendung von Inzuchtstämmen lässt sich der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Phänotyp einer transgenen Linie durch die Erstellung kongener Stämme untersuchen. Dies geschieht durch die Rückkreuzung des Transgenlocus vom ursprünglichen Stamm (Donor) in einen neuen Stamm (Rezipient) über zehn Generationen. Danach ist der genetische Hintergrund im neu erstellten Stamm bis auf einen 20 cM langen Genomabschnitt, der den Transgenlocus enthält, ausgetauscht.

Die erstellten transgenen Linien sind systematisch auf mögliche Belastungen der Tiere zu untersuchen. Die international gültige Nomenklatur für transgene Linien ist im Internet einzusehen (<http://www.informatics.jax.org>).

1.2 Zielsetzung

Das Ziel eines Transgenexperiments bestimmt, welche Strategien und Techniken zur Konstruktion des Transgens und zum Gentransfer geeignet sind. Die experimentelle Mutation führt zu einem Funktionsgewinn durch das Transgen (*gain of function*) und/oder zu einem Funktionsverlust von Wirtsgenen (*loss of function*). Letzteres umfasst die Inaktivierung von spezifischen Gensequenzen (Gen-Knockout), definierte Genmodifikationen (Gen-Knockin),

die gezielte Unterdrückung der Synthese von Wirtsgenprodukten (Gen-Knockdown, *gene silencing*) sowie die umfassende zufällige Mutagenese des Wirtsgenoms durch die Integration von Transgenen (Insertionsmutagenese).

Die Transgenwirkung kann je nach Versuchsansatz gewebe- und/oder entwicklungsstufenspezifisch (spatio-temporal) sein. In ihrer Wirkung steuerbare Transgene können reversibel oder irreversibel funktionell aktiviert oder inaktiviert werden.

1.3 Allgemeiner Ablauf zur Erstellung transgener Tiere

Der Generierung transgener Tiere liegt folgender allgemeiner Ablauf zugrunde:

- Erstellen eines funktionsfähigen Transgens
- Einbringen des Transgens in das Genom von Wirtszellen. Je nach Technik werden hierfür Gameten und deren Vorläuferzellen, frühe Embryonalstadien, embryonale Stammzellen oder somatische Körperzellen verwendet.
- Erstellen von Embryonen aus diesen Zellen und/oder Embryotransfer in vorbereitete Empfängertiere (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen der Empfängertiere auf das Transgen im Wirtsgenom
- Zucht transgener Linien aus den transgenen Foundertieren
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

2 Transgene

Das *in vitro* mit Hilfe von Klonierungsvektoren erstellte, linearisierte Transgen besteht aus genomischer DNA oder rekombinanter DNA. Auf bakterielle Vektoren basierende Klonierungsvektoren sind vor der Verwendung des Transgens möglichst vollständig zu entfernen. Das Transgen kann für den ausgewählten Wirtsorganismus isogene, allogene und/oder xenogene DNA-Sequenzen, darunter auch funktionelle prokaryotische Genomsequenzen, enthalten. Transgene sind wenige kb bis mehrere 100 kb lang. Die zufällige und die gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom erfordern verschiedene Transgentypen.

Transgene sind vor ihrem Einsatz im Versuchstier in geeigneten *in vitro*-Systemen zu testen. Die Aussagekraft dieser Tests im Hinblick auf das Verhalten im *in vivo*-System ist jedoch begrenzt.

Die Funktionsfähigkeit des Transgens kann durch benachbarte endogene Sequenzen beeinflusst werden und ist damit wesentlich vom Integrationsort im Wirtsgenom abhängig (Positionseffekt). Zur zufälligen Transgenintegration in das Wirtsgenom eignen sich alle fünf etablierten Transfermethoden (siehe 3), während die gezielte Transgenintegration ins Wirtsgenom nur durch die Verwendung von embryonalen Stammzellen (siehe 3.2.1) oder des somatischen Kerntransfers (siehe 3.2.2) möglich ist.

Arbeiten zum Transgendesign umfassen im Wesentlichen die Optimierung der Regulationskontrolle der Transgenexpression z.B. in Form des rationalen Designs von regulatorischen Sequenzen.

2.1 Nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom

Die zufällige Transgenintegration in das Wirtsgenom durch nicht-homologe DNA-Rekombination wird zur Produktion von transgenspezifischer RNA und/oder

transgenspezifischen Proteinen (additiver Gentransfer) verwendet. Das Transgen kann ein oder mehrere versuchszweckspezifische Gene mit gleicher oder unterschiedlicher spatio-temporaler Expression enthalten. Trap-Konstrukte werden zur zufälligen Mutagenese des Wirtsgenoms verwendet.

2.1.1 Additiver Gentransfer

Transgene für den additiven Gentransfer bestehen aus den drei Basisdomänen (1) regulatorischer Abschnitt, (2) kodierende Region und (3) Terminationseinheit. (1) Der verwendete regulatorische Abschnitt bestimmt den Ort (ubiquitär oder zelltypspezifisch) und den entwicklungsstufenspezifischen Zeitpunkt (spatio-temporale Expression) sowie die Stärke und Dauer (konstitutiv, aktivierbar bzw. inaktivierbar; siehe 2.3.1) der Transgenexpression. Vollständige regulatorische Abschnitte mit *cis*-regulatorischen Elementen (Promotor im engeren Sinn, Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren) und *trans*-regulatorischen (*long-range*) Elementen (*enhancer*, *insulator*, *locus control region* [LCR], *repressor/silencer*) zeigen eine optimale Wirkung. (2) Die kodierende Region enthält das zu transkribierende Gen. Nichtkodierende Abschnitte mit regulatorischen Sequenzen und eine Exon/Intronstruktur sind für eine effektive Expression essentiell. (3) Die Transkriptionsterminationseinheit sorgt für die ordnungsgemäße Expression des Transgens.

Expressionskassetten besitzen getestete Regulations- und Terminationseinheiten sowie einen dazwischenliegenden DNA-Abschnitt (*multiple cloning site* [MCS]), in den die kodierenden Sequenzen der Wahl eingefügt werden können. Die Expression des Transgens ist damit mit einer gewissen Sicherheit voraussagbar.

Sequenzen, die abschirmende Eigenschaften (*insulator*, *matrix attachment region* [MAR], *scaffold attachment region* [SAR]) gegenüber dem naheliegenden Wirtsgenom besitzen, können zur Spezifität und Kopiezahlabhängigkeit der Transgenwirkung beitragen. Die Praxistauglichkeit dieser Sequenzen wird derzeit bearbeitet.

Eigenständig im Zellkern replizierende Transgene ohne Integration in das Wirtsgenom wie *mammalian artificial chromosomes* (MAC) zeigten bisher eine instabile Vererbung.

Die spatio-temporal gesteuerte Expression von toxischen Transgenprodukten führt zu Inaktivität bzw. Verlust definierter Zellen oder Zellkompartimente (genetische Zellablation).

2.1.2 Gezielte Unterdrückung von Wirtsgenprodukten

Zur gezielten Unterdrückung der Synthese von Wirtsgenprodukten (Gen-Knockdown, *gene silencing*) findet die RNA-Interferenz (RNAi) Verwendung. Dabei kodiert das Transgen die Expression von RNA-Molekülen, die spezifisch komplementäre mRNA-Moleküle der Wirtszelle inaktivieren. Das führt zur Verminderung oder zur kompletten Inhibierung der Produktion des entsprechenden Wirtsproteins. Die Effizienz der Spezifität und des Grades der Inaktivierung in transgenen Tieren durch diese Technik ist in Untersuchung.

2.1.3 Trap-Konstrukte

Trap-Konstrukte bestehen aus regulatorischen Elementen in verschiedenen Versionen (*enhancer*-, *promoter*-, *gene*-, *poly (A)-trap*) und Markergenen (*reporter gene*), und werden zur Auslösung von zufälligen Insertionsmutationen mittels nicht-homologer DNA-Rekombination im Wirtsgenom, typischerweise in embryonalen Stammzellen, verwendet. Auch retrovirale Vektoren werden als Trap-Konstrukte verwendet. Die Vektoren können bei

ihrer Insertion umfassende Rekombinationen im Wirtsgenom auslösen. Die mutanten Zellen können nach klonaler Kultivierung, Untersuchung auf die erfolgreiche Expression des Markergens und molekulargenetischer Analyse der durch die Integration des Trap-Konstruktes induzierten Mutation im Wirtsgenom zur Generierung transgener Tiere genutzt werden. Die transgenen Tiere dienen zur *in vivo*-Analyse der spatio-temporalen Aktivität der zufällig mutierten Wirtsgenomsequenzen (*loss of function*).

DNA-Transposons aus verschiedenen Spezies wie das zweiteilige *sleeping beauty* (SB)-System oder *piggyBac* (PB), stellen eine weitere Technik zur Auslösung zufälliger Insertionsmutationen im Wirtsgenom von Säugern dar.

2.2 Homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom

Zur gezielten Mutation endogener DNA-Sequenzen werden *in vitro* in embryonalen Stammzellen (siehe 3.2.1) bzw. in den für den somatischen Kerntransfer als Kernspender vorgesehenen Zelllinien (siehe 3.2.2) bekannte Genomabschnitte mit dem Transgen ausgetauscht. Dies geschieht durch die homologe Rekombination von zum Wirtsgenom identischen DNA-Abschnitten an beiden Seiten des Transgens (*gene targeting*). Die mit dem Transgen eingeführte Mutation ist in der Größe sehr variabel und reicht von Punktmutationen bis zu langen Genomabschnitten. Mit den *in vitro* gezielt mutierten Zellen werden dann transgene Tiere generiert.

Zur vollständigen Inaktivierung (Gen-Knockout) und zur definierten Modifikation (Gen-Knockin) von spezifischen Wirtsgenen ist die Erstellung eines rekombinanten Targeting-Vektors als Transgen notwendig. Voraussetzung zur Konstruktion von Targeting-Vektoren ist die Kenntnis der Basensequenz und Struktur des ausgewählten Wirtsgens (<http://www.ensembl.org>).

Für die standardisierte Produktion von transgenspezifischen Proteinen (additiver Gentransfer) mit Einbau des Transgens in einen definierten Ort des Wirtsgenoms stehen Targeting-Vektoren zur Verfügung, die als integrationsortsspezifische Expressionskassetten (siehe 2.1.1) genutzt werden können.

Ein Targeting-Vektor besteht aus DNA-Sequenzen, die isogen zu den für die gezielte Mutation vorgesehenen Zellen sind. Die Länge der zum ausgewählten Integrationsort des Wirtsgenoms homologen Sequenzen auf beiden Seiten des Transgens beträgt in der Regel 5-10 kb. Zwischen diese Sequenzen wird die beabsichtigte Mutation eingefügt. Der Targeting-Vektor enthält Markergene, die zur Selektion der Zellklone mit den gewünschten Veränderungen essentiell sind. Das positiv selektierbare Markergen verbleibt in der Regel im für die Erstellung der transgenen Tiere verwendeten Zellgenom.

Zur Erhöhung der Effizienz des *in vitro gene targeting* im Wirtsgenom ist die Verwendung verschiedener Rekombinationstechniken und viraler Vektoren in Untersuchung.

2.3 Regulierbarkeit des Transgens

Die Funktion von Transgenen, die zufällig in das Wirtsgenom integrieren (siehe 2.1), kann durch entsprechende regulatorische Elemente gesteuert werden. Eine Regulation der Transgenexpression ist transkriptional, translational oder posttranslational möglich. Bei Transgenen mit gezieltem Einbau in das Wirtsgenom (siehe 2.2) kann eine konditionale Mutagenese mit dem Ergebnis der gezielten Veränderung des Transgenlocus in den transgenen Tieren durchgeführt werden. Kombinationen der beiden Systeme sind möglich.

2.3.1 Transgeninduktion

Die Transgenexpression auf der Ebene der Transkription kann je nach Versuchsansatz spezifisch und reversibel spatio-temporal gesteuert werden. Dabei können die induzierbaren Transgene mit entsprechenden Promotorsequenzen funktionell aktiviert oder inaktiviert werden. Das Transgen zeigt im Ruhezustand eine geringe bis keine Funktionsfähigkeit, während nach der reversiblen Induktion eine erhöhte Funktionsfähigkeit vorhanden ist. Die Inaktivierung der Transgenfunktion wird in umgekehrter Richtung durchgeführt. Aus experimentellen Gründen ist eine möglichst vollständige Inaktivierung des induzierbaren Promotors wünschenswert. Das Erreichen dieser Eigenschaft ist zur Zeit in Arbeit.

Die Promotorkontrolle kann durch (1) Applikation von exogenen Substanzen oder durch (2) zweiteilige transgene Systeme erfolgen. Hierfür werden zwei transgene Linien benötigt, die jeweils einen Teil des Systems als Transgen enthalten. Nach der Erstellung doppelt transgener Tiere durch Kreuzung der beiden transgenen Linien geschieht die spatio-temporale Steuerung der Expression des einen Transgens durch die Verwendung von gewebe- und/oder entwicklungsstufenspezifischen Promotorsequenzen des zweiten Transgens, dessen Produkt mit seiner Interaktion mit dem Promotor des ersten Transgens die Aktivierung bzw. Inaktivierung auslöst. (3) Die Kombination der zweiteiligen transgenen Systeme und der exogen zugeführten Substanzen ist möglich. Durch Auslösung der Transgeninduktion mit synthetischen Substanzen oder spezie fremden Proteinen sind am ehesten zusätzliche unerwünschte Effekte im Gesamtorganismus zu vermeiden. Häufig sind Systeme unter Verwendung von Tetracyklinen oder Derivaten davon in Verwendung.

Zur Regulation der Transgenexpression auf der Ebene der Translation zeigen Arbeiten die prinzipielle Möglichkeit der Modulation der translationalen Termination durch Aminoglykosid-Antibiotika und weitere nichtantibiotische Substanzen. Durch Einfügen eines translationalen Terminationskodons kurz nach dem Startkodon im Transgen produzieren unbehandelte transgene Zellen kein vollständiges transgenspezifisches Protein. Ausgewählte Substanzen sind zur Unterdrückung dieser eingefügten *nonsense*-Mutation und damit zur effektiven Induktion der Produktion des transgenspezifischen Proteins in der Lage.

Eine mögliche Regulierung des Transgens auf Proteinebene stellt die Verwendung von Transgenen dar, die das zu untersuchende Protein in Verbindung mit einer destabilisierenden Domäne exprimieren, was zur Stabilität des Proteins nur bei Anwesenheit einer mit der destabilisierenden Domäne interferierenden Substanz führt. Die Verwendung dieses Systems als Gen-Knockin-Konstrukt zum Ersatz des endogenen Proteins (siehe 2.2) könnte eine „Proteinalternative“ zur RNA-Interferenz (siehe 2.1.2) darstellen.

2.3.2 Konditionale Mutagenese

Zur Untersuchung der spatio-temporalen Wirkung bestimmter Gene stehen induzierbare Systeme zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des Transgens (konditionale Mutagenese) zur Verfügung. Die Induktion bewirkt einen Gen-Knockout/-in und ist irreversibel. Diese Systeme sind prinzipiell auch bei Transgenen mit zufälliger Integration im Wirtsgenom anwendbar.

Hierfür werden zweiteilige Rekombinationssysteme wie das bakterielle *Cre/loxP*-System (*Cre* = *causes recombination*, *loxP* = *locus of crossover* (X) des Bakteriophagen P1) mit einem Temperaturoptimum von 37°C genutzt. Die *Cre*-Rekombinase katalysiert dabei die Rekombination des DNA-Abschnittes, der zwischen zwei kurzen identischen *loxP*-Erkennungssequenzen liegt. Hierfür müssen zwei transgene Linien etabliert werden: Eine

Linie mit der meist zelltypspezifischen Expression der *Cre*-Rekombinase als Transgen in der Regel mit zufälliger Integration im Wirtsgenom, und die zweite Linie mit der gezielten Flankierung des Zielgens im Wirtsgenom mit *loxP*-Sequenzen, was mit Hilfe von Targeting-Vektoren durchgeführt wird. Nach Kreuzung beider Linien erhält man doppelt transgene Tiere, in denen durch die *Cre*-Rekombinase die Rekombination ausgelöst wird. Die spatio-temporale Steuerung der konditionalen Mutagenese geschieht dabei durch die Verwendung von gewebe- und/oder entwicklungsstufenspezifischen Promotorsequenzen des *Cre*-Rekombinase-Transgens.

Untersuchungen zur Effizienz in Bezug auf Spezifität und Induktionsgrad dieser und ähnlicher Techniken wie das aus Hefen entstammende *Flp/FRT*-System sind in Arbeit. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Rekombinationssysteme sind die Erstellung von bis zu mehrere hundert kb langen Genomrekombinationen (Deletion, Inversion, Translokation), die Entfernung von Markergenen, Gen-Knockin-Anwendungen bzw. die Generierung von definierten Punktmutationen im Wirtsgenom.

Eine Induktion (siehe 2.3.1) des *Cre/loxP*-Systems durch die Verwendung entsprechender Promotorsequenzen der *Cre*-Rekombinase ist möglich.

3 Methoden zur Erstellung transgener Tiere

Die Funktionsfähigkeit des Transgens ist potentiell vom Integrationsort im Wirtsgenom abhängig (Positionseffekt). Die etablierten Transfermethoden umfassen die DNA-Mikroinjektion, virale Vektoren und den spermienvermittelten Gentransfer als Methoden des direkten Transgengentransfers mit dem Ergebnis der zufälligen Integration des Transgens in das Wirtsgenom (nicht-homologe DNA-Rekombination). Ist die gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom (homologe DNA-Rekombination) erforderlich, werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) oder somatischer Kerntransfer (Klonen) als indirekte Transfermethoden genutzt.

Nach der nicht-homologen DNA-Rekombination werden transgene Tiere, die die gentechnische Modifikation in einem Allel tragen, als hemizygot transgen bezeichnet. Nach der homologen DNA-Rekombination werden die aus den genetisch modifizierten Zellen erstellten transgenen Tiere, die die gentechnische Modifikation in einem Allel tragen, als heterozygot transgen bezeichnet. Transgene Tiere mit der experimentell erstellten Mutation in beiden Allelen werden unabhängig von der Art der DNA-Rekombination als homozygot transgen bezeichnet.

Im Vergleich zur geringen Effizienz der DNA-Mikroinjektion können lentivirale Vektoren, spermienvermittelter Gentransfer, fortgeschrittene ES-Zelltechnologien und somatischer Kerntransfer in Zukunft das Potential besitzen, bei der Generierung transgener Tiere die Versuchstierzahlen zu verringern. Die Etablierung dieser Techniken zur routinemäßigen Anwendung steht zum Teil noch aus.

Neue Techniken zur Erstellung transgener Tiere entstehen auch durch die Kombination von verschiedenen Transgentypen und/oder Transfermethoden (siehe 3.2.1.3).

3.1 Transgenintegration durch nicht-homologe Rekombination

Zur Generierung transgener Tiere mit zufälligem Einbau des Transgens in das Wirtsgenom eignen sich Transgene für den additiven Gentransfer (siehe 2.1).

3.1.1 DNA-Mikroinjektion

Die Mikroinjektion von DNA-Konstrukten ist die Standardmethode des additiven Gentransfers bei allen Wirbeltierspezies. Die Effizienz, d.h. die Anzahl der transgenen Nachkommen pro Anzahl der mikroinjizierten Embryonen, wird bei Labortieren mit 1-5 % angegeben.

3.1.1.1 Standardtechnik

Die Generierung transgener Tiere mittels DNA-Mikroinjektion umfasst folgende Schritte:

- Erstellung des Transgenkonstruktes
- Hormonelle Superovulation von Spendertieren
- Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
- Kontrolle der Begattung
- Gewinnung fertilisierter Eizellen aus dem Eileiter
- *In vitro*-Injektion des Transgens in die Vorkerne der Zygoten
- Transfer der Embryonen in die Eileiter von pseudoträchtigen, zyklussynchronisierten Empfängertieren (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

3.1.1.2 Genotyp der Tiere

Bis zu ein Viertel der Nachkommen der Empfängertiere zeigt die zufällige Integration von wenigen bis zu mehr als hundert Transgenkopien in der Regel in eine nicht segregierende Stelle des Wirtsgenoms. Der Transgenlocus kann vollständige und alterierte Transgenkopien in verschiedener Ausrichtung vermischt mit endogenen Wirtssequenzen enthalten. Das Wirtsgenom kann an den Transgen-Wirtsgenomübergängen Rekombinationen von mehreren kb Länge aufweisen.

Die transgenen Tiere (Founder = F0-Tiere) bestehen aus zwei Gruppen: Bei (1) hemizygot transgenen Tieren besitzen alle Zellen das Transgen an derselben Stelle in ihrem Genom, während bei (2) Mosaik-Tieren nur ein Teil der Zellen des Organismus das Transgen im Genom enthält. Nach Verpaarung der Foundertiere mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyptieren) treten bei Vorliegen der experimentell eingebrachten Mutation in den Keimzellen in der nachfolgenden F1-Generation hemizygot transgene und nicht-transgene Tiere auf. Foundertiere mit segregierenden Integrationsstellen lassen die Erstellung mehrerer transgener Linien zu. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten nach der Verpaarung hemizygot transgener F1-Wurfgeschwister in der F2-Generation homozygot transgene Tiere auf. Bei Verwendung von Inzuchtstämmen als genetischen Hintergrund sind alle homozygot transgenen Tiere einer Linie genetisch uniform. Nach Etablierung der ersten Generationen einer transgenen Linie sind Transgenlocus und Transgenexpression in der Regel stabil.

Integrationsort und Transgenlocus der transgenen Linien sind nicht vorherzubestimmen. Die potentiell verschiedene Funktionsfähigkeit des Transgens in den etablierten Linien eines Transgenprojektes macht die Erstellung und Untersuchung von mehreren Linien notwendig.

Bei der Anwendung von Methoden mit einem zufälligen Einbau des Transgens in das Wirtsgenom kommt es in einem geringen Prozentsatz der erstellten transgenen Tiere zur ungeplanten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation), was zu unvorhersehbaren, nicht transgenspezifischen Veränderungen des physiologischen Phänotyps der in der Regel betroffenen homozygot transgenen Tiere (rezessive Mutation) führen kann. Ist die Insertionsmutation in der heterozygoten und/oder homozygoten Ausprägung letal, treten ab dem betroffenen Entwicklungszustand keine hemizygot transgenen und/oder homozygot transgenen Tiere auf.

3.1.1.3 Technische Entwicklungen

Die Steigerung der Effizienz der DNA-Mikroinjektion war bisher wenig erfolgreich. Arbeiten zur Optimierung der Transgenexpression zielen auf die positionsunabhängige (siehe 2.1.1) und regulierbare (siehe 2.3.1) Funktion des Transgens.

3.1.2 Virale Vektoren

Verschiedene virale Vektoren werden zur Integration von Transgenen in das Wirtsgenom verwendet. Zur Erstellung transgener Wirbeltiere werden gentechnisch modifizierte virale Partikel benutzt. Retroviren stellen mit Hilfe viruseigener Enzyme aus ihrem RNA-Genom eine doppelsträngige DNA her und integrieren diese in das Wirtsgenom. Transgene Linien mit stabiler Integration des Genkonstrukts im Wirtsgenom und Funktionalität des Transgens werden derzeit vorzugsweise mit Hilfe von rekombinanten lentiviralen Vektoren erstellt.

3.1.2.1 Standardtechnik

Die Erstellung transgener Tiere mittels lentiviraler Vektoren erfolgt in folgenden Schritten:

- Erstellung eines DNA-Transgenkonstruktes
- Generierung der infektiösen lentiviralen Partikel, die das Transgen als Virusgenom in Form von RNA-Sequenzen enthalten, mit Hilfe von Verpackungskonstrukten in speziellen Zelllinien
- Hormonelle Superovulation von Spendertieren
- Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
- Kontrolle der Begattung
- Gewinnung fertilisierter Eizellen aus dem Eileiter
- Infektion der Zygoten (bzw. alternativ der unbefruchteten Eizellen mit anschließender *in vitro*-Fertilisation [IVF]) mit den rekombinanten retroviralen Partikeln durch die Injektion der lentiviralen Partikel in den perivitellinen Raum oder durch Koinkubation der Embryonen nach Entfernung der *Zona pellucida* mit den lentiviralen Partikeln
- Transfer der infizierten Embryonen in die Eileiter von pseudoträchtigen, zyklus-synchronisierten Empfängertieren (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

3.1.2.2 Genotyp der Tiere

Die Nachkommen der Empfängertiere können zu einem hohen Prozentsatz transgen sein, wobei Transgenkopien an mehreren segregierenden Stellen des Wirtsgenoms eines Foundertieres integriert sein können. Damit ist es möglich, mit einem Foundertier mehrere transgene Linien zu erstellen. Jede der zufälligen Integrationsstellen enthält eine Transgenkopie und zeigt am Transgen-Wirtsgenomübergang eine Rekombination des Wirtsgenoms in wenigen Nukleotiden.

Die transgenen Tiere (Founder = F0-Tiere) bestehen aus zwei Gruppen: Bei (1) hemizygot transgenen Tieren besitzen alle Zellen das Transgen an derselben Stelle in ihrem Genom, während bei (2) Mosaik-Tieren nur ein Teil der Zellen des Organismus das Transgen im Genom enthält. Nach Verpaarung der Foundertiere mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyptieren) treten bei Vorliegen der Erbgutveränderung in den Keimzellen in der nachfolgenden F1-Generation hemizygot transgene und nicht-transgene Tiere auf. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten nach Verpaarung hemizygot transgener F1-Wurfgeschwister in der F2-Generation homozygot transgene Tiere auf. Bei Verwendung von Inzuchtstämmen als genetischen Hintergrund sind alle homozygot transgenen Tiere einer Linie genetisch uniform.

Der Integrationsort der transgenen Linien ist nicht vorherzubestimmen. Die potentiell verschiedene Funktionsfähigkeit des Transgens in den etablierten Linien eines Transgenprojektes macht die Erstellung und Untersuchung von mehreren Linien notwendig. Bei der Verwendung von Methoden mit einem zufälligen Einbau des Transgens in das Wirtsgenom kommt es in einem geringen Prozentsatz der erstellten transgenen Tiere zur ungeplanten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation) (siehe 3.1.1.2).

Nachteile des Systems sind vor allem erhöhte Anforderungen an die Biosicherheitsvorkehrungen, die limitierte Länge der Transgene und ein möglicher Verlust der Funktionalität des integrierten Transgens in den folgenden Generationen. Die mögliche Verringerung der Transgenexpression im Laufe der weiteren Zucht der Linien ist in Untersuchung.

3.1.3 Spermienvermittelter Gentransfer

Der spermienvermittelte Gentransfer stellt eine einfache Methode zur Erstellung von transgenen Tieren dar. Bisher publizierte Ergebnisse zeigen die prinzipielle Möglichkeit der erfolgreichen Anwendung dieser Technologie beim Säuger, aber auch erhebliche Schwierigkeiten in der Etablierung und Reproduzierbarkeit der Technik, so dass dieses Verfahren bisher nicht praxistauglich ist.

Für den spermienvermittelten Gentransfer sind mehrere Methoden und Methodenkombinationen beschrieben, wobei die *in vitro*-Inkubation von Spermien bzw. deren Vorläuferzellen und dem Transgen mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden kann.

(1) Inkubation *in vitro* von Spermien und Transgen; anschließend *in vitro*-Fertilisation (IVF):

- Gewinnung von Spermien von fertilen Spendertieren
- Inkubation *in vitro* von Spermien und Transgen
- Gewinnung von Eizellen durch Superovulation von Spendertieren
- *In vitro*-Fertilisation (IVF) der unbefruchteten Eizellen mit den behandelten Spermien
- Transfer der fertilisierten Eizellen in vorbereitete, zyklussynchronisierte Empfängertiere

(2) Inkubation *in vitro* von Spermien und Transgen; anschließend direkte künstliche Besamung:

- Präparation von Spermien von fertilen Spendertieren
- Inkubation *in vitro* von Spermien und Transgen
- Künstliche Besamung von vorbereiteten Empfängertieren mit den behandelten Spermien

(3) Inkubation *in vitro* von Vorläuferzellen der Spermien und Transgen:

- Gewinnung von Vorläuferzellen der Spermien aus den Hoden von fertilen Spendertieren
- Inkubation *in vitro* von Zellen und Transgen
- Injektion der behandelten Zellen in die Hoden der Empfängertiere
- Anpaarung der Empfängertiere mit unbehandelten weiblichen Tieren

(4) Injektion des Transgens in die Hoden:

- Direkte Injektion des Transgens in die Hoden fertiler Tiere
- Verpaarung der Empfängertiere mit unbehandelten weiblichen Tieren

Bei der Verwendung dieser Methoden werden Nachkommen geboren, die zu einem hohen Prozentsatz transgen sein können. Die transgenen Tiere zeigen die zufällige Integration von Transgenkopien in eine oder mehrere segregierende Stellen des Wirtsgenoms. Die Transgenloci sind wenig untersucht.

Die transgenen Tiere (Founder = F0-Tiere) bestehen aus zwei Gruppen: Bei (1) hemizygot transgenen Tieren besitzen alle Zellen das Transgen an derselben Stelle in ihrem Genom, während bei (2) Mosaik-Tieren nur ein Teil der Zellen des Organismus das Transgen im Genom enthält. Nach Verpaarung der Foundertiere mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyptieren) treten bei Vorliegen der Erbgutveränderung in den Keimzellen in der nachfolgenden F1-Generation hemizygot transgene und nicht-transgene Tiere auf. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten nach Verpaarung hemizygot transgener F1-Wurfgeschwister in der F2-Generation homozygot transgene Tiere auf. Die Stabilität von Transgenlocus und Transgenexpression ist wenig untersucht.

Der Integrationsort der transgenen Linien ist nicht vorherzubestimmen. Die potentiell verschiedene Funktionsfähigkeit des Transgens in den etablierten Linien eines Transgenprojektes macht die Erstellung und Untersuchung von mehreren Linien notwendig. Bei der Verwendung von Methoden mit einem zufälligen Einbau des Transgens in das Wirtsgenom kommt es in einem geringen Prozentsatz der erstellten transgenen Tiere zur ungeplanten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation) (siehe 3.1.1.2).

3.2 Transgenintegration durch homologe Rekombination

Die gezielte Mutation des Genoms mittels homologer Rekombination (*gene targeting*) benötigt Targeting-Vektoren als Transgene (siehe 2.2) und wird häufig zur funktionellen Inaktivierung (Gen-Knockout) oder definierten Modifikation (Gen-Knockin) von bestimmten Genen verwendet.

3.2.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

Die Erstellung transgener Linien durch Übertragung gezielt mutierter ES-Zellen in Embryonen ist zur Zeit nur bei der Maus etabliert. ES-Zelllinien werden aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten gewonnen und sind nur von wenigen Inzuchtstämmen verfügbar. In der Regel werden ES-Zelllinien aus verschiedenen Sublinien des Inzuchtstammes 129 verwendet. Die homolog rekombinierten ES-Zellen liefern dabei Zellen

für die Entwicklung des entstehenden Individuums und haben das Potential zur Keimbahnbesiedlung.

3.2.1.1 Standardtechnik

- Die Generierung transgener Linien mit Hilfe von ES-Zellen umfasst folgende Schritte:
- Erstellung des Targeting-Vektors (Gen-Knockout/-in-Konstrukt) zur homologen Rekombination
 - *In vitro gene targeting* in ES-Zellen mit dem Ergebnis der heterozygoten homologen Rekombination in den selektierten Zellklonen
 - Hormonelle Superovulation von Spendertieren (z.B. BALB/c- oder C57BL/6-Inzuchtmäuse, um bei den Nachkommen die Fellfarbe als Marker der Transgenität zu nutzen (siehe 3.2.1.2))
 - Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
 - Kontrolle der Begattung
 - Präparation von Blastozysten aus dem Uterus
 - *In vitro*-Injektion der gentechnisch modifizierten ES-Zellklone in die Blastozysten (Alternative: Kokultivierung von homolog rekombinierten ES-Zellen mit Embryonen nach Entfernung der *Zona pellucida* [Aggregation])
 - Transfer der injizierten (bzw. aggregierten) Embryonen in pseudoträchtige, zyklussynchronisierte Empfängertiere (Ammen)
 - Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
 - Zucht von transgenen Linien
 - Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

3.2.1.2 Genotyp der Tiere

Ein geringer Anteil der Nachkommen der Empfängertiere ist transgen. Die transgenen Tiere (Founder = F0-Tiere) werden als Chimären bezeichnet und bestehen aus nicht-transgenen Zellen, die sich aus den Zellen der Blastozyste entwickeln, und aus transgenen Zellen, die von den injizierten (bzw. aggregierten), homolog rekombinierten ES-Zellen abstammen. Für bestimmte Kombinationen des genetischen Hintergrundes von ES-Zellen und Embryonen wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Beteiligung der homolog rekombinierten ES-Zellen an der Keimzellentwicklung (Keimbahnchimäre) nachgewiesen. Zur Identifizierung der transgenen Nachkommen werden neben der molekulargenetischen Untersuchung ES-Zellen und Blastozysten aus Mäusestämmen oder Mäuselinien mit unterschiedlicher Fellfarbe verwendet. Chimären sind somit an der Zweifarbigkeit des Fells zu erkennen, wenn dieses sowohl von nicht-transgenen als auch transgenen Zellen gebildet wird. Der Transgenlocus besteht aus der gewünschten Mutation, die in den für die Injektion bzw. Aggregation ausgewählten ES-Zellklonen verifiziert wurde.

Das Geschlecht der Chimären und dessen Funktionsfähigkeit ergibt sich aus dem meist männlichen Geschlecht der etablierten ES-Zelllinien und dem Geschlecht der zur Injektion bzw. Aggregation verwendeten Blastozysten.

Zur Etablierung einer transgenen Linie werden die Chimären mit nicht-transgenen Tieren z.B. des C57BL/6-Inzuchtstammes (Wildtypieren) verpaart. Im Falle der Beteiligung der transgenen Zellen an der Keimzellentwicklung (Keimbahnchimäre) treten in der F1-Generation neben nicht-transgenen Tieren zu einem unterschiedlichen Prozentsatz heterozygot transgene Tiere auf, die in ihrem genetischen Hintergrund F1-Hybriden der Inzuchtstämme 129 und C57BL/6 sind. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten

nach Verpaarung heterozygot transgener F1-Tiere in der F2-Generation homozygot transgene Tiere auf. Die fehlende genetische Uniformität macht häufig die Rückkreuzung der transgenen F2-Hybriden in einen Inzuchtstamm nötig, um nach zehn Generationen die weitgehende genetische Uniformität (siehe 1.1) der homozygot transgenen Tiere zu erhalten.

Gen-Knockouts sind meist rezessive Mutationen, so dass erst bei homozygot transgenen Tieren mit einem abweichenden Phänotyp zu rechnen ist. Abhängig von der erzeugten Mutation kann in homozygot transgenen Gen-Knockout-Tieren auch ein weitgehend normaler Phänotyp auftreten.

Die zur Übertragung in Embryonen ausgewählten ES-Zellklone mit der verifizierten Mutation können zufällige genetische Läsionen als Folge der *in vitro*-Kultur aufweisen, die den Phänotyp der transgenen Tiere beeinflussen können. Dies macht für jedes Transgenprojekt die Erstellung und Untersuchung von mehreren transgenen Linien erforderlich, die mit Hilfe von unabhängigen, gentechnisch modifizierten ES-Zellklonen erstellt wurden.

3.2.1.3 Technische Entwicklungen

Für die ES-Zelltechnologie wurden zahlreiche Modifikationen publiziert, deren Praxistauglichkeit in Untersuchung ist.

Durch die Erstellung von ES-Zellen, die die spezifische Mutation homozygot tragen, wurden Keimbahnchimären erstellt, die im Vergleich zum Standardverfahren in der F1-Generation die doppelte Anzahl an heterozygot transgenen Tieren erzeugen.

Eine Verbesserung des Systems kann in der Verwendung von spezifischen ES-Zellen aus F1-Hybriden und in deren Übertragung in vorbehandelte Embryonen (tetraploide Embryonen) bestehen. Da sich die tetraploiden Zellen praktisch nicht an der Entwicklung der Tiere beteiligen, treten in der F0-Generation ausschließlich transgene Tiere auf. Je nach Ausführung der Mutation in den ES-Zellen sind alle Tiere entweder heterozygot transgen oder homozygot transgen. Der Nachteil auch dieser Methodenvariante liegt bis jetzt in der fehlenden Uniformität des genetischen Hintergrundes bei den nachfolgend erstellten Generationen.

Die Heterogenität des genetischen Hintergrundes bei den nachfolgenden Generationen wurde durch die Verwendung von ES-Zellen und Embryonen aus zwei koinzogenen Inzuchtstämmen umgangen. Während die ES-Zellen vom normal pigmentierten C57BL/6-Inzuchtstamm stammen, wurden Blastozysten einer unpigmentierten, tyrosinase-mutanten C57BL/6-Sublinie verwendet.

Durch lasergestützte Penetration der *Zona pellucida* von Embryonen im Achtzellstadium und anschließende Injektion von genetisch modifizierten ES-Zellen aus Inzuchtstämmen wurden Foundertiere erstellt, die sich praktisch vollständig aus den übertragenen ES-Zellen entwickelten. Dies führt in den nachfolgend erstellten transgenen Linien zur Uniformität des genetischen Hintergrundes der Tiere.

Darüberhinaus wird bei der Maus und weiteren Spezies nach weiteren Zelltypen gesucht, die sich nach der gezielten Veränderung ihres Genoms an der Bildung der Keimbahn bei den Chimären beteiligen. Hierfür werden vor allem Vorläuferzellen der Keimzellen verwendet.

Eine erfolgreiche Methodenkombination bei der Maus stellt das *gene targeting* in spermatogonialen Stammzellen dar. Nach der Transplantation der gentechnisch modifizierten Zellen in die Hoden von Empfängertieren wurden transgene Nachkommen geboren. Darüberhinaus wurden nach *in vitro*-Differenzierung von unbehandelten ES-Zellen der Maus

männliche Gameten erzeugt, die nach intrazytoplasmatischer Injektion (ICSI) in Eizellen Nachkommen erbrachten. Dies stellt einen weiteren zukünftigen Ansatz zur Generierung transgener Tiere dar.

3.2.2 Somatischer Kerntransfer (Klonen)

Die Etablierung der Biotechnik des somatischen Kerntransfers ermöglicht in vielen Säugerarten inklusive der klassischen Labortiere Maus, Ratte und Kaninchen die Generierung von transgenen Tieren mit gezielten Mutationen. Gegenwärtig ist die Erfolgsrate des somatischen Kerntransfers bei den Labortieren gering.

3.2.2.1 Standardtechnik

Zur Generierung transgener Tiere mit Hilfe des somatischen Kerntransfers sind folgende Schritte notwendig:

- Erstellung des Targeting-Vektors (Gen-Knockout/in-Konstrukt) zur homologen Rekombination
- *In vitro gene targeting* in diploiden somatischen Kernspenderzellen mit dem Ergebnis des in der Regel heterozygoten Gen-Knockout/in in den selektierten Zellklonen
- Präparation von reifen Oozyten als Empfängerzellen
- Enukleation der Oozyten
- Transfer der gezielt mutierten Spenderzellen in die enuklierten Oozyten
- Oozytenaktivierung und Embryokultur
- Transfer der klonierten Embryonen in pseudoträchtige, zyklussynchronisierte Empfängertiere (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

3.2.2.2 Genotyp der Tiere

Alle Tiere der resultierenden F0-Generation sind transgen. Je nach Ausführung der gentechnischen Veränderungen in den Spenderzellen sind alle Tiere entweder heterozygot transgen oder homozygot transgen. Der Transgenlocus besteht aus der gewünschten Mutation, die in den für den Kerntransfer ausgewählten Zellklonen verifiziert wurde.

Bei den Tieren der F0-Generation ist wegen der auftretenden unkorrekten Reprogrammierung der übertragenen somatischen Zellkerne mit einem erhöhten Anteil an abnormer Prä- und Postnatalentwicklung zu rechnen. Foundertiere ohne offensichtliche transgen-unabhängige Veränderungen des normalen Phänotyps zeigen häufig in der molekulargenetischen Analyse unterschiedliche transgen-unabhängige Veränderungen der Expression endogener Gene. Bei intakter Fortpflanzungsfähigkeit der Foundertiere mit auffallenden, transgen-unabhängigen Veränderungen zeigen die Tiere der F1-Generation diesen Phänotyp in der Regel nicht mehr. Bei Verwendung von Inzuchtstämmen als genetischen Hintergrund sind alle homozygot transgenen Tiere einer Linie genetisch uniform.

Die als Kernspender ausgewählten Zellklone mit der verifizierten Mutation können zufällige genetische Läsionen als Folge der *in vitro*-Kultur aufweisen, die den Phänotyp der transgenen Tiere beeinflussen können. Dies macht für jedes Vorhaben die Generierung und

Charakterisierung von mehreren transgenen Linien erforderlich, die mit Hilfe von unabhängigen, gentechnisch modifizierten Zellklonen erstellt wurden.

3.2.2.3 Technische Entwicklungen

Die derzeitige Analyse der Reprogrammierung der somatischen Zellkerne kann Beiträge zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit und der Effizienz des somatischen Kerntransfers bei den Labortieren liefern. Weiterhin ist die Verwendung von verschiedenen Zelltypen als Kernspender und deren Vorbehandlung in Untersuchung. Zur Erhöhung der Effizienz des somatischen Kerntransfers wird auch die Reklonierung mit Zellen klonierter Embryonen oder Feten durchgeführt.

4 Literatur

4.1 Übersichtsliteratur

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) (2007) Erzeugung und Zucht transgener Tiere unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten. <http://www.bmelv.de>. In Vorbereitung

BVA/AVMA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement (2003) Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Lab Anim* 37, Suppl. 1

Geldermann H (2005) Tier-Biotechnologie. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Pinkert CA (2002) Transgenic animal technology: a laboratory handbook. Academic Press, London

Schenkel J (2006) Transgene Tiere. Springer-Verlag, Berlin

4.2 Tierartspezifische Übersichtsartikel

Bosze Z, Hiripi L, Carnwath JW, Niemann H (2003) The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Res* 12, 541-53 [Kaninchen]

Etches RJ (2006) The hard cell(s) of avian transgenesis. *Transgenic Res* 15, 521-6 [Vogel]

Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF (2005) Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet* 37, 1187-93 [Maus]

Hirsch N, Zimmerman LB, Grainger RM (2002) Xenopus, the next generation: X. tropicalis genetics and genomics. *Dev Dyn* 225, 422-33 [Frosch]

Niemann H, Kues W, Carnwath JW (2005) Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech* 24, 285-98 [Schwein, Wiederkäuer]

Rocha A, Ruiz S, Estepa A, Coll JM (2004) Application of inducible and targeted gene strategies to produce transgenic fish: a review. *Mar Biotechnol* 6, 118-27 [Fisch]

Tesson L, Cozzi J, Menoret S, Remy S, Usal C, Fraichard A, Anegon I (2005) Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res* 14, 531-46 [Ratte]

4.3 Technische Entwicklungen

Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG, Wandless TJ (2006) A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. *Cell* 126, 995-1004

Garcia-Otin AL, Guillou F (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci* 11, 1108-36

Gaszner M, Felsenfeld G (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7, 703-13

Heaney JD, Bronson SK (2006) Artificial chromosome-based transgenes in the study of genome function. *Mamm Genome* 17, 791-807

Hochedlinger K, Jaenisch R (2006) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441, 1061-7

Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T (2006) Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8018-23

Lavitrano M, Busnelli M, Cerrito MG, Giovannoni R, Manzini S, Vargiolu A (2006) Sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 18, 19-23

Meissner A, Jaenisch R (2006) Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn* 235, 2460-9

Mello CC, Conte D Jr (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-42

Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN, Mulligan RC (2006) Exogenous control of mammalian gene expression via modulation of translational termination. *Nat Med* 12, 1093-9

Pfeifer A (2006) Lentiviral transgenesis - a versatile tool for basic research and gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 535-42

Poueymirou WT, Auerbach W, Friendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Dore AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, Dechiara TM, Valenzuela DM (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 25, 91-9

Prawitt D, Brixel L, Spangenberg C, Eshkind L, Heck R, Oesch F, Zabel B, Bockamp E (2004) RNAi knock-down mice: an emerging technology for post-genomic functional genetics. *Cytogenet Genome Res* 105, 412-21

Raymond CS, Soriano P (2006) Engineering mutations: deconstructing the mouse gene by gene. *Dev Dyn* 235, 2424-36

Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M (2004) To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet* 20, 59-62

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond.
Nat Rev Genet 2, 756-68

Autoren: Ingrid Renner-Müller, Johannes Schenkel, Bernhard Aigner