



GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde
Society for Laboratory Animal Science

Fachinformation

**aus dem Ausschuss für Genetik und
Labortierzucht**

**Typen von mit gentechnischen
Methoden veränderten Tieren**

Stand April 2024

verfasst von:

Ingrid Renner-Müller, Johannes Schenkel, Bernhard Aigner

ISBN 978-3-943445-12-1

Inhaltsverzeichnis

1.	Vorbemerkung (2024).....	3
1.1.	Literatur zur Vorbemerkung.....	4
2.	Einleitung	5
2.1.	Definition	6
2.2.	Zielsetzung.....	7
2.3.	Allgemeiner Ablauf zur Generierung mutanter bzw. transgener Tiere.....	7
3.	Nicht-transgene Tiere mit gentechnisch induzierten, gezielten Mutationen.....	7
4.	Gentechnisch veränderte, transgene Tiere.....	9
4.1.	Transgene	10
4.1.1.	Nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom.....	10
4.1.1.1.	Additiver Gentransfer.....	10
4.1.1.2.	Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems als Transgen.....	11
4.1.1.3.	Gezielte Unterdrückung von Wirtsgenprodukten.....	12
4.1.1.4.	Trap-Konstrukte.....	12
4.1.1.5.	Transposons.....	13
4.1.2.	Homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom	13
4.1.3.	Regulierbarkeit des Transgens.....	14
4.1.3.1.	Transgeninduktion.....	14
4.1.3.2.	Konditionale Mutagenese	15
4.2.	Methoden zur Erstellung transgener Tiere.....	18
4.2.1.	Zufällige Transgenintegration durch nicht-homologe Rekombination.....	18
4.2.1.1.	DNA-Mikroinjektion.....	18
4.2.1.2.	Virale Vektoren.....	20
4.2.1.3.	Spermienvermittelter Gentransfer.....	21
4.2.2.	Gezielte enzymvermittelte Transgenintegration durch nicht-homologe oder homologe Rekombination.....	22
4.2.3.	Gezielte, nicht-enzymvermittelte Transgenintegration durch homologe Rekombination	24
4.2.3.1.	Embryonale Stammzellen (ES-Zellen).....	25
4.2.3.2.	Somatischer Kerntransfer (Klonen).....	28
5.	Ausgewählte Literatur.....	30
5.1.	Übersichtsliteratur	30
5.2.	Tierartsspezifische Übersichtsartikel	30
5.3.	Technische Entwicklungen	31

1. Vorbemerkung (2024)

In der biomedizinischen Forschung wird die gezielte experimentelle Veränderung des Genoms von Versuchstieren durch Mutation definierter endogener DNA-Sequenzen oder durch Einbau von experimentell übertragenem Erbmateriale heute überwiegend mit Hilfe artifizieller sequenzspezifischer Nuklease-Systeme wie vor allem dem CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9*)-System gentechnisch durchgeführt (Anzalone et al. 2020, Caso und Davies 2022, Wang und Doudna 2023). Damit kommen viele früher verwendete gentechnische Methoden zur Erzeugung genetisch veränderter Tiere nicht oder kaum mehr zur Anwendung. Jedoch werden diese Mutanten nach wie vor genutzt. Darüber hinaus werden mutante Tiere weiterhin mit den etablierten assistierten Reproduktionstechniken (ART) erstellt. Deswegen soll diese Fachinformation aus dem Jahr 2017 nach vor allem redaktioneller Durchsicht bis auf weiteres online öffentlich zugänglich bleiben.

Erstellung und Zucht genetisch veränderter Versuchstiere sollen weiterhin im Sinne der 3R des Tierschutzes durchgeführt werden (Buch et al. 2022, Zevnik et al. 2022). Eine Kryokonservierung von Gameten oder Embryonen mutanter Linien schützt vor unbeabsichtigten genetischen Veränderungen über die einzelnen Zuchtgenerationen durch die spontane Mutationsrate.

In der biomedizinischen Forschung ist die möglichst genaue Kenntnis der genutzten mutanten Versuchstiere sowie eine jederzeit kritische Betrachtung der damit erzielten Ergebnisse essenziell. Generell ist der Einsatz multipler Kontrollgruppen in Form von Wurfgeschwister-tieren notwendig, um unbeabsichtigte Effekte der einzelnen Einflussfaktoren auf die Ergebnisse zu kontrollieren. Neben den in dieser Fachinformation aus dem Jahr 2017 dargestellten kritischen Punkten für die einzelnen Methoden sollen deswegen nachfolgend vorab beispielhaft weitere essenzielle Punkte aus der seitdem publizierten Literatur aufgeführt werden, die zum einen unbeabsichtigte genetische Veränderungen und zum anderen unerwartete Phänotypen in mit verschiedenen Methoden erzeugten genetisch veränderten Tieren betreffen.

Unbeabsichtigte genetische Veränderungen in genetisch veränderten Versuchstieren wurden in einer Reihe von Publikationen beschrieben. So wurden eine unkorrekte Information der genetischen Veränderung und/oder unbeabsichtigte und unerkannte genetische Kontaminationen in mutanten Mauslinien nach Einsendung in internationale Mausmutanten-Repositorien nachgewiesen (Yoshiki et al. 2022). Ebenso wurden für einzelne Methoden wie z.B. die zufällige Integration von Transgenen ins Wirtsgenom (Goodwin et al. 2019) sowie für die Verwendung einzelner Transgenkomponenten wie z.B. der *human growth hormone* (hGH)-Kassette (De Faudeur et al. 2018) oder des *Cre/loxP*-Systems (Song und Palmiter 2018) unerkannte genetische Artefakte in entsprechenden mutanten Mauslinien festgestellt. Zur Prüfung auf solche unbeabsichtigten genetischen Veränderungen wurden Untersuchungen zur genetischen Validierung für die verschiedenen Methoden zur genetischen Modifikation beschrieben (Birling et al. 2022, Bunton-Stasyshyn et al. 2022).

Unerwartete Phänotypen in genetisch veränderten Tieren und den entsprechenden Kontrollen: Der Einsatz von Wildtyp-Wurfgeschwistern als Kontrolltieren bei gemeinsamer Haltung mit den entsprechenden mutanten Versuchstieren in einem Käfig zur Standardisierung der Haltungsfaktoren wurde bei Labormäusen durch die Beobachtung des sozialen Transfers von

phänotypischen Verhaltensweisen in Frage gestellt (Kalbassi et al. 2017, Smith et al. 2021). Daneben ist hierbei auch die Ausbildung von Hierarchieverhältnissen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren als möglicher Störfaktor zu berücksichtigen. Weitere Publikationen beschreiben für die Labormaus allgemeine Phänomene wie die genetische Kompensation (El-Brolosy et al. 2019) oder die biologische Plastizität durch Reinitiation der Translation oder *exon skipping* (Smits et al. 2019) und ihren Einfluss auf den entsprechenden mutanten Phänotyp.

1.1. Literatur zur Vorbemerkung

- Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. 2020 Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 38:824-844.
- Birling MC, Fray MD, Kasperek P, Kopkanova J, Massimi M, Matteoni R, Montoliu L, Nutter LMJ, Raspa M, Rozman J, Ryder EJ, Scavizzi F, Voikar V, Wells S, Pavlovic G, Teboul L. 2022. Importing genetically altered animals: ensuring quality. *Mamm Genome* 33:100-107.
- Buch T, Davidson J, Hose K, Jerchow B, Nagel-Riedasch S, Schenkel J. 2022. Reduktion der Zahl nicht verwendbarer Tiere in Versuchstierzuchten. <https://www.gv-solas.de/ausschuesse/>
- Bunton-Stasyshyn RK, Codner GF, Teboul L. 2022. Screening and validation of genome-edited animals. *Lab Anim* 56:69-82.
- Caso F, Davies B. 2022. Base editing and prime editing in laboratory animals. *Lab Anim* 56:35-49.
- De Faudeur G, Brouwers B, Schuit F, Creemers JWM, Ramos-Molina B. 2018. Transgenic artifacts caused by passenger human growth hormone. *Trends Endocrinol Metab* 29:670-674.
- El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Günther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio GIM, Takacs CM, Lai SH, Fukuda R, Gerri C, Giraldez AJ, Stainier DYR. 2019. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568:193-197.
- Goodwin LO, Splinter E, Davis TL, Urban R, He H, Braun RE, Chesler EJ, Kumar V, van Min M, Ndikum J, Philip VM, Reinholdt LG, Svenson K, White JK, Sasner M, Lutz C, Murray SA. 2019. Large-scale discovery of mouse transgenic integration sites reveals frequent structural variation and insertional mutagenesis. *Genome Res* 29:494-505.
- Kalbassi S, Bachmann SO, Cross E, Robertson VH, Baudouin SJ. 2017. Male and female mice lacking neuroligin-3 modify the behavior of their wild-type littermates. *eNeuro* 4:e0145-17.2017.
- Smith ML, Asada N, Malenka RC. 2021. Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. *Science* 371:153-159.
- Smits AH, Ziebell F, Joberty G, Zinn N, Mueller WF, Clauder-Münster S, Eberhard D, Savitski MF, Grandi P, Jakob P, Michon AM, Sun H, Tessmer K, Bürckstümmer T, Bantscheff M, Steinmetz LM, Drewes G, Huber W. 2019. Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. *Nat Methods* 16:1087-1093.
- Song AJ, Palmiter RD. 2018. Detecting and avoiding problems when using the cre–lox system. *Trends Genet* 34:333-340.
- Wang JY, Doudna JA. 2023. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science* 379:eadd8643.
- Yoshiki A, Ballard G, Perez AV. 2022. Genetic quality: a complex issue for experimental study reproducibility. *Transgenic Res* 31:413-430.
- Zevnik B, Jerchow B, Buch T. 2022. 3R measures in facilities for the production of genetically modified rodents. *LabAnimal* 51:162-177.

2. Einleitung

Die Generierung und Zucht mutanter Tiere ist durch die Weiterzucht von Tieren mit spontan auftretenden Mutationen sowie durch die experimentelle Veränderung des Genoms möglich. Die experimentelle Mutagenese kann ungezielt mit konventionellen Methoden (z.B. chemisch oder physikalisch) oder - wesentlich zielgerichteter - durch Anwendung von auf Gentechnik basierenden Methoden induziert werden. Die mit diesen Methoden induzierte Veränderung kann zu nicht-transgenen Tieren mit Mutationen definierter endogener DNA-Sequenzen (siehe 3) oder durch Einbau von experimentell übertragenem Erbmateriale zur Erstellung von transgenen Tieren (siehe 4) führen, die die Mutation stabil an die Nachkommen vererben. Genetisch veränderte Linien sind systematisch auf mögliche Belastungen der Tiere zu untersuchen.

Gentechnisch veränderte 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. Je nach Versuchszweck ist mit jedem der ca. 20.000 proteinkodierenden Säugergene und der weiteren, regulatorisch wirkenden Genomloci die Generierung einer Vielzahl von verschiedenen gentechnisch veränderten Linien möglich.

Die Erstellung neuer Tiermodelle in Form gentechnisch veränderter Tiere kann durch zwei komplementäre Ansätze erfolgen, den genbasierten Ansatz (*reverse genetics*) – was in der Regel der Fall ist - oder den phänotypbasierten Ansatz (*forward genetics*). Für den genbasierten Ansatz (*reverse genetics*) wird die Funktion einer definierten, versuchszweckspezifischen Genomsequenz modifiziert, um danach die Auswirkungen der experimentellen Veränderung auf den Phänotyp zu untersuchen. Der spezifische Phänotyp ist dabei nur eingeschränkt vorherzusehen. Für den phänotypbasierten Ansatz (*forward genetics*) kann durch zufällige Insertionsmutagenese mittels nicht-homologer DNA-Rekombination eine Anzahl von transgenen Tieren erzeugt werden, die auf einen versuchszweckspezifischen, mutanten Phänotyp untersucht werden. Mit den gentechnisch veränderten Tieren, die den gewünschten mutanten Phänotyp zeigen, werden gentechnisch veränderte Linien gezüchtet, in denen dann die ursächliche Mutation im Wirtsgenom gesucht wird. Dabei liegt in der Regel ein Funktionsverlust des Wirtsgenoms vor.

Die vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) veröffentlichten Versuchstierdaten zeigen, dass weit mehr als zwei Drittel der in Deutschland im Tierversuch verwendeten Tiere Mäuse sind. Über die Hälfte dieser Mäuse ist wiederum genetisch verändert. Weitere genetisch veränderte Wirbeltiere werden in nennenswertem Umfang vor allem in Tierversuchen mit Zebrabärblingen eingesetzt (<https://www.bmel.de>, <https://www.bf3r.de>).

Die gentechnikrechtliche Einordnung der durch Anwendung von auf Gentechnik basierenden Methoden (im weiteren Text auch als "gentechnisch" bezeichnet) erstellten nicht-transgenen Tiere (siehe 3) ist nicht Gegenstand des Manuskriptes. Gentechnisch induzierte Veränderungen in Tieren ohne entsprechende Keimbahnveränderungen und damit ohne Übertragbarkeit der induzierten Mutation auf die Nachkommen sind ebenso nicht Gegenstand des Manuskriptes.

2.1. Definition

Mit Hilfe von gentechnischen Methoden veränderte, nicht-transgene Tiere (siehe 3) können durch die Verwendung sequenzspezifischer Nukleasen (*designer nucleases*) erstellt werden, die eine gezielte Erbgutveränderung induzieren (*genome editing*), ohne dass es zum Einbau von Fremd-DNA in das Wirtsgenom kommt.

Transgene Tiere sind durch die Übertragung von Erbmaterial (Transgen) experimentell generierte Mutanten, die durch die Integration des Transgens in ihrem Erbgut verändert sind. Tiere mit stabiler Erbgutveränderung in ihren Keimbahnzellen (Keimbahn-Gentransfer) 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 Transgenexpression (transkribierte mRNA bzw. entsprechendes Protein) und/oder der durch das Transgen ausgelösten Veränderungen im Phänotyp des Wirtes geprüft. Für verschiedene Forschungszwecke kommen dabei auch einfach nachweisbare Markergene (*reporter genes*) als Transgene zum Einsatz. Selbst bei Verwendung solcher Markergene sind unbeabsichtigte Nebenwirkungen auf den Phänotyp des Tieres im Einzelfall nicht auszuschließen.

Die Auswahl von Tierart und Tierstamm zur Erstellung gentechnisch veränderter 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). Im Internet ist für die Labormaus eine Zusammenstellung der publizierten mutanten Linien zu finden, wobei für den additiven Gentransfer als Mutationsart nur ein Teil der publizierten Linien berücksichtigt ist (<https://www.informatics.jax.org>). Das hierbei verwendete Dokumentationsschema ist auch anderen Nutzern genetisch veränderter Tierlinien zu empfehlen.

Zur Erhebung valider Daten sind in einem Versuchsprojekt grundsätzlich parallel mehrere unabhängige gentechnisch veränderte Linien zu erzeugen und zu untersuchen, da bei allen verwendeten Techniken nicht-versuchszweckspezifische genetische und/oder epigenetische Veränderungen im Wirtsgenom der erzeugten gentechnisch veränderten Tiere auftreten können. Soweit diese Veränderungen nicht mit dem mutierten bzw. Transgenlocus gekoppelt vererbt werden, können sie durch Zucht mit Wildtyptieren aus dem Genom der gentechnisch veränderten Linie entfernt werden.

Für dieselbe experimentelle Veränderung des Genoms im genetischen Hintergrund verschiedener Labormausstämme ist das Auftreten unterschiedlicher phänotypischer Veränderungen beschrieben. Bei der Nutzung von Inzuchtstämmen lässt sich der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Phänotyp einer gentechnisch veränderten Linie auch durch die Erstellung kongener Stämme untersuchen. Dies geschieht durch die Rückkreuzung des mutierten bzw. Transgenlocus vom ursprünglichen Stamm (Donor) in einen neuen Stamm (Rezipient) über mindestens zehn Generationen. Danach ist der genetische Hintergrund im neu erstellten Stamm bis auf einen 20 cM langen Genomabschnitt (entspricht ca. 1% des Genoms), der den mutierten bzw. Transgenlocus enthält, ausgetauscht.

Die international gültige Nomenklatur für genetisch veränderte Linien ist im Internet beschrieben (<http://www.informatics.jax.org>)

2.2. Zielsetzung

Das Ziel eines Experiments mit gentechnisch veränderten Tieren bestimmt, welche Strategien und Techniken zur Erstellung der mutanten Tiere geeignet sind. Die experimentelle Mutation kann zu einem Funktionsgewinn durch das Transgen (*gain of function*) und/oder zu einem teilweisen oder vollständigen Funktionsverlust von Wirtsgenen (*loss of function*) führen. 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 zufällige Mutagenese des Wirtsgenoms durch die Integration von Transgenen (Insertionsmutagenese).

In gentechnisch veränderten, nicht-transgenen Tieren (siehe 3) ist in der Regel der teilweise oder vollständige Funktionsverlust von versuchszweckspezifischen Wirtsgenen (*loss of function*) das Ziel.

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.

2.3. Allgemeiner Ablauf zur Generierung mutanter bzw. transgener Tiere

Zur Generierung mutanter bzw. transgener Tiere werden assistierte Reproduktionstechniken (ART) als biotechnologische Verfahren angewandt, die bei den erstellten Foundertieren epigenetische Veränderungen hervorrufen und damit Veränderungen des Phänotyps zur Folge haben können. Der Erstellung liegt folgender allgemeiner Ablauf zugrunde:

- Erstellen eines sequenzspezifischen Nukleasesystems bzw. eines funktionsfähigen Transgens
- Einbringen des sequenzspezifischen Nukleasesystems bzw. Transgens in Wirtszellen aus Spendertieren. 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 scheinträchtige Empfängertiere (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen der Empfängertiere (Founder = F0-Tiere) auf die Mutation bzw. Integration des Transgens im Wirtsgenom
- Aufbau und Zucht gentechnisch veränderter Linien aus den gentechnisch veränderten Foundertieren
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der gentechnisch veränderten Linien

3. Nicht-transgene Tiere mit gentechnisch induzierten, gezielten Mutationen

Durch enzymvermittelte gentechnische Methoden kann an gezielten Stellen eine Erbgutveränderung (*site-specific recombination*) in Embryonen induziert werden, ohne dass es zum Einbau von Fremd-DNA in das Wirtsgenom kommt. In den gentechnisch veränderten, nicht-transgenen Tieren ist in der Regel der teilweise oder vollständige Funktionsverlust von spezifischen Wirtsgenen (*loss of function*) das Ziel. Dafür werden künstlich hergestellte

Endonuklease-Systeme mit Anteilen zur Bindung an spezifischen DNA-Sequenzen wie das CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9*)-System (bzw. in gleicher Weise funktionierende Klasse 2-CRISPR-Nuklease-Systeme), *Transcription activator-like effector*-gekoppelte Nukleasen (TALEN) oder Zinkfingergekoppelte Nukleasen (ZFN) konstruiert, die an ausgewählten Wirtsgenomsequenzen binden und dort Doppelstrangbrüche auslösen. Das CRISPR-Cas9-System besteht aus einem zweiteiligen System mit einem Enzym (Cas9) und einer kurzen versuchszweck- und sequenzspezifischen Nukleinsäure, und ist in der Regel in der Anwendung den beiden anderen Systemen überlegen. Durch die DNA-Reparatur über den Mechanismus des *non-homologous end joining* (NHEJ) entstehen mutante Tiere. In der Regel entstehen Mutationen mit einer Länge von wenigen Basenpaaren (*indels*) in der Region der Spaltstelle. Ort und Art der Mutation sind dabei nicht exakt zu steuern und sind in den erstellten Mutanten unterschiedlich. Weiterentwicklungen des CRISPR-Cas9-Systems zeigen unter Vermeidung von Doppelstrangbrüchen eine erhöhte Steuerbarkeit der Mutationsinduktion (*base editing*, *prime editing*). Es ist auch möglich, simultan mehrere Stellen im Genom eines Embryos gezielt zu mutieren.

Standardtechnik

Die Generierung der mutanten Tiere wird in der Regel mit Hilfe der Mikroinjektion in Zygoten durchgeführt und umfasst folgende Schritte:

- Erstellen des sequenzspezifischen Nuklease-Systems (CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN). CRISPR-Cas9 ist dabei in der Regel in der Anwendung den beiden anderen Systemen überlegen.
- Hormonelle Superovulation von Spendertieren
- Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
- Kontrolle der Begattung
- Präparation fertilisierter Eizellen aus dem Eileiter
- *in vitro*-Injektion des sequenzspezifischen Nuklease-Systems in die Vorkerne und/oder in das Zytoplasma der Zygoten (das CRISPR-Cas9-System wird dabei in Form von RNA-Molekülen oder Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen übertragen und nicht in Form von DNA-Konstrukten, bei denen nach unspezifischer Degradierung die zufällige Integration von DNA-Fragmenten in das Wirtsgenom möglich ist). Alternativ wird auch die Elektroporation als Übertragungsmethode verwendet.
- Transfer der Embryonen in die Eileiter von vorbereiteten scheinträchtigen Empfängertieren (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Mutationen im ausgewählten Genabschnitt mit anschließender Auswahl der geeigneten Mutationen für die Weiterzucht
- Zucht von mutanten Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der mutanten Linien

Bei der Labormaus wurde alternativ die prinzipielle Möglichkeit beschrieben, unter Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems die Elektroporation der frühen embryonalen Stadien direkt *in vivo* im operativ vorgelagerten Ovidukt der narkotisierten Spendertiere durchzuführen. Damit sind keine Empfängertiere notwendig, da die Nachkommen direkt von den

Spendertieren ausgetragen werden (GONAD, *Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery*; i-GONAD, *improved GONAD*)

Genotyp der Tiere

Ein erheblicher Teil der Nachkommen der Empfängertiere (Founder = F0-Tiere) kann Mutationen in der ausgewählten Gensequenz zeigen. Das Wirtsgenom weist dort in der Regel Mutationen von wenigen Basenpaaren (*indels*) auf. Die mutanten F0-Tiere bestehen aus zwei Gruppen: (1) Tiere mit einer Mutation in allen Zellen des Organismus, wobei heterozygot mutante Tiere, homozygot mutante Tiere, oder Tiere mit unterschiedlichen Mutationen auf beiden Allelen (biallelische Mutation, *compound heterozygosity*) auftreten können. (2) Bei Mosaik-Tieren enthält nur ein Teil der Zellen des Organismus die Mutation im Genom. Nach Verpaarung der mutanten Foundertiere mit Wildtyptieren treten bei Vorliegen der experimentell induzierten Mutation in den Keimzellen in der nachfolgenden F1-Generation heterozygot mutante und nicht-mutante Tiere auf. Liegt in der ausgewählten Gensequenz mehr als ein mutantes Allel in den Keimzellen der verpaarten Foundertiere vor, können die mutanten F1-Wurfgeschwister unterschiedliche Mutationen tragen. Hierbei wurde auch schon das Auftreten von mehr als zwei unterschiedlichen Mutationen in den Keimzellen eines Foundertieres beschrieben. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten nach der Verpaarung heterozygot mutanter F1-Wurfgeschwister, die dieselbe Mutation tragen, in der F2-Generation homozygot mutante Tiere auf. Bei Verwendung von Inzuchtstämmen als genetischen Hintergrund sind alle homozygot mutante Tiere einer Linie genetisch uniform.

Auch bei der Erstellung von gentechnisch veränderten, nicht-transgenen Tieren sind mehrere unabhängige Linien in einem Versuchsprojekt zu generieren und zu charakterisieren, um valide Daten erheben zu können. Off-target-Effekte der verwendeten Enzymsysteme wie das Auslösen von Mutationen an nicht ausgewählten Stellen des Wirtsgenoms oder unbeabsichtigter Einbau von Fremd-DNA sind möglich.

Bei Verwendung von Nukleasen mit Bindungsstellen in einiger Entfernung zueinander kann die Deletion des dazwischenliegenden Genomstückes ausgelöst werden.

4. Gentechnisch veränderte, transgene Tiere

Zur Erstellung transgener Tiere wird *in vitro* ein versuchszweckspezifisches DNA-Konstrukt (Transgen) erstellt, das mit Hilfe verschiedener Methoden in das Wirtsgenom übertragen werden kann.

Die gezielte enzymvermittelte Transgenintegration nach Koinjektion von Transgen und sequenzspezifischem Nuklease-System (CRISPR-Cas9 bzw. in gleicher Weise funktionierende Klasse 2-CRISPR-Nuklease-Systeme, TALEN, ZFN) sowie mit Weiterentwicklungen des CRISPR-Cas9-Systems ohne Auslösung von Doppelstrangbrüchen (*prime editing*) machen auch die Erstellung von Mutationen im Wirtsgenom möglich, die - im Vergleich zu spontan auftretenden Mutationen - die Verwendung von Transgenen in den gentechnisch erstellten, mutanten Tieren durch DNA-Sequenzierung nicht mehr erkennen lassen (siehe 4.2.2).

4.1. Transgene

Das *in vitro* mit Hilfe von Klonierungsvektoren und/oder durch künstliche DNA-Synthese erstellte Transgen besteht aus genomischer DNA oder rekombinanter DNA. Auf bakterielle Vektoren basierende Klonierungsvektorsequenzen 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 in der Regel wenige kb bis mehrere 100 kb lang. Besonders bei langen Konstrukten ist die intakte Integration in das Wirtsgenom zu überprüfen.

Die Funktionsfähigkeit des Transgens kann durch benachbarte endogene Sequenzen beeinflusst werden und ist damit wesentlich vom Integrationsort im Wirtsgenom abhängig (Positionseffekt). Mit Hilfe verschiedener Transfermethoden ist die zufällige oder die gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom möglich, dabei erfordert die gezielte Integration durch homologe Rekombination einen spezifischen Transgentyp, den Targeting-Vektor (siehe 4.1.2). Zur zufälligen Transgenintegration in das Wirtsgenom eignen sich alle etablierten Transfermethoden (siehe 4.2), während die gezielte Transgenintegration ins Wirtsgenom in der Regel entweder enzymvermittelt mit Hilfe sequenzspezifischer Nuklease-Systeme (siehe 4.2.2) oder nicht-enzymvermittelt unter Verwendung embryonaler Stammzellen (siehe 4.2.3.1) oder des somatischen Kerntransfers (siehe 4.2.3.2) durchgeführt wird.

Transgene können vor dem Einbringen in das Zieltier in geeigneten *in vitro*-Systemen getestet werden. Die Aussagekraft dieser Tests im Hinblick auf das Verhalten im *in vivo*-System ist jedoch begrenzt.

4.1.1. Nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom

Durch nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom kommt es zum zufälligen Einbau des Transgens in das Wirtsgenom; nur durch eine enzymvermittelte Transgenintegration ist eine nicht-homologe Rekombination auch an einer gezielten Stelle im Wirtsgenom (*site-specific recombination*) möglich (siehe 4.2.2). Die Transgenintegration in das Wirtsgenom durch nicht-homologe DNA-Rekombination wird zur Produktion von transgen-spezifischer RNA und/oder transgenspezifischen Proteinen (additiver Gentransfer) verwendet. Das Transgen kann ein oder mehrere versuchszwecksspezifische Gene mit gleicher oder unterschiedlicher spatio-temporalen Expression enthalten. Darüber hinaus kann das CRISPR-Cas9-System selbst als Transgen verwendet werden (siehe 4.1.1.2). Trap-Konstrukte werden zur zufälligen Mutagenese des Wirtsgenoms verwendet (siehe 4.1.1.4). Die Transposon-Technik ist eine ungezielte enzymvermittelte Methode des Gentransfers (siehe 4.1.1.5).

4.1.1.1. 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 Zeitpunkt bzw. die Dauer (konstitutiv oder entwicklungsstufenspezifisch; spatio-temporale Expression; aktivierbar bzw. inaktivierbar, siehe 4.1.3) sowie die Stärke der Transgen-expression. 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. Arbeiten zum Transgendesign umfassen im Wesentlichen die Optimierung der Regulationskontrolle der Transgenexpression. (2) Die kodierende Region enthält das zu transkribierende Gen. Nichtkodierende Abschnitte mit regulatorischen Sequenzen und eine Exon/Intron-Struktur begünstigen in der Regel die effektive Expression. Alternativ kann auch nicht-proteinkodierende RNA exprimiert werden (siehe 4.1.1.3, *gene silencing*). (3) Die Transkriptionsterminationseinheit sorgt für die ordnungsgemäße Expression des Transgens.

Wird ein endogenes Wirtsgen als Transgen zum additiven Gentransfer verwendet, ist eine Unterscheidung der Expression von Transgen und endogenem Gen auf Proteinebene entweder durch die Verwendung unterschiedlicher Allele oder durch Kopplung des Transgens an zusätzliche kurze, translatierte DNA-Sequenzen möglich. Dies dient der Bildung von zusätzlichen Epitopen (*peptide tags*) zum Nachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper, kann jedoch auch die Funktion des transgenen Proteins verändern.

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. In der Praxis zeigen diese Sequenzen unterschiedliche Ergebnisse. 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 Produkten bzw. von Rezeptoren toxischer Stoffe als Transgen (z.B. Diphtherietoxin bzw. Rezeptor des Diphtherietoxins) kann zur Inaktivierung bzw. zum Verlust (Ablation) definierter Zellen oder Zellkompartimente verwendet werden. Aus experimentellen Gründen ist dabei eine möglichst genaue Steuerbarkeit des Transgens essenziell.

4.1.1.2. Verwendung des CRISPR-Cas9-Systems als Transgen

Das CRISPR-Cas9-System (bzw. ein in gleicher Weise funktionierendes Klasse 2-CRISPR-Nuklease-System) kann selbst als DNA-Konstrukt zum additiven Gentransfer verwendet werden, um in den transgenen Tieren spatio-temporal Veränderungen im Wirtsgenom hervorzurufen. Da das zweiteilige CRISPR-Cas9-System aus dem Enzym (Cas9) und einer kurzen versuchszweck- und sequenzspezifischen Nukleinsäure besteht, können entweder beide Teile oder nur der Enzymteil Cas9 als Transgen verwendet werden. Bei Verwendung nur des Enzymteils Cas9 als Transgen ist die exogene Applikation der sequenzspezifischen Nukleinsäure notwendig. Bei Verwendung eines DNA-Konstruktes, das für ein aktives Cas9-Enzym kodiert, sollen in der Regel sequenzspezifische Mutationen in Form kurzer *Indels* erzeugt werden. Werden DNA-Konstrukte eingesetzt, die enzymatisch nicht-aktive Cas9-Proteine kodieren, kann in den transgenen Tieren mit Hilfe der Kopplung weiterer Effektoren

an die enzymatisch nicht-aktiven Cas9-Proteine eine sequenzspezifische Aktivierung oder Deaktivierung der Expression durchgeführt werden. Die spatio-temporale Kontrolle des Transgensystems erfolgt dabei entweder durch die Verwendung entsprechender Promotorsequenzen und/oder regulierbarer Systeme (siehe 4.1.3). *Off-target*-Effekte des verwendeten Systems sind möglich.

Bei Verwendung eines Transgens, bei dem die kodierenden Abschnitte für eine sequenzspezifische Nuklease (und mögliche weitere Gene, sog. *Cargo*-Gene) von Teilen seiner eigenen Zielsequenz flankiert werden, kommt es bei Vorliegen der vollständigen Zielsequenz im Wirtsgenom der generierten transgenen Organismen zur Auslösung eines sequenzspezifischen Doppelstrangbruchs durch die exprimierte Nuklease. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination an dieser Stelle, was zum Einbau des Transgens an der Stelle des Doppelstrangbruchs führt. Durch die Weitergabe des Transgens durch Selbstduplikation kann in diploiden Zellen sequenzspezifisch direkt ein homozygot transgener Genotyp zustande kommen. Nach Verbringen des Systems durch Verpaarung in eine Population ist damit eine sequenzspezifische genetische Modifikation der Population möglich („mutagene Kettenreaktion“, *gene drive*).

4.1.1.3. Gezielte Unterdrückung von Wirtsgenprodukten

Als post-transkriptionaler Ansatz werden im additiven DNA-Transfer DNA-Sequenzen zur Expression von nicht-proteinkodierenden, regulatorischen RNA-Sequenzen (ncRNA) eingesetzt.

Zur gezielten Unterdrückung der Synthese von Wirtsgenprodukten (Gen-Knockdown, *gene silencing*) findet die RNA-Interferenz (RNAi) Verwendung. Dabei kodiert das Transgen die Expression von natürlich vorkommenden oder künstlich entworfenen RNA-Molekülen, die spezifisch komplementäre mRNA-Moleküle der Wirtszelle inaktivieren, indem sie mit diesen RNA-Doppelstränge ausbilden, die daraufhin dem Abbau zugeführt werden. 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 ist in der Praxis unterschiedlich, die Durchführung einer kompletten Inaktivierung ist dabei schwierig.

4.1.1.4. Trap-Konstrukte

Trap-Konstrukte bestehen aus regulatorischen Elementen in verschiedenen Versionen (*enhancer*-, *promoter*-, *gene*-, *poly (A)-trap*) und Markergenen (*reporter gene*). Sie 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 an der Insertionsstelle umfassende Veränderungen 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 zufällig mutierten Wirtsgenomsequenzen (*loss of function*). Die so weltweit in mehreren Projekten erstellten mutanten Zellen sind in Onlinedatenbanken zusammengestellt:

<https://igt.c.org>; <http://www.mousephenotype.org>; <http://www.informatics.jax.org>

4.1.1.5. Transposons

Zum ungezielten enzymvermittelten Gentransfer werden zweiteilige DNA-Transposonsysteme verwendet, die aus verschiedenen Spezies stammen wie z.B. *sleeping beauty* (SB) oder *piggyBac* (PB). Das Transgen wird hier auf beiden Seiten von den Erkennungsstellen (*inverted terminal repeats*, ITR) des Enzyms Transposase flankiert. Bei der Transgenintegration an zufälligen Stellen werden im benachbarten Wirtsgenom nur geringe Veränderungen ausgelöst.

Für den additiven Gentransfer wird dabei in der Regel die DNA-Mikroinjektion von Transgen und Transposase mit zeitlich limitierter Funktion durchgeführt, was im Vergleich zur herkömmlichen Technik zu einer erhöhten Effizienz der Transgenintegration, der Integration von einzelnen Kopien an einer Stelle und multiplen segregierenden Integrationsstellen im Wirtsgenom führen kann (siehe 3.2.1.1). Im *in vivo*-Ansatz kann die Transgenlänge limitiert sein.

DNA-Transposons stellen auch eine weitere Möglichkeit zur Auslösung zufälliger Insertionsmutationen im Wirtsgenom von Säugern dar. Dabei werden zwei transgene Linien erstellt. Eine transgene Linie enthält das mit den Erkennungsstellen der Transposase flankierte Transgen, und die andere Linie enthält die Transposase selbst als Transgen. Durch Kreuzung und weitere Zucht der Tiere können transgene Nachkommen mit multiplen zufälligen Insertionsmutationen für deren Einsatz im phänotypbasierten Ansatz (*forward genetics*) generiert werden.

Bei der enzymvermittelten Entfernung des integrierten Transgens des *piggyBac* (PB)-Systems durch eine weitere Transposition ist die Möglichkeit der vollständigen Wiederherstellung des Wildtypallels beschrieben. Eine Weiterentwicklung der Transposon-Technik stellt ihr Einsatz in Kombination mit dem CRISPR-Cas9-System zur gezielten Transgenintegration dar.

4.1.2. Homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom

Die gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom wird zur Inaktivierung (Gen-Knockout) bzw. zur definierten Modifikation (Gen-Knockin) von spezifischen Wirtsgenen verwendet. Sie wird enzymvermittelt mit Hilfe sequenzspezifischer Nuklease-Systeme durch nicht-homologe oder homologe Rekombination (siehe 3.2.2) durchgeführt, was direkt in Embryonen oder indirekt unter Verwendung embryonaler Stammzellen (siehe 3.2.3.1) oder der für den somatischen Kerntransfer als Kernspender vorgesehenen Zelllinien (siehe 3.2.3.2) möglich ist. Als Transgene dienen hierbei in der Regel Targeting-Vektoren in Form doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA-Moleküle. Aufgrund der hohen Effizienz der sequenzspezifischen Nuklease-Systeme ist die Verwendung von Targeting-Vektoren ohne Markergene zur Selektion möglich, was auch die Erstellung von Mutationen im Wirtsgenom erlaubt, die - im Vergleich zu spontan auftretenden Mutationen - die Verwendung von Transgenen in den gentechnisch erstellten, mutanten Tieren durch DNA-Sequenzierung nicht mehr erkennen lassen (siehe 4.2.2).

Alternativ ist die nicht-enzymvermittelte, gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom *in vitro* durch homologe Rekombination mit Hilfe embryonaler Stammzellen (siehe 3.2.3.1) oder des somatischen Kerntransfers (siehe 3.2.3.2) möglich, die zwingend einen Targeting-Vektor als spezifischen Transgentyp erfordert und mit einer geringen Effizienz verbunden ist. Dabei werden zur gezielten Mutation endogener DNA-Sequenzen 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 DNA-Abschnitten. Mit den *in vitro* gezielt mutierten Zellen werden dann transgene Tiere generiert.

Voraussetzung zur Konstruktion von Targeting-Vektoren ist die Kenntnis der Basensequenz und Struktur des ausgewählten Wirtsgens (<http://www.ensembl.org>). Für die kontrollierte Produktion von transgenspezifischen Proteinen (additiver Gentransfer) mit Einbau des Transgens in eine definierte Position des Wirtsgenoms wie z.B. dem ROSA26-Locus stehen Targeting-Vektoren zur Verfügung, die als integrationsortspezifische Expressionskassetten (siehe 4.1.1.1) genutzt werden können.

Ein klassischer Targeting-Vektor als Transgen besteht auf beiden Seiten aus in der Regel einigen kb langen DNA-Sequenzen, die homologe Sequenzen zum ausgewählten Integrationsort des Wirtsgenoms zeigen und aus isogener DNA zu den für die gezielte Mutation vorgesehenen Zellen erstellt werden. Bei der Verwendung sequenzspezifischer Nuklease-Systeme funktionieren auch doppelsträngige oder einzelsträngige Targeting-Vektoren mit kurzen homologen DNA-Abschnitten. Zwischen diese Sequenzen wird die beabsichtigte Mutation eingefügt. Der Targeting-Vektor enthält Markergene, die zur Selektion der Zellklone mit den gewünschten Veränderungen essenziell sind. Das positiv selektierbare Markergen verbleibt in der Regel im für die Erstellung der transgenen Tiere verwendeten Zellgenom, kann aber bei entsprechend entworfenen Transgenkonstrukten auch wieder *in vitro* oder *in vivo* aus dem Wirtsgenom entfernt werden.

4.1.3. Regulierbarkeit des Transgens

Die Funktion von Transgenen kann einerseits durch entsprechende regulatorische Elemente vor allem transkriptional gesteuert werden. Dabei wird das integrierte Transgen selbst nicht verändert (siehe 4.1.3.1). Darüber hinaus kann eine konditionale Mutagenese mit dem Ergebnis der gezielten Veränderung des Transgenlocus in den transgenen Tieren durchgeführt werden (siehe 4.1.3.2). Kombinationen der beiden Systeme sind möglich.

4.1.3.1. Transgeninduktion

Die Transgenexpression kann auf der Ebene der Transkription je nach Versuchsansatz 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 Inaktivierbarkeit des induzierbaren Promotors wünschenswert. Dies gilt auch vor allem bei der Expression von für den Organismus schädlichen Substanzen.

Die Promotorkontrolle kann einerseits durch (1) Applikation von exogenen Substanzen erfolgen. Die Verwendung endogener Substanzen und derer Zielpromotoren lässt im Allgemeinen keine stringente Regulierung der Induktion der Transgenexpression zu. Beispielsweise wurde die prinzipielle Möglichkeit einer kontrollierten Applikation von

essenziellen Aminosäuren über das Futter in Kombination mit der Verwendung von entsprechend optimierten Promotorelementen (*amino acid response elements*) mit dem Ergebnis einer geringen basalen Expression und einer hohen induzierten, reversiblen Expression von Transgenen beschrieben. Versuche der spatio-temporalen, reversiblen Induktion der Transgenexpression durch Exposition mit blauem Licht in Kombination mit entsprechenden synthetischen Transaktivator- und Promotorelementen (*LightOn system*) waren grundsätzlich erfolgreich, sind aber abhängig von der Eindringtiefe des Lichts in das Gewebe.

Die Promotorkontrolle kann auch durch (2) zweiteilige transgene Systeme erfolgen. Hierfür werden zwei transgene Linien benötigt, die jeweils einen Teil des Systems als Transgen enthalten. Nach der Zucht 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 von exogen zugeführten Substanzen ist möglich. Durch Auslösung der Transgeninduktion mit synthetischen Substanzen oder speziesfremden Proteinen sind am ehesten zusätzliche unerwünschte Effekte im Gesamtorganismus bzw. unerwünschte endogene Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Häufig sind Systeme mit der Applikation von Tetrazyklinen oder Derivaten davon (z.B. Doxyzyklin) in Verwendung, wobei eine möglichst genaue Steuerbarkeit des Systems wünschenswert ist. Dabei wird die Expression des gewünschten Transgens durch die transgene Expression des Tetrazyklin-abhängigen, funktionellen Transaktivators tTA (Tet-Off-System) oder des Tetrazyklin-abhängigen, nicht-funktionellen reversen Transaktivators rtTA (Tet-On-System) unter gewebespezifischer Promotorkontrolle erreicht. Bei Verwendung des Tet-Off-Systems erfolgt die Expression des gewünschten Transgens durch Bindung des in der Regel gewebespezifisch exprimierten, funktionellen Transaktivators tTA an das TRE (*tetracycline responsive element*)-Promotorelement des gewünschten Transgens. Nach Applikation (über Futter, Tränkwasser oder Injektion) von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin bindet dieser exogene Faktor an den Transaktivator tTA und verhindert dadurch die Bindung des jetzt nicht-funktionellen Transaktivators rtTA an das TRE-Promotorelement und damit die Expression des gewünschten Transgens.

Bei Verwendung des Tet-On-Systems erfolgt keine Bindung des in der Regel gewebespezifisch exprimierten, reversen Transaktivators rtTA an das TRE-Promotorelement und damit auch keine Expression des gewünschten Transgens. Nach Applikation von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin bindet der sich bildende rtTA-Doxyzyklin-Komplex an das TRE-Promotorelement, und eine Expression des gewünschten Transgens wird induziert. In solchen Versuchen ist auch auf einen möglichen unbeabsichtigten Einfluss der Applikation von Tetrazyklinen oder dessen Derivaten per se auf den Phänotyp zu achten.

4.1.3.2. 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.

Hierfür werden zweiteilige Rekombinationssysteme wie das bakterielle Cre/loxP-System (Cre = *causes recombination*, loxP = *locus of crossover* (X) des Bakteriophagen P1) 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, und die zweite Linie mit der gezielten Flankierung des Zielgens im Wirtsgenom mit loxP-Sequenzen ("gefloxtes Zielgen"), was enzymvermittelt durch die Verwendung sequenzspezifischer Nuklease-Systeme oder nicht-enzymvermittelt 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. Bei einer spatio-temporal gesteuerten und/oder inkompletten konditionalen Mutagenese werden Mosaik-Tiere erzeugt. Trotz der Verwendung speziesfremder Rekombinasen sind besonders bei langandauernder und/oder hoher Expression unbeabsichtigte Interaktionen mit endogenen Stellen im Wirtsgenom als irrtümlichen Erkennungsstellen (*off-target*-Effekte) und daraus resultierende Auswirkungen auf den Phänotyp beschrieben. Die Verwendung heterozygot Cre-Rekombinase-transgener Tiere kann hierfür eine Lösung darstellen. Darüber hinaus sind unbeabsichtigte Effekte in einem geplanten Versuch durch das Mitführen der verwendeten Cre-transgenen Tiere als zusätzliche Kontrollgruppe zu kontrollieren. Im Internet sind Zusammenstellungen der publizierten Cre-Rekombinase-transgenen Mauslinien verfügbar (u.a. <http://www.informatics.jax.org>).

Lage und Orientierung der loxP-Erkennungssequenzen bestimmen die Art der möglichen Rekombination. Bei Lage auf einem DNA-Molekül und gleicher Orientierung kommt es zur Deletion des dazwischenliegenden DNA-Abschnittes. Bei Lage auf zwei DNA-Molekülen (z.B. auf einem ins Wirtsgenom integrierten Transgen und einem exogen zugeführten Transgen, oder auf zwei integrierten Transgenen (an demselben Genomlocus oder an verschiedenen Genomloci)) und gleicher Orientierung kommt es zur Translokation der beiden DNA-Moleküle an diesen Stellen. Bei Lage auf einem DNA-Molekül und inverser Orientierung kommt es zur Cre-vermittelten Inversion des dazwischenliegenden DNA-Abschnittes, wodurch in den Zellen mit Inversion eine Funktionsänderung dieses DNA-Abschnittes ausgelöst werden kann. Solange in diesem Fall ein funktionsfähiges Enzym und intakte loxP-Sequenzen in entsprechender Lage zueinander vorliegen, kann die Cre-vermittelte Rekombination nacheinander abwechselnd in beide Richtungen der Reaktion ablaufen. Anwendungsmöglichkeiten der Rekombinationssysteme sind somit die Erstellung von bis zu mehrere hundert kb langen Genomrekombinationen (Deletion, Inversion, Translokation), die Entfernung von Markergenen, Gen-Knockin-Anwendungen bzw. die Generierung definierter Punktmutationen im Wirtsgenom. Beispielsweise kann vor spezifischen Gensequenzen eine Stop-Sequenzkassette, flankiert von loxP-Sequenzen, in das Genom eingebracht werden, die transkriptionell oder translational die Expression des entsprechenden Gens verhindert. Die Cre-Rekombinase beseitigt die Stop-Sequenz und führt irreversibel zur Expression des Gens.

Eine Induktion (siehe 4.1.3.1) des Cre/loxP-Systems durch die Verwendung entsprechender Promotorsequenzen für die Expression der Cre-Rekombinase ist möglich. Die Transkription der transgenen Cre-Rekombinase lässt sich auch durch Kombination des Cre/loxP-Systems mit dem Tet-On-System bzw. dem Tet-Off-System und exogener Applikation von Tetrazyklin

bzw. Doxyzyklin in einem dreiteiligen Transgensystem reversibel steuern. Das System besteht aus Transgen 1 mit gewebespezifischem Promotor zur Expression eines Transaktivators, Transgen 2 mit TRE (*tetracycline responsive element*)-Promotorelement zur Expression der Cre-Rekombinase und Transgen 3 mit den *loxP*-Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase, und macht die Zucht entsprechender dreifach transgener Tiere erforderlich (siehe 4.1.3.1). Die durch die transgene Cre-Rekombinase ausgelöste Genomrekombination ist dabei irreversibel. Auch hier ist auf eine möglichst genaue Steuerbarkeit des Systems und auf einen möglichen unbeabsichtigten Einfluss der Applikation von Tetrazyklinen oder dessen Derivaten *per se* auf den Phänotyp zu achten.

Posttranslational lässt sich die Funktion der transgenen Cre-Rekombinase durch Kopplung an eine mutierte Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors reversibel steuern. Endogenes Östrogen bindet nicht an die mutierte Ligandenbindungsdomäne. Ohne exogene Applikation des Östrogenderivates Tamoxifen kann das transgene Fusionsprotein aus Cre-Rekombinase und Östrogenrezeptor nicht durch die Kernmembran in den Zellkern als Ort der gewünschten Funktion der Cre-Rekombinase gelangen. Dies ist erst nach exogener Applikation von Tamoxifen und Bindung dieses Stoffes an das Fusionsprotein möglich. Die durch die transgene Cre-Rekombinase ausgelöste Genomrekombination ist dabei irreversibel. Auf einen möglichen unbeabsichtigten Einfluss der Tamoxifen-Applikation *per se* auf den Phänotyp ist zu achten. Aus experimentellen Gründen ist eine möglichst vollständige Inaktivität des Systems im nicht-induzierten Zustand wünschenswert, wobei verschiedene Störfaktoren beschrieben sind. Da in Soja enthaltene Phytoöstrogene an den Östrogenrezeptor binden und somit unerwünschte Reaktionen auslösen können, ist bei der Verwendung des Östrogenrezeptor-Systems darauf zu achten, ein Futter einzusetzen, das frei oder arm an Phytoöstrogenen ist. Ähnliches gilt für Bisphenol A, einem Weichmacher für Kunststoffe (besonders bei Getränkeflaschen).

Zur konditionalen Mutagenese werden auch weitere, ähnliche Techniken wie das aus Hefen stammende *Flp/FRT*-System und weitere aus Hefen stammende Systeme, das bakterielle *Dre/rox*-System, mutante Systeme des *Cre/loxP*- und *Flp/FRT*-Systems, und das aus Bakteriophagen stammende $\Phi C31/attP/attB$ -System verwendet.

Diese Rekombinasen können auch kombiniert für die effiziente Integration von Transgenen an Zielorten verwendet werden. Bei gleichzeitiger Verwendung zweier dieser Systeme mit nicht-interagierenden Erkennungssequenzen und je einer Erkennungssequenz im Wirtgenom und auf einem exogenen Transgen wird durch die entsprechenden Rekombinasen *in vitro* oder *in vivo* der Austausch der zwischen den beiden verschiedenen Erkennungssequenzen liegenden DNA-Abschnitte (*recombinase-mediated cassette exchange*, RMCE) ausgelöst.

Bei gleichzeitiger Verwendung zweier dieser Systeme mit nicht-interagierenden Erkennungssequenzen und der inversen Orientierung der entsprechenden Erkennungssequenzen auf einem Transgen kann bei der ersten Rekombination die Inversion und damit in der Regel der Funktionsverlust des dazwischenliegenden DNA-Abschnittes ausgelöst werden, und mit der zweiten Rekombination die nochmalige Inversion und damit die Wiederherstellung der Funktion des dazwischenliegenden DNA-Abschnittes.

4.2. Methoden zur Erstellung transgener Tiere

Die Funktionsfähigkeit des Transgens ist potenziell vom Integrationsort im Wirtsgenom abhängig (Positionseffekt). Die etablierten Transfermethoden ohne gezielte enzymvermittelte Transgenintegration umfassen die DNA-Mikroinjektion, virale Vektoren und den spermienvermittelten Gentransfer als Methoden des direkten Transgentransfers. Das Ergebnis ist eine zufällige Integration des Transgens in das Wirtsgenom (nicht-homologe DNA-Rekombination, siehe 4.2.1). Enzymvermittelte Transfermethoden unter Verwendung sequenzspezifischer Nuklease-Systeme sind wesentlich effizienter und erlauben eine gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom (siehe 4.2.2). Alternativ ist eine gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom nicht-enzymvermittelt über homologe DNA-Rekombination mit Hilfe embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) oder des somatischen Kerntransfers (Klonen) als indirekte Transfermethoden möglich, jedoch nur mit geringer Effizienz (siehe 4.2.3).

Transgene Tiere nach nicht-homologer DNA-Rekombination, die die gentechnische Modifikation in einem Allel tragen, werden als hemizygot transgen bezeichnet. Transgene Tiere nach homologer DNA-Rekombination, die die gentechnische Modifikation in einem Allel tragen, werden 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 basalen DNA-Mikroinjektion kann die Etablierung neuer Techniken zur Erstellung transgener Tiere das Potenzial besitzen, die zur Generierung der transgenen Tiere benötigten Versuchstierzahlen zu verringern.

4.2.1. Zufällige Transgenintegration durch nicht-homologe Rekombination

Ohne die Verwendung sequenzspezifischer Nuklease-Systeme kommt es durch nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom zum zufälligen Einbau des Transgens in das Wirtsgenom. Dafür eignen sich Transgene für den additiven Gentransfer (siehe 4.1.1).

4.2.1.1. DNA-Mikroinjektion

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

Standardtechnik

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

- Erstellung und *in vitro*-Überprüfung des Transgenkonstruktes
- Hormonelle Superovulation von Spendertieren
- Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
- Kontrolle der Begattung
- Präparation fertilisierter Eizellen aus dem Eileiter
- *In vitro*-Injektion des Transgens in die Vorkerne der Zygoten

- Transfer der Embryonen in die Eileiter von vorbereiteten scheinträchtigen Empfängertieren (Ammen) (Alternative: Weiterentwicklung der Embryonen *in vitro* und transzervikaler Transfer in vorbereitete scheinträchtige Empfängertiere)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Parallele Zucht von mehreren transgenen Founderlinien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

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 Integrationsort 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, wobei beide Arten von Mutationen auch kombiniert in einem Foundertier vorliegen können: 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 mit unterschiedlichen Integrationsstellen 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. Daraus können in den etablierten Linien eines Transgenprojektes potenzielle Unterschiede in Zeitpunkt, Ort und Stärke der Transgenexpression auftreten, die die Generierung und Charakterisierung von mehreren Linien notwendig machen.

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 unbeabsichtigten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation), was zu unvorhersehbaren, nicht transgenspezifischen Veränderungen des physiologischen Phänotyps der in der Regel betroffenen homozygot transgenen Tiere (bei einer rezessiven 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.

4.2.1.2. 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 Genkonstruktes im Wirtsgenom und Funktionalität des Transgens werden derzeit vorzugsweise mit Hilfe rekombinanter lentiviraler Vektoren erstellt. Die Translokation des lentiviralen Genoms in den Wirtszellkern findet über Nukleosporen statt, wodurch eine unmittelbare Transgenintegration möglich ist. Für die Translokation des Genoms anderer Retroviren in den Wirtszellkern ist die Teilung der entsprechenden Zelle erforderlich. Bei lentiviralen Vektoren lässt sich das Transgen durch Verwendung geeigneter Promotoren virusunabhängig spatio-temporal regulieren. Die physische Manipulation der Embryonen ist bei Verwendung viraler Vektoren geringer als bei der DNA-Mikroinjektion.

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
- Präparation 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 vorbereiteten scheinträchtigen Empfängertieren (Ammen)
- Genotypisierung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Parallele Zucht von mehreren transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

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 wenige Nukleotide lange Veränderung des Wirtsgenoms.

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 potenziell 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 unbeabsichtigten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation, siehe 4.2.1.1).

Nachteile des Systems sind vor allem erhöhte Anforderungen an die Biosicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit den infektiösen lentiviralen Partikeln, die limitierte Länge der Transgene und ein möglicher Verlust der Funktionalität des integrierten Transgens in den folgenden Generationen durch endogene Methylierung des Transgenlocus. In den einzelnen transgenen Linien scheint im Laufe der weiteren Zucht der spezifische Methylierungsstatus des Transgenlocus und damit die Höhe der jeweiligen Transgenexpression über die Generationen stabil zu bleiben.

4.2.1.3. Spermienvermittelter Gentransfer

Der spermienvermittelte Gentransfer ist eine einfache Technik zur Generierung transgener Tiere. Bisher publizierte Ergebnisse zeigen die prinzipielle Möglichkeit der erfolgreichen Anwendung dieser Technologie beim Säuger, aber auch erhebliche Schwierigkeiten in der Etablierung und Reproduzierbarkeit der Techniken. So ist vor allem die erfolgreiche Durchführung der Inkubation von Spermien und Transgen bisher nicht praxistauglich.

Für den spermienvermittelten Gentransfer sind mehrere Methoden und Methodenkombinationen beschrieben, wobei die 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):

- Präparation von Spermien von fertilen Spendertieren
- Inkubation *in vitro* von Spermien und Transgen
- Präparation von Eizellen nach Superovulation von Spendertieren
- *In-vitro*-Fertilisation (IVF) der unbefruchteten Eizellen mit den behandelten Spermien (in Sonderfällen mit Hilfe der intrazytoplasmatischen Injektion der behandelten Spermien (ICSI) in die unbefruchteten Eizellen)
- Transfer der Zygoten in vorbereitete scheinträchtige Empfängertiere (Ammen)

(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) Injektion des Transgens in die Hoden:

- Direkte Injektion des Transgens in die Hoden fertiler Tiere mit/ohne anschließender Elektroporation (Alternative: Verwendung von viralen Vektoren)
- Verpaarung dieser Empfängertiere mit unbehandelten weiblichen Tieren

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

- Präparation von Vorläuferzellen der Spermien aus den Hoden von fertilen Spendertieren
- Inkubation *in vitro* von Vorläuferzellen und Transgen
- Injektion der transgenen Vorläuferzellen in die Hoden von unfruchtbar gemachten Empfängertieren
- Anpaarung der Empfängertiere mit unbehandelten weiblichen Tieren

Bei der Anwendung 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. Bei Verwendung von transgenen Vorläuferzellen der Spermien für den Gentransfer treten keine Mosaik-Tiere auf. Nach Verpaarung der Foundertiere mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyp-Tieren) 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. Nach Gentransfer durch Inkubation von Spermien und Transgen ist die Stabilität von Transgenlocus und Transgenexpression 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 unbeabsichtigten Zerstörung von Wirtsgenen (Insertionsmutation, siehe 4.2.1.1).

4.2.2. Gezielte enzymvermittelte Transgenintegration durch nicht-homologe oder homologe Rekombination

Die gezielte Transgenintegration ist enzymvermittelt durch nicht-homologe oder homologe Rekombination an der Stelle des im Wirtsgenom sequenzspezifisch ausgelösten Doppelstrangbruchs direkt *in vivo* im Embryo möglich. Die Koinjektion von Transgen und künstlich hergestellten Endonuklease-Systemen mit Anteilen zur Bindung an spezifischen

DNA-Sequenzen wie dem CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9*)-System (bzw. in gleicher Weise funktionierenden Klasse 2-CRISPR-Nuklease-Systemen), *Transcription activator-like effector*-gekoppelte Nukleasen (TALEN) oder Zinkfinger-gekoppelte Nukleasen (ZFN) (siehe 2) kann zur gezielten Transgenintegration durch nicht-homologe Rekombination von Transgen und Wirtsgenom über den zur Reparatur des im Wirtsgenom sequenzspezifisch ausgelösten Doppelstrangbruchs ausgelösten Mechanismus des *non-homologous end joining* (NHEJ) führen. Durch Koinjektion eines entsprechenden Targeting-Vektors (siehe 4.1.2) in Form doppelsträngiger oder einzelsträngiger DNA-Moleküle mit einem Nuklease-System ist durch den Mechanismus des *homology-directed repair* (HDR) eine enzymvermittelte Transgenintegration durch homologe Rekombination von Targeting-Vektor und Wirtsgenom möglich. Weiterentwicklungen des CRISPR-Cas9-Systems zeigen ein vermehrtes Auftreten des HDR-Mechanismus. Die ausgewählte, spezifische Zielsequenz des CRISPR-Cas9-Systems darf dabei nicht auf dem Targeting-Vektor enthalten sein. Weiterhin sind Weiterentwicklungen des CRISPR-Cas9-Systems ohne Auslösung von Doppelstrangbrüchen (*prime editing*) im Einsatz. Off-target-Effekte der verwendeten Enzyme sind möglich.

Da aufgrund der relativ hohen Effizienz des Systems auf die Verwendung von exogenen Selektionsmarkern als Bestandteil der Targeting-Vektoren (siehe 4.1.2) verzichtet werden kann, ist auch die Erstellung von Mutationen im Wirtsgenom möglich, die - im Vergleich zu spontan auftretenden Mutationen - die Verwendung von Transgenen in den gentechnisch erstellten, mutanten Tieren durch DNA-Sequenzierung nicht mehr erkennen lassen.

Standardtechnik

Die Generierung der transgenen Tiere kann mit Hilfe der Mikroinjektion (siehe 4.2.1.1) in Zygoten durchgeführt werden und umfasst folgende Schritte:

- Erstellen des sequenzspezifischen Nuklease-Systems (CRISPR-Cas9, TALEN, ZFN) und des Transgenkonstruktes. Das CRISPR-Cas9-System besteht aus einem zweiteiligen System mit einem Enzym (Cas9) und einer kurzen versuchszweck- und sequenzspezifischen Nukleinsäure, und ist in der Anwendung den beiden anderen Systemen überlegen.
- Hormonelle Superovulation von Spendertieren
- Verpaarung mit fertilen männlichen Tieren
- Kontrolle der Begattung
- Präparation fertilisierter Eizellen aus dem Eileiter
- *In vitro*-Koinjektion von sequenzspezifischem Nuklease-System und Transgen in Vorkerne und Zytoplasma der Zygoten
- Transfer der Embryonen in die Eileiter von vorbereiteten scheinträchtigen Empfängertieren (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenintegration im ausgewählten Genomabschnitt
- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

Sequenzspezifische Nuklease-Systeme werden auch zur gezielten Transgenintegration *in vitro* in Zellen eingesetzt, die anschließend zur Erstellung transgener Tiere mit Hilfe der

Blastozysteninjektion embryonaler Stammzellen (siehe 4.2.3.1) oder des somatischen Kerntransfers (siehe 4.2.3.2) verwendet werden.

Genotyp der Tiere

Ein erheblicher Teil der Nachkommen der Empfängertiere kann transgen sein. Die transgenen Tiere mit der gewünschten Mutation (Founder = F0-Tiere) bestehen aus zwei Gruppen: Bei (1) hemizygot transgenen (bei nicht-homologer Rekombination) bzw. heterozygot transgenen (bei homologer Rekombination) Tieren besitzen alle Zellen das Transgen in ihrem Genom, während bei (2) Mosaik-Tieren nur ein Teil der Zellen des Organismus das Transgen im Genom enthält. Bei transgenen F0-Tieren können auch beide Allele betroffen sein und/oder unterschiedliche Mutationen zeigen. Nach Verpaarung der transgenen Foundertiere mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyptieren) treten bei Vorliegen der experimentell eingebrachten Mutation in den Keimzellen in der nachfolgenden F1-Generation hemizygot transgene bzw. heterozygot transgene Tiere und nicht-transgene Tiere auf. Liegt für die ausgewählte Genomsequenz mehr als ein mutantes Allel in den Keimzellen der verpaarten Foundertiere vor, können die mutanten F1-Wurfgeschwister unterschiedliche Mutationen tragen. Nach den Mendelschen Regeln der Vererbung treten nach der Verpaarung hemizygot transgener bzw. heterozygot transgener F1-Wurfgeschwister, die dieselbe Mutation tragen, in der F2-Generation homozygot transgene Tiere auf. Bei Verwendung von Inzuchtstämmen als genetischen Hintergrund sind alle homozygot transgenen Tiere einer Linie genetisch uniform.

Off-target-Effekte der verwendeten Enzymsysteme wie das Auslösen von Mutationen an nicht ausgewählten Stellen des Wirtsgenoms oder unbeabsichtigter Einbau von Fremd-DNA sind möglich, weswegen mehrere unabhängige Linien in einem Versuchsprojekt zu generieren und zu charakterisieren sind, um valide Daten erheben zu können.

Die Koinjektion eines Transgens mit entsprechenden Erkennungssequenzen und spezifischen Rekombinasen/Integrasen in Verbindung mit endogenen Zielsequenzen im Wirtsgenom bzw. gentechnisch veränderten Wirtsstämmen kann (z.B. mit Hilfe zweiteiliger Rekombinationssysteme wie des Cre/loxP-Systems) zum enzymvermittelten Austausch des zwischen den Erkennungssequenzen liegenden DNA-Abschnittes (*recombinase-mediated cassette exchange*, RMCE) führen (siehe 4.1.3.2). Damit ist grundsätzlich die Integration einer intakten Kopie des Transgens in definierte chromosomale Loci mit hoher Effizienz möglich. Mögliche *off-target*-Effekte der verwendeten Enzyme sind zu beachten.

4.2.3. Gezielte, nicht-enzymvermittelte Transgenintegration durch homologe Rekombination

Ohne Anwendung sequenzspezifischer Nuklease-Systeme erfordert die gezielte Mutation des Genoms mittels homologer Rekombination längerer DNA-Sequenzen (*gene targeting*) die Verwendung von Targeting-Vektoren als Transgene (siehe 3.1.2). Mit den damit *in vitro* gezielt mutierten Zellen werden dann transgene Tiere generiert. Hierfür werden die Blastozysteninjektion embryonaler Stammzellen oder der somatische Kerntransfer durchgeführt. Die Methode wird in der Regel zur funktionellen Inaktivierung (Gen-Knockout) oder definierten Modifikation (Gen-Knockin) von bestimmten Genen verwendet.

Die gezielte *in vitro* Mutagenese der Zellen ist auch wesentlich effizienter durch den Einsatz von sequenzspezifischen Nuklease-Systemen ohne oder mit Transgen(en) möglich (siehe 2 und 4.2.2).

Technische Entwicklungen

Bei verschiedenen Tierarten wurden Untersuchungen zur Generierung von Keimzellen, keimbahnspezifischen Stammzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) durchgeführt, um *in vitro* in diesen Zellen die ungezielte bzw. gezielte Integration des Transgens in das Wirtsgenom über nicht-homologe bzw. homologe DNA-Rekombination auszuführen. Diese Methoden sind technisch aufwändig und nicht für den Routineeinsatz etabliert. Dabei ist grundsätzlich auf die Möglichkeit von genetischen und/oder epigenetischen Läsionen als Folge von *in vitro*-Kultur bzw. Reprogrammierung und deren phänotypische Auswirkungen zu achten.

4.2.3.1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

Die Erstellung transgener Linien durch Übertragung gezielt mutierter ES-Zellen in Embryonen ist zurzeit beim Säuger nur für die Maus und zusätzlich für die Ratte etabliert. Beim Geflügel sind primordiale Keimzellen (PGC) als analoges Zellsystem im Einsatz. ES-Zelllinien werden aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten gewonnen und sind nur von wenigen Inzuchtstämmen verfügbar. Ursprünglich wurden vor allem murine ES-Zelllinien aus verschiedenen Sublinien des Inzuchtstammes 129 verwendet; danach wurden auch funktionsfähige ES-Zellen von weiteren Inzuchtstämmen wie C57BL/6 etabliert. Die homolog rekombinierten ES-Zellen liefern dabei Zellen für die Entwicklung des entstehenden Individuums und haben das Potential zur Keimbahnbesiedlung.

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* nicht-enzymvermitteltes oder enzymvermitteltes *gene targeting* in ES-Zellen (ursprünglich vor allem in ES-Zellen des Inzuchtstammes 129) mit dem Ergebnis der heterozygoten oder homozygoten 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)
- 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 vorbereitete scheinträchtige Empfängertiere (Ammen)
- Genotypisierung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität

- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

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 Blastozysten 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 (ursprünglich vor allem ES-Zellen des Inzuchtstammes 129 und Blastozysten z.B. des Inzuchtstammes C57BL/6). 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 in der Regel männliche Chimären mit nicht-transgenen Tieren (Wildtyptieren) des Inzuchtstammes des Blastozystenspenders 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 (im gewählten Beispiel 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 mindestens zehn Generationen die weitgehende genetische Uniformität (siehe 2.1) der homozygot transgenen Tiere zu erhalten (= kongener Stamm). Dadurch sind auch genetische Läsionen der verwendeten ES-Zelllinien aus den erstellten transgenen Mauslinien zu entfernen, soweit sie nicht gekoppelt mit dem Targeting-Locus vererbt werden.

Generierte Mutationen können sich auch als rezessive Mutationen herausstellen, so dass erst bei homozygot transgenen Tieren mit einem abweichenden Phänotyp zu rechnen ist. Darüber hinaus 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 ratsam, die mit Hilfe von unabhängigen, gentechnisch modifizierten ES-Zellklonen erstellt wurden.

Technische Entwicklungen

Für die ES-Zelltechnologie wurden zahlreiche Modifikationen publiziert, deren Praxistauglichkeit teilweise noch weiter untersucht wird:

Die Heterogenität des genetischen Hintergrundes in den nachfolgenden Generationen nach Verpaarung der Chimären kann durch die Verwendung von ES-Zellen und Embryonen aus zwei koisogenen Inzuchtstämmen umgangen werden. So werden ES-Zellen des normal pigmentierten C57BL/6-Inzuchtstamms und Blastozysten aus unpigmentierten, tyrosinase-mutanten C57BL/6-Sublinien verwendet.

Bei Verwendung zweier verschiedener Inzuchtstämme als ES-Zellspender und Blastozysten-spender ist die Heterogenität des genetischen Hintergrundes in der F2-Generation durch basale Zuchttechniken und die nachfolgende Untersuchung der entstehenden Tiere zu vermeiden bzw. zu kompensieren. So werden F0-Chimären, die in der normalen Anpaarung an den Inzuchtstamm des Blastozysten-spenders durch das Auftreten von heterozygot transgenen F1-Hybriden als Keimbahnchimären identifiziert wurden, nachfolgend an den Inzuchtstamm des ES-Zell-spenders angepaart. In den in der Fellfarbe identischen Nachkommen sind durch molekulargenetische Untersuchung die heterozygot transgenen F1-Tiere zu identifizieren, die dann zur Zucht homozygot transgener F2-Tiere auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes des ES-Zell-spenders (= koisogener Stamm) verwendet werden. So können sowohl der transgene koisogene Stamm als auch transgene kongene Stämme gezüchtet und untersucht werden.

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. Die homozygot mutanten ES-Zellen können auch durch die gleichzeitige oder konsekutive Verwendung zweier Targeting-Vektoren mit unterschiedlichen Resistenzgenen erzeugt werden.

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.

Durch lasergestützte Penetration der Zona pellucida von frühen Embryonen im Einzell- bis Achtzellstadium und anschließende Injektion von genetisch modifizierten ES-Zellen aus Inzuchtstämmen wurden Foundertiere erstellt, die sich praktisch vollständig aus den übertragenen ES-Zellen entwickelten. Damit ist die Zucht transgener Linien mit einem uniformen genetischen Hintergrund der Tiere möglich.

Darüber hinaus 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. Auch

induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) aus differenzierten Körperzellen mit ES-zell-spezifischem Potential können als Alternative für ES-Zellen dienen. Zur Generierung solcher Zellen wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden verwendet. Hierbei ist grundsätzlich auf die Möglichkeit von genetischen und/oder epigenetischen Läsionen als Folge von *in vitro*-Kultur bzw. Reprogrammierung und deren phänotypische Auswirkungen zu achten.

4.2.3.2. 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 Tieren mit gezielten Mutationen. Gegenwärtig ist die Erfolgsrate des somatischen Kerntransfers bei Labortieren gering. Vor allem bei Schwein und Wiederkäuer ist der somatische Kerntransfer zur Erstellung mutanter oder transgener Tiere – auch für den additiven Gentransfer - gut etabliert und erzielt eine höhere Effizienz als herkömmliche Methoden wie z.B. die DNA-Mikroinjektion.

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* nicht-enzymvermitteltes oder enzymvermitteltes *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 oder deren Zellkerne in die enuklierten Oozyten
- Oozytenaktivierung und Embryokultur
- Transfer der klonierten Embryonen in vorbereitete scheinträchtige Empfängertiere (Ammen)
- Untersuchung der Nachkommen aus dem Embryotransfer auf Transgenität
- Zucht von transgenen Linien
- Genotypische und phänotypische Charakterisierung der transgenen Linien

Genotyp der Tiere

Bei Verwendung transgener Spenderzellen sind alle Tiere der resultierenden F0-Generation 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.

Da als Folge einer langen *in vitro*-Kultur und -Manipulation der Kernspenderzellen die Effizienz der Klonierung abnimmt, werden auch transgene Spenderzellen, die noch nicht vollständig aufgereinigt sind und damit noch mit nicht-transgenen Zellen vermischt sein können, zur

Klonierung verwendet. In diesem Fall treten in der F0-Generation auch nicht-transgene Tiere auf.

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 genetischem 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 ratsam, die mit Hilfe von unabhängigen, gentechnisch modifizierten Zellklonen erstellt wurden.

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.

Für den *in vitro* Transfer des Transgens in die somatischen Kernspenderzellen sind unter anderem virale Vektoren wie rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) im Einsatz und können zu einem erhöhten Erfolg der homologen Rekombination führen.

Für den additiven Gentransfer wird der kumulative Transfer von Embryonen, die mit Hilfe von unabhängigen transgenen Zellen kloniert wurden, in Empfängertiere durchgeführt. Damit können transgene F0-Tiere mit unterschiedlichem Transgenlocus in einem Wurf erstellt werden.

5. Ausgewählte Literatur

5.1. Übersichtsliteratur

- Behringer R, Gertsenstein M, Vintersten Nagy K, Nagy A. 2014. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Informationspapier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML) vom 15.04.1996: Die Erzeugung und Zucht transgener Mäuse und Ratten unter Tierschutzgesichtspunkten.
- BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. 2003. Refinement and reduction in production of genetically modified mice. Lab Anim 37, Suppl. 1.
- Doudna J, Mali P. 2016. CRISPR-Cas – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- FELASA Working Group. 2007. FELASA guidelines for the production and nomenclature of transgenic rodents. Lab Anim 41:301-311.
- Kühn R, Wurst W. 2009. Gene knockout protocols. Humana Press, New York
- Pinkert CA. 2014. Transgenic animal technology: a laboratory handbook. Elsevier, Amsterdam
- Schenkel J. 2006. Transgene Tiere. Springer-Verlag, Berlin.

5.2. Tierartspezifische Übersichtsartikel

- Aigner B, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Renner S, Wunsch A, Wolf E. 2017. Genetically tailored pig models for translational biomedical research. In Conn PM (Ed), Animal models for the study of human disease, second edition, pp. 671-701. Academic Press, London [Schwein]
- Doran TJ, Cooper CA, Jenkins KA, Tizard MLV. 2016. Advances in genetic engineering of the avian genome: “Realising the promise”. Transgenic Res 25:307-319. [Vogel]
- Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. 2012. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. Transgenic Res 21:327-349. [Maus]
- Duranthon V, Beaujean N, Brunner M, Odening KE, Navarrete Santos A, Kacskovics I, Hiripi L, Weinstein EJ, Bosze Z. 2012. On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. Transgenic Res 21:699-713. [Kaninchen]
- Kawaharada K, Kawamata M, Ochiya T. 2015. Rat embryonic stem cells create new era in development of genetically manipulated rat models. World J Stem Cells 7:1054-1063 [Ratte]
- Li M, Zhao L, Page-McCaw PS, Chen W. 2016. Zebrafish genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Trends Genet 32:815-827. [Fisch]
- Menchaca A, Anegon I, Whitelaw CBA, Baldassarre H, Crispo M. 2016. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. Theriogenology 86:160–169. [Nutztiere]
- Ogino H, Ochi H. 2009. Resources and transgenesis techniques for functional genomics in Xenopus. Dev Growth Differ 51:387-401. [Xenopus]
- Rogers CS. 2016. Genetically engineered livestock for biomedical models. Transgenic Res 25:345–359. [Schwein]

Tan W, Proudfoot C, Lillico SG, Whitelaw CBA. 2016. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Res* 25:273–287. [Nutztiere].

5.3. Technische Entwicklungen

Bello SM, Smith CL, Eppig JT. 2015. Allele, phenotype and disease data at Mouse Genome Informatics: improving access and analysis. *Mamm Genome* 26:285–294.

Bonaparte D, Cinelli P, Douni E, Hérault Y, Maas M, Pakarinen P, Poutanen M, Lafuente MS, Scavizzi F; FELASA Working Group. 2013. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the FELASA Working Group. *Lab Anim* 47:134-145.

Champer J, Buchman A, Akbari OS. 2016. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet* 17:146-159.

Chaveroux C, Bruhat A, Carraro V, Jousse C, Averous J, Maurin AC, Parry L, Mesclon F, Muranishi Y, Cordelier P, Meulle A, Baril P, Do Thi A, Ravassard P, Mallet J, Fafournoux P. 2016. Regulating the expression of therapeutic transgenes by controlled intake of dietary essential amino acids. *Nat Biotechnol* 34:746-751.

Danner E, Bashir S, Yumlu S, Wurst W, Wefers B, Kühn R. 2017. Control of gene editing by manipulation of DNA repair mechanisms. *Mamm Genome* 28:262-274.

De Repentigny Y, Kothary R. 2010. Production of mouse chimeras by injection of embryonic stem cells into the perivitelline space of one-cell stage embryos. *Transgenic Res* 19:1137-1144.

Dow LE, Fisher J, O'Rourke KP, Muley A, Kasthuber ER, Livshits G, Tschaharganeh DF, Socci ND, Lowe SW. 2015. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 33:390-394.

Eppig JT, Motenko H, Richardson JE, Richards-Smith B, Smith CL. 2015. The International Mouse Strain Resource (IMSR): cataloging worldwide mouse and ES cell line resources. *Mamm Genome* 26:448-455.

Gaszner M, Felsenfeld G. 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* 7:703-713.

Green M, Bass S, Spear BT. 2009. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential postoperative complications. *Biotechniques* 47:919-924.

Housden BE, Muhar M, Gemberling M, Gersbach CA, Stainier DYR, Seydoux G, Mohr SE, Zuber J, Perrimon N. 2017. Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nat Rev Genet* 18:24-40.

Ivics Z, Li MA, Mátés M, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z. 2009. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods* 6:415-422.

Komor AC, Badran AH, Liu DR. 2017. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell* 168:20-36.

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* 235:2460-2469.

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* 25:91-99

- Qin W, Kutny PM, Maser RS, Dion SL, Lamont JD, Zhang Y, Perry GA, Wang H. 2016. Generating mouse models using CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Curr Protoc Mouse Biol* 6:39-66.
- Quadros RM, Miura H, Harms DW, Akatsuka H, Sato T, Aida T, Redder R, Richardson GP, Inagaki Y, Sakai D, Buckley SM, Seshacharyulu P, Batra SK, Behlke MA, Zeiner SA, Jacobi AM, Izu Y, Thoreson WB, Urness LD, Mansour SL, Ohtsuka M, Gurumurthy CB. 2017. Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biology* 18:92.
- Raymond CS, Soriano P. 2006. Engineering mutations: deconstructing the mouse gene by gene. *Dev Dyn* 235:2424-2436.
- 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.
- Takeo T, Nakagata N. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *Plos One* 10, e0128330.
- Vanden Berghe T, Hulpiau P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, Bruggeman I, Divert T, Choi SM, Vuylsteke M, Shestopalov VI, Libert C, Vandenabeele P. 2015. Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity* 43:200–209.
- Wolfer DP, Crusio WE, Lipp HP. 2002. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25:336-340.

Haftungsausschluss

Die Nutzung und Verwendung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen und Inhalte erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko der jeweiligen Nutzer*innen oder Verwender*innen.

Die GV-SOLAS und auch die Autor*innen können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben, keine Haftung übernehmen.

Die GV-SOLAS übernimmt keine Haftung für Schäden jeglicher Art, die die durch die Nutzung der Webseite und das Herunterladen der Vorlagen entstehen. Ebenfalls haftet die GV-SOLAS nicht für unmittelbare oder mittelbare Folgeschäden, Datenverlust, entgangenen Gewinn, System- oder Produktionsausfälle.

Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autor*innen für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen.

Schadenersatzansprüche sind daher sowohl gegen die Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS wie auch gegen die Autor*innen ausgeschlossen.

Die Werke inklusive aller Inhalte wurden unter größter wissenschaftlicher Sorgfalt erarbeitet. Gleichwohl übernehmen die GV-SOLAS und die Autor*innen keinerlei Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler.

Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autor*innen übernommen werden.

Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind überdies ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich.

Die GV-SOLAS und die Autor*innen haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten.