

Von der DGfZ ausgezeichnete Graduiierungsarbeiten

Original Article

Transgene Expression durch zytoplasmatische Injektion von Plasmiden und Transposon-basierten Konstrukten in Säugerembryonen (Dissertation)

WIEBKE GARRELS¹, STEPHANIE HOLLER¹, Z. IVICS², H. NIEMANN¹ und W.A. KUES¹

Zusammenfassung

Genetisch modifizierte Nutztiere haben eine wesentliche Bedeutung als biomedizinische Modelle und werden zukünftig auch in der landwirtschaftlichen Produktion eine Rolle spielen. Allerdings ist die Nutzung transgener Nutztiere z.Z. wegen der geringen Effizienz und wegen der Kosten der Transgenese limitiert. In dieser Arbeit wurde mit der zytoplasmatischen Plasmidinjektion an einer Verbesserung der Produktion transgener Tiere gearbeitet. Im ersten Teil der Arbeit wurde humane Telomerase in Rinderblastozysten exprimiert. Durch die zytoplasmatische Injektion von Telomerase-kodierenden Plasmiden konnte die Expression des humanen Telomerase-Proteins induziert und eine signifikante Verlängerung der Telomeren erzielt werden.

Da die verwendeten Plasmide nicht in das Genom integrierten, kam es bei den Telomerase-Versuchen zu einer zeitlich begrenzten Transgenese, die ca. 7–14 Tage anhält. Es konnte gezeigt werden, wie effizient die injizierten Plasmide transkribiert und translatiert wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Limitierung der transienten Transgenese überwunden werden, indem die zytoplasmatische Plasmidinjektion mit einem nicht-autonomen Transposon-System kombiniert wurde. Zunächst wurden in einem Pilotprojekt stabil transgene Mäuse erzeugt, die ein Reporter-Transgen durch spezifische Transposition als Einzelkopie in das Genom integriert hatten. Aufbauend auf den Vorversuchen wurden dann Transposon-Injektionsversuche in Schweinezygoten durchgeführt. Es konnten mit hoher Effizienz (42–57%) Transposon-transgene Schweine generiert werden, die eine Keimbahntransmission und Segregation der Transposon-Transgene aufwiesen. Die Transposon-Transgene können basenpaar-genau im Genom lokalisiert werden, und über die Cre-Rekombinase gegen funktionelle Transgene ausgetauscht werden. Dieser Ansatz erlaubt eine hocheffiziente Erstellung transgener Nutztiere und die gezielte Integration von Transgenen.

Schlüsselwörter: Mikroinjektion, Telomer, Transposon, Sleeping Beauty, Zygote

¹ Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee, 31535 Neustadt. E-Mail: Wiebke.Garrels@fli.bund.de

² Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin, Berlin

Summary

Transgenic expression by cytoplasmic injection of plasmids and transposon-based constructs in mammalian embryos

Genetically modified animals play an important role as biomedical models and will have a considerable impact on agricultural production in the future. However, at the moment the use of transgenic animals is limited due to inefficient and expensive process. The aim of this study was to enhance the production of transgenic animals using cytoplasmic plasmid injection.

In the first part of the work the expression of human telomerase in bovine blastocysts was investigated. Due to cytoplasmic injection of telomerase encoding plasmids the expression of human telomerase protein was induced, which resulted in significantly elongated telomeres. Since in the telomerase experiments the plasmids were not integrated in the genome, transgenesis was limited to approximately 7–14 days. Nevertheless, it did show how efficient injected plasmids are transcribed and translated.

In the second part of the work the focus was to resolve the limitation of transient transgenesis. Therefore, cytoplasmic plasmid injection was combined with a non-autonomous transposon system. In a pilot project stable transgenic mice with a reporter transgen were produced. The transgen was integrated with specific transposition as a single copy. Subsequently, the transposon injection experiments were applied to pig zygotes. Transposon transgenic pigs were produced with high efficiency (42–57%). They show germline transmission and segregation of transposon transgene. It was possible to localise the transposon mediated transgene within the genome exactly and a Cre-recombinase exchange of the transgenic cassette against a functional transgene is possible. This approach allows a highly efficient production of transgene farm animals combined with a targeted integration of transgenes.

Keywords: Microinjection, telomeres, transposons, Sleeping Beauty, zygotes

1 Einleitung

Landwirtschaftliche Nutztiere sind wichtige Modelle für die biomedizinische Forschung (KUES und NIEMANN, 2004; JACOBSEN et al., 2010). Großtiermodelle sind für vorklinische Versuche besser geeignet als Labornager, weil Physiologie, Metabolismus, Genom-Organisation, Körpergewicht und Lebenserwartung sehr viel näher der humanen Situation sind, als das für Nagermodelle der Fall ist (HABERMANN et al., 2007; WALL and SHANI, 2008). Schweine werden bereits erfolgreich als Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen, Arteriosklerose, Diabetes, ophthalmologische Erkrankungen sowie für die Krebsforschung genutzt (PHILLIPS et al., 1982; GRANADA et al., 2009). Die Nutzung porciner Organe für die Xenotransplantation könnte einen wesentlichen Beitrag zur Reduzierung des Mangels an humanen Spenderorganen leisten (SHARMA and HARISH, 2004). Allerdings ist die Transgenese bei Großtieren noch immer sehr ineffizient. Beim Schwein entwickeln sich nach DNA-Injektion in einen Vorkern (pronukleare DNA-Injektion) von Zygoten durchschnittlich nur 1–2% der Embryonen zu transgenen Nachkommen. Auch beim somatischen Kerntransfer mit transgenen Kernspenderzellen ist nur mit 1–3% lebenden transgenen Nachkommen beim Schwein zu rechnen (PETERSEN et al., 2008; MENDICINO et al., 2010). Ein wesentlicher Anteil der transgenen Schweine, die aus der DNA-Vorkerninjektion oder dem somatischen Kerntransfer resultieren, zeigen unerwünschte Expressionsmuster, die sich in variiertem Expression bzw. Gen-Silencing äußern (DEPPENMEIER et al., 2006; KUES et al., 2006). Ein Grund dafür ist, dass die

Fremd-DNA zufällig im Genom integriert wird. Das Säuger genom besteht jedoch nur zu 2–3% aus Protein-kodierenden Genbereichen, so dass die überwiegende Anzahl von Fremd-DNA-Integrationen in Bereichen erfolgt, die für eine Genexpression ungeeignet sind.

Hier wurde mit einem vereinfachten DNA-Injektionsverfahren eine neue effiziente Methode zur transienten Fremd-DNA-Expression in Säugerembryonen etabliert. Durch die Injektion von DNA in das Zytoplasma von Zygoten wurden wesentlich bessere Expressionsraten als mit der Standardmethode der DNA-Injektion in einen Zygotenvorkern erreicht (Abb. 1).

Die Erfolgsrate lag zwischen 40–60% (IQBAL et al., 2009). Die zytoplasmatische Plasmidinjektion führt jedoch meist zu einer vorübergehenden (transienten) Transgenese, d.h. die injizierten Plasmide sind episomal stabil und werden an die Tochterzellen weitergegeben, aber sie replizieren nicht.

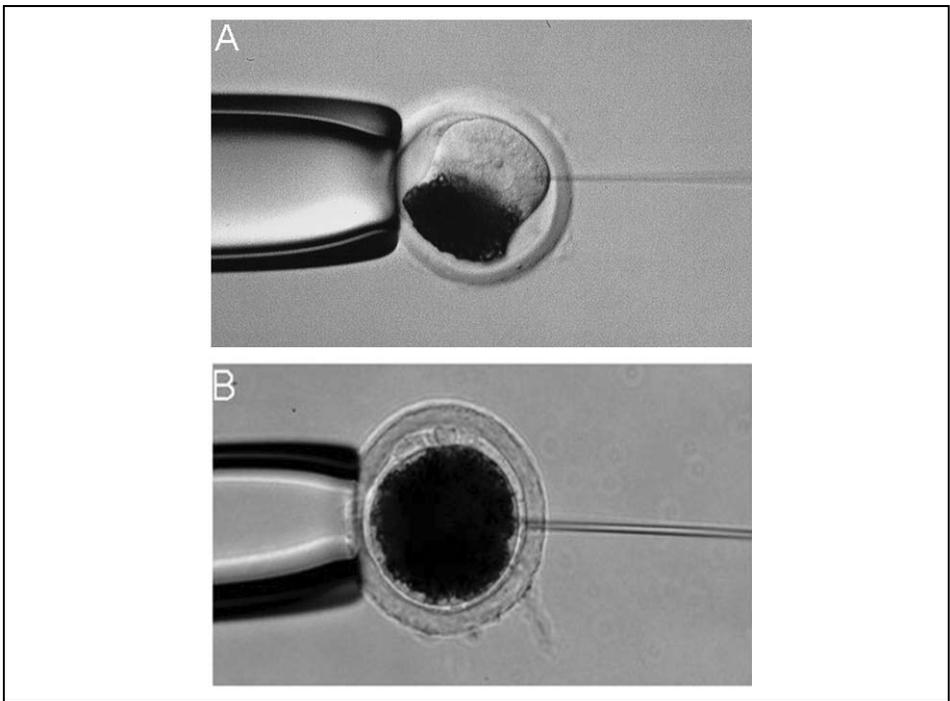


Abb. 1. A. Pronukleare DNA-Injektion in eine Schweinezygote. Da Zygoten des Schweins sehr stark gefärbt sind, können die Vorkerne nur durch eine Zentrifugationsbehandlung bei 12 000 – 15 000 g dargestellt werden. Durch die harsche Separation aller Zellbestandteile wird vermutlich die Entwicklungsfähigkeit vermindert.

B. Zytoplasmatische DNA-Injektion in eine Schweinezygote. Es werden ca. 10 picoliter (pl) Plasmidlösung mit einem Druck von 1 Bar injiziert.

A. Pronuclear DNA-injection into a porcine zygote. Pig zygotes are opaque and for visualisation of the pronuclei a high speed centrifugation at 12'000 – 15'000 g is necessary. This harsh treatment may result in a reduced developmental competence.

B. Cytoplasmic injection into a porcine zygote. Approximately 10 picoliter (pl) of plasmid solution will be injected with a pressure of 1 bar.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zirkuläre Expressionsplasmide, die humane Telomerase-Gene kodieren, in das Zytoplasma boviner Zygoten injiziert, um die Auswirkungen auf Entwicklungsfähigkeit, Telomerenlänge und Telomeraseaktivität in Blastozysten zu untersuchen. Telomeren sind hochspezialisierte Strukturen an den Enden eukaryotischer Chromosomen (BLACKBURN, 1991; GREIDER, 1991). Sie bestehen aus hochrepetitiven DNA-Elementen und speziellen DNA-bindenden Proteinen (SMOGORZEWSKA and DE LANGE, 2004). Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau der Chromosomen mit den Telomeren als sog. Kappenstruktur an den Chromosomenenden.

Die Länge der Telomeren variiert spezies-spezifisch. Bei Rindern, Menschen und Wildmäusen liegt sie bei 10–15 kb (HEMANN and GREIDER, 2000). Die Hauptfunktion der Telomeren besteht darin, die DNA-Enden zu schützen (BLACKBURN, 2001). Dadurch verhindern sie eine Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen, die Bildung chromosomaler Fusionen sowie die Entstehung von chromosomaler Instabilität (COUNTER et al., 1992; HANDE et al., 1999). Eine besondere Rolle spielen die Telomeren im Zusammenhang mit dem Endreplikationsproblem (WATSON, 1972). Für die DNA-Replikation sind die DNA-Polymerasen α und δ sowie die Primase notwendig, ein Enzym, das den RNA-Primer synthetisiert. Da der RNA-Primer am äußeren Telomerenende abgebaut wird, ohne in DNA umgeschrieben zu werden, kommt es bei jeder Replikation zu einer Telomerenverkürzung. Hayflick beschrieb 1961, dass es bei humanen Fibroblasten im Gegensatz zu Tumorzellen nur zu einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen kommt (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961). Später wurde postuliert, dass sich die Chromosomen bei jeder Zellteilung verkürzen (OLOVNIKOV, 1971) und dadurch eine „biologische Uhr“ des Alters bzw. der erfolgten Zellteilungen darstellen. Im Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz wurde die Telomerenverkürzung als erster molekularer Mechanismus beschrieben (HARLEY et al., 1990). Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen sind die Telomeren kritisch verkürzt, und die Zellen erreichen das Stadium der Seneszenz.

Die Telomerase ist ein Holoenzym, das aus zwei Untereinheiten besteht: dem katalytischen Protein der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und der Telomerase-RNA-Komponente (TERC), die als Matrize für die Telomerensynthese dient (MEYERSON et al., 1997). Die Telomerase verlängert das 3'Ende der DNA direkt, wobei ihre RNA-Komponente als Matrize genutzt wird (COLLINS et al., 1995).

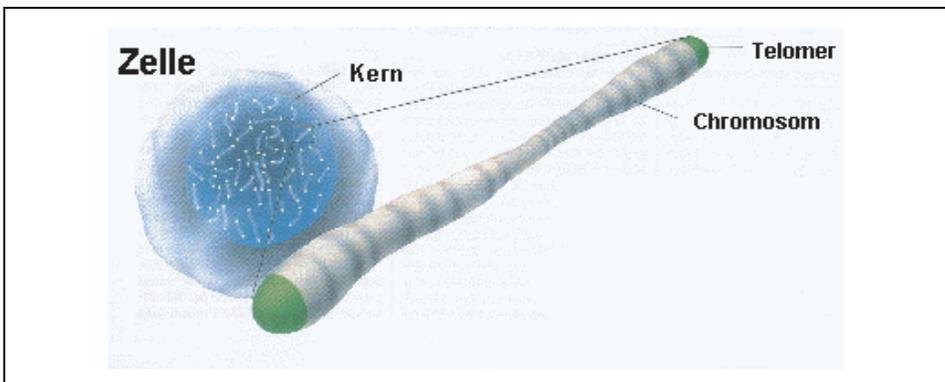


Abb. 2. Schematische Darstellung des Chromosomenaufbaus (Abb. aus GREIDER und BLACKBURN, 1998).

Schematic depiction of chromosomal structure (Fig. from GREIDER und BLACKBURN, 1998).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Kombination von zytoplasmatischer Plasmidinjektion mit einem nicht-autonomen Transposon zu einer stabilen Transgenese bei Labor- und Großtieren führen kann. Dazu wurden Versuche bei Maus und Schwein durchgeführt. Transposons sind springende DNA-Elemente, die zuerst von Barbara McClintock im Mais beschrieben wurden (McCLINTOCK, 1953). Transposons kommen in spezies-spezifischer Ausprägung in allen untersuchten Genomen von Pro- und Eukaryoten vor. Jedoch sind die meisten Transposons durch Mutationen inaktiviert (KAWAKAMI, 2007; MATES et al., 2009). Transposons wurden in den letzten Jahren als alternatives Verfahren für die Transgenese in Fliegen, Fischen, Fröschen, Mäusen und Ratten entwickelt (KAWAKAMI, 2007; IVICS et al., 2009). Bisher ist eine Transposon-vermittelte Transgenese bei Großtieren noch nicht beschrieben worden.

2 Material und Methoden

Modulation der Telomeraseaktivität in bovinen Embryonen

Die bovinen Embryonen wurden aus Schlachthofmaterial *in vitro* produziert (ECKERT und NIEMANN, 1995). Die befruchteten Eizellen wurden dann mit einer Plasmidmischung aus hTERT- und GFP-Expressionsplasmiden (als Markergen) bzw. aus hTERT-, hTERT- und GFP-Expressionsplasmiden injiziert. Nach sieben Tagen *in vitro*-Kultur wurden die Blastozysten, die eine spezifische Fluoreszenz aufwiesen, selektiert und für die weiteren Versuche verwendet. Aus den Blastozysten wurde mRNA isoliert und diese dann in einer Reversen Transkriptase PCR eingesetzt, um die Transkripte der Plasmide nachzuweisen. Hierzu wurden spezies-spezifische Primer eingesetzt, damit die endogenen Telomerase-Komponenten eindeutig von den ektopisch exprimierten humanen Telomerase-Komponenten unterschieden werden konnten. Um die Telomerenlänge zu bestimmen, wurden einige Blastozysten auf Objektträger aufgebracht und in der quantitativen Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (q-FISH) eingesetzt. Q-FISH ist eine quantitative Methode, mit der die Telomerenlänge in individuellen Chromosomen bestimmt werden kann (SCHÄTZLEIN et al., 2004). Sie basiert auf der *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenz-markierten Peptidnukleinsäuren (PNA). PNAs sind synthetische, nicht natürlich vorkommende Oligonukleotide, die im Vergleich zu natürlichen Oligonukleotiden eine höhere Bindungsaffinität zu komplementären Sequenzen aufweisen. Die fluoreszenz-markierte PNA-Sonde wird auf die Zellkerne gegeben; die DNA wird bei 80°C für drei Minuten denaturiert, und die Sonde bindet während einer Inkubationszeit von zwei Stunden hoch spezifisch an die Telomeren. Die Telomerenlänge ist direkt proportional zur Menge der gebundenen Sonde und somit zur Fluoreszenzintensität. Von den einzelnen Zellkernen der Blastozysten wurden Aufnahmen unter einem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Die Bilder wurden dann mit dem TFL Telo V2 Programm von S. POON und P. LANSDORP (POON et al., 1999) ausgewertet. Da die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Telomerspots keine Normalverteilung aufwiesen, wurden diese logarithmisch (\log_{10}) transformiert, um eine Anpassung an eine Normalverteilung zu erreichen. Um die Effekte der experimentellen Gruppen zu testen, wurde ein One-Way-ANOVA angewandt, gefolgt von einem Mehrfachvergleich der Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen (Tukey-Kramer-Test). Die Telomeraseaktivitätsmessung wurde mit dem quantitativen Real-Time Telomeric-Repeat-Amplification-Protokoll (Q-Trap) durchgeführt.

Transposon-Injektionen in das Zytoplasma von Zygoten der Maus und des Schweines

Für die Embryonengewinnung wurden weibliche Tiere superovuliert. Die Mäuse wurden verpaart und die Sauen zweimal besamt. Die Tiere wurden am Folgetag getötet und die

Geschlechtsorgane entnommen. Die Eileiter wurden dann gespült, um die befruchteten Eizellen zu erhalten. Die Zygoten wurden mit einer Plasmidmischung aus Transposon-(CAGGS-Venus) und Transposase-(CMV-SB100) Plasmiden injiziert. Die injizierten Zygoten wurden auf Empfängertiere übertragen. Die Jungtiere wurden zunächst makroskopisch mittels spezifischer Anregung auf das Vorhandensein des Venus-Fluorophores untersucht. Bei den Mäusen wurde RNA und DNA isoliert und diese dann für PCR, Southern Blot sowie Northern Blot eingesetzt. Des Weiteren wurden flowzytometrische Messungen mit einem FACScan (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) durchgeführt. Bei den vom Schwein gewonnenen Feten und Ferkeln wurde DNA aus einer Ohrkerbe isoliert, und Fibroblastenkulturen wurden angelegt. Es wurden ebenfalls Untersuchungen in der PCR, dem Southern Blot sowie dem FACScan durchgeführt. Geschlechtsreife Tiere wurden verpaart bzw. Eber wurden abgesamt und für die künstliche Besamung von Sauen eingesetzt.

3 Ergebnisse

Modulation der Telomeraseaktivität in bovinen Embryonen

Nach der Mikroinjektion der humanen Telomerasekomponenten in das Zytoplasma kommt es zu einer transienten Transgenese, bei der die humanen Telomerase-Gene bis zum Blastozystenstadium exprimiert werden.

Zunächst wurde ermittelt, ob auch durch eine alleinige Expression von hTERC eine Verlängerung der Telomeren sowie eine Erhöhung der Telomeraseaktivität erfolgt. TERC ist ein RNA-kodierendes Gen, das als Matrize für die Telomerenverlängerung dient. In einer weiteren Versuchsgruppe wurden hTERC mit dem hTERT-Expressionsplasmid ko-injiziert, um die gesamte humane Telomerase im Rinderembryo zu exprimieren. Die humane hTERC-Sequenz wurde zunächst im BLAST-Programm (NCBI, Pubmed) mit bovinem TERC abgeglichen. Beim Vergleich der Sequenzhomologie zwischen humanem und bovinem TERC zeigte sich, dass die Sequenzen sich nur in wenigen Bereichen unterscheiden.

Zur Produktion von insgesamt 5869 bovinen Zygoten, von denen 5142 mikroinjiziert bzw. als Kontrollgruppe in Kultur eingesetzt wurden, wurden 4500 Ovarien verarbeitet. In allen Gruppen zusammen wurden 1048 Blastozysten generiert. Bei der Mikroinjektion der Telomerasekomponenten wurden verschiedene Gruppen und Kontrollgruppen gebildet:

Gruppe 1: hTERC- und GFP-Plasmide wurden koinjiziert. Durch Fluoreszenzanalyse konnten erfolgreich injizierte Blastozysten identifiziert werden.

Gruppe 2: Beide Telomerasekomponenten und GFP-Plasmide wurden koinjiziert.

Gruppe 3: Kontrollgruppe, in der nur GFP-Plasmide injiziert wurden (Behandlungs-Kontrollgruppe).

Gruppe 4: Kontrolle, in der keine Mikroinjektion durchgeführt wurde (Kulturkontrolle).

In der RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die humane TERC-Komponente sowie das gesamte humane Telomerase-Enzym in der bovinen Blastozyste exprimiert werden konnten. Die Effekte der hTERC-, bzw. hTERC und hTERT-Injektion auf die Telomerenlänge wurde quantitativ untersucht. Die Zellkerne der Blastozysten wurden mit einer Telomere-spezifischen Sonde hybridisiert, die direkt mit dem Fluorochrom Cy3 markiert war. Die Intensitätsmessungen wurden in Telomere-Fluoreszenz-Units (TFU) angegeben. In Abb. 3A und B ist ein Zellkern einer Blastozyste nach Markierung mit der Telomere-sonde zu sehen.

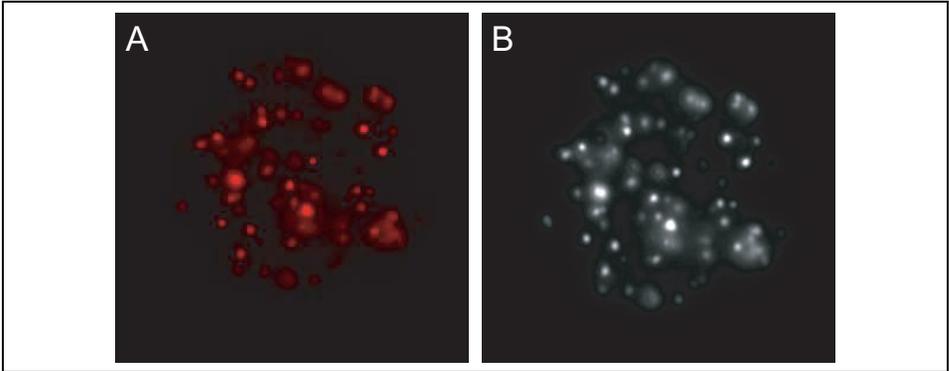


Abb. 3. In situ-Hybridisierung der Telomeren mit einer PNA-Probe.

Q-FISH in einem embryonalen Interphase-Zellkern einer Rinderblastocyste.

A. Einzelner Interphase-Zellkern mit q-FISH markierten Telomeren (rot).

B. Schwarzweißaufnahme desselben Zellkernes wie unter A für eine quantitative Graustufenauswertung.

In situ hybridisation of telomeres with a PNA-Probe.

Q-FISH in an interphase nucleus of bovine blastocyst.

A. Single interphase nucleus with q-FISH labelled telomeres (red).

B. Monochrome picture of the same nucleus like in A for a quantitative grey level analysis.

Im ersten Durchgang wurden 21 Kontrollblastozysten (Gruppe 4) gegen neun injizierte Blastozysten (hTERC und GFP, Gruppe 1) gemessen. Hierzu wurden mehr als 20.000 Datenpunkte der einzelnen Telomerenspot's der Zellkerne verrechnet. Die Analyse der Telomerenspot's der Zellkerne ergab in der Kulturkontrolle (Gruppe 4) eine Telomerlänge von 854 TFU und in der Gruppe 1 eine Telomerlänge von 1138 TFU (Abb. 4).

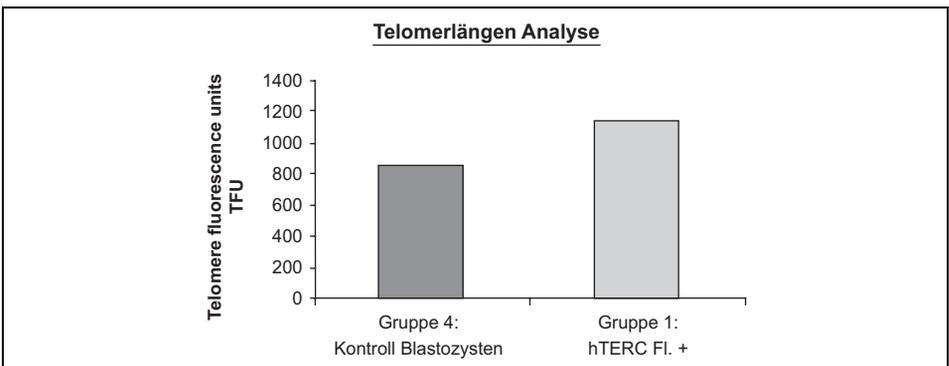


Abb. 4. Telomerer Verlängerung in Blastozysten mit hTERC-Expression.

Q-FISH Messung der mittleren Telomerlänge in injizierten Rinderembryonen

Gruppe 4: Kontrolle (Kulturkontrolle); Gruppe 1: Injiziert mit humanem TERC, fluoreszenzpositiv.

Telomere elongation in blastocysts with hTERC expression.

Q-FISH measurement of mean telomere length in injected bovine embryos.

Group 4: Control (culture control); group 1: Injected with human TERC, fluorescence positive.

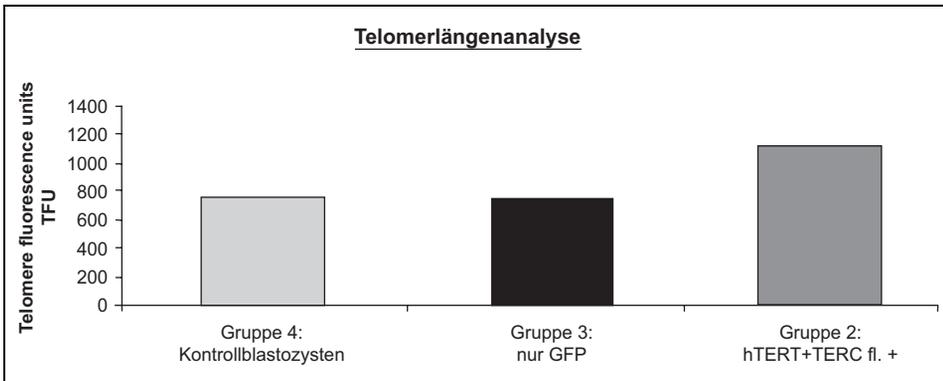


Abb. 5. Telomerenverlängerung in Blastozysten mit hTERC- und hTERT-Expression. Q-FISH Messung der mittleren Telomerenlänge in injizierten Rinderembryonen. Gruppe 4: Kontrolle nicht injiziert; Gruppe 3: Nur mit GFP injiziert (Behandlungs-Kontrollgruppe); Gruppe 2: Injiziert mit humanem TERC und TERT.
Telomere elongation in blastocysts with hTERC and hTERT expression. Q-FISH measurement of mean telomere length in injected bovine embryos. Group 4: Control group not injected; group 3: Injected only with GFP (treatment-control); group 2: Injected with human TERC and TERT.

Die Gruppen 4 und 1 waren signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die mit hTERC injizierte Gruppe wies damit eine signifikante Verlängerung der Telomeren auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass TERC-RNA in frühen Embryonen – anders als bisher angenommen – einen limitierenden Faktor für die Telomerenverlängerung darstellt.

Im zweiten Durchgang wurden 15 Kontrollblastozysten (Gruppe 4) gegen 15 injizierte Blastozysten (hTERC, hTERT und GFP, Gruppe 2) sowie 13 injizierte Blastozysten (nur GFP, Gruppe 3) getestet. Die Analyse der Telomerenspots der Zellkerne ergab bei der Kulturkontrolle (Gruppe 4) eine Telomerenlänge von 761 TFU. Bei der Injektionskontrolle (Gruppe 3: nur GFP injiziert) wurde eine Länge von 749 TFUs ermittelt. Die Messung der hTERC/hTERT-Blastozysten (Gruppe 2) ergab eine Telomerenlänge von 1113 TFU (siehe Abb. 5).

Es gab keine Signifikanz zwischen Gruppe 4 und Gruppe 3. Der Test der Gruppen 3 und 4 gegen Gruppe 2 (hTERC und hTERT) ergab hingegen eine Signifikanz ($p < 0,05$). Die mit hTERC und hTERT injizierte Gruppe wies signifikant verlängerte Telomeren gegenüber der Kontrollgruppe auf. Daraus ergibt sich, dass die (i) Koinjektion von hTERC und hTERT zu einer Verlängerung der Telomeren führt, (ii) die Injektion von GFP zu keiner Telomerenverlängerung führt und (iii) im Vergleich zu einer hTERC-Injektion die Koinjektion hTERC/hTERT mit keiner weiteren Verlängerung verbunden ist. Die Ergebnisse der Verlängerung waren jedoch nicht wesentlich verschieden, so dass es offenbar keinen Vorteil gibt, wenn man beide Komponenten ektopisch exprimiert. Mit der Messung der Telomeraseaktivität in den verschiedenen Gruppen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden.

Transposon-Injektionen in das Zytoplasma von Zygoten der Maus und des Schweines

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zur zytoplasmatischen Plasmid-Injektion in Zygoten zeigten, dass es durch die injizierten Plasmide zu einer transienten Transgenese im

Embryo kommt. Um die transiente Transgenese zu überwinden, wurde auf ein plasmid-kodiertes nicht-autonomes Transposonsystem zurückgegriffen. Die hyperaktive SB100-Transposase wurde im Labor von Z. Ivics (MDZ, Berlin) entwickelt (Ivics et al., 1997; MATEŠ et al., 2009). Mit SB100, aber auch anderen Transposasen, wie PiggyBac und Tol2 konnten bereits transgene Mäuse generiert werden (DING et al., 2005; MATEŠ et al., 2009). In diesen Versuchen erfolgte aber immer eine Injektion in einen Zygoten-vorkern. Nach der hier zu testenden Hypothese sollten die Transposonplasmide auch nach zytoplasmatischer Injektion zu einer stabilen Transgenese führen (Abb. 6). Venus ist eine GFP-Variante, die ein gelbverschobenes Exitationsmaximum (515 nm gegenüber 488 nm für GFP) aufweist. Dabei sollte nur der von den LTRs flankierte DNA-Bereich als

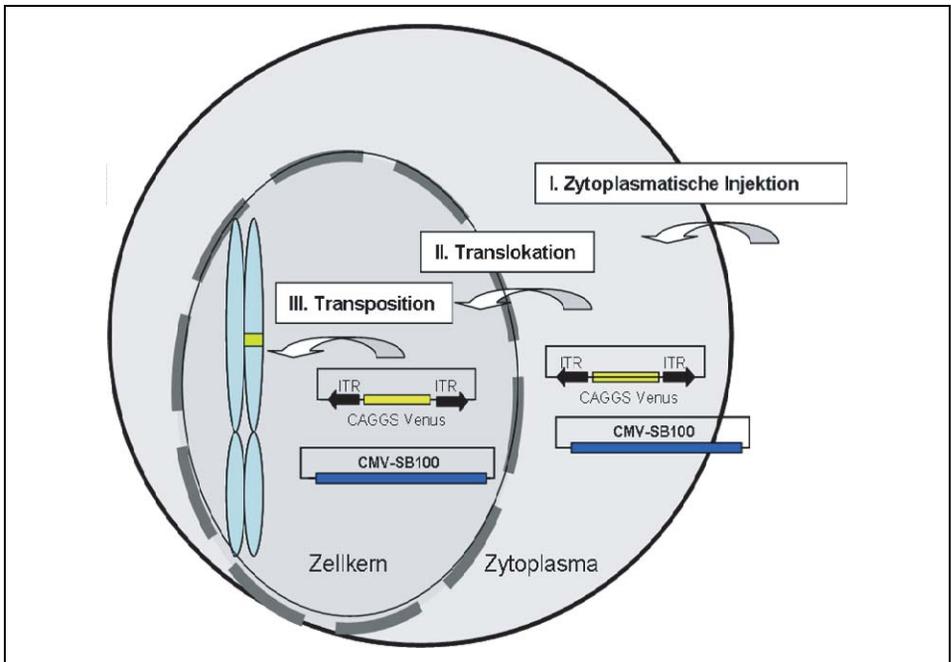


Abb. 6. Kombination von zytoplasmatischer Injektion mit den SB100-Transposonplasmiden. Schematische Darstellung der Transposon-katalysierten DNA-Integration nach zytoplasmatischer Injektion in eine Zygote. Nach Injektion von Transposon- und Transposase-Plasmiden erfolgt eine Translokation in den Zellkern, dort wird das Transposase-Hilfsplasmid exprimiert. Dieses Transposase-Protein katalysiert nun die Integration des Transposons ins Säuger-Genom. Dabei wird spezifisch das Transposon zwischen den ITR's, aber nicht der Rest des Plasmides oder das Transposase-Hilfsplasmid integriert. Diese werden entweder abgebaut oder dünnen sich im Laufe der Zellteilungen aus.

Combination of cytoplasmic injection with the SB100 transposon plasmids.

Schematic depiction of transposon-catalysed DNA integration after cytoplasmic injection into a zygote. After injection of transposon- and transposase plasmids, the plasmids were translocated in the nucleus, there the plasmids were expressed. Then the transposase catalyzes the integration of the transposon in the genome. In this process only the transposon between the ITR's, but not the rest of the plasmid, nor the transposase helper plasmid is integrated. They will be dismantled or will be diluted during cell division.

Einzelkopie in das Genom integriert werden. Das Rückgrat (Backbone) des Venus-Transposons, aber auch das Transposase-Hilfsplasmid sollte nicht integrieren.

Zunächst wurden die Versuche als Pilotprojekt aufgrund der kurzen Reproduktionszeit bei Mäusen durchgeführt. Bei den geborenen Jungtieren erfolgte zunächst der Nachweis der Venus-Expression makroskopisch unter spezifischer Anregungswellenlänge. Die Tiere wurden fotografiert, um die Expressionsmuster und die Expressionsintensität in den Founder-Tieren zu dokumentieren (Abb. 7).

Die Southern Blot Analyse der Jungtiere ergab bei den positiven Tieren eine Einfachintegration des Transposons. Die Mäuse wurden zwecks Prüfung auf Keimbahntrans-

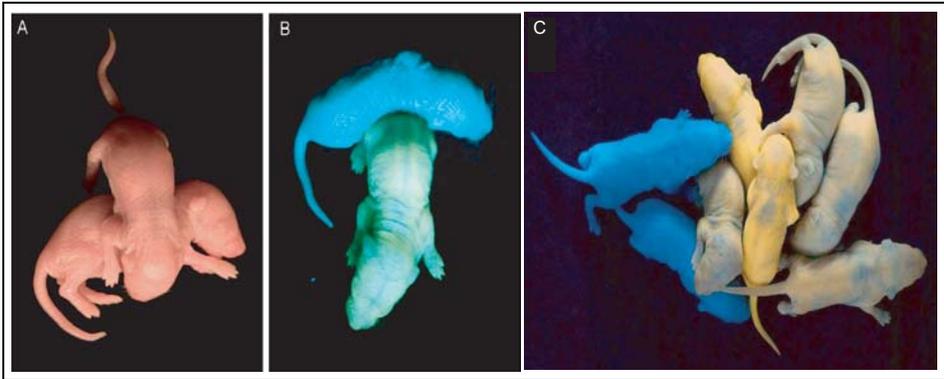


Abb. 7. Venus-transgene Mäuse aus zytoplasmatischer Injektion von SB100-Plasmiden in Zygoten
A. Zwei der Founder-Tiere (F₀) in einer Hellfeldaufnahme

B. Die beiden Founder-Jungtiere aus A unter spezifischer Anregung von Venus. Das Jungtier auf zwölf Uhr ist Fluoreszenz-negativ, das auf sechs Uhr zeigt eine homogene Venus-Fluoreszenz. Spezifische Venus-Fluoreszenz stellt sich unter den Aufnahmebedingungen als gelb-grünliche Färbung dar, die blaue Färbung des transgen-negativen Tieres beruht auf der Reflexion des Anregungslichtes. Da die Aufnahmen an lebenden, neugeborenen Mäusen stattfanden, war eine Bewegung der Tiere zwischen den Aufnahmen nicht zu vermeiden.

C. Nachkommen (F₃) aus der Verpaarung von heterozygoten Elterntieren

Lebende neugeborene Mäuse (Tag 2) unter spezifischer Anregung der Venus-Fluoreszenz. Bei den Nachkommen sind drei Phänotypen feststellbar: 1. Nicht fluoreszierend, die beiden Jungtiere auf der linken Seite (nicht-transgen, -/-); 2. Schwächer fluoreszierend (heterozygot, +/-), die drei Tiere auf der rechten sowie das Eine in der Mitte; 3. Stark fluoreszierend (homozygot, +/+), die beiden Tiere in der Mitte. Durch die Verwendung eines optimierten Emissionsfilters wird hier die Fluoreszenz von Venus natürlicher dargestellt als in Abb. 7B.

Venus-transgenic mice resulting from cytoplasmic injection of SB100 plasmids into zygotes

A. Two founder animals (F₀) in a bright field picture

B. Both founder animals from A under specific Venus excitation. The pub at twelve o'clock is fluorescence negative, that one at six o'clock shows a homogenous Venus fluorescence. Specific Venus fluorescence under this recording condition seems to be yellow-green light, where as the blue light of the negative animal comes from the reflection and scattering of excitation light.

C. Offspring (F₃) from a mating of heterozygous parents

Living newborn mice (day 2) under specific Venus excitation. In the litter three phenotypes can be detected: 1. Non fluorescent, the two pubs on the left side (non-transgenic, -/-); 2. slim fluorescence (heterozygous, +/-), the three pubs on the right side, and that one in the middle; 3. strongly fluorescent (homozygous, +/+), the two pubs in the middle. For this picture an optimized emission filter was used and therefore the Venus fluorescence appears slightly different from the one in picture 7B.

mission aufgezogen und nach Eintritt der Geschlechtsreife mit Wildtyp-Tieren verpaart. Das Venus-Transgen war keimbahngängig. Auch nach mehreren Generationen bestand ein gleichbleibendes homogenes Expressionsmuster sowie eine unveränderte Expressionshöhe. Der Erbgang des Transgens folgt den Mendelschen-Regeln. Die F₁- und F₂-Elterntiere sind heterozygot für das Venustransposon-Transgen. Heterozygote F₁- und F₂-Elterntiere wurden miteinander verpaart, um die Vitalität zu homozygot-transgenen Tieren zu testen. Bei den Würfen der Nachkommen zeigten sich unter Venus-Fluoreszenzanregung drei Phänotypen: Venus-negative, Venus-positive und stark Venus-positive (Abb. 7C). Das Verhältnis dieser Phänotypen folgte einer 25:50:25-Verteilung, die nach den Mendelschen Regeln bei einer Verpaarung von heterozygoten Elterntieren zu erwarten ist. Die Zunahme der detektierbaren Fluoreszenz von heterozygot zu homozygot spricht dafür, dass beide Allele exprimiert werden (Abb. 7C).

Um den Effekt der Gewebeeigenfärbung und die Validität der Fluoreszenzmessung zu überprüfen, wurden die Venus-Transkript-Gehalte mittels Northern Blot gemessen (Abb. 8). Dabei sind spezifische Transkriptgehalte in Herz, Lunge, Leber und Skelettmuskular, verminderte in Hoden und Niere und sehr geringe in der Milz transgener Tiere nachweisbar. Die phänotypischen Fluoreszenzdaten stimmen weitgehend mit den Northern Blot-Daten überein.

Mittels FACS wurde die Venus-Fluoreszenz in peripheren Blutzellen transgener Mäuse ermittelt. Die FACS-Messung zeigt auf der Y-Achse das Streulicht und auf der X-Achse die Grünfluoreszenz an (Abb. 9). Anhand des Signals im Streulicht lassen sich Leukozyten typischerweise in zwei Populationen unterscheiden: die stärker streuenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN's, siehe Abb. 9A, oberes Oval) und die schwächer streuenden mononukleären Zellen (MNS, siehe Abb. 9B, unteres Oval). Bei den heterozygoten und homozygoten Trägartieren (Abb. 9C und E) stellte sich das gleiche Bild dar. Es gab einen Anteil der beiden Zellpopulationen, der stark positiv war, mittlerer Fluoreszenzwert (mF)(heterozygot) = 1024 und mF(homozygot) = 1075 und einem Anteil mit schwacher Fluoreszenz mF(heterozygot) = 11 und mF(homozygot) = 25. Dagegen wiesen die Leukozyten von Wildtyp-Tieren einen mF = 4 auf. Offenbar exprimieren Leukozyten in bestimmten Reifungszuständen den Venus-Marker nur sehr gering. Interessanterweise ist bei den Leukozyten keine Fluoreszenzerhöhung bei Zellen aus homozygoten Tieren messbar. Möglicherweise ist in diesen Zellen bereits im heterozygoten Zustand ein Maximalwert für die Expression erreicht.

Die Versuche bei der Maus wurden anschließend auf das Schwein übertragen. Zwei trächtige Sauen wurden am Tag 30 nach Embryotransfer geschlachtet, um die Feten zu untersuchen. Unter spezifischer Fluoreszenzanregung konnte eine Venus-Fluoreszenz in Organen aus allen drei Keimblättern sowie den Embryonalhüllen von insgesamt vier Feten nachgewiesen werden (siehe Abb. 10).

Das dritte Empfängertier warf am 09.09.09 insgesamt 12 Ferkel, von denen fünf phänotypisch transgen waren (Tab. 1).

Nachdem die beiden transgenen Eber die Geschlechtsreife erreicht hatten, wurden Wildtyp-Sauen mit dem Sperma der positiven Eber besamt, und es konnten erfolgreich transgene Feten und Ferkel in der F₁-Generation generiert werden (Tab. 1).

Die Lokalisation der Transposon-Integrationsorte im Schweinegenom erfolgte durch eine sogenannte Splinkerette-PCR (MATES et al., 2009). Insgesamt konnten 25 Integrationsstellen sequenziert werden, von denen fünf über einen BLAST-Abgleich (www.ensembl.org) eindeutig Loci auf den Chromosomen 3, 7, 8, 13 und X zugeordnet werden konnten. Beispielfhaft ist ein Integrationsort auf dem X-Chromosom in Abb. 11 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Transposoninjektion zu einer hohen Rate spezifischer Transposition des Reporterkonstruktes

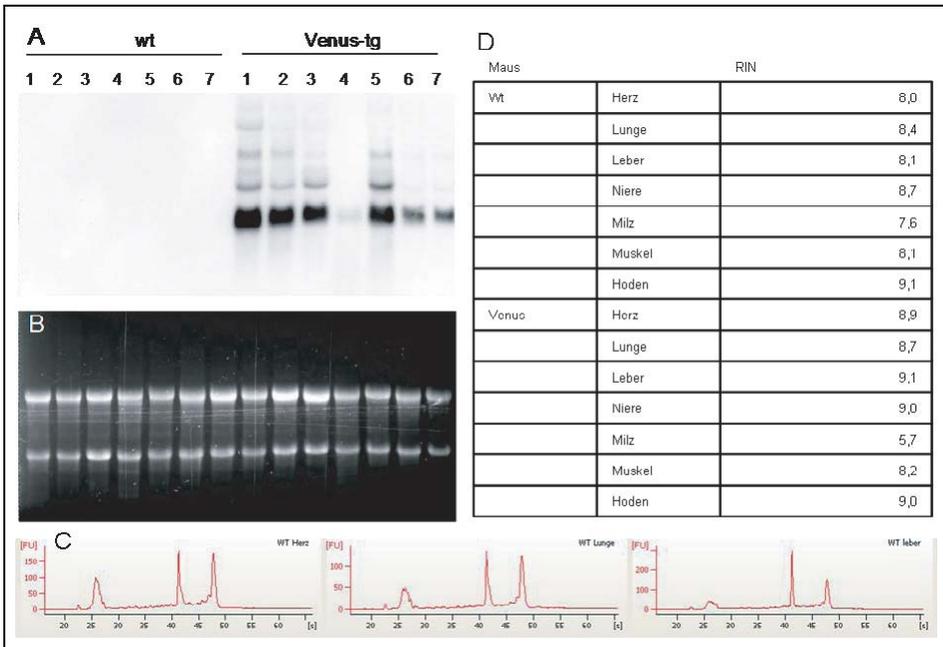


Abb. 8. Gewebespezifische Venus-mRNA-Expression in Transposon-transgenen Mäusen

A. Die RNA wurde aus Herz (1), Lunge (2), Leber (3), Milz (4), Sklettmuskulatur (5), Hoden (6) und Niere (7) aus der Niere einer Wildtyp – und einer Venus (+/) Maus extrahiert und auf eine Membran geblottet. Anschließend wurde die Membran mit einer Venus-spezifischen Sonde hybridisiert. Das Ergebnis des Northern Blotes zeigte hohe mRNA-Mengen in allen Organen außer der Milz. Dies stimmt mit den makroskopischen Ergebnissen der Venus-Fluoreszenz überein.

B. EtBr markierte 18 s and 28 s RNAs zeigen ein gleichmäßiges Beladen von 5 Mikrogramm pro Bahn.

C. Lab-on-Chip Messungen der Proben, exemplarisch für drei Proben dargestellt.

D. Lab-on-Chip RIN-Messwerte der gesamten RNAs. RIN-Messwerte sind ein Indikator für die Intaktheit der RNA Proben. Die RIN-Skala geht von 1 (RNA degradiert) bis 10 (beste Aufbereitung).

Tissue specific Venus-mRNA expression in transposon transgenic mice.

A. Total RNA was extracted from (1) heart, (2) lung, (3) liver, (4) spleen, (5) skeletal muscle, (6) testis, (7) kidney of a wildtype and a Venus (+/+) mouse, blotted to a membrane and hybridized with a Venus-specific probe. The Northern blot indicates high Venus mRNA-levels in all tested organs, except spleen, and corresponds with data obtained from excitation of protein fluorescence.

B) EtBr stained 18 s and 28 s RNAs indicate equal loading of 5 microgram per lane.

C) Lab-on-Chip measurements of exemplary samples.

D) Lab-on-Chip RIN-values of total RNAs. RIN value is an indicator of intactness of a RNA samples, ranging from 1 (degraded) to 10 (best).

in das Genom von Mäusen und Schweinen führt und vitale, stabil transgene Foundertiere erhalten werden können. Durch die Enzym (Transposase)-vermittelte Integration wird jeweils nur eine Kopie des eigentlichen Transgens in das Genom eingebaut, dabei bevorzugt die Transposase offenbar euchromatische Bereiche (MATES et al., 2009; GARRISON

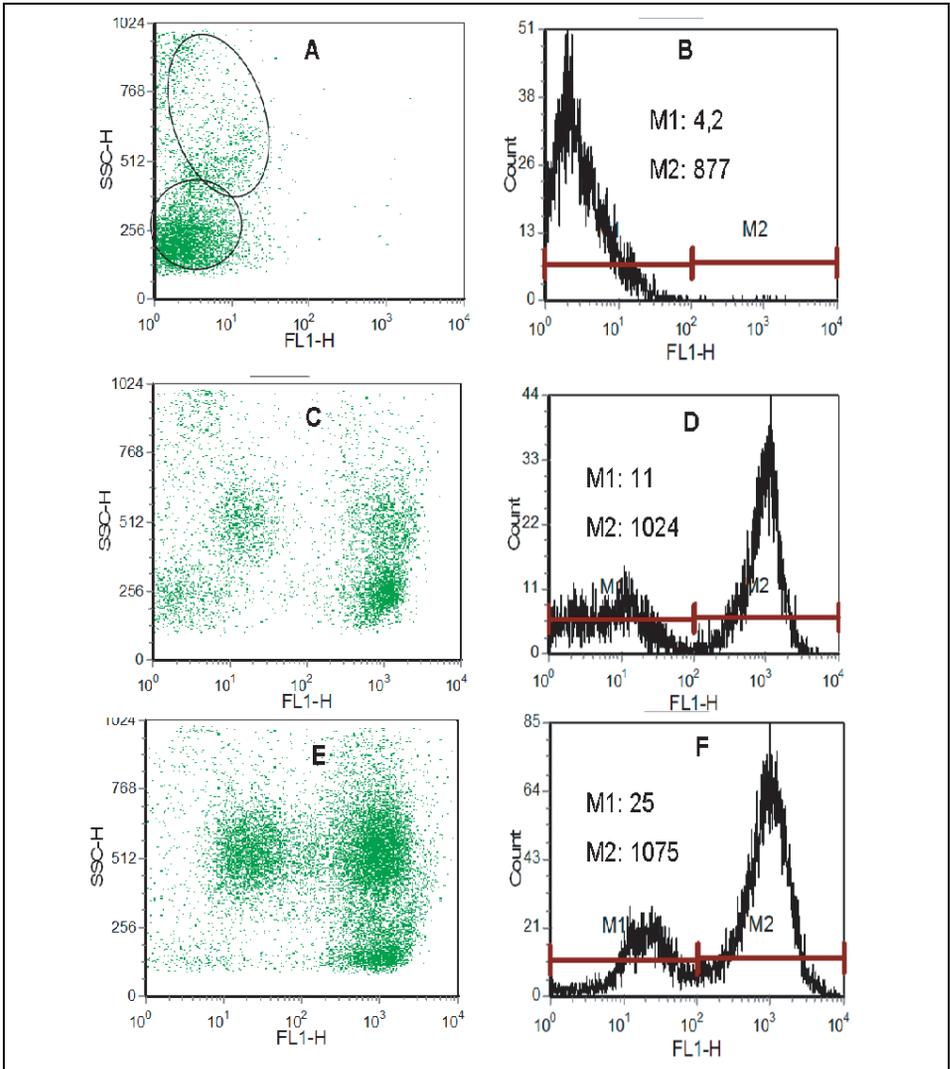


Abb. 9. Venus-Fluoreszenz in Leukozyten

A. + B. Negative Maus; C. + D. Heterozygote Maus; E. + F. Homozygote Maus

A + C + E: Darstellung im Dot Plot-Diagramm. Die y-Achse stellt den Streulichtkanal, die x-Achse den Grünlichkanal dar.

B + D + F: Korrespondierende Histogramme. Die y-Achse stellt die gezählten Ereignisse, die x-Achse den Grünkanal dar. M 1 und M 2 sind die mittlere Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Zellpopulation.

Venus fluorescence in leukocytes

A. + B. Negative mouse; C. + D. Heterozygous mouse; E. + F. Homozygous mouse

A + C + E: Presentation in a dot blot diagram. Y-axis illustrate scattered light channel, x-axis illustrate green light channel.

B + D + F: Corresponding histograms. Y-axis illustrate green light channel. M1 and M2 are the mean fluorescence intensities of cell populations.

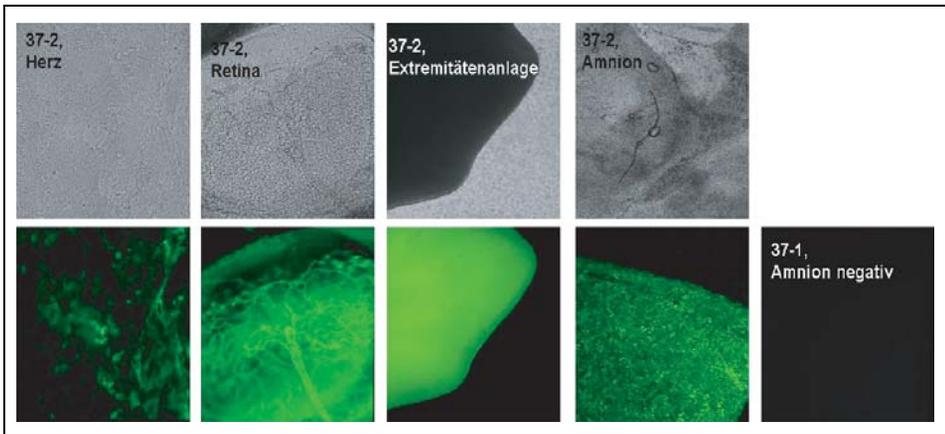


Abb. 10. Transposon-transgener Schweinefetus
 Aufnahmen vom positiven Fetus 37-2 im Hellfeld und unter spezifischer Anregung. Beim Amnion wurde der negative Fetus 37-1 als Negativkontrolle mit abgebildet.
Transposon transgenic pig fetus
 Picture from positive fetus 37-2 in brightfield and under specific venus-excitation. From negative fetus 37-1 a picture of the amnion is shown.

Tab. 1. Übersicht der generierten Feten und Ferkel.
Overview of generated fetuses and piglets.

F0, Feten	7, davon 4 positiv > 57% positiv	> 8,5% bezogen auf die insgesamt injizierten Zygoten
F0, geborene Ferkel	12, davon 5 positiv > 42% positiv	> 5,8% bezogen auf die insgesamt injizierten Zygoten
F1, Feten	21, davon 18 positiv > 86% positiv	–
F1, Ferkel	4 Ferkel, davon 3 positiv > 85% positiv	–

et al., 2007). Sowohl bei der Maus als auch beim Schwein wurden nahezu ubiquitäre Expressionsmuster nachgewiesen. Variierte Expressionsmuster oder Gen-Silencing traten nicht auf. Die detaillierten Ergebnisse sind in der Doktorarbeit von GARRELS (2010) dargestellt, in Kurzform sind sie auf den internationalen Konferenzen der TransTech-Society (KUES et al., 2010) und der ESDAR (GARRELS et al., 2010) präsentiert worden.

4 Diskussion

Die zytoplasmatische Plasmidinjektion führt überwiegend zu einer transienten Transgenese, d.h. die injizierten Plasmide sind episomal stabil, da sie in einer sogenannten ccc

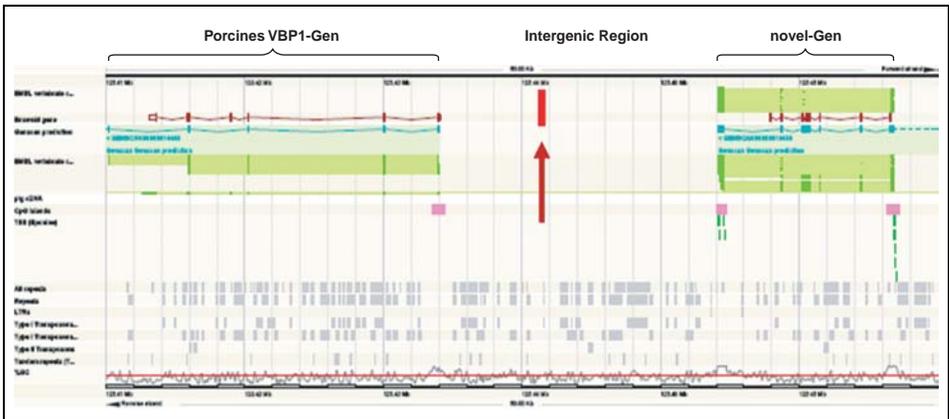


Abb. 11. Darstellung eines Integrationsortes auf dem porcinen X-Chromosom.

Die Integration (siehe roter Pfeil) liegt in einem intergenetischen Bereich zwischen dem porcinen VBP1-Gen und einem sogenannten Novel-Gen. Der BLAST-Abgleich erfolgte unter www.ensembl.org.

Illustration of one integration site on the porcine X-chromosome.

Integration (see red arrow) occured in an intergenic region between the porcine VBP1-gene and a so-called novel gene. The BLAST alignment was performed with www.ensembl.org.

(covalently closed circular) stabilisierten Form vorliegen und auf die Tochterzellen verteilt werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene methodische Ansätze der Mikroinjektion in das Zytoplasma gewählt. Im ersten Teil der Arbeit wurden zuerst zirkuläre Expressionsplasmide für die RNA-Komponente (hTERC) der humanen Telomerase und anschließend beide Telomerase-Gene (hTERC und hTERT) gemeinsam in das Zytoplasma in vitro produzierter Rinderzygoten injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das RNA-Gen (hTERC) als auch die protein-kodierenden Gene (hTERT und GFP) mit hoher Effizienz in der Blastozyste ko-exprimiert wurden. Da ca. 10.000 Plasmid-Moleküle injiziert werden, sind rechnerisch ca. 50–100 Moleküle pro Blastozysten-Blastomer zu erwarten. Aufgrund der zirkulären Struktur ist eine Integration in das Genom ein sehr unwahrscheinliches Ereignis. Die zytoplasmatische Plasmidinjektion ist also gut für eine ektopische Expression rekombinanter Gene in frühen Embryonen geeignet. Eine stabile Transgenese mit Integration der Fremd-DNA ins Genom tritt dabei nicht oder nur sehr selten auf.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob diese Limitierung in Bezug auf stabile Transgenese durch die Kombination mit einem nicht-autonomen Transposon überwindbar ist. Aktive oder reaktivierte Klasse II-Transposons können durch rekombinante DNA-Techniken zu sog. nicht-autonomen Transposon-Systemen entwickelt werden (IVICS et al., 1997; MATES et al., 2009). In dieser Arbeit wurde die Methode der zytoplasmatischen Injektion mit dem Transposon-System kombiniert. Dabei wurde ein Plasmid, das ein LTR-flankiertes Venus-Gen trägt, und ein zweites Plasmid, das die SB100-Transposase trägt, in das Zytoplasma von Maus- oder Schweinezygoten injiziert. Es konnten erfolgreich transgene Mäuse und erstmals auch Transposon-transgene Schweine produziert werden. Die Vorteile der Transposon-vermittelten Transgenese gegenüber einer Zufallsintegration bei klassischen Methoden sind, dass (i) es durch die Zugabe der

Transposase (Integrase) zu einer höheren Rate transgener Founder-Tiere kommt, (ii) die Transposase-vermittelte Integration vor allem in euchromatischen Bereichen erfolgt, (iii) vorwiegend Einzelkopien des Transposons integriert werden (gegenüber Konkatameren der Fremd-DNA bei der klassischen Injektionsmethode) und dass (iv) bei der Transposition keine Plasmid-Backbone-Sequenzen mitintegriert werden. Bei den Founder-Tieren wurden homogene Expressionsmuster des Venus-Transgens beobachtet. Silencing oder variegierende Expressionsmuster wurden nicht gefunden. Bei einer Founder-Maus war ein ausgeprägter Transgen-Mosaizismus feststellbar (nicht gezeigt). Die wesentlich erhöhte Effizienz der Transgenese beim Schwein macht diese Methodik zu einem vielversprechenden Ansatz für genetische Modifikationen bei Nutztieren.

Expression humaner Telomerasekomponenten in bovinen Embryonen

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass humanes TERC (ein RNA-Gen) und humanes TERT (ein Protein-kodierendes Gen) mittels zytoplasmatischer Plasmidinjektion in bovinen Zygoten exprimiert werden können. Die Expression – sowohl von hTERC allein, als auch die Expression des gesamten Holoenzym – führte zu einer signifikanten Verlängerung der Telomeren in den Blastozystenstadien. Die Expression des gesamten Enzyms zeigte keine weiter gesteigerte Verlängerung im Vergleich zur alleinigen Expression von hTERC. In beiden Gruppen konnte eine tendenzielle Erhöhung der Telomeraseaktivität nachgewiesen werden.

Während der frühen Embryonalentwicklung ist die Telomeraseaktivität streng reguliert. In der ungeriften Oozyte ist eine hohe Telomeraseaktivität vorhanden, die bei humanen Zygoten unter die Nachweisgrenze abfällt, um dann im Blastozystenstadium wieder anzusteigen (XU and YANG, 2000; WRIGHT et al., 2001). Beim Übergang von der Morula zur Blastozyste wurde ein Telomerase abhängiges Telomeren-Verlängerungsprogramm nachgewiesen (SCHAEZLEIN et al., 2004). Beim Menschen ist eine reduzierte Telomeraseaktivität mit Knochenmarkserkrankungen, Lungenfibrose, Tumorbildung und anderen Krankheitsbildern verbunden (LANSDORP, 2009). Telomeren stehen im Zusammenhang mit Regeneration, Alterung und Tumorbildung (DJOJOSUBROTO et al., 2003). Wenn Telomeren kritisch verkürzt sind, kommt es zur Seneszenz und zum Zelltod (LUNDBLAD, 1997). Bei Telomerase knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass bei ihnen schon im Alter von 18 Monaten Defekte im Zusammenhang mit einer verfrühten Alterung auftreten (BLASCO et al., 1999). Auch starker Stress kann zu einer beschleunigten Telomerenverkürzung führen (EPEL et al., 2004). Im Zusammenhang mit Tumorbildung spielt die Telomerase eine wichtige Rolle. In 90% der Tumorzellen ist eine erhöhte Telomerase-Expression und -Aktivität nachweisbar (SHAY and BACCHETTI, 1997). Ein Screening der meisten humanen Krebsarten hat eine starke Assoziation zwischen Telomeraseaktivität und dem Grad der Malignität der Krebszellen ergeben. Die Telomerase ist deshalb zum gebräuchlichen Tumormarker geworden (SHAY and WRIGHT, 1996).

Die Transfektion von TERT in Telomerase-negativen Zellen stellt die Telomeraseaktivität wieder her und führt zu einer verlängerten Proliferation der Zellen. Die Wiederherstellung der Telomeraseaktivität wiederum ist mit verlängerten Telomeren, aber ohne Transformation oder maligne Veränderungen verbunden (BODNAR et al., 1998). Bovine microvaskuläre Endothelzellen, die mit hTERT immortalisiert wurden, zeigten eine Proliferationsrate von 40–45 Passagen, während die Wildtyp-Kontrollgruppe nicht mehr als 20–22 Passagen durchlief (BUSER et al., 2006).

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die katalytische Untereinheit TERT nur in Zellen der Keimbahn, frühen Blastomeren und einigen somatischen Stammzellen exprimiert wird und damit als limitierender Faktor für die Telomeraseaktivität gilt,

während TERC ubiquitär exprimiert wird und deshalb wenig Einfluss auf die Telomerase-Aktivität haben dürfte (MEYERSON et al., 1997; NAKAMURA et al., 1997). Bei verschiedenen Zelltypen wurde gezeigt, dass die Telomeraseaktivität mit der TERT-mRNA Expression korreliert (BLASCO et al., 1999). Die Transfektion von TERT in Telomerase-negativen Zellen führt zur verlängerten Proliferation der Zellen und zu verlängerten Telomeren ohne Transformation oder maligne Veränderungen (BODNAR et al., 1998; YANG et al., 1999).

Es scheint, dass bei bovinen Embryonen der TERC- Transkriptgehalt limitierend für die Aktivität der Telomerase ist. Es wurde schon in früheren Arbeiten gezeigt, dass sich mit Spezies-fremden Telomer-Komponenten eine vollständige Telomerasefunktion herstellen lässt. So wurde in Linseneithelzellen vom Kaninchen die hTERT-Komponente exprimiert, sie führte zusammen mit dem endogenen TERC zur Telomeraseaktivität (XIANG et al., 2000). Es gibt aber auch Anzeichen, dass die TERC-RNA doch ein limitierender Faktor für die Telomerase-Aktivität ist. Sowohl TERT als auch TERC schienen essentiell für die Aufrechterhaltung und Verlängerung der Telomere zu sein, aber die Anzahl der Genkopien und transkriptionelle Regulation von TERC war limitierend für die Telomeraseaktivität *in vivo* (CHIANG et al., 2004).

Die Injektion der beiden humanen Telomerase-Gene (hTERC mit hTERT) ergab eine signifikante Verlängerung der Telomeren in der Blastozyste. Offenbar ergibt sich aber durch die Ko-Injektion keine weitere Telomerenverlängerung. Beide Komponenten sind anscheinend im bovinen Embryo limitierend. Mit der Expression der einzelnen Telomerasekomponenten konnte sehr wahrscheinlich bereits eine Maximalkapazität erreicht werden, so dass die Expression der gesamten Telomerase keine weitere Verbesserung der Ergebnisse bringt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit der hier beschriebenen Methodik zuverlässig Embryonen mit veränderten Telomerenlängen erzeugt werden konnten, die einen wichtigen Schritt zur Entwicklung eines *Bos Taurus*-Modells für die Alterungsforschung darstellen. Des Weiteren könnten bovine Blastozysten mit verlängerten Telomeren eine vielversprechende Möglichkeit sein, bovine embryonale Stammzellen aus den Blastozysten zu isolieren. Bei Mäusen ist eine Stammzellisolierung erfolgreich, und sie weisen wesentlich längere Telomeren auf. Beim Menschen wurde gezeigt, dass Embryonen, die die kritische Telomerenlänge unterschritten haben, nicht mehr in der Lage sind, in der Gebärmutter zu implantieren (KEEFE et al., 2005). Eine Modulation der Telomeraseaktivität könnte also ein wichtiger Schritt für die Entwicklung von therapeutischen Strategien für den humanen Embryotransfer sein.

Transposon-vermittelte Transgenese bei Mäusen und Schweinen

Die Mausstudie war ein Pilotprojekt, das wegen der sehr kurzen Reproduktionszeit in 8–12 Wochen durchgeführt werden konnte (HOGAN et al., 1986). Es sollte geklärt werden, ob die Transposon-vermittelte Transgenese auch mit der vereinfachten Mikroinjektion ins Zytoplasma möglich ist. In einem Wurf konnte ein Tier makroskopisch unter spezifischer Anregung als Venus-GFP positiv bewertet werden. Die SB100-Transposase und der Backbone-Anteil der Venus-Plasmide waren in der PCR nicht nachweisbar. Dieser Befund spricht dafür, dass eine Transposase-vermittelte Integration in das Genom stattgefunden hat. Bei der positiven Maus konnte eine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Die positiven Tiere aus der F₁-Generation wurden weiter verpaart und eine Venus-Transposon-transgene Linie etabliert. Durch gezielte Verpaarung ist es gelungen, eine homozygote Linie zu etablieren. Mittels Southern Blot konnte gezeigt werden, dass die phänotypisch positiven Mäuse nur eine Kopie des Venus-Transposons integriert hatten. Auch im Southern Blot konnten keine Hybridi-

sierungssignale für das SB100-Hilfsplasmid oder Backbone-Sequenzen nachgewiesen werden; somit ist von einer Transposase-vermittelten Integration auszugehen. Unter spezifischer Anregung und sensitiver Detektion zeigten homozyote Tiere eine deutlich verstärkte Venus-Fluoreszenz gegenüber heterozygoten Tieren. Die zytoplasmatische Injektion von Venus-Transposon und Transposase-Hilfsplasmid führte zur stabilen Transgenese. Silencing-Effekte und variegierende Expressionsmuster wurden nicht gefunden.

Beim Schwein zeigten schon die ersten Ergebnisse aus den gewonnenen Feten, dass eine Transposon-vermittelte Transgenese beim Schwein möglich ist. Die nächste Trächtigkeit wurde deshalb nicht abgebrochen, sondern die Ferkel wurden ausgetragen. Von den 12 Ferkeln waren fünf positiv und sieben negativ. Vier negative und drei positive Ferkel verstarben, was nicht auf die Transgenität zurückzuführen war, sondern auf eine vorhandene Infektion.

Der Vorteil der hier etablierten Methode zur Transgenese beim Schwein liegt besonders in der hohen Rate transgener Feten und Ferkel, die unter den besten Konzentrations-Bedingungen (10 fg/pl Transposon- und 5 fg/pl SB100-Transposase-Plasmid) der Expressionsplasmide erzielt wurden. In einer Arbeit von Jakobsen (JAKOBSEN et al., 2010) wurden ebenfalls transgene Schweine mit der Sleeping-Beauty-DNA-transposition generiert. Hier wurde jedoch keine Mikroinjektion durchgeführt, sondern es wurden transgene Fibroblasten generiert und diese zum Klonen eingesetzt. Die geborenen Ferkel waren zwar zu einem großen Teil transgen, jedoch zeigte sich zum einen, dass die Transposonkassette vielfach integriert war mit bis zu 13 Integraten, zum anderen zeigte sich, dass die Integration nicht immer Transposase vermittelt war, sondern dass es auch zu Zufallsintegrationen kam, in denen Teile des Plasmid- Grundgerüsts mit-integriert wurden (JAKOBSEN et al., 2010). In dieser Arbeit konnte mit Splinkerette PCR bewiesen werden, dass tatsächlich in jedem Fall eine transpositionelle Integration stattgefunden hat, da alle identifizierten Integrationsorte einen definierten Übergang von der ITR-Sequenz in die genomische Sequenz aufwiesen. Bei einigen davon konnten sogar exakte Positionen auf den Chromosomen zugeordnet werden. Die beiden positiven Eber sind inzwischen geschlechtsreif; sie wurden zur künstlichen Besamung von Wildtypsauen eingesetzt, eine Keimbahntransmission konnte nachgewiesen werden.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen wesentlichen Schritt zur Verbesserung der Produktion transgener Großtiermodelle für verschiedene Anwendungsbereiche dar.

Acknowledgements

Ich danke U. Taylor für die durchgeführten FACS-Analysen; E. Lemme, D. Herrmann, K.G. Hadel, P. Hassel, M. Diederich, C. Ehling, S. Wittig und R. Poppenga für die exzellente technische Assistenz sowie E. Kuhfeld und dem SVA-Team für die gute Betreuung der Tiere. Ich danke auch denen, die ich hier nicht erwähnt habe.

Literatur

- BLACKBURN, E.H., (1991): Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569–73.
BLACKBURN, E.H., (2001): Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661–73.
BLASCO, M.A., S.M. GASSER and J. LINGNER, (1999): Telomeres and telomerase. *Genes Dev.* **13**, 2353–9.

- BODNAR, A.G., M. OUELLETTE, M. FROLKIS, S.E. HOLT, C.P. CHIU, G.B. MORIN, C.B. HARLEY, J.W. SHAY, S. LICHTSTEINER and W.E. WRIGHT, (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349–52.
- COUNTER, C.M., A.A. AVILION, C.E. LEFEUVRE, N.G. STEWART, C.W. GREIDER, C.B. HARLEY and S. BACCHETTI, (1992): Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921–9.
- BUSER, R., R. MONTESANO, I. GARCIA, P. DUPRAZ and M.S. PEPPER, (2006): Bovine microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase. *J. Cell Biochem.* **98**, 267–86.
- CHIANG, Y.J., M.T. HEMANN, K.S. HATHCOCK, L. TESSAROLLO, L. FEIGENBAUM, W.C. HAHN and R.J. HODES, (2004): Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance *in vivo*. *Mol. Cell Biol.* **24**, 7024–31.
- COLLINS, K., R. KOBAYASHI and C.W. GREIDER, (1995): Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* **81**, 677–86.
- DEPPENMEIER, S., O. BOCK, M. MENGEL, H. NIEMANN, W. KUES, E. LEMME, D. WIRTH, K. WONIGEIT and H. KREIPE, (2006): Health status of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59. *Xenotransplantation.* **13**, 345–56.
- DOJOSUBROTO, M.W., Y.S. CHOI, H.W. LEE and K.L. RUDOLPH, (2003): Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol. Cells* **15**, 164–75.
- EPEL, E.S., E.H. BLACKBURN, J. LIN, F.S. DHABHAR, N.E. ADLER, J.D. MORROW and R.M. CAWTHON, (2004): Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 17312–5.
- GARRELS, W., (2010): Transgene Expression durch zytoplasmatische Injektion von Plasmiden und Transposon-basierten Konstrukten in Säugerembryonen. Diss. TH Hannover.
- GARRELS, W., L. MATES, S. HOLLER, H. NIEMANN, Z. IZSVAK, Z. IVICS and W.A. KUES, (2010): Generation of transgenic pigs by the *Sleeping Beauty* transposition in zygotes. *Reprod. Dom. Anim.* **45**, 65 (abstract).
- GRANADA, J.F., G.L. KALUZA, R.L. WILENSKY, B.C. BIEDERMANN, R.S. SCHWARTZ and E. FALK, (2009): Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *EuroIntervention.* **5**, 140–8.
- GREIDER, C.W. and E.H. BLACKBURN, (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–13.
- HANDE, M.P., E. SAMPER, P. LANSDORP and M.A. BLASCO, (1999): Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell Biol.* **144**, 589–601.
- HAYFLICK, L. and P.S. MOORHEAD, (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621.
- HABERMANN, F.A., A. WUENSCH, F. SINOWATZ and E. WOLF, (2007): Reporter genes for embryogenesis research in livestock species. *Theriogenology* **68** Suppl 1, S116–S124.
- HARLEY, C.B., A.B. FUTCHER and C.W. GREIDER, (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–60.
- HEMANN, M.T. and C.W. GREIDER, (2000): Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4474–8.
- HOGAN, B., F. CONSTANTINI and E. LACY, (1986): Manipulation the Mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- IQBAL, K., B. BARG-KUES, S. BROLL, J. BODE, H. NIEMANN and W. KUES, (2009): Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *Biotechniques* **47**, 959–68.

- IVICS, Z., M.A. LI, L. MATES, J.D. BOEKE, A. NAGY, A. BRADLEY and Z. IZSVAK, (2009): Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat. Methods* **6**, 415–22.
- JACOBSEN, J.C., C.S. BAWDEN, S.R. RUDIGER, C.J. MCLAUGHLAN, S.J. REID, H.J. WALDVOGEL, M.E. MACDONALD, J.F. GUSELLA, S.K. WALKER, J.M. KELLY, G.C. WEBB, R.L. FAULL, M.I. REES and R.G. SNELL, (2010): An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1873–82.
- JAKOBSEN, J.E., J. LI, P.M. KRAGH, B. MOLDT, L. LIN, Y. LIU, M. SCHMIDT, K.D. WINTHER, B.D. SCHYTH, I.E. HOLM, G. VAJTA, L. BOLUND, H. CALLESEN, A.L. JØRGENSEN, A.L. NIELSEN and J.G. MIKKELSEN, (2010): Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic Res* DOI 10.1007/s11248-010-9438-x.
- KAWAKAMI, K., (2007): Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* **8** Suppl 1, S7.
- KEEFE, D.L., S. FRANCO, L. LIU, J. TRIMARCHI, B. CAO, S. WEITZEN, S. AGARWAL and M.A. BLASCO, (2005): Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 1256–60.
- KUES, W.A. and H. NIEMANN, (2004): The contribution of farm animals to human health. *Trend Biotechnol.* 2004 Jun **6**, 286–94.
- KUES, W.A., R. SCHWINZER, D. WIRTH, E. VERHOEYEN, E. LEMME, D. HERRMANN, B. BARG-KUES, H. HAUSER, K. WONIGEIT and H. NIEMANN, (2006): Epigenetic silencing and tissue independent expression of a novel tetracycline inducible system in double-transgenic pigs. *FASEB J.* **20**, 1200–2.
- KUES, W.A., W. GARRELS, L. MATES, S. HOLLER, H. NIEMANN, Z. IZSVAK and Z. IVICS, (2010): Production of transgenic pigs by the *Sleeping Beauty* transposon system. *Transgenic Res.* **19**, 336. (Abstract).
- LANSDORP, P.M., (2009): Telomeres and disease. *EMBO J.* **28**, 2532–40.
- MATES, L., M.K. CHUAH, E. BELAY, B. JERCHOW, N. MANOJ, A. COSTA-SANCHEZ, D.P. GRZELA, A. SCHMITT, K. BECKER, J. MATRAI, L. MA, E. SAMARA-KUKO, C. GYSEMANS, D. PRYPUTNIEWICZ, C. MISKEY, B. FLETCHER, T. VANDENDRIESSCHE, Z. IVICS and Z. IZSVAK, (2009): Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet.* **41**, 753–61.
- MENDICINO, M., J. RAMSOONDAR, C. PHELPS, T. VAUGHT, S. BALL, T. LEROITH, J. MONAHAN, S. CHEN, A. DANDRO, J. BOONE, P. JOBST, A. VANCE, N. WERTZ, Z. BERGMAN, X.Z. SUN, I. POLEJAEVA, J. BUTLER, Y. DAI, D. AYARES and K. WELLS, (2010): Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus. *Transgenic Res.*
- MCCLINTOCK, B., (1953): Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics* **38**, 579–99.
- MEYERSON, M., C.M. COUNTER, E.N. EATON, L.W. ELLISEN, P. STEINER, S.D. CADDLE, L. ZIAUGRA, R.L. BEIJERSBERGEN, M.J. DAVIDOFF, Q. LIU, S. BACCHETTI, D.A. HABER and R.A. WEINBERG, (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785–95.
- NAKAMURA, T.M., G.B. MORIN, K.B. CHAPMAN, S.L. WEINRICH, W.H. ANDREWS, J. LINGNER, C.B. HARLEY and T.R. CECH, (1997): Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**, 955–9.
- NIEMANN, H. and W.A. KUES, (2007): Transgenic farm animals: an update. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 762-770.
- OLOVNIKOV, A.M., (1971): [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **201**, 1496–9.
- PETERSEN, B., A. LUCAS-HAHN, M. OROPEZA, N. HORNEN, E. LEMME, P. HASSEL, A.L. QUEISSER and H. NIEMANN, (2008): Development and validation of a highly efficient

- protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning Stem Cells* **10**, 355–62.
- PHILLIPS, R.W., L.M. PANEPINTO, R. SPANGLER and N. WESTMORELAND, (1982): Yucatan miniature swine as a model for the study of human diabetes mellitus. *Diabetes* **31**, 30–6.
- POON, S.S., U.M. MARTENS, R.K. WARD and P.M. LANSDORP, (1999): Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* **36**, 267–78.
- SCHÄTZLEIN, S., A. LUCAS-HAHN, E. LEMME, W.A. KUES, M. DORSCH, M.P. MANNS, H. NIEMANN and K.L. RUDOLPH, (2004): Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 8034–8.
- SHARMA, B.R. and D. HARISH, (2004): Organ transplantation programme: an overview of the present situation. *Med. Sci. Law* **44**, 245–51.
- SHAY, J.W. and W.E. WRIGHT, (1996): Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **8**, 66–71.
- SMOGORZEWSKA, A. and T. DE LANGE, (2004): Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **73**, 177–208.
- VERDUN, R.E. and J. KARLSEDER, (2007): Replication and protection of telomeres. *Nature* **447**, 924–31.
- WATSON, J.D., (1972): Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**, 197–201.
- WALL, R.J. and M. SHANI, (2008): Are animal models as good as we think? *Theriogenology* **69**, 2–9.
- WRIGHT, D.L., E.L. JONES, J.F. MAYER, S. OEHNINGER, W.E. GIBBONS and S.E. LANZENDORF, (2001): Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol. Hum. Reprod.* **7**, 947–55.
- XU, J. and X. YANG, (2000): Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol. Reprod.* **63**, 1124–8.