

76143

**ALESSIO, ANA PAULA**

Modificación del presente convenio colectivo de sus de funcionamiento y otras condiciones de

2017 **76143**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y  
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctora  
en Ciencias Biológicas

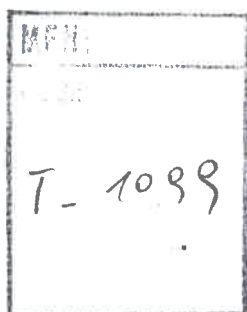
**MODIFICACIÓN DEL GENOMA BOVINO MEDIANTE EL USO DE  
TRANSPOSONES Y OTRAS METODOLOGÍAS EMERGENTES**

Mic. Ana Paula Alessio

DIRECTOR: Dr. Pablo Bosch


CO-DIRECTORA: Dra. Nancy Rodríguez

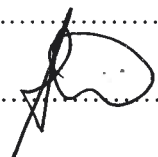
84107

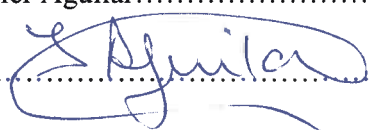


Río Cuarto, Mayo 2017

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Dr. Rafael Fernández-Martin.....Universidad de Buenos Aires  
Firma:..........Aclaración: *Rafael Fernández Martin*

Dr. Adrián Mutto..... Universidad de San Martín  
Firma:..........Aclaración: *Adrián Mutto*

Dr. Javier Aguilar..... Universidad Nacional de Río Cuarto  
Firma:..........Aclaración: *Javier Aguilar*

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha: *Río Cuarto 19 de mayo 2017*

Calificación: *Soldados Sobresaliente*

***A mis papás.***

*Entre todas las aventuras, las más fascinantes son las exploraciones a lo desconocido. Y esa fascinación reside en que la curiosidad es uno de los motores de la evolución. La ciencia tiene la fascinación de la aventura porque, por encima de todo, es una exploración a lo desconocido.*

***César Milstein***

## AGRADECIMIENTOS

Ésta ha sido una etapa que finalizó con muchas satisfacciones, una etapa de crecimiento personal, de ponerse a prueba y conocerse mejor. Han sido unos años realmente intensos, marcados por la gente que me ha acompañado durante todo este tiempo, y de la que tanto he aprendido, a nivel profesional y personal. Quería mostrar mi agradecimiento a todas las a todas aquellas personas, colegas y amigos que me brindaron su apoyo, tiempo e información y que han hecho posible que estos años de tesis hayan sido una experiencia increíble.

A Dios y a la Virgen.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por brindarme el espacio para llevar a cabo mi doctorado y a CONICET cuyo financiamiento me permitió formarme como profesional durante estos años.

A mis directores, el Dr. Pablo Bosch y la Dra. Nancy Rodríguez por darme la oportunidad de entrar al laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto. Gracias por su dedicación, por estar siempre dispuestos a escucharme y por tener en cuenta mis ideas y opiniones. Gracias Nancy por todos los consejos y por preocuparte por mí.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes, e intercambios de ideas durante todo el doctorado que ayudaron a conducir mi trabajo para el logro de los objetivos propuestos.

A mi familia por su apoyo incondicional, por su esfuerzo y dedicación. Por saber escucharme y aconsejarme, en fin...por cuidar de mí siempre.

A mis compañeros del laboratorio 23 y a los que ya se fueron, un abrazo especial a Ceci por ser mi inmejorable compañera de experimentos!

A mis microbios del alma, siempre presentes! Gracias por hacerme sonreír en los momento difíciles y por celebrar conmigo los buenos momentos. Por ser indudablemente un apoyo, al que siempre he sabido que podía acudir. No tengo dudas que conservaré su amistad para siempre.

A Mariano, por hacer que los últimos años fueran tan especiales. Gracias por estar siempre a mi lado, por no soltar mi mano.

Al Dr. Flavio Meirelles y a su equipo de la Universidad de Sao Paulo por brindarme la oportunidad de realizar una estancia que significó un enorme avance en mis conocimientos teóricos y prácticos. Un agradecimiento especial a la Dra. Fabiana Bressan por todo su apoyo durante la estadía.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación por ofrecerme una beca que fue para mí una experiencia única tanto en el plano profesional como personal. Gracias al Dr. Pablo Bermejo, al Dr. Alfonso Gutierrez-Adán y a todos los becarios del INIA por recibirme y brindarme tantos buenos momentos.

A mis amigas de siempre, que desde un lugar totalmente ajeno supieron apoyarme siempre, gracias por tantos años de amistad.

A los becarios del Departamento de Biología Molecular que me han ayudado durante esta etapa.

Al Dr. Teodoro Posse del Frigorífico Río Cuarto, por su buena predisposición durante todo el doctorado.

## ÍNDICE

Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen en español e inglés	xi
Abreviaturas	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
• Biotecnología Transgénica	1
• Microinyección de cigotos	1
• Manipulación de Células madre	2
• Transferencia Nuclear de Células somáticas	3
• Aspecto técnicos de la TNCS	4
• Eficiencia en el Clonado bovino por TNCS	9
• Electroporación in vivo de gónadas	10
Capítulo I: Desarrollo de un sistema transgénico basado en un transposón para introducir modificaciones en el genoma de fibroblastos bovinos en cultivo para aplicaciones biotecnológicas	
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Transgénesis activa mediada por elementos transponibles	11
1.2. Sistema piggyBac	13
1.2.1. Mecanismo de integración del piggyBac	14
1.3. Aplicación de elementos transponibles en transgénesis animal	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Obtención y cultivo de fibroblastos fetales bovinos (FFBs)	23
2.2. Vectores piggyBac	23
2.2.1. pmGENIE-3	23
2.2.2. pmhyGENIE-3	24
2.2.3. pmGENIE-3/ ΔpiggyBac	24
2.3. Transfección Celular y Evaluación de la expresión in-vitro de EGFP	24
2.3.1. Efecto del agente JetPRIME sobre la eficiencia de transfección de FFBs	24
2.3.2. Efecto de la electroporación sobre la eficiencia de transfección de FFBs	26
2.4. Obtención de Líneas Monoclonales Transgénicas	27
2.5. Caracterización Molecular de la integración del transgén en el genoma bovino.	27
2.5.1. PCRs múltiples.	27
2.5.2. Análisis del secuenciamiento del plásmido religado	28
2.6. Non-restrictive Lineal Amplification Mediated by PCR (nr-LAMPCR)	29
2.7. Cuantificación absoluta del número de copias del transgén mediante qPCR	29
2.7.1. Construcción de la curva estándar para la determinación del número de	

copias del plásmido pmhyGENIE-3	30
2.7.2. Relación entre el número de copias presentes en el genoma y la intensidad de fluorescencia	31
2.8. Experimento de remoción del transposón piggybac	31
2.9. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante transferencia Nuclear de células somáticas (TNCS)	32
2.9.1. Obtención de ovocitos	33
2.9.2. Maduración in-vitro	33
2.9.3. Obtención de Células Donantes para Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)	33
2.9.4. Técnica convencional de Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)	33
2.9.5. Sincronización de hembras receptoras	36
2.9.6. Transferencia embrionaria	36
2.9.7. Establecimiento de líneas celulares transgénicas a partir de los fetos recuperados	36
2.9.8. Transferencia nuclear de células somáticas: Método Zona-Free	36
2.9.9. Evaluación de la expresión de EGFP en embriones	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Actividad de los vectores pGENIE-3 en fibroblastos fetales bovinos.	39
3.1.1. Efecto del agente JetPRIME sobre la eficiencia de transfección.	39
3.1.2. Efecto de la electroporación sobre la eficiencia de transfección.	42
3.2. Caracterización del mecanismo de integración del transgén	46
3.2.1. Caracterización del mecanismo de integración del transgén	48
3.3. Estudio del sitio de inserción del transposón piggyBac	49
3.4. Determinación del número de copias del transgén: qPCR	49
3.5. Experimento de remoción del transposón piggyBac	51
3.6. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante Transferencia Nuclear de células somáticas	53
3.6.1. Obtención de ovocitos y Maduración In-vitro	53
3.6.2. Transferencia Nuclear de células somáticas: Método convencional	54
3.6.2.1. Transferencia embrionaria y obtención de fetos transgénicos	56
3.6.2.2. Caracterización molecular de los fetos transgénicos obtenidos mediante TNCS	58
3.6.3. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante Transferencia Nuclear de células somática Zona-Free	60
4. DISCUSIÓN	63
5. CONCLUSIONES	71
Capítulo II: Inserción del gen de la desaturasa FAT-2 en células bovinas knock-out para el gen de la $\beta$ -lactoglobulina.	
6. INTRODUCCIÓN	73
6.1. Recientes avances en Transgénesis Animal: Nucleasas recombinantes	



sitio-específicas	73
6.1.1. Nucleasas Zinc Finger (ZFNs)	73
6.1.2. Transcription activator like effector nucleases (TALENs)	74
6.1.3. CRISPR/Cas9	74
6.2. Producción de proteínas recombinantes en animales transgénicos	77
6.3. Mejoramiento genético de la performance productiva en vacas lecheras: Papel de la $\beta$ -lactoglobulina y la desaturasa FAT-2	79
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
7. MATERIALES Y MÉTODOS	85
7.1. Construcción de vectores	85
7.1.1. Generación del plásmido para el knock-out del gen la $\beta$ -lactoglobulina bovina.	85
7.1.2. Vectores Sleeping Beauty	85
7.2. Transfección de fibroblastos fetales bovinos con el vector CRIPR/Cas9	86
7.3. Ensayo de clivaje in-vitro de ADN	86
7.4. Generación de embriones knockout mediante el sistema CRISPR/Cas9	89
7.4.1. Producción in vitro de embriones	89
7.4.2. Producción de los ARN mensajeros de Cas9 y sgARN- PAEP	89
7.4.3. Microinyección de cigotos bovinos	90
7.4.4. Análisis de las mutaciones en el locus de la $\beta$ -lactoglobulina en embriones microinyectados.	90
7.5. Generación de fibroblastos fetales bovinos transgénicos mediante transfección con los vectores Sleeping Beauty y pX459-PAEP.	90
7.5.1. Diseño experimental	91
7.5.2. Obtención de Líneas Monoclonales Transgénicas	91
7.6. Genotipificación de las líneas monoclonales	91
8. RESULTADOS	93
8.1. Optimización de la tasa de transfección de fibroblastos fetales bovinos con el vector CRISPR/Cas9	93
8.2. Actividad de mutagénica del sgARN sobre el locus de la $\beta$ -lactoglobulina en fibroblastos fetales bovinos	94
8.3. Evaluación in vitro de los constructos génicos para el knock-out de la $\beta$ - lactoglobulina y la incorporación de mFAT-2 en fibroblastos fetales bovinos.	95
8.4. Producción de embriones bovinos knock-out mediante el sistema CRISPR/Cas9	96
9. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	99
10. BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXO I	117

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Comparación entre retrovirus y transposones piggyBac y Sleeping Beauty	19
2	Transgénesis mediada por transposones en animales de granja.	24
3	Parámetros de las condiciones de electroporación.	33
4	Información de primers.	35
5	Secuencia de primers para real time qPCR	36
6	Estimación del N° de copias del pmhyGENIE-3 en relación a la cantidad total de ADN presente en la muestra.	37
7	Comparación del número de colonias resistentes al antibiótico utilizando los vectores pGENIE-3.	49
8	Actividad relativa de transposición de los vectores pGENIE-3.	50
9	Resultados del análisis de integración basado en PCR en líneas transgénicas monoclonales.	56
10	Localización del sitio de incorporación del piggyBac al genoma bovino.	58
11	Colección y maduración in-vitro de ovocitos.	62
12	Eficiencia en la producción de embriones clonados mediante TNCS.	64
13	Transferencia embrionaria de blastocistos transgénicos a hembras receptoras.	65
14	Transferencia embrionaria y recuperación de fetos utilizando dos líneas transgénicas modificadas con el transposón piggyBac.	66
15	Resultados del análisis de integración basado en PCR en los fetos transgénicos generados mediante TNCS.	68
16	Resultados del análisis de número de copias mediante qPCR en los fetos transgénicos obtenidos mediante clonado por TNCS.	69
17	Eficiencia en la producción de embriones clonados mediante TNCS zona-free.	71
18	Comparación de las características técnicas de ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9	89
19	Proteínas recombinantes humanas producidas a partir de ganado transgénico.	91
20	Tratamientos empleados en el experimento de transfección in-vitro.	102
21	Información de primers para la genotipificación.	108
22	Parámetros de microinyección.	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metodologías para la generación de animales transgénicos	5
2	Esquema general para la producción de animales clonados mediante TNCS.	6
3	Clases de elementos transponibles	17
4	Representación esquemática del mecanismo no-replicativo de transposición del transposón piggyBac.	20
5	Mecanismo general de integración del transgén al genoma mediado por la transposasa.	22
6	Esquema de los vectores pGENIE utilizados en los experimentos de transfección	31
7	Colección de COCs.	40
8	Microfotografía de fibroblastos transfectados con los plásmidos pGENIE	48
9	Gráfico de la actividad de transposición de los vectores p-GENIE-3 en FFBs	49
10	Líneas monoclonales transgénicas de FFBstransfectados con los vectores pGENIE-3	51
11	Expresión de GFP en FFB 48 h post-electroporación en presencia del plásmido pmhyGENIE-3 utilizando PBS-Sucrosa 0,27M.	52
12	Número de colonias EFGP <sup>+</sup> e higromicina <sup>R</sup> obtenidas con diferentes métodos (químico y físico) de incorporación del ADN.	53
13	Microfotografía de colonias de FFBs transfectados con el vector pmhyGENIE-	54
14	Gráfico de correlación entre el método de transfección y la Fluorescencia Celular Total Corregida (CTCF)	55
15	Genotipificación de las líneas monoclonales transfectadas con los vectores pGENIE-3	55
16	Posibles destinos del transgén y recircularización del esqueleto plasmídico luego del proceso de transposición del piggyBac	57
17	Curva estándar utilizada para la determinación del N° de copias en los clones transgénicos.	59
18	Detección de variaciones en el número de copiaspor qPCR y su la relación entre la intensidad de fluorescencia	60
19	Determinación de la remoción del transposón mediante citometría de flujo.	61
20	Colecta y maduración de COCs.	62
21	Procedimiento de enucleación y transferencia celular	63
22	Resultados del análisis mediante FACS de las líneas policlonastransfectadas con pmhyGENIE-3 y pmGENIE-3	63
23	Blastocistos generados mediante TNCS.	64
24	Expresión de EGFP en blastocistos y mórulas 8 días post TNCS.	65
25	Fetos recuperados de 37 y 40 días de gestación.	66
26	Expresión macroscópica de EGFP del feto de 40 días observados bajo luz UV.	67
27	Membranas embrionarias expresando EGFP.	67

28	Amplificación por PCR del fragmento correspondiente a EGFP	68
29	Eliminación de la zona pelúcida.	69
30	Proceso de enucleación zona-free.	70
31	Electrofusión de los pares ovocito-célula somática.	70
32	Cultivo en WOWs	70
33	Embriones generados mediante TNCS zona-free.	71
34	Modelo del sistema CRISPR/Cas9.	89
35	Esquema simplificado de la síntesis de AG en el nematodo <i>C. elegans</i>	94
36	Microfotografía de fibroblastos 48 hs luego de la transfección con el plásmido <i>pmax</i> -GFP usando las relaciones 1:2 y 2:2 ( $\mu$ l PEI: $\mu$ g ADN).	110
37	Actividad del sistema CRISPR/Cas9 en fibroblastos fetales bovinos.	112
38	Detección de la incorporación del transgén mFAT-2 en las líneas monoclonales transfectadas con pT2/ $\alpha$ Cas-mFAT-2-His/Neo y pCMV(CAT)T7-SB100X.	113
39	Análisis de la secuencia del exón 1 del gen de la $\beta$ -lactoglobulina bovina.	114

## RESUMEN

Actualmente, el impulso generador de nuevas tecnologías reside en los potenciales usos de la transgénesis de grandes animales en agricultura y biomedicina. Dentro de las posibilidades que ofrece la plataforma tecnológica de animales transgénicos se pueden mencionar la producción de biomoléculas destinadas al tratamiento de gran cantidad de padecimientos, producción de órganos para xenotransplatación y como modelo de diversas enfermedades humanas.

*Capítulo 1:* La transgénesis activa mediada por elementos transponibles, se planteó como una metodología alternativa y eficiente con respecto a otras como el uso de vectores retrovirales. Durante este trabajo se evaluó la capacidad del transposón piggyBac para mediar la incorporación de secuencias de ADN heterólogo al genoma de fibroblastos fetales bovinos. Se demostró que este sistema de transgénesis es activo en células bovinas incrementando la eficiencia de integración del transgén hasta 85 veces por encima del control en ensayos de formación de colonias. Las líneas transgénicas fueron utilizadas con éxito como donantes de núcleos en la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), dando lugar al desarrollo de blastocitos morfológicamente normales y con una expresión homogénea del transgén EGFP. Los datos presentados en este trabajo demuestran que el uso de sistemas basados en transposones ADN, continúa siendo una valiosa herramienta para la producción de ganado transgénico de interés bioagrícola.

*Capítulo 2:* Actualmente, existe un gran interés en la adaptación del sistema CRISPR/Cas9 como una herramienta altamente eficiente para inducir alteraciones genéticas dirigidas en una gran variedad de especies. En el presente estudio, se propuso introducir el transgén de la desaturasa FAT-2 dentro del genoma bovino y simultáneamente mutar el gen endógeno de la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) a través de los cortes en el ADN dirigidos por el sistema CRISPR/Cas9. Para ello, se transfectaron fibroblastos fetales bovinos con el vector para el knockout de la BLG junto con los vectores para la expresión de FAT-2. Se determinó la presencia del transgén *mFAT-2* en el 70% de las líneas transgénicas analizadas. Sin embargo, a pesar de la gran actividad mutagénica del sgARN determinada por el ensayo de clivaje in vitro, ninguna de las líneas celulares analizadas mostró mutaciones en el locus target. Nuestro mayor desafío para el futuro será generar vacas transgénicas knockout para el locus de la  $\beta$ -lactoglobulina y que presenten a su vez una expresión funcional del transgén *mFAT-2*, promoviendo una modificación no sólo en el perfil lipídico de la leche mediante incrementos en la proporción de ácidos grasos omega-3 y 6 sino también eliminando el principal alérgeno lácteo, la BLG.

## ABSTRACT

In the past few years, new technologies have arisen that enable higher efficiency of gene editing in farm animals. The main objectives of producing transgenic livestock are the study of developmental, genetic, reproductive and disease-related biological questions, as well for the production of recombinant proteins, or the assessment of xenotransplants for human patients. In recent years, significant improvements have been made to introduce and apply active techniques of transgenesis and genetic engineering. These new approaches dramatically enhance the ease and speed with which livestock species can be genetically modified, and allow to performing precise genetic modifications.

*Chapter 1:* Transposon-mediated transgenesis is a well-established tool for genome manipulation in small animal models. However, translation of this active transgenesis method to the large animal setting requires further investigation. Here, the piggyBac (PB) transposon system was assessed for stable gene transfer into the cattle genome. Bovine fibroblasts were transfected with a helper-independent PB system. PB transposon was highly active in bovine cells increasing the efficiency of DNA integration up to 85 times over basal non-facilitated integrations in a colony formation assay. Stably transfected fibroblasts modified by PB transposon were used for somatic cell nuclear transfer (SCNT) and were obtain morphologically normal blastocysts that expressed the fluorophore. The data indicate that transposition is a feasible approach for genetic engineering in the cattle genome.

*Chapter 2:* Editing technologies continue to improve with the arrival of CRISPRs. The activity of the CRISPR/Cas9 system allows the implementation of high-throughput methodologies and multiplex editing of genomic loci in mammalian cells and preimplantation embryos. Here we set out to introduce FAT-2 desaturase by transposition and simultaneously knockout the bovine  $\beta$ -lactoglobulin locus in bovine cells using CRISPR/Cas9 system. We transfected knockout vector and plasmids for FAT-2 expression into bovine fetal fibroblasts and demonstrated the presence of mFAT-2 transgene in in almost 70% of the analyzed cell lines. However, despite the great gene mutation activity of the sgRNA sequence determinate by T7EI mismatch detection assay, none of the cell lines analyzed showed modification in the target locus. In conclusion, although this technology holds great promise for both agriculture and biomedicine there is still room for improve the use of livestock as a bioreactors as well as the development of livestock strains with more desirable traits.

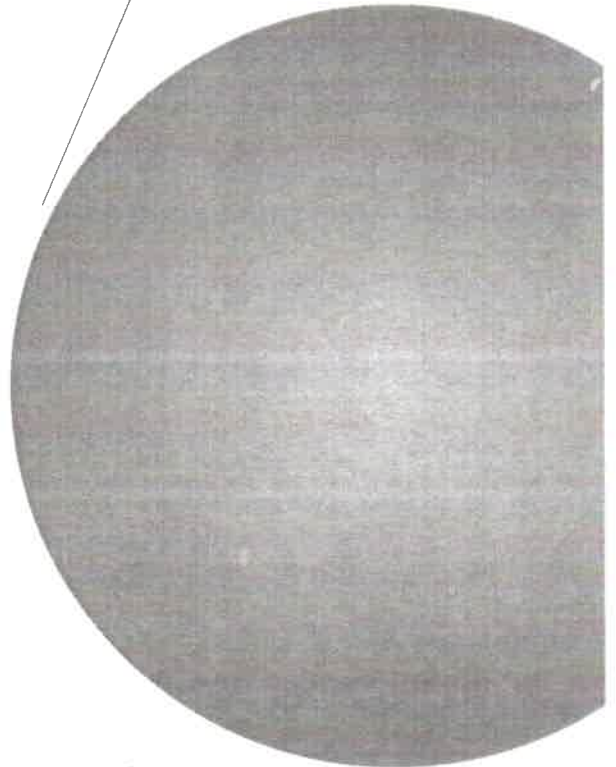
## ABREVIATURAS

6-DMAP	6-Dimetilaminopurina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNdc	ADN doble cadena
AG	Ácidos grasos
ALA	Ácido $\alpha$ -linolénico
ARN	Ácido ribonucleic
ARNm	ARN mensajero
BLG	$\beta$ -Lactoglobulina
BSA	Albúmina sérica bovina
Cas9	CRISPR-associated protein 9
COCs	Complejos cumulus-ovocitos
CPI	Inyección intracitoplasmática
crARN	CRISPRs ARN
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CT	Ciclo umbral
CT	Transferencia de cormatina
CTCF	Fluorescencia celular total corregida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSB	Double strand break
EGFP	Proteína verde fluorescente
EN	Endonucleasa
EP	Electroporación
ESC	Células madre embrionarias
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAT	Enzima desaturasa
FFBs	Fibroblastos fetales bovinos
G418	Geneticina
GONAD	Genome-editing via oviductal nucleic acids delivery
HDR	Homology-directed repair
HEK	células embrionarias de riñón humano 293
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etansulfónico
HyPBase	Transposasa PB hiperactiva
ICSI	Inyección intracitoplasmática de esperma
iPS	Células madre pluripotentes inducidas
ITR	Repeticiones terminales invertidas
JP	JETPrime
Kb	Kilopares de bases
KI	knock-in
KO	knockout
LA	Ácido linolénico
LINES	Long Interspersed Nuclear Elements
LOS	Síndrome de la cría grande
MII	Metafase II
NGS	Next generation sequencing
NHEJ	Non-homologous end joining
ORF	Marco de lectura abierto
PAM	Protospacer adjacent motif
Pb	Pares de bases
PB	piggyBac
PBS	Fosfato salino baferado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PEI	Polietilenimina
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
qPCR	PCR cuantitativa
RT	Retotranscriptasa inversa
SB	Sleeping beauty
SB100x	Transposasa SB hiperactiva
SFB	Suero fetal bovino
sgRNA	RNA de cadena simple (ARN guía)
SINEs	Short Interspersed Nuclear Elements
SOF	Fluido oviductal sintético
SV40	simian virus 40
TALEN	Transcription activator-like element nuclease
TNCS	Transferencia Nuclear de Células Somáticas
TPase	Transposasa
tracrARN	trans-activating crRNA
Vf	Volumen final
WOWs	Well of the wells
WT	Wild type
ZFN	Zinc finger nuclease



# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

- *Biotecnología Transgénica*

La tecnología transgénica, es decir la capacidad de modificar deliberadamente el genoma de un organismo mediante la incorporación de ADN exógeno o la sustitución/remoción de secuencias endógenas se convirtió en una herramienta con grandes aplicaciones en el área de la salud humana y la producción animal. Las técnicas de transgénesis fueron inicialmente desarrolladas en roedores para la generación de animales genéticamente modificados con fines de investigación básica. Si bien, éste continúa siendo un modelo muy útil para la ingeniería genética (Mantegazza *et. al*, 2016; Chung *et. al*, 2016), hoy existen otras especies capaces de ser manipuladas genéticamente con éxito. Actualmente, el impulso generador de nuevas tecnologías reside en los potenciales usos de la transgénesis de grandes animales en agricultura y biomedicina. Dentro de las posibilidades que ofrece la plataforma tecnológica de animales transgénicos se pueden mencionar la producción de biomoléculas destinadas al tratamiento de gran cantidad de padecimientos (Bertolini *et. al*, 2016; Peng *et. al*, 2015; McWhir, 2002), producción de órganos para xenotransplatación (Kues y Niemann, 2004) y como modelo de diversas enfermedades humanas (Rogers, 2016; Norgren, 2004). Existen cuatro estrategias más comúnmente utilizadas para producir mamíferos transgénicos: a) la microinyección de cigotos con el gen de interés, b) la manipulación genética de células madre embrionarias las cuales son posteriormente inyectadas en la cavidad de un blastocisto, c) la modificación del genoma de células somáticas en cultivo que son luego utilizadas como donantes de núcleos para generar animales transgénicos mediante transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) (Bosch *et. al*, 2015) (Fig. 1) y más recientemente, d) la electroporación *in vivo* de gónadas (Gurumurthy *et. al*, 2015; Takahashi *et. al*, 2015).

- *Microinyección de cigotos*

La introducción de ADN exógeno dentro del pronúcleo de un cigoto ha sido el método de elección para la producción de animales transgénicos por más de tres décadas. La mayoría de los animales transgénicos de interés comercial fueron producidos mediante el uso de

esta metodología (Niemann *et. al*, 2007). Este método involucra la inyección de ADN exógeno dentro del pronúcleo masculino de un cigoto. Luego de la microinyección, el transgén se incorpora al azar en sitios donde se producen rupturas espontáneas de la doble hebra del ADN y queda permanentemente integrado gracias a la participación de los sistemas endógenos de reparación del ADN del genoma (Fig. 1a). Este mecanismo de integración, conocido como *transgénesis pasiva* presenta características no deseadas que limitan su efectividad. Sólo una fracción reducida de los embriones microinyectados presenta el patrón de expresión deseado debido a que como la integración ocurre al azar, el transgén puede ser silenciado por mecanismos epigenéticos, de manera similar a lo que ocurre con las secuencias incorporadas por vectores retro y lentivirales (Hofmann *et. al*, 2006). Otras desventajas de la microinyección están relacionadas con las altas tasas de mosaicismo y formación de concatémeros (ligación de transgenes lineales) y la gran destreza técnica que se requiere para implementar exitosamente esta metodología. Una dificultad adicional que se presenta en grandes animales es el alto contenido de lípidos de los cigotos lo que imposibilita la visualización de los pronúcleos. Esto llevó al desarrollo de protocolos basados en la inyección intracitoplasmática del ADN exógeno (CPI) (Fig. 1b) (Garrels *et. al*, 2015 y Garrels *et. al*, 2011). Ésta tecnología, asociada a las recientemente desarrolladas endonucleasas sitio específicas permiten modificaciones complejas en el ganado bovino sin utilizar el procedimiento de clonación (Aida *et. al*, 2015). La capacidad de modificar directamente el genoma bovino en cigotos a través del uso de nucleasas sitio-específicas eliminaría los problemas asociados a la clonación incluyendo la baja eficiencia debido a la excesiva micromanipulación de los embriones y a errores durante la reprogramación del núcleo donante que originan bajas tasas de preñez y consecuentemente altos costos operativos.

- *Manipulación de Células madre*

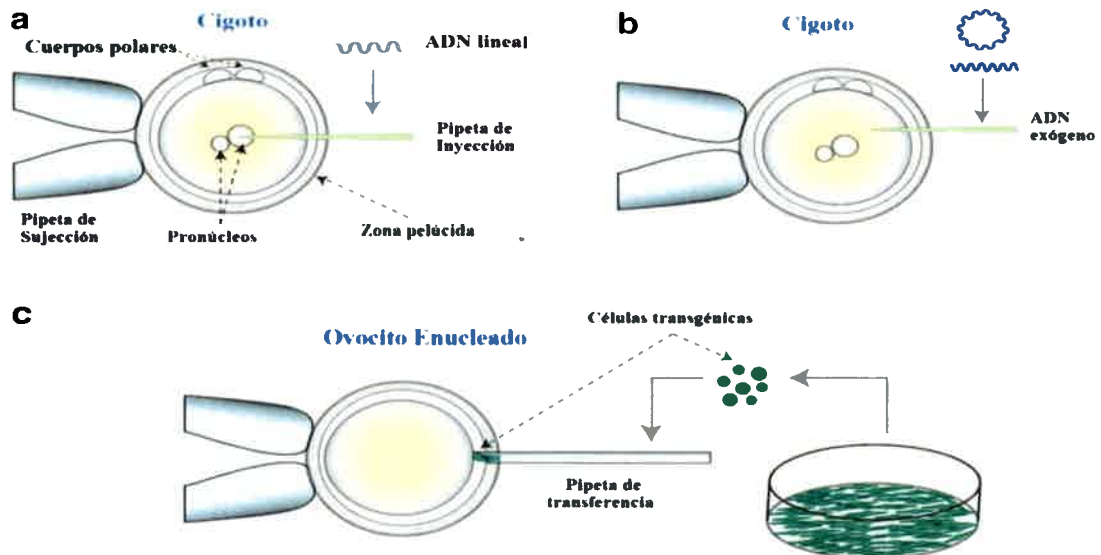
La manipulación genética de células madre embrionarias (*Embryonic Stem cells-ESC*) es actualmente la principal herramienta para la modificación precisa del genoma en el ratón. Las ESC inyectadas en la cavidad del blastocisto se integran al macizo celular interno y contribuyen a la generación de los distintos tejidos embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo). Con ésta técnica se obtienen *quimeras* ya que el individuo resultante posee células transgénicas y células no modificadas. Para generar un animal 100% transgénico se deben aparear aquellas quimeras que sean transgénicas en la línea germinal. De esta

manera la producción de quimeras utilizando ESC modificadas genéticamente se convirtió en el método de elección para la generación de ratones knock-out y knock-in (Polejaeva y Mitalipov, 2013), modelos invaluable en estudios genéticos en roedores de laboratorio. En grandes animales, el uso de ESC permitiría mejorar notablemente los rasgos asociados a la producción y resistencia a enfermedades a través del aumento en la eficiencia del clonado por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Esto se debería en parte a su ilimitada capacidad de proliferación *in vitro*, lo cual representa una de las principales diferencias con respecto a los fibroblastos comúnmente utilizados en experimentos de clonado que poseen una vida media finita en condiciones de cultivo en el laboratorio. Además, dichas ESC retienen su pluripotencia y presentan un patrón de expresión génica muy similar a las células del embrión, lo cual favorecería su reprogramación hacia el estadio embrionario (Wakayama y Yanagimachi, 2001; Wakayama *et. al*, 1999). Sin embargo no ha sido posible hasta el momento obtener verdaderas ESC a partir de animales domésticos. Ésta limitación fue superada en parte con el descubrimiento de que las células somáticas podían ser reprogramadas a un estado pluripotente empleando diferentes protocolos. Las células reprogramadas, llamadas células madre pluripotentes inducidas (iPS), exhiben características morfológicas y funcionales muy similares a las ESC presentando un atractivo campo de investigación dentro de las áreas de la biología del desarrollo y la medicina regenerativa (Song *et. al*, 2016; Yee, 2010).

▪ *Transferencia Nuclear De Células Somáticas (TNCS)*

La TNCS es la biotecnología que permite la producción asexual de un individuo idéntico al material nuclear con el que se generó. Desde su introducción, la TNCS ha alcanzado un grado de desarrollo tal que constituye una técnica de uso rutinario en muchos grupos de investigación en todo el mundo y está siendo usada de manera creciente con fines comerciales. Las aplicaciones de ésta técnica comprenden desde la multiplicación de individuos de gran valor genético en programas de mejoramiento animal a la conservación de especies en peligro de extinción (Moro *et. al*, 2015). La aplicación que actualmente despierta mayor interés, es la producción de animales transgénicos, representando un método alternativo que posibilita generar grandes animales con modificaciones complejas/precisas en lugares preestablecidos de sus genomas (Fig. 1c). En este sentido, la TNCS promete reemplazar metodologías tradicionales como la microinyección pronuclear

para generar animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Asimismo, en el futuro se espera que a través de la manipulación genética se pueda contar con células, tejidos y órganos completos “humanizados” para utilizarse en terapia regenerativa y trasplante a pacientes humanos.

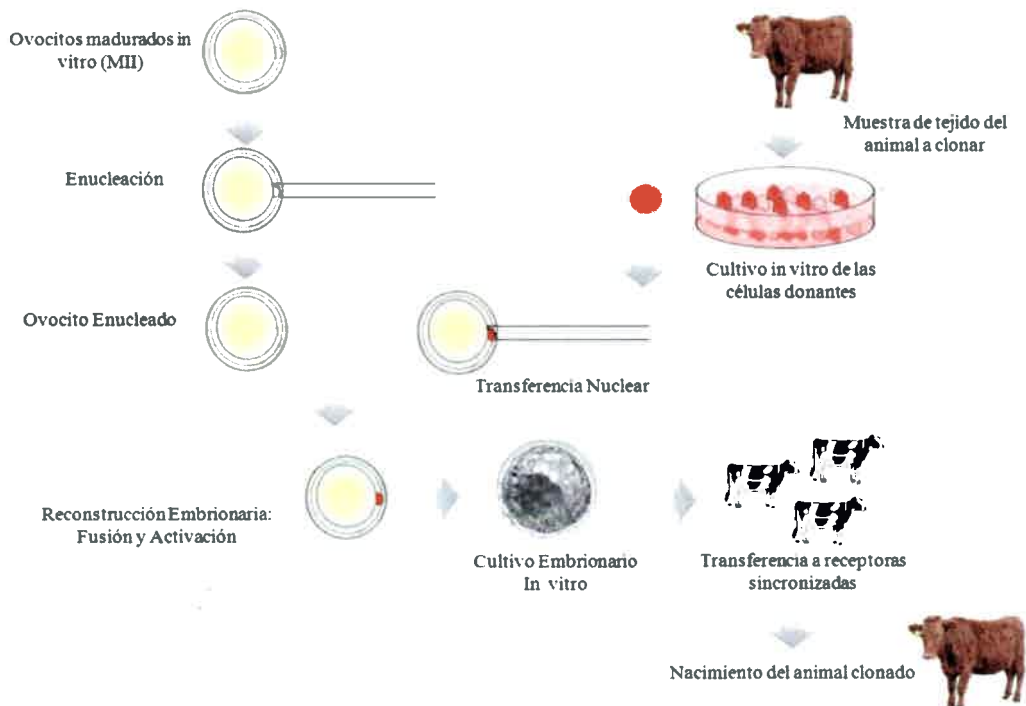


**Figura 1. Metodologías para la generación de animales transgénicos.** Microinyección pronuclear de ADN exógeno (a), Inyección intracitoplasmática (CPI) (b) y modificación genética de cultivos celulares primarios, los cuales serán utilizados como donantes de núcleos en la TNCS (c). Imagen tomada de Bosch *et. al*, 2015.

- *Aspectos técnicos de la TNCS*

La técnica de TNCS se basa en el concepto de que el citoplasma del ovocito posee factores capaces de inducir cambios en el material nuclear de la célula donante del material genético. Dichas modificaciones epigenéticas, cuyas bases moleculares son poco conocidas, se traducen en cambios de la expresión génica que conducen a una reprogramación de la cromatina a un estado totipotencial, condición que posibilita el desarrollo de un individuo completo a partir del material genético transferido. El éxito del clonado por transferencia nuclear depende de la delicada serie de eventos que toman lugar en un corto período de tiempo durante el cual se produce la reprogramación nuclear la cual tendrá grandes efectos en el futuro desarrollo embrionario, fetal y placentario.

El protocolo clásico para la producción de bovinos mediante la técnica de TNCS incluye los siguientes pasos (Stice y Keefer 1993): 1) Colección y maduración *in vitro* de ovocitos, 2) enucleación, 3) transferencia de núcleo y fusión, 4) activación y 5) cultivo embrionario y transferencia a hembras receptoras sincronizadas (Fig. 2).



**Figura 2. Esquema general para la producción de animales clonados mediante TNCS.** Los ovocitos madurados in vitro y posteriormente enucleados son utilizados como recipientes para la transferencia nuclear. La célula donante del núcleo es transferida al espacio perivitelino para la reconstrucción embrionaria. El presunto embrión es cultivado in vitro y posteriormente transferido a hembras receptoras.

➤ *Maduración in vitro*

Actualmente los ovarios obtenidos de frigoríficos constituyen la principal fuente de ovocitos para experimentos de clonado por TNCS. Si bien, al provenir de animales de faena los ovocitos presentan una calidad variable, resulta económicamente conveniente (debido a la obtención de un gran número de ovocitos) y es posible controlar el proceso de maduración. Luego de la maduración in vitro aproximadamente el 80-90% de los ovocitos

inmaduros puestos a cultivar llegan al estadio de metafase II y expulsan el primer cuerpo polar. En bovinos, el tiempo de maduración in vitro es de aproximadamente 17-22 hs.

#### ➤ *Enucleación*

Los ovocitos maduros detenidos en metafase II representan el estadio más apropiado para la producción de embriones mamíferos clonados. Para ello los ovocitos deben ser enucleados mediante la aspiración de una pequeña porción de citoplasma generalmente cercana al primer cuerpo polar que contiene los cromosomas en metafase II. Como no siempre la metafase está ubicada cerca del cuerpo polar es necesario teñir al ovocito con un colorante que permite visualizar la cromatina, el más utilizado es el Hoechst 33342 (Li *et. al*, 2004). Generalmente la enucleación se realiza utilizando micromanipuladores, éstos permiten el movimiento de la aguja de enucleación en los 3 ejes (X, Y y Z). Uno de los micromanipuladores se destina a sujetar al ovocito en una posición fija mediante succión a través de una pipeta de vidrio denominada *holding*. Con el otro micromanipulador el operario realiza la enucleación por aspiración de la metafase junto con la menor cantidad de citoplasma (Bosch *et. al*, 2004).

En el método de clonado denominado *Handmade cloning* no es necesario contar con micromanipuladores ya que, en primer lugar los ovocitos son despojados de la zona pelúcida mediante un procedimiento enzimático y luego son biseccionados mediante una microcuchilla operada manualmente por un técnico. Posteriormente bajo luz UV se seleccionan los hemi-ovocitos que no poseen la metafase. En el paso siguiente dos hemi-citoplastos se fusionan con la célula donante de núcleo para reconstruir un embrión. La desventaja de esta técnica es que se requieren dos ovocitos por cada embrión reconstituido, por lo que es necesario contar con el doble de ovocitos para lograr la misma eficiencia que la obtenida con los métodos tradicionales de micromanipulación (Vajta *et. al*, 2006).

#### ➤ *Transferencia Nuclear de células somáticas*

Células somáticas de distinto origen, tales como células del cúmulus, fibroblastos, células epiteliales, células de glándula mamaria, entre otras, pueden ser utilizadas como donantes de núcleos para TNCS. La capacidad de los blastocistos generados mediante TNCS para generar animales vivos fue demostrada mediante el nacimiento del primer mamífero

clonado utilizando células fetales (Campbell *et. al*, 1996) y adultas (Wilmut *et. al*, 1997). Posteriormente, investigadores de diferentes puntos del mundo lograron clonar otras especies tales como ratones, conejos, gatos, cabras, cerdos y ganado bovino (Wakayama *et. al*, 1998; Chesne *et. al*, 2002; Baguisi *et. al*, 1999; Polejaeva *et. al*, 2000 y Shin *et. al*, 2002) utilizando una variedad de células como donantes de núcleos, demostrando que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas por factores presentes en el citoplasma del ovocito maduro y revertidas a un estado de totipotencialidad. A pesar de ello, se ha demostrado que cuando se utilizan núcleos donantes provenientes de células menos diferenciadas, el desarrollo a término es mejor comparado al obtenido con células completamente diferenciadas (Alberio *et. al*, 2006).

➤ *Fusión*

La introducción del material genético donante dentro del citoplasma receptor se realiza mediante la fusión de la membrana celular con la membrana plasmática del citoplasma. Para ello, los pares ovocito-célula somática son colocados en una cámara de fusión y sometidos a pulsos cortos de alto voltaje. Como consecuencia, el núcleo de la célula donante queda incluido en el ooplasma, donde luego de la disolución de la membrana nuclear, la cromatina queda expuesta a los factores ovocitarios que inducen la reprogramación (Galli *et. al*, 2012).

➤ *Reprogramación Nuclear y Activación*

El proceso de desdiferenciación de células somáticas después del trasplante nuclear se define como *reprogramación nuclear*. Este proceso permite que la expresión génica de la célula somática sea la apropiada para un desarrollo embrionario normal y se produce mayormente en el tiempo transcurrido entre la fusión ovocito-célula y la activación del presunto embrión reconstituido (Hwang *et. al*, 2004). El tiempo de exposición de la cromatina de la célula donante con el citoplasma del ovocito es determinante para que ocurran los eventos de reprogramación que inducen cambios en la estructura y función de la cromatina del núcleo donante promoviendo su reversión a un estado totipotente, el cual es necesario para promover el desarrollo embrionario (Niemann y Lucas-Hahn, 2012).

Los mecanismos conocidos que regulan el proceso de reprogramación incluyen: 1) acetilación de las histonas H3 y H4 (Kimura *et. al*, 2004), 2) desmetilación de secuencias



promotoras específicas de genes de pluripotencia, 3) reducción de la metilación en secuencias activadoras de genes de pluripotencia (Humpherys *et. al*, 2001) y 4) remodelado de la lámina nuclear (Alberio *et. al*, 2005), entre otros.

La activación es esencial para superar el arresto meiótico en el que se encuentra el ovocito y proseguir con el desarrollo del embrión reconstruido. En condiciones fisiológicas, la activación es producida por la entrada del espermatozoide seguido por repetidas oscilaciones en la concentración de calcio que provocan la caída de la actividad del factor promotor de la maduración (del inglés *Maturation Promoting Factor*, MPF), que es una proteína-quinasa responsable de la ruptura de la lámina nuclear (Bilodeau-Goeseels, 2012) y la desfosforilación de la proteína-quinasa mitógena activada (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), proceso que está relacionado con la formación de los pronúcleos. Los embriones producidos por TNCS requieren una inducción artificial de la activación que se logra mediante la combinación de estímulos que provocan un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio (a través de métodos físicos y/o químicos) y factores que disminuyan la actividad de MPF. En bovinos el protocolo más utilizado en la actualidad es el tratamiento con un ionóforo de calcio (Ionomicina de calcio) 2hs después de la fusión, seguido de la exposición de los embriones a 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) durante 4 hs. Protocolos alternativos combinan un pulso eléctrico con un inhibidor de la síntesis proteica como la cicloheximida (Kato *et. al*, 2000). La ionomicina induce la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplasmático liso del ovocito provocando una única oleada de calcio mientras que el 6-DMAP inactiva a MPF resultando en la reanudación de la meiosis (Alberio *et. al*, 2001). Del mismo modo, el 6-DMAP evita la extrusión del segundo cuerpo polar, manteniendo así una dotación diploide normal.

#### ➤ *Cultivo embrionario*

Los embriones bovinos reconstruidos son cultivados hasta el estadio de blastocisto (Día 7 después de la transferencia nuclear). En este paso puede evaluarse el porcentaje de embriones que han desarrollado hasta blastocisto. Si bien la tasa de producción de blastocistos no difiere mucho de la que se puede obtener mediante la fertilización *in vitro* clásica, los embriones producidos por transferencia nuclear presentan bajas tasas de desarrollo luego de la transferencia a hembras receptoras (Hill *et. al*, 2000).

#### ➤ *Transferencia a hembras receptoras*

Los embriones bovinos se transfieren comúnmente por vía transvaginal en el estadio de mórula o blastocisto a hembras receptoras sincronizadas. Pueden ser congelados en etilenglicol utilizando protocolos de enfriamiento lento o vitrificados para su criopreservación por periodos prolongados. Aunque la congelación de embriones producidos mediante transferencia nuclear no se recomienda ya que la baja calidad de los mismos los hace muy vulnerables al proceso de enfriamiento y congelación. El número de embriones transferidos comúnmente es de 1-4 por receptora, debido a las altas tasas de mortalidad embrionaria y fetal (Bó *et. al*, 2011).

▪ *Eficiencia en el Clonado bovino por TNCS*

Si bien el ganado bovino y porcino son las especies en las cuales se han invertido mayores esfuerzos en mejorar la técnica de TNCS, la eficiencia actual de esta metodología sigue siendo baja. Hasta el momento, para la mayoría de las especies domésticas menos del 1-5% de los embriones reconstruidos desarrollan a término; sólo en bovinos se ha registrado una tasa de éxito de >10% (Kues y Niemann, 2004). Dentro de los principales problemas se destacan: las altas tasas de pérdidas embrionarias (Hill *et. al*, 2000), fetales y postnatales (Akagi *et. al*, 2013) y la elevada incidencia de anomalías congénitas como el síndrome de la cría grande, LOS (del inglés, *large offspring syndrome*) (Watanabe, 2013). La mayoría de estos problemas tienen su origen en una inapropiada reprogramación epigenética del núcleo donante lo que llevaría a un incorrecto patrón de expresión de los genes en los embriones generados por transferencia nuclear (Wells, 2005) además de la gran manipulación a la que son sometidos los embriones durante todo el procedimiento.

A pesar de la baja eficiencia, la TNCS permite el uso de células donantes transgénicas lo cual ofrece dos grandes ventajas: 1) la alta tasa de crías transgénicas, que a menudo alcanza el 100%, dependiendo del método de transfección y de la selección de las células donantes y 2) la posibilidad de realizar una caracterización genética (número de copias y localización del transgén dentro del genoma) y epigenética (patrones de metilación y expresión del transgén) de las células donantes de núcleos previo a la TNCS. La probabilidad de generar un animal transgénico con el patrón genético deseado es de gran relevancia especialmente en el ganado bovino donde el amplio intervalo generacional amenaza la sustentabilidad de la técnica.

Si bien se han logrado grandes progresos en la transgénesis en grandes animales mediante la aplicación de la TNCS, todavía está lejos de ser satisfactoria. En la mayoría de los animales transgénicos generados la integración del transgén al genoma es al azar y su expresión no es predecible. Actualmente, los avances en el secuenciamiento del genoma de grandes animales (Archibald *et. al*, 2010) junto con la aplicación de herramientas moleculares tales como el uso de endonucleasas específicas, recombinasas, integrasas, transposasas, entre otras permiten no sólo mejorar la eficiencia en el clonado por TNCS sino también lograr una integración controlada del transgén en sitios específicos del genoma. A éstas estrategias se las llama en su conjunto como *transgénesis activa* ya que la integración del transgén ocurre por mecanismos facilitados en los cuales la incorporación es catalizada por una o más enzimas (Garrels *et. al*, 2012).

- *Electroporación in vivo de gónadas*

Ésta técnica surgió recientemente con el propósito de superar las limitaciones del método estándar de microinyección en lo que respecta al requerimiento de equipamiento sofisticado, personal altamente entrenado y la necesidad de aislar, microinyectar y consecuentemente transferir los embriones a hembras receptoras. Se han descrito diferentes técnicas *independientes de microinyección*, y que involucran la transfección in vivo, tales como GONAD (del inglés, *Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery*) en la cual el ADN/ARN exógeno es incorporado a embriones pre-implantacionales dentro del oviducto intacto de ratones mediante electroporación (Takahashi *et. al*, 2015). Los embriones obtenidos mostraron las modificaciones génicas deseadas con una alta tasa de eficiencia, indicando que dicho sistema podría ser utilizado con éxito en otras especies incluyendo ratas, cerdos, ovejas, cabras y vacas.

Otra metodología que fue originalmente desarrollada para el estudio del proceso de espermatogénesis en ratones consiste en la electroporación in vivo del testículo luego de la inyección del vector de interés dentro de los túbulos seminíferos vía conducto eferente., lográndose tasas en la eficiencia de producción de ratones transgénicos de más del 90% (Michaelis *et. al*, 2014). Más recientemente, se han puesto en marcha nuevos estudios para lograr la estandarización de éste método en otras especies mediante la transfección in vitro de los túbulos seminíferos y posterior electroporación (Raina *et. al*, 2015). Estas investigaciones preliminares llevadas a cabo en cabras sin duda proporcionarán información valiosa para permitir la adaptación de la técnica a grandes animales.

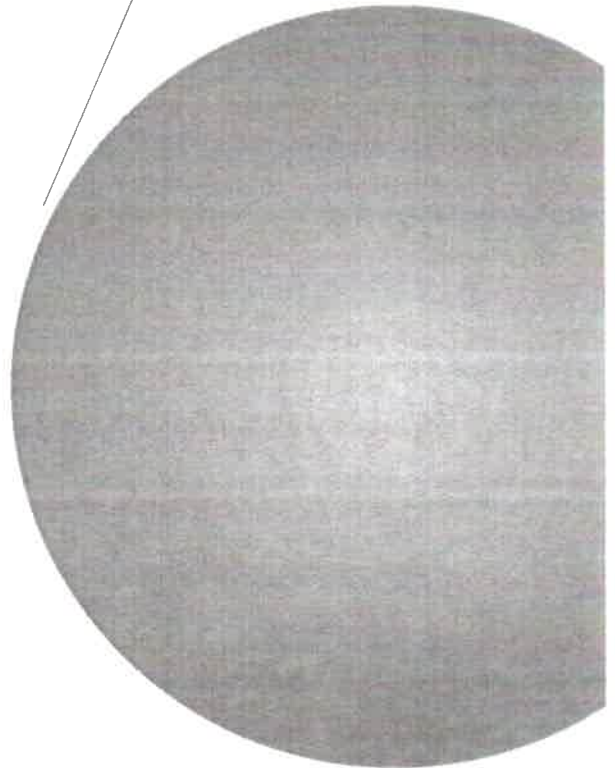
The page features a decorative graphic consisting of three grey circles of varying sizes and two thin, light-grey lines. One line runs diagonally from the top-left towards the bottom-right, passing behind the top and middle circles. The other line runs diagonally from the top-right towards the bottom-left, passing behind the middle and bottom circles. The circles are positioned at the top, middle, and bottom-right of the page.

# CAPÍTULO I

**Desarrollo de un sistema transgénico  
basado en un transposón para  
introducir modificaciones en el  
genoma de fibroblastos bovinos en  
cultivo para aplicaciones  
biotecnológicas**

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Transgénesis activa mediada por elementos transponibles

La *transgénesis activa* involucra aquellos métodos en los cuales la integración del transgén al genoma huésped es facilitado por la acción de enzimas asociadas tales como recombinasas (Cre, flipasa) (Garrels *et. al.*, 2011), transposasas (piggyBac, Sleeping Beauty, Tol2) (Alessio *et. al.*, 2016; Carlson *et. al.*, 2011), integrasas virales (lentivirus) (Hofmann *et. al.*, 2006) y endonucleasas (ZFNs, TALENs) (Yu *et. al.*, 2011). Éste término fue acuñado para remarcar las diferencias con la *transgénesis pasiva* donde la incorporación del ADN exógeno se lleva a cabo en sitios donde se producen al azar rupturas espontáneas en la doble hebra de ADN que son reparadas posteriormente por mecanismos endógenos del genoma huésped (Shinohara *et. al.*, 2007.).

La transgénesis activa mediada por elementos transponibles, se planteó como una metodología alternativa y eficiente con respecto a otras como el uso de vectores retrovirales. Los transposones o elementos transponibles constituyen elementos genéticos móviles que fueron originalmente descritos en el maíz (McClintock, 1950) y luego en una gran variedad de organismos desde insectos hasta humanos. En humano y ratón estos elementos representan más del 45% del genoma, sugiriendo su importancia en el proceso evolutivo. La mayoría están inactivos debido a una acumulación de mutaciones deletéreas a lo largo del tiempo.

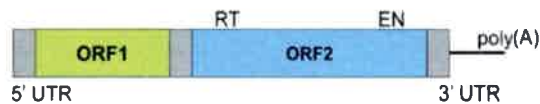
La característica distintiva de los transposones es su capacidad para movilizarse de un lado a otro del genoma a través de un fenómeno conocido como *transposición*. Dependiendo del mecanismo de movilización utilizado encontramos dos grandes categorías:

- *Transposones de Clase I (Retrotransposones)*: Durante el proceso de movilización se forma un intermediario ARN, que es retrotranscrito a ADNc para su posterior inserción en una nueva posición en el genoma. Para llevar a cabo este proceso, el transposón porta las secuencias codificantes de una proteína de unión al ADN y de una proteína con actividad endonucleasa y transcriptasa inversa. Dentro de ésta categoría encontramos los LTR, LINEs y SINEs. El único retrotransposón que se encuentra activo en el genoma humano y en el de otros primates son los elementos LINE-1 (Kazazian, 2011) (Fig. 3).

- Transposones de Clase II (Transposones ADN):

- Subclase I: Estos elementos se mueven mediante un mecanismo de “cortar y pegar”, en el cual el transposón es escindido desde una localización en el genoma e incorporado en un nuevo sitio. Dicho proceso es catalizado por una enzima asociada denominada transposasa. Hasta el momento no han sido identificados transposones ADN activos en mamíferos. Dentro de esta subclase encontramos *Tc1/mariner*, *PIF/Harbinger*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *piggyBac* y *CACTA* (Fig. 3).
- Subclase II: Dentro de este grupo están incluidos los elementos que se movilizan por un mecanismo de “copiar y pegar”, ya que al no escindir las cadenas, se mantiene una copia del elemento luego de la transposición. A esta subclase pertenecen los transposones *Helitron* y *Maverick*.

**Class I:**



**Class II:**



**Figura 3: Clases de elementos transponibles.** Elementos Clase I: Presentan dos marcos de lectura abiertos (ORF1 y ORF2) que codifican una proteína de unión al ADN y una enzima con actividad endonucleasa (EN) y transcriptasa inversa (RT) respectivamente. Elementos de Clase II: constan del gen de la transposasa flanqueado por repeticiones terminales invertidas (TIR ó ITR). Imagen tomada de Muñoz-López *et. al*, 2010.

Los transposones de Clase II son elementos móviles presentes de manera natural en el genoma de una gran variedad de especies que pueden ser utilizados como vehículos no virales para el transporte génico, ya que son capaces de integrarse al genoma huésped de una manera muy eficiente. Durante la transposición, una copia simple de la secuencia de

interés flanqueada por secuencias cortas llamadas repeticiones terminales invertidas ITRs (del inglés *Inverted Terminal Repeats*) es integrada dentro del genoma a través de un preciso mecanismo catalizado por una enzima asociada, la transposasa. Debido a que la integración del transgén es facilitada por la acción de una enzima, el proceso se conoce como *transgénesis activa* y se asocia a una expresión a largo plazo del gen de interés en las células (Garrels *et. al*, 2011). Los transposones que han recibido una mayor atención y por lo tanto han sido más extensivamente estudiados y usados en transgénesis animal son piggyBac (PB) y Sleeping Beauty (SB).

### 1.2.Sistema piggyBac

El transposón piggyBac es naturalmente activo y fue identificado en el genoma de la polilla del género *Trichoplusia* pero se han encontrado elementos relacionados en plantas, hongos y animales incluyendo humanos (Wilson *et. al*, 2007). Este sistema presenta ciertas ventajas con respecto a otros transposones utilizados en transgénesis como el *Sleeping Beauty* (Tabla 1), tales como: 1) mayor eficiencia y actividad de transposición (Wu *et. al*, 2006), 2) mayor capacidad de carga (100Kb) (Li *et. al*, 2011), 3) permite la removilización del transposón sin dejar marcas en el genoma (*footprint mutations*), lo cual resulta de gran valor para la generación de iPS libres del transgén (Woltjen *et. al*, 2009; Yusa *et. al*, 2009) y 4) a diferencia de los elementos de la familia Tc1/*mariner*, el piggyBac presenta una menor tendencia a insertarse en regiones adyacentes al locus donante, fenómeno conocido como *local hopping* (Ding *et. al*, 2005), característica de gran importancia en experimentos de mutagénesis en la línea germinal.



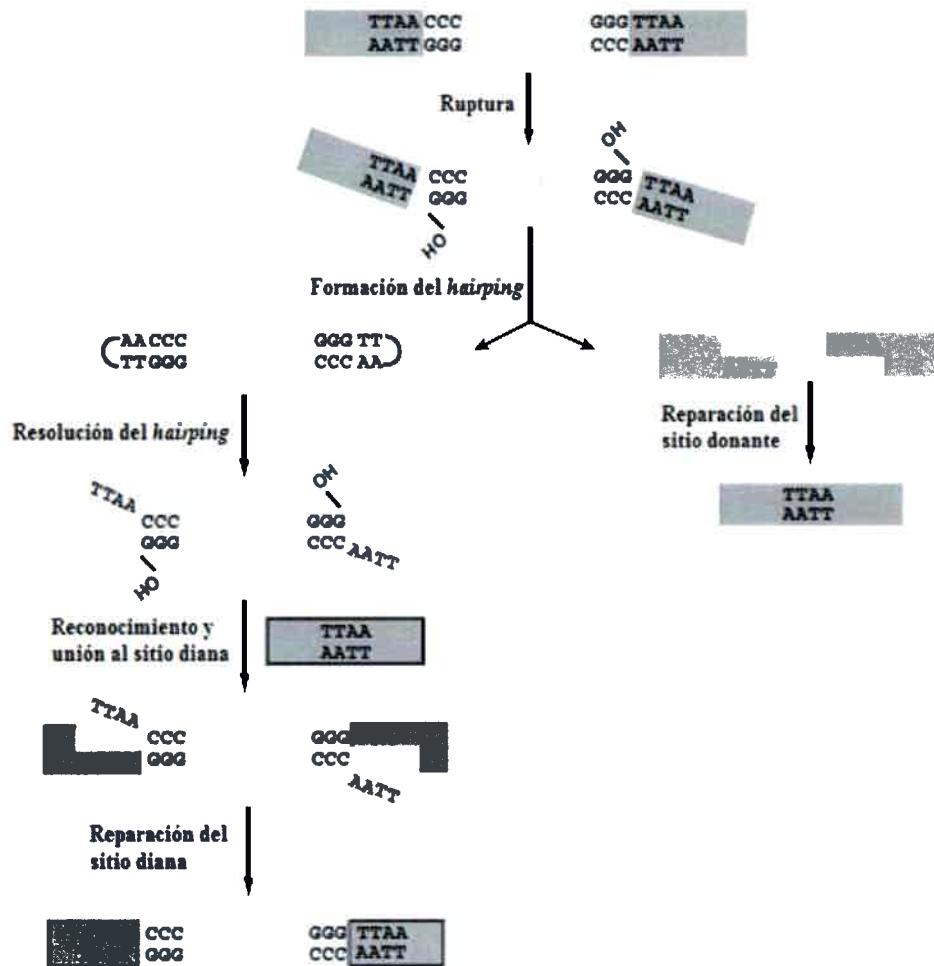
**Tabla 1.** Comparación entre retrovirus y transposones piggyBac y Sleeping Beauty. Adaptada de Woodard *et.al*, 2015.

	<b>Retovirus</b>	<b>Sleeping Beauty</b>	<b>piggyBac</b>
Vector/ácido nucleico	Viral/RNA	No-viral/ADNdc	No-viral/ADNdc
Mantenimiento	Integración	Integración	Integración
Capacidad de cargo	<8Kb	Hasta 10 Kb. A medida que aumenta el tamaño del inserto disminuye la eficiencia.	100Kb
Mecanismo de integración	Transcripción inversa e integración	Transposición: “Cortar y pegar”	Transposición: “Cortar y pegar”
Sitio diana		TA	TTAA
Inhibición por superproducción		Sí	No
Variantes de la transposasa mutada		SB100X	HyPBase
Perfil de integración	Unidades transcripcionales	Al azar	Unidades transcripcionales
Genotoxicidad	Posible mutación insercional	Posible mutación insercional. Patrón de integración al azar.	Posible mutación insercional
Potenciador de promotores adyacentes	Fuerte	Mínimo	Mínimo

### 1.2.1. Mecanismo de integración del piggyBac

La transposición del piggyBac (PB) es un fenómeno no-replicativo que se basa en un mecanismo de “cortar y pegar”. De acuerdo a la evidencia experimental disponible el mecanismo consta de 4 pasos: 1) Una molécula de PB transposasa reconoce y se une a cada ITR que se encuentran flanqueando al transposón donde produce una ruptura en ambas cadenas. Primero se produce la ruptura de una hebra de ADN (*nick*) en el extremo 3’ del transposón, exponiendo el OH 3’. 2) Seguidamente, estos OHs producen un ataque nucleofílico a 4 nucleótidos de distancia sobre la hebra complementaria, generando un *hairpin* en los extremos del transposón y al mismo tiempo liberándose la secuencia donante. De esta manera los extremos del ADN del sitio donante contienen extensiones 5’ TTAA que se pueden reunir para reparar el sitio de escisión de manera precisa. 3) Los *hairpins* en los externos del transposón son resueltos por la transposasa dejando un *overhang* de 4 nucleótidos (TTAA) en el extremo 5’ del transposón escindido y exponiendo nuevamente el OH 3’ en los extremos. 4) Los OHs en los extremos del transposón se unen covalentemente a las extremidades 5’ generadas por la acción de la transposasa sobre el

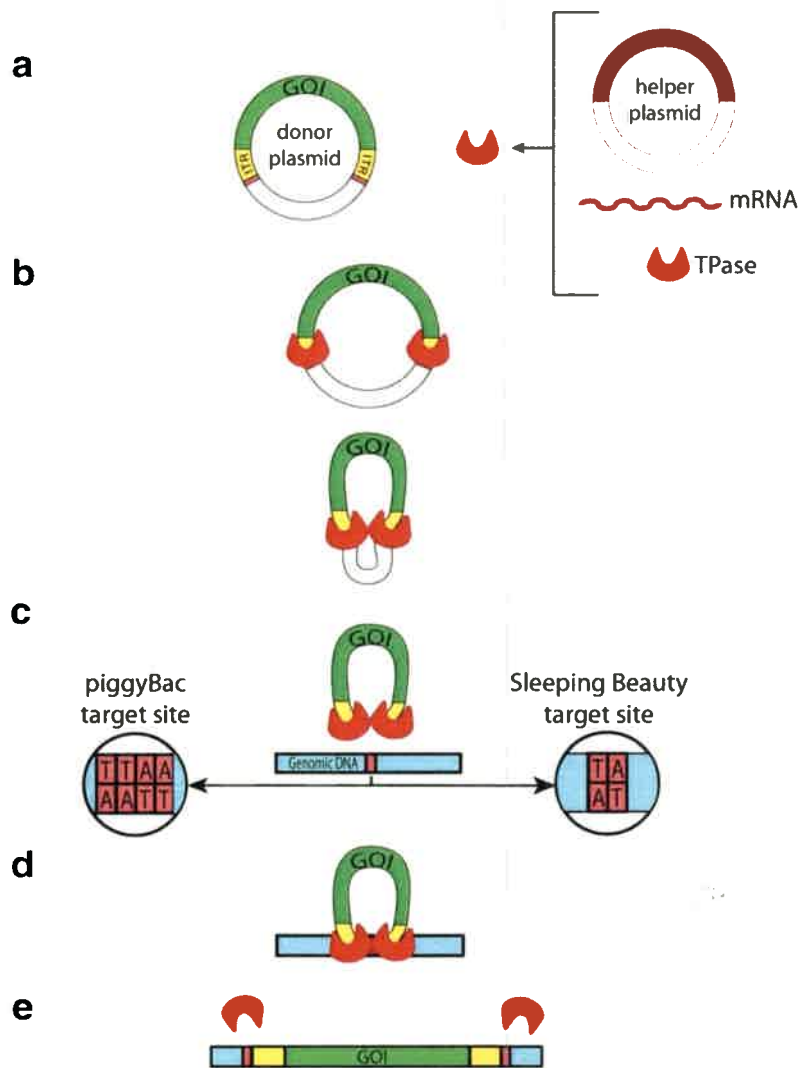
sitio diana (TTAA/AATT), donde la transposasa genera una ruptura escalonada con 5' overhangs. Los mecanismos de reparación del ADN propios del huésped completan los *gaps* que flanquean al transposón insertado dando origen a la duplicación del tetranucleótido diana TTAA (Mitra *et. al*, 2008) (Fig.4).



**Figura 4. Representación esquemática del mecanismo no-replicativo de transposición del transposón piggyBac.** La transposición se inicia con una ruptura en el extremo 3' del transposón, el OH libre ataca la hebra complementaria formando un hairping que es posteriormente resuelto por acción de la transposasa. El transposón escindido posee ahora 4 nucleótidos *overhangs* (TTAA) exponiendo nuevamente un OH 3' libre que se unirá a la secuencia diana. Una vez incorporado el transposón, los nicks generados a ambos lados del mismo son reparados dando lugar a una duplicación del sitio diana. Imagen modificada de Mitra *et al.*, 2008.

Aparentemente, la transposasa PB muestra cierta preferencia para incorporar el transposón dentro de unidades transcripcionales, principalmente en regiones intergénicas (Wilson *et. al*, 2007) y (Geurts *et. al*, 2006). La transferencia génica mediada por transposones es menos propensa al silenciamiento y asegura la incorporación de copias monoméricas del transgén representando una atractiva elección para la transgénesis y mutagénesis insercional (Alessio *et. al*, 2014; Urschitz *et. al*, 2010).

Para la mayoría de las aplicaciones, la transposasa y el transposón piggyBac son transportados en plásmidos separados (*trans*); uno de ellos, el *donante*, es el portador del transgén el cual se encuentra flanqueado por los ITRs. El otro plásmido, conocido como *ayudante*, posee un casete para la expresión de la enzima transposasa. Luego de la transfección de las células con ambos plásmidos, a partir del ayudante se genera la enzima transposasa la cual media la escisión del transgén desde el plásmido donante y su incorporación posterior al genoma celular (Bosch *et. al*, 2015) (Fig. 5).



**Figura 5. Mecanismo general de integración del transgén al genoma mediado por la transposasa.** La transposasa (TPase) es comúnmente sintetizada a partir de un vector de expresión (helper plasmid), ARNm o provista como proteína. El gen de interés (GOI) flanqueado por los ITRs es transportado en un vector independiente (donor plasmid) (a). La transposasa reconoce y se une a los ITRs catalizando rupturas en la doble hebra del ADN en sus extremos (b). El complejo transposón-transposasa se une a un sitio específico en el genoma (c) y se lleva a cabo la integración del transposón flanqueado por los ITRs (d-e). Esquema tomado de Bosch *et. al*, 2015.

### 1.3. Aplicación de elementos transponibles en transgénesis animal

Lo atractivo de las metodologías basadas en transposones, es la alta eficiencia de integración al genoma huésped, junto con una baja frecuencia de mutaciones deletéreas y

silenciamiento de la expresión del transgén poco marcado, aventajando de este modo a los vectores retrovirales (Liu *et. al*, 2006). A pesar de las ventajas de la transgénesis por transposición, dista mucho de ser el método ideal. Por ejemplo, se reconoce que la optimización del sistema, en términos de la relación de donante/ayudante que maximice los fenómenos de transposición, es más engorrosa por el hecho de tener que trabajar con dos plásmidos simultáneamente. Adicionalmente, existe el riesgo de que el casete de expresión de la transposasa (el cual normalmente es degradado por nucleasas intracelulares) gane acceso al genoma celular lo cual llevaría a la expresión constitutiva de la transposasa. Como consecuencia de esto, el transgén podría movilizarse a otros sitios genómicos con el consiguiente riesgo de daño genómico y muerte de la línea celular transgénica. Buscando simplificar el sistema original de dos plásmidos, Urschitz *et. al*, 2010 desarrollaron una estrategia en la cual el transgén (flanqueado por los ITRs) y el gen de la transposasa forman parte del mismo plásmido llamado *hepler-independent system (cis)*. Además, estos investigadores diseñaron el plásmido de tal manera que parte del casete de expresión de la transposasa se encuentra por dentro de los ITRs. Esto significa que al producirse el fenómeno de transposición porciones del gen de la transposasa son escindidos junto al transgén, dejando secuencias incompletas incapaces de producir la enzima. De esta manera se reduciría significativamente el riesgo de genotoxicidad asociado a la expresión sostenida de la transposasa.

Se han reportado altos niveles de integración de transgenes en ratones y cerdos mediante la combinación de constructos piggyBac hiperactivos y técnicas estándares como la microinyección pronuclear (PNI), ICSI e inyección intracitoplasmática (CPI), mostrando incrementos en la eficiencia de integración del transgén y porcentajes de transgénesis comparables a los obtenidos con métodos basados en vectores lentivirales (Marh *et. al*, 2012; Li *et. al*, 2014). Estos trabajos apoyan la idea de que la CPI combinada con el uso de transposones representarían una mejora significativa a la técnica de microinyección clásica, resultando en una atractiva metodología para la generación de bovinos transgénicos. Se ha demostrado también la habilidad del piggyBac para generar líneas celulares transgénicas para la producción a gran escala de proteínas recombinantes (Li *et. al*, 2013); como así también la transferencia *in vivo* del vector con fines de terapia génica en ratones (Saridey *et. al*, 2009).

La transgénesis activa a través de “*jumping genes*” ofrece un sistema versátil para la generación de líneas celulares transgénicas permitiendo una integración genómica estable

que beneficiaría la expresión a largo plazo del gen de interés. En la TNCS, la habilidad para transfectar las células que serán utilizadas como donantes de núcleos tiene una gran implicancia sobre la eficiencia global del sistema. Por lo tanto, la alta eficiencia de los transposones para mediar la incorporación de ADN exógeno al genoma huésped mejoraría la eficiencia de la técnica y consecuentemente reduciría el costo y los requerimientos de un gran número de receptoras para la generación de ganado bovino transgénico (Bertolini *et. al*, 2016).

Sistemas basados en transposones han sido utilizados extensamente en células murinas y humanas y más recientemente en conejos, pollos y cerdos (Tabla 2). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la factibilidad de aplicar esta metodología en células bovinas mantenidas en cultivo y luego emplearlas para la generación de embriones transgénicos mediante TNCS. Ésta combinación permitiría emplear líneas celulares con una precisa caracterización molecular reduciendo el tiempo y la imprevisibilidad en la producción de animales transgénicos logrando un aprovechamiento máximo del potencial biotecnológico de esta especie.

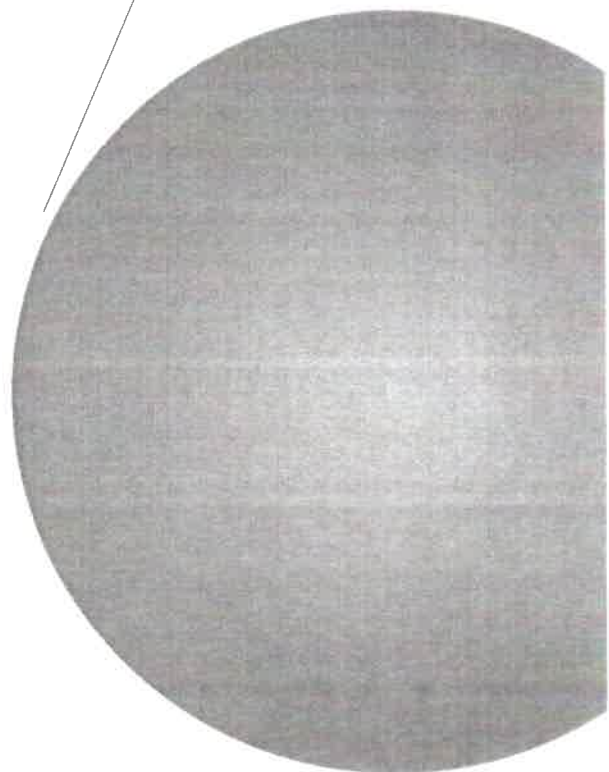
**Tabla 2.** Transgénesis mediada por transposones en animales de granja.

Transposón	Especie	Eficiencia global*	Patrón de expresión	Integraciones inespecíficas	Método
PiggyBac	Pollo	NA	Ubicua	ND	PGC transfección in vitro
	Pollo	49.6%	Ubicua	ND	PGC transfección in vitro
	Pollo	NA	Ubicua	ND	Microinyección embrionaria y electroporación
	Cerdo	1.3%	Ubicua	ND	SCNT
	Cerdo	7.0%	Tejido ocular	5%	CPI
	Cerdo	5.7%	Ubicua	ND	CPI
Sleeping Beauty	Conejo	1.4%	Ubicua	NO	PNI
	Cerdo	6.8%	Ubicua	5%	CPI
	Cerdo	NA	Ubicua	25%	SCNT (HMC)
	Cerdo	3%	Ubicua	NO	CT
	Cerdo	NA	Queratinocitos	ND	SCNT (HMC)
	Cerdo	NA	Hígado	ND	SCNT (HMC)
Tol2	Pollo	NA	Ubicua	ND	PGC transfección in vitro
	Pollo	1.5%	Ubicua	ND	PGC transfección in vivo

NA Las eficiencias expresadas como descendencia transgénica por embriones tratados no son aplicables, ND no determinadas, PGC células germinales primordiales.\* Descendencia transgénica por ovocito o embrión tratado.

# **CAPÍTULO I**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## CAPÍTULO I

### HIPÓTESIS DE TRABAJO:

El sistema transgénico basado en el transposón *piggyBac* es capaz de mediar la incorporación de secuencias de ADN heterólogo al genoma de fibroblastos fetales bovinos mediante el mecanismo conocido como transposición. El uso de este sistema para modificar el genoma de células bovinas resulta en una alta tasa de células que expresan el transgén de manera estable y las mismas retienen la capacidad de producir embriones preimplantacionales mediante la técnica de TNCS.

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo del proyecto es desarrollar un sistema basado en un transposón conocido como *piggyBac*, el cual permita introducir eficientemente modificaciones génicas estables en células bovinas en cultivo. Estas células serán usadas en un futuro como base para la generación de animales transgénicos para aplicaciones biotecnológicas mediante clonado por transferencia nuclear de células somáticas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

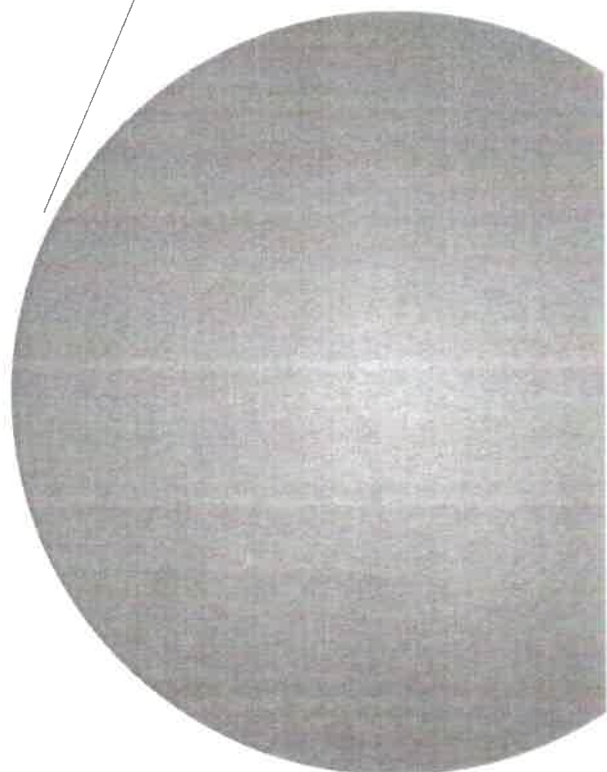
- 1) Optimizar la tasa de transfección de fibroblastos bovinos con vectores que contienen el transgén (casetes de expresión de GFP e higromicina fosfotransferasa) flanqueado por los ITRs y un casete para expresión de la *piggyBac* transposasa. Evaluar el efecto de la electroporación y del uso de agentes químicos sobre la eficiencia de transfección.
- 2) Estudiar mediante PCR las características de integración del transgén en líneas clonales transgénicas. Esta estrategia permitirá determinar si la integración del transgén ha sido al azar o mediante el fenómeno de transposición.
- 3) Investigar el número de copias del transgén que se han incorporado al genoma de las líneas celulares transgénicas obtenidas mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
- 4) Establecer con precisión los lugares específicos dentro del genoma celular donde se ha incorporado el o los transgenes a fin de determinar si existe alguna predilección para insertarse en ciertas regiones del genoma bovino.



5) Evaluar la capacidad de reprogramación de los fibroblastos transgénicos mediante la producción de embriones bovinos por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) utilizando como donantes de núcleos fibroblastos modificados genéticamente mediante el sistema de transposición piggyBac.

# **CAPÍTULO I**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Obtención y cultivo de fibroblastos fetales bovinos (FFBs)

Fetos resultantes de preñeces entre 30 y 70 días fueron transportados desde el Frigorífico Río Cuarto ubicado a 10 Km de la UNRC hasta el laboratorio en un contenedor térmico para su procesamiento. Brevemente, los fetos fueron lavados con solución de DPBS estéril y se tomaron muestras de la región de los flancos para la generación de explantos de 1cm<sup>2</sup> que posteriormente fueron cultivados en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor) en una estufa de cultivo con atmósfera controlada de 5% CO<sub>2</sub> y alta humedad a 38°C durante un período de 10 días. Las células fueron colectadas utilizando tripsina 0,05% (Sigma), congeladas a -80°C en un sistema de congelación controlada (“Mr. Frosty” Nalgene®). En este sistema, el recipiente conteniendo los crioviales con las células es llenado con isopropanol y colocado en el freezer a -80°C garantizando una tasa de enfriamiento de 1°C/min lo que se traduce en una mejor viabilidad y recuperación de las células post-descongelado. Al día siguiente los crioviales fueron transferidos a termos de nitrógeno líquido y mantenidos allí hasta su utilización.

### 2.2. Vectores piggyBac

Los plásmidos utilizados fueron gentilmente cedidos por nuestro colaborador el Dr. Stefan Moisyadi (Department of Anatomy, Biochemistry, and Physiology, John A. Burns School of Medicine, Honolulu, HI, USA).

#### 2.2.1. *pmGENIE-3*

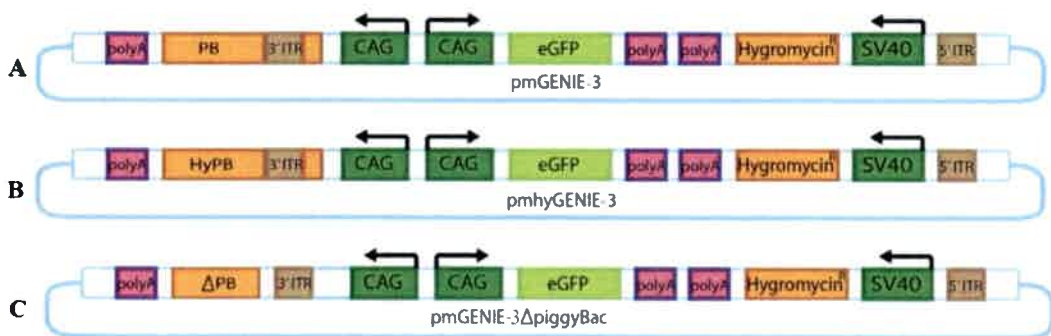
El plásmido denominado *pmGENIE-3* (Urschitz *et. al*, 2010) contiene los siguientes componentes: casete de expresión de EGFP bajo el control del promotor CAG (CMV-IE enhancer, Chicken  $\beta$ -actin promoter,  $\beta$ -globin intron) y de resistencia a higromicina bajo el control del promotor SV40, un casete de expresión de la enzima transposasa con codones optimizados para expresión en células mamíferas y repeticiones terminales invertidas del *piggyBac* (ITRs). Además, el esqueleto del plásmido posee todos los componentes que permiten que el plásmido sea propagado en *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  (Fig.6A).

### 2.2.2. pmhyGENIE-3

El plásmido pmGENIE-3 fue modificado para mejorar la eficiencia en la integración del transgén. Se remplazaron los codones optimizados de ratón en el gen de la transposasa por una variante hiperactiva (Yusa *et. al*, 2011) (Fig.6B).

### 2.2.3. pmGENIE-3/ $\Delta$ piggyBac

El plásmido pmGENIE-3 fue digerido con las enzimas de restricción *BbsI* y *EcoNI* las cuales remueven un fragmento de 1095 pb. Luego de la ligación se formó un nuevo plásmido, el pmGENIE-3/ $\Delta$ piggyBac, el cual carece de la capacidad para producir la enzima transposasa. Este plásmido fue utilizado como control negativo de los experimentos (Fig. 6C).



**Figura 6.** Esquema de los vectores pGENIE utilizados en los experimentos de transfección.

## 2.3. Transfección Celular y Evaluación de la expresión in-vitro de EGFP

### 2.3.1. Efecto del agente JetPRIME sobre la eficiencia de transfección de FFBs

Los fibroblastos fetales bovinos creciendo en DMEM, 10% SFB y 1x Penicilina-Streptomycin 100x (Gibco, Ca, USA) en estufa a 38°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad fueron tripsinizados y contados en la cámara de Neubauer. Se sembraron 0,5x10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa MW-24 con lo cual se obtenía un 80% de confluencia a las 24 hs. Una vez obtenido el crecimiento deseado, los fibroblastos fueron transfectados utilizando el agente químico JetPRIME® (Poliplus transfection™) según el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, se mezclaron en 100  $\mu$ l de buffer JetPRIME, 1  $\mu$ g de plásmido y 2  $\mu$ l de JetPRIME. La mezcla de transfección fue

colocada sobre cada pocillo conteniendo 400µl de DMEM sin SFB, 1x Antibiótico incubada durante 4 hs en la estufa. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado y se agregó medio de cultivo nuevo suplementado con 10% SFB. 48 h post-transfección se realizó la evaluación de la expresión transitoria de EGFP bajo luz azul (450nm a 500nm) en un microscopio invertido Eclipse 2000s (Nikon, Tk, Japón) con equipo de epifluorescencia (Nikon). Posteriormente las células transfectadas fueron tripsinizadas y colocadas en placas de 100mm para comenzar el proceso de selección con el antibiótico higromicina B (Invitrogen) durante 21 días, realizando cambios de medio cada 3 días.

▪ *Diseño experimental*

En este experimento se estudió la capacidad de mediar la incorporación estable del transgén al genoma bovino de 3 plásmidos diferentes: *pmhyGENIE-3*, *pmGENIE-3* y *pmGENIE-3/ΔpiggyBac* (Control negativo sin transposasa). Para ello, FFB fueron expuestos a cada uno de los plásmidos con el agregado de JetPRIME en relaciones 2:1 (µl de JetPRIME/µg de ADN plasmídico), constituyendo 2 tratamientos y un control.

- *Tratamiento 1:* FFB transfectados con 1 µg de *pmhyGENIE-3* en combinación con 2 µl JetPRIME.
- *Tratamiento 2:* FFB transfectados con 1 µg de *pmGENIE-3* en combinación con 2 µl JetPRIME.
- *Control Negativo:* FFB transfectados con 1 µg de *pmGENIE-3/ΔpiggyBac* en combinación con 2 µl JetPRIME.

A las 48 hs de realizada la transfección, las células fueron repicadas a placas de cultivo (100 mm de diámetro) y se cultivaron en DMEM 10% SFB con el agregado del antibiótico higromicina para selección positiva (50 µg/ml). Bajo estas condiciones sólo proliferaron aquellas células que integraron el casete de resistencia a higromicina presente en el plásmido. Finalizado el período de selección con el antibiótico se llevó a cabo el conteo del número de colonias EGFP positivas e higromicina resistentes obtenidas a partir de cada tratamiento. Estos resultados fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguido del Test de Tukey para comparar las medias de los diferentes tratamientos.

### 2.3.2. Efecto de la electroporación sobre la eficiencia de transfección de FFBS

Se descongelaron crioviales de FFBS de pasajes comprendidos entre 2 y 4 y fueron cultivados en DMEM 10% SFB hasta obtener una confluencia del 80%. Los FFBS fueron lavados con DPBS y digeridos con tripsina 0,5%. Las células fueron resuspendidas en dos medios de electroporación diferentes: DMEM sin SFB y sin el agregado de antibióticos y PBS-Sucrosa 0,27M a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml de medio.

Para todas las electroporaciones se utilizaron 5  $\mu$ g de plásmido por transfección resuspendido en 100  $\mu$ l de PBS-Sucrosa 0,27M o DMEM sin SFB y sin antibióticos conteniendo  $1 \times 10^5$  células. Se utilizaron dos voltajes diferentes: 250 y 350 V. Cada electroporación utilizó ondas cuadradas de pulsos administradas a través de cuvetas de 2 mm (BTX ECM 830). Los parámetros empleados se detallan en la Tabla 3. Luego de la administración del pulso, las células fueron colocadas 10 min en hielo y posteriormente sembradas en placas MW-6 conteniendo 2 ml de DMEM 10% SFB. Cuarenta y ocho horas post-transfección se realizó la evaluación de la expresión transitoria de EGFP bajo luz azul (450nm a 500nm) en un microscopio invertido Eclipse E-300 (Nikon, Tokio, Japón) con equipo de epifluorescencia (Nikon). Posteriormente las células transfectadas fueron tripsinizadas y colocadas en placas de 100mm para comenzar el proceso de selección con el antibiótico higromicina B (Invitrogen) durante 21 días, realizando cambios de medio cada 4 días.

**Tabla 3.** Parámetros de las condiciones de electroporación.

	250 V	350V
<b>DMEM</b>	5 $\mu$ g ADN plasmídico	5 $\mu$ g ADN plasmídico
	Intervalo: 100 ms	Intervalo: 100 ms
	Longitud del pulso: 100 $\mu$ s	Longitud del pulso: 100 $\mu$ s
	Número de pulsos: 4	Número de pulsos: 4
<b>PBS-Sucrosa</b>	5 $\mu$ g ADN plasmídico	5 $\mu$ g ADN plasmídico
	Intervalo: 100 ms	Intervalo: 100 ms
	Longitud del pulso: 100 $\mu$ s	Longitud del pulso: 100 $\mu$ s
	Número de pulsos: 4	Número de pulsos: 4

2.4. Obtención de líneas monoclonales transgénicas

Luego de 21 días de selección con higromicina B, se formaron colonias aisladas de células resistentes al antibiótico. Para obtener las células de cada colonia, se utilizaron anillos de clonado ó *Cloning Rings*, los cuales consisten en pequeños cilindros de plástico de 7mm que fueron colocados sobre cada colonia previamente identificada bajo la luz azul en el microscopio. Se agregó dentro de cada anillo de clonado 50µl de Tripsina 0,5%, se incubó 5 min en estufa y las células obtenidas fueron colocadas en placas MW-24 con 500 µl de medio de cultivo. Aquellas colonias que mantuvieron un potencial de crecimiento y lograron llegar a confluencia en la placa, fueron tripsinizadas y colocadas secuencialmente en placas de mayor superficie, MW-6, frascos de cultivo de 25 y finalmente de 75mm. Cada colonia expandida fue criopreservada en nitrógeno líquido como se describió previamente.

2.5. Caracterización Molecular de la integración del transgén en el genoma bovino.

2.5.1. *PCRs múltiples*

El ADN genómico fue aislado de 9 líneas monoclonales transgénicas utilizando el Kit comercial de extracción Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research Corporation, Irvine, USA.). Para llevar a cabo la caracterización de la integración del transposón se emplearon PCRs múltiples basadas en una estrategia que permitió estimar si las integraciones del transposón piggyBac se debieron a una integración al azar o si fueron facilitadas por la enzima transposasa. Para ello, se utilizaron un total de 4 sets de primers (Tabla 4). Las PCRs múltiples (multiplex) fueron realizadas bajo los siguientes parámetros de acuerdo al protocolo previamente descrito por Römppler *et. al*, 2006:

	Desnaturalización inicial	94°C por 9 min
	Desnaturalización	94°C por 20 s
30 ciclos	Hibridación	60°C por 30 s
	Elongación	72°C por 30 s
	Elongación Final	72°C por 5 min

**Tabla 4.** Información de primers.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón	Fragmento amplificado	Interpretación
PB-EGFP-F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	187 pb	EGFP	Presencia del transgén en el genoma.
PB-EGFP-R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG			
PB-FP-F	GATCTCGTCGGTGAAGAACAG	537 pb	Se extiende desde el 3'ITR hacia el esqueleto del plásmido	Integración no-transposicional del transgén.
PB-FP-R	ACTCCCAGACATGCCCAAGT			
PB-TPase-F	GATCTCGTCGGTGAAGAACAG	245 pb	piggyBac transposasa	Presencia del gen de la piggyBac transposasa.
PB-TPase-R	AGATCCTGGACGAGCAGAAC			
PB-RL-F	GGTGCTCTTGGAGGTGGAC	442 pb	Parte del esqueleto religado del pGENIE-3	Integración no-transposicional del esqueleto religado de plásmido.
PB-RL-R	CCGCGACGAAGTGGTATC			

### 2.5.2. Análisis del secuenciamiento del plásmido religado

El fragmento obtenido mediante la amplificación con los primers PB-RL a partir del ADN genómico de la línea transgénica A1 (Ver Sección 3.2.1. de Resultados) fue secuenciado para confirmar su identidad. Para ello, la banda fue recuperada del gel de agarosa utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), cuantificado por espectrofotometría (Nanodrop2000c UV-Vis Spectrophotometer, Thermo) y secuenciado. El secuenciamiento fue realizado en la Unidad Genómica del INTA Castelar, donde se llevaron a cabo dos reacciones de secuenciación, una utilizando el primer forward y otra el reverse. Los cromatogramas fueron analizados mediante el programa bioinformático BioEdit Sequence Alignment Editor.



### 2.6 Non-restrictive linear amplification mediated by PCR (nr-LAMPCR)

Para determinar el sitio específico de integración del transposón dentro del genoma bovino se realizó una PCR inversa denominada nrLAM-PCR (del inglés, *non-restrictive linear amplification-mediated PCR*). El DNA genómico proveniente de las líneas transgénicas de fibroblastos se utilizó como molde para llevar a cabo la reacción según Paruzynski *et. al*, 2010. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis bioinformático, en el cual las secuencias amplificadas fueron comparadas contra la base de datos del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar el sitios de integración específico dentro del genoma bovino.

### 2.7. Cuantificación absoluta del número de copias del transgén mediante qPCR

La amplificación y el análisis mediado por *real time qPCR* fue realizado utilizando el equipo Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System. El ADN fue cuantificado utilizando un Nanodrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo). Para la amplificación se utilizó el kit comercial de KAPA SYBR® FAST qPCR (Biosystem), la mezcla de reacción fue preparada como se indica a continuación:

	Vf: 20µl	Concentración Final
Agua para PCR	Hasta 20 µl	-
2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Universal	10 µl	1X
10 µM PB-EGFP-R	0.4 µl	200 nM
10 µM PB-EGFP-F	0.4 µl	200 nM
AND		20 ng
50X ROX High/Low	0.4 µl	1X

Los primers fueron diseñados con el programa Primer3 para amplificar un fragmento < 200 pb del gen EGFP y sus secuencias se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencia de primers para *real time qPCR*

Gen Target	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del amplicón
EGFP	F: ACGTAAACGGCCACAAGTTC	187 pb
EGFP	R: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	187 pb

El programa del termociclador fue el siguiente: desnaturalización inicial 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C, 10 s a 61°C y 10 s a 72°C. La señal de fluorescencia fue medida en el final de cada paso de extensión a 72°C. Luego de la amplificación, se realizó una curva de melting con un gradiente de temperatura de 0,1°C/s desde 70 a 95°C para confirmar que sólo fue amplificado el producto específico correspondiente a EGFP. El colorante utilizado SYBR Green se une a cualquier secuencia de ADN doble cadena y emite fluorescencia, por lo que se detectarán tanto los productos específicos como los no específicos (dímeros de primers y ADN contaminante). El análisis basado en la curva de disociación permite detectar los productos inespecíficos. El proceso de disociación de la doble cadena de ADN causa una reducción en la señal de fluorescencia alrededor de la temperatura de melting ( $T_m$ ) del producto de PCR, resultando en un pico en la curva. Por lo tanto, los diferentes fragmentos con diferentes temperaturas de melting aparecen como picos separados (Lee *et. al*, 2006).

### 2.7.1. Construcción de la curva estándar para la determinación del número de copias del plásmido *pmhyGENIE-3*

Se llevaron a cabo diluciones seriadas 1/10 del plásmido *pmhyGENIE-3* (el cual porta una única copia del gen EGFP), comenzando con 100 pg de ADN plasmídico para llegar a la menor concentración utilizada de 0,01 pg. En la Tabla 6 se muestra la correlación del N° de copias del gen EGFP en función de la cantidad de ADN plasmídico presente.

**Tabla 6.** Estimación del N° de copias del *pmhyGENIE-3* en relación a la cantidad total de ADN presente en la muestra.

pg de ADN plasmídico	N° de copias
100	5,93E+06
10	5,93E+05
1	5,93E+04
0,1	5,93E+03
0,01	5,93E+02

El número de copias fue calculado usando la siguiente ecuación según Whelan *et. al*, 2003:

$$N^{\circ} \text{ de copias} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \text{ copias/mol} * \text{Cantidad de ADN (g)}}{\text{Longitud del ADN (pb)} * 660 \text{ g/mol/pb}}$$

$$\text{Longitud del ADN (pb)} * 660 \text{ g/mol/pb}$$

Los valores de Ct de cada dilución fueron medidos por duplicado para la generación de la curva estándar para EGFP. Dichos valores fueron graficados contra el número de copias. Para calcular el número de copias presentes por genoma en cada una de las líneas bovinas transgénicas se tuvo en cuenta el tamaño del mismo ( $2,87 \cdot 10^9$  pb) y la cantidad presente en cada muestra de reacción (20 ng).

### 2.7.2. *Relación entre el número de copias presentes en el genoma y la intensidad de fluorescencia*

Para establecer una relación entre la intensidad de la señal de EGFP y el número de copias presentes en el genoma bovino, se llevó a cabo un análisis de Regresión Lineal utilizando el programa estadístico InfoStat empleando los valores de CTCF (Fluorescencia total corregida), la cual fue obtenida con el programa ImageJ aplicando la siguiente fórmula:  $CTCF = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} * \text{medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$ .

### 2.8. Experimento de remoción del transposón piggyBac

El ensayo de remoción del transposón fue llevado a cabo acorde al protocolo establecido por Woltjen *et. al*, 2011. La línea transgénica monoclonal A1 obtenida mediante la transfección de FFBS con el vector *pmhyGENIE-3* fue descongelada y las células fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/well en una placa MW-24 por triplicado. Posteriormente cada well fue transfectado con 1  $\mu$ g del plásmido *pmPBBase* (conteniendo el casete de expresión de la piggyBac transposasa) y 2  $\mu$ l del agente polietilenimina (PEI). Cuarenta y ocho horas post-transfección, se inició una selección transitoria con G418 (250  $\mu$ g/mL) para enriquecer las células transfectadas que expresan la transposasa. Como control se empleó la línea transgénicas A1 sin transfectar. Luego de 5 días de crecimiento en DMEM 10% SFB suplementado con G418 las células fueron tripsinizadas y analizadas en un citómetro de flujo (COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer). En todos los casos, se analizaron más de 100000 eventos celulares por tubo y los resultados arrojados se examinaron con el programa FlowJo para determinar la intensidad media de fluorescencia para cada una de las muestras.

## 2.9. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante transferencia Nuclear de células somáticas (TNCS)

### *2.9.1. Obtención de ovocitos*

Ovarios procedentes de animales destinados a faena fueron transportados desde el Frigorífico Río Cuarto ubicado a 10 Km de la UNRC hasta el laboratorio en un contenedor térmico a aproximadamente 25°C. Los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) fueron recolectados utilizando dos métodos diferentes:

- Aspiración con Jeringa: Se utilizó una aguja 18G acoplada a una jeringa de 10 ml conteniendo 1 ml de medio de colección H-SOF ó TCM-AIR (TCM-199, NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, Piruvato de Sodio, Gentamicina y BSA). La punción de los folículos se realizó dirigiendo la aguja desde el interior del parénquima ovárico y aspirando varios folículos sin sacar la aguja. Se punzaron los folículos de tamaño intermedio (2-8 mm de diámetro), el líquido folicular obtenido fue colectado en tubos de cónicos de 50 ml y llevado al laboratorio para la selección de los COCs en una lupa estereoscópica.
- Slicing: Los ovarios lavados con solución fisiológica estéril fueron colocados en placas de vidrio con PBS y 1x Penicilina-Streptomycin (Gibco, Ca, USA) para realizar el corte de los folículos con hojillas de afeitar. El líquido colectado en la placa de slicing se pasó a través de un tamiz a un vaso de precipitado de vidrio estéril y se dejó reposar 15 min para que los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) decanten. Posteriormente, se aspiró con una jeringa el líquido en la parte superior del vaso de precipitado hasta llegar a un volumen final de aproximadamente 80-100 ml. El líquido folicular conteniendo los COCs fue recolectado en tubos de 50 ml, seguido de un proceso de decantación; el sobrenadante se eliminó y se tomó el decantado con 2 ml de líquido folicular el cual es depositado en una placa de Petri para comenzar la búsqueda de los ovocitos en una lupa estereoscópica (Fig. 7).



**Figura 7.** Material de Slicing (A), Colección de COCs (B y C) y Búsqueda de COCs en la lupa estereoscópica (D).

### 2.9.2. Maduración *in-vitro*

Para la maduración *in vitro* se colectaron COCs de buena calidad, siendo aquellos con un citoplasma homogéneo y rodeados por un cúmulus compacto de color gris o marrón uniformemente oscuro (Palma *et. al*, 2008). El medio de maduración utilizado fue TCM-199 (31100-035; Gibco, Grand Island, NY, USA), conteniendo 10% SFB, 10  $\mu\text{g/ml}$  de hormona Folículo estimulante FSH (Folltropin; Bioniche, Caulfield North, Victoria, Australia), 0.3 mM de piruvato de sodio (Sigma, P2256), 100  $\mu\text{M}$  cysteamina (Sigma, M9768), y 2% antibiotico-antimicótico (15240-096; Gibco). Los ovocitos fueron incubados durante 18-20 hs en gotas de 100 $\mu\text{l}$  cubiertas por aceite mineral (Sigma, M8410), en 5%  $\text{CO}_2$  y humedad máxima a 39 °C.

### 2.9.3. Obtención de células donantes para transferencia nuclear de células somáticas

Para la realización de la TNCS se utilizaron como donantes de núcleos, fibroblastos transgénicos provenientes de líneas policlonales conteniendo el transposón piggyBac. Una semana antes de realizar la maniobra de micromanipulación, las células fueron descongeladas del nitrógeno líquido y cultivadas en DMEM 10% SFB. Un día antes de la TNCS el medio de crecimiento fue reemplazado por DMEM 0,5% SFB para permitir que las células ingresen en el estadio  $G_0$  del ciclo celular por privación de suero.

### 2.9.4. Técnica convencional de transferencia nuclear de células somáticas

Los COCs madurados en las placas de cultivo, fueron colocados en un tubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de hialuronidasa al 0,2% y BSA al 0,4% en PBS para remover las células del cúmulus. Se realizó un pipeteo previo con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  para

favorecer la denudación de los ovocitos. El proceso se repitió dos veces y los ovocitos denudados fueron lavados tres veces en el medio de lavado (H-199, 10% SFB, 83,4 µg/ml de amicacina y 22 µg/ml de piruvato de sodio) para eliminar los restos de hialuronidasa. Para determinar la maduración nuclear de los ovocitos se evaluó la presencia del primer cuerpo polar, lo cual indica que el ovocito se encuentra en el estadio de metafase II.

- *Enucleación*

Los ovocitos en metafase II (MII) fueron teñidos con el colorante Hoechst 33342 (B-2261) para visualizar la placa metafásica bajo la luz UV. Para ello, se colocaron grupos de 15-20 ovocitos en placas de 35mm conteniendo gotas de 15µl de SOF con 7,5 µg/ml de Citocalasina B y 5 µg/ml de Hoechst. La placa se colocó en la estufa protegida de la luz y se dejó teñiendo a los ovocitos durante 10-20 min. Posteriormente los ovocitos fueron colocados en la placa de micromanipulación. Dicha placa contenía tres gotas de 60 µl de H-199 con 7,5 µg/ml de citocalasina-B (para facilitar la plasticidad del ovocito), cubiertas por aceite mineral donde se depositaron entre 25-30 ovocitos teñidos. La placa fue colocada sobre una platina térmica (Nikon) sobre el microscopio. Cada ovocito fue sujetado mediante succión utilizando una pipeta holding y ubicado de manera tal que la metafase quedara en el mismo plano y enfrentada a la aguja de enucleación exponiendo los ovocitos a la luz UV no más de 10 segundos para evitar daños. La pipeta de enucleación presentó un ángulo de inclinación de 45° y un diámetro interno de 10 µm y se procedió a aspirar la MII con la menor cantidad de citoplasma posible.

- *Transferencia nuclear de células somáticas*

Previo a la TNCS, las células fueron procesadas mediante FACS (del inglés, *Fluorescence-activated cell sorting*) para tener la seguridad de utilizar sólo células transgénicas. Ésta células fueron colocadas en baja densidad en las mismas gotas de micromanipulación donde se realizó la enucleación. Se seleccionaron células de pequeño tamaño, las cuales probablemente sufrieron un proceso de división reciente con lo cual se evitan problemas de ploidía en los embriones reconstituidos. Se cargaron aproximadamente ocho células con estas características y fueron colocadas individualmente en el espacio perivitelino de los ovocitos enucleados (1 célula/ovocito).

▪ *Fusión*

Los pares ovocito-célula fueron colocados sobre una placa conteniendo medio de fusión (Manitol 0,28M, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1mM, HEPES sódico 0,5mM y BSA 0,05%) donde se realizaron al menos tres lavados. Posteriormente se colocaron en una cámara de fusión (Eppendorf) que contenía 200 µl de medio de fusión cubierto por aceite mineral. Los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- Voltaje: 75Kv/cm
- Longitud del pulso: 45µs
- Números de pulsos: 2
- Intervalo: 5s

Luego de la fusión, los presuntos embriones fueron colocados en gotas de SOF (2,77mM de Myo-Inositol, 50µg/ml de Gentamicina, 30µl/ml de BME, 10µg/ml de MEM, 0,2mM de L-Glutamina, 5mM de NaHCO<sub>3</sub>, 108mM de NaCl, 7,2 mM de KCl, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 4,2 mM de Lactato de Sodio, 7,3mM de Piruvato de Sodio, 1,78mM CaCl<sub>2</sub> y 5% de BSA) en la estufa durante 2 h para favorecer la reprogramación del núcleo donante.

▪ *Activación química*

Transcurridas las 2 h de reprogramación, se comprobó la fusión y los embriones fusionados fueron lavados al menos tres veces y luego se colocaron en gotas de 300 µl de medio de lavado con el agregado de ionomicina de calcio (I24222; Invitrogen, California, USA) 5 µM durante 5 min al resguardo de la luz. Posteriormente, los embriones fueron lavados en el medio de lavado H-199 suplementado con 3x de BSA para permitir una mejor eliminación de los residuos de ionomicina. Seguidamente, fueron colocados en gotas de SOF con 2 mM de 6-DMAP, y cultivados durante 3 hs en estufa.

▪ *Cultivo Embrionario*

Los presuntos embriones fueron lavados y colocados en gotas de 100 µl de SOF, aproximadamente 25-30 embriones por gota. Los embriones se cultivaron en la estufa a 39°C, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, en aire y máxima humedad. Al día 2 post-transferencia nuclear se realizó la evaluación del clivaje y al día 7 se determinó el porcentaje de blastocistos obtenidos.

#### 2.9.5. Sincronización de hembras receptoras

Para la transferencia embrionaria se utilizó un rodeo de 12 vacas mestizas. 17 días antes de la transferencia nuclear se inició la sincronización hormonal de las receptoras utilizando el siguiente protocolo:

- Día 0: 2 mg de Benzoato de Estradiol. Colocación del dispositivo de progesterona (1g de progesterona).
- Día 8: 0,5 mg de cloprostenol. Remoción del dispositivo de progesterona.
- Día 9: 1 mg de Benzoato de Estradiol.
- Día 17: Transferencia embrionaria.

#### 2.9.6. Transferencia embrionaria

Los blastocistos expandidos fueron cargados en pajuelas de 0,5 ml y transferidos por vía transvaginal al cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo.

El diagnóstico de preñez fue realizado a los 27 días post transferencia nuclear mediante ultrasonografía.

#### 2.9.7. Establecimiento de líneas celulares transgénicas a partir de los fetos recuperados

Aproximadamente a los 40 días de preñez las hembras receptoras fueron faenadas y los úteros gestantes fueron transportados hasta el laboratorio en un recipiente térmico. Se realizó una incisión en el cuerno uterino y se recuperó el feto junto con las membranas asociadas. Se retiró la cabeza y el resto del embrión fue seccionado para generar los explantos que fueron cultivadas en placas de 35mm con 500  $\mu$ l de DMEM 20% SFB suplementados con 50 $\mu$ g/ml de ciprofloxacina.

#### 2.9.8. Transferencia nuclear de células somáticas: Método Zona-Free

La técnica utilizada en este trabajo para realizar la TNCS está basada en un método alternativo de clonado denominado *zona-free* descrito por Oback *et. al*, 2003. Las principales ventajas de éste método en comparación con el estándar *zona-intact* son la simplicidad y la rapidez. Para la enucleación no se requiere pipeta holding, la aspiración de la metafase se lleva a cabo utilizando una pipeta de punta roma y es posible fusionar varios pares ovocito-célula de manera simultánea. Además, no se observan diferencias en las



tasas de preñez y de crías nacidas a término, indicando que los embriones generados tanto con el método estándar *zona-intact* como aquellos derivados de la metodología *zona-free* presentan la misma viabilidad.

- *Enucleación*

Los COCs madurados en las placas de cultivo, fueron colocados en un tubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo 200  $\mu$ l de hialuronidasa 0,5 mg/ml para remover las células del cúmulus. Para determinar la maduración nuclear de los ovocitos se evaluó la presencia del primer cuerpo polar, lo cual indicaría que es ovocito secundario (maduro) detenido en la metafase II. La eliminación de la zona pelúcida se realizó sometiendo a los ovocitos a la acción de la enzima pronasa. En una placa de 35mm se colocaron 2 ml de medio de lavado y 200  $\mu$ l del stock de pronasa (20 mg/ml) quedando una concentración de trabajo de la enzima de 2mg/ml.

Los ovocitos *zona-free* fueron teñidos con 1  $\mu$ g/mL of Hoechst 33342 por 10 minutos y luego transferidos a gotas de 50  $\mu$ L de HEPES-TALP suplementado con 0.3 g/ml BSA y cubiertas por aceite mineral. Los ovocitos teñidos fueron enucleados mecánicamente usando un micromanipulador hidráulico Narishige (Narishige Sci., Tokyo, Japan) montado en un microscopio invertido Nikon Eclipse E-300 (Nikon, Tokyo, Japan). La enucleación fue llevada a cabo usando una pipeta con un diámetro interno de 20  $\mu$ m. Los cromosomas en MII fueron visualizados bajo luz UV (con una exposición <10 s) y aspirados junto con el menor volumen de citoplasma posible.

- *Preparación de las células donantes y fusión a los ovocitos enucleados*

Las células transfectadas con el plásmido *pmhyGENIE-3* fueron usadas como donantes de núcleos para la TNCS. Los ovocitos enucleados *zona free* fueron recubiertos con 1 mg/ml de PHA (del inglés *Phytohemagglutinin*) (Sigma, L8754) disuelta en TCM-199 sin SFB, ésta lectina promueve una fuerte unión entre la membrana del ovocito y la de la célula donante debido a su habilidad para combinarse con residuos glucosídicos de las membranas celulares. Posteriormente fueron transferidos a una gota de HEPES-TALP que contiene la suspensión celular, dejando caer un ovocito a la vez sobre una célula aislada. Cada par ovocito-célula fue colocado en una gota de medio de fusión (0.3 M manitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml PVA) para realizar la electro-fusión de las

membranas celulares en una cámara de fusión (BTX Instrument Division; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). La fusión se realizó bajo los siguientes parámetros: 2 pulsos, 75V, longitud de 30 ms y un intervalo de 0,1 s. Los embriones reconstituidos fueron cultivados durante 2 h en gotas de SOF para permitir la reprogramación del núcleo somático.

- *Activación química*

Los ovocitos fusionados y reprogramados fueron activados con 5 $\mu$ M de ionomicina de calcio en HEPES-TALP durante 4 min al resguardo de la luz y subsecuentemente transferidos a gotas de 100 $\mu$ l de SOFaa con 6-DMAP (Sigma, D2629) a una concentración de 2mM cubiertas por aceite mineral. Las placas fueron colocadas en la estufa de cultivo durante 3 hs.

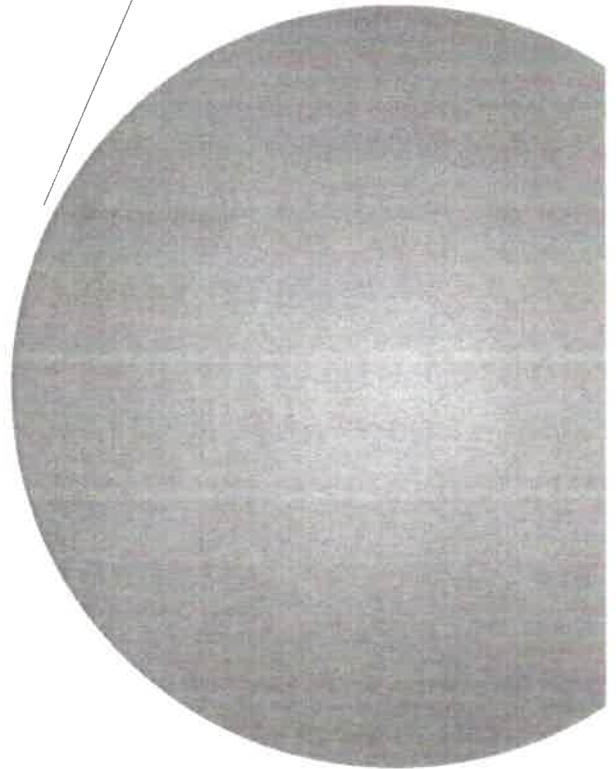
- *Cultivo in vitro: Sistema Well of the Well (WOWs)*

Luego del cultivo en 6-DMAP, los presuntos embriones se lavaron para eliminar los restos del inhibidor y fueron cultivados de manera individual en gotas de 2 $\mu$ l de SOFaa o en pocillos de un tamaño un poco mayor al tamaño del embrión, denominados *Well of the Well* (WOWs) (Vajta *et. al*, 2006). Para la generación de los pocillos, se calentó la punta de un tubo capilar estirado y se apoyó sobre una placa. Se realizaron 3 ó 4 grupos de aproximadamente 15 pocillos por cada placa de 35mm y sobre cada grupo se agregó 100  $\mu$ l de SOFaa y se cubrió con aceite mineral. Los embriones fueron cultivados en la estufa a 39°C, dentro de una cámara de incubación modular 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> y máxima humedad. Al día 2 post-transferencia nuclear se realizó la evaluación del clivaje y se reemplazó el 50% del medio. A día 5 se suplementó con 7,5% de SFB y a día 7 se determinó el porcentaje de blastocistos obtenidos.

#### 2.9.9. *Evaluación de la expresión de EGFP en embriones*

Los embriones clonados fueron expuestos bajo la luz azul usando filtros de excitación (460-498 nm) y de emisión (510 - 540 nm) específicos para la detección de la expresión de EGFP en los días 5 y 7 post-activación química.

**CAPÍTULO I**  
**RESULTADOS**

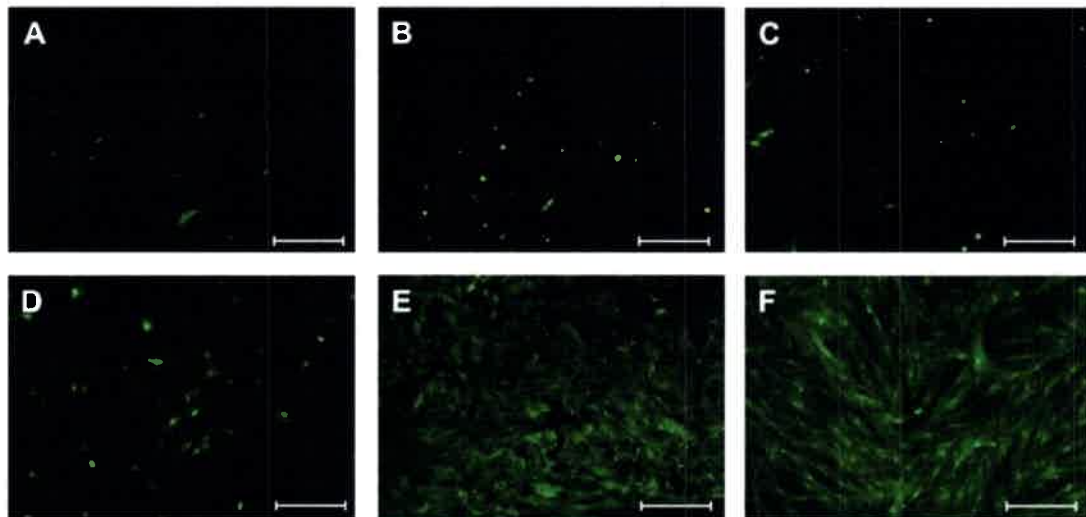


### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Actividad de los vectores pGENIE-3 en fibroblastos fetales bovinos.

##### 3.1.1. Efecto del agente JetPRIME sobre la eficiencia de transfección.

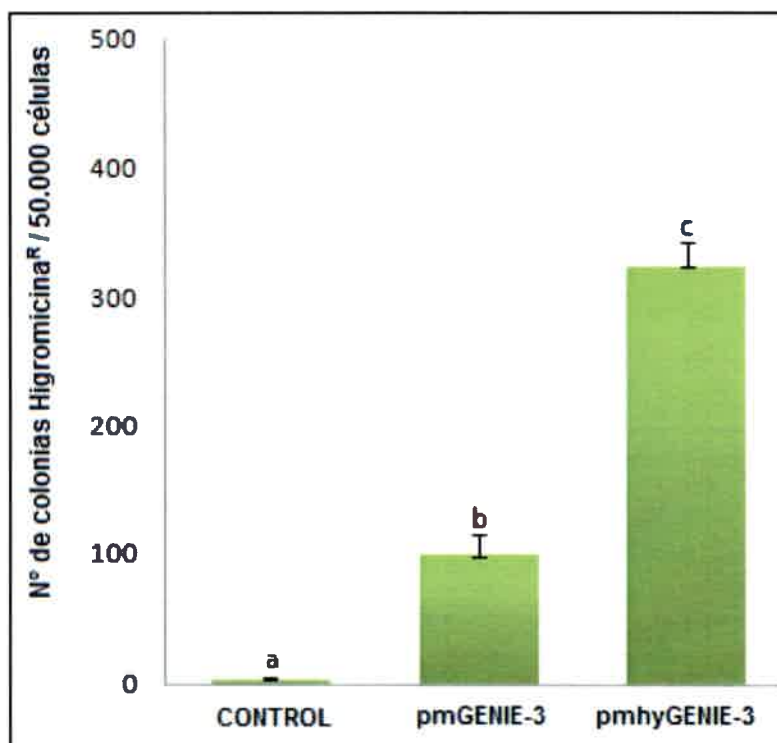
Para evaluar la actividad de transposición se transfectaron  $0,5 \times 10^5$  fibroblastos fetales bovinos (FFBs) con  $1 \mu\text{g}$  de los plásmidos *pmGENIE-3* ó *pmhyGENIE-3*. Como control negativo de los experimentos se utilizó el plásmido *pmGENIE-3/ΔpiggyBac* en el cual el gen de la transposasa se encuentra truncado y por lo tanto no produce una transposasa activa. La transfección se llevó a cabo utilizando el agente químico poliamínico comercial JetPRIME. La expresión del transgén EGFP a las 48 hs post-transfección fue similar para los plásmidos *pmGENIE-3* y *pmGENIE-3/ΔpiggyBac*, aunque se observó una mayor expresión transitoria en aquellas células transfectadas con el vector *pmhyGENIE-3* conteniendo la versión hiperactiva de la transposasa (Fig. 8 A, B y C respectivamente). A los 21 días de selección con higromicina B, se contó el número de colonias EGFP positivas resistentes al antibiótico para los distintos grupos experimentales (Fig. 8 D, E y F).



**Figura 8.** Microfotografía de fibroblastos 48 hs post-transfección (A, B y C) y luego de 21 días de selección con higromicina B (D, E y F) transfectados con los plásmidos *pmGENIE-3/ΔpiggyBac* (A y D), *pmGENIE-3* (B y E) y *pmhyGENIE-3* (C y F; Barras =  $100 \mu\text{m}$ ).

Según se observa en el gráfico de la figura 9, el número de colonias resistentes fue estadísticamente diferente entre los 3 tratamientos; en células transfectadas con el plásmido

*pmhy*GENIE-3 se registró un mayor número de colonias resistentes al antibiótico con respecto a las transfectadas con *pm*GENIE-3 y con el plásmido control.



**Figura 9.** Gráfico de la actividad de transposición de los vectores p-GENIE-3 en FFBs. La actividad de transposición se midió en función del N° de colonias EFGP<sup>+</sup> e higromicina<sup>R</sup> luego de 21 días de selección.

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis estadístico realizado sobre el número de colonias resistentes obtenido para cada tratamiento.

**Tabla 7.** Comparación del número de colonias resistentes al antibiótico utilizando los plásmidos: *pmhy*GENIE-3, *pm*GENIE-3 y *pm*GENIE-3/ $\Delta$ piggyBac.

Plásmido	Nº de colonias resistentes a higromocina B
<i>pmhy</i> GENIE-3	324±17,82 <sup>a</sup>
<i>pm</i> GENIE-3	100±16,10 <sup>b</sup>
<i>pm</i> GENIE-3/ $\Delta$ piggyBac	3,78±0,81 <sup>c</sup>

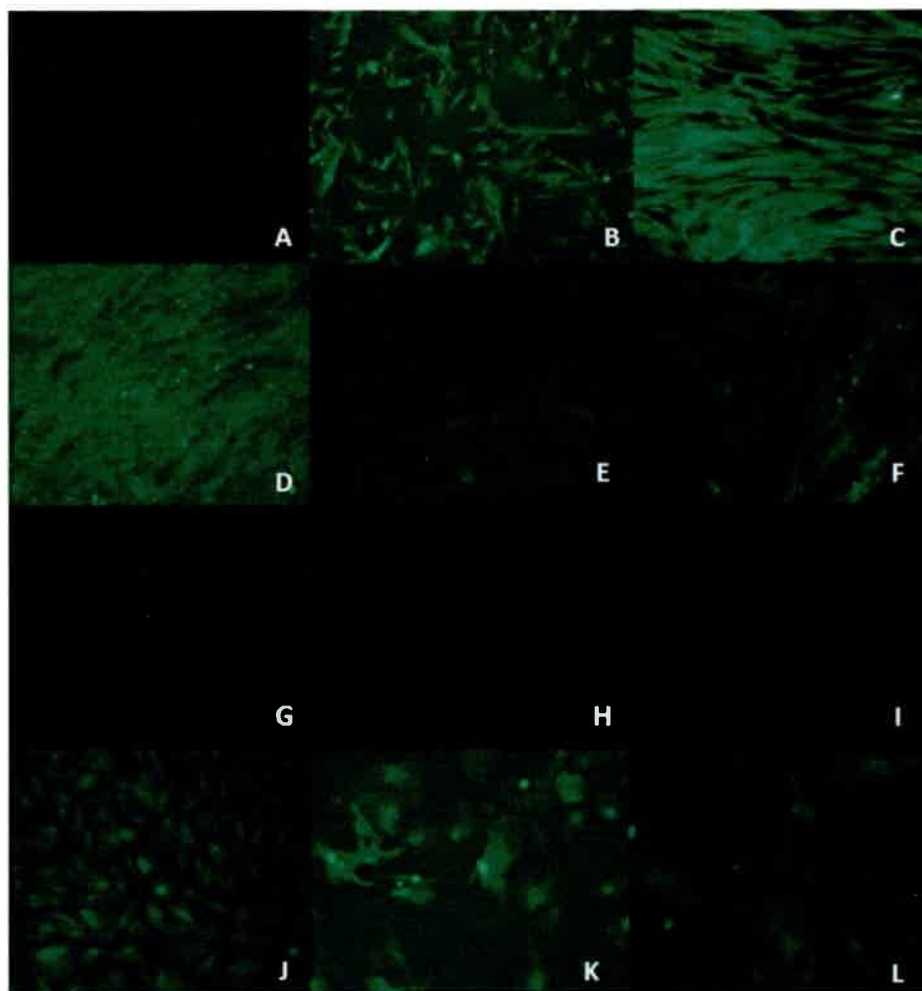
Los datos se expresaron como la media del N° de colonias resistentes a higromicina B  $\pm$  EE (n= 4-7). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Estos resultados indican que el *pmhy*GENIE-3 incrementó el número de células que incorporaron y expresan al menos un transgén 3,24 veces respecto a lo observado con el *pm*GENIE-3 y 85 veces con respecto a los niveles encontrados por incorporaciones al azar. El *pm*GENIE-3 mostró un número de colonias resistentes 26,45 veces respecto a lo registrado en el control. La eficiencia relativa para cada tratamiento, la cual surge de dividir el número de colonias higromicina<sup>R</sup> obtenidas para cada plásmido por el N° de colonias obtenidas en el control, se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Actividad relativa de transposición de los vectores *pmhy*GENIE-3 y *pm*GENIE-3.

	<i>pmhy</i> GENIE-3	<i>pm</i> GENIE-3
Eficiencia relativa	85,71	26,45

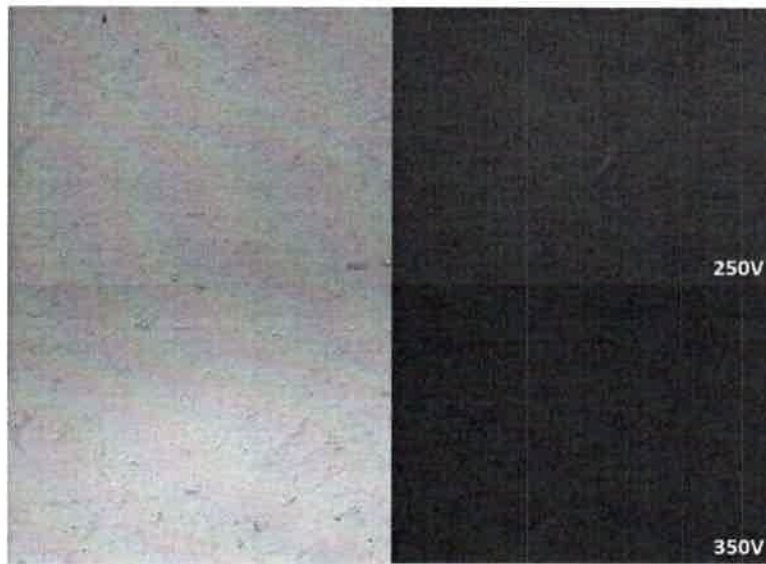
Finalizado el período de selección con el antibiótico higromicina B, se utilizaron los anillos de clonado para la obtención de líneas monoclonales transgénicas. Se obtuvieron 14 líneas monoclonales transgénicas con el *pm*GENIE-3, 8 líneas con el *pmhy*GENIE-3 y 1 línea con el *pm*GENIE-3/ $\Delta$ piggyBac (Fig.10). Cabe aclarar que sólo el 23.6% de las colonias obtenidas a partir del método de anillos de clonado pudieron ser expandidas, el resto presentó características morfológicas típicas de un estadio de senescencia probablemente causado por el prolongado tiempo de cultivo al que fueron sometidas (Fig. 10 [J-L]).



**Figura 10.** Líneas monoclonales transgénicas de FFBS transfectados con *pmhyGENIE-3* (A-C), *pmGENIE-3* (D-I), fibroblastos senescentes (J-L).

### 3.1.2. *Efecto de la electroporación sobre la eficiencia de transfección.*

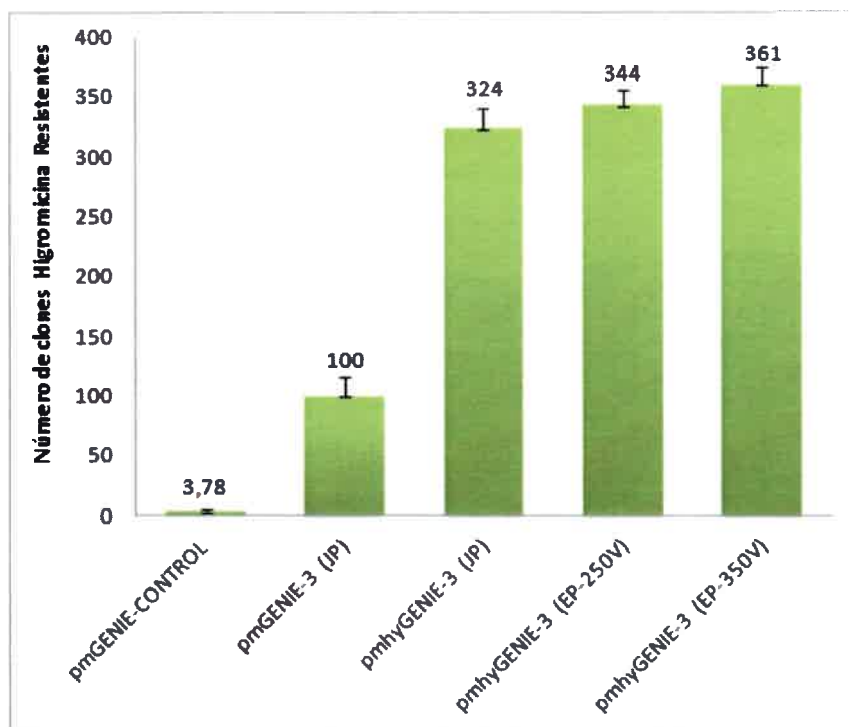
Para evaluar la eficiencia de transfección mediante electroporación, se utilizaron dos buffers de electroporación, por un lado DMEM sin antibióticos ni suero y por el otro PBS-Sucrosa 0.27M cada uno a dos voltajes: 250 y 350 V. Cuando el buffer utilizado fue DMEM no se observó fluorescencia 48 hs post-electroporación y el porcentaje de mortalidad alcanzó el 80-90% para ambos voltajes. Esto probablemente se deba al bajo efecto protector de este medio durante la aplicación del pulso eléctrico. Por el contrario, cuando se utilizó PBS-Sucrosa 0,27M se observó no sólo una mayor viabilidad de las células sino también una baja expresión transitoria para ambos voltajes (250 y 350V) (Fig. 11).



**Figura 11.** Expresión de EGFP en FFB 48 h post-electroporación en presencia del plásmido *pmhyGENIE-3* utilizando PBS-Sucrosa 0,27M.

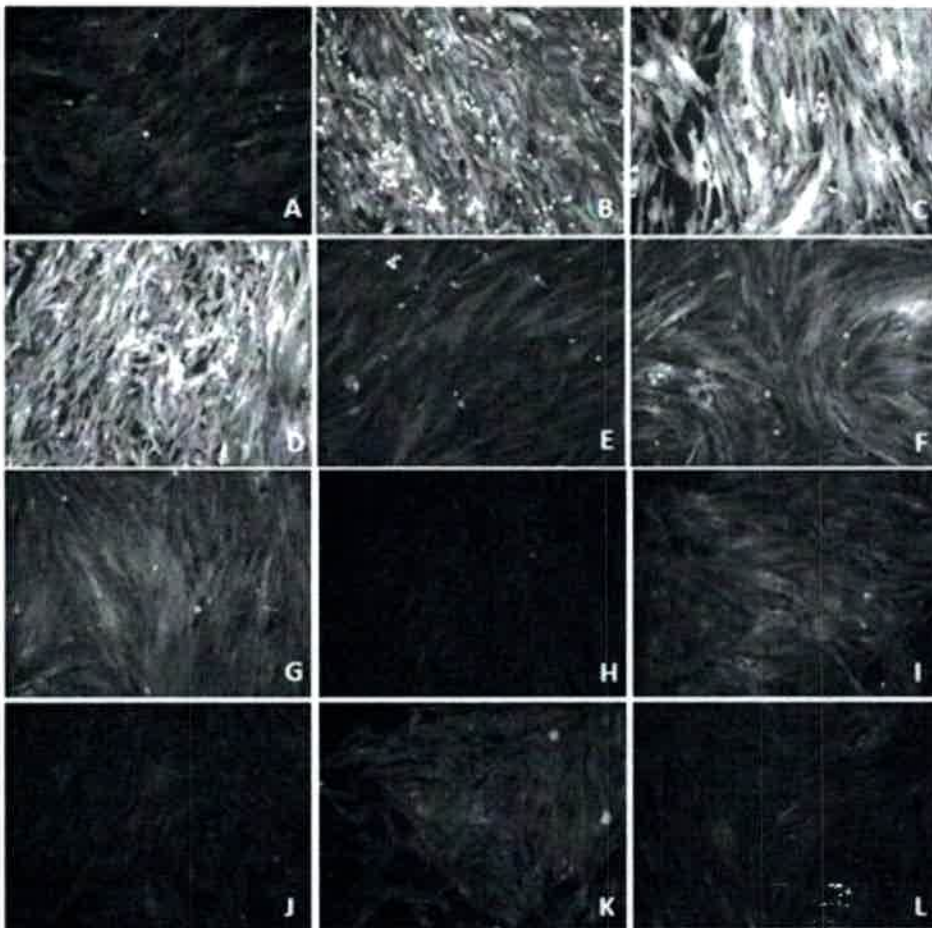
Luego de 21 días de selección con el antibiótico higromicina B, se observó la formación de un gran número de colonias EGFP<sup>+</sup> en las placas de 100 mm. El recuento de las mismas arrojó un valor promedio de 344 clones resistentes cuando el voltaje utilizado fue de 250 V y 361 cuando se empleó 350 V (Figura 12). Estos resultados fueron similares a los obtenidos previamente con el agente químico comercial JetPRIME.





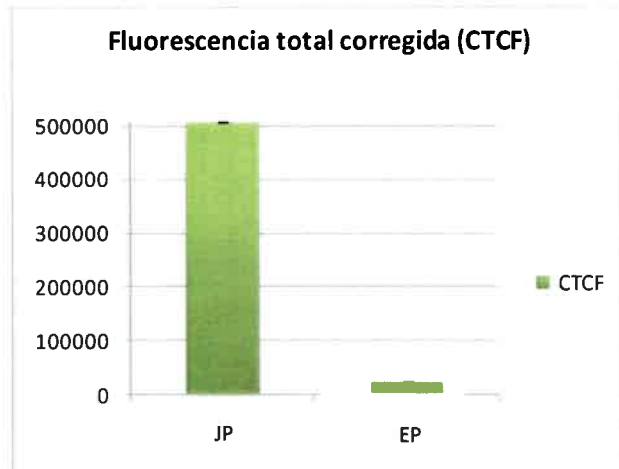
**Figura 12. Número de colonias EFGP<sup>+</sup> e higromicina<sup>R</sup> obtenidas con diferentes métodos (químico y físico) de incorporación del ADN. JP, JetPRIME. EP, Electroporación.**

Sin embargo, a pesar de la similitud en el número de clones formados con ambos métodos (químico y físico) de incorporación del plásmido, se observó una notable diferencia en relación a la intensidad de fluorescencia de las colonias obtenidas mediante el empleo de JetPRIME (Fig.13 A-F) y Electroporación (Fig. 13 G-L).



**Figura 13.** Microfotografía de colonias de FFBs luego de 14 días de selección con higromicina transfectadas con el vector *pmhyGENIE-3* empleando JetPRIME (A-F) y electroporción (G-L).

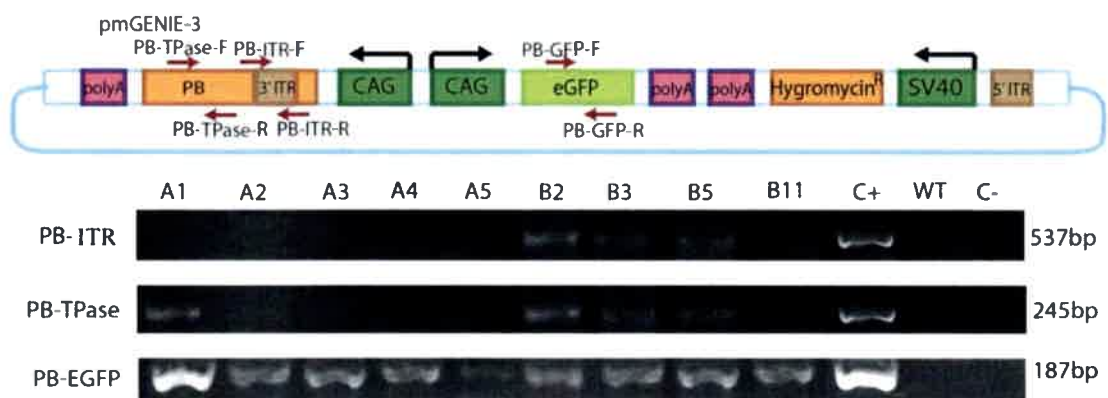
Dicha diferencia fue estimada en base al análisis de la Fluorescencia Total Corregida (CTCF). En el gráfico de la figura 14 se muestran los valores promedio de CTCF para aquellas colonias obtenidas transfectando los FFBs con JetPRIME ( $508857,2 \pm 12,7$ ) y aquellas obtenidas mediante electroporción ( $23300,98 \pm 7,8$ ). Si bien no se realizaron estudios para determinar el número de copias del transgén en estas líneas celulares, podemos sugerir, basándonos en los resultados mostrados en el apartado 3.4., que existe una relación lineal entre intensidad de fluorescencia y número de copias. Por lo tanto, estos resultados sugieren que mediante el método físico de electroporción el número de moléculas de plásmido que atraviesan la célula y se incorporan posteriormente en el genoma es menor comparado con el método químico.



**Figura 14.** Gráfico de correlación entre el método empleado para la incorporación del plásmido y la fluorescencia emitida por diferentes líneas transgénicas medida como Fluorescencia Celular Total Corregida (CTCF)  $\pm$  EE. JP, JetPRIME. EP, Electroporación.

### 3.2. Caracterización molecular del mecanismo de integración del transgén.

Para determinar si la integración del transgén se produjo al azar o mediante el fenómeno de transposición, el ADN genómico proveniente de clones derivados de diferentes experimentos de transfección con los plásmidos *pmGENIE-3* fue utilizado en experimentos de PCRs múltiples con 4 primers diferentes (Fig. 15).



**Figura 15.** Genotipificación de las líneas monoclonales transfectadas con *pmGENIE-3* (A1-A5) y con *pmhyGENIE-3* (B2-B11). C (+): *pmGENIE-3*. WT (ADN genómico bovino sin transfectar).

Los primers empleados en las reacciones de PCR se ilustran en la parte superior de la figura.

Imagen tomada de Alessio *et. al*, 2016.

Los resultados obtenidos del análisis mediante PCR que se muestran en la Tabla 8 indican que todos los clones transgénicos individuales analizados presentaron amplificación del

fragmento de 187 pb correspondiente al gen EGFP, mientras que estuvo ausente en el ADN genómico proveniente de FFBs sin transfectar. Para detectar la incorporación el plásmido entero dentro del genoma bovino, se utilizaron los primers PB-FP (FP, del inglés *full plasmid*) lo cuales amplifican un fragmento de 537pb que se extiende desde el 3'ITR del transposón hacia el esqueleto del pGENIE-3. Dicha banda fue observada en 3 de las 9 líneas transgénicas analizadas, indicando que el mecanismo de integración del transgén en las 6 líneas restantes que no mostraron amplificación para esta reacción de PCR, estuvo mediado por la enzima transposasa ya que no hubo evidencias de una incorporación al azar del plásmido entero. Para corroborar estos resultados, se observó además, que en aquellas líneas donde hubo amplificación del 3'ITR, también contenían el casete de expresión de la enzima transposasa (Tabla 9 y Figura 15) sugiriendo que en éstas líneas ocurrió al menos una integración del plásmido completo mediante un mecanismo no-transposicional dentro del genoma bovino.

**Tabla 9.** Resultados del análisis de integración basado en PCR en líneas transgénicas monoclonales.

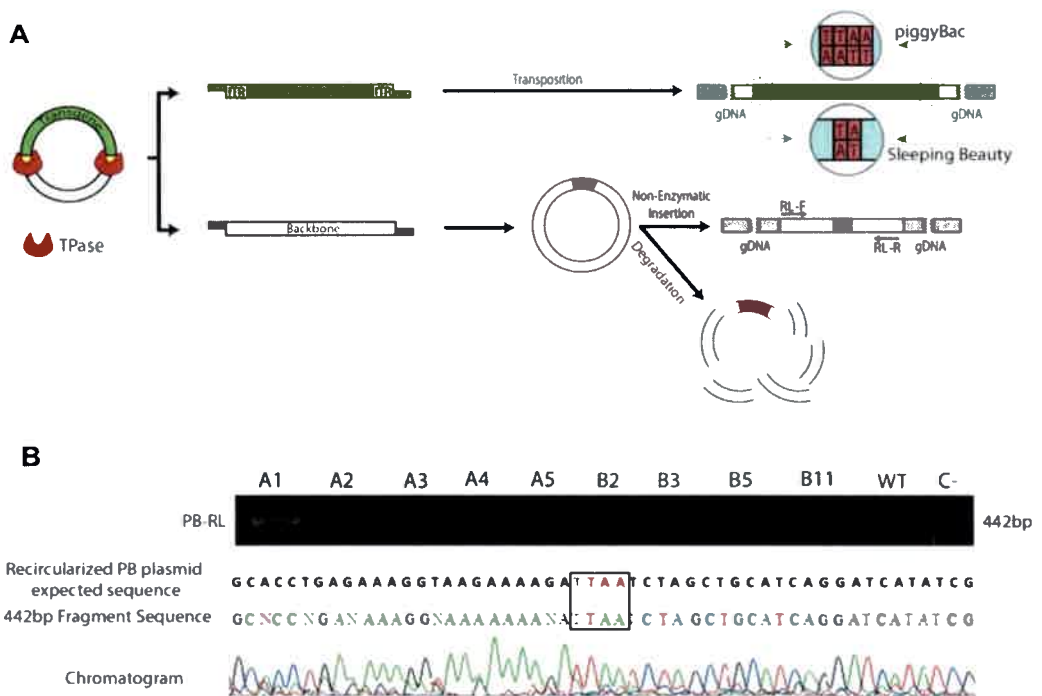
Línea Monoclonal	Vector utilizado	PCR			
		PB-EGFP (187pb)	PB-FP (537pb)	PB-TPase (245pb)	PB-RL (442pb)
A1	<i>pm</i> GENIE-3	+	-	+	+
A2	<i>pm</i> GENIE-3	+	-	-	-
A3	<i>pm</i> GENIE-3	+	-	-	-
A4	<i>pm</i> GENIE-3	+	-	-	-
A5	<i>pm</i> GENIE-3	+	-	-	-
B2	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	+	+	-
B3	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	+	+	-
B5	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	+	+	-
B11	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	-	-	-
WT	-	-	-	-	-

(+), Presencia del producto de amplificación de tamaño esperado. (-), ausencia de producto de amplificación.

Para analizar los potenciales efectos genotóxicos, se utilizaron los primers PB-RL (RL, del inglés *religated*) para la identificación de integraciones no-transposicionales del esqueleto religado del plásmido luego de la transposición. Los resultados que se resumen en la Tabla 9 revelan que sólo una de las 9 líneas modificadas con el *pm*GENIE-3 presentó al menos una incorporación al azar del esqueleto recircularizado sin evidencias de una inserción del plásmido entero. El fragmento de 442 pb que presuntamente corresponde al esqueleto recircularizado (*backbone*) fue purificado del gel de electroforesis y secuenciado para corroborar su identidad (Fig.16b).

### 3.2.1. Análisis del secuenciamiento del fragmento backbone

En la Figura 16 se muestra parte del cromatograma obtenido a partir del secuenciamiento usando el primer forward (PB-RL-F). Dicha secuencia se comparó con la secuencia teórica que se obtendría a partir de la recircularización del pGENIE-3 luego de la transposición utilizando el programa bioinformático BioEdit. El análisis de las secuencias confirma que el vector pmGENIE-3 se recircularizó luego de la escisión del transposón, lo cual queda demostrado mediante la presencia del sitio TTAA reconstituido en la ubicación esperada.



**Figura 16.** Posibles destinos del transgén y recircularización del esqueleto plasmídico luego del proceso de transposición del piggyBac y ubicación de los primers PB-RL (a). Producto de amplificación correspondiente al vector pGENIE-3 religado e insertado dentro del genoma detectado en la línea monoclonal A1. Alineamiento entre la secuencia esperada del esqueleto del plásmido y la obtenida luego del secuenciamiento del fragmento de 442 pb proveniente de A1 (b). El recuadro muestra el sitio TTAA reconstituido luego de la transposición. Imagen tomada de Alessio *et. al.*, 2016.


### 3.3. Estudio del sitio de inserción del transposón piggyBac.

Para determinar el sitio específico de integración del transposón piggybac dentro del genoma bovino se realizó una PCR inversa denominada nrLAM-PCR. El DNA genómico


proveniente de 5 líneas monoclonales transgénicas de fibroblastos fetales bovinos transfectados con el *pmGENIE-3* se utilizó como molde para la reacción de amplificación. De los 17 sitios de inserción analizados, 14 pudieron ser asignados a sus posiciones exactas dentro del genoma, 11 de esas inserciones se localizan en regiones intergénicas y 3 dentro de genes. Adicionalmente, los resultados obtenidos muestran un promedio de 2 a 3 inserciones individuales por genoma (Tabla 10). Además, se confirma que el mecanismo de incorporación del transgén se debió al fenómeno de transposición ya que los resultados del secuenciamiento demuestran la incorporación del transposón en la secuencia target TTAA y la duplicación de la misma luego de la inserción.

**Tabla 10.** Localización del sitio de incorporación del piggyBac al genoma bovino.

Cromosoma	Localización genómica	Gen	Secuencia
ch15	19428292	intergenic	cagactatctttctagggTTAACATATGAACTTGAGAGGG
chrUn_JH122283	39105	unknown	cagactatctttctagggTTAAGGGATTGAGTGAATTTG
ch21	25472450	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGACCCC ATGGACTGCAGC
chrUn_AAFC03095622	1018	unknown	cagactatctttctagggTTAAGACCCCATGGACTGCAGC
ch5	79123143	RBFOX2, intron	cagactatctttctagggTTAATCTCCTTTCAGAAAGGA
ch6	37957543	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGGAGTTTAAACAGGAATCA
ch7	105149760	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGTCAGATCCACCAGTCT
chrUn_JH121295	390708	unknown	cagactatctttctagggTTAATCTGAAGAAAAGTGAAAA
ch15	141258670	intergenic	cagactatctttctagggTTAATGTACTGACAAAGCTCCA
chX	529630	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGACAAATGTGCTCTTAAA
ch9	82826492	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGCCACAAAAGCGGGGGTC
ch26	18051846	intergenic	cagactatctttctagggTTAAAAGGCAGTTTCCGCCAT
ch2	8600480	GULP1, intron	cagactatctttctagggTTAAGATTAAGTGTGCCCATC
ch16	19235265	intergenic	cagactatctttctagggTTAAAAGATGTTGAATTAAGTT
ch27	45374270	UBE2E2, intron	cagactatctttctagggTTAAGATGAAAAATCCCCAGT
ch27	10507265	intergenic	cagactatctttctagggTTAAAAGGTAGCCAGTTGCA
ch7	49826129	intergenic	cagactatctttctagggTTAAGTGGAGGAGACTTTTTT



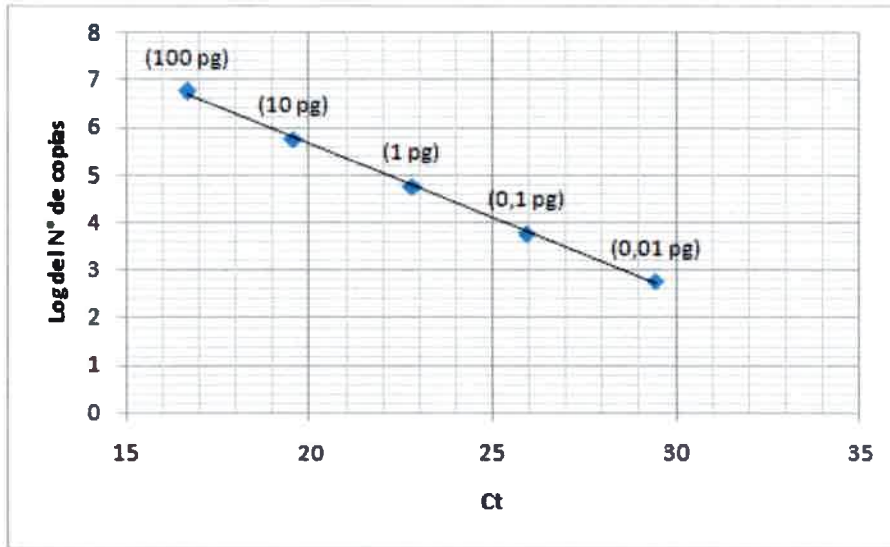
Transposon



Secuencia de ADN genómico

### 3.4. Determinación del número de copias del transgén: qPCR

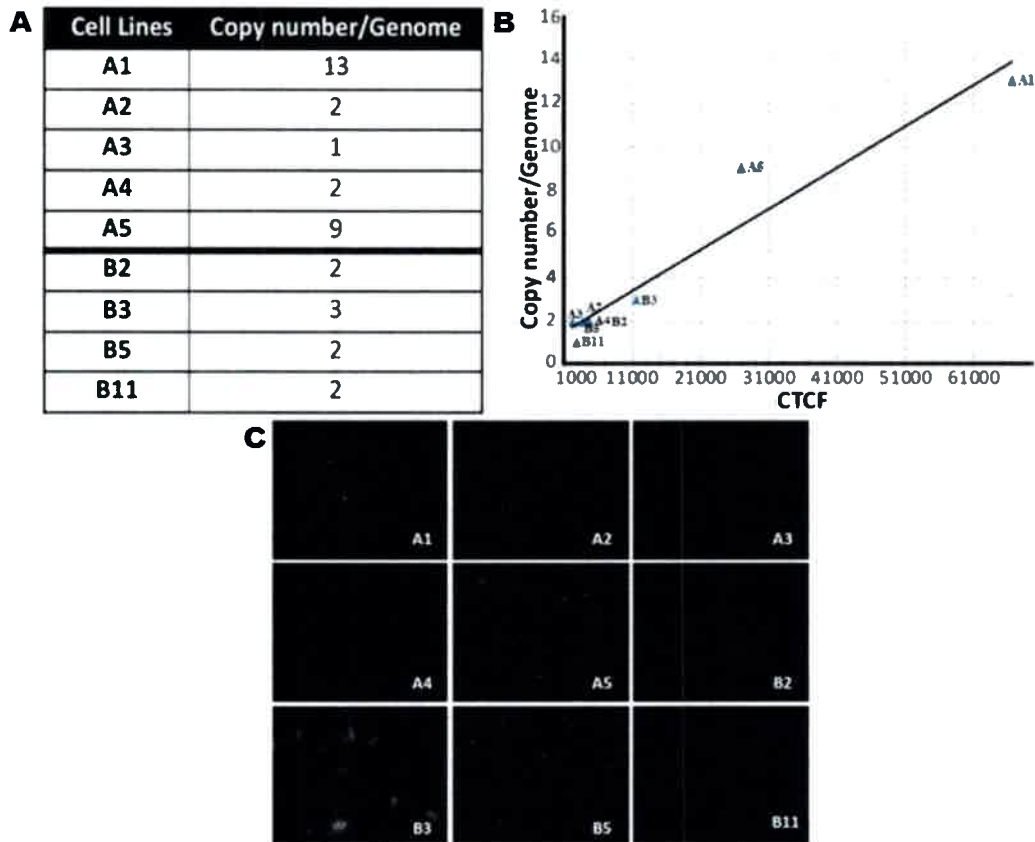
El análisis de PCR cuantitativa en tiempo real fue utilizado para evaluar el número de copias del transgén EGFP integrados en el genoma bovino. Este número fue obtenido mediante un ensayo de cuantificación absoluta empleando una curva estándar generada con diferentes concentraciones del plásmido *pmhyGENIE-3* (Figura 17).



**Figura 17. PCR cuantitativa en tiempo real.** Curva estándar utilizada para la determinación del N° de copias en los clones transgénicos.

Las variaciones en el número de copias de las líneas monoclonales transgénicas determinadas mediante qPCR se muestran en la Figura 18A, encontrándose valores dentro de un rango comprendido entre 1 y 13 copias por genoma. La mayoría de las líneas (5) presentaron alrededor de 2 copias del transgén por genoma.

Como era de esperarse, las diferentes líneas transgénicas obtenidas presentaron diferentes niveles de expresión de EGFP bajo la observación al microscopio óptico. Para cada línea celular, se calculó la fluorescencia total corregida (CTCF) con el objetivo de evidenciar que aquellas con fluorescencia más intensa presentaban en sus genomas un mayor número de eventos de inserción del transgén. Se realizó un análisis de regresión lineal que permitió demostrar que existe relación lineal entre el número de copias del transgén/genoma y la intensidad de fluorescencia detectada bajo el microscopio (CTCF) (Figura 18B y C).



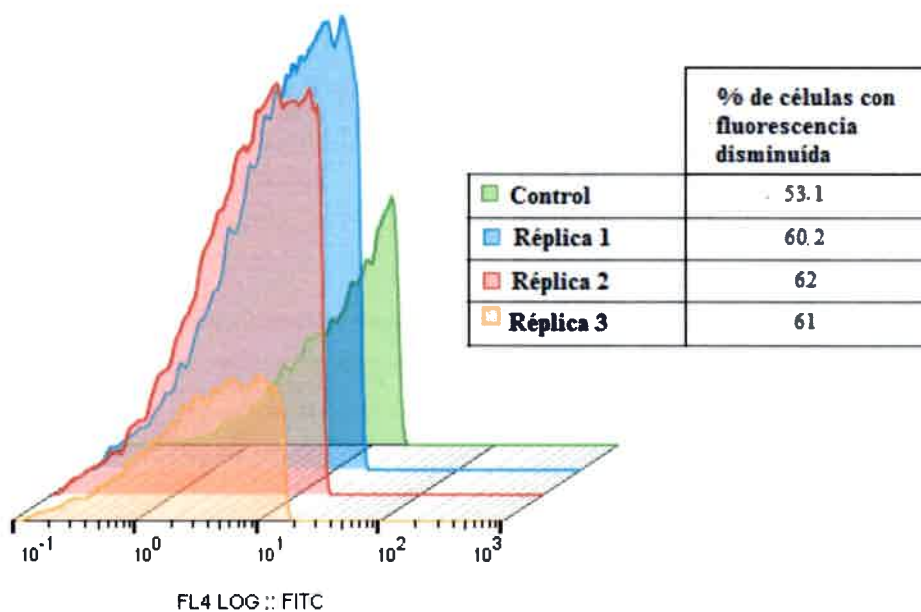
**Figura 18.** Detección de variaciones en el número de copias por qPCR (A) y su relación entre la intensidad de fluorescencia (CTCF) (B). El análisis de regresión lineal demostró una asociación entre las dos variables  $R^2 = 0.93$ ;  $p < 0,05$ ). Microfotografía de líneas celulares transgénicas utilizadas en el análisis de qPCR (C). Las líneas A1-A5 corresponden a líneas celulares transfectadas con el vector *pmGENIE-3*, mientras que B2, B3, B5 y B11 fueron transfectadas con *pmhyGENIE-3*. Imagen tomada de Alessio *et. al*, 2016.

### 3.5. Experimento de remoción del transposón piggyBac

Se descongelaron 5 líneas transgénicas monoclonales de FFBS transfectadas con los vectores *pGENIE-3* (designadas previamente como: A1, A2, B2, B5 y B11), de las cuales sólo una de ellas, la línea A1, pudo ser empleada para el ensayo de remoción del transposón debido al rápido estado de senescencia alcanzado por las líneas restantes. Las células pertenecientes a la línea A1 expresando EGFP fueron tripsinizadas y sembradas por triplicado originando tres réplicas que fueron analizadas independientemente. Cada réplica fue transfectada con el plásmido *pmPBase* conteniendo la secuencia de una transposasa activa y como control del experimento se utilizaron células de la línea A1 sin transfectar, es decir sin someterlas a una re-exposición de la transposasa. Se determinó para cada



muestra la intensidad media de fluorescencia y los resultados se analizaron teniendo en cuenta el 50% de la población celular con una fluorescencia menor a la media (Gráfico 5), ya que se esperaba que en las células transfectadas con el vector *pmPB*ase la intensidad de fluorescencia se viera disminuida. Empleando el programa FlowJo fue posible determinar el porcentaje de células de cada réplica que presentaban una fluorescencia menor a la fluorescencia media del control (fluorescencia disminuida). En la figura 19 se observa que la intensidad de fluorescencia media de cada una de las réplicas fue menor que la del control. Además, el porcentaje de células con fluorescencia disminuida fue mayor en aquellas células expuestas transitoriamente a la transposasa, arrojando valores de 60.2, 62 y 61% para las réplicas 1, 2 y 3 respectivamente aumentando aproximadamente un 10% con respecto al control.



**Figura 19.** Diagrama de puntos correspondiente a la intensidad de fluorescencia en el control (línea A1 sin exposición al *pmPB*ase) y en la línea A1 transfectada con el vector que expresa la transposasa analizada por triplicado (Réplicas 1-3).

3.6. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante Transferencia Nuclear de células somáticas.

Para determinar la habilidad de las células modificadas con el transposón piggyBac de ser reprogramadas y soportar el desarrollo embrionario temprano, se llevó a cabo la TNCS utilizando líneas transgénicas policlonales modificadas con los vectores *pmhyGENIE-3* y *pmGENIE-3*.

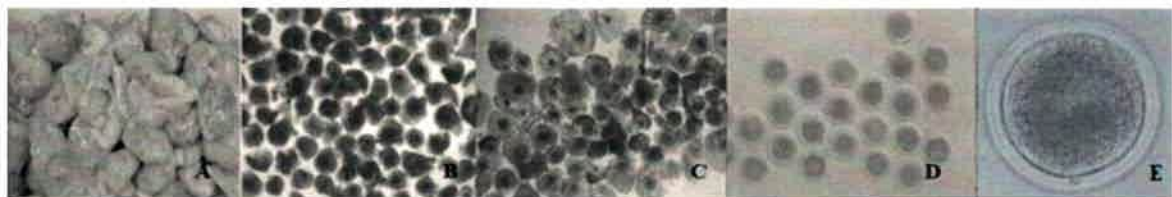
3.6.1. *Obtención de ovocitos y Maduración In-vitro*

Durante este trabajo se probaron dos procedimientos para la obtención de ovocitos, obteniéndose una tasa de recuperación promedio de 4,5 y 2 ovocitos/ovario procesado utilizando el método de *slincing* y aspiración con jeringa respectivamente. A pesar de que el método de *slincing* resultó ser más rápido y se obtuvieron grandes cantidades de ovocitos, la calidad de los mismos fue mejor en aquellos colectados por el método de aspiración por lo que se decidió continuar el trabajo realizando este último método.

Los ovocitos que presentaron un citoplasma homogéneo y estaban recubiertos por al menos tres capas de células del cúmulus fueron seleccionados y puestos a madurar en gotas de 100 µl (15-20 ovocitos/gota) en medio de maduración en la estufa a 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, en aire y máxima humedad por 18-22 h (Fig. 20). Se evaluó el porcentaje de maduración nuclear determinando la presencia del primer cuerpo polar (Tabla 11). En promedio el porcentaje de maduración fue de 74,3%.

**Tabla 11.** Colección y maduración in-vitro de ovocitos.

Ovarios	COCs	Ovocitos con 1er CP	% de Maduración Nuclear
78	210	146	70%
64	234	184	78,6%



**Figura 20.** Ovarios provenientes del matadero (A). Complejos Cúmulus-Ovocito (B). Ovocitos madurados in-vitro (C), Ovocitos desnudados (D) y Ovocito maduro (E).

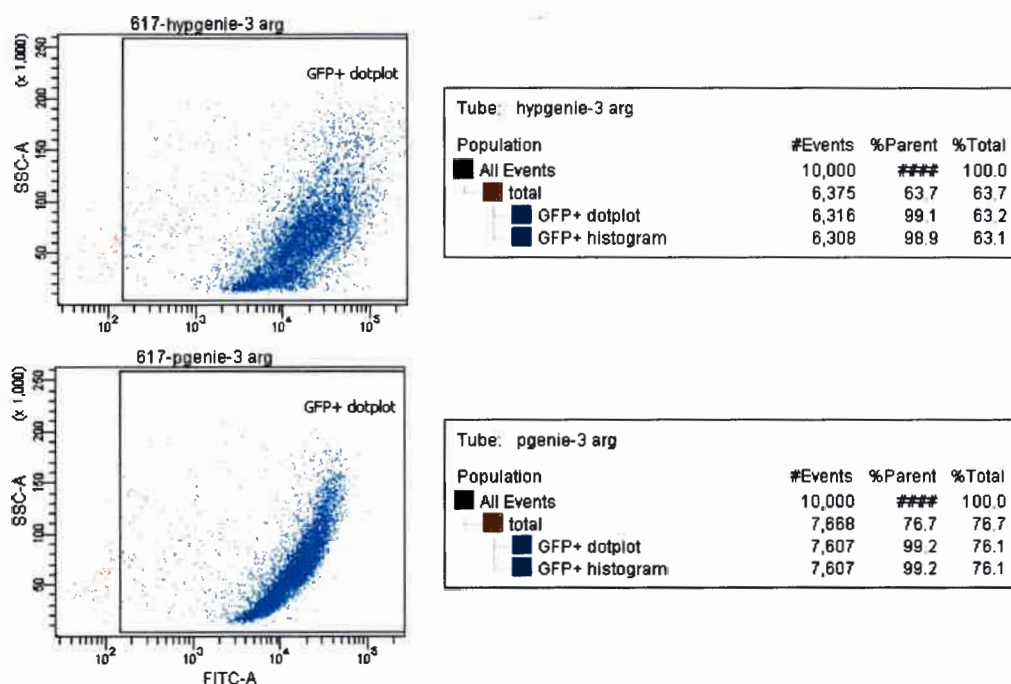
### 3.6.2. Transferencia Nuclear de células somáticas: Método convencional

Luego de 18 h de maduración in-vitro, los COCs fueron desnudados utilizando la enzima hialuronidasa (0,2% en PBS). Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar y fueron enucleados según el procedimiento descrito en la sección 2.9.3. de Materiales y Métodos (Fig. 21).



**Figura 21.** Procedimiento de enucleación y transferencia celular. Ovocito sujetado para su enucleación (A), enucleación (B) y transferencia celular (C).

Finalizada la enucleación se procedió a la colocación de la célula en el espacio perivitelino. Las células utilizadas como donantes de núcleos fueron seleccionadas mediante FACS. Los resultados mostraron un 99% de células GFP positivas para ambos grupos (*pmhyGENIE-3* y *pmGENIE-3*) (Fig. 22).



**Figura 22.** Resultados del análisis mediante FACS de las líneas policlonales transfectadas con *pmhyGENIE-3* (superior) y *pmGENIE-3* (inferior).

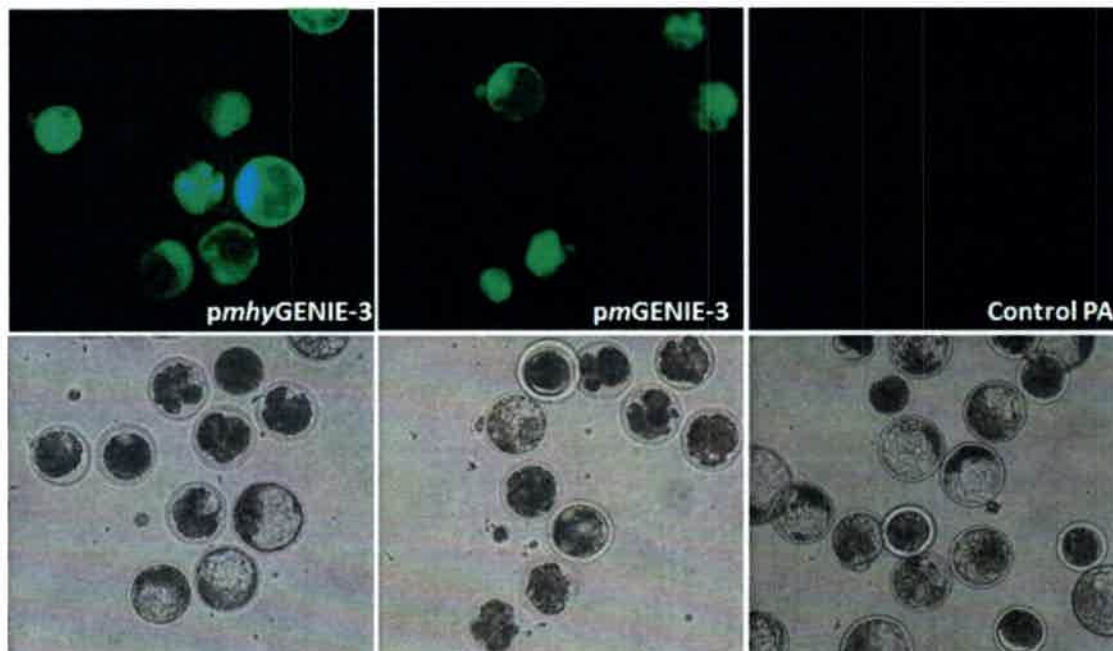
Como se muestra en la Tabla 12 correspondiente a la eficiencia global de la técnica de TNCS, el porcentaje de enucleación y transferencia nuclear realizado de manera exitosa fue de aproximadamente 80% para ambos grupos. Luego de la reprogramación de los presuntos embriones se determinó que el porcentaje de pares ovocito-fibroblasto fusionados de manera exitosa fue de 45-60%.

**Tabla 12.** Eficiencia en la producción de embriones clonados mediante TNCS.

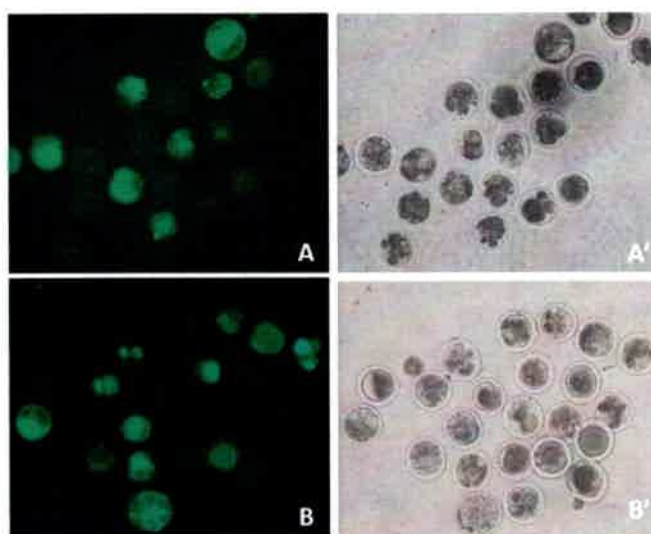
Experimento	MII*	Enucleación (%)	TN** (%)	Fusionados (%)	Clivaje (%)	Blastocistos (%)
<i>pm</i> GENIE-3	58	45 (77.6)	45 (100)	26 (44,8)	26(100)	4(15.4)
<i>pmhy</i> GENIE-3	58	47 (81)	47 (100)	36 (62)	33(91.66)	9(25)
PA***	30	-	-	-	28(93.3)	19(63.3)

\*MII: Ovocitos en metafase II. \*\*TN: Transferencia nuclear. \*\*\*PA: Partenogénesis.

Se obtuvieron un total de 13 blastocistos al día 7 post-TNCS, 4 pertenecían al grupo *pm*GENIE-3 y 9 al grupo *pmhy*GENIE-3 (Fig. 23 y 24).



**Figura 23.** Blastocistos día 7 obtenidos a partir de FFB transfectados con *pm*GENIE-3 (A) y con *pmhy*GENIE-3 (B). Blastocistos obtenidos mediante activación partenogenética (CONTROL) (C).



**Figura 24.** Blastocistos y mórulas EGFP<sup>+</sup> día 8 post TNCS obtenidos a partir de *pmGENIE-3* (A) y *pmhyGENIE-3* (B).

### 3.6.2.1. Transferencia embrionaria y obtención de fetos transgénicos

Para las transferencias embrionarias se utilizaron 10 hembras receptoras sincronizadas utilizando el protocolo descrito en la sección 2.9.6 de Materiales y Métodos. Se transfirieron un total de 13 blastocistos expandidos entre ambos grupos (Tabla 13).

**Tabla 13.** Transferencia embrionaria de blastocistos transgénicos a hembras receptoras.

Receptora	Ovario con CL	Grupo	N° de blastocistos/pajuela
#403	Izquierdo	<i>pmGENIE-3</i>	2
#406	Derecho	<i>pmGENIE-3</i>	2
#407	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	2
#410	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#411	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#408	Izquierdo	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#404	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#416	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#405	Izquierdo	<i>hypmGENIE-3</i>	1
#413	Derecho	<i>hypmGENIE-3</i>	1

A los 27 días post-transferencia nuclear se llevó a cabo el diagnóstico de preñez mediante ultrasonografía. Se obtuvieron dos preñeces (#407 y #416), ambas provenientes de blastocistos transgénicos con el plásmido *pmhyGENIE-3* (Fig. 25 y Tabla 14). Fue posible observar macroscópicamente la expresión de EGFP en ambos fetos y en las membranas extraembrionarias (Fig. 26 y 27).

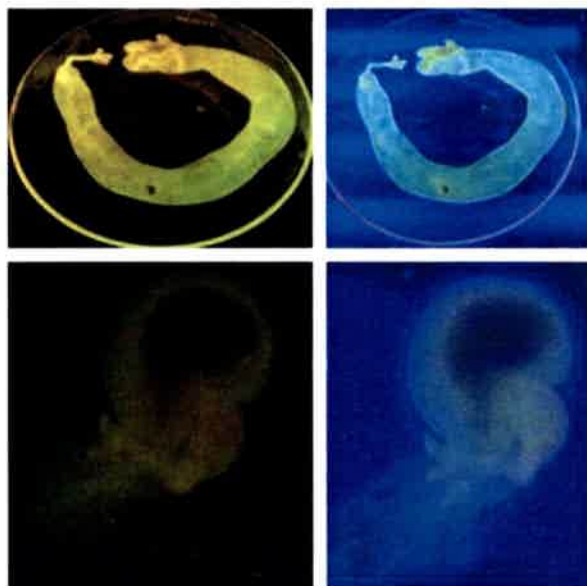


**Figura 25.** Fetos recuperados de 37 (A) y 40 días de gestación (B).

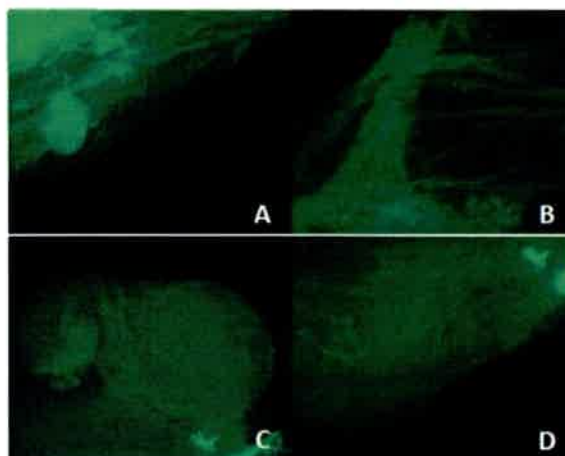
**Tabla 14.** Transferencia embrionaria y recuperación de fetos utilizando dos líneas transgénicas modificadas con el transposón piggyBac.

Grupo Experimental	ET*	Nº de receptoras/ preñeces	Nº de fetos recuperados (Día 30)	Nº de fetos Tg**	Nº de fetos Tg/ET (%)	Eficiencia de Clonado
<i>pmGENIE-3</i>	4	2/0	0	-	0(0)	-
<i>pmhyGENIE-3</i>	9	8/2	2	2	2/9(22.22)	5,55%

\*ET: Embriones transferidos. \*\*Tg: transgénicos



**Figura 26.** Expresión macroscópica de EGFP del feto de 40 días observados bajo luz UV.

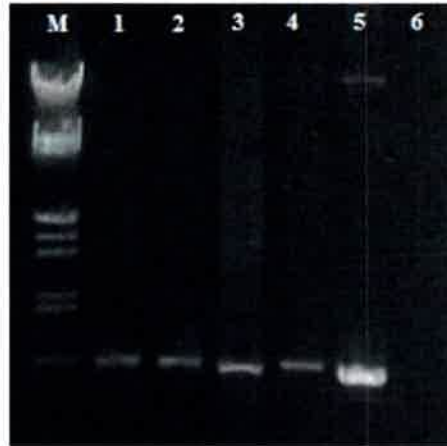


**Figura 27.** Membranas embrionarias expresando EGFP. Corioalantoides (A-B) y amnios (C-D).

No fue posible establecer un cultivo celular a partir de los fetos recuperados debido a que presentaban evidencias de un cese en el desarrollo probablemente debido a fallas durante el proceso de reprogramación celular.

### 3.6.2.2. Caracterización molecular de los fetos transgénicos obtenidos mediante TNCS

Los análisis moleculares mediante PCR confirmaron la presencia del transgén tanto en el ADN genómico proveniente de los dos fetos recuperados como así también en el proveniente del corioalantoides (Fig. 28).



**Figura 28.** Amplificación por PCR del fragmento de 187 pb correspondiente a EGFP. Feto de 37 días de gestación (1) y su membrana corioalantoidea asociada (2). Feto de 40 días (3) y su membrana corioalantoidea asociada (4). Control positivo (5), control negativo (6) y marcador de peso molecular (M).

Los estudios de integración del transposón en los fetos transgénicos evidenciaron la presencia en ambos de al menos una incorporación al azar, no-transposicional del transgén en el genoma (Tabla 15). Estos resultados no indican que no se ha producido transposición, sino que existen evidencias de que además del mecanismo facilitado por la enzima transposasa, se han producido eventos de incorporación al azar del transgén.

**Tabla 15.** Resultados del análisis de integración basado en PCR en los fetos transgénicos generados mediante TNCS.

Feto Transgénico	Vector utilizado	PCR			
		PB-EGFP (187pb)	PB-FP (537pb)	PB-PTase (245pb)	PB-RL (442pb)
F1	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	+	+	-
F2	<i>pmhy</i> GENIE-3	+	+	+	-

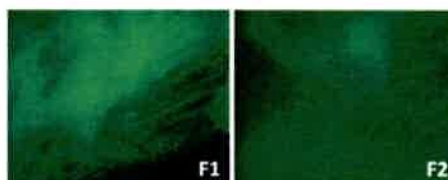
(+), Presencia del producto de amplificación de tamaño esperado. (-), ausencia del producto de amplificación.

También se determinó el número de copias en los fetos transgénicos, encontrándose 4 copias del transgén por genoma en el Feto 1 (F1) y 6 en el Feto 2 (F2) (Tabla 16).



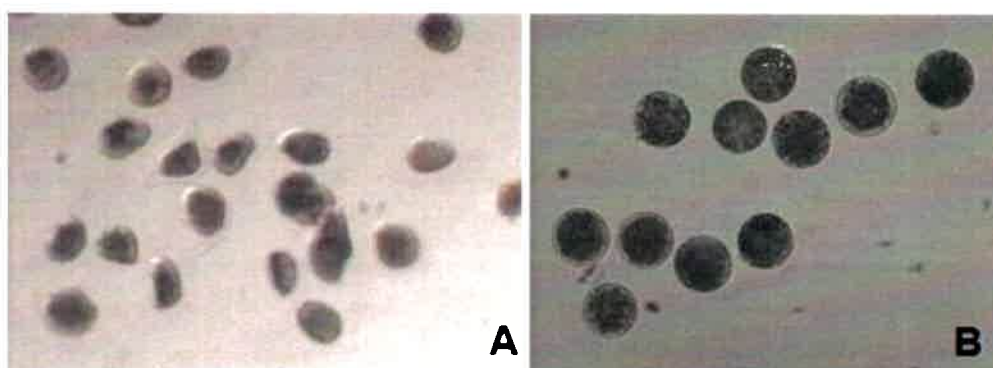
**Tabla 16.** Resultados del análisis de número de copias mediante qPCR en los fetos transgénicos obtenidos mediante clonado por TNCS.

Feto transgénico	Nº de copias/genoma
F1	4
F2	6



### 3.6.3. Producción de embriones bovinos transgénicos mediante Transferencia Nuclear de células somática Zona-Free

Los ovocitos fueron procesados según se describe en la sección 2.9.1 de Materiales y Métodos. Luego de 18 h de maduración in-vitro, los COCs fueron desnudados utilizando la enzima hialuronidasa (0,5 mg/ml de HEPES-TALP). Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar y se los sometió a la acción de la enzima pronasa (2mg/ml de HEPES-TALP) para remover la zona pelúcida (Fig. 29).



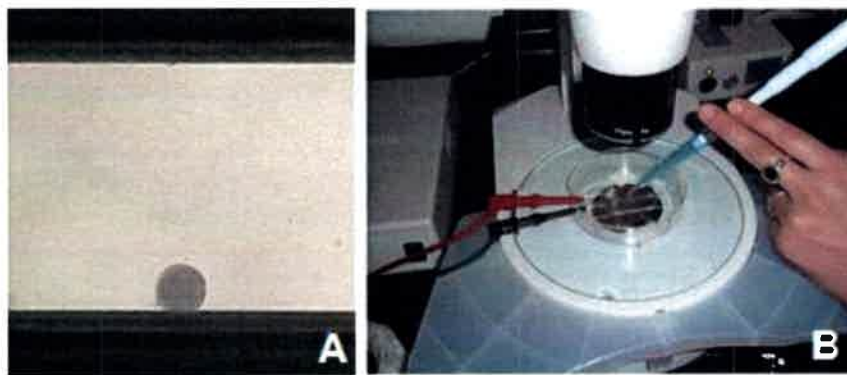
**Figura 29.** Degradación de la zona pelúcida (A) y ovocitos sin zona pelúcida, luego del tratamiento con pronasa (B).

Los ovocitos sin zona pelúcida fueron enucleados según el procedimiento descrito en la sección 2.9.8 de Materiales y Métodos (Fig. 30).



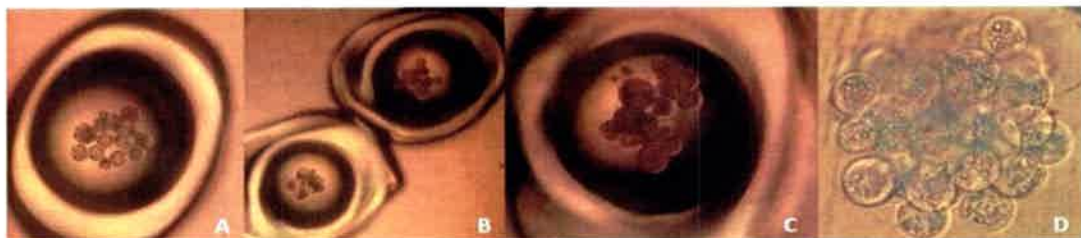
**Figura 30.** Metafase de un ovocito teñido con Hoetsch 33342 (A) y Enucleación zona-free (B y C).

Luego de la enucleación, se realizó la transferencia nuclear utilizando PHA y finalmente fueron colocados en el medio de fusión sobre la Cámara de Fusión BTX para recibir el pulso eléctrico (Fig. 31).



**Figura 31.** Fusión de los pares ovocito-célula somática ubicada entre electrodos (A) en una cámara de Fusión BTX (B).

Para el cultivo embrionario fue necesario utilizar el sistema *Well of the Well* (WOWs) para cultivar a los embriones de manera individual (Fig. 32).



**Figura 32.** Cultivo en WOWs (A-C). Embrión en estadio de mórula generado por transferencia nuclear de células somáticas *zona free* (D).

Como se muestra en la Tabla 17 correspondiente a la eficiencia global de la técnica de TNCS, el porcentaje de clivaje llegó a un 87% para el grupo piggyBac. Luego de la

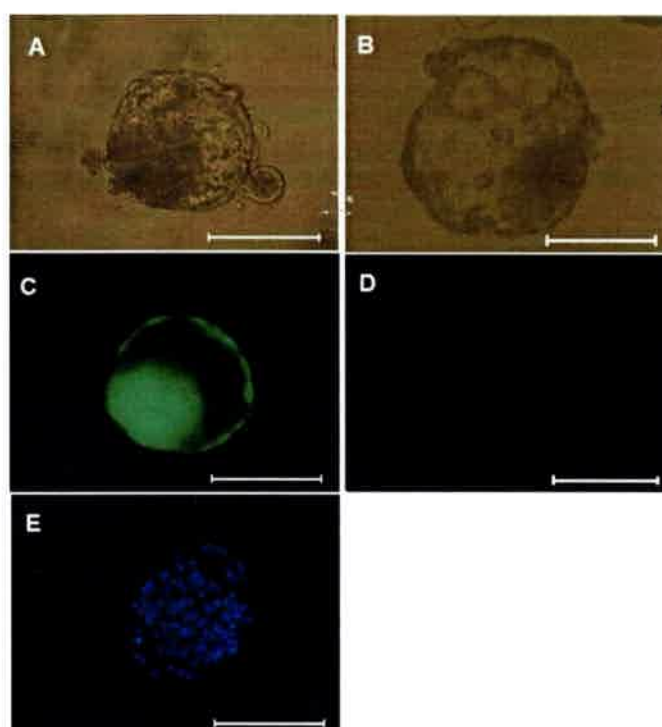
reprogramación de los presuntos embriones se observó un desarrollo hasta el estadio de mórula de 34,6% a día 5 post-TN y un total de 41 blastocistos (33%) a día 7, 23 de los cuales (56%) mostraron una expresión homogénea de EGFP (Fig. 33B).

**Tabla 17.** Eficiencia en la producción de embriones clonados mediante TNCS zona-free.

Tratamiento	N	Clivaje (%)	Mórula (%)	Blastocistos (%)	Blastocistos Tg* (%)
piggyBac	124	108(87.0)	43(34.6)	41(33.0)	23(56.0)
PA**	126	122 (96.8)	76(60.3)	67(53.1)	-

\*Tg: Transgénicos. \*\*PA: Control Partenogenético.

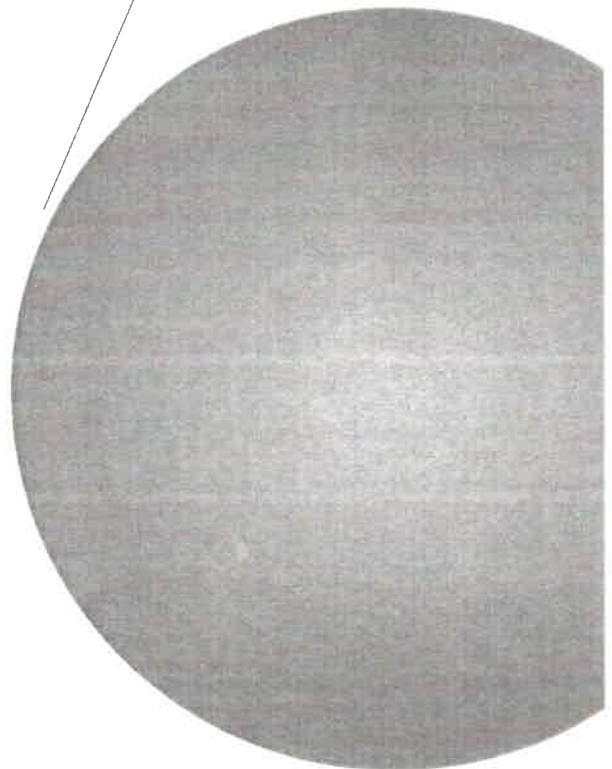
Los blastocistos que expresaron EGFP fueron vitrificados, uno de ellos se descongeló para evaluar su capacidad de reexpansión, presentando un número aproximado de 99 células (Fig. 33C).



**Figura 33.** Blastocisto a día 7 de cultivo *in vitro* obtenido a partir de FFB transfectados con el plásmido *pmhyGENIE-3* (A) expresando EGFP (C). Blastocisto transgénico re-expandido luego de un proceso de vitrificación/descongelado y teñido con Hoetsch para determinar el número de células (E) Control partenogenético (B y D). Imagen tomada de Alessio *et. al*, 2016.

# **CAPÍTULO I**

## **DISCUSIÓN**



#### 4. DISCUSIÓN

La transferencia génica mediada por transposones representa una de las tecnologías de transgénesis activa más eficientes, la cual permite a través de un mecanismo enzimático inducir modificaciones genéticas de manera más precisa que las técnicas convencionales donde el transgén es incorporado al azar en sitios donde se producen rupturas espontáneas en la doble hebra del ADN (Bosch *et. al.*, 2015). Durante este trabajo se demostró que el sistema de transgénesis activa basado en el transposón *piggyBac* fue capaz de modificar eficientemente el genoma de células bovinas en cultivo y que dichas células fueron utilizadas con éxito como donantes de núcleos en la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), dando lugar al desarrollo de blastocitos morfológicamente normales.

La efectividad de la transposasa *piggyBac* y *Sleeping Beauty* en células y embriones ha sido demostrada en diferentes especies domésticas (Li *et. al.*, 2014; Liu *et. al.*, 2013; Park y Han, 2012). Se reportaron nacimientos de cerdos transgénicos cuyos genes reporteros fueron introducidos mediante transposición ya sea en células en cultivo que fueron luego utilizadas para TNCS (Carlson *et. al.*, 2011 y Wu *et. al.*, 2013) como así también mediante la microinyección de cigotos (Garrels *et. al.*, 2011 y Li *et. al.*, 2014). A pesar de que se demostraron altas tasas de transgénesis en células de rumiantes (Alessio *et. al.*, 2014; Bai *et. al.*, 2012; Hu *et. al.*, 2011; Jiang *et. al.*, 2011) y cigotos (Garrels *et. al.*, 2016 y Garrels *et. al.*, 2015), la transgénesis mediada por el transposón *piggyBac* en embriones y células de la especie bovina no ha sido rigurosamente caracterizada. Esto se debe por un lado a que se trata de una especie monotoca con un largo período gestacional (alrededor de 280 días) y por otro a la baja eficiencia de las técnicas tanto de microinyección como de TNCS.

En concordancia con lo expuesto por Urschitz *et. al.*, 2010, se demostró en este estudio que el uso de vectores *piggyBac* promueven un incremento en el número de células que incorporaron el transgén en su genoma. Además cuando los fibroblastos fetales bovinos (FFBs) se transfectaron con el constructo *pmhyGENIE-3* que contiene una versión hiperactiva de la transposasa PB (Marh *et. al.*, 2012), se observó que el número de colonias resistentes al antibiótico fue 3 veces mayor al observado con la transposasa convencional y 85 veces por encima del control. Bajo nuestras condiciones experimentales el constructo *pmhyGENIE-3* mostró una mayor actividad en cultivos primarios de fibroblastos fetales para mediar la inserción al genoma de transgenes flanqueados por los ITRs. Fue posible calcular una eficiencia de integración transitoria del transgén de aproximadamente 3% y una eficiencia de integración estable de 21,6%. Si bien otros investigadores han llevado a

cabo estudios demostrando que la versión hiperactiva de la transposasa PB incrementó la actividad transposicional en células humanas y en experimentos in vivo en ratones en comparación con la variante hiperactiva del Sleeping Beauty (SB100X) (Doherty *et. al*, 2012), no podemos asegurar que el aumento en el número de colonias resistentes al antibiótico se debió únicamente a un incremento de la actividad de transposición. Especialmente teniendo en cuenta que en la mayoría de las líneas transgénicas obtenidas con el *pmhy*GENIE-3 se detectaron secuencias flanqueantes del transposón (Fig. 15) lo cual podría indicar que dicho plásmido presenta una mayor estabilidad como episoma que el *pm*GENIE-3 o bien que se integra al genoma al azar con una mayor frecuencia.

Cabe aclarar que si bien nuestros experimentos fueron realizados utilizando el sistema *helper-independent*, hay trabajos que muestran una elevada eficiencia de transgénesis en líneas celulares y cultivos primarios de fibroblastos porcinos transfectados con el sistema de dos componentes (Clark *et. al*, 2007 y Wu *et. al*, 2013).

La elevada eficiencia de la transposasa PB para mediar la transferencia génica en bovinos fue mayor que la reportada en cerdos (Wu *et. al*, 2013) y ovejas (Hu *et. al*, 2011). Esto reflejaría características o condiciones específicas de especie que favorecerían el mecanismo de transposición, como la presencia o ausencia de cofactores celulares que afectan la funcionalidad de la transposasa o la habilidad de las enzimas para reparar el ADN entre otros factores.

A través del análisis de integración mediante PCR fue posible detectar la integración no-enzimática del plásmido entero dentro del genoma bovino en 3 de las 9 líneas transgénicas analizadas, como así también en ambos fetos. También encontramos evidencia que indicaría la incorporación no-transposicional del esqueleto del plásmido religado, el cual se forma luego del proceso de transposición (Saha *et. al*, 2015; Urschitz *et. al*, 2010). Este fenómeno ocurrió en una única línea celular sugiriendo que además de la degradación (Wang *et. al*, 2009), también puede ocurrir, aunque de manera poco frecuente, la integración del esqueleto plasmídico dentro del genoma. Estos resultados contrastan con los niveles relativamente altos de integración del esqueleto plasmídico cuando se empleó el sistema piggyBac para modificar genéticamente células HEK-293 (del inglés, *human embryonic kidney*) reportados por Saha *et. al*, 2015. A pesar de ello, nuestro estudio de caracterización genómica presenta ciertas limitaciones, ya que no comprueba una integración genómica, sino la presencia de un producto de PCR a partir de ADN genómico. Por lo tanto, no podemos distinguir si dicho producto corresponde a una integración del transposón o al esqueleto plasmídico, ya que éste último puede persistir dentro de las

células por largos períodos de tiempo y podría haber sido co-purificado con el ADN genómico a partir del cual se hicieron las determinaciones.

Por otro lado, pesar de que la integración de la transposasa puede causar inestabilidad genómica debido a la expresión a largo plazo de la enzima y la consecuente posibilidad de removilización del transposón, la integración del esqueleto del pGENIE-3 inactiva el gen de la transposasa, reduciendo los efectos genotóxicos (Urschitz *et. al*, 2010).

Nuestros reportes sobre nrLAM-PCR demostraron que las integraciones del transgén al genoma bovino se correspondían con eventos de transposición mediados por la PB transposasa. Todas las integraciones genómicas presentaban en uno de sus extremos el tetranucleótido TTAA el cual queda reconstituido luego de la transposición, seguido de secuencias genómicas (Mitra *et. al*, 2008). El mecanismo de transposición asegura la incorporación de copias únicas del transgén evitando la formación de concatémeros y reduciendo considerablemente los problemas epigenéticos como silenciamiento y expresión alterada del transgén que constituyen las principales limitaciones de los métodos transgénicos basados en vectores virales (Ellis *et. al*, 2005). Nuestros resultados indicaron que 11 de las inserciones se localizan en regiones intergénicas y 3 dentro de genes, a pesar de ello, el limitado número de sitios de integración analizados (van Luenen *et. al*, 1994) y asignados a lugares específicos en el genoma bovino no nos permite hacer inferencias concretas sobre las preferencias de la PB transposasa para incorporar el transgén en localizaciones particulares dentro del genoma. Recientemente, estudios acerca de la integración del transgén y su efecto sobre la estabilidad genómica utilizando NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*) en bovinos transgénicos muestran, en concordancia con nuestros resultados, que la enzima transposasa presenta preferencias de integración por regiones intrónicas consideradas de bajo riesgo y aun cuando las integraciones tuvieron lugar dentro de exones, su expresión no se vio afectada (Yum *et. al*, 2016). Estudios llevados a cabo analizando un mayor número de inserciones (575) mediadas por la transposasa en el genoma humano, mostraron que la piggyBac transposasa, a diferencia de la transposasa Sleeping Beauty (SB) que presenta perfiles de incorporación al azar, exhibe una fuerte tendencia de incorporar el transposón en regiones transcripcionalmente activas o cerca de ellas (Wilson *et. al*, 2007). Si bien las integraciones intragénicas supondrían una expresión más confiable del transgén, también podrían provocar daños en el genoma huésped.

Hasta el momento, la principal dificultad del uso del sistema piggyBac es la integración al azar del transgén, para superar esta limitación los investigadores han trabajado en el desarrollo de una transposasa quimérica fusionada a TALE (del inglés, *Transcription activator like effector*) ó a ZFP (del inglés, *Zinc finger proteins*) que permite el direccionamiento y especificidad de la enzima hacia un sitio en particular del genoma mejorando la seguridad del sistema para aplicaciones terapéuticas (Owens *et. al*, 2013; Owens *et. al*, 2012 y Kettlu *et. al*, 2011).

Durante nuestro trabajo pudimos demostrar además la factibilidad y reproducibilidad del método de cuantificación absoluta basado en qPCR para estimar el número de copias del transgén presentes en el genoma bovino. Dichos valores fueron de 1-3 copias/genoma en la mayoría de las líneas transgénicas. A pesar de la tendencia a asociar un mayor número de copias con daños en el genoma, Yum *et. al*, 2016 generaron terneros transgénicos saludables utilizando transposones y aún aquellos en los cuales se detectó un gran número de copias del transgén (alrededor de 15), no se observó una significativa inestabilidad genómica. Por otro lado, fue posible observar diferentes intensidades de fluorescencia entre las líneas transgénicas monoclonales, lo cual llevó a pensar que dicha diferencia estaba relacionada con el número de copias del transgén presentes en el genoma. Garrels *et. al*, 2011 demostraron en un trabajo realizado en cerdos transgénicos modificados con el transposón Sleeping Beauty, que existe una relación directa entre los niveles de expresión del transgén y el número de copias del mismo insertas en el genoma, como así también una segregación independiente del transposón en la generación F1. Con nuestros resultados fue posible determinar valores de expresión de EGFP, medida como fluorescencia total corregida (CTCF), más elevados en aquellas líneas que presentaban un mayor número de copias. Sorprendentemente, la línea con el mayor número de copias (*línea A1*) no reveló evidencias de una incorporación no-transposicional del transgén. Como se demostró previamente mediante *nrLAM*-PCR, la transposasa cataliza integraciones individuales del transgén, reduciendo las posibilidades de formación de concatémeros y consecuentemente el silenciamiento del transgén.

Una de las características más ventajosas del transposón piggyBac es su capacidad para ser removido sin modificar el sitio de inserción, lo cual implica potenciales aplicaciones para su uso en terapia génica. Utilizando una línea transgénica modificada con el vector *pmGENIE-3* se llevó a cabo un ensayo de remoción reintroduciendo en las células un plásmido conteniendo el casete de expresión de la transposasa PB. Mediante citometría de flujo se logró observar una reducción en la intensidad de fluorescencia lo que indicaría la



remoción de algunas copias del transposón, ya que la línea empleada contenía varias copias del mismo. Estos resultados son indicativos pero no concluyentes, ya que no se determinó el número de copias luego de haber realizado el ensayo. Sin embargo, la remoción del transposón piggyBac a través de la expresión transitoria de la transposasa fue demostrado en varias líneas celulares (Woltjen *et. al*, 2009; Ding *et. al*, 2005; Dafa'alla *et. al*, 2006 y Chen *et. al*, 2010), sugiriendo que es capaz de mediar una transferencia génica reversible. Esto proporciona la opción de eliminar la modificación generada por el transposón sin dejar marcas (*footprint mutations*) en el genoma.

La TNCS representa la mejor opción debido a las altas tasas de transgénesis y a la posibilidad de utilizar líneas celulares perfectamente caracterizadas antes de la reconstrucción embrionaria. La TNCS provee la oportunidad de realizar una caracterización genética (identificación del número de copias y sitios de integración del transgén al genoma) y epigenética (patrones de metilación y expresión del transgén) de la línea celular antes de ser usada como donante de núcleo (Bosch *et. al*, 2015; Bressan *et. al*, 2011). Esto permite predecir con cierta certeza el fenotipo del animal transgénico, lo cual es un punto clave a la hora de producir animales para ser usados como biorreactores. Para verificar si los FFBs transfectados con los constructos piggyBac podían ser utilizados como donantes de núcleos para la generación de embriones bovinos transgénicos, se utilizaron líneas policlonales resistentes a higromicina y que expresaban EGFP en experimentos de TNCS. Utilizando el método de transferencia nuclear *Zona-Free* se logró generar un total de 41 blastocistos bovinos, 23 (56%) de los cuales mostraron una expresión homogénea del transgén EGFP. Las tasas de desarrollo de blastocistos reconstruidos con células transgénicas fueron comparables con aquellas obtenidas con células no transgénicas como donantes de núcleos (Canel *et. al*, 2010; Iager *et. al*, 2008). Estos resultados revelan que las células transgénicas modificadas con el transposón piggyBac retienen la habilidad para promover el desarrollo embrionario temprano luego de la TNCS, mostrando una expresión persistente de EGFP sin evidencias de mosaicismo (Alessio *et. al*, 2015), correspondiéndose con lo demostrado por Kim *et.al*, 2011.

También se llevaron a cabo experimentos de TNCS empleando el método convencional con microanipuladores obteniéndose un total de 13 blastocistos transgénicos, 9 (25%) pertenecientes al grupo *pmhy*GENIE-3 y 4 (15,4%) al grupo *pm*GENIE-3. El total de embriones fueron transferidos a hembras receptoras sincronizadas generando dos preñeces, ambas correspondientes al grupo *pmhy*GENIE-3. Esto sugiere que la integración del

transposón no interferiría con la actividad de algún gen funcional relacionado con el desarrollo y organogénesis durante el período embrionario y fetal temprano.

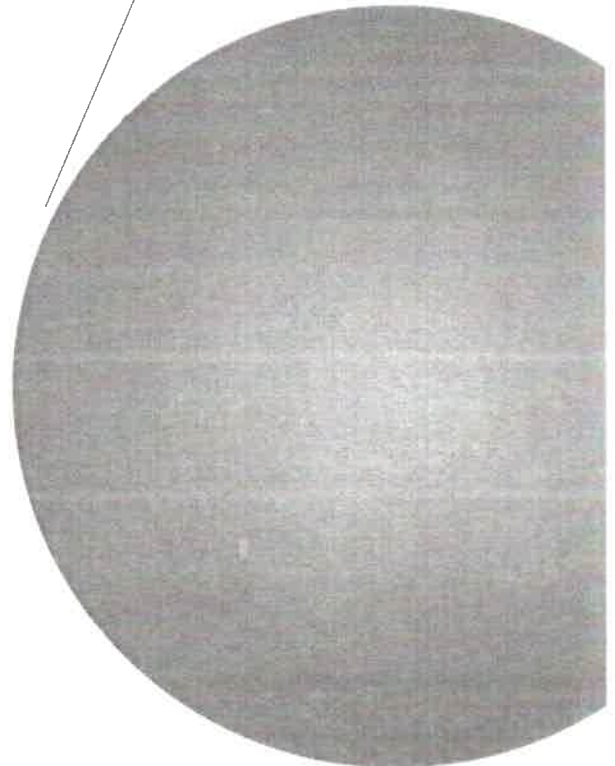
En el presente trabajo se describe una estrategia altamente eficiente y sencilla para mediar la incorporación estable de ADN exógeno al genoma bovino. Dicha estrategia involucra la utilización de un único plásmido en cada experimento de transfección para generar las modificaciones en el genoma bovino, a diferencia del clásico sistema de dos plásmidos (*donor and helper system*) o el uso de un ARNm como fuente de la enzima transposasa. Además el diseño de los constructos pGENIE-3 permitiría una reducción de eventos potencialmente genotóxicos como la incorporación de concatémeros, la expresión de la transposasa a partir del plásmido remanente y la relocalización del transposón (Urschitz *et. al*, 2010).

La baja eficiencia representa el principal factor limitante en el uso de la TNCS en la clonación y transgénesis bovina. Aunque no está totalmente esclarecido, el principal factor responsable de las elevadas tasas de pérdida embrionaria y fetal junto con la incidencia de anomalías congénitas en las crías clonadas sería una reprogramación incompleta del núcleo donante. En experimentos donde se emplearon drogas que modifican el estatus de metilación de la cromatina donante se logró mejorar la eficiencia de clonado en ratón pero los resultados en el ganado bovino son controversiales y poco concluyentes (Wu *et. al*, 2006). Por tales motivos, es necesario continuar las investigaciones orientadas a desarrollar mecanismos más eficientes, precisos y controlados para la modificación génica como así también lograr avances que aporten conocimientos sobre los factores que gobiernan el proceso de reprogramación. Sin dudas, el mayor desafío constituye el desarrollo de técnicas que permitan seleccionar previo a la transferencia embrionaria aquellos embriones de TNCS con el mayor potencial para generar terneros transgénicos sanos.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que pese al actual desarrollo de técnicas de ingeniería genética como TALEN, ZFN y CRISPR/Cas9 system, el transposón piggyBac constituye un sistema altamente eficiente para estudios de transgénesis animal. Las nucleasas diseñadas requieren del fenómeno de recombinación homóloga para la incorporación de transgenes, lo cual ocurre con una frecuencia muy baja y es casi inexistente en tejidos somáticos adultos quiescentes. Adicionalmente, si bien permiten la incorporación de secuencias de ADN en sitios precisos del genoma, la estrategia debe ser evaluada cuidadosamente para evitar daños genotóxicos asociados a los cortes fuera del sitio diana (*off target*) (Wells, 2016).

En cambio, luego del proceso de transposición, el sitio de inserción se repara mediante mecanismos endógenos de recombinación no homóloga (NHEJ) (del inglés, *non-homologous end joining*), permitiendo la incorporación de grandes fragmentos de ADN sin reducciones significativas en la actividad de la enzima. En el último año se logró el nacimiento de terneros modificados con los transposones piggyBac y Sleeping Beauty (Yum *et. al*, 2016) que han crecido normalmente y no exhiben hasta la fecha problemas de salud. El sistema piggyBac, ha permitido la apertura de nuevas áreas de investigación tanto en la producción animal como en salud humana. La capacidad de generar células iPS libres del transgén debido a la escisión precisa del transposón sin dejar marcas en el genoma fue mejorada mediante el desarrollo de una transposasa piggyBac capaz de escindir pero que carece la función de integrar ( $\text{Exc}^+/\text{Int}^-$ ) (Li *et. al*, 2013) mejorando la seguridad para su uso en estudios clínicos de terapia génica. Del mismo modo, la eficiente modificación de células T humanas haría posible su aplicación inmunoterapéutica a un menor costo que aquel asociado al uso de vectores virales (Woodard *et. al*, 2015).

**CAPÍTULO I**  
**CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

El transposón piggyBac fue capaz de mediar una incorporación eficiente y precisa de copias monoméricas del transgén dentro del genoma de células bovinas en cultivo. La transfección de fibroblastos fetales bovinos en cultivo con los constructos piggyBac *helper-independent* incrementaron notablemente la incorporación del transgén dentro del genoma, siendo la versión hiperactiva de la transposasa, 3 veces más eficiente que la convencional para mediar la inserción al genoma de transgenes flanqueados por los ITRs. El número de integraciones del transposón en líneas monoclonales fue en general de 2 a 3 copias por genoma. El análisis a nivel genómico de los patrones de integración del *piggyBac* llevado a cabo durante este estudio aportó conocimientos sobre las bases moleculares que gobiernan el mecanismo de transposición en células bovinas en cultivo.

Conjuntamente, las células transgénicas modificadas con el transposón piggyBac pudieron ser reprogramadas luego de la transferencia a ovocitos maduros enucleados para la generación de blastocistos morfológicamente normales que expresaron el transgén EGFP. Una fracción de dichos embriones transgénicos pudieron continuar el desarrollo fetal in vivo al ser transferidos a hembras bovinas sincronizadas. Aunque las células donantes de núcleos normalmente no se consideran un recurso limitante para experimentos de SCNT, las mejoras en la integración estable de genes en cultivos primarios son de gran utilidad cuando se trabaja con células primarias difíciles de transfectar.

La alta eficiencia de transgénesis mediada por el transposón piggyBac demostrada durante este trabajo permitiría reducir tiempo, costos y evitar efectos no deseados debidos a fallas en la expresión del transgén. A pesar de las ventajas de este sistema, aún es necesario lograr la integración en sitios específicos dentro del genoma, principalmente en el ganado transgénico utilizado como biorreactor para expresión estable de proteínas recombinantes. La estrategia transgénica presentada en este trabajo expande los escenarios posibles para la ingeniería genética en bovinos y demuestra que el uso de sistemas basados en transposones ADN, continúa siendo una valiosa herramienta para la producción de ganado transgénico de interés bioagrícola.

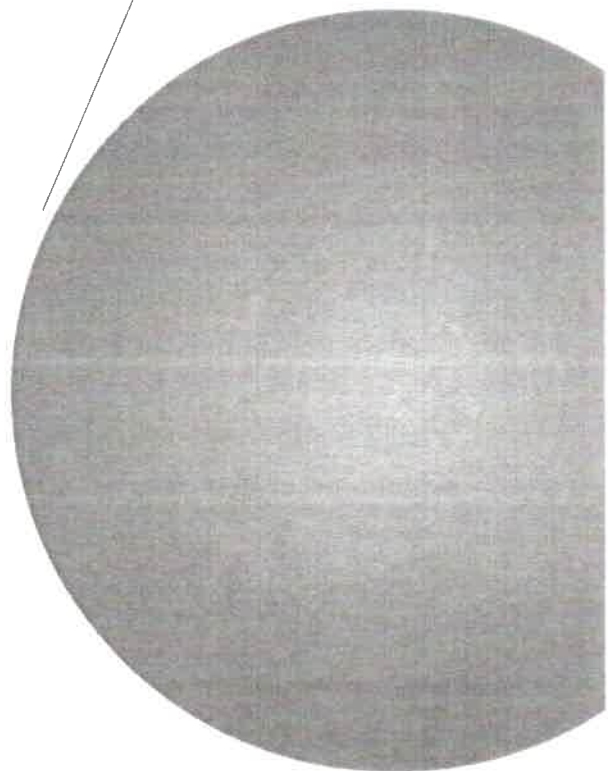


# CAPÍTULO II

**Modificaciones del genoma bovino para el mejoramiento nutricional de la leche para consumo humano mediante el uso de transposones y CRISPR/Cas9.**

# **CAPÍTULO II**

## **INTRODUCCIÓN**



## 6. INTRODUCCIÓN

### 6.1. Recientes avances en Transgénesis Animal: Nucleasas recombinantes sitio-específicas

Una de las mayores innovaciones tecnológicas de la ingeniería genética en los últimos años es el desarrollo de nucleasas sitio-específicas como ZFNs (del inglés, *Zinc Finger nucleases*), TALEN (del inglés, *Transcription activator like effector nucleases*) y el Sistema CRISPR/Cas (del inglés, *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats associated endonuclease*), las cuales han mejorado enormemente tanto la eficiencia como la versatilidad de las técnicas para modificar el genoma animal. Estas nucleasas diseñadas comparten ciertas características que incluyen: 1) pueden ser programadas para introducir de manera muy eficiente rupturas en las dos hebras del ADN o en una sola (*actividad nickasa*) y 2) las rupturas en el ADN son posteriormente reparadas por mecanismos de recombinación homóloga (HDR) (del inglés, *homology-directed repair*) o más comúnmente no homóloga (NHEJ) (del inglés, *non-homologous end joining*) generando pequeñas inserciones o deleciones (*indels*) que provocan en la mayoría de los casos un corrimiento del marco de lectura y consecuentemente una disrupción génica sin necesidad de introducir ADN exógeno (Wang, 2015 y Bosch *et. al*, 2015).

Su alta eficiencia y capacidad de dirigir la modificación a sitios precisos dentro del genoma, hace posible producir mutaciones en ambos alelos de un gen de manera simultánea y sin el uso de marcadores de selección (Carlson *et. al*, 2013).

Las nucleasas diseñadas se convirtieron rápidamente en las herramientas más utilizadas de la ingeniería genética y actualmente se cuenta con una gran producción científica que avala su potencial uso en la transgénesis en grandes animales (Bosch *et. al*, 2015).

#### 6.1.1. Nucleasas Zinc Finger (ZFNs)

Las ZFNs son proteínas quiméricas con un dominio específico de unión al ADN que consiste en una serie de motivos dedos de zinc individuales y el dominio catalítico de la endonucleasa de restricción FokI. La especificidad de los motivos dedos de zinc ha sido analizada mediante mutagénesis dirigida y actualmente es posible contar con dominios dedos de zinc sintéticos capaces de unirse a cualquier secuencia de ADN preestablecida. Un par de ZFNs reconoce el sitio específico permitiendo la dimerización del dominio catalítico FokI y el subsecuente clivaje del ADN (Kim *et. al*, 2014). Los primeros reportes de



knockout génico en células somáticas porcinas fueron presentados por Watanabe *et. al*, 2013, seguidos por disrupciones mono y bialélicas de genes endógenos en cerdos clonados (Yang *et. al*, 2011 y Bao *et. al*, 2014, respectivamente). En bovinos, se llevó a cabo la mutación en el gen de la  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) mediada por ZFNs (Yu *et. al*, 2011). En 2013 Liu *et. al*, emplearon una Zinc Finger Nickasa (la cual induce la ruptura en una sola hebra del ADN y en consecuencia, aumentaría la frecuencia de ocurrencia de recombinación homóloga) para mediar la incorporación al genoma bovino de un gen de lisostafina en el locus de la  $\beta$ -caseína endógeno (CSN2) y reportaron el nacimiento de animales vivos clonados por TNCS que expresan dicha proteína antimicrobiana heteróloga en la glándula mamaria.

#### 6.1.2. *Transcription activator like effector nucleases (TALENs)*

*Transcription activator like effector* (TALE) representan un grupo de proteínas efectoras de origen bacteriano que contienen secuencias repetitivas que determinan su especificidad por una secuencia *target* en el ADN. Las nucleasas TALE (TALENs) son proteínas de fusión originadas a partir de una proteína TALE completa o troncada y el dominio catalítico de la enzima de restricción FokI. Al igual que las ZFN, el dominio catalítico de FokI causa rupturas en las dos hebras del ADN que son luego reparadas por los mecanismos no homólogos, dando lugar a las alteraciones en la secuencia de reconocimiento específico o próximo a ella (Liu *et. al*, 2014). Ésta tecnología ha sido utilizada para inducir modificaciones en loci específicos que se sabe que están asociados con enfermedades genéticas en humanos. A partir de las células modificadas, se generaron cerdos knockout por transferencia de cromatina (CT) que servirían como modelo de estudio de diversas enfermedades (Tan *et. al*, 2012). También fue posible la generación de embriones bovinos preimplantacionales originados mediante la microinyección del ARNm de la TALEN dirigido al gen de la miostatina (GDF-8) (Yang *et. al*, 2014).

A pesar de la comprobada eficiencia de las ZFNs y TALENs para inducir modificaciones genéticas, presentan ciertas limitaciones que se resumen en la Tabla 18.

#### 6.1.3. *CRISPR/Cas*

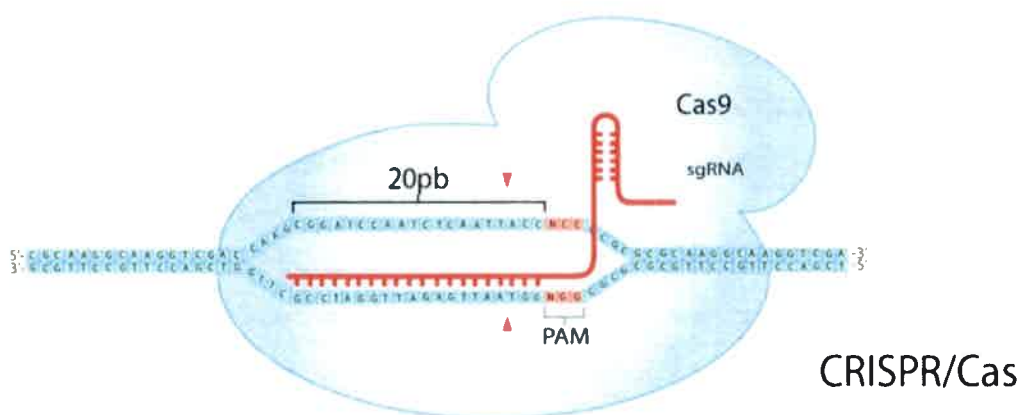
El sistema CRISPR/Cas surgió como una eficiente alternativa ante las nucleasas diseñadas ZFNs y TALENs para inducir alteraciones genéticas dirigidas. En bacterias, el sistema

CRISPR está relacionado con la resistencia frente a la presencia de ADN exógeno a través de un sistema de clivaje sitio-específico del ADN vía ARN-guía. El locus CRISPR consiste en cuatro genes, incluyendo la nucleasa asociada Cas9 (del inglés, *CRISPR-associated protein 9*), CRISPR ARNs (crARNs) y un tracrARN (del inglés, *trans-activating crRNA*). Durante el clivaje, el complejo formado por la nucleasa Cas9, crARN y tracrARN degrada el ADN exógeno conteniendo una secuencia de 20 nucleótidos complementaria al crARN y adyacente a una secuencia de 3 nucleótidos (NGG para la Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes*) conocida como PAM (del inglés, *protospacer adjacent motif*) (Yang *et. al.*, 2014). El sistema optimizado de CRISPR/Cas9 consiste en una fusión entre el crARN y el tracrARN que da lugar a un ARN quimérico de cadena simple (sgARN) que es utilizado para dirigir los cortes específicos en el genoma (Fig. 34). Por lo tanto, es posible mediante modificaciones en la secuencia de los sgARNs redirigir el clivaje de la nucleasa asociada para generar rupturas en cualquier secuencia genómica de interés (Cong *et. al.*, 2013). Al igual que las ZFNs y las TALENs, la nucleasa Cas9 induce rupturas doble cadena en el ADN diana que son reparadas por mecanismos no-homólogos de reparación del ADN propensos a error (*NHEJ*), resultando en alelos mutantes.

Este sistema ha sido usado en varias especies (Whitworth *et. al.*, 2014; Zhou *et. al.*, 2014; Honda *et. al.*, 2014) abriendo un abanico de posibilidades en el campo de la ingeniería genética, logrando con éxito la generación de cerdos, cabras y ovejas knock-out (Butler *et. al.*, 2016; Hai *et. al.*, 2014; Ni *et. al.*, 2014; Crispo *et. al.*, 2015 respectivamente) como así también animales knock-in para la producción de proteínas recombinantes (Peng *et. al.*, 2015; Ruan *et. al.*, 2015). En 2013 se presentaron los primeros resultados de modificaciones genómicas en células humanas (Jinek *et. al.*, 2013).

**Tabla 18.** Comparación de las características técnicas de ZFN, TALEN y CRISPR/Cas9 (Feng *et al.*, 2015).

Factores	ZFNs	TALEN	CRIPR/Cas9
Construcción de la nucleasa	Dificultad significativa	Dificultad significativa	Simple
Evaluación <i>in-vitro</i>	Dificultad significativa	Dificultad significativa	Simple
Eficiencia de clivaje sitio-específico	Factor limitando	Promedio	Buena
Clivaje fuera del sitio target	Alto	Bajo	Bajo
Elección del sitio target	Limitado	Limitado	Ilimitado?
Mutaciones génicas múltiples	Limitado	Limitado	Ilimitado
Componentes esenciales	Proteína Zinc Finger + Proteína de fusión FokI	TALE + Proteína de fusión FokI	ARN guía + Proteína Cas9
Consumo de tiempo	7-15 días	5-7 días	1-3 días
Costo	Alto	Alto	Bajo



**Figura 34. Modelo del sistema CRISPR/Cas9.** La nucleasa Cas9 es dirigida a una secuencia específica del genoma por los primeros 20 nucleótidos del sgARN, los cuales hibridan con la secuencia diana en el ADN genómico. La Cas9 cataliza la ruptura en ambas hebras del ADN a una distancia de 3 nucleótidos corriente arriba del PAM (flechas rojas). Imagen tomada de Bosch *et al.*, 2014.

Actualmente, existe un gran interés en la adaptación del sistema CRISPR/Cas9 como una herramienta altamente eficiente para inducir alteraciones genéticas dirigidas en una gran variedad de especies. Bajo esta perspectiva, es posible mediante modificaciones en la secuencia de los sgARNs del sistema CRISPR/Cas9, redirigir el clivaje de la nucleasa

asociada para generar rupturas en cualquier secuencia genómica de interés que serán reparadas posteriormente por mecanismos endógenos de recombinación no-homólogos generando un knock-out génico mono o bi-alélico con una gran eficiencia. Si bien esta tecnología ha sido aplicada con éxito en la generación de animales transgénicos de diferentes especies, son pocos los reportes que muestran su validación en grandes animales (Ni *et. al*, 2014; Hai *et. al*, 2014 y Han *et. al*, 2014).

A pesar de las grandes ventajas de esta metodología, como son la alta eficiencia para dirigir las modificaciones a cualquier secuencia genómica y la posibilidad de generar múltiples ediciones proporcionando simultáneamente diferentes sgARNs, existen ciertas limitaciones. Por un lado, la necesidad de la secuencia 5'-NGG (PAM) de la Cas9 puede llegar a ser un factor limitante en la selección del sitio diana. Además, se requieren análisis de secuenciación más extensivos para detectar las mutaciones generadas por cortes fuera del sitio diana (*off-target*) (Singh *et. al*, 2015). Y por último, es importante mencionar algunas limitaciones que son inherentes a los mecanismos de producción de embriones, como por ejemplo los elevados niveles de mosaicismo observado en embriones generados por microinyección y las bajas tasas de transfección del sistema CRISPR/Cas9 en células empleadas para TNCS. En este contexto, surge la necesidad de optimización de este sistema para su aplicación a especies mayores como el ganado bovino.

### 6.2. Producción de proteínas recombinantes en animales transgénicos

Dentro de las aplicaciones más atractivas de la transgénesis en animales domésticos y sobre las cuales se ha enfocado el desarrollo de tecnologías innovadoras son la producción de proteínas recombinantes en la glándula mamaria, sangre, fluido seminal u orina (metodología conocida como *gene pharming*) aplicadas al tratamiento de enfermedades humanas y la obtención de alimentos funcionales. Actualmente es posible mencionar una variedad de proteínas sintetizadas en glándula mamaria que se encuentran aprobadas o en fase pre-clínica para el tratamiento de diversas enfermedades como arterosclerosis, fibrosis quística, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, hemofilia, enfermedad de Pompe, entre otras. Ejemplos de proteínas de uso terapéutico producidas mediante esta biotecnología incluyen  $\alpha$ 1-antitripsina, lactoferrina, antitrombina III, hormona de crecimiento (hGC),  $\alpha$ -glucosidasa y factor de coagulación IX, entre otras (Tabla 19).

**Tabla 19.** Proteínas recombinantes humanas producidas a partir de ganado transgénico. Adaptado de Bertolini *et. al*, 2016 y Kues y Niemann, 2004.

<b>Característica Transgénica</b>	<b>Molécula</b>	<b>Método de TG*</b>	<b>Especie</b>
Incrementos en las tasas de crecimiento	Hormona de crecimiento (GH)	Microinyección	Bovinos
Incrementos en las tasas de crecimiento	Factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1)	Microinyección	Porcinos
Utilizado como sellador quirúrgico de tejidos, como andamiaje en ingeniería de tejidos y en la cicatrización de heridas.	Fibrinógeno	Microinyección	Conejos y Bovinos
Utilizado como biomaterial	Colágeno	Microinyección	Conejos y Bovinos
Tratamiento de esclerosis múltiple, miastenia gravis y artritis reumatoidea.	$\alpha$ -Fetoproteína humana	TNCS	Cabras
Restablece los valores plasmáticos de inhibidor C1 disminuyendo la inflamación	Inhibidor de Estearasa-C1	Microinyección	Conejos
Factor de la coagulación	Factor VIIa	Microinyección	Conejos
Factor de la coagulación	Antitrombina III		Cabras
Incrementos en los niveles de ácidos grasos poli-insaturados	Desaturasa	Microinyección/ TNCS	Porcinos
Metabolismo de fosfatasa	Fitasa	Microinyección	Porcinos
Composición de la leche	$\alpha$ -Lactoalbúmina	Microinyección	Porcinos
Resistencia al virus de la Influenza	Proteína Mx	Microinyección	Porcinos
Aumento de la resistencia a enfermedades	Inmunoglobulina A (IgA)	Microinyección	Porcinos
Crecimiento de lana	Factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1)	Microinyección	Ovinos
Resistencia al virus Visna	Proteína de envoltura del virus visna	Microinyección	Ovinos
Resistencia a BSE*	Gen de la Proteína Priónica	TNCS	Ovinos
Composición grasa de la leche	Estearoil-desaturasa	Microinyección	Caprinos
Incrementos de proteínas lácteas	$\beta$ -Caseína $\kappa$ -Caseína	TNCS	Bovinos
Incrementos de lactoferrina en la leche	Lactoferrina Humana	Microinyección	Bovinos
Resistencia a Mastitis	Lisostafina	TNCS	Bovinos
Resistencia a BSE**	Gen de la Proteína Priónica	TNCS	Bovinos
Resistencia al virus de la Influenza	Short harpin RNA	Transducción Lentiviral	Aves

\*TG: Transferencia Génica\*\*BSE: bovine spongiform encephalopathy.

El uso de la transgénesis para dirigir la expresión de proteínas exógenas en la leche fue reportada por primera vez en 1987 en ratones (Gordon *et. al*, 1987), a partir de ese momento se han incorporado transgenes bajo promotores específicos de expresión en

glándula mamaria en cerdos (Wall *et. al*, 1991), ovejas (Wright *et. al*, 1991), cabras (Ebert *et. al*, 1991) y vacas (Krimpenfort *et. al*, 1991) explotando su potencial como biorreactores. Este sistema de expresión no sólo permite la obtención de altos niveles de la proteína recombinante (Murray *et. al*, 2010) sino que además las proteínas pueden ser fácilmente recuperadas aventajando de ese modo a los sistemas basados en cultivos celulares, en los cuales adicionalmente a los altos costos de producción, las modificaciones post-traduccionales son a menudo incorrectas pudiendo provocar reacciones inmunes (Brondyk, 2009).

A pesar del creciente estímulo para la investigación y el desarrollo comercial de esta área, es necesario tener en claro que no todas las proteínas recombinantes han podido ser expresadas en grandes cantidades en la glándula mamaria de bovinos como así también pueden existir inconvenientes relacionados con su actividad indicando que estas tecnologías deben ser mejoradas para lograr con éxito la adecuada expresión de la proteína de interés.

### 6.3. Mejoramiento genético de la performance productiva en vacas lecheras: Papel de la $\beta$ -lactoglobulina y la desaturasa FAT-2

La manipulación del genoma bovino representa actualmente una potencial herramienta para generación de hembras bovinas capaces de producir leche nutricionalmente más apropiada para el consumo humano. De hecho, existen antecedentes que demuestran que es posible modificar la composición de la leche en animales transgénicos para mejorar su calidad y reducir su potencial alergénico para el hombre (Sabikhi, 2007; Yom y Bremel 1993).

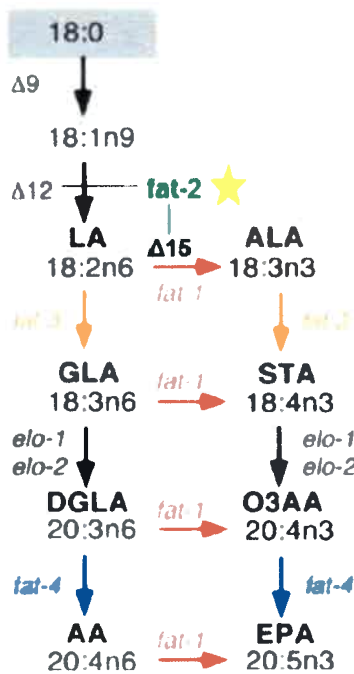
La  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) es una de las proteínas más abundantes de la leche de vaca, representando el 50% del total de proteínas del lactosuero. Esta proteína no se encuentra presente en el leche humana (Wal *et. al*, 2004) y muestra una gran resistencia tanto a la hidrólisis ácida como a la acción de proteasas por lo que gran parte de la proteína permanece intacta luego de la digestión. Esto incrementa la probabilidad de que la proteína intacta junto con los fragmentos digeridos se absorba a nivel de la mucosa intestinal como antígenos. Actualmente se conoce que la BLG es el principal alérgeno de la leche de vaca y la responsable de la alta prevalencia de cuadros alérgicos en niños asociados al consumo de leche vacuna (Li *et. al*, 2014b; Tsaouri *et. al*, 2014). Por lo tanto la reducción o

eliminación de la BLG en la leche podría disminuir considerablemente los trastornos de salud asociados al consumo de este valioso producto. Con este objetivo, mediante el uso de tecnologías basadas en nucleasas para generar modificaciones en sitios precisos del genoma ha sido posible generar vacas con el gen de BLG inactivado mediante el uso de ZFNs (Yu *et. al*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que es posible aumentar la proporción de ácidos grasos (AG) Omega-3 ( $\omega$ -3) en la leche de ratones y bovinos (Kao *et. al*, 2006; Wu *et. al*, 2012). Estos ácidos grasos poliinsaturados, junto con los ácidos grasos Omega-6 ( $\omega$ -6) son nutrientes imprescindibles para el desarrollo cerebral y cognitivo y se ha reportado que la ingesta del AG  $\omega$ -3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Calder, 2004; Kris-Etherton *et. al*, 2003; Lemaitre *et. al*, 2003; Marik y Varon 2009, desórdenes neurológicos (Hibbeln, 1998) y cáncer (Roynette *et. al*, 2004). En conjunto estos AG se han descrito como hipolipemiantes, reductores de los niveles de colesterol LDL, y tienen acción reductora de la agregación plaquetaria (Guivernau *et. al*, 1994). Debido a que carecemos de las enzimas desaturasas necesarias para sintetizarlos, los AG  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 son considerados AG esenciales para los humanos, y deben ser incorporados de manera exógena. La dosis diaria recomendada de estos ácidos grasos no es normalmente alcanzada en la dieta típica en los países en desarrollo, de lo que se deduce que aumentar la ingesta de estos lípidos a través de los alimentos redundaría en una mejor calidad de vida. Esto es particularmente relevante para habitantes de regiones mediterráneas a quienes se les dificulta incluir en la dieta carne de pescado la cual es considerada una de las principales fuentes de  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. Si bien se han realizado grandes esfuerzos para modificar el perfil de los ácidos grasos en la leche de vaca, existen muchas barreras que impiden que los ácidos grasos poliinsaturados ingeridos con la dieta formen parte de la leche como la biohidrogenación y esterificación en el rumen (Laniery Corl 2015) y la baja especificidad de las lipoproteínas de la glándula mamaria por estos tipos de ácidos grasos (Stamey Lanier *et. al*, 2013). Debido a los impedimentos fisiológicos para el enriquecimiento de la leche con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, la manipulación del genoma bovino representaría una potencial herramienta para lograr un aumento de la composición de dichos ácidos grasos.

Las desaturasas  $\Delta$ -12 y  $\Delta$ -15 han sido identificadas en una variedad de organismos incluyendo eucariotas inferiores, plantas y animales excepto mamíferos. Los vertebrados poseen la enzima estearoil-(CoA)-desaturasa (Delta 9 en la Fig. 35), la cual sintetiza AG monoinsaturados a partir de los AG saturados. Sin embargo, al no contar con las enzimas

requeridas para la síntesis de ácido linoleico (18:2n-6, un importante AG  $\omega$ -6 precursor de otros AG  $\omega$ -6) ni del AG  $\omega$ -3 ácido  $\alpha$ -linolenico (ALA, 18:3n-3), dependen de las fuentes dietarias para cubrir los requerimientos. Por el contrario, el nematodo *Caenorhabditis elegans* es capaz de sintetizar ambos AG insaturados (Fig. 35) (Zhou *et. al*, 2011). Se ha reportado que la enzima FAT-2 de este nematodo (CeFAT-2) es capaz de catalizar desaturaciones  $\Delta 15$  además de la clásica desaturación  $\Delta 12$  de AG de 16 y 18 átomos de carbono (Zhou *et. al*, 2011). Esto resulta en la producción tanto de LA como de ALA a partir del ácido oleico (C18:1n9) utilizando solo una enzima. La actividad de esta enzima representa una gran ventaja a la hora de realizar transgénesis, dado que la regulación y el control de la expresión una sola enzima puede ser mucho más preciso y posibilita la incorporación posterior de otras desaturasas como la FAT-3 o FAT-4 que permitirían obtener leche con un espectro más amplio de AG insaturados, aumentando aún más el valor nutricional de la leche bovina modificada.



**Figura 35.** Esquema simplificado de la síntesis de AG en el nematodo *C. elegans* donde se puede observar que la acción de las enzimas Fat-2 ( $\Delta 12$ , en verde) y Fat-1 ( $\Delta 15$ , en rojo) permiten la síntesis de una amplia gama de AG  $\omega$ -3 y AG  $\omega$ -6, entre ellos el A. linolénico (LA) y  $\alpha$ -linolénico (ALA). Adaptada de Jan *et. al*, 2005.

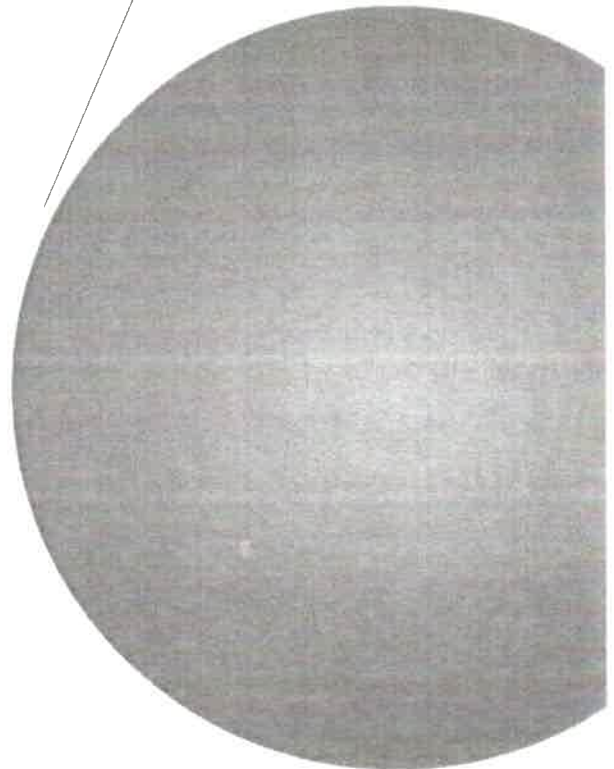
Desde la identificación de los genes responsables de la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, se ha logrado clonar e introducir desaturasas en un amplio



número de especies. Inicialmente, se emplearon las secuencias provenientes de *C. elegans* para expresar desaturasas en *S. cerevisiae* (Peyou *et. al*, 2000) y en ratones transgénicos, donde se observó un incremento en la proporción de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en tejidos y órganos (Zhang *et. al*, 2013). Al mismo tiempo, se reportó la generación de cerdos transgénicos empleando una desaturasa proveniente de plantas (Saeki *et. al*, 2004). Posteriormente se emplearon secuencias optimizadas para mamíferos tanto en cerdos (Lai *et. al*, 2006) como en rumiantes (Liu *et. al*, 2015; Wu *et. al*, 2012).

# **CAPÍTULO II**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS

El transposón SB es altamente eficiente y seguro para incorporar el gen de la desaturasa *mFAT2* al genoma bovino. Adicionalmente, la nucleasa recombinante CRISPR/Cas9 representa un sistema preciso y altamente eficiente para producir mutaciones inactivantes en secuencias genómicas, tal el caso del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina.

Mediante el uso simultáneo del transposón SB y la nucleasa CRISPR/Cas9 es posible inducir modificaciones precisas y complejas del genoma bovino con alta eficiencia. Por lo tanto, se puede incorporar en un solo paso el gen de la desaturasa *CeFAT-2* e inducir la mutación del gen endógeno de la  $\beta$ -lactoglobulina (*BLG*) bovina mediante co-transfección de fibroblastos bovinos con ambos sistemas.

### OBJETIVO GENERAL

Incorporar el gen de una desaturasa de ácidos grasos (*mFAT2*) con expresión histoespecífica (glándula mamaria) en el genoma de células bovinas en cultivo, utilizando como herramienta transgénica el transposón SB. Simultáneamente, se persigue inactivar en la misma línea celular el gen de la *BLG* mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 para noquear dicho gen.

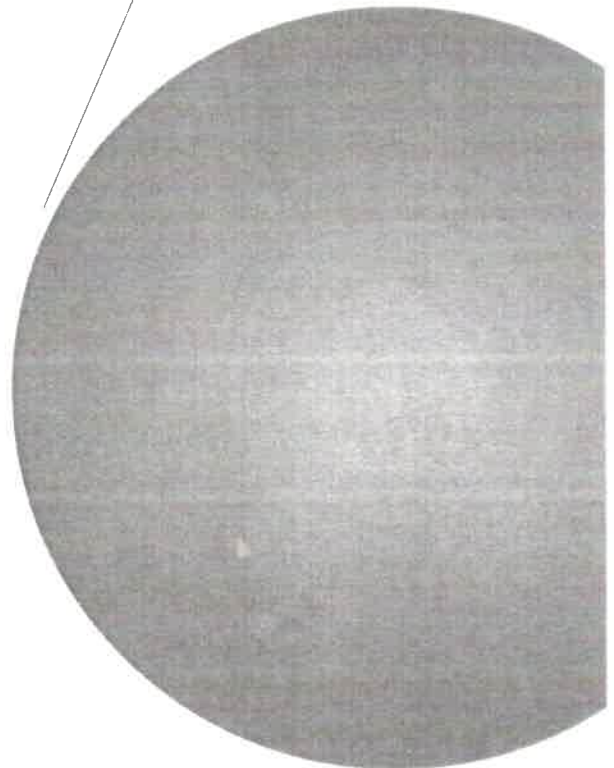
### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Desarrollar y caracterizar un sistema transgénico basado en el transposón *Sleeping Beauty* (SB) para mediar la integración genómica de secuencias que codifican una enzima heteróloga (*CeFAT-2*) al genoma de células bovinas en cultivo.
- 2) Desarrollar y optimizar el sistema CRISPR/Cas9 para inducir una mutación que deje inoperativo (*knock-out*) el gen de la  $\beta$ -lactoglobulina en fibroblastos bovinos.

- 3) Estudiar la factibilidad de incorporar el gen de la enzima desaturasa por transposición y simultáneamente provocar la mutación del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina mediante el sistema CRISPR/cas9 en fibroblastos bovinos en cultivo.
- 4) Genotipificar las líneas transgénicas obtenidas para detectar la incorporación de la CeFAT-2 y la mutación del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina mediante estudios de secuenciamiento.

# **CAPÍTULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Construcción de vectores

#### 7.1.1. *Generación del plásmido para el knock-out del gen la $\beta$ -lactoglobulina bovina*

El vector pSpCas9 (BB)-2<sup>a</sup>-Puro (pX459) (Addgene plasmid #48139) fue digerido con BbsI y purificado. Se diseñaron un par de oligonucleótidos (F: CACCGGAAGTGCCTCCTGCTTGCCC y R: AAACGGGCAAGCAGGAGGCACTTCC) dirigidos a la secuencia correspondiente al exon 1 del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina (PAEP, AC\_000168.1) que hibridan en la región ubicada inmediatamente corriente abajo del codón de inicio de la transcripción. Dichos oligonucleótidos fueron hibridados entre sí y ligados al vector digerido con BbsI para generar el vector bicostrónico (pX459-Cas9-PAEP) que expresa tanto la nucleasa Cas9 como el sgRNA.

#### 7.1.2. *Vectores Sleeping Beauty*

Los vectores que se utilizaron para llevar a cabo la transposición del gen mFAT-2 fueron los siguientes: pCMV(CAT)T7-SB100X, éste plásmido expresa una versión optimizada de la transposasa (SB 100X) bajo el control del promotor CMV; el pT2/ $\alpha$ Cas-mFAT-2-His/Neo, el cual contiene el gen mFAT-2 bajo el promotor específico de glándula mamaria  $\alpha$ -caseína y un cassette de expresión que le confiere resistencia al antibiótico geneticina (G418), ambos flanqueados por los ITRs del transposón Sleeping Beauty. El ADNc de la enzima CeFAT2 fue obtenido mediante PCR a partir del plásmido PXZP278, gentilmente cedido por el Dr. Zhou (CSIRO, Black Mountain Laboratories, Canberra, Australia). Dado que la predilección de codones difiere entre nematodos (*C. elegans*) y mamíferos, se envió a sintetizar en la Compañía GenScript un ADN que contiene tripletes que se corresponden con los más utilizados por células de mamíferos. Por lo tanto los niveles de expresión de la proteína CeFAT2 deberían ser mayores con esta versión optimizada. Este ADN codificante, al cual llamamos mFAT-2, es el que fue subclonado en los plásmidos mencionados anteriormente.

### 7.2. Transfección de fibroblastos fetales bovinos con el vector CRIPR/Cas9

Los fibroblastos fetales bovinos creciendo en DMEM, 10% SFB y 1x Pen-Strep 100x (Gibco, Ca, USA) en estufa a 39°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad fueron tripsinizados y contados en la cámara de Neubauer. Se sembraron 200.000 células por pocillo en una placa MW-6 con lo cual se obtenía un 80% de confluencia a las 24 hs. Una vez obtenido el crecimiento deseado, los fibroblastos fueron transfectados con los vectores pX459-PAEP (Vector CRIPR/Cas9) y pmax-GFP (Control) utilizando el agente químico polietilennimina (PEI). Las condiciones de transfección se detallan en la Tabla 20. Las células fueron incubadas con la mezcla de transfección durante 4 h en la estufa. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado y se agregó medio de cultivo nuevo. 48 h post-transfección se realizó la evaluación de la eficiencia de transfección en las placas controles mediante la observación de la expresión de EGFP bajo luz azul (450nm a 500nm) en un microscopio invertido con equipo de epifluorescencia (Nikon). Posteriormente, se comenzó el proceso de selección con el antibiótico puromicina durante 3 días, realizando cambios de medio diariamente. Se extrajo ADN genómico de la población celular luego de la selección con purmicina para llevar a cabo el ensayo de clivaje in-vitro.

**Tabla 20.** Tratamientos empleados en el experimento de transfección in-vitro.

CONDICIONES			
	Relación 2:1	Relación 2:2	Vol. de diluyente
µg pX459-PAEP	2	2	100 µl
µl PEI	1	2	100 µl
CONTROL DE TRANSFECCIÓN			
µg pmax-GFP	2	2	100 µl
µl PEI	1	2	100 µl

### 7.3. Ensayo de clivaje in-vitro de ADN

Para validar la eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 para inducir rupturas doble cadena en el sitio target (gen de la β-lactoglobulina) en el genoma bovino se llevó a cabo un ensayo

de clivaje utilizando la endonucleasa T7 (*T7E1 New England Biolabs Inc.*). Este protocolo se basa en la digestión de productos de PCR con la enzima T7, la cual reconoce y cliva el ADN que no hibrida perfectamente (Crispo *et. al*, 2015). En el primer paso, el ADN genómico proveniente de FFBS transfectados con el vector CRISPR/Cas9 se utilizó como molde en reacciones de PCR para amplificar una secuencia de 427 pb que contiene el sitio target (exón 1 del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina). El producto de PCR fue desnaturalizado y posteriormente re-hibridado para ser sometido a la acción de la endonucleasa T7. Esta enzima produce cortes en los sitios donde no haya un correcto apareamiento de bases. Como control negativo se utilizó ADN genómico de FFBS sin transfectar. Dichos fragmentos fueron resueltos en un gel de agarosa para determinar la eficiencia de las mutaciones sitio-dirigidas. Aquellos alelos que no contengan mutaciones son representados por una única banda del tamaño correspondiente al fragmento amplificado por PCR. Sin embargo, si el sistema CRISPR/Cas9 provocó cortes en ambas cadenas del ADN en el sitio target, los mecanismos endógenos de reparación del ADN generarán *indels* (inserciones o deleciones de nucleótidos) y como consecuencia, el fragmento de PCR no hibridará de manera exacta y será digerido por la nucleasa T7 generando fragmentos más cortos (193-234 pb) que aparecerán como dos bandas en el gel. La proporción entre productos clivados y no clivados será utilizada para calcular el porcentaje de *indels*.

El protocolo empleado se detalla a continuación:

*1- Amplificación del sitio target mediante PCR*

Componente	Cantidad	Concentración final
Buffer (5X)	10	1X
dNTPs (100mM)	1	2Mm
PAEP-F (10 $\mu$ M)	1	0,2 $\mu$ M
PAEP-R (10 $\mu$ M)	1	0,2 $\mu$ M
Taq	1	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	1mM
ADN genómico	1	2 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	33	
Total	50	



30 ciclos	Desnaturalización inicial	95°C por 2 min
	Desnaturalización	95°C por 20 s
	Hibridización	60°C por 20 s
	Elongación	72°C por 30 s
	Elongación Final	72°C por 3 min

2- *Purificación del producto de PCR.*

3- *Formación de homoduplex y heteroduplex de ADN.*

El producto de PCR fue sometido al siguiente protocolo de desnaturalización/hibridación:

	Temperatura	Rampa de disminución de temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C		5 min.
Hibridación	95-85°C	-2°C/segundo	
	85-25°C	-0.1°C/Segundo	

4- *Digestión con la Endonucleasa T7*

Componente	Volumen de reacción 20 µl
Producto de PCR hibridado	19 µl
T7 Endonucleasa I (M0302)	1 µl
Tiempo de incubación	15 min.
Temperatura de incubación	37°C

5- *Análisis de los resultados*

El siguiente paso fue analizar los fragmentos del producto de PCR resueltos en un gel de agarosa al 2% y estimar la intensidad de cada banda empleando el programa ImageJ. Para cada calle correspondiente a un tratamiento se calculó la fracción clivada del producto de PCR usando la siguiente fórmula:  $(b+c)/(a+b+c)$ , donde a es la intensidad del producto de PCR sin digerir, b y c las intensidades de los productos clivados.

Finalmente se calculó el porcentaje de modificación génica como:

$$\% \text{ indels} = 100 \times (1 - (1 - \text{fracción clivada})^{1/2})$$

#### 7.4. Generación de embriones knockout mediante el sistema CRISPR/Cas9

##### 7.4.1. Producción in vitro de embriones

Los embriones fueron producidos mediante el protocolo estándar de fertilización in vitro. Brevemente, se transportaron ovarios desde el frigorífico en solución de Ringer a 37°C hasta el laboratorio. Una vez allí, los ovarios fueron aspirados para recuperar los complejos cúmulus-ovocito (COCs), los cuales fueron seleccionados y colocados en medio de maduración por 24 horas en estufa de cultivo con 5% CO<sub>2</sub> y humedad máxima a 39 °C. Para llevar a cabo la fertilización, se utilizó semen descongelado y los espermatozoides con mayor motilidad fueron seleccionados mediante centrifugación en un gradiente discontinuo de Bovipure (40-80%) por 10 minutos a 1000 rpm. El pellet de semen fue lavado dos veces con TALP suplementado con heparina y utilizado para la fertilización de los ovocitos maduros a una concentración de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml de medio de fertilización durante 19 hs en estufa de cultivo con 5% CO<sub>2</sub> y humedad máxima a 39 °C. Los cigotos fueron desnudados y empleados en los experimentos de microinyección.

##### 7.4.2. Producción de los ARN mensajeros de Cas9 y sgARN- PAEP

Para generar el ARN mensajero correspondientes a la secuencia del ARN guía, fue necesario utilizar primers que contengan la secuencia del promotor T7 para amplificar el segmento correspondiente del vector pX459-PAEP (T7-sgARN\_F: TTAATACGACTCACTATAGGCACCGGAAGTGCCTCCTGCTTGCCC y T7-sgARN\_R: GGCAAGCAGGAGGCACTTCC). El producto de PCR fue luego purificado y utilizado para el procedimiento de transcripción in-vitro. Dicho procedimiento, se llevó a cabo utilizando el kit comercial MEGA shortscript de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Para obtener el ARN mensajero de la nucleasa Cas9 se empleó el vector pMJ920 el cual contiene la secuencia codificante de la enzima Cas9 unida mediante el péptido 2A a GFP. Dicha secuencia se encuentra bajo el control transcripcional del promotor T7, de esta manera la transcripción genera un ARN mensajero bicistrónico que fue linealizado y purificado para su posterior utilización en los experimentos de microinyección. Los detalles de esta metodología fueron descriptos por Yang *et. al*, 2014.

#### 7.4.3. *Microinyección de cigotos bovinos*

Inmediatamente luego de la fertilización, los embriones fueron asignados al azar en dos grupos y fueron microinyectados intracitoplasmáticamente con el ARNm de Cas9-EGFP y con el sgARN-PAEP obtenidos mediante transcripción *in vitro* a partir de los vectores pMJ920 y pX459-PAEP respectivamente. Los embriones fueron microinyectados con 30 ng/ $\mu$ l del sgARN y 100 ng/ $\mu$ l del ARNm de Cas9 en un volumen estimado en 7 pl. Luego de la microinyección, los embriones fueron transferidos a gotas de SOF y cultivados durante 7 días. El clivaje se evaluó a día 2 y el desarrollo hasta el estadio de blastocisto a día 7.

#### 7.4.4. *Análisis de las mutaciones en el locus de la $\beta$ -lactoglobulina en embriones microinyectados.*

Luego de 7 días de cultivo in-vitro, el ADN proveniente de blastocistos originados a partir de embriones microinyectados fue extraído y analizado para detectar mutaciones en el gen de la  $\beta$ -lactoglobulina. En primer lugar se amplificó mediante PCR el sitio target del sgARN, dicho fragmento fue purificado y clonado en el vector pMJ920 para estudios de secuenciamiento.

#### 7.5. *Generación de fibroblastos fetales bovinos transgénicos mediante transfección con los vectores *Sleeping Beauty* y *CRISPR-PAEP*.*

Los fibroblastos fetales bovinos creciendo en DMEM, 10% SFB y 1x Penicilina-Streptomicina 100x (Gibco, Ca, USA) en estufa a 39°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad fueron tripsinizados y contados en la cámara de Neubauer. Se sembraron 0,5x10<sup>5</sup> células por pocillo en una placa MW-24 con lo cual se obtenía un 80% de confluencia a las 24 hs. Una vez obtenido el crecimiento deseado, los fibroblastos fueron transfectados utilizando el agente químico PEI según el protocolo previamente establecido. Brevemente, se mezclaron en 100  $\mu$ l de buffer, 2  $\mu$ g de ADN y 1  $\mu$ l de PEI. La mezcla de transfección fue colocada sobre cada pocillo conteniendo 400  $\mu$ l DMEM 10% SFB, 1x Antibiótico incubada durante 4 hs en la estufa. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas y colocadas en la estufa con DMEM suplementado con 10% SFB.

### 7.5.1. Diseño experimental

En este ensayo se evaluó de manera simultánea la capacidad del sistema CRISPR/Cas9 de editar la secuencia de la  $\beta$ -lactoglobulina y por otro lado, la eficiencia de incorporación del gen *mFAT-2* mediante transposición en fibroblastos bovinos. Para ello, FFBs fueron transfectados por triplicado con los diferentes vectores utilizando la relación 1:2 ( $\mu$ l PEI:  $\mu$ g de ADN plasmídico).

- *Experimento 1:*

FFB transfectados con 0,66  $\mu$ g del vector pX459-Cas9-PAEP y 0,66  $\mu$ g de pT2/ $\alpha$ Cas-*mFAT-2*-His/Neo y con 0,66 de pCMV (CAT)T7-SB100Xen combinación con 1  $\mu$ l PEI.

- *Control de transfección:* FFB transfectados con 2  $\mu$ g de *pmax-GFP* en combinación con 1  $\mu$ l PEI.

### 7.5.2. Obtención de Líneas Monoclonales Transgénicas

Se llevó a cabo una primera selección con el antibiótico purimicina a una concentración de 1,3  $\mu$ g/ml durante 3-4 días para enriquecer el cultivo con aquellas células que incorporaron el vector pX459-PAEP (*knock-out*). Posteriormente dichas células fueron tripsinizadas y colocadas en placas de 100 cm donde se comenzó la selección con G418 durante 14 días permitiendo la formación de colonias resistentes al antibiótico. Para obtener las células de cada colonia, se utilizaron anillos de clonado ó *CloningRings*, los cuales son pequeños cilindros de plástico de 7 mm que fueron colocados sobre cada colonia previamente identificada bajo la luz azul en el microscopio. Se agregó dentro de cada anillo de clonado 50  $\mu$ l de Tripsina 0,5%, se incubó 3 min en estufa y las células obtenidas fueron colocadas en placas MW-24 con 500  $\mu$ l de medio de cultivo. Aquellas colonias que mantuvieron un potencial de crecimiento y lograron llegar a confluencia en la placa, fueron tripsinizadas y colocados en placas de mayor superficie.

### 7.6. Genotipificación de las líneas monoclonales

El ADN genómico aislado a partir de las líneas monoclonales transgénicas fue empleado para la caracterización molecular tanto de la integración del transgén *mFAT-2* como para los estudios de secuenciación del locus de la  $\beta$ -lactoglobulina. Los primers utilizados se detallan en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Información de primers para la genotipificación.

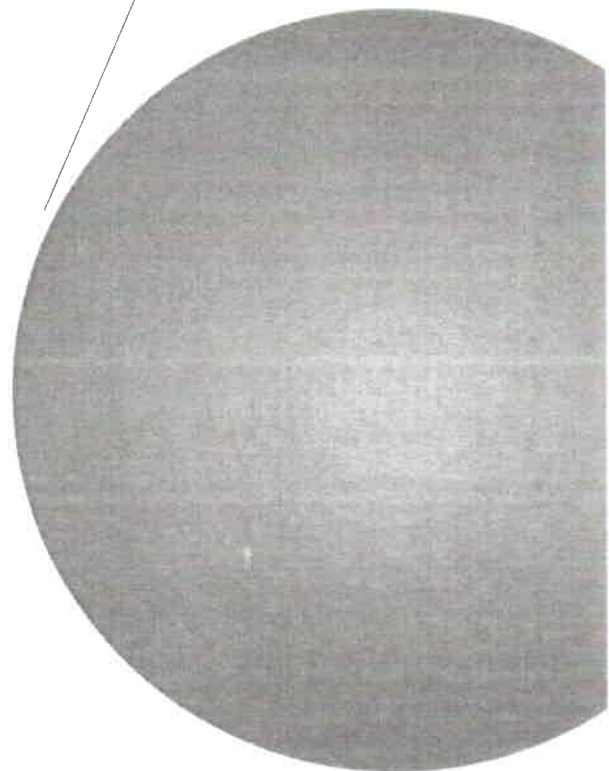
Primers	Secuencias de Primers (5'→3')	Tamaño del amplicón	Interpretación
FAT2-F (a)	TGTAGTGCAGATACTTGAAAAACCA	369 pb	Inserción de <i>mFAT-2</i> (SB)
FAT2-R (b)	ACTATAGCGTGTACACATTCGTCAA		
bPAEP-F (c)	GTAGAGGAAGCAACCCAGGGCCCA	471 pb (WT*)	Detección de mutaciones mono o bi-alélicas
bPAEP-R (d)	ATGCAAGACACTAAACGCCTGGTTG		

\*WT: wild type.

Los primers FAT-2 fueron empleados para detectar la presencia en el genoma del transgén *mFAT-2* en colonias resistentes a neomicina. Por otro lado, los primers bPAEP fueron utilizados para determinar las mutaciones en el locus de la  $\beta$ -lactoglobulina mediante secuenciación de Sanger llevado a cabo en la Unidad Genómica del INTA Castelar.

# **CAPÍTULO II**

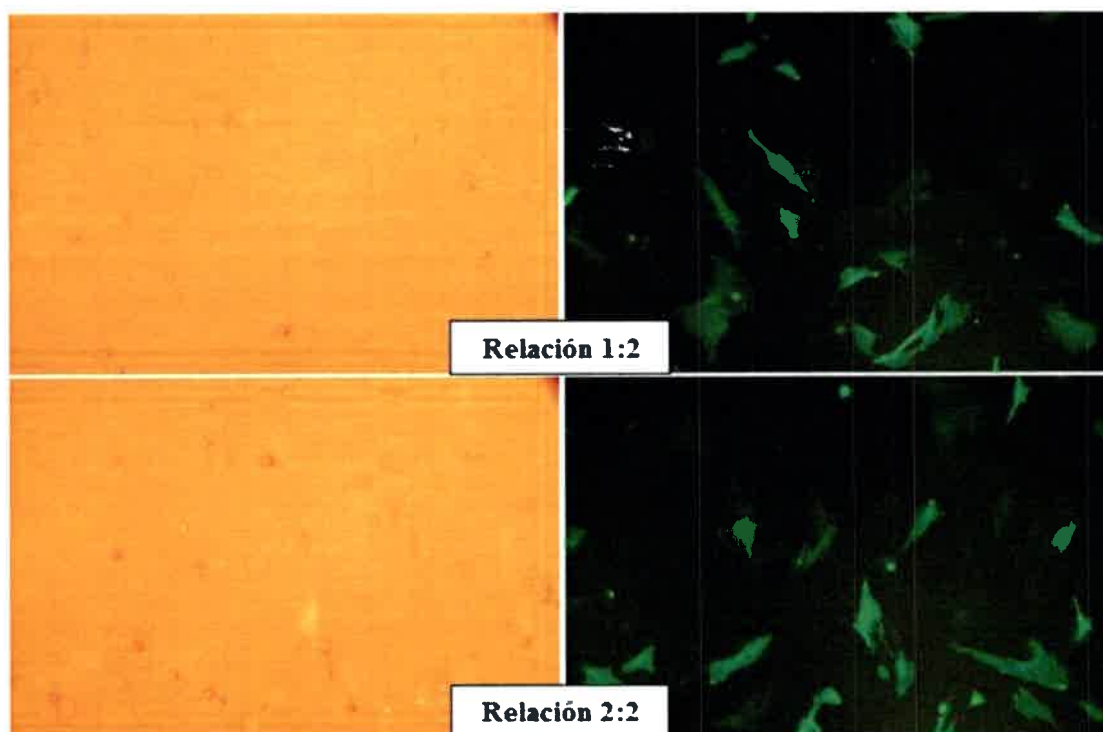
## **RESULTADOS**



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Optimización de la tasa de transfección de fibroblastos fetales bovinos con el vector CRISPR/Cas9

Para evaluar la actividad del sistema CRISPR/Cas9 se transfectaron  $0,5 \times 10^6$  fibroblastos fetales bovinos (FFBs) con 2  $\mu\text{g}$  del plásmido pX459-PAEP utilizando el agente químico polietilenimina (PEI). Como control de la eficiencia de transfección se utilizó el plásmido *pmax*-GFP (conteniendo el gen marcador de la proteína verde fluorescente) sometido a los mismos tratamientos que el vector de interés (Relaciones  $\mu\text{l PEI}/\mu\text{g ADN}$  1:2 y 2:2). La expresión de GFP a las 48 hs post-transfección fue similar para ambos tratamientos, sin embargo, se observaron menor cantidad total de células en el tratamiento con 2  $\mu\text{l}$  del agente químico, indicativo de una mayor citotoxicidad (Fig. 36). Luego de 3 días de selección con 1,3 mg/ml de puomicina, las células fueron recuperadas para llevar a cabo el ensayo con la endonucleasa T7.



**Figura 36.** Microfotografía de fibroblastos 48 hs luego de la transfección con el plásmido *pmax*-GFP usando las relaciones 1:2 y 2:2 ( $\mu\text{l PEI}:\mu\text{g ADN}$ ).

## 8.2. Actividad de mutagénica del sgARN sobre el locus de la $\beta$ -lactoglobulina en fibroblastos fetales bovinos

Para determinar la eficiencia de nuestro sistema CRISPR/Cas9 para mediar una disrupción en el locus endógeno de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina (Fig. 37A), fibroblastos fetales bovinos fueron transfectados con el plásmido pX459-PAEP el cual co-expresa el sgARN y la nucleasa asociada Cas9 y seleccionados 3 días con el antibiótico puromicina (1,3mg/ml). El ADN genómico proveniente de las células transfectadas fue utilizado en un ensayo de clivaje in vitro. Este análisis emplea la endonucleasa T7, la cual hidroliza específicamente heterodúplex formados luego de la hibridación de las secuencias de ADN de la población *wild type* y mutante. Luego del tratamiento con la enzima T7, los productos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Fig. 37B). La intensidad relativa de las bandas fue determinada empleando el software ImageJ y los valores se presentan a continuación:

	Intensidad relativa de la banda en el gel
a (producto de PCR sin digerir)	19,5
b (producto clivado)	13,9
c (producto clivado)	5,56

La fracción clivada se obtuvo empleando la siguiente fórmula:  $(b+c)/(a+b+c)$

$$(13,9+5,56)/(19,5+13,9+5,56) = 0,5$$

Finalmente se calculó el porcentaje de modificación génica como:

$$\% \text{ indels} = 100 \times (1 - (1 - \text{fracción clivada})^{1/2})$$

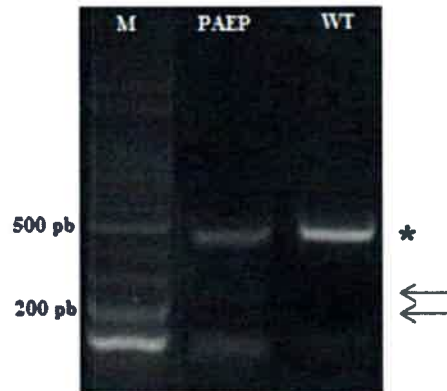
$$100 \times (1 - (1 - 0,5)^{1/2}) = 29\%$$



**A**

CCCAAGGATAGGCCAGGGGGGATTTCGGGGAACCGCGTGGCTGGGGGCCCGGCCCGGGCTGGCTGGCT  
 GGCCCTCCTCCTGTATAAGGCCCCGAGCCCACTGTCTCAGCCCTCCACTCCCTGCAGAGCTCAGAAGC  
 GTGACCCAGCTGCAGCCATG**AAGTGCCTCCTGCTTGCCCTGGCC**CTCACTTGTGGCGCCAGGCC  
 CTCATTGTCACCCAGACCATGAAGGGCCTGGATATCCAGAAGGTTTCGAGGGTGCCCGGGTGGGTGGTG  
 AGTTGCAGGGCAGGCAGGGGAGCTGGGCCTCAGAGACCAAGGGAGGCTGTGACGTCTGGGA

**B**



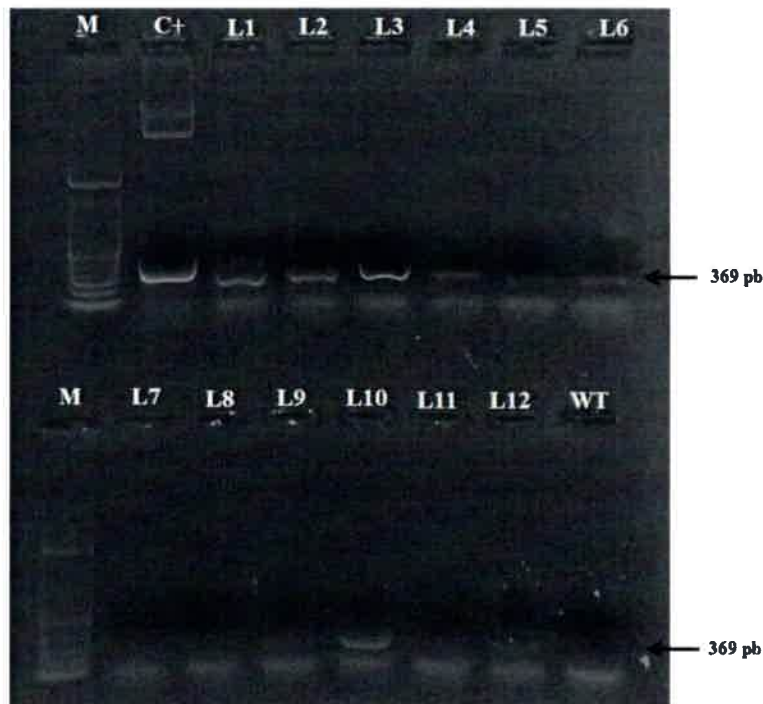
**Figura 37. Actividad del sistema CRISPR/Cas9 en fibroblastos fetales bovinos.** Fragmento del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina (PÁEP, AC\_000168.1) correspondiente a la secuencia target del sgRNA (naranja) ATG: inicio de la transcripción, TGG: PAM (A). El ADN genómico proveniente de FFBS transfectados con el pX459-PAEP fue utilizado en el ensayo T7 para la detección de mutaciones en el locus target. El producto de PCR corresponde a una banda de 481 pb, el producto sin clivar se indica con un asterisco, y las bandas generadas por el clivaje (193 pb y 234 pb) con flechas (B). M: marcador de peso molecular, PAEP: células transfectadas, WT: células no transfectadas.

Los resultados mostraron mutaciones en el exón 1 de la BLG en 29% del total de ADN proveniente de células transfectadas con el vector CRISPR/Cas9.

### 8.3. Evaluación in vitro de los constructos génicos para el knock-out de la $\beta$ -lactoglobulina y la incorporación de mFAT-2 en fibroblastos fetales bovinos.

Se llevó a cabo la selección de células resistentes a neomicina transfectadas con los vectores Sleeping Beauty (conteniendo la secuencia mFAT-2) y con el sistema CRISPR/Cas9 para generar el knock-out de la  $\beta$ -lactoglobulina. Se analizaron un total de

12 colonias para determinar la incorporación del transgén *mFAT-2* y posibles mutaciones en ambos alelos en la secuencia correspondiente al gen endógeno de la  $\beta$ -lactoglobulina. Los resultados del secuenciamiento revelaron que la secuencia de la  $\beta$ -lactoglobulina no presentó modificaciones en ninguna de las líneas analizadas. Por otro lado, el ADN genómico proveniente de las colonias resistentes al antibiótico utilizado para determinar la incorporación del transgén *mFAT-2* mostró la presencia del producto de amplificación de la secuencia de interés en 8 de las 12 colonias analizadas (67%) (Fig. 38).



**Figura 38.** Detección de la incorporación del transgén *mFAT-2* en las líneas monoclonales transfectadas con pT2/ $\alpha$ Cas-*mFAT-2*-His/Neo y pCMV(CAT)T7-SB100X. C (+): pmGENIE-3. WT (ADN genómico bovino sin transfectar).

#### 8.4. Producción de embriones bovinos knock-out mediante el sistema CRISPR/Cas9

Los ovocitos madurados in-vitro durante 22 hs fueron fertilizados y los presuntos cigotos se microinyectaron con el ARN mensajero de Cas9 y sgARN dirigido al locus de la  $\beta$ -lactoglobulina. Se inyectaron un total de 37 embriones, de los cuales el 100% sobrevivió al procedimiento de micromanipulación. El porcentaje de clivaje se evaluó a día 2, encontrándose para el grupo microinyectado un valor de 73%, sólo ligeramente inferior al grupo control (sin microinyectar) (Tabla 22).

**Tabla 22.** Parámetros de microinyección.

Solución de inyección CRISPR/Cas9 100 ng/μl mARN Cas9 30 ng/ μl sgARN	Cigotos microinyectados	Clivaje (%)	Blastocistos (%)
	37	73	25
	Nº de cigotos	Clivaje	Blastocistos
Control	10	100%	40%

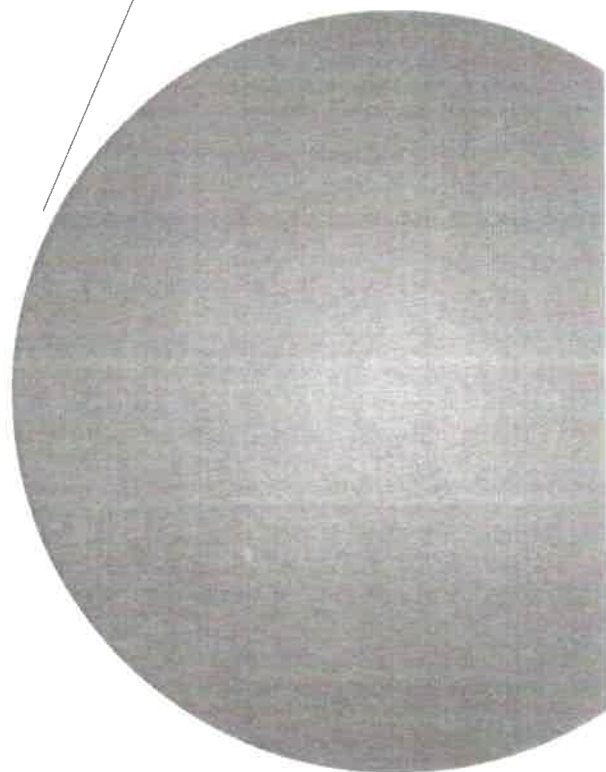
El ADN proveniente de los embriones microinyectados con el sistema CRISPR/Cas9 fue utilizado como molde en una reacción de PCR empleando los primersb-PAEP y dicho producto fue clonado en el vectorpMJ920 y secuenciado. Los resultados de los estudios de secuenciamiento empleando el primer bPAEP-F se muestran en la figura 39. Se secuenciaron un total de cinco blastocistos, cuatro microinyectados y un control sin microinyectar. Las secuencias provenientes de dos de los cuatro blastocistos microinyectados no pudieron ser analizadas debido a errores durante el secuenciamiento. De las dos muestras restantes, una mostró mutaciones en el sitio target que ocasionarían mutaciones puntuales y un corrimiento del marco de lectura.

Blastocisto	sgRNA	PAM	Indels
WT	ATGAAGTGCCTCCTGCTTGGCCCTGGCCCTCACTTGTGGCGCCCAGGCCCT		WT
#1	No fue posible analizar debido a errores durante el secuenciamiento.		-
#2	ATGAAGTGCCTCCTGCTTGGCCCTGGCCCTCACTTGTGGCGCCCAGGCCCT		-
#3	ATGAAGTGCCTCCTGCTTGT	NGC[GNCCA]GGCCCTCACTTGTGGCGCCA	Sust. 3 pb + Ins. 5 pb
#4	No fue posible analizar debido a errores durante el secuenciamiento.		-

**Figura 39.** Análisis de la secuencia del exón 1 del gen de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina. El ADN genómico proveniente de blastocistos microinyectados con el vector pX459-PAEP fue amplificado por PCR y los productos fueron secuenciados. Para cada embrión se muestra la secuencia target del sgRNA (naranja), la secuencia PAM (roja), los nucleótidos adicionados (verde) y los que fueron sustituidos por otros (azul).

# **CAPÍTULO II**

## **DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS**



## 9. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En las últimas décadas, la demanda por alimentos más saludables ha promovido la investigación en áreas vinculadas al desarrollo de alimentos funcionales, es decir, aquellos que poseen un potencial efecto benéfico para la salud. La leche de vaca es considerada un componente importante para la alimentación humana constituyendo una fuente importante de nutrientes. Es bien conocido que la  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína más abundante en el suero sanguíneo y está presente también en la leche en cantidades de alrededor de 2-4 g/L (Corredig, 2009). Dicha proteína está ausente en la leche humana y está asociada a cuadros alérgicos de alta prevalencia en niños (Li *et. al.*, 2014; Tsaouri *et. al.*, 2014).

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en particular, los ácidos grasos omega-3 y omega-6 son nutrientes esenciales no sólo para el desarrollo cerebral y cognitivo sino que también han sido implicados en el desarrollo de diversas enfermedades (Calder, 2004; Kris-Etherton *et. al.*, 2003; Lemaitre *et. al.*, 2003; Marik y Varon 2009; Roynette *et. al.*, 2004). Por tales motivos, las actuales tendencias nutricionales promueven un aumento en la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados y una reducción en el consumo de ácidos grasos saturados. Esto despertó un gran interés en el desarrollo de tecnologías que permitan modificar la composición de la leche bovina a través de la manipulación del genoma.

La aplicación de la transgénesis para la expresión de proteínas heterólogas en la leche fue reportada inicialmente en ratones (Gordon *et. al.*, 1992) y posteriormente se logró la incorporación de transgenes específicos de la lactación de interés farmacéutico en otras especies como cerdos (Wall *et. al.*, 1991), ovejas (Wright *et. al.*, 1991), cabras (Ebert *et. al.*, 1991) y vacas (Krimpenfort *et. al.*, 1991) las cuales ofrecen ventajas comparativas en relación a su uso como biorreactores.

En el presente estudio, se desarrolló un vector de expresión para la proteína FAT-2 que fue incorporado dentro del genoma de fibroblastos fetales bovinos mediante el fenómeno de transposición. Al mismo tiempo, sobre las mismas células bovinas se intentó llevar a cabo la mutación del gen endógeno de la  $\beta$ -lactoglobulina a través de los cortes en el ADN dirigidos por el sistema CRISPR/Cas9.

Recientemente, dos estudios independientes llevados a cabo empleando la secuencia *fat-1* del nematodo *C. elegans* optimizadas, fueron capaces de generar cerdos (Lai *et. al.*, 2006) y

vacas (Wu *et. al*, 2012) transgénicas que expresan la proteína FAT-1 mostrando altos niveles de ácidos grasos omega-3 en el tejido muscular y en la leche respectivamente.

Otras desaturasas de ácidos grasos provenientes de *C. elegans* han logrado convertir in vitro ácidos grasos  $\omega$ -6 en  $\omega$ -3 de manera muy eficiente en células cardíacas de ratas (Kang *et. al*, 2001). También se analizó la funcionalidad de desaturasas vegetales en cerdos transgénicos, cuyos adipocitos mostraron cantidades de omega-6 diez veces mayores que en aquellos cerdos no transgénicos (Saeki *et. al*, 2004).

Si bien la modificación del locus endógeno de la BLG en bovinos ha sido lograda exitosamente por Yu *et. al*, en 2011 utilizando ZFNs, éstas nucleasas son difíciles de diseñar y producir en comparación con las tecnologías emergentes basadas en el sistema CRISPR/Cas9. En el presente estudio, las modificaciones dirigidas al locus de la BLG alcanzaron una eficiencia del 29% en ensayos in vitro mediante la transfección de FFBs con el vector para el knockout (KO). Desafortunadamente cuando el vector para el KO fue co-transfectados junto con los vectores para la expresión del transgén *mFAT-2* en FFBs, no se logró generar mutaciones en el locus endógeno de la BLG. Esto puede atribuirse a una reducción en la eficiencia de transfección provocada por el transporte simultáneo de diferentes plásmidos. Las diferencias en cuanto al tamaño y a la carga de los ácidos nucleicos afectan la formación de los complejos de transfección y su pasaje a través de la membrana plasmática como así también su transporte hasta el núcleo. Adicionalmente se trabajó con vectores que no contenían genes reporteros, lo cual nos imposibilitó determinar si la transfección fue exitosa. Estos factores sumados a la dificultad de transfectar cultivos primarios como fibroblastos fetales bovinos, seguramente impactaron negativamente sobre la eficiencia de la transfección. A pesar de ello, se logró generar 8 líneas monoclonales transgénicas en las que se demostró la presencia del transgén *mFAT-2*.

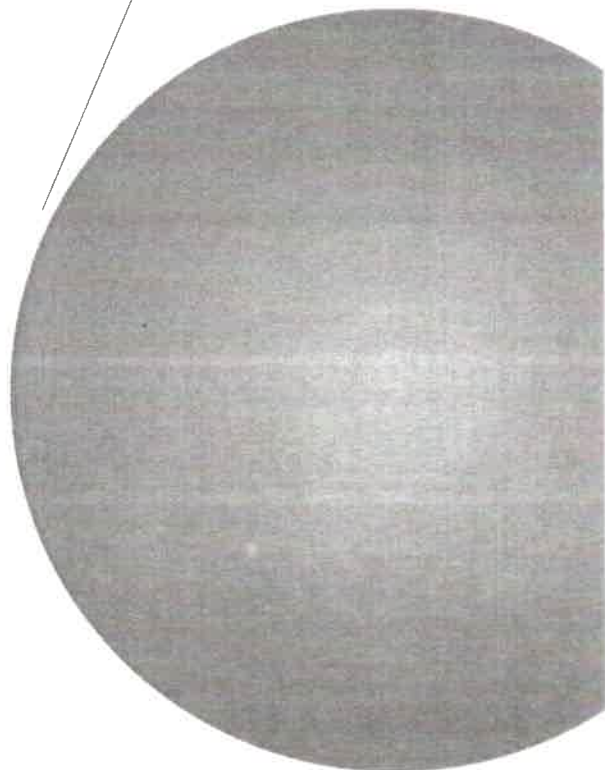
En conclusión, nuestros resultados demuestran que el transgén *mFAT-2* fue incorporado con éxito dentro del genoma bovino. Dichas células modificadas podrán ser empleadas en experimentos de clonado por transferencia nuclear de células somáticas para la generación de vacas transgénicas que expresen la desaturasa FAT-2 en la glándula mamaria lo cual mejoraría la proporción de ácidos grasos poliinsaturados ( $\omega$ -6 y  $\omega$ -3) en la leche de estos animales.

La funcionalidad de la proteína FAT-2 in vitro en células de glándula mamaria bovina se está llevando a cabo en el laboratorio con el objetivo de demostrar que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados ( $\omega$ -6 y  $\omega$ -3) se incrementó debido a la presencia del gen heterólogo *mFAT-2* en el genoma de dichas células. Nuestro mayor desafío para el futuro será generar

vacas transgénicas knockout para el locus de la  $\beta$ -lactoglobulina y que presenten a su vez una expresión funcional del transgén *mFAT-2*, promoviendo una modificación no sólo en el perfil lipídico de la leche mediante incrementos en la proporción de ácidos grasos omega-3 y 6 sino también eliminando el principal alérgeno lácteo, la BLG. Ésta estrategia permitiría mejorar la calidad de la leche vacuna para consumo humano satisfaciendo la demanda de ácidos grasos poliinsaturados y evitándose los problemas asociados al consumo de  $\beta$ -lactoglobulina.

Esto ampliaría las posibilidades de modificar la composición de la leche de animales domésticos mediante tecnologías transgénicas que incluyan el uso de transposones y CRISPR.

# **BIBLIOGRAFÍA**





## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka KF, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K. (2015) Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol.* 16:87. doi: 10.1186/s13059-015-0653-x.
- Akagi S, Geshi M, Nagai T. (2013) Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *AnimSci J.* 84(3):191-9. doi: 10.1111/asj.12035.
- Alberio R, Brero A, Motlik J, Cremer J, Wolf E y Zakhartchenko I. (2001) Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *MolReprodDev*59(4): 371-9.
- Alberio R, Johnson AD, Stick R y Campbell KH (2005) Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Experimental Cell Research* 307 131–141.
- Alberio R, Campbell KH, Johnson AD (2006) Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction.* 132(5):709-20.
- Alessio A, Fili A, Forcato D, Olmos Nicotra F, Alustiza F, Rodriguez N, Owens J, Moisyadi S, Kues WA, Bosch P. (2014) Efficient piggybac transposon-mediated transgene integration into bovine fetal fibroblast genome. *Reproduction in Domestic Animals. Volumen 49 (Suplemento 1) Pag. 1-52. ISSN: 1439-0531.*
- Alessio AP, Fili AE, Garrels W, Forcato DO, Olmos Nicotra MF, Liaudat AC, Bevacqua RJ, Savy V, Hiriart MI, Talluri TR, Owens JB, Ivics Z, Salamone DF, Moisyadi S, Kues WA, Bosch P. (2015) Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle. *Theriogenology.* 85(7):1297-1311.e2. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.016.
- Archibald AL, Bolund L, Churcher C, Fredholm M, Groenen MA, Harlizius B, Lee KT, Milan D, Rogers J, Rothschild MF, Uenishi H, Wang J, Schook LB, (2010) Pig genome sequence analysis and publication strategy. *BMC Genomics* 11, 438. doi: 10.1186/1471-2164-11-438.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican D, Pollock J, Destrempes M, Cammuso C, Williams J, Nims S, Porter CA, Midura P. (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*17(5): 456-61.
- Bai DP, Yang MM, Chen YL. (2012) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in Cashmere goat fetal fibroblast cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(5):933-7.
- Bao L, Chen H, Jong U, Rim C, Li W, Lin X, Zhang D, Luo Q, Cui C, Huang H, Zhang Y, Xiao L, Fu Z (2014) Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci* 57(2):263–268. doi: 10.1007/s11427-013-4601-2.

- Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, Martins LT, Tavares KC, Bertolini M, Murray JD. (2016) The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic Res.* (3):329-43. doi: 10.1007/s11248-016-9933-9.
- Bilodeau-Goeseels S. (2012) Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence?. *ReprodDomest Anim.* 47(4):687-93. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01924.x.
- Bó GA, Peres LC, Cutaia LE, Pincinato D, Baruselli PS, Mapletoft RJ (2011) Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *ReprodFertilDev.* 24(1):272-7. doi: 10.1071/RD11918.
- Bosch P, Forcato DO, Alustiza FE, Alessio AP, Fili AE, Olmos Nicotra MF, Liaudat AC, Rodríguez N, Talluri TR, Kues WA. (2015) Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cell Mol Life Sci* doi:10.1007/s00018-015-1842-1.
- Bosch P, Hodges CA y Stice SL. (2004) Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *BiotechnologiaAplicada.* 21(3): p. 128-136.
- Bressan F, Dos Santos Miranda M, Perecin F, De Bem TH, Pereira FT, Russo-Carbolante EM, Alves D, Strauss B, Bajgelman M, Krieger JE, Binelli M, Meirelles FV. (2011) Improvement production of genetically modified fetuses with homogeneous transgene expression after transgene integration site analysis and recloning in cattle. *Cellular Reprogramming.* 13(1):29-36.
- Brondyk WH (2009) Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol* 463:131-147. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63011-1.
- Butler JR, Martens GR, Estrada JL, Reyes LM, Ladowski JM, Galli C, Perota A, Cunningham CM, Tector M, Joseph Tector A. (2016) Silencing porcine genes significantly reduces human-anti-pig cytotoxicity profiles: an alternative to direct complement regulation. *Transgenic Res.* 25(5):751-9. doi: 10.1007/s11248-016-9958-0.
- Calder PC (2004) n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 107(1):1-11.
- Campbell K, McWhir J, Ritchie WA y Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380(6569): 64-6.
- Canel N, Bevacqua R, Fernández-Martín R, Salamone DF (2010) Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cell Reprogram* 12(4):491-9. doi: 10.1089/cell.2009.0109.

- Carlson DF, Garbe JR, Tan W, Martin MJ, Dobrinsky JR, Hackett PB, Clark KJ, Fahrenkrug SC. (2011) Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Res* 20(5):1125-37. doi: 10.1007/s11248-010-9481-7.
- Carlson DF, Tan W, Hackett PB, Fahrenkrug SC (2013) Editing livestock genomes with site-specific nucleases. *ReprodFertilDev* 26(1):74–82. doi: 10.1071/RD13260.
- Chen YT, Furushima K, Hou PS, Ku AT, Deng JM, Jang CW, Fang H, Adams HP, Kuo ML, Ho HN, Chien CL, Behringer RR (2010) PiggyBac transposon-mediated, reversible gene transfer in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Jun;19(6):763-71. doi: 10.1089/scd.2009.0118.
- Chesne P, Adenot P, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L y Renard J. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*20(4): 366-9.
- Chung SI, Moon H, Kim DY, Cho KJ, Ju HL, Kim do Y, Ahn SH, Han KH, Ro SW.(2016) Development of a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma with a liver fibrosis background. *BMC Gastroenterol.* 16(1):13. doi: 10.1186/s12876-016-0423-6.
- Clark KJ, Carlson DF, Foster LK, Kong BW, Foster DN, Fahrenkrug SC (2007) Enzymatic engineering of the porcine genome with transposons and recombinases. *BMC Biotechnol* 7:42.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 15;339(6121):819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
- Corredig, M. (2009) Dairy-derived ingredients. Food and nutraceutical uses. Cambridge, UK :Woodhead Publishing.
- Crispo M, Mulet AP, Tesson L, Barrera N, Cuadro F, dos Santos-Neto PC, Nguyen TH, Crénéguy A, Brusselle L, Anegón I, Menchaca A. (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One.* 2015 Aug 25;10(8):e0136690. doi: 10.1371/journal.pone.0136690.
- Dafa'alla TH, Condon GC, Condon KC, Phillips CE, Morrison NI, Jin L, Epton MJ, Fu G, Alphey L.(2006) Transposon-free insertions for insect genetic engineering. *Nature Biotechnol.*24, 820 – 821.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. (2005) Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell.* 122(3): p. 473-83.
- Doherty, JE, Huye LE, Yusa K, Zhou L, Craig NL, Wilson MH. (2012) Hyperactive piggyBac gene transfer in human cells and in vivo. *Hum. Gene Ther.* 23, 311–320. doi: 10.1089/hum.2011.138.

- Dunner S, Me'nissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscléd phenotype in cattle. *Nat Genet* 17(1):71–74.
- Ebert K, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA, Gordon K.. (1991) Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)* 9, 835–838.
- Ellis J (2005) Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 16(11):1241-6.
- Feng W, Dai Y, Mou L, Cooper DK, Shi D, Cai Z. (2015) The potential of the combination of CRISPR/Cas9 and pluripotent stem cells to provide human organs from chimaeric pigs. *Genome Biol.* 2015 Apr 29;16:87.doi: 10.3390/ijms16036545.
- Galli C, I Lagutina, APerota, S Colleoni, R Duchi, F Lucchini y Lazzari I. (2012) Somatic Cell Nuclear Transfer and Transgenesis in Large Animals: Current and Future Insights. *Reprod Dom Anim* 47, (Suppl. 3), 2–11.doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02045.x.
- Garrels W, Ma'te's L, Holler S, Dalda A, Taylor U, et al. (2011) Germline Transgenic Pigs by Sleeping Beauty Transposition in Porcine Zygotes and Targeted Integration in the Pig Genome. *PLoS ONE* 6(8): e23573. doi: 10.1371/journal.pone.0023573.
- Garrels W, Talluri TR, Bevacqua R, Alessio A, Fili A, Forcato D, Rodriguez N, Olmos Nicotra MF, Ivics Z, Salamone D, Bosch P, Kues WA. (2015) Sleeping Beauty Transgenesis in Cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 27(1):266.
- Garrels W, Ivics Z, Kues WA (2012) Precision genetic engineering in large mammals. *Trends Biotechnol.* 30(7):386-93. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.03.008.
- Garrels W, Talluri TR, Apfelbaum R, Carratalá YP, Bosch P, Pöttsch K, Grueso E, Ivics Z, Kues WA. One-step Multiplex Transgenesis via Sleeping Beauty Transposition in Cattle. *Sci Rep.* 2016 Feb 24;6:21953. doi: 10.1038/srep21953.
- Geurts A, Hackett C, Bell J, Bergemann T, Collier L, Carlson C, Largaespada D, Hackett P, (2006) Structure-based prediction of insertion-site preferences of transposons into chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 34(9), 2803-2811).
- Gordon K, Lee E, Vitale JA, Smith AE, Westphal H, Hennighausen L. (1987) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology* 24, 425–428 (1992).
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Guivernau M, Meza N, Barja P, Roman O (1994) Clinical and experimental study on the long-term effect of dietary gamma-linolenic acid on plasma lipids, platelet aggregation, thromboxane formation, and prostacyclin production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 51(5):311-6 .

- Gurumurthy CB, Takahashi G, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M. (2016) GONAD: A Novel CRISPR/Cas9 Genome Editing Method that Does Not Require Ex Vivo Handling of Embryos. *CurrProtoc Hum Genet.* 88:15.8.1-15.8.12. doi: 10.1002/0471142905.hg1508s88.
- Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 24(3):372-375. doi: 10.1038/cr.2014.11.
- Han H, Ma Y, Wang T, Lian L, Tian X, Hu R et al. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front AgrSci Eng.* 2014; 1(1):2-5.
- Hibbeln JR (1998) Fish consumption and major depression. *Lancet* 351(9110):1213.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. (2000) Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *BiolReprod* 63, 1787-1794.).
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2006). Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *MolTher.* 13(1):59-66.
- Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K (2014) Single-Step Generation of Rabbits Carrying a Targeted Allele of the Tyrosinase Gene Using CRISPR/Cas9. *Exp Anim.* 2014; 64(i):31-7. doi: 10.1538/expanim.14-0034.
- Hu S, Ni W, Sai W, Zhang H, Cao X, Qiao J, Sheng J, Guo F, Chen C. (2011) Sleeping Beauty-mediated knockdown of sheep myostatin by RNA interference. *Biotechnol Lett* 33(10):1949-53. doi: 10.1007/s10529-011-0667-8.
- Humpherys, D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, D. Biniszkiwicz, Yanagimachi R y Jaenisch R. (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293(5527): 95-7.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH. (2004) Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* (10.1126/science. 1094 515).
- Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, Cibelli JB.(2008) Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 10(3):371-9. doi: 10.1089/clo.2007.0002.
- Jiang BC, Kaleri HA, Zhang HX, Chen J, Liu HL (2011) Application of the Sleeping Beauty system in Saanen goat fibroblast cells for establishing persistent transgene expression. *Genet Mol Res* 10(4):3347-55. doi: 10.4238/2011.
- Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J (2013) RNA programmed genome editing in human cells. *Elife (Cambridge)* 2:e00471. doi: 10.7554/eLife.00471.

- Kang, J.X.; Wang, J.; Wu, L.; Kang, Z.B. (2004) Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 2004, 427, 504. doi: 10.1002/ijc.29956.
- Kang, Z. B., Ge, Y., Chen, Z., Cluette-Brown, J., Laposata, M., Leaf, A. & Kang, J. X. (2001) Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans* n-3 fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4050–4054.
- Kao BT, Lewis KA, DePeters EJ, Van Eenennaam AL (2006) Endogenous production and elevated levels of long-chain n-3 fatty acids in the milk of transgenic mice. *J Dairy Sci* 89(8):3195-201.
- Kato Y, Tani T y Tsunoda Y. (2000) Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 120(2): 231-7.
- Kazazian HH Jr (2011) Mobile DNA transposition in somatic cells. *BMC Biol.* 29;9:62. doi: 10.1186/1741-7007-9-62.
- Kettlun C, Galvan DL, George AL Jr, Kaja A, Wilson MH. (2011) Manipulating piggyBac transposon chromosomal integration site selection in human cells. *Mol. Ther.* 19, 1636–1644. doi: 10.1038/mt.2011.129.
- Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15(5):321–334. doi: 10.1038/nrg3686.
- Kim S, Saadeldin IM, Choi WJ, Lee SJ, Lee WW, Kim BH, Han HJ, Bang du H, Lee BC, Jang G. (2011) Production of transgenic bovine cloned embryos using piggybac transposition. *J Vet Med Sci* 2011;73:1453–7.
- Kimura H, Tada M, Nakatsuji N y Tada T (2004) Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Molecular and Cellular Biology* 24 5710–5720.
- Kinney, A.J.; Browse, J. (1997) Identification of an animal-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 1142–1147.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, van den Broek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R (1991) Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology (NY)* 9, 844–847.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, Committee N (2003) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2):e20-30.
- Kues WA, Niemann H. (2004) The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* 22(6):286-94.

- Lai L, Kang J, Li R, Wang J, Witt WT, Yong HY, Hao Y, Wax DM, Murphy C, Rieke A. (2006) Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 435–436.
- Lanier JS, Corl BA. (2015) Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids. *J AnimSciBiotechnol.* 2015 Jun 12;6(1):26. doi: 10.1186/s40104-015-0025-0.
- Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 123(3):273-80.
- Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients.* 2016 Jan 4;8(1). pii: E23. doi: 10.3390/nu8010023.
- Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D, Kuller LH, Tracy RP, Siscovick DS (2003) n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr* 77(2):319-25.
- Li X, Burnight ER, Cooney AL, Malani N, Brady T, Sander JD, Staber J, Wheelan SJ, Joung JK, McCray PB Jr, Bushman FD, Sinn PL, Craig NL. (2013) piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 110, E2279–E2287. doi: 10.1073/pnas.1305987110.
- Li G, White K y Bunch T. (2004) Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* 6(1): 5-13.
- Li MA, Turner DJ, Ning Z, Yusa K, Liang Q, Eckert S, Rad L, Fitzgerald TW, Craig NL, Bradley A (2011) Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res.* 39, e148. doi: 10.1093/nar/gkr764.
- Li X, Yuan S, He S, Gao J, Chen H (2014b) Identification and characterization of the antigenic site (epitope) on bovine  $\beta$ -lactoglobulin: common residues in linear and conformational epitopes. *J Sci Food Agric.* 95(14):2916-23. doi: 10.1002/jsfa.7033.
- Li Z, Michael IP, Zhou D, Nagy A, Rini JM. (2013) Simple piggyBac transposon-based mammalian cell expression system for inducible protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 26;110(13):5004-9. doi: 10.1073/pnas.1218620110.
- Li Z, Zeng F, Meng F, Xu Z, Zhang X, Huang X, Tang F, Gao W, Shi J, He X, Liu D, Wang C, Urschitz J, Moisyadi S, Wu Z. (2014) Generation of Transgenic Pigs by Cytoplasmic Injection of piggyBac Transposase Based pmGENIE-3 Plasmids. *Biol Reprod* 8;90(5):93. doi: 10.1095/biolreprod.113.116905.
- Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, Liu X, Zhao E, Wang C, Lin S, Jing B, Si C, Lin Q, Chen X, Lin H, Pu X, Wang Y, Qin B, Wang F, Wang H, Si W, Zhou J, Tan T, Li T, Ji S, Xue Z, Luo Y, Cheng L, Zhou Q, Li S, Sun YE, Ji W (2014)

- TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14(3):323–328. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.018.
- Liu L, Mah C, Fletcher B (2006) Sustained FVIII expression and phenotypic correction of hemophilia A in neonatal mice using an endothelial-targeted sleeping beauty transposón. *Mol Ther.* 13(5): p. 1006-15.
- Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2013) Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565. doi: 10.1038/ncomms3565.
- Liu X, Bai C, Ding X, Wei Z, Guo H, Li G (2015) Microarray Analysis of the Gene Expression Profile and Lipid Metabolism in Fat-1 Transgenic Cattle. *PLoS One.* 2015 Oct 1;10(10):e0138874. doi: 10.1371/journal.pone.0138874.
- Mantegazza R, Cordiglieri C, Consonni A, Baggi F. (2016) Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations. *Int J Gen Med.* 9:53-64. doi: 10.2147/IJGM.S88552.
- Marh J, Stoytcheva Z, Urschitz J, Sugawara A, Yamashiro H, Owens JB, Stoytchev I, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2012) Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;109(47):19184-9. doi: 10.1073/pnas.1216473109.
- Marik PE, Varon J (2009) Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review. *Clin Cardiol* 32(7):365-72. doi: 10.1002/clc.20604.
- McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36 (6):344-355.
- McWhir, J. (2002) Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Methods Mol Biol*, 180: p. 3-23. DOI:10.1385/1-59259-178-7:003.
- Michaelis M, Sobczak A, Weitzel JM. (2014) In vivo microinjection and electroporation of mouse testis. *J Vis Exp.* 2014 Aug23;(90). doi: 10.3791/51802.
- Mitra R, Fain-Thornton J, Craig NL (2008) piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *Embo J* 27(7):1097-109. doi: 10.1038/emboj.2008.41.
- Moro LN, Hiriart MI, Buemo C, Jarazo J, Sestelo A, Veraguas D, Rodriguez-Alvarez L, Salamone DF. (2015) Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. *Reproduction.* 150(1):1-10. doi: 10.1530/REP-15-0048.
- Muñoz-López M, García-Pérez JL (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics.* 11(2):115-28. doi: 10.2174/138920210790886871.
- Murray JD, Mohamad-Fauzi N, Cooper CA, Maga EA (2010) Current status of transgenic animal research for human health application. *Acta Sci Vet* 38(Supl 2):627–632.



- Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C (2014) Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE* 9(9):e106718. doi: 10.1371/journal.pone.0106718.
- Niemann H y Lucas-Hahn A. (2012) Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *ReprodDomest Anim.* 47 Suppl 5:2-10. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x.
- Niemann H, Kues WA (2007). Transgenic farm animals: an update. *ReprodFertilDev.* 19(6):762-70.
- Norgren, R.B., Jr. (2004). Creation of non-human primate neurogenetic disease models by gene targeting and nuclear transfer. *ReprodBiolEndocrinol*2: p. 40.
- Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, Miller AL, Troskie HE, Wilson KL, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, McMillan V, TervitHR, Wells DN (2003). Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells.* 5(1):3-12. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 23;16(3):6545-56.
- Owens J, Mauro D, Stoytchev I, Bhakta MS, Kim MS, Segal DJ, Moisyadi S.. (2013) Transcription activator like- effector (TALE) directed piggyBac transposition in human cells. *Nucleic Acid s Res.* 41,9197– 9207. doi: 10.1093/nar/gkt677.
- Owens J, Urschitz J, Stoytchev I, Dang NC, Stoytcheva Z, Belcaid M, Maragathavally KJ, Coates CJ, Segal DJ, Moisyadi S.. (2012) Chimeric piggyBac transposases for genomic targeting in human cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 6978–6991. doi: 10.1093/nar/gks309.
- Park TS, Han JY (2012) piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(24):9337-41. doi: 10.1073/pnas.1203823109.
- Paruzynski A, Arens A, Gabriel R, Bartholomae CC, Scholz S, Wang W, Wolf S, Glimm H, Schmidt M, von Kalle C (2010). Genome-wide high throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. *NatProtoc.* 5(8):1379-95. doi: 10.1038/nprot.2010.87.
- Peng J, Wang Y, Jiang J, Zhou X, Song L, Wang L, Ding C, Qin J, Liu L, Wang W, Liu J, Huang X, Wei H, Zhang P. (2015) Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR/Cas9-Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes. *Sci Rep.* 12;5:16705. doi: 10.1038/srep16705.
- Peyou-Ndi MM, Watts JL, Browse J. (2000) Identification and characterization of an animal delta(12) fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *ArchBiochemBiophys.* 15;376(2):399-408.

- Polejaeva I, Mitalipov S.(2013) Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms.*Reproduction*7;145(3):R81-8.doi: 10.1530/REP-12-0396.
- Raina A, Kumar S, Shrivastava R, Mitra A. (2015) Testis mediated gene transfer: in vitro transfection in goat testis by electroporation. *Gene*. 2015 Jan 1;554(1):96-100.doi: 10.1016/j.gene.2014.10.030.
- Rogers CS (2016) Genetically engineered livestock for biomedical models. *Transgenic Res.*(3):345-59.doi: 10.1007/s11248-016-9928-6.
- Römpler H, Dear PH, Krause J, Meyer M, Rohland N, Schöneberg T, Spriggs H, Stiller M, Hofreiter M. (2006) Multiplex amplification of ancient DNA.*Nat Protoc.* 1(2):720-8.
- Royette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C (2004) n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr* 23(2):139-51.
- Ruan J, Li H, Xu K, Wu T, Wei J, Zhou R, Liu Z, Mu Y, Yang S, Ouyang H, Chen-Tsai RY, Li K. (2015) Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs.*Sci Rep.* 2015 Sep 18;5:14253. doi: 10.1038/srep14253.
- Sabikhi L (2007) Designer milk. *Adv Food Nutr Res* 53:161-98
- Saeki K, Matsumoto K, Kinoshita M, Suzuki I, Tasaka Y, Kano K, Taguchi Y, Mikami K, Hirabayashi M, Kashiwazaki N, Hosoi Y, Murata N, Iritani A. (2004) Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6361-6.
- Saha S, Woodard LE, Charron EM, Welch RC, Rooney CM, Wilson MH (2015) Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells. *Nucleic Acids Res* 43, 1770–1782.doi: 10.1093/nar/gkv017.
- Saridey SK, Liu L, Doherty JE, Kaja A, Galvan DL, Fletcher BS, Wilson MH.(2009) PiggyBac transposon-based inducible gene expression in vivo after somatic cell gene transfer.*Mol. Ther.* 17, 2115–2120.doi: 10.1038/mt.2009.234.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L y Westhusin M. (2002) A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415(6874): 859.
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2007) Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res.* 16(3):333-9.
- Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E. (2015) A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications.*Genetics.* 2015 Jan;199(1):1-15. doi: 10.1534/genetics.114.169771.

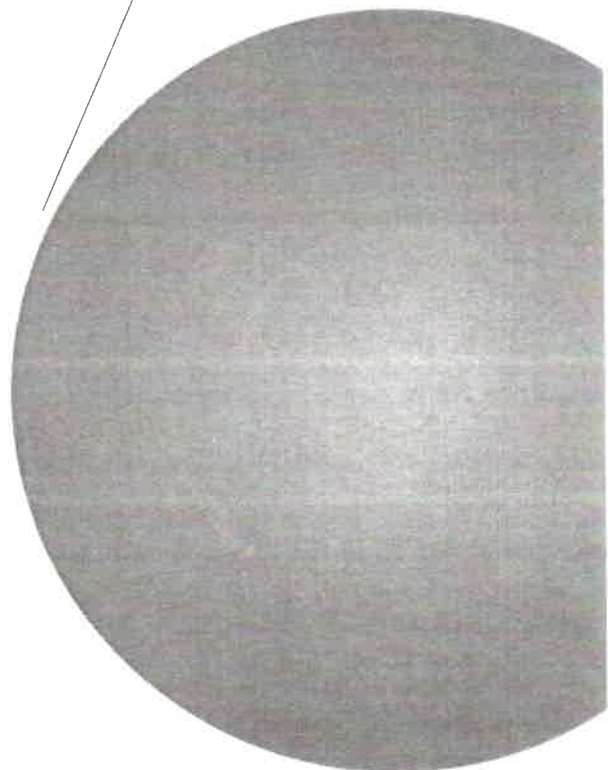
- Song H, Li H, Huang M, Xu D, Wang Z, Wang F. (2016) Big Animal Cloning Using Transgenic Induced Pluripotent Stem Cells: A Case Study of Goat Transgenic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Reprogram.* 18(1):37-47. doi: 10.1089/cell.2015.0035.
- Stamey Lanier J, Suagee JK, Becvar O, CorlBASpychalla, J. (2013) Mammary uptake of fatty acids supplied by intravenous triacylglycerol infusion to lactating dairy cows. *Lipids.* 2013 May;48(5):469-79. *Stem Cells Dev.* 19(6):763-71. doi: 10.1007/s11745-013-3782-6.
- Stice SL y Keefer CL. (1993) Multiplegenerational bovine embryo cloning. *Biol Reprod.* 1993. 48(4):715-9.
- Takahashi G, Gurumurthy CB, Wada K, Miura H, Sato M, Ohtsuka M (2015) GONAD: Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery system: a novel microinjection independent genome engineering method in mice. *Sci Rep.* 22;5:11406. doi: 10.1038/srep11406.
- Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, Fahrenkrug SC (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(41):16526–16531. doi: 10.1073/pnas.1310478110.
- Tsabouri S, Douros K, Priftis KN (2014) Cow's milk allergenicity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 14(1):16-26
- Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, Morozumi K, Yamashiro H, Stoytchev I, Marh J, Dee JA, Kawamoto K, Coates CJ, Kaminski JM, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S. (2010) Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(18): p. 8117-22. doi: 10.1073/pnas.1003674107.
- Vajta G, Lewis IM y Tecirlioglu RT (2006) Handmade somatic cell cloning in cattle. *Methods Mol Biol.* 348:183-96.
- vanLuenen HG, Colloms SD, Plasterk RH. (1994) The mechanism of trans-position of Tc3 in *C. elegans*. *Cell* 1994;79:293– 301 .
- Wakayama T y Yanagimachi R. (2001) Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol. Reprod. Dev.* 58, 376–383.
- Wakayama T, Rodriguez I, Perry ACF, Yanagimachi R y Mombaerts P. (1999). Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14984–14989.
- Wakayama, T., A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson and R. Yanagimachi. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394(6691): 369-74.
- Wal JM (2004) Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 93(5 Suppl 3):S2-11

- Wall R, Pursel VG, Shamay A, McKnight RA, Pittius CW, Hennighausen L.(1991). High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 1696–1700.
- Wall RJ, Pursel VG, Shamay A, McKnight RA, Pittius CW, Hennighausen L (1991) High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1; 88(5): 1696-700.
- Wang X, Sarkar DP, Mani P, Steer CJ, Chen Y, Guha C, Chandrasekhar V, Chaudhuri A, Roy-Chowdhury N, Kren BT, Roy-Chowdhury J. (2009) Long-term reduction of jaundice in Gunn rats by nonviral liver-targeted delivery of Sleeping Beauty transposon. *Hepatology* 50(3):815-24. doi: 10.1002/hep.23060.
- Wang Z (2015). Genome engineering in cattle: recent technological Advancements. *Chromosome Res.* 23(1):17-29. doi: 10.1007/s10577-014-9452-6.
- Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H (2013) Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLoS ONE* 8(10):e76478. doi: 10.1371/journal.pone.0076478.
- Watanabe S. (2013) Effect of calf death loss on cloned cattle herd derived from somatic cell nuclear transfer: clones with congenital defects would be removed by the death loss. *Anim Sci J.* 84(9):631-8. doi: 10.1111/asj.12087.
- Wells D. (2016) Genetic engineering of mammals. *Cell Tissue Res* (2016) 363:289–294. doi: 10.1007/s00441-015-2321-6.
- Wells DN, (2005) Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech* 24, 251– 264.
- Whelan, J.A., Russel, N.B., Whelan, M.A., (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Meth.* 278, 261–269.
- Whitworth K, Lee K, Benne J, Beaton B, Spate L, Murphy S. (2014) Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biol Reprod.* 2014; 91(3):78, 1–13. doi: 10.1095/biolreprod.114.121723.
- Wilmot I, Schnieke A, McWhir J, Kind H y Campbell K. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385(6619): 810-3.
- Wilson MH, Coates CJ, George AL, Jr. (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 15(1):139-45.
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (2009) piggyBac

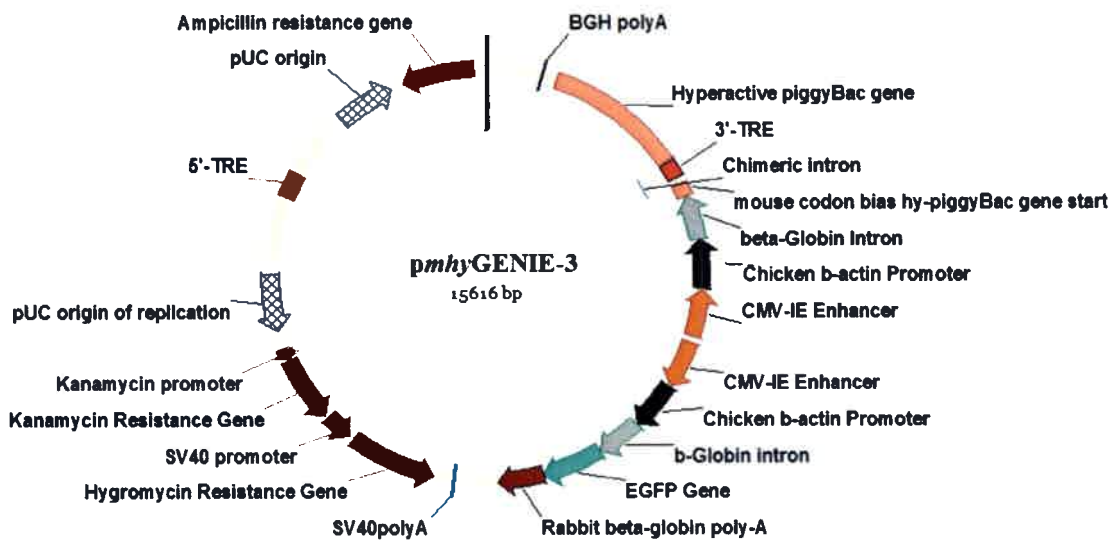
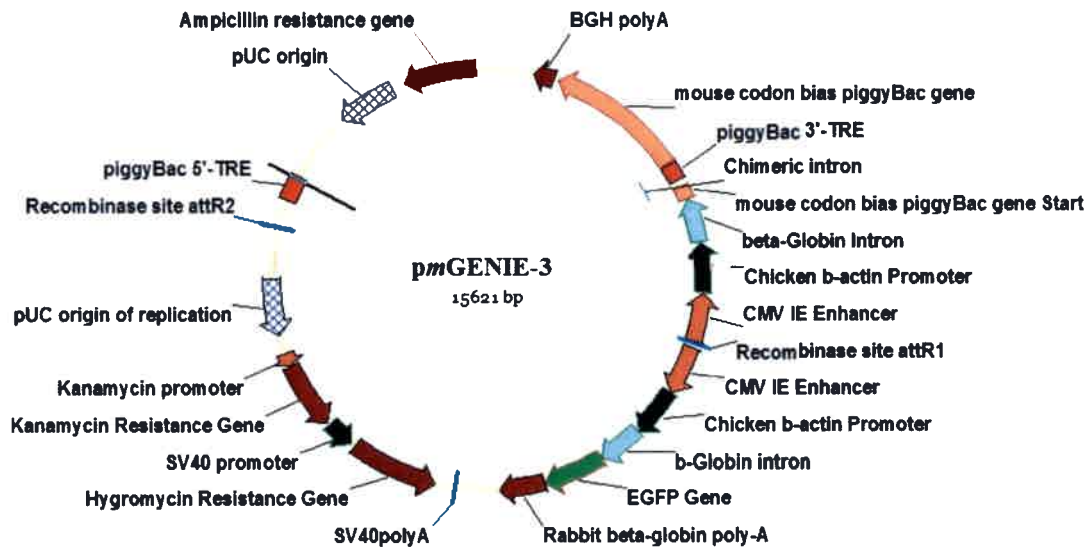
- transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770. doi: 10.1038/nature07863.
- Woltjen K, Härmäläinen R, Kibschull M, Mileikovsky M, Nagy A. (2011) Transgene-free production of pluripotent stem cells using piggyBac transposons. *Methods Mol Biol.* 2011;767:87-103. doi: 10.1007/978-1-61779-201-4\_7.
- Woodard LE, Wilson MH. (2015) piggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol.* 33(9):525-33. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.009.
- Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I, Colman A. (1991) High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)* 9, 830–834.
- Wu SC, Meir YJ, Coates CJ, Handler AM, Pelczar P, Moisyadi S, Kaminski JM. (2006) piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to Sleeping Beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(41): 15008–15013.
- Wu X, Ouyang H, Duan B, Pang D, Zhang L, Yuan T, Xue L, Ni D, Cheng L, Dong S, Wei Z, Li L, Yu M, Sun QY, Chen DY, Lai L, Dai Y, Li GP. (2012) Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Res* 21(3):537-43. doi: 10.1007/s11248-011-9554-2.
- Wu Z, Xu Z, Zou X, Zeng F, Shi J, Liu D, Urschitz J, Moisyadi S, Li Z. (2013) Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* 22(6):1107-18. doi: 10.1007/s11248-013-9729-0.
- Yang H, Wang H, Jaenisch R. (2014) Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 9(8):1956-68. doi: 10.1038/nprot.2014.134.
- Yee, J. (2010) Turning Somatic Cells into Pluripotent Stem Cells. *Nature Education* 3(9):25.
- Yom HC, Bremel RD (1993) Genetic engineering of milk composition: modification of milk components in lactating transgenic animals. *Am J Clin Nutr* 58(2 Suppl):299S-306S.
- Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N (2011) Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res* 21(11):1638-40. doi: 10.1038/cr.2011.153.
- Yum SY, Lee SJ, Kim HM, Choi WJ, Park JH, Lee WW, Kim HS, Kim HJ, Bae SH, Lee JH, Moon JY, Lee JH, Lee CI, Son BJ, Song SH, Ji SM, Kim SJ, Jang G. Efficient generation of transgenic cattle using the DNA transposon and their analysis by next-generation sequencing. *Sci Rep.* 2016 Jun 21;6:27185. doi: 10.1038/srep27185.

- Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL (2011) A hyperactive piggyBactransposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad.* 25;108(4):1531-6. doi: 10.1073/pnas.1008322108.
- Yusa, K. Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods* 6, 363–369. doi: 10.1038/nmeth.1323.
- Zhang P, Liu P, Dou H, Chen L, Chen L, Lin L, Tan P, Vajta G, Gao J, Du Y, Ma RZ. (2013) Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 Fatty acids. *PLoS One.* 2013;8(2):e55941. doi: 10.1371/journal.pone.0055941.
- Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z (2014) Generation of CRISPR/Cas9-mediated genotargeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *CelMol Life Sci.* 2014: 72(6):1175–84. doi: 10.1007/s00018-014-1744-7.
- Zhou XR, Green AG, Singh SP (2011) *Caenorhabditis elegans* Delta12-desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the Delta12 and Delta15 positions. *J Biol Chem* 286(51):43644-50. doi: 10.1074/jbc.M111.266114.

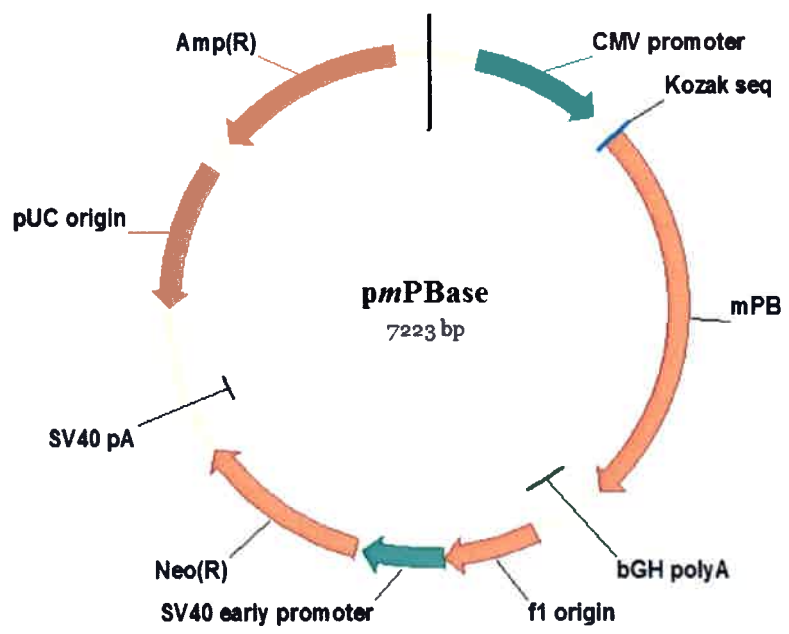
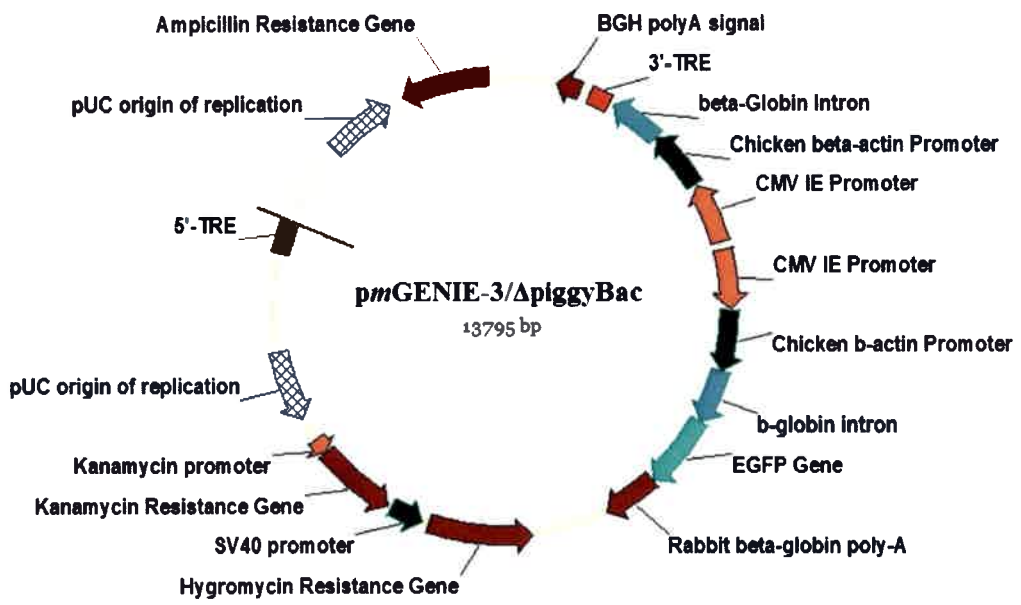
**ANEXO I**  
**VECTORES**

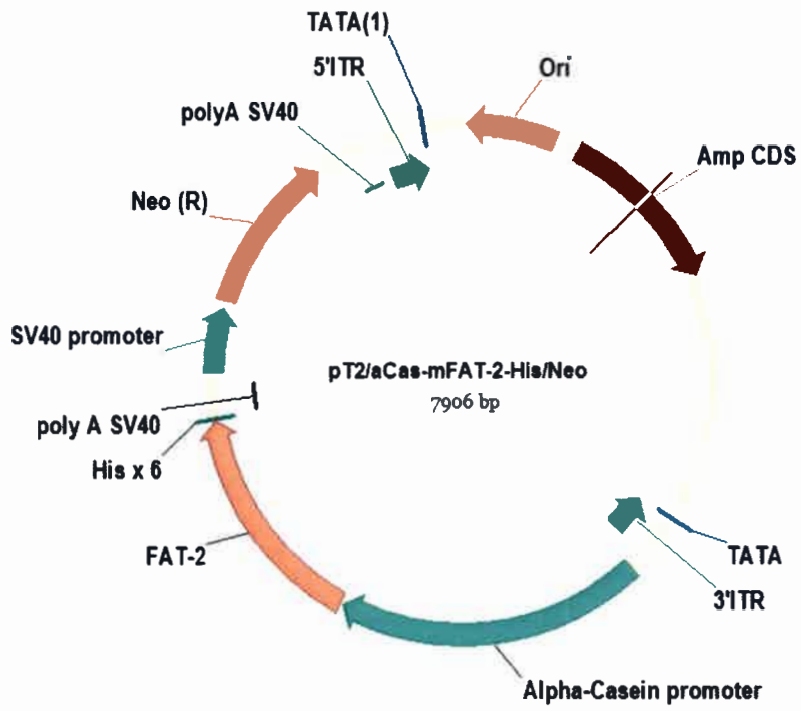
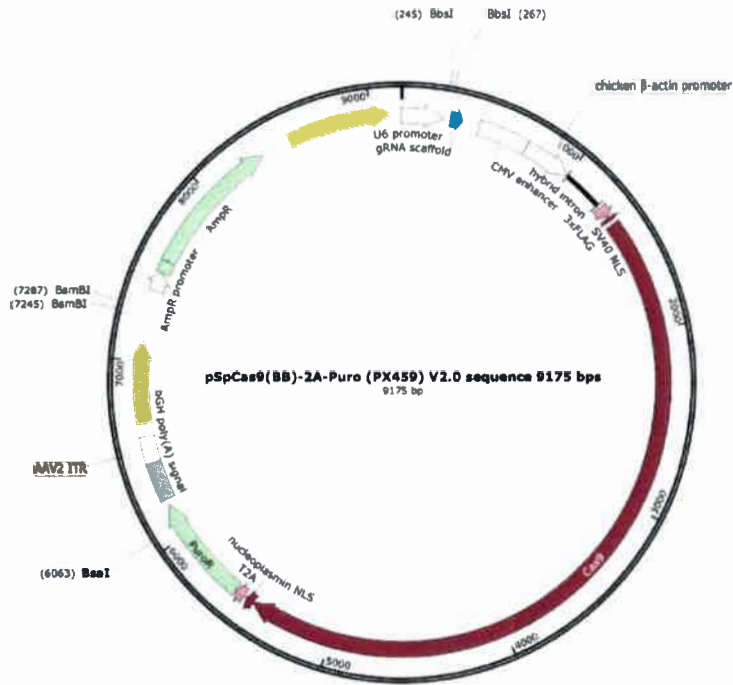


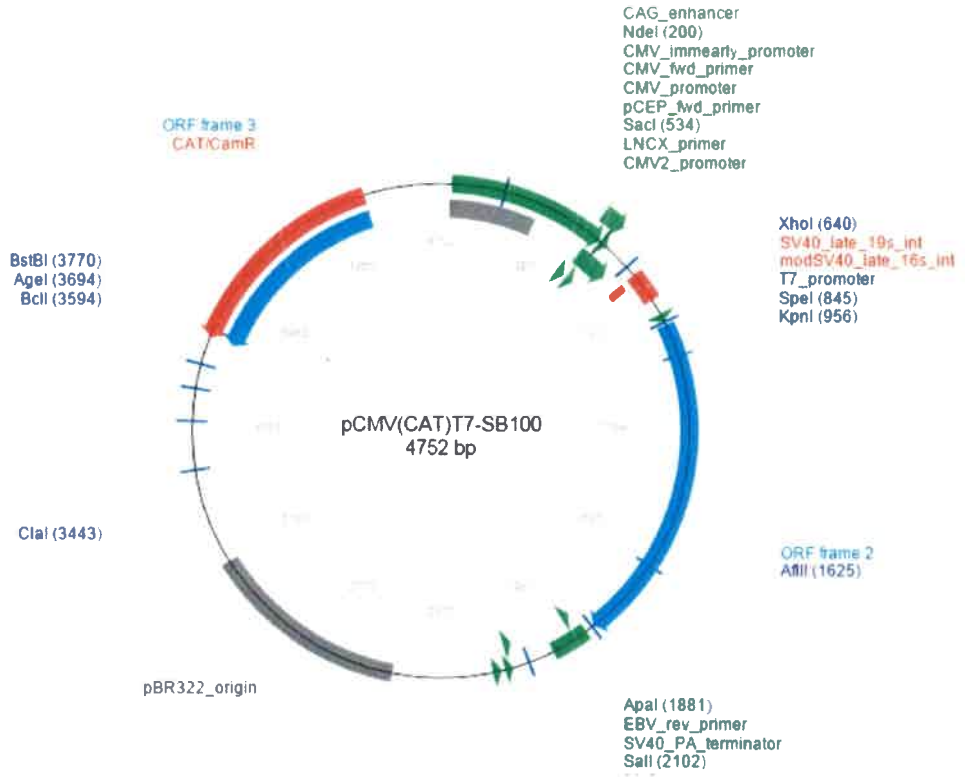
**ANEXO I: Representación gráfica de la estructura circular y componentes de los vectores plasmídicos que fueron utilizados en este trabajo.**



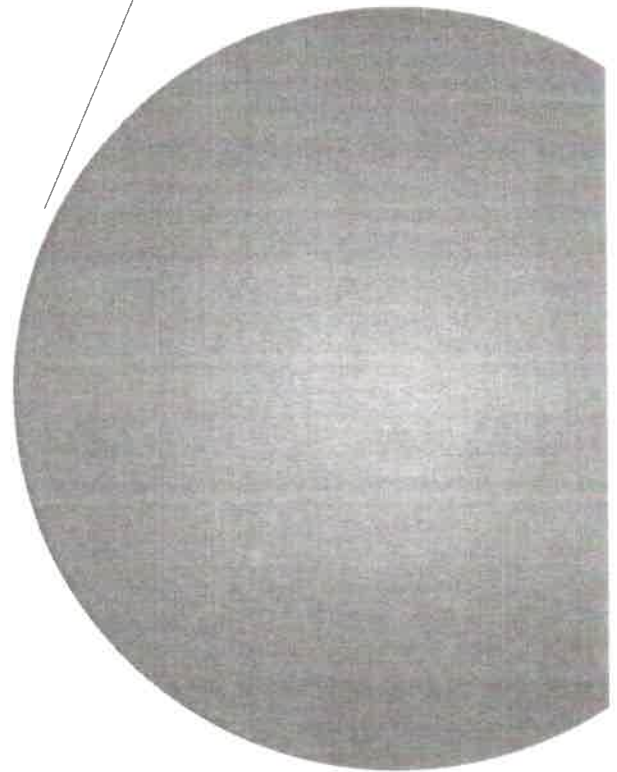








# **PUBLICACIONES**



REVIEW

# Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals

Pablo Bosch · Diego O. Forcato · Fabrisio E. Alustiza · Ana P. Alessio · Alejandro E. Fili · María F. Olmos Nicotra · Ana C. Liaudat · Nancy Rodríguez · Thirumala R. Talluri · Wilfried A. Kues

Received: 1 December 2014 / Revised: 15 January 2015 / Accepted: 16 January 2015  
© Springer Basel 2015

**Abstract** Transgenic farm animals are attractive alternative mammalian models to rodents for the study of developmental, genetic, reproductive and disease-related biological questions, as well for the production of recombinant proteins, or the assessment of xenotransplants for human patients. Until recently, the ability to generate transgenic farm animals relied on methods of passive transgenesis. In recent years, significant improvements have been made to introduce and apply active techniques of transgenesis and genetic engineering in these species. These new approaches dramatically enhance the ease and speed with which livestock species can be genetically modified, and allow to performing precise genetic modifications. This paper provides a synopsis of enzyme-mediated genetic engineering in livestock species covering the early attempts employing naturally occurring DNA-modifying proteins to recent approaches working with tailored enzymatic systems.

**Keywords** Active transgenesis · Livestock · Binary transposon system · Designer nuclease · Recombinase · Integrase · Synthetic biology

## Abbreviations

Cas9	CRISPR-associated protein 9
CPI	Cytoplasmic injection
Ct	Chromatin transfer
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DSB	Double-strand break
GOI	Gene of interest
HR	Homologous recombination
HDR	Homology-directed repair
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
ICSI-Tr	Intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis
iPS	Induced pluripotent stem (cell)
I-SceI	Homing endonuclease
ITR	Inverted terminal repeat
KO	Knockout
NHEJ	Non-homologous end joining
PB	piggyBac transposon system
PNI	Pronuclear injection
RE	Restriction enzyme
RecA	Recombinase A
REMI	Restriction enzyme-mediated integration
RMCE	Recombinase-mediated cassette exchange
RMDI	Recombinase-mediated DNA insertion
SB	Sleeping Beauty transposon system
SCNT	Somatic cell nuclear transfer
sgRNA	Single-guide RNA
SMGT	Sperm-mediated gene transfer
SV40	Simian virus 40
TALFN	Transcription activator-like element nuclease
Tol2	Tol2 transposon system
ZFN	Zinc finger nuclease

P. Bosch · D. O. Forcato · F. E. Alustiza · A. P. Alessio · A. E. Fili · M. F. Olmos Nicotra · A. C. Liaudat · N. Rodríguez  
Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Republic of Argentina

T. R. Talluri · W. A. Kues (✉)  
Friedrich-Loeffler-Institute, Institute of Farm Animal Genetics, Biotechnology, 31535 Neustadt, Germany  
e-mail: wilfried.kues@fli.bund.de

## Introduction

Transgenic farm animals can serve as excellent models of human diseases, of biopharming, and of basic research [1–5]. During the past few years, transgenic farm animals have gained renewed popularity, because of the availability of annotated genome depositories (<http://www.ensembl.org>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) and because of the introduction of active methods of transgenesis. Active transgenesis refers to the introduction of exogenously provided enzymes or nucleic acids encoding them [2, 6, 7], which catalyze specific gain-of-function or loss-of-function genetics in an unprecedented pace. The exogenous enzymes are only transiently present; however, by carefully selecting highly active or hyperactive variants [8–11], the desired genetic modification can be performed in individual cells, such as the mammalian zygote. Prominent examples are hyperactive transposon systems, such as Sleeping Beauty [9, 10], piggyBac [11], as well as designer nucleases, including zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like element nucleases (TALENs) and RNA-guided nucleases [1–3, 12]. In addition, Cre recombinase and  $\Phi$ C31 integrase found some interest for farm animal transgenesis [13, 14]. Viral integrases (retrovirus, lentivirus, adeno-associated virus) apply similar mechanisms; however, viral transgenesis is already covered by a number of excellent reviews [15–18], and will not be discussed in this paper. The repertoire of molecular tools now allows the precise modification of large mammalian genomes at rapid pace and has led to a recent boost in this field [2, 19–22].

### Brief time course of livestock transgenesis

Since the isolation of class II restriction enzymes (RE), the hypothesis that simultaneous delivery of a RE in combination with a transgene would increase the efficiency of foreign DNA incorporation was postulated. First evidence for this hypothesis came from a study in which illegitimate integration events of non-homologous DNA fragments into yeast genome was several fold enhanced when a standard RE was included in the transformation mixture [23]. The restriction enzyme-mediated integration (REMI) was subsequently used in unicellular organisms, fungi [24, 25] and xenopus [26]. The catalytic activity of RE in cultured mammalian cells [27, 28] prompted researchers to apply REMI in combination with pronuclear microinjection of mouse zygotes [29]. In the mouse model, the rate of transgenic embryos and live pups by PCR analysis was doubled (18 vs 9 %) in REMI versus standard pronuclear injection [29]. However, no information regarding number of copies, genomic sites of transgene incorporation, expression and transmission to progeny were given [29].

Further independent replications of this approach are warranted to unequivocally establish the usefulness of REMI for animal transgenesis.

It has been postulated that the co-delivery of transgene and a site-specific RE could increase efficiency of integration into the host genome by three non-excluding ways: (1) protecting the ends of the transgene constructs, (2) inducing DNA breaks, and (3) stimulating endogenous DNA repair mechanisms [30].

It has been well established that frequently cutting RE may pose a potential risk of causing genotoxic damage [31, 32]. In fact, introduction of a RE by electroporation into mammalian cells has been shown to induce genomic rearrangements such as deletions, duplications, and translocations [28, 33, 34]. To avoid these detrimental effects, REMI can be performed with rare-cutting meganucleases. Meganucleases or homing endonucleases (HE) are naturally occurring enzymes that recognize long consensus sequences spanning 12–40 bp [35]. One of the best characterized is I-SceI from *Saccharomyces cerevisiae* [36]. Albeit the consensus sequence spans 18 bp, I-SceI seems to allow some ambiguity in the recognition site. Co-injection of a transgene flanked by two I-SceI restriction sites with purified I-SceI into fertilized eggs of *Oryzias latipes* (medaka fish) and *Xenopus tropicalis* resulted in improved transgenic efficiencies [37, 38]. Preliminary studies assessed I-SceI for transgenesis in livestock [39]. I-SceI-injected bovine zygotes resulted in an increased proportion of embryos expressing the reporter gene and a reduced percentage of mosaic embryos. In a preliminary report [40], the I-SceI approach significantly increased ratio of transgenic bovine fibroblasts, suggesting that I-SceI can enhance transgene integration into the cattle genome. Recently, the first reporter transgenic pigs were generated by an I-SceI approach; however, no details about copy numbers, integration sites and transgene silencing have been reported [41]. Further studies are warranted to reveal the mechanistic role of I-SceI during mammalian transgenesis.

The first evidence for sperm-mediated transport of native simian virus 40 (SV40) DNA into rabbit oocytes came from a study by Brackett et al. [42]. The SV40 DNA encoded the complete genome of the virus, and infective SV40 virions could be recovered by coculture of fertilized embryos with a permissive kidney cell line from African green monkey. Eighteen years later Lavitrano et al. [43] used sperm mixed with plasmid DNA to produce transgenic mice. This report of sperm-mediated gene transfer (SMGT) was soon challenged by an independent study, which failed to replicate the experiment [44]. Since then, SMGT has been assessed for transgenesis in several invertebrates as well as vertebrates [45–47], including domestic species [48–50]. However, most of the studies in

mammalian species provided poor evidences for transgene integration or recombinant protein expression.

In 1999, an alternate technique called intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis (ICSI-Tr) was published [51]. Developed originally to produce transgenic mice, the method was later translated to other mammalian species [52–56] and birds [57]. In this methodology, double-stranded DNA molecules are complexed with membrane-damaged (dead) spermatozoa, which were subsequently microinjected into the cytoplasm of metaphase II oocytes. In this modification of SMGT, the physical or chemical disruption of sperm cell membranes is a prerequisite for successful gene transfer, which then requires the troublesome ICSI procedure. With ICSI-Tr, high percentages of transgenic offspring with low incidence of mosaicism have been reported [51]. Despite the success of this technique in terms of transgenic ratios, it does not escape from the numerous drawbacks of methodologies that rely on passive integration of transgenes, such as concatemeric transgene integration, silencing, and variegated transgene expression [58, 59].

To address some of these concerns, approaches to combine ICSI-Tr with the delivery of ectopic enzymes were assessed [60]. Initial experiments addressed the effect of a bacterial recombinase (RecA) [60] and Tn5 transposase [61] on mouse and livestock transgenesis [62, 63]. Both enzymes were able to increase the proportion of live transgenic animals compared to classic pronuclear microinjection and ICSI-Tr methods [64], but seemed to suffer from sub-optimal activities of the employed enzymes [29, 30].

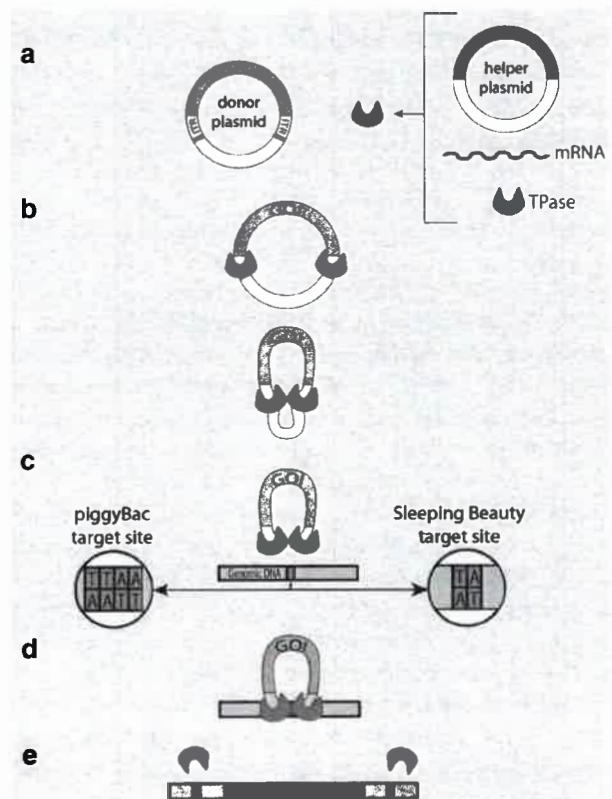
The need for advanced transgenic methodologies that permit precise genetic and highly efficient modifications in preselected DNA sequences has driven research efforts to develop hyperactive and codon-optimized transposases (SB, PB, Tol2) [10, 11, 65–68], recombinases (Cre, flipase) [13, 69] and customized programmable nucleases, like zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator-like element nucleases (TALEN), and RNA-guided nucleases [2, 19, 22, 70], which already initiated a revolution in the field of animal transgenesis.

### Application of transposon systems for genetic engineering

Transposons or jumping genes belong to a diverse family of genetic elements that are able to move horizontally in genomes. Transposons were originally described in maize [71], but later identified as widespread components in the genomes of prokaryotes and eukaryotes [72]. Interestingly, transposable elements comprise high proportions of eukaryotic genomes (i.e., about 45 % of the human genome [73]) and the vast majority of them are inactive due to accumulated deleterious mutations [74].

Transposons are grouped in two distinct categories according to the mechanism used for mobilization (transposition). Class I transposons also called retrotransposons rely on a RNA intermediate, which is reverse-transcribed in a new genomic locus. As consequence the number of genomic units increases by a mechanism that can be characterized as “copy and paste” [75]. Retrotransposon mobilization is capable of inducing random mutations at high frequency, disrupting endogenous genes, and therefore it has been held responsible for causing several genetic disorders [75, 76].

Class II transposons or DNA transposons are mobilized by a process that operates by a “cut and paste” mechanism [10, 77]. A transposase specifically recognizes inverted terminal repeats (ITRs), and precisely removes and relocates the ITR-flanked DNA segment to a different genome position [10, 77] (Fig. 1).



**Fig. 1** General mechanism for transposase-mediated transgene integration into the host genome. Transposase (*TPase*) is commonly synthesized from an expression vector (helper plasmid), mRNA or it is (rarely) provided as protein. The gene of interest (*GOI*) flanked by ITRs is delivered on an independent vector (*donor plasmid*) (a). *TPase* recognizes/binds ITRs flanking the *GOI* and catalyzes staggered double-strand breaks at the ends of ITRs (b). The resulting transposon-transposase complex binds at specific target sites in the host genomic DNA (c), and integrates the ITR-flanked transposon (d–e)

DNA transposons have been manipulated as useful gene transfer vectors for germline transgenesis, insertional mutagenesis and somatic cell transgenesis (gene therapy) (reviewed in [78]). Bicomponent transgenic systems have been developed [79] in which the gene of interest (GOI) is flanked by ITRs, and the transposase is provided in trans as mRNA or as an expression plasmid (helper plasmid) (Fig. 1). The excised transposon plus transposase proteins binds to a target DNA, where the insertion takes place [80]. Most transposases catalyze integration at short consensus sequences, for example TC1/mariner transposases recognize TA dinucleotides, and PB transposase recognizes TTAA tetranucleotides (Fig. 1). Through this mechanism, one monomeric copy of a transposon is integrated in the genome, leaving the empty backbone of the donor plasmid, which is eventually degraded (Fig. 1) [77].

Due to the development of hyperactive transposase variants, two-component transposon system has been adopted as an improved tool for germline transgenesis in a broad range of invertebrate and vertebrate species (reviewed in [81]). Integration efficiencies reported for various transposon systems (Table 1) rival the high integration rates of viral-based methods. In contrast to viral methods, transposon systems are characterized by being safe and capable of delivering large cargos [68, 82–85]. An advantage of transposase-mediated transgenesis is the monomeric transgene integration, making these constructs less prone to silencing in transposon transgenic animals [65].

The reported instability of transgene expression from sequences inserted by non-facilitating mechanisms has been linked to methylation of CpG-rich vector sequences [86] that flank the transgene and are co-inserted with the transgene. An added advantage of transposition transgenesis is that each event can be later segregated in the descendants [65, 79, 87]. Segregation of independently inserted sequences by transposition would maximize the overall efficiency of the methodology. The same segregation process can serve to recycle marker/antibiotic selection cassettes to comply with current regulatory guidelines regarding transgenic animals.

Under certain scenarios, intentional removal of the stably inserted sequences is required to turn on or off transgene expression, being the conditional transgenesis an illustrative example of such applications [88]. Since transposition does not change the ITRs [80], the transposon is susceptible to be remobilized, and eventually removed, if the transposase is reintroduced in the system. This can be exploited to excise unwanted genomic DNA sequences flanked by transposon ITRs. Proof of principle for this potentially useful strategy has come from experiments with induced pluripotent stem (iPS) cells [89, 90]. The recent development of transposase variants, which are excision

competent, but integration deficient will facilitate the seamless removal of transposons [91]. Thus, transposon systems combine high delivery rates of transgenes and the possibility of seamless transposon removal.

The use of DNA transposons to engineer vertebrate genomes began in 1997, when an active transposase, SB, was reconstructed from non-functional transposon sequences isolated from several salmonid species [79]. It was demonstrated that the original SB variant can transpose DNA sequences in a broad range of vertebrate species [65, 92–95] with moderate activity [9, 96–98]. Using an *in vitro* evolutionary approach, Mátés et al. [10] finally came up with a hyperactive version: SB100X. Since then, this hyperactive transposase has become the gold standard for transposition approaches in animals.

Successful implementation of SB-mediated integration for germline transgenesis in small animal models was followed by translational research aimed to produce transgenic livestock animals (Table 2). There are two established methodologies to generate transgenic large animals, DNA microinjection of zygotes or somatic cell nuclear transfer (SCNT) (Fig. 2).

Microinjection of pronuclear stage embryos, developed by Gordon et al. [99], became a routine technique to produce transgenic mice. Later, pronuclear microinjection (PNI) was adapted to livestock zygotes [100, 101]. Unlike mouse oocytes, the porcine and bovine counterparts are darkened by lipid droplets precluding the visualization of pronuclei. Therefore, high-speed centrifugation of zygotes is mandatory to visualize the pronuclei [100, 101]. PNI is a technically demanding methodology, which has been characterized by low efficiency in terms of number of transgenic offerings per injected embryo, and variable and instable expression of the recombinant protein in the transgenic animals. The cytoplasmic injection (CPI) of plasmids into the cytoplasm of one-cell embryos [102] represents a simplified alternative, making it suitable for species with opaque zygotes (Fig. 2). Both PNI and the CPI methods were successfully employed with SB, PB and Tol2 transposon components for germline transgenesis in fish [103], frogs [92], mice [10, 104], rats [105] and domestic pigs [65, 87]. A significant increase in the ratio of transgenic animals per microinjected zygotes has been consistently reported. The feasibility and efficiency of transposon-mediated transgene integration into the pig genome are supported by the high proportion of born animals carrying at least one copy of the transgene (>40%) [65, 66, 106]. Reported overall efficiency was also very impressive reaching 5.7 and 6.8 % of transgenic live pigs per microinjected zygote for PB and SB transposon systems, respectively [65, 106] (Table 1). Moreover, most transposon integrations corresponded to monomeric integrations and very low incidence of passive incorporation of



**Table 1** Transposon transgenesis approaches in livestock

Transposon	Species	Construct	Antibiotic selection	Overall efficiency*	Expression pattern	Unspecific integrations	Germline transmission generations	Method	References
Sleeping Beauty	Rabbit	CAGGS-Venus	AB-free	1.4 %	Ubiquitous	No	F0, F1, F2	PNI	[258]
	Pig	CAGGS-Venus	AB-free	6.8 %	Ubiquitous	~ 5 %	F0, F1, F2	CPI	[65]
	Pig	floxedUbi-GIN	G418	NA	Ubiquitous	~ 25 %	F0	SCNT (HMC)	[13]
	Pig	DIV Puro $\Delta$ tk APOBEC3G	Puromycin	~ 3 %	Ubiquitous	No	F0	CT	[87]
	Pig	INV-hITGA2/ NV-hITGB1	G418	NA	Keratinocyte	ND	F0	SCNT (HMC)	[259]
	Pig	HCR-hAAT- D374Y-PCSk9	Puromycin	NA	Liver	ND	F0	SCNT (HMC)	[260]
PiggyBac	Chicken	CAGGS-EGFP- IRES-Puro	Puromycin	NA	Ubiquitous	ND	Prefounder, F1	PGC transfection in vitro	[261]
	Chicken	CMV-EGFP SV40-Neo	G418	49.6 %	Ubiquitous	ND	Prefounder, F1, F2	PGC transfection in vitro	[262]
	Chicken	IRES-LacZ- CAGGS- EGFP-PGK- Neo	G418	NA	Ubiquitous	ND	Prefounder	Embryo microinjection and electroporation	[263]
	Pig	CMV-Neo-EGFP	G418	1.3 %	Ubiquitous	ND	F0	SCNT	[111]
	Pig	CAA-tdTomato	AB-free	7.0 %	Eye lens	5 %	F0	CPI	Unpub. (KW)
	Pig	CAGGS-EGFP, SV40-Hygro	none	5.7 %	Ubiquitous	ND	F0	CPI	[106]
Tol2	Chicken	CAGGS-EGFP- IRES-Puro	Puromycin	NA	Ubiquitous	ND	Prefounder	PGC transfection in vitro	[261]
	Chicken	CAGGS-EGFP	AB-free	1.5 %	Ubiquitous	ND	Prefounder, F1	PGC transfection in vivo	[264]

*AB-free* antibiotic selection marker-free, *NA* Efficiencies as transgenic offspring per treated embryos are not applicable, *ND* not determined, *CAGGS* cytomegalovirus early enhancer/chicken beta-actin promoter, *CMV* cytomegalo virus (immediate early) promoter, *Ubi* ubiquitin C promoter, *SV40* simian virus 40 promoter, *DIV* diverse promoters were tested, *PGK* phosphoglycerate kinase promoter, *CAA* crystallin A $\alpha$  promoter, *GIN* EGFP-IRES-neomycin, *APOBEC3G* apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, *INV* involucrin promoter, *hITGB1* human beta 1 integrin, *hD374-PCSK9 D374Y* gain-of-function mutation in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, *HCR-hAAT* hepatocyte control region and human  $\alpha$ 1-antitrypsin promoter, *hITGA2* human Integrin  $\alpha$ 2 (CD49b), *HMC* hand made cloning, *PGC* primordial germ cell

\* Transgenic offspring per treated oocytes or embryos

vector backbone or SB transposase vector sequences (Table 1). Interestingly, all transgenic pigs stably expressed the transgene in a promoter-dependent manner in SB transgenic animals and only one case of variegated reporter expression was observed in the PB transgenic group [106]. This can be interpreted as transposase prefers safe harbor loci for integration.

Transposition transgenesis is also compatible with SCNT [87, 107]. SCNT involves the introduction of a somatic cell into an enucleated metaphase II-arrested oocyte, followed by activation by chemical or electric stimulation, and subsequent transfer to synchronized surrogate females for development to term [108]. Since the first report of the successful cloning of sheep from cultured cells [109], SCNT has become a major method to produce

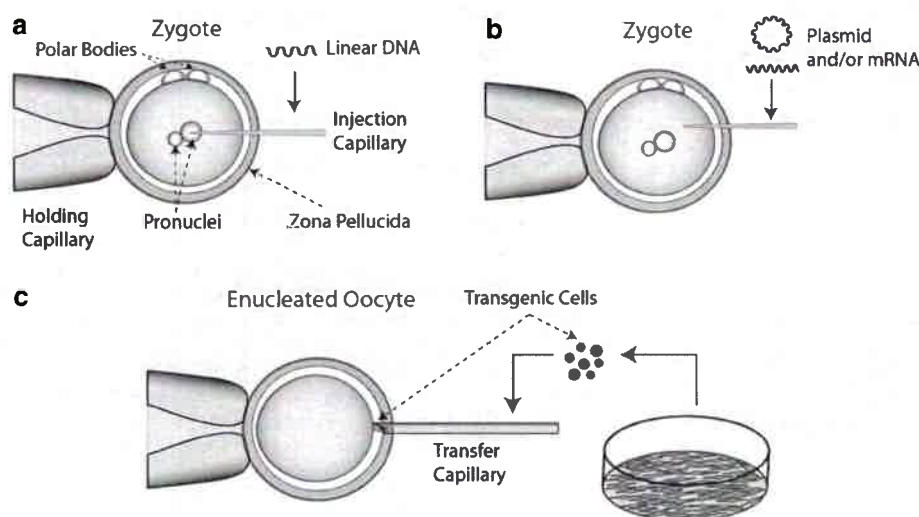
transgenic livestock. Advantages of SCNT are: (1) the high rate of transgenic animals per born animals, which often reaches 100 % (but low overall efficiency), and (2) the possibility to characterize the genotype of the somatic cells before use as nuclear donor [110]. High likelihood of obtaining a transgenic animal by SCNT with known genetic makeup would reduce costs associated with producing a transgenic animal. This is particularly relevant for monotonous species with long-generation interval like cattle, in which husbandry expenditures of surrogate females negatively impact the sustainability of transgenic endeavors.

Donor cells can be transfected with linear or circular DNA transgenes for passive integration or with the components of an active system, such as SB or PB (Fig. 2)

**Table 2** Recombinase superfamily divisions (adapted from [126])

Superfamily	Family	Subdivisions	Recognition sites	Activity	Representative members
Site-specific recombinases	Tyrosine recombinases	Bidirectional	Identical	Reversible	Cre
				Inversion, excision and integration	
		Unidirectional	Non-identical	Irreversible	Lambda
				Inversion, excision and integration	
	Serine recombinases	Small	Identical	Irreversible	Beta-six
				Excision	
	Large	Non-identical	Irreversible	Bxb1	
			Inversion, excision and integration		ΦC31
					TP901

**Fig. 2** Genome engineering via in vivo and in vitro approaches. Injection of nucleic acids and/or protein into the pronucleus of a zygote (a) or into the cytoplasm (b). Genetic modification in primary cells, which are subsequently used in SCNT (c)



[107, 111]. Although donor cells are not considered a limiting resource for SCNT, the use of transposons is associated with significantly enhanced proportion of stably transfected cells. Delivery of pmGENIE-3, a helper independent PB transposon, to bovine primary fibroblast cells in culture caused an impressive 42-fold increase in the number of resistant cell colonies over controls [112]; similar results were reported for an established immortalized porcine cell line, as well as in primary porcine cells transfected with the SB, PB, Tol2 or Passport transposon systems [67, 68, 87, 95]. A disadvantage of the SCNT approach is that an antibiotic selection cassette is usually needed for isolation of transgenic cell clones and therefore, it is carried over into SCNT transgenic animals. This drawback, which is strongly

discouraged by current regulatory guidelines, can be overcome if the antibiotic gene is supplied on a separate vector and consequently is genomically integrated independently from the GOI. Under this circumstance, the antibiotic selection cassette may be removed by segregation of the GOI from unwanted sequences by an additional round of breeding [87]. Alternatively, unwanted sequences can be removed by Cre or Flp recombinase systems as addressed in depth in the next section.

Clean and stable genomic insertion events mediated by transposases are the most striking features of these systems, making transposons first choice when gene addition for gain of function or loss of function by expression of a dominant negative allele or RNA interference is sought.

The availability of different transposon systems with distinct characteristics regarding their recognition sites and/or biased genome distribution confer versatility to the system by offering the possibility of choosing a specific transposon according to the application or particular goal. For instance, PB transposase has a slight tendency to land in or close to transcriptionally active regions of the chromatin [113], so it may be more appropriate for insertional mutagenesis studies. On the other hand, SB transposase shows no predilection for transcription units, it rather prefers intergenic chromosomal regions [114, 115], which makes it the system of choice for safe delivery of transgenes. As new transposable elements are discovered and recombinant transposases with optimum enzymatic activity in the mammalian environment and improved targeting activity are developed, it is expected that transposon-based systems will gain ground in the field of large animal transgenesis.

#### Application of site-specific recombinases

Site-specific recombinase systems occur naturally in prokaryotes and fungi, where they perform several biological functions such as bacterial phase variation, plasmid copy number regulation, bacteriophage integration/excision from bacterial genome and amplification of yeast plasmids [116–118]. Site-specific recombinases have in common the capacity to bring together two DNA partners, catalyze double-strand cleavage at specific sites, and rejoin reciprocal strands (Fig. 3).

Importantly, site-specific recombination can proceed in heterologous environments, opening new avenues to engineer genomes in a predictable manner [119, 120], overcoming many problems associated with traditional methods, namely silencing or unpredictable expression of transgenes [121, 122] and unwanted remnant sequences left behind after genome manipulations.

Two basic elements comprise a site-specific recombinase system: two short consensus sequences and an enzyme that specifically recognizes those motifs and mediates strand exchange between the two DNA partner molecules [123, 124]. This process may lead to insertion, inversion, deletion or translocation of a DNA fragment in a reversible or irreversible manner [123, 125].

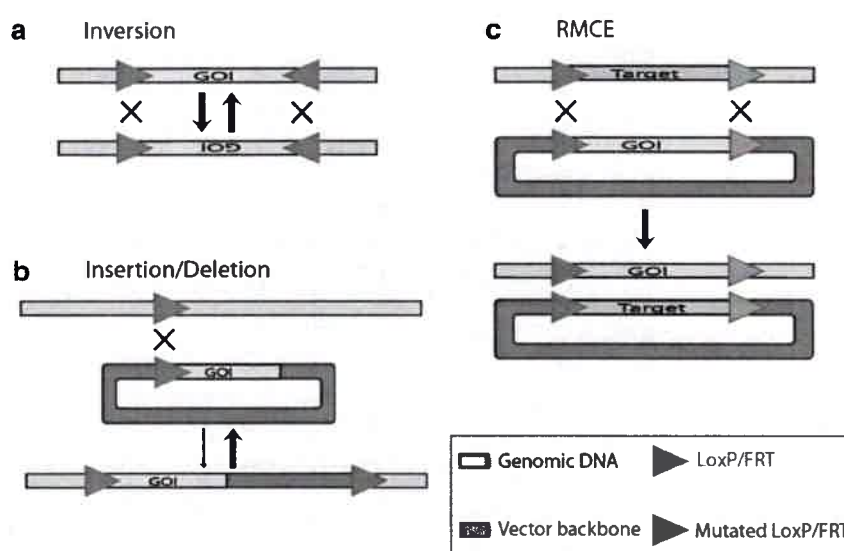
Members of the recombinase superfamily can be grouped according to the active amino acid present within the catalytic site in tyrosine or serine recombinases [126]. The mechanism of strand breakage, exchange and reunion markedly differs for each family (for details see [123]). The former group is further classified according to the mechanism of action in bidirectional or unidirectional [126] (Table 2).

From the tyrosine recombinase family, the Cre-loxP and Flp-FRT systems are by far the most extensively characterized members [127]. The minimum requirements for the recombination process to take place are two specific 34 base pair recognition sites and the recombinase [123]. In addition, based on the length of the recognition sites (34 bp) the probability that an identical sequence occurs by chance is extremely low ( $p \sim 10^{-21}$ ), and it is conveniently short enough as to be normally neutral toward gene expression when positioned in the genome.

Each loxP or FRT site comprises two inverted 13-bp symmetry elements, which serve as recombinase binding motif, flanking an 8-bp non-palindromic core element where strand recombination is catalyzed. The core nucleotide sequence asymmetry gives directionality to the reaction and therefore determines the type of modification [128]. Recombination of two identical target sites located on a circular and a linear DNA molecule each one will cause integration into the linear molecule. Inverted target sites in the same linear molecule dictates inversion of the DNA between recognition target sites (Fig. 3). If each identical target site is located on different linear DNA molecules, Cre or Flp recombination causes mutual exchange of sequences distal to the two recognition sites. Interestingly, it is known that recombination reaction occurs with the same efficiency regardless of the DNA topology (supercoiled or relaxed), and circular or linear molecules [128]. This versatility has positioned these members of tyrosine recombinase family at the vanguard of tools for genetic studies as well as biotechnological developments [125].

Based on the general properties of site-specific recombinase systems, different strategies for genome engineering have been developed to tailor diverse objectives, initially applied to classic model mammals and later to large domestic species. Early reports on the successful use of Flp and Cre recombinase systems for mammalian genome modifications employed recombinase-mediated DNA insertion (RMDI) [119, 120]. RMDI relies on recombination between two identical target sites, one inserted in a genomic address and the other one provided in a donor plasmid carrying the sequence to be inserted [129, 130] (Fig. 3). Upon recombination, the newly integrated DNA sequence is flanked by tandem-oriented target sites; therefore, it is prone to be excised by another round of recombination, explaining the low efficiency of this transgenic approach [119, 120]. One alternative is the use of heteromeric target sites, which recombine into inactive double mutant site and wild-type site, thus precluding another round of recombination [131–134].

Subsequently, an alternative methodology that addressed some pitfalls of RMDI, known as recombinase-mediated cassette exchange (RMCE), was introduced



**Fig. 3** Recombination reactions catalyzed by Cre and Flp. The outcome of the recombination reaction is determined by the relative orientation of target sites. Inverted target sites in the same linear molecule dictate inversion of intervening DNA (a). Recombination between a target site located in a genomic address and an identical target site present in a circular DNA molecule results in insertion of

circular DNA (b; *thin arrow*). The intramolecular recombination (*thick arrow*) is favored over the intermolecular reaction (*thin arrow*) (b). RMCE involves recombinase-mediated insertion and excision reactions, which lead to mutual exchange of the DNA between target sites (c). The inclusion of mutated target sites makes the recombination reaction irreversible

[135]. RMCE requires the host genome being previously tagged with compatible docking sites [132–134]. Once the appropriate tagged cell line is obtained and characterized, a site-specific recombinase mediates the exchange of the genomic-tagged cassette with the sequence of interest (Fig. 3). Recombinase may be provided as protein [136, 137], mRNA [138] or most commonly as an expression plasmid [129]. The GOI is delivered in a donor vector flanked by target sites that are homologous to the ones that were previously inserted in the genome. In summary, RMCE offers the precise engineering of animal genomes.

Inclusion of a positive selectable marker is normally required to enrich cell populations in which the desired transgenic event has occurred. However, retention of strong promoter and enhancer sequences associated with the selectable marker may have unpredictable effects on expression of linked genes [139–142], even those located at long distances from the inserted cassette [143]. From the perspective of the future introduction of transgenic animal products or derivatives into the food chain, production of selectable marker-free animals will be a mandatory condition to comply with regulatory agency guidelines raising concern regarding the possibility that antibiotic resistance genes being transferred to intestinal or environmental bacteria [144]. Therefore, deletion of selectable genes after *in vitro* selection of clonal cell lines is of utmost importance for both research and commercial application of transgenesis.

Removal of selectable marker genes introduced as part of the transgenic strategy can be accomplished by homologous recombination (HR), using the so-called “hit-and-run” or “tag-and-exchange” approaches [145–147]. Although successful, these methods subject the cell line to a second cycle of selection, which is not only time consuming but also may compromise the proliferative capacity of primary cell cultures. Therefore, the use of floxed or flanked selection cassettes provides the opportunity of marker deletion or replacement by site-specific recombination. Several reports have provided proof of concept for the potential of site-specific recombination technology for livestock genome engineering [65, 148–150]. Generation of marker-free cattle [14, 151] and goats [152] originated from cells that were selected and subsequently subjected to recombinase-mediated marker removal has been documented (Table 3).

The potential of site-specific recombinase technology is not limited to deletion of resistance marker sequences from the manipulated genome. In mice, strategies that combine marker gene removal with complex targeted sequence modifications have been developed [125]. These include large deletions [153], non-selectable subtle mutations [154], large-scale chromosomal rearrangements (translocation, duplication, inversion, deletion, or chromosomal gain or loss) [155] and swapping gene endogenous sequences for heterologous sequences [156]. Another application of site-specific recombinases that has

**Table 3** Recombinase and integrase approaches in livestock

Enzyme	Species	Recombination site	Targeted modification	Selection	Recombinase activity	Comments	Method	Germline transmission, generation	References
Cre	Goat	LoxP	Deletion of Neo and tk	G418	Excision		SCNT	Yes	[152]
	Pig	LoxP/loxP257	Venus >mCherry	FACS	RMCE		SCNT	Yes, F1	[65]
	Pig	LoxP/LoxP?	GFP >PSEN1M146I	G418/ Puromycin	RMCE		SCNT	Yes	[13]
	Cattle	LoxP	Deletion of Neo	FACS	Excision		SCNT	Preimplantation embryos	[151]
Flp	Goat	FRT	Puromycin >GFP	Puromycin/ hygromycin	Gene replacement		SCNT	35-day fetus	[150]
ΦC31/Cre	Cattle	AttB-pseudo-attP/loxP	Artificial locus integration/ deletion of Neo and DsRed	G418/FACS	Excision	Ambiguity	SCNT	ND	[14]
ΦC31/Cre/ Dre	Cattle	AttB-pseudo-attP/loxP/ rox	Deletion of Neo, tk, EGFP and plasmid backbone	G418/GCV/ FACS	Excision		SCNT	Preimplantation embryos	[149]

*RMCE* recombinase-mediated cassette exchange, *ND* not determined, *FACS* fluorescence-activated cell sorting, *GCV* ganciclovir, *PSEN1M146I* mutated presenilin-1 gene (Alzheimer's disease-causing gene), *Neo* neomycin gene, *tk* thymidine kinase

revolutionized mouse genetic studies is the so-called conditional gene targeting. With the conditional gene targeting methodology the specific genetic modification is triggered in a specific cell type (tissue-specific) [157] or at a particular stage of development (temporal-specific) [158, 159].

Applying the basic principles of site-specific recombination and conditional gene targeting system, a myriad of novel strategies for mouse genomic manipulation have been developed, which are revolutionizing genetic research in the post-genomic era (reviewed in [159]). Equivalent conditional methods for genetic engineering of livestock are not yet available. Albeit, some steps toward establishing conditional gene targeting methods in large animals, like generation of pigs with Cre-induced expression [160, 161] have been undertaken, the complete conditional system has not been validated in domestic species.

Further flexibility to site-specific recombination applications has come with the introduction of the large family of serine recombinases. For example, the integrase ΦC31 [162, 163] induces recombination between two different target sites known as *attP* (39 bp minimal size) and *attB* (43 bp minimum size) [162]. Upon recombination, it originates two sequence hybrid sites, *attL* and *attR*, making the reaction unidirectional [164]. Depending on the configuration, ΦC31 can induce inversion, excision or integration of DNA sequences in heterologous genomes

[165, 166]. For ΦC31-based strategies, an *attP*-tagged genome has to be generated by random integration or HR. Once the genomic single-copy tagging is achieved, unidirectional recombination between the genomic *attP* site and a vector *attB* site is catalyzed by ΦC31 [163].

An alternative approach to accomplish chromosomal targeting with ΦC31 integrase involves recombination at cryptic endogenous genomic recognition sites, also known as pseudo-*attP* sites. Recombination occurs at these pseudo-sites, because of their similarity in nucleotide sequence with the wild-type *attP* [167]. Pseudo-*attP* sites have been reported to be present not only in invertebrates [168, 169], lower vertebrates [170], but also in mouse [163], human [167, 171], cattle [172, 173], sheep [174], goat [175] and pig [176] genomes. Accumulating experimental evidence indicates that these pseudo-target sites reside in genomic locations that conform to the definition of "safe harbors" [177, 178]. Further improvement to this transgenic method was achieved by the introduction of evolved and mutated ΦC31 integrases, showing enhanced sequence specificity and integration frequency at preintegrated and pseudo-*attP* sites [179, 180].

Although ΦC31 has been the integrase that has received most attention, new members of the large serine subfamily [181] are constantly discovered. Such novel recombinase systems include: R4 [182], TP901-1 [183, 184], and Bxb1 [181, 185]. The wide spectrum of site-specific recombinases

identified so far offers a set of tools to tailor controlled and sophisticated genome modifications for basic and applied research endeavors.

### Application designer nucleases

Designer nucleases, also known as programmable nucleases, are regarded as a new generation of transgenic tools characterized by being efficient, customizable and capable of precise targeted genome modifications for a broad spectrum of applications [186–191]. Programmable nucleases include ZFNs, TALENs and a RNA-guided genome modification system termed CRISPR/Cas9 [192]. The CRISPR/Cas9 has recently emerged as a powerful and facile alternative to ZFNs and TALENs for inducing targeted genetic alterations in cells and embryos [2, 20, 22]. Generically, these chimeric proteins harbor a domain (protein or RNA) that recognizes and interacts with a specific genomic sequence and an associated catalytic module that induces site-specific DNA single- or double-strand breaks (DSBs). Enzyme-catalyzed DNA cleavage in turn activates host repair mechanisms through error-prone non-homologous end joining (NHEJ) and/or homology-directed repair (HDR) [188, 189, 193], which are ultimately responsible for the targeted genome modification. Depending on the system configuration, programmable nucleases can predictably alter nucleotide sequences to achieve gene knockout, gene insertion, gene correction or point mutations at predefined endogenous loci [189–191]. Moreover, long-range chromosomal rearrangements, including deletions, inversions and translocations can be accomplished by nuclease-induced DSBs.

The introduction of SCNT opened the possibility of conventional HR-based gene targeting in somatic cells of livestock [194, 195], an approach that has been inapplicable before because of the lack of germline competent stem cells in these species [196–199]. However, the extremely low rate of HR in somatic cells (10- to 100-fold lower than that in murine ES cells) [200–202], along with the inherent inefficiency of the SCNT technique [203] made this approach cumbersome and tedious. In consequence, only few loci were knocked out by conventional HR in livestock species since the establishment of SCNT in 1997.

Designer nucleases rapidly changed the scene in livestock transgenesis, evidenced by a burst in the number of published reports since their recent introduction (summarized in Table 4). The most appealing features of programmable nucleases are that their DNA-binding domain can be engineered to target almost any predefined DNA sequence in a particular genome [12]. During NHEJ, the break ends are ligated and small base pair deletions or insertions (indels) are commonly introduced at the site of

breakage. Indels in coding exons frequently result in reading frameshift mutations and inactivation of the allele.

The other cell pathway triggered by specific nuclease cleavage of the genome is HDR. The likelihood of a HR increases several orders of magnitude in the vicinity of a DSB [204, 205]. Therefore designer nuclease-mediated DNA scission will favor precise modification of the target sequence by HR between the endogenous sequence and the provided donor template [206, 207]. Genome editing through HR is highly versatile allowing for targeted introduction of large genetic segments to precise single-base mutations.

Such improved efficiencies associated with programmed nucleases make it feasible to target both alleles of a gene simultaneously, to perform one-step multiplex gene targeting and to omit selectable markers [19, 186]. With this emerging transgenic technology it is now possible to achieve biallelic targeting in livestock [187, 208]. Perhaps one of the major advantages of engineered nuclease-mediated gene editing for commercial purposes is that beneficial traits or mutations can be introduced in livestock genomes without inserting surplus genetic material, which is one of the concerns associated with genetically modified organisms [144].

The first designer nuclease platform to be used in livestock was the ZFN [186, 209–211], followed by TALEN [187, 190, 212] and more recently by CRISPR/Cas9 [19, 213]. ZFNs utilize zinc finger motifs tethered to a non-specific nuclease (*FokI*) to bind chromosomal DNA and perform a double cut [214]. This system is comprised of an array of zinc fingers (which recognizes 12 nucleotides in the target sequence; Fig. 4). As *FokI* nuclease requires dimerization to cleave DNA, two ZFN monomers are necessary to interact with specific sequences in opposite DNA strands to form an active nuclease dimer. This configuration doubles the length of the recognition site, which substantially increases the specificity of ZFNs. Despite the length of the recognition site, off-target cleavages may still occur [215, 216].

The first report on ZFN-mediated gene knockout in porcine somatic cells came from the Nagashima laboratory in 2010 [217], followed by the ZFN-mediated knockout of a single-copy GFP transgene in cloned pigs [218]. These initial studies were rapidly extended by the ZFN-mediated mono-allelic disruption of an endogenous gene (*PPAR $\gamma$* ) in cloned piglets [210] and the biallelic disruption of the  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase (*GGTA1*) gene in pig fibroblasts, subsequently employed in SCNT to produce knockout pigs (Table 4; [186, 219]). In cattle, ZFN-mediated disruption of the beta-lactoglobulin (*BLG*) gene in bovine fibroblasts and production of cloned cows have been recently reported (Table 4, [211]). Variants of ZFNs are the zinc finger nickases (ZFNickases), which induce

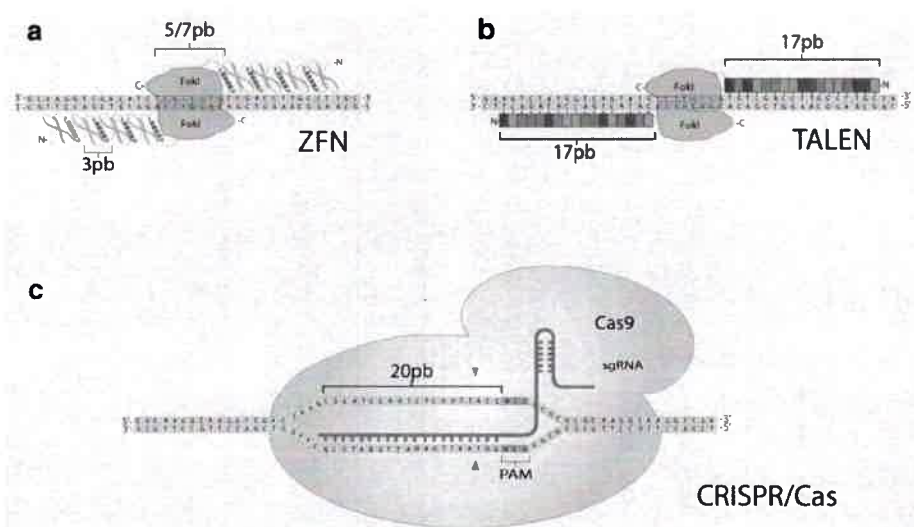
**Table 4** Selected designer nuclease approaches in livestock and monkeys

Designer nuclease	Species	Target gene/gene KO	Deletion	Generation	Overall efficiency*	Method	Off-target effects/comments	Selection of somatic cells	References
ZFN	Rabbit	<i>IgM</i>	NHEJ	F0, F1	3.1 %	CPI	Mosaic F0; 14–22 % without mod.	NA	[265]
	Pig	<i>EGFP</i>	NHEJ, m	F0	Not given	SCNT	80 % without mod.	FACS	[209]
	Pig	<i>PPAR-γ</i>	NHEJ, m	F0	0.15 %	SCNT	10 % cotransfection	G418	[210]
	Pig	<i>GGTA1</i>	NHEJ, b	F0	1.4 %	SCNT	Resorbed fetuses and neonatal mortality	α-gal <sup>-</sup> cells counter selection	[186]
	Pig	<i>GGTA1</i>	NHEJ, b	F0	1.6 %	SCNT	Resorbed fetuses	α-gal <sup>-</sup> cells counter selection	[266]
	Pig	<i>GGTA/CMAH</i>	NHEJ, b	F0	0.8 %	SCNT	Resorbed fetuses	Clonal exp.	[267]
	Pig	<i>CMAH</i>	NHEJ, b	F0	2.6 %	SCNT		Clonal exp.	[268]
	Pig	<i>CMAH</i>	HDR, b, m	F0	0.4 %	SCNT	No integration of ZFN constructs	G418	[268]
	Pig	<i>RELA</i>	NHEJ, b	F0	11 %	CPI		NA	[269]
	Pig	<i>IL2rg</i>	NHEJ, b, m	Fetuses	2 %	SCNT	High neonatal mortality		[270]
	Cattle	<i>BLG</i>	NHEJ, b	F0	0.8 %	SCNT	Weak off-target effect	Clonal exp.	[211]
	Cattle	Beta-casein	Nick + HR	F0	<0.5 %	SCNT	High levels of off-target mutations	Clonal exp.	[223]
	Rabbit	<i>APOE</i>	NHEJ, b	F1	25 %	PNI		No selection	[271]
	TALEN	Cattle	Several	NHEJ, m, b	Preimplant	50 %	CPI	High deletion/insertion	NA
Cattle		<i>MSTN</i>	NHEJ	F0	15 %	CPI	Mosaicism	NA	[233]
Sheep		<i>MSTN</i>	NHEJ	F0	3.8 %	CPI		NA	[233]
Pig		<i>RELA</i>	NHEJ, m, b	Preimplant	29 %	CPI	High deletion/insertion	NA	[187]
Pig		<i>LDLR</i>	NHEJ, m, b	F0	Not given	CT		Puromycin	[187]
Pig		<i>RELA</i>	NHEJ, m, b	F0	21 %	CPI		NA	[269]
Mini-pig		<i>GGTA</i>	NHEJ, b	F0	0.16 %	SCNT	High deletion	G418	[272]
Pig,		<i>DAZL, APC</i>	HDR, NHEJ	F0	Not given	CT		No selection	[19]
Monkey		<i>MECP2</i>	NHEJ	F0	1.2 %	CPI	High male fetal mortality, chimeric F0	NA	[273]
Chicken		<i>OV</i>	NHEJ	Founder, F1	8 %	Microinjection of PGC	No off-target effects	FACS	[274]
CRISPR/Cas9		Pig	<i>vWF</i>	NHEJ, b, m	F0	13.2 %	CPI	Small effect on embryo development	NA
	Pig	<i>RELA</i>	HDR	F0	Not given	CT	Off-target cleavage	No selection	[19]
	Pig	<i>CD163, CD1D</i>	NHEJ	F0	1.2–2.1 %	SCNT	Very low HDR	No selection or G418	[246]
	Pig	<i>CD163, CD1D</i>	NHEJ	F0	4.2–3.6 %	CPI		NA	[246]
	Pig	<i>GGTA1, CMAH, iGb3S</i>	NHEJ	F0	3.9 %	SCNT		α-gal <sup>-</sup> cells counter selection	[245]
	Mini-pig	<i>TYR</i>	NHEJ, b	F0	0.9 %	SCNT	No off-target effects	G418?	[244]
	Mini-pig	<i>PARK2, PINK1</i>	NHEJ, b	F0	1.2 %	SCNT	No off-target effects	G418?	[244]
	Goat	Several	NHEJ, b	F0	1.1 %	SCNT	No off-target effects	No selection	[247]
	Sheep	<i>MSTN</i>	NHEJ	F0	5.7 %	CPI	No off-target effects	NA	[249]
	Monkey	<i>PPAR-γ, RAG1</i>	NHEJ	F0	Not given	CPI	No off-target effects	NA	[275]
	Rabbit	<i>TYR</i>	NHEJ	F0, F1	3 %	PNI	No off-target effects	No selection	[276]
Rabbit	<i>IL2rg; Tiki1; IL2rg + RAG1<sup>a</sup></i>	NHEJ b	F0	7.5–16.6 %	CPI	Low off-target effects	No selection	[238]	

*PPAR-γ* peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *GGTA1* α1,3-galactosyltransferase gene, *CMAH* cytidine monophosphate-*N*-acetylneuraminic acid hydroxylase, *PRNP* prion protein, *RELA* v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian), *LDLR* LDL receptor, *IL2rg* interleukin 2 receptor gamma gene, *BLG* beta-lactoglobulin, *MECP2* methyl-CpG-binding protein, *vWF* Von Willebrand disease gene, *RAG1* recombination-activating gene 1, *DAZL* deleted in azoospermia-like, *APC* adenomatous polyposis coli, *CD163* porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) receptor, *CD1D* non-classical major histocompatibility complex protein, *iGb3S* iGb3 synthase candidate glycosyltransferase, *TYR* tyrosinase gene, *PARK2* parkin, *RBR E3* ubiquitin protein ligase, *PINK1* PTEN-induced putative kinase, *OV* ovalbumin gene, *m* mono-allelic, *b* bi-allelic, *NA* not applicable

\* Transgenic offspring per treated oocytes or embryos

<sup>a</sup> Multiplex gene targeting



**Fig. 4** Schematic representation of components of ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas9 systems. **a** Structure of ZFNs. A ZFN enzyme comprise a DNA-binding domain formed by zinc finger modules (ZF), each recognizing a unique 3-base pair sequence on the target DNA, and a DNA-cleaving domain composed of *FokI*. Two ZFN are designed to recognize DNA sequences that flank the desired cleavage site. In the example, each ZFN comprises four ZF which recognize 12 bp on opposite strands. Upon interaction of ZF with the target site, a *FokI* dimer catalyzes a targeted double-strand break. **b** Model of TALEN system. Targeted DNA cleavage is achieved by a pair of TALEN molecules. Each TALEN is comprised by a TALE and a *FokI*

catalytic domain. TALE-targeting domain comprise a variable number of tandem arrays of repeats of typically 34 amino acids each (shown as colored boxes in **b**). The RVD is responsible for the repeat specificity to associate with a particular base pair on the target DNA. **c** Model of CRISPR/Cas9. Cas9 nuclease is directed to a specific sequence in the genomic DNA by the first 20 nucleotides of the sgRNA, which hybridizes with the target genomic DNA, which has to be followed by a mandatory protospacer adjacent motif (PAM; 5'-NGG for Cas9 system derived from *Streptococcus pyogenes*). Cas9 catalyzes a DSB upstream of the PAM (red arrowheads)

site-specific single-strand breaks in genomic DNA. This modified version of ZFNs can be engineered by mutating the *FokI* catalytic domain in one of the ZFN monomers [220–222]. ZFNickases, and other programmable nucleases with single-strand cleavage capability, are better suited for situations in which HDR-based genome edition is sought. Single-strand break stimulates resolution by HDR; therefore the faulty prone NHEJ pathway is avoided [220, 221]. A ZFNickase was used to stimulate gene addition (lyso-staphin) by HDR into the endogenous beta-casein (*CSN2*) locus of bovine fibroblasts. Treated cells were subsequently used to generate cloned cows that produced the antimicrobial transgene product in milk [223].

Although ZFNs have been exceptionally effective for knocking out genes in farm animal genomes [186], the lack of proprietary algorithms to predict active ZFN molecules has restricted their use [190, 224].

TALENs are fusion proteins that comprise an assembled DNA-targeting domain coupled to a DNA cleavage motif. The DNA-binding domain is derived from proteins secreted by a plant pathogen belonging to the genus *Xanthomonas*. The DNA-binding domain is tethered to a catalytic domain of the non-specific restriction endonuclease *FokI*. DNA recognition and binding is mediated by

tandem repeats of typically 34 amino acids, except for the last module, called half-repeat, which comprises 20 amino acids [212]. Thirty-two of the amino acids that comprise the repeat are highly conserved, whereas variable residues at positions 12 and 13, repeat variable di-residues (RVDs), dictate the binding specificity to a single nucleotide [225, 226]. Based on this code, arrays of tandem repeats can be assembled to target almost any DNA sequence of choice. Similar to ZFNs, TALEN-mediated cleavage depends on the dimerization of a pair of TALEN monomers binding to opposite DNA strands, which activates the *FokI* nuclease domains. Typical a TALEN monomer contains up to twenty tandem repeats, such that upon dimerization a 40-bp target sequence is recognized. Despite this theoretical high specificity, there exists evidence that TALEN can bind to degenerate sequences, and induce DNA cleavage at off-target sites [227, 228].

Several particular features of TALENs make them easier to develop and use than ZFNs [229]. Tan et al. [19] assessed the potential of TALENs (and CRISPR/Cas9 nucleases, see below) to edit the genome of many commercially important species. The authors demonstrated that TALENs can efficiently target a variety of alleles involved in food production, reproductive efficiency and external



traits (hornlessness) [230] in the genomes from different livestock species. In the same study, TALENs were used to induce NHEJ- or HDR-directed edits at specific loci to mimic mutations that are known to be associated with genetic diseases in humans. From the edited cells, live pigs carrying the induced mutations were generated by chromatin transfer (CT) and these animals promise to become valuable large mammalian models in translational medicine. The targeting efficiency ranged from approximately 10 % for single-nucleotide polymorphisms to >50 % for some larger alterations. According to recent data, the TALEN system is also functional and efficient in the preimplantation embryo context, since microinjection of TALEN mRNA directed to the *GDF-8* gene [231, 232] into bovine and ovine zygotes resulted in correctly edited cattle and sheep [233]. In light of these encouraging findings, it is conceivable that genome edition by designer nucleases will become a practical strategy to introduce or suppress genetic characteristics in livestock populations to accelerate the genetic progress in harmony with classic breeding strategies.

The RNA-guided CRISPR/Cas9 system [234, 235] was recently discovered in bacteria and archaea, in which the RNA-guided foreign-DNA cleavage process provides adaptive immunity against invading phages or plasmids [236, 237]. The CRISPR/Cas9 sequence specificity is determined by Watson–Crick base complementarity with a single-guide RNA (sgRNA). The induced DNA damage is repaired by either HR or error-prone NHEJ that normally causes indels at the cleavage site. Design and generation of the synthetic sgRNA is markedly easier compared with the cumbersome protein engineering required to produce ZFNs and TALENs. By changing the nucleotide sequence of the sgRNA it is possible to target almost any site in the genome. The activity of the CRISPR/Cas9 system allows the implementation of high-throughput methodologies and multiplex editing of genomic loci in preimplantation mammalian embryos [238].

From 2013, the CRISPR/Cas9 system bursts into the genome engineering scenario through several independent reports providing encouraging evidence for simplicity and effectiveness of this system to engineer large animal genomes [2, 239–243]. Tan et al. [19] were the first researchers to apply CRISPR/Cas9 technology to target endogenous genes (*P65* and *APC*) in primary pig cells in culture. Despite the demonstration that CRISPR/Cas9 works in livestock cells, recovery of CRISPR mutant cell clones was much lower than that with TALENs, suggesting that CRISPR/Cas9 system needs further optimization to achieve targeting efficiencies comparable to TALENs. Follow-up studies have demonstrated that CRISPR/Cas9 genome-edited cells can support development to term when used as nuclear donor in SCNT in pigs [244–246] and goats [247].

An appealing and straightforward alternative to SCNT to generate genome-edited animals is the injection of the CRISPR/Cas9 components in livestock one-cell embryos produced in vivo or in vitro. Using the CPI approach, Hai et al. [248] managed to obtain live pigs with mono- and biallelic mutations in the *vWF* gene to generate a relevant large animal model for hemophilia. The reported efficiency is quite impressive for a zygote microinjection-based method; with 10 out of 16 born piglets (~63 %) carrying one or both *vWF* alleles mutated. Another study with sheep zygotes microinjected with sgRNA/Cas9 mRNA [249] produced modest results in terms of the number of mutated offspring to born animals (2/32); however, no off-target mutations were detected. A recurrent problem of zygote microinjections is the high incidence of mosaic animals [227, 246, 249, 250], which is believed to originate when the nuclease remains active beyond the first embryo cleavage. Another potential problem associated with the use CRISPR/Cas9 editing system is the introduction of undesired mutations at off-target genomic sites [251, 252]. Based on the relatively short CRISPR/Cas9 recognition site (20 nt) and the known mismatch tolerance, especially at the 5' region of the target sequence, occurrence of off-target mutations should not be disregarded [253]. A strategy to minimize off-target activity is to use a mutated version of Cas9 (D10A mutation [192, 254]) with nickase activity. DNA single-strand break stimulates HDR with negligible NHEJ-mediated mutations. Moreover, when required, a DSB can be simultaneously induced at the target site using a pair of appropriately spaced and oriented sgRNAs along with Cas9 nickase, that enhances genome editing specificity [255]. More research is warranted to ascertain if off-target DNA cleavage rates induced by CRISPR/Cas9 are a concern in the context of genome edition in large animals.

## Conclusions

Transgenic methodologies are constantly evolving, providing researchers and biotechnologists with advanced tools for efficient and controlled genome modifications. Initial transgenic interventions in livestock were confined to simple gene insertion at random places in the genome. Thanks to constant advances in the area of genetic engineering, today it is possible to achieve precise genome modifications by inserting, replacing or removing predefined DNA sequences. In this regard, introduction of methodologies that enable enzymatic manipulation of animal genomes have opened new possibilities to create genetically modified animals for agriculture or biomedicine. Although the transgenic toolbox for large animals is currently equipped with powerful methodologies there are many aspects to improve in the associated reproductive

technologies required to generate a transgenic animal. Low success rates of SCNT and zygote microinjection, two of the most commonly used methods to generate transgenic large animals, still represent a bottleneck. Efficiency of SCNT has remained low in spite of considerable efforts invested in developing more successful protocols, while embryo microinjection has been invariably associated with undesired chimerism. Thus, further improvements in surpassing the limitations of these techniques may impact favorably on the overall efficiency of transgenic methods.

Transposon-based systems are a straightforward alternative to achieve transgene integrations with persistent transgene expression and germline transmission. These characteristics along with increased transgenic efficiencies will certainly reduce costs and contribute to animal welfare by reducing the number of animal required to produce the desired genotype and by avoiding unwanted phenotypes. Transposon-based methods alone or combined with site-directed recombinases will simplify the production of marker-free animals to comply with regulatory guidelines for animal transgenesis.

The ground-breaking feature of designer nucleases is that they brought the possibility of purposely directing the genomic modification to a specific and unique chromosomal locus. Among the members of the engineered nucleases, RNA-guided nucleases are the ones that promise to change the paradigm of genome editing in large animals. The CRISPR/Cas9 system combines facile design and construction with high specificity, effectivity and real possibility of multiplex gene edition. However, there is still room for improvement in particular areas like minimizing off-target effects of designer nucleases, enhancement of nuclease activity, and development of methods to enrich cell population with targeted genome edits. Another avenue to improve engineered nuclease-based methods is through the genetic or pharmacologic manipulation of the DSB repair pathway. For instance, for many applications, enhancement of low-frequency HDR over the NHEJ would be convenient.

The launching of high-throughput genome sequencing at accessible prices will make it possible to improve the quality of current genome data in farm animals and it will become a valuable tool to verify transgenic lines at genome scale. It is anticipated that new generation transgenic tools in concert with updated genomic data will facilitate the production of large animal models for translational medicine. These large animal models will be instrumental for understanding disease pathogenesis and development of better therapeutic approaches of severe human pathologic conditions.

It is foreseen that similar opportunities will arise in agricultural applications of transgenic livestock. Genome sequencing and phenotyping will provide unprecedented

opportunities for the identification of molecular markers that affect livestock performance, which can be readily addressed and manipulated at will by site-directed nucleases to improve productive traits. Experimental evidence has provided proof of principle that non-meiotic introgression of natural or novel genetic variants in livestock genomes is attainable using designer nucleases. Numerous reports cited in this review strongly indicate that designer nucleases have earned enough merit as genome engineering tools as to be considered in the near future in selection programs to advance genetic improvement when selective breeding is impracticable or inefficient. Importantly, the toolbox for genome engineering is still expanding, as new enzymatic systems are constantly discovered. One recent example are the bacterial casposons, which seem to combine the features of CRISPR/Cas and transposons [256, 257], suggesting that more sophisticated options for genome engineering will become feasible in the near future.

**Acknowledgments** Authors acknowledge the financial support from CONICET, FONCYT, UNRC (Republica Argentina), ICAR (India), as well as from DAAD and DFG (Germany).

## References

- Miao X (2013) Recent advances in the development of new transgenic animal technology. *Cell Mol Life Sci* 70(5):815–828. doi:10.1007/s00018-012-1081-7
- Laible G, Wei J, Wagner S (2014) Improving livestock for agriculture: technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnol J*. doi:10.1002/biot.201400193
- Prather RS (2013) Pig genomics for biomedicine. *Nat Biotechnol* 31(2):122–124. doi:10.1038/nbt.2490
- Segal DJ, Meckler JF (2013) Genome engineering at the dawn of the golden age. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14:135–158. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153435
- Cibelli J, Emborg ME, Prockop DJ, Roberts M, Schatten G, Rao M, Harding J, Mirochnitchenko O (2013) Strategies for improving animal models for regenerative medicine. *Cell Stem Cell* 12(3):271–274. doi:10.1016/j.stem.2013.01.004
- Shinohara ET, Kaminski JM, Segal DJ, Pelczar P, Kolhe R, Ryan T, Coates CJ, Fraser MJ, Handler AM, Yanagimachi R, Moisyadi S (2007) Active integration: new strategies for transgenesis. *Transgenic Res* 16(3):333–339
- Garrels W, Ivics Z, Kues WA (2012) Precision genetic engineering in large mammals. *Trends Biotechnol* 30(7):386–393. doi:10.1016/j.tibtech.2012.03.008
- Keravala A, Liu D, Lechman ER, Wolfe D, Nash JA, Lampe DJ, Robbins PD (2006) Hyperactive Himar1 transposase mediates transposition in cell culture and enhances gene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 17(10):1006–1018. doi:10.1089/hum.2006.17.1006
- Zayed H, Izsvák Z, Walisko O, Ivics Z (2004) Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Mol Ther* 9(2):292–304. doi:10.1016/j.ymthe.2003.11.024
- Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L,

- Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvak Z (2009) Molecular evolution of a novel hyperactive sleeping beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 41(6):753–761. doi:10.1038/ng.343
11. Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL (2011) A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(4):1531–1536. doi:10.1073/pnas.1008322108
  12. Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15(5):321–334. doi:10.1038/nrg3686
  13. Jakobsen JE, Johansen MG, Schmidt M, Dagnaes-Hansen F, Dam K, Gunnarsson A, Liu Y, Kragh PM, Li R, Holm IE, Callesen H, Mikkelsen JG, Nielsen AL, Jorgensen AL (2013) Generation of minipigs with targeted transgene insertion by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Transgenic Res* 22(4):709–723. doi:10.1007/s11248-012-9671-6
  14. Yu Y, Wang Y, Tong Q, Liu X, Su F, Quan F, Guo Z, Zhang Y (2013) A site-specific recombinase-based method to produce antibiotic selectable marker free transgenic cattle. *PLoS ONE* 8(5):e62457. doi:10.1371/journal.pone.0062457
  15. Whitelaw CB, Lilloco SG, King T (2008) Production of transgenic farm animals by viral vector-mediated gene transfer. *Reprod Domest Anim* 43(Suppl 2):355–358. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01184.x
  16. Park F (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics* 31(2):159–173. doi:10.1152/physiolgenomics.00069.2007
  17. Pfeifer A, Hofmann A (2009) Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol* 530:391–405. doi:10.1007/978-1-59745-471-1\_21
  18. Lilloco S, Vasey D, King T, Whitelaw B (2011) Lentiviral transgenesis in livestock. *Transgenic Res* 20(3):441–442. doi:10.1007/s11248-010-9448-8
  19. Carlson DF, Tan W, Hackett PB, Fahrnkug SC (2013) Editing livestock genomes with site-specific nucleases. *Reprod Fertil Dev* 26(1):74–82. doi:10.1071/RD13260
  20. Tan W, Carlson DF, Lancto CA, Garbe JR, Webster DA, Hackett PB, Fahrnkug SC (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(41):16526–16531. doi:10.1073/pnas.1310478110
  21. Gun G, Kues WA (2014) Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Biores Open Access* 3(6):255–264. doi:10.1089/biores.2014.0039
  22. Carroll D (2014) Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* 83:409–439. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035418
  23. Schiestl RH, Petes TD (1991) Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(17):7585–7589
  24. Black M, Seeber F, Soldati D, Kim K, Boothroyd JC (1995) Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 74(1):55–63
  25. Maier FJ, Schafer W (1999) Mutagenesis via insertional- or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biol Chem* 380(7–8):855–864. doi:10.1515/BC.1999.105
  26. Marsh-Armstrong N, Huang H, Berry DL, Brown DD (1999) Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(25):14389–14393
  27. Cavolina P, Agnese C, Maddalena A, Sciandrello G, Di Leonardo A (1989) Induction of CAD gene amplification by restriction endonucleases in V79, B7 Chinese hamster cells. *Mutat Res* 225(1–2):61–64
  28. Costa ND, Masson WK, Thacker J (1993) The effectiveness of restriction endonucleases in cell killing and mutation. *Somat Cell Mol Genet* 19(5):479–490
  29. Seo BB, Kim CH, Yamanouchi K, Takahashi M, Sawasaki T, Tachi C, Tojo H (2000) Co-injection of restriction enzyme with foreign DNA into the pronucleus for elevating production efficiencies of transgenic animals. *Anim Reprod Sci* 63(1–2):113–122
  30. Wall RJ (1996) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57–68
  31. Abella Columna E, Giaccia AJ, Evans JW, Yates BL, Morgan WF (1993) Analysis of restriction enzyme-induced chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen* 22(1):26–33
  32. Dewey WC, Miller HH, Leeper DB (1971) Chromosomal aberrations and mortality of x-irradiated mammalian cells: emphasis on repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(3):667–671
  33. Obe G, Von der Hude W, Scheutwinkel-Reich M, Basler A (1986) The restriction endonuclease Alu I induces chromosomal aberrations and mutations in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus, but not in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase locus in V79 hamster cells. *Mutat Res* 174(1):71–74. doi:10.1016/0165-7992(86)90079-5
  34. Singh B, Bryant PE (1991) Induction of mutations at the thymidine kinase locus in CHO cells by restriction endonucleases. *Mutagenesis* 6(3):219–223
  35. Hafez M, Hausner G (2012) Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome* 55(8):553–569. doi:10.1139/g2012-049
  36. Jacquier A, Dujon B (1985) An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* 41(2):383–394
  37. Ogino H, McConnell WB, Grainger RM (2006) Highly efficient transgenesis in *Xenopus tropicalis* using I-SceI meganuclease. *Mech Dev* 123(2):103–113
  38. Thernes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS (2002) I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* 118(1–2):91–98
  39. Bevacqua RJ, Canel NG, Hiriart MI, Sipowicz P, Rozenblum GT, Vitullo A, Radrizzani M, Fernandez Martin R, Salamone DF (2013) Simple gene transfer technique based on I-SceI meganuclease and cytoplasmic injection in IVF bovine embryos. *Theriogenology* 80(2):104–113. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.017
  40. Ortega MN, Benítez SB, Barrionuevo BE, Olmos Nicotra MF, Alessio AP, Fili AE, Forcato DO, Stice SL, Bosch P (2012) Meganuclease I-SceI enhances stable transgene integration in cultured bovine fetal fibroblasts. *Reprod Fertil Dev* 25(1):170–171. doi:10.1071/RDv25n1Ab46
  41. Wang Y, Zhou XY, Xiang PY, Wang LL, Tang H, Xie F, Li L, Wei H (2014) The meganuclease I-SceI containing nuclear localization signal (NLS-I-SceI) efficiently mediated mammalian germline transgenesis via embryo cytoplasmic microinjection. *PLoS ONE* 9(9):e108347. doi:10.1371/journal.pone.0108347
  42. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(2):353–357
  43. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57(5):717–723
  44. Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD (1989) No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59(2):239–241
  45. Tsai HJ (2000) Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. *Mol Reprod Dev* 56(2)

- Suppl):281–284. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<281:AID-MRD15>3.0.CO;2-B
46. Shamila Y, Mathavan S (2000) Sperm/DNA interaction: DNA binding proteins in sperm cell of silkworm *Bombyx mori*. *Mol Reprod Dev* 56(2 Suppl):289–291. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<289:AID-MRD17>3.0.CO;2-Y
  47. Fernandez MA, Mani SA, Rangarajan PN, Seshagiri PB (1999) Sperm-mediated gene transfer into oocytes of the golden hamster: assessment of sperm function. *Indian J Exp Biol* 37(11):1085–1092
  48. Cappello F, Stassi G, Lazzereschi D, Renzi L, Di Stefano C, Marfe G, Giancotti P, Wang HJ, Stoppacciaro A, Forni M, Bacci ML, Turchi V, Sinibaldi P, Rossi M, Bruzzone P, Pretagostini R, Della Casa G, Cortesini R, Frati L, Lavitrano M (2000) hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer. *Transplant Proc* 32(5):895–896
  49. Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y (2000) Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol Reprod Dev* 56(S2):306–308
  50. Sciamanna I, Piccoli S, Barberi L, Zaccagnini G, Magnano AR, Giordano R, Campedelli P, Hodgson C, Lorenzini R, Spadafora C (2000) DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 56(2 Suppl):301–305. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200006)56:2+<301:AID-MRD20>3.0.CO;2-B
  51. Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284(5417):1180–1183
  52. Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H (2012) Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Mol Reprod Dev* 79(3):218–228. doi:10.1002/mrd.22015
  53. Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S (2005) Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 13(1):79–85
  54. Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, Olivera R, Jarazo J, Vichera G, Gibbons A, Salamone D (2008) A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reprod Fertil Dev* 20(7):741–749
  55. Bevacqua RJ, Pereyra-Bonnet F, Fernandez-Martin R, Salamone DF (2010) High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Theriogenology* 74(6):922–931. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.017
  56. Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G (2000) Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 6(1):26–33
  57. Mizushima S, Takagi S, Ono T, Atsumi Y, Tsukada A, Saito N, Sasanami T, Okabe M, Shimada K (2010) Novel method of gene transfer in birds: intracytoplasmic sperm injection for green fluorescent protein expression in quail blastoderms. *Biol Reprod* 83(6):965–969. doi:10.1095/biolreprod.110.085860
  58. Henikoff S (1998) Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays* 20(7):532–535. doi:10.1002/(sici)1521-1878(199807)20:7<532:aid-bies3>3.0.co;2-m
  59. Kues WA, Schwinzer R, Wirth D, Verhoeyen E, Lemme E, Herrmann D, Barg-Kues B, Hauser H, Wonigeit K, Niemann H (2006) Epigenetic silencing and tissue independent expression of a novel tetracycline inducible system in double-transgenic pigs. *FASEB J* 20(8):1200–1202. doi:10.1096/fj.05-5415fje
  60. Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P (2005) Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 64(8):1704–1715
  61. Suganuma R, Pelczar P, Spetz JF, Hohn B, Yanagimachi R, Moisyadi S (2005) Tn5 transposase-mediated mouse transgenesis. *Biol Reprod* 73(6):1157–1163
  62. Maga EA, Sargent RG, Zeng H, Pati S, Zarling DA, Oppenheim SM, Collette NM, Moyer AL, Conrad-Brink JS, Rowe JD, BonDurant RH, Anderson GB, Murray JD (2003) Increased efficiency of transgenic livestock production. *Transgenic Res* 12(4):485–496
  63. Mason JB, Najarian JG, Anderson GB, Murray JD, Maga EA (2006) The effect of coating single- and double-stranded DNA with the recombinase A protein of *Escherichia coli* on transgene integration in mice. *Transgenic Res* 15(6):703–710. doi:10.1007/s11248-006-9005-7
  64. Moisyadi S, Kaminski JM, Yanagimachi R (2009) Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32(2):47–60. doi:10.1016/j.cimid.2008.05.003
  65. Garrels W, Mates L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, Niemann H, Izsvak Z, Ivics Z, Kues WA (2011) Germline transgenic pigs by sleeping beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS ONE* 6(8):e23573. doi:10.1371/journal.pone.0023573
  66. Ivics Z, Garrels W, Mátés L, Yau TY, Bashir S, Zidek V, Landa V, Geurts A, Pravenec M, Rüllicke T, Kues WA, Izsvák Z (2014) Germline transgenesis in pigs by cytoplasmic microinjection of sleeping beauty transposons. *Nat Protoc* 9(4):810–827. doi:10.1038/nprot.2014.010
  67. Kawakami K (2007) Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8(Suppl 1):S7. doi:10.1186/gb-2007-8-s1-s7
  68. Suster ML, Abe G, Schouw A, Kawakami K (2011) Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc* 6(12):1998–2021. doi:10.1038/nprot.2011.416
  69. Schnutgen F, Stewart AF, von Melchner H, Anastassiadis K (2006) Engineering embryonic stem cells with recombinase systems. *Methods Enzymol* 420:100–136. doi:10.1016/s0076-6879(06)20007-7
  70. Mali P, Esvelt KM, Church GM (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10(10):957–963. doi:10.1038/nmeth.2649
  71. McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36(6):344–355
  72. Makalowski W, Pande A, Gotea V, Makalowska I (2012) Transposable elements and their identification. *Methods Mol Biol* 855:337–359. doi:10.1007/978-1-61779-582-4\_12
  73. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M,

- Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korfi I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowski J, Consortium IHGS (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860–921. doi:10.1038/35057062
74. Muñoz-López M, García-Pérez JL (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* 11(2):115–128. doi:10.2174/138920210790886871
75. Ostertag EM, Kazazian HH (2001) Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet* 35:501–538. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.091032
76. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV (2002) Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* 110(3):315–325
77. Plasterk RH, Izsvák Z, Ivics Z (1999) Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet* 15(8):326–332
78. Ivics Z, Li MA, Mates L, Boeke JD, Nagy A, Bradley A, Izsvák Z (2009) Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods* 6(6):415–422. doi:10.1038/nmeth.1332
79. Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z (1997) Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91(4):501–510
80. van Luenen HG, Colloms SD, Plasterk RH (1994) The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. *Cell* 79(2):293–301
81. Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z (2007) Technology transfer from worms and flies to vertebrates: transposition-based genome manipulations and their future perspectives. *Genome Biol* 8(Suppl 1):S1. doi:10.1186/gb-2007-8-s1-s1
82. Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T (2005) Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* 122(3):473–483. doi:10.1016/j.cell.2005.07.013
83. Horie K, Yusa K, Yae K, Odajima J, Fischer SE, Keng VW, Hayakawa T, Mizuno S, Kondoh G, Ijiri T, Matsuda Y, Plasterk RH, Takeda J (2003) Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol Cell Biol* 23(24):9189–9207
84. Balciunas D, Wangenstein KJ, Wilber A, Bell J, Geurts A, Sivasubbu S, Wang X, Hackett PB, Largaespada DA, McIvor RS, Ekker SC (2006) Harnessing a high cargo-capacity transposon for genetic applications in vertebrates. *PLoS Genet* 2(11):e169. doi:10.1371/journal.pgen.0020169
85. Rostovskaya M, Naumann R, Fu J, Obst M, Mueller D, Stewart AF, Anastassiadis K (2013) Transposon mediated BAC transgenesis via pronuclear injection of mouse zygotes. *Genesis* 51(2):135–141. doi:10.1002/dvg.22362
86. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 22(9):3157–3173
87. Carlson DF, Garbe JR, Tan W, Martin MJ, Dobrinsky JR, Hackett PB, Clark KJ, Fahrenkrug SC (2011) Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the sleeping beauty transposon system. *Transgenic Res* 20(5):1125–1137. doi:10.1007/s11248-010-9481-7
88. Ryding AD, Sharp MG, Mullins JJ (2001) Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol* 171(1):1–14
89. Woltjen K, Hämäläinen R, Kibschull M, Mileikovsky M, Nagy A (2011) Transgene-free production of pluripotent stem cells using piggyBac transposons. *Methods Mol Biol* 767:87–103. doi:10.1007/978-1-61779-201-4\_7
90. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6(5):363–369. doi:10.1038/nmeth.1323
91. Li X, Burnight ER, Cooney AL, Malani N, Brady T, Sander JD, Staber J, Wheelan SJ, Joung JK, McCray PB, Bushman FD, Sinn PL, Craig NL (2013) piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(25):E2279–E2287. doi:10.1073/pnas.1305987110
92. Sinzelle L, Vallin J, Coen L, Chesneau A, Du Pasquier D, Pollet N, Demeneix B, Mazabraud A (2006) Generation of transgenic *Xenopus laevis* using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Res* 15(6):751–760. doi:10.1007/s11248-006-9014-6
93. Yergeau DA, Johnson Hamlet MR, Kuliyeu E, Zhu H, Doherty JR, Archer TD, Subhawong AP, Valentine MB, Kelley CM, Mead PE (2009) Transgenesis in *Xenopus* using the sleeping beauty transposon system. *Dev Dyn* 238(7):1727–1743. doi:10.1002/dvdy.21994
94. Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, Takahashi R, Ueda M, Keng VW, Horie K, Takeda J (2007) Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat Methods* 4(2):131–133. doi:10.1038/nmeth1002
95. Clark KJ, Carlson DF, Foster LK, Kong BW, Foster DN, Fahrenkrug SC (2007) Enzymatic engineering of the porcine genome with transposons and recombinases. *BMC Biotechnol* 7:42. doi:10.1186/1472-6750-7-42
96. Baus J, Liu L, Heggstad AD, Sanz S, Fletcher BS (2005) Hyperactive transposase mutants of the Sleeping Beauty transposon. *Mol Ther* 12(6):1148–1156. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.484
97. Yant SR, Park J, Huang Y, Mikkelsen JG, Kay MA (2004) Mutational analysis of the N-terminal DNA-binding domain of sleeping beauty transposase: critical residues for DNA binding and hyperactivity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 24(20):9239–9247. doi:10.1128/MCB.24.20.9239-9247.2004
98. Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu G, Cui Z, Dupuy AJ, Bell JB, Largaespada DA, Hackett PB (2003) Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* 8(1):108–117
99. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(12):7380–7384
100. Bondioli KR, Biery KA, Hill KG, Jones KB, De Mayo FJ (1991) Production of transgenic cattle by pronuclear injection. *Biotechnology* 16:265–273

101. Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315(6021):680–683
102. Iqbal K, Barg-Kues B, Broll S, Bode J, Niemann H, Kues W (2009) Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *Biotechniques* 47(5):959–968. doi:10.2144/000113270
103. Clark KJ, Urban MD, Skuster KJ, Ekker SC (2011) Transgenic zebrafish using transposable elements. *Methods Cell Biol* 104:137–149. doi:10.1016/B978-0-12-374814-0.00008-2
104. Marh J, Stoytcheva Z, Urschitz J, Sugawara A, Yamashiro H, Owens JB, Stoytchev I, Pelczar P, Yanagimachi R, Moisyadi S (2012) Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(47):19184–19189. doi:10.1073/pnas.1216473109
105. Jang CW, Behringer RR (2007) Transposon-mediated transgenesis in rats. *CSH Protoc* 2007:pdb.prot4866
106. Li Z, Zeng F, Meng F, Xu Z, Zhang X, Huang X, Tang F, Gao W, Shi J, He X, Liu D, Wang C, Urschitz J, Moisyadi S, Wu Z (2014) Generation of transgenic pigs by cytoplasmic injection of piggyBac transposase based pmGENIE-3 plasmids. *Biol Reprod* 90(5):93–102. doi:10.1095/biolreprod.113.116905
107. Jakobsen JE, Li J, Kragh PM, Moldt B, Lin L, Liu Y, Schmidt M, Winther KD, Schyth BD, Holm IE, Vajta G, Bolund L, Callesen H, Jorgensen AL, Nielsen AL, Mikkelsen JG (2011) Pig transgenesis by sleeping beauty DNA transposition. *Transgenic Res* 20(3):533–545. doi:10.1007/s11248-010-9438-x
108. Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813
109. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmot I (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380(6569):64–66
110. Bosch P, Hodges CA, Stice SL (2004) Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biotechnologia Aplicada* 21(3):128–136
111. Wu Z, Xu Z, Zou X, Zeng F, Shi J, Liu D, Urschitz J, Moisyadi S, Li Z (2013) Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* 22(6):1107–1118. doi:10.1007/s11248-013-9729-0
112. Alessio A, Fili A, Forcato D, Olmos-Nicotra F, Alustiza F, Rodriguez N, Owens J, Moisyadi S, Kues WA, Bosch P (2014) Efficient piggyBac transposon-mediated transgene integration into bovine fetal fibroblast genome. *Reprod Dom Anim* 49(S1):8
113. Wilson MH, Coates CJ, George AL Jr (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 15(1):139–145. doi:10.1038/sj.mt.6300028
114. Ikeda R, Kokubu C, Yusa K, Keng VW, Horie K, Takeda J (2007) Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 27(5):1665–1676. doi:10.1128/MCB.01500-06
115. Yant SR, Wu X, Huang Y, Garrison B, Burgess SM, Kay MA (2005) High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* 25(6):2085–2094. doi:10.1128/MCB.25.6.2085-2094.2005
116. Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 3(8):789–798
117. Gellert M, Nash H (1987) Communication between segments of DNA during site-specific recombination. *Nature* 325(6103):401–404. doi:10.1038/325401a0
118. Sadowski P (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* 165(2):341–347
119. Fukushima S, Sauer B (1992) Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(17):7905–7909
120. O’Gorman S, Fox DT, Wahl GM (1991) Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251(4999):1351–1355
121. Bestor TH (2000) Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 105(4):409–411. doi:10.1172/JCI9459
122. Whitelaw E, Sutherland H, Kearns M, Morgan H, Weaving L, Garrick D (2001) Epigenetic effects on transgene expression. *Methods Mol Biol* 158:351–368. doi:10.1385/1-59259-220-1:351
123. Grindley ND, Whiteson KL, Rice PA (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 75:567–605. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908
124. Stark WM, Boocock MR, Sherratt DJ (1992) Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet* 8(12):432–439
125. Dymecki SM (2000) Site-specific recombination in cells and mice. In: Joyner AL (ed) *Gene targeting: a practical approach. The practical approach, 2nd edn.* Oxford University Press, New York, pp 36–99
126. Wang Y, Yau YY, Perkins-Balding D, Thomson JG (2011) Recombinase technology: applications and possibilities. *Plant Cell Rep* 30(3):267–285. doi:10.1007/s00299-010-0938-1
127. Grainge I, Jayaram M (1999) The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Mol Microbiol* 33(3):449–456
128. Branda CS, Dymecki SM (2004) Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6(1):7–28
129. Turan S, Zehe C, Kuehle J, Qiao J, Bode J (2013) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene* 515(1):1–27. doi:10.1016/j.gene.2012.11.016
130. Jones JR, Shelton KD, Magnuson MA (2005) Strategies for the use of site-specific recombinases in genome engineering. *Methods Mol Med* 103:245–257
131. Turan S, Galla M, Ernst E, Qiao J, Voelkel C, Schiedlmeier B, Zehe C, Bode J (2011) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges. *J Mol Biol* 407(2):193–221. doi:10.1016/j.jmb.2011.01.004
132. Araki K, Araki M, Yamamura K (1997) Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25(4):868–872
133. Araki K, Imaizumi T, Sekimoto T, Yoshinobu K, Yoshimuta J, Akizuki M, Miura K, Araki M, Yamamura K (1999) Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(5):737–750
134. Senecoff JF, Rossmeissl PJ, Cox MM (1988) DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 mu plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site. *J Mol Biol* 201(2):405–421
135. Schlake T, Bode J (1994) Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33(43):12746–12751
136. Kolb AF, Siddell SG (1996) Genomic targeting with an MBP-Cre fusion protein. *Gene* 183(1–2):53–60
137. Baubonis W, Sauer B (1993) Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 21(9):2025–2029
138. de Wit T, Drabek D, Grosveld F (1998) Microinjection of cre recombinase RNA induces site-specific recombination of a transgene in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res* 26(2):676–678
139. Braun T, Bober E, Rudnicki MA, Jaenisch R, Arnold HH (1994) MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development* 120(11):3083–3092

140. Fiering S, Kim CG, Epner EM, Groudine M (1993) An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(18):8469–8473
141. Kim CG, Epner EM, Forrester WC, Groudine M (1992) Inactivation of the human beta-globin gene by targeted insertion into the beta-globin locus control region. *Genes Dev* 6(6):928–938
142. Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ (1996) Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85(1):1–4
143. Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(23):13090–13095
144. Howard TH, Homan EJ, Bremel RD (2001) Transgenic livestock: regulation and science in a changing environment. *J Anim Sci* 79:E1–E11
145. Askew GR, Doetschman T, Lingrel JB (1993) Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol* 13(7):4115–4124
146. Stacey A, Schnieke A, McWhir J, Cooper J, Colman A, Melton DW (1994) Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol Cell Biol* 14(2):1009–1016
147. Wu H, Liu X, Jaenisch R (1994) Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Colla-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(7):2819–2823
148. Graham C, Cole S, Laible G (2009) Site-specific modification of the bovine genome using Cre recombinase-mediated gene targeting. *Biotechnol J* 4(1):108–118. doi:10.1002/biot.200800200
149. Yu Y, Tong Q, Li Z, Tian J, Wang Y, Su F, Liu J, Zhang Y (2014) Improved site-specific recombinase-based method to produce selectable marker- and vector-backbone-free transgenic cells. *Sci Rep* 4:4240. doi:10.1038/srep04240
150. Yu H, Wang X, Zhu L, He Z, Liu G, Xu X, Chen J, Cheng G (2013) Establishment of a rapid and scalable gene expression system in livestock by site-specific integration. *Gene* 515(2):367–371. doi:10.1016/j.gene.2012.10.017
151. Wang S, Sun X, Ding F, Zhang K, Zhao R, Li S, Li R, Tang B, Zhang L, Liu Y, Li J, Gao F, Wang H, Wang L, Dai Y, Li N (2009) Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on recloned embryo development. *Theriogenology* 72(4):535–541. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.009
152. Xu Y, Liu S, Yu G, Chen J, Xu X, Wu Y, Zhang A, Dowdy SF, Cheng G (2008) Excision of selectable genes from transgenic goat cells by a protein transducible TAT-Cre recombinase. *Gene* 419(1–2):70–74. doi:10.1016/j.gene.2008.04.020
153. Zhang H, Hasty P, Bradley A (1994) Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 14(4):2404–2410
154. Nagy A, Moens C, Ivanyi E, Pawling J, Gertsenstein M, Hadjantonakis AK, Pirity M, Rossant J (1998) Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol* 8(11):661–664
155. Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A (1995) Chromosome engineering in mice. *Nature* 378(6558):720–724. doi:10.1038/378720a0
156. Zou YR, Müller W, Gu H, Rajewsky K (1994) Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies. *Curr Biol* 4(12):1099–1103
157. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossman H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265(5168):103–106
158. Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269(5229):1427–1429
159. Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2):99–109
160. Chen L, Li L, Pang D, Li Z, Wang T, Zhang M, Song N, Yan S, Lai LX, Ouyang H (2010) Construction of transgenic swine with induced expression of Cre recombinase. *Animal* 4(5):767–771. doi:10.1017/S1751731109991571
161. Li S, Flisikowska T, Kurome M, Zakhartchenko V, Kessler B, Saur D, Kind A, Wolf E, Flisikowski K, Schnieke A (2014) Dual fluorescent reporter pig for Cre recombination: transgene placement at the ROSA26 locus. *PLoS ONE* 9(7):e102455. doi:10.1371/journal.pone.0102455
162. Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP (2000) A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11):5995–6000. doi:10.1073/pnas.090527097
163. Belteki G, Gertsenstein M, Ow DW, Nagy A (2003) Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing phiC31 integrase. *Nat Biotechnol* 21(3):321–324. doi:10.1038/nbt787
164. Smith MC, Brown WR, McEwan AR, Rowley PA (2010) Site-specific recombination by phiC31 integrase and other large serine recombinases. *Biochem Soc Trans* 38(2):388–394. doi:10.1042/BST0380388
165. Thorpe HM, Wilson SE, Smith MC (2000) Control of directionality in the site-specific recombination system of the *Streptomyces* phage phiC31. *Mol Microbiol* 38(2):232–241
166. Farruggio AP, Chavez CL, Mikell CL, Calos MP (2012) Efficient reversal of phiC31 integrase recombination in mammalian cells. *Biotechnol J* 7(11):1332–1336. doi:10.1002/biot.201200283
167. Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP (2001) Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol* 21(12):3926–3934. doi:10.1128/MCB.21.12.3926-3934.2001
168. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* 166(4):1775–1782
169. Yin Y, Cao G, Xue R, Gong C (2014) Construction of transformed, cultured silkworm cells and transgenic silkworm using the site-specific integrase system from phage phiC31. *Mol Biol Rep* 41(10):6449–6456. doi:10.1007/s11033-014-3527-5
170. Allen BG, Weeks DL (2005) Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using phiC31 integrase. *Nat Methods* 2(12):975–979. doi:10.1038/nmeth814
171. Hu ZP, Chen LS, Jia CY, Zhu HZ, Wang W, Zhong J (2013) Screening of potential pseudo att sites of *Streptomyces* phage phiC31 integrase in the human genome. *Acta Pharmacol Sin* 34(4):561–569. doi:10.1038/aps.2012.173
172. Ma QW, Sheng HQ, Yan JB, Cheng S, Huang Y, Chen-Tsai Y, Ren ZR, Huang SZ, Zeng YT (2006) Identification of pseudo attP sites for phage phiC31 integrase in bovine genome. *Biochem Biophys Res Commun* 345(3):984–988. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.145
173. Qu L, Ma Q, Zhou Z, Ma H, Huang Y, Huang S, Zeng F, Zeng Y (2012) A profile of native integration sites used by phiC31 integrase in the bovine genome. *J Genet Genomics* 39(5):217–224. doi:10.1016/j.jgg.2012.03.004
174. Ni W, Hu S, Qiao J, Wang Y, Shi H, He Z, Li G, Chen C (2012) PhiC31 integrase mediates efficient site-specific integration in sheep fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(11):2093–2095. doi:10.1271/bbb.120439

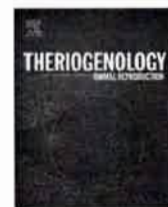
175. Ma H, Ma Q, Lu Y, Wang J, Hu W, Gong Z, Cai L, Huang Y, Huang SZ, Zeng F (2014) PhiC31 integrase induces efficient site-specific recombination in the *Capra hircus* genome. *DNA Cell Biol* 33(8):484–491. doi:10.1089/dna.2013.2124
176. Bi Y, Liu X, Zhang L, Shao C, Ma Z, Hua Z, Li L, Hua W, Xiao H, Wei Q, Zheng X (2013) Pseudo attP sites in favor of transgene integration and expression in cultured porcine cells identified by *Streptomyces* phage phiC31 integrase. *BMC Mol Biol* 14:20. doi:10.1186/1471-2199-14-20
177. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD (2012) Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 12(1):51–58. doi:10.1038/nrc3179
178. Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, Kadota K, Roth SL, Giardina P, Viale A, Leslie C, Bushman FD, Studer L, Sadelain M (2011) Genomic safe harbors permit high  $\beta$ -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29(1):73–78. doi:10.1038/nbt.1717
179. Keravala A, Lee S, Thyagarajan B, Olivares EC, Gabrovsky VE, Woodard LE, Calos MP (2009) Mutational derivatives of PhiC31 integrase with increased efficiency and specificity. *Mol Ther* 17(1):112–120. doi:10.1038/mt.2008.241
180. Scimmenti CR, Thyagarajan B, Calos MP (2001) Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence. *Nucleic Acids Res* 29(24):5044–5051
181. Xu Z, Thomas L, Davies B, Chalmers R, Smith M, Brown W (2013) Accuracy and efficiency define Bxb1 integrase as the best of fifteen candidate serine recombinases for the integration of DNA into the human genome. *BMC Biotechnol* 13:87. doi:10.1186/1472-6750-13-87
182. Olivares EC, Hollis RP, Calos MP (2001) Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells. *Gene* 278(1–2):167–176
183. Stoll SM, Ginsburg DS, Calos MP (2002) Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells. *J Bacteriol* 184(13):3657–3663
184. Keravala A, Groth AC, Jarrahan S, Thyagarajan B, Hoyt JJ, Kirby PJ, Calos MP (2006) A diversity of serine phage integrases mediate site-specific recombination in mammalian cells. *Mol Genet Genomics* 276(2):135–146. doi:10.1007/s00438-006-0129-5
185. Russell JP, Chang DW, Tretiakova A, Padidam M (2006) Phage Bxb1 integrase mediates highly efficient site-specific recombination in mammalian cells. *Biotechniques* 40(4):462
186. Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H (2011) Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(29):12013–12017. doi:10.1073/pnas.1106422108
187. Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, Voytas DF, Long CR, Whitelaw CB, Fahrrenkrug SC (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(43):17382–17387. doi:10.1073/pnas.1211446109
188. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186(2):757–761. doi:10.1534/genetics.110.120717
189. Carroll D (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 188(4):773–782. doi:10.1534/genetics.111.131433
190. Carlson DF, Fahrrenkrug SC, Hackett PB (2012) Targeting DNA with fingers and TALENs. *Mol Ther Nucleic Acids* 1:e3. doi:10.1038/mtna.2011.5
191. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife (Cambridge)* 2:e00471. doi:10.7554/eLife.00471
192. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816–821. doi:10.1126/science.1225829
193. Sun N, Abil Z, Zhao H (2012) Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems. *Biotechnol J* 7(9):1074–1087. doi:10.1002/biot.201200038
194. Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL (2002) Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20(3):251–255
195. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405(6790):1066–1069
196. Yu G, Chen J, Yu H, Liu S, Xu X, Sha H, Zhang X, Wu G, Xu S, Cheng G (2006) Functional disruption of the prion protein gene in cloned goats. *J Gen Virol* 87(Pt 4):1019–1027. doi:10.1099/vir.0.81384-0
197. Zhu C, Li B, Yu G, Chen J, Yu H, Xu X, Wu Y, Zhang A, Cheng G (2009) Production of Prnp<sup>-/-</sup> goats by gene targeting in adult fibroblasts. *Transgenic Res* 18(2):163–171. doi:10.1007/s11248-008-9220-5
198. Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ (2001) Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* 19(6):559–562
199. Zhou ZR, Zhong BS, Jia RX, Wan YJ, Zhang YL, Fan YX, Wang LZ, You JH, Wang ZY, Wang F (2013) Production of myostatin-targeted goat by nuclear transfer from cultured adult somatic cells. *Theriogenology* 79(2):225–233. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.08.006
200. Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3):503–512
201. Porter AC, Itzhaki JE (1993) Gene targeting in human somatic cells. Complete inactivation of an interferon-inducible gene. *Eur J Biochem* 218(2):273–281
202. Brown JP, Wei W, Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277(5327):831–834
203. Smith LC, Suzuki J, Goff AK, Filion F, Therrien J, Murphy BD, Kohan-Ghadr HR, Lefebvre R, Brisville AC, Buczinski S, Fecteau G, Perecin F, Meirelles FV (2012) Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod Domest Anim* 47(Suppl 4):107–114. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02063.x
204. Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, Jasin M (1995) Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 23(24):5012–5019
205. Rouet P, Smih F, Jasin M (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 14(12):8096–8106
206. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cheron JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 29(8):731–734. doi:10.1038/nbt.1927
207. Lombardo A, Cesana D, Genovese P, Di Stefano B, Provasi E, Colombo DF, Neri M, Magnani Z, Cantore A, Lo Riso P, Damo M, Pello OM, Holmes MC, Gregory PD, Gritti A, Broccoli V, Bonini C, Naldini L (2011) Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat Methods* 8(10):861–869. doi:10.1038/nmeth.1674



208. Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN (2008) Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15):5809–5814. doi:10.1073/pnas.0800940105
209. Whyte JJ, Zhao J, Wells KD, Samuel MS, Whitworth KM, Walters EM, Laughlin MH, Prather RS (2011) Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev* 78(1):2. doi:10.1002/mrd.21271
210. Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L (2011) Generation of PPAR $\gamma$  mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res* 21(6):979–982. doi:10.1038/cr.2011.70
211. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N (2011) Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res* 21(11):1638–1640. doi:10.1038/cr.2011.153
212. Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333(6051):1843–1846. doi:10.1126/science.1204094
213. Seruggia D, Montoliu L (2014) The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res* 23(5):707–716. doi:10.1007/s11248-014-9823-y
214. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(3):1156–1160
215. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 25(7):778–785. doi:10.1038/nbt1319
216. Szczepek M, Brondani V, Büchel J, Serrano L, Segal DJ, Cathomen T (2007) Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 25(7):786–793. doi:10.1038/nbt1317
217. Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H (2010) Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun* 402(1):14–18. doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.092
218. Whyte JJ, Prather RS (2011) Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol Reprod Dev* 78(10–11):879–891. doi:10.1002/mrd.21333
219. Bao L, Chen H, Jong U, Rim C, Li W, Lin X, Zhang D, Luo Q, Cui C, Huang H, Zhang Y, Xiao L, Fu Z (2014) Generation of GGTA1 biallelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci* 57(2):263–268. doi:10.1007/s11427-013-4601-2
220. Kim E, Kim S, Kim DH, Choi BS, Choi IY, Kim JS (2012) Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. *Genome Res* 22(7):1327–1333. doi:10.1101/gr.138792.112
221. Ramirez CL, Certo MT, Mussolino C, Goodwin MJ, Cradick TJ, McCaffrey AP, Cathomen T, Scharenberg AM, Joong JK (2012) Engineered zinc finger nucleases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res* 40(12):5560–5568. doi:10.1093/nar/gks179
222. Wang J, Friedman G, Doyon Y, Wang NS, Li CJ, Miller JC, Hua KL, Yan JJ, Babiarz JE, Gregory PD, Holmes MC (2012) Targeted gene addition to a predetermined site in the human genome using a ZFN-based nicking enzyme. *Genome Res* 22(7):1316–1326. doi:10.1101/gr.122879.111
223. Liu X, Wang Y, Guo W, Chang B, Liu J, Guo Z, Quan F, Zhang Y (2013) Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lyso-staphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat Commun* 4:2565. doi:10.1038/ncomms3565
224. Camenisch TD, Brilliant MH, Segal DJ (2008) Critical parameters for genome editing using zinc finger nucleases. *Mini Rev Med Chem* 8(7):669–676
225. Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* 335(6069):720–723. doi:10.1126/science.1215670
226. Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* 335(6069):716–719. doi:10.1126/science.1216211
227. Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Ane-gon I, Cost GJ (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* 29(8):695–696. doi:10.1038/nbt.1940
228. Mussolino C, Cathomen T (2011) On target? Tracing zinc-finger-nuclease specificity. *Nat Methods* 8(9):725–726. doi:10.1038/nmeth.1680
229. Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, Joong JK, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR (2012) Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. *Nucleic Acids Res* 40(16):8001–8010. doi:10.1093/nar/gks518
230. Tan WS, Carlson DF, Walton MW, Fahrenkrug SC, Hackett PB (2012) Precision editing of large animal genomes. *Adv Genet* 80:37–97. doi:10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8
231. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled belgian blue and pied-montese cattle. *Genome Res* 7(9):910–916
232. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirotin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménéssier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17(1):71–74. doi:10.1038/ng0997-71
233. Proudfoot C, Carlson DF, Huddart R, Long CR, Pryor JH, King TJ, Lillico SG, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB, Fahrenkrug SC (2014) Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res*. doi:10.1007/s11248-014-9832-x
234. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121):819–823. doi:10.1126/science.1231143
235. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joong JK (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31(3):227–229. doi:10.1038/nbt.2501
236. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1:7. doi:10.1186/1745-6150-1-7
237. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819):1709–1712. doi:10.1126/science.1138140
238. Yan Q, Zhang Q, Yang H, Zou Q, Tang C, Fan N, Lai L (2014) Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen (Lond)* 3(1):12. doi:10.1186/2045-9769-3-12

239. Huang J, Guo X, Fan N, Song J, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Yan Q, Yi X, Schambach A, Frampton J, Esteban MA, Yang D, Yang H, Lai L (2014) RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 193(3):1496–1503. doi:10.4049/jimmunol.1400915
240. Reyes LM, Estrada JL, Wang ZY, Blosser RJ, Smith RF, Sidner RA, Paris LL, Blankenship RL, Ray CN, Miner AC, Tector M, Tector AJ (2014) Creating class I MHC-null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *J Immunol* 193(11):5751–5757. doi:10.4049/jimmunol.1402059
241. Boulanger L, Pannetier M, Gall L, Allais-Bonnet A, Elzaïat M, Le Bourhis D, Daniel N, Richard C, Cotinot C, Ghyselinck NB, Pailhoux E (2014) FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol* 24(4):404–408. doi:10.1016/j.cub.2013.12.039
242. Chen Y, Cui Y, Shen B, Niu Y, Zhao X, Wang L, Wang J, Li W, Zhou Q, Ji W, Sha J, Huang X (2014) Germline acquisition of Cas9/RNA-mediated gene modifications in monkeys. *Cell Res*. doi:10.1038/cr.2014.167
243. Wan H, Feng C, Teng F, Yang S, Hu B, Niu Y, Xiang AP, Fang W, Ji W, Li W, Zhao X, Zhou Q (2014) One-step generation of p53 gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*. doi:10.1038/cr.2014.158
244. Zhou X, Xin J, Fan N, Zou Q, Huang J, Ouyang Z, Zhao Y, Zhao B, Liu Z, Lai S, Yi X, Guo L, Esteban MA, Zeng Y, Yang H, Lai L (2014) Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-014-1744-7
245. Li P, Estrada JL, Burlak C, Montgomery J, Butler JR, Santos RM, Wang ZY, Paris LL, Blankenship RL, Downey SM, Tector M, Tector AJ (2014) Efficient generation of genetically distinct pigs in a single pregnancy using multiplexed single-guide RNA and carbohydrate selection. *Xenotransplantation*. doi:10.1111/xen.12131
246. Whitworth KM, Lee K, Benne JA, Beaton BP, Spate LD, Murphy SL, Samuel MS, Mao J, O’Gorman C, Walters EM, Murphy CN, Driver J, Mileham A, McLaren D, Wells KD, Prather RS (2014) Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 91(3):78. doi:10.1095/biolreprod.114.121723
247. Ni W, Qiao J, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Polejaeva IA, Chen C (2014) Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE* 9(9):e106718. doi:10.1371/journal.pone.0106718
248. Hai T, Teng F, Guo R, Li W, Zhou Q (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 24(3):372–375. doi:10.1038/cr.2014.11
249. Ma Y, Ma J, Zhang X, Chen W, Yu L, Lu Y, Bai L, Shen B, Huang X, Zhang L (2014) Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 281(17):3779–3790. doi:10.1111/febs.12935
250. Sung YH, Baek JJ, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, Jeong D, Kim JS, Lee HW (2013) Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 31(1):23–24. doi:10.1038/nbt.2477
251. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31(9):827–832. doi:10.1038/nbt.2647
252. Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church GM (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31(9):833–838. doi:10.1038/nbt.2675
253. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31(9):822–826. doi:10.1038/nbt.2623
254. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(39):E2579–E2586. doi:10.1073/pnas.1208507109
255. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154(6):1380–1389. doi:10.1016/j.cell.2013.08.021
256. Hickman AB, Dyda F (2014) CRISPR-Cas immunity and mobile DNA: a new superfamily of DNA transposons encoding a Cas1 endonuclease. *Mob DNA* 5:23. doi:10.1186/1759-8753-5-23
257. Krupovic M, Makarova KS, Forterre P, Prangishvili D, Koonin EV (2014) Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Biol* 12:36. doi:10.1186/1741-7007-12-36
258. Katter K, Geurts AM, Hoffmann O, Mates L, Landa V, Hiripi L, Moreno C, Lazar J, Bashir S, Zidek V, Popova E, Jerchow B, Becker K, Devaraj A, Walter I, Grzybowksi M, Corbett M, Filho AR, Hodges MR, Bader M, Ivics Z, Jacob HJ, Pravenec M, Bosze Z, Rulicke T, Izsvak Z (2013) Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *Faseb J* 27(3):930–941. doi:10.1096/fj.12-205526
259. Staunstrup NH, Madsen J, Primo MN, Li J, Liu Y, Kragh PM, Li R, Schmidt M, Purup S, Dagnaes-Hansen F, Svensson L, Petersen TK, Callesen H, Bolund L, Mikkelsen JG (2012) Development of transgenic cloned pig models of skin inflammation by DNA transposon-directed ectopic expression of human beta1 and alpha2 integrin. *PLoS ONE* 7(5):e36658. doi:10.1371/journal.pone.0036658
260. Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, Christoffersen C, Mortensen MB, Tolbod LP, Thim T, Du Y, Li J, Liu Y, Moldt B, Schmidt M, Vajta G, Larsen T, Purup S, Bolund L, Nielsen LB, Callesen H, Falk E, Mikkelsen JG, Bentzon JF (2013) Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Sci Transl Med* 5(166):166. doi:10.1126/scitranslmed.3004853
261. Macdonald J, Taylor L, Sherman A, Kawakami K, Takahashi Y, Sang HM, McGrew MJ (2012) Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(23):E1466–E1472. doi:10.1073/pnas.1118715109
262. Park TS, Han JY (2012) piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(24):9337–9341. doi:10.1073/pnas.1203823109
263. Liu X, Li N, Hu X, Zhang R, Li Q, Cao D, Liu T, Zhang Y (2013) Efficient production of transgenic chickens based on piggyBac. *Transgenic Res* 22(2):417–423. doi:10.1007/s11248-012-9642-y
264. Tyack SG, Jenkins KA, O’Neil TE, Wise TG, Morris KR, Bruce MP, McLeod S, Wade AJ, McKay J, Moore RJ, Schat KA, Lowenthal JW, Doran TJ (2013) A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Res* 22(6):1257–1264. doi:10.1007/s11248-013-9727-2
265. Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, Ros F, Lifke V, Zeitler B, Rottmann O, Vincent A, Zhang L, Jenkins S, Niersbach H, Kind AJ, Gregory PD, Schnieke AE, Platzer J (2011) Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS ONE* 6(6):e21045. doi:10.1371/journal.pone.0021045

266. Li P, Estrada JL, Burlak C, Tector AJ (2013) Biallelic knockout of the alpha-1,3 galactosyltransferase gene in porcine liver-derived cells using zinc finger nucleases. *J Surg Res* 181(1):e39–e45. doi:10.1016/j.jss.2012.06.035
267. Lutz AJ, Li P, Estrada JL, Sidner RA, Chihara RK, Downey SM, Burlak C, Wang ZY, Reyes LM, Ivary B, Yin F, Blankenship RL, Paris LL, Tector AJ (2013) Double knockout pigs deficient in *N*-glycolylneuraminic acid and galactose alpha-1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation* 20(1):27–35. doi:10.1111/xen.12019
268. Kwon DN, Lee K, Kang MJ, Choi YJ, Park C, Whyte JJ, Brown AN, Kim JH, Samuel M, Mao J, Park KW, Murphy CN, Prather RS (2013) Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep* 3:1981. doi:10.1038/srep01981
269. Lillico SG, Proudfoot C, Carlson DF, Stverakova D, Neil C, Blain C, King TJ, Ritchie WA, Tan W, Mileham AJ, McLaren DG, Fahrenkrug SC, Whitelaw CB (2013) Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep* 3:2847. doi:10.1038/srep02847
270. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H (2013) Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLoS ONE* 8(10):e76478. doi:10.1371/journal.pone.0076478
271. Ji D, Zhao G, Songstad A, Cui X, Weinstein EJ (2014) Efficient creation of an APOE knockout rabbit. *Transgenic Res*. doi:10.1007/s11248-014-9834-8
272. Xin J, Yang H, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Li X, Song J, Yang Y, Zou Q, Yan Q, Zeng Y, Lai L (2013) Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS ONE* 8(12):e84250. doi:10.1371/journal.pone.0084250
273. Liu H, Chen Y, Niu Y, Zhang K, Kang Y, Ge W, Liu X, Zhao E, Wang C, Lin S, Jing B, Si C, Lin Q, Chen X, Lin H, Pu X, Wang Y, Qin B, Wang F, Wang H, Si W, Zhou J, Tan T, Li T, Ji S, Xue Z, Luo Y, Cheng L, Zhou Q, Li S, Sun YE, Ji W (2014) TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell* 14(3):323–328. doi:10.1016/j.stem.2014.01.018
274. Park TS, Lee HJ, Kim KH, Kim JS, Han JY (2014) Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(35):12716–12721. doi:10.1073/pnas.1410555111
275. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J (2014) Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 156(4):836–843. doi:10.1016/j.cell.2014.01.027
276. Honda A, Hirose M, Sankai T, Yasmin L, Yuzawa K, Honsho K, Izu H, Iguchi A, Ikawa M, Ogura A (2014) Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of the tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Exp Anim*. doi:10.1538/expanim.14-0034



## Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle



Ana P. Alessio<sup>a</sup>, Alejandro E. Fili<sup>a</sup>, Wiebke Garrels<sup>b,1</sup>, Diego O. Forcato<sup>a</sup>,  
 María F. Olmos Nicotra<sup>a</sup>, Ana C. Liaudat<sup>a</sup>, Romina J. Bevacqua<sup>c</sup>,  
 Virginia Savy<sup>c</sup>, María I. Hiriart<sup>c</sup>, Thirumala R. Talluri<sup>b,2</sup>, Jesse B. Owens<sup>d</sup>,  
 Zoltán Ivics<sup>e</sup>, Daniel F. Salamone<sup>c</sup>, Stefan Moisyadi<sup>d</sup>, Wilfried A. Kues<sup>b</sup>,  
 Pablo Bosch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, República Argentina

<sup>b</sup> Department of Biotechnology, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Nutztiergenetik, Neustadt, Germany

<sup>c</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, República Argentina

<sup>d</sup> Department of Anatomy, Biochemistry and Physiology, Institute for Biogenesis Research, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA

<sup>e</sup> Division of Medical Biotechnology, Paul-Ehrlich-Institute, Langen, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 October 2015

Received in revised form 10 December 2015

Accepted 18 December 2015

#### Keywords:

Cattle  
 PiggyBac  
 Sleeping beauty  
 Transgenesis  
 Transposon

### ABSTRACT

Transposon-mediated transgenesis is a well-established tool for genome modification in small animal models. However, translation of this active transgenic method to large animals warrants further investigations. Here, the piggyBac (PB) and sleeping beauty (SB) transposon systems were assessed for stable gene transfer into the cattle genome. Bovine fibroblasts were transfected either with a helper-independent PB system or a binary SB system. Both transposons were highly active in bovine cells increasing the efficiency of DNA integration up to 88 times over basal nonfacilitated integrations in a colony formation assay. SB transposase catalyzed multiplex transgene integrations in fibroblast cells transfected with the helper vector and two donor vectors carrying different transgenes (fluorophore and neomycin resistance). Stably transfected fibroblasts were used for SCNT and on *in vitro* embryo culture, morphologically normal blastocysts that expressed the fluorophore were obtained with both transposon systems. The data indicate that transposition is a feasible approach for genetic engineering in the cattle genome.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The advent of high throughput DNA sequencing methods and comprehensive annotated genome maps concomitantly with advanced active transgenic techniques

promise to revolutionize the field of animal biotechnology. In particular, areas like disease modeling, biopharming, and basic research will benefit enormously by introducing precise genetic engineering tools to manipulate livestock genomes. Initial transgenic methods relayed on passive (nonfacilitated) genomic integration of transgenes at sites of spontaneously arising double-strand breaks of chromosomes after direct injection of naked DNA into zygotes (pronuclear injection) or transfection of cultured cells followed by SCNT. Homologous recombination in somatic cells of livestock is an extremely rare event, and only a few

\* Corresponding author. Tel.: +54 0358 4676425x3; fax: +54 0358 4676232.

E-mail address: [pbosch@exa.umrc.edu.ar](mailto:pbosch@exa.umrc.edu.ar) (P. Bosch).

<sup>1</sup> Current address: Hannover Medical School, University of Hannover, Hannover, Germany.

<sup>2</sup> Current address: National Research Center on Equines, Bikaner, India.

genes were targeted in recent years [1–7]. These inefficient and unreproducible approaches were gradually superseded by a new generation of active methods in which genomic insertion of heterologous DNA molecules is catalyzed by exogenously provided enzymes (reviewed in [8,9]).

For gain-of-function approaches in farm animals, the engineered transposon systems Sleeping Beauty (SB) and piggyBac (PB) gained increasing interests in recent years [10,11]. Transposon-based transgenic methods, derived from naturally occurring DNA transposable elements, are nonviral gene delivery systems capable of efficient enzyme-mediated genomic insertion of DNA segments into the genome. During transposition, a single copy of the sequence of interest framed by inverted terminal repeats (ITRs) is integrated into the genome through a precise, transposase-catalyzed mechanism, providing long-term expression of the gene of interest in cells [12]. Bicomponent transposon-based transgenic systems comprise a donor vector containing the transgene flanked by transposase-specific ITRs and the transposase enzyme provided as protein, mRNA, or most commonly as a helper DNA vector. In addition, systems that combine both components in a single vector, known as helper-independent transposons, have been developed and validated in cells and animals [13–16]. Transposase catalyzes both the excision of the transgene from the donor vector and its integration into a genomic target site. Integration occurs at short consensus sequences, for example Tc1/mariner transposases, such as SB, recognize TA dinucleotides [17], and PB transposase recognizes TTAA tetranucleotides [18]. Through this mechanism one monomeric copy of a transposon is integrated in the genome, leaving the empty backbone of the donor plasmid, which is eventually degraded [12,19,20] or, rarely, randomly integrated [14,21]. Expression units introduced by transposition are less prone to epigenetic silencing and show long-term expression of the transgene [12], suggesting that transposons have a tendency to land in genomic regions that are transcriptionally permissive [22].

PiggyBac and SB transposons have been extensively studied for transgenesis in mice, rats, and rabbits [13,23–26]. Both *in vivo* (intracytoplasmic injection of zygotes) and *in vitro* (SCNT) approaches have been exploited to generate transposon-transgenic pig models [12,20,27–31]. Zygote microinjection with SB transposon components has resulted in single-copy integration units into the pig preimplantation embryo genome [20], into born F0 animals and successful transmission to F1 generation [12]. Garrels et al. [12] demonstrated segregation of individual transposons in the F1 offspring, copy number-dependent expression of reporter protein over a prolonged time with no evidence of gene silencing. Similarly, transgenic pigs generated by microinjection of a helper-independent, self-inactivating PB transposon had monogenic and often single transgene genomic integration and the absence of concatemers or variegated transgene expression [28].

Alternatively, genetic modification of somatic cells by PB or SB transposition followed by SCNT is an avenue to generate transgenic livestock. Here, we assessed the suitability of the PB and SB transposon systems for the genetic modification of bovine fibroblasts, which were subsequently used in SCNT.

To this end, cultured fibroblast cells were transfected or electroporated with both transposon systems, respectively, and on selection or enrichment of transgenic cells, they were used as nuclear donor in SCNT. The use of transposons is associated with an enhanced proportion of stably transfected cells, as it has been documented for established immortalized and primary porcine cells [32] transfected with SB, PB, Tol2, or passport transposon systems [20,32] as well as for primary bovine fibroblasts transfected with PB [33]. These promising results warrant more research that extends and adapts transposon-based methods to functional transgene products and to economically important livestock species such as cattle.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

The experimental design is summarized in the Figure 1. Fibroblast cultures were established from fetuses collected at a local abattoir. Fibroblasts were transfected with either SB transposon components or PB helper-independent plasmids followed by a 3-week antibiotic selection period.

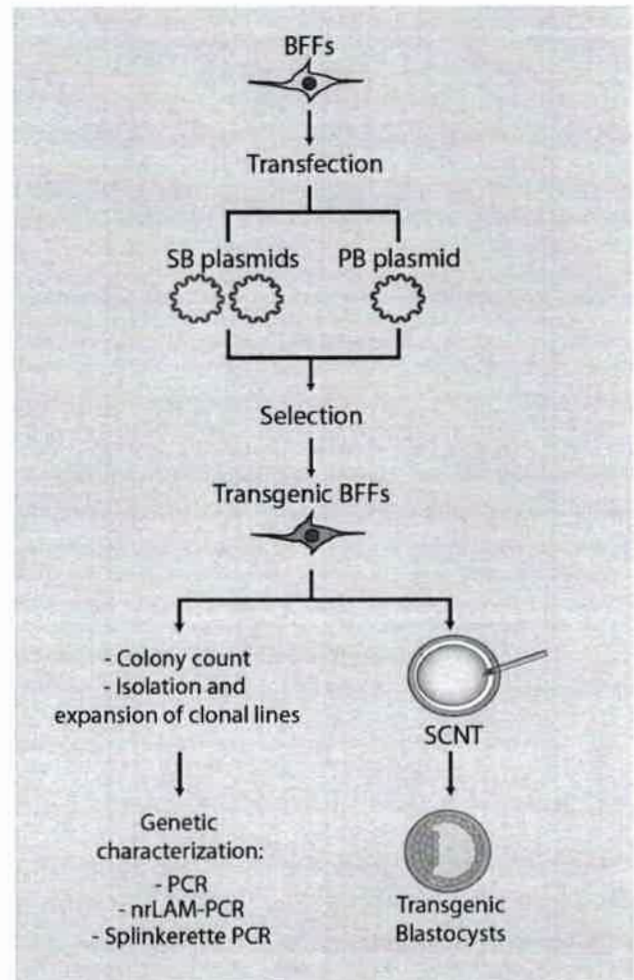


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

The number of resistant colonies was counted and representative colonies were picked and expanded to obtain genomic DNA (gDNA) for molecular analysis of transposon genomic integration (polymerase chain reaction [PCR], nrLAM-PCR, and Splinkerette PCR). Transgenic polyclonal cell cultures generated from PB or SB were used as nuclear donors in SCNT experiments to assess their ability to support early embryo development.

## 2.2. Vectors

### 2.2.1. PiggyBac plasmids

The experiments were carried out using *pmGENIE-3*-based plasmids. *pmGENIE-3* combines in a single plasmid the transposon and the transposase coding sequence (helper-independent system). Another feature of this plasmid is that a portion of the transposase coding sequence is deleted on transposition (self-inactivation) [14].

*pmGENIE-3*: this plasmid carries enhanced green fluorescent protein (EGFP) coding sequence which is under control of CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin promoter. In addition, the plasmid harbors the hygromycin B resistance gene.

*pmhyGENIE-3*: differs from *pmGENIE-3* in that it contains a sequence that codes a hyperactive version of the PB transposase.

*pmGENIE-2/ $\Delta$ PB*: it is a control plasmid that codes for a nonfunctional truncated transposase. We will refer to this plasmid as *pmGENIE-control*.

*pmhyGENIE-3*, *pmGENIE-3*, and *pmGENIE-control* were previously described [14].

### 2.2.2. Sleeping Beauty plasmids

*pCMV(CAT)T7-SB100X*: this plasmid contains an eukaryotic expression cassette for SB transposase under the control of CMV promoter. The SB transposase expressed by this construct is an optimized version (SB100X) with enhanced transposition activity [10].

*pT2RMCEVenus*: this plasmid contains a eukaryotic expression cassette for Venus fluorescent protein under the control of CAGGS promoter [34]. The expression cassette is flanked by 5' and 3' ITRs of SB transposon.

*pT2/SV40-Neo*: this plasmid contains an expression cassette for neomycin phosphotransferase, which confers resistance to the antibiotic geneticin (G418), flanked by SB ITRs. SV40 promoter drives expression of the antibiotic resistance gene [35].

*pBSII-I-SceI-skA*: this plasmid is used as control in experiments with SB system (kindly provided by Dr. Jochen Wittbrodt, Developmental Biology Programme, EMBL-Heidelberg, Heidelberg, Germany).

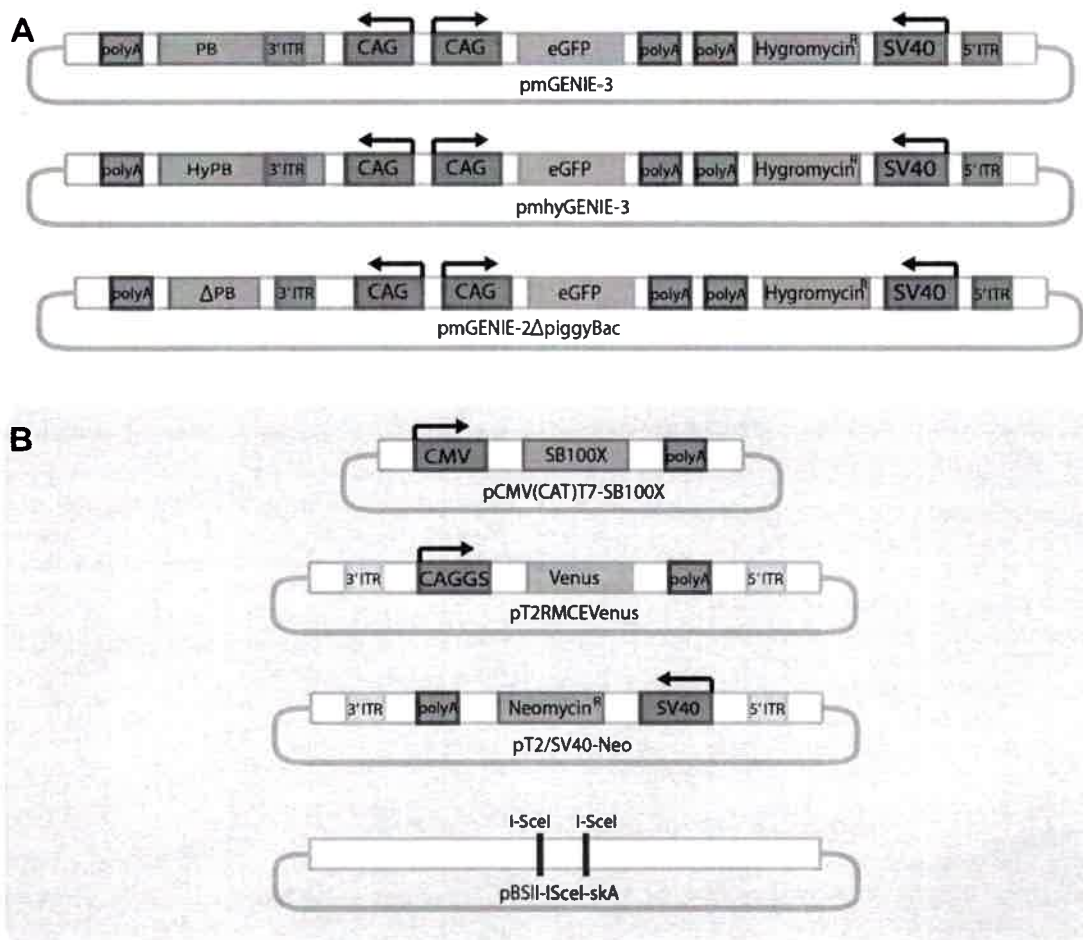


Fig. 2. Diagrams of piggyBac (A) and Sleeping Beauty (B) plasmid constructs used in the experiments showing the major components of each vector.

Schematic representations of all plasmids are depicted in Figure 2.

### 2.3. Culture of primary cells

Primary bovine fetal fibroblasts (BFFs) were obtained from slaughterhouse fetuses of 90 to 150 days of gestation. Fetuses were transported to the laboratory where they were processed in a laminar-flow cabinet. A piece of subdermal tissue (about 1 cm<sup>2</sup>) was removed from the flank of the fetus and sectioned with a scalpel blade into smaller pieces. Explants were placed in cell culture plates (three–four explants per 100 mm plate) in 6 mL of cell culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM], 1x antibiotic/antimycotic, Gibco, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Natocor, Cordoba, Rep. Argentina) and cultured for approximately 10 days in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air and high humidity at 38.5 °C. When the cells reached 70% to 80% confluence, they were trypsinized (trypsin 0.5%, Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and passaged to a T75 culture flask for cell propagation. Fibroblasts were frozen in DMEM containing 20% FBS and 10% DMSO (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) and kept in liquid nitrogen until use.

### 2.4. Cell transfection with transposon vectors

Bovine fetal fibroblasts were seeded at  $0.5 \times 10^5$  cells per well of a 24-well plate. When the cells reached 80% confluence (12–24 hours), cultures were transfected with a polyethylenimine-based transfection reagent (JetPRIME; Polyplus-transfection SA, Illkirch, France) and 1 µg of plasmid DNA according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours posttransfection, expression of reporter fluorescent protein was assessed in a microscope equipped with epifluorescence (excitation filter 450–490 nm and an emission filter 530 nm). Images of transfected cells were captured with a Nikon DS-Qi1Mc camera using the same acquisition settings for all pictures taken. Subsequently, cells from each well were trypsinized and transferred into a 100-mm culture plate with 8 mL DMEM supplemented with 10% FBS and selected for 14 days with the appropriate antibiotic, depending on the particular plasmid used (*pmGENIE-3*: hygromycin B; SB system: G418).

For PB system, fibroblasts were transfected with *pmGENIE-3*-based plasmids (*pmhyGENIE-3*, *pmGENIE-3*, or *pmGENIE-Control*) followed by 14-day selection with 50 µg/mL hygromycin B (Invitrogen; Van Allen Way Carlsbad, California, USA). The media were replaced every other day.

In the first SB transfection experiment, fibroblast cultures were cotransfected with pT2RMCEVenus (donor plasmid) and pCMV(CAT)T7-SB100X (helper plasmid). In the second experiment, fibroblasts were cotransfected with pT2RMCEVenus, pT2/SV40-Neo, and pCMV(CAT)T7-SB100X. In both experiments, we included a treatment in which the pCMV(CAT)T7-SB100X was replaced by the same amount of pBSII-I-SceI-skA which lacks a SB transposase as a negative control, thus background, (nonfacilitated) transgene integration could be estimated. No antibiotic selection was applied for cells transfected with pT2RMCEVenus because this vector is devoid of antibiotic selection cassette,

and the number of fluorescent colonies was determined 12 to 14 days after transfection. In experiments of cotransfection in which pT2/SV40-Neo was included, G418 selection (250 µg/mL, Invitrogen; Van Allen Way Carlsbad, California, USA) was implemented for two weeks with media replacement every other day.

### 2.5. Colony formation assay and derivation of monoclonal transgenic cell lines

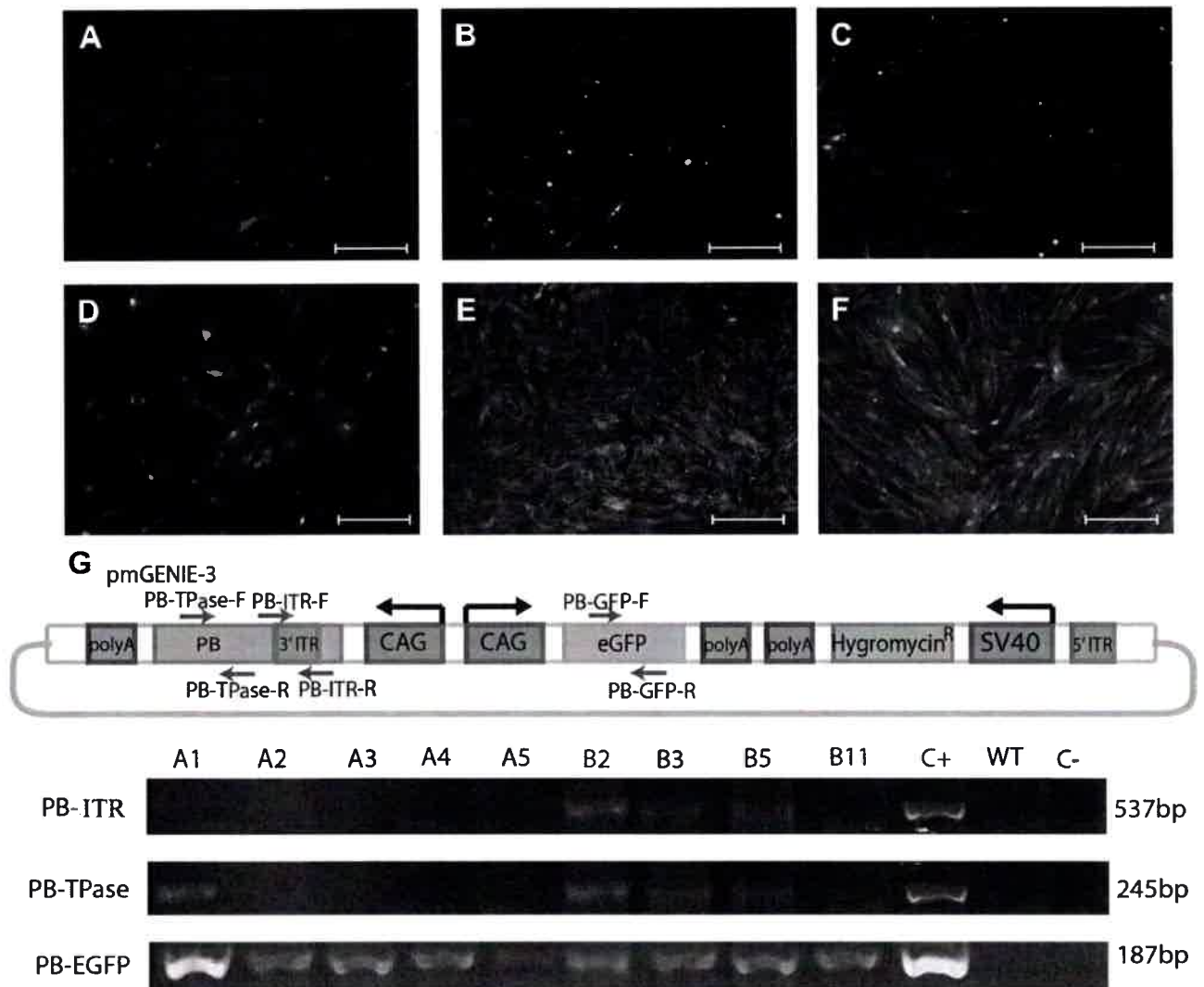
Transfected cells were kept under antibiotic selection for two weeks and the numbers of fluorescent colonies were counted in an inverted microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) with epifluorescence equipment. To assess the transposition activity of the different plasmids, we calculated the relative fold change, which was obtained by dividing the number of antibiotic resistant colonies counted in cultures transfected with *pmhyGENIE-3* or *pmGENIE-3* plasmids by the number of colonies in those transfected with *pmGENIE-control* plasmid.

In the SB experiment in which fibroblasts were cotransfected with two plasmids (pT2RMCEVenus and pCMV(CAT)T7-SB100X), the number of Venus positive colonies formed after two-week culture was compared with those in the control treatment. When cell cultures were cotransfected with three plasmids (pT2RMCEVenus, pT2/SV40-Neo, and pCMV(CAT)T7-SB100X), the number of colonies originated under antibiotic selection (G418) was determined after 14 days.

For clonal expansion, individual cell colonies were recovered from 100 mm plates using cloning rings, small plastic cylinders of 7 mm of diameter that were placed over each individual colony and fixed and sealed with agarose [36]. Cells inside the cloning ring were trypsinized and cultivated in 24-well plates up to 80% to 90% confluence. Cell lines were sequentially passaged into larger sized culture plates as the number of cells increased. Once they reached 80% to 90% of confluence in a T75 culture flask each cell line was processed to obtain gDNA for molecular characterization of transgene integration.

### 2.6. Molecular characterization of transgene genomic integrations

Polymerase chain reaction: genomic DNA was isolated from transgenic cell lines using Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research Corporation, Irvine, USA) according to the manufacturer's protocol. We designed a PCR strategy (four reactions) to characterize PB transgene genomic integrations (nonfacilitated or transposase catalyzed). Polymerase chain reaction1: amplification of a 187-bp fragment of the EGFP gene with primers pair PB-GFP-F/PB-GFP-R. The presence of a correct size PCR product confirmed the presence of the transgene (Fig. 3G). Polymerase chain reaction2: amplified a 537-bp fragment extending from the 3'-ITR into the backbone of the plasmid using primers pair PB-ITR-F/PB-ITR-R. Amplification of the correct size product would indicate non-transpositional transgene integration (Fig. 3G). Polymerase chain reaction3: this reaction was included to determine if nontranspositional integration of the recircularized



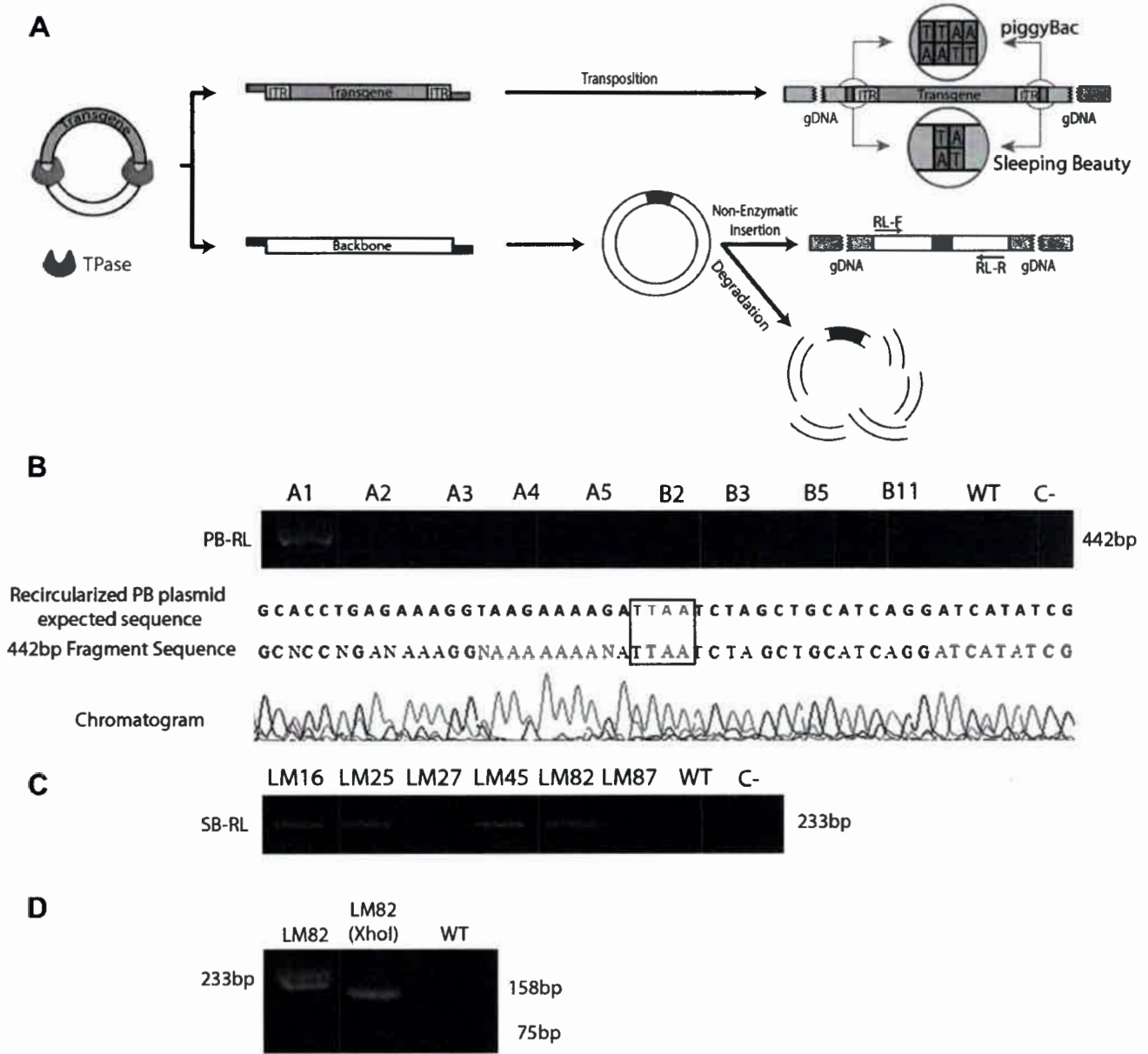
**Fig. 3.** Microphotographs of fibroblast cells two days (A, B, and C) and 16 days (D, E, and F) after transfection with *pmGENIE-2/ΔpiggyBac* (PB; A and D), *pmGENIE-3* (B and E), or *pmhyGENIE-3* (C and F; bars = 100 μm). After 14 days of antibiotic selection, discrete colonies of different sizes were evident (D, E, and F). (G) Schematic representation of *pmGENIE-3* plasmid showing position of three pairs of primers (PB-TPase-F/PB-TPase-R, PB-ITR-F/PB-ITR-R, and PB-GFP-F/PB-GFP-R) used for PCR analysis of genomic DNA (gDNA) from *pmGENIE-3* (A1–A5) and *pmhyGENIE-3* (B2, B3, B5, and B11) transgenic cell lines. A 187-bp fragment of EGFP gene (GFP) was amplified from gDNA from all transgenic cell lines and positive control, but it was not amplified from wild type gDNA and negative control (C–). A PCR product corresponding to a 537-bp fragment extending from the 3′-ITR into the backbone of the plasmid was present in B2, B3, and B5 and absent in A1, A2, A3, A4, A5, B11, and wild type samples. A 245-bp product generated from PB transposase sequence was present in cell lines A1, B2, B3, and B5.

backbone of the plasmid after transposition had occurred, as it was reported in mice [14]. Polymerase chain reaction was performed using PB-RL-F/PB-RL-R primer pair to amplify a 442-bp backbone fragment (Fig. 4A). Identity of PCR products was confirmed by sequencing. Polymerase chain reaction4: To determinate integration of PB transposase sequences into the bovine genome primer pair PB-TPase-F/PB-TPase-R was used (Fig. 3G). A PCR amplicon of 245 bp was expected in cell lines that contained at least one integrated copy of the PB transposase coding sequence.

Multiplex PCRs were run using the following parameters: initial denaturalization at 94 °C for 9 minutes followed by 30 cycles of 20 seconds denaturalization at 94 °C, 30 seconds annealing at 60 °C, and 30 seconds elongation at 72 °C, with a final elongation of 5 minutes.

Genomic DNA isolated from six SB monoclonal transgenic cell lines was used as template in a series of four reactions of PCRs to characterize SB transgene integrations. Polymerase chain reaction1: amplification of a 280-bp fragment from the Venus gene with primers pair SB-Venus-F/SB-Venus-R (Fig. 5E). The presence of a correct size PCR product confirmed the presence of the transgene. Polymerase chain reaction2: amplification of a 408-bp fragment extending from the 3′-ITR into the backbone of the plasmid using primers pair SB-ITR-F/SB-ITR-R (Fig. 5E). Amplification of the correct size product indicated nontranspositional transgene integration. Polymerase chain reaction3: amplification of a 493-bp fragment of the plasmid backbone with primer pair SB-BB-F/SB-BB-R (Fig. 5E). The presence of correct sized product indicated genomic integration of backbone





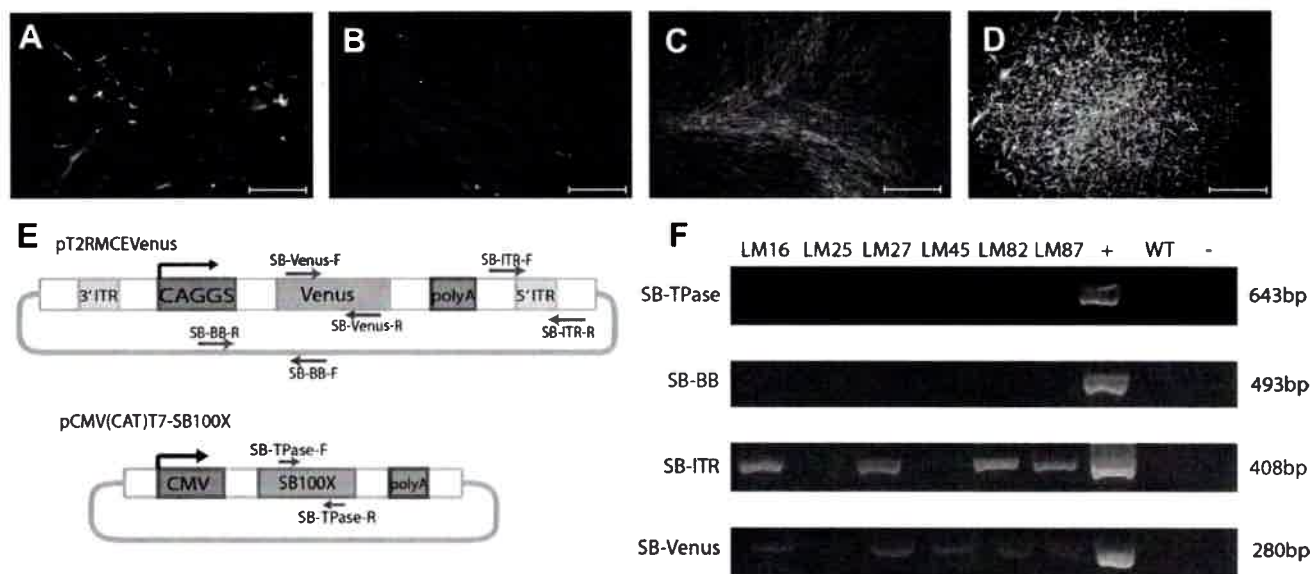
**Fig. 4.** (A) Schematic drawing that shows the possible fates of the transgene and the recircularized backbone after transposition for SB and PB transgenic systems. Position of primers RL-F and RL-R is depicted in the figure. (B) Agarose gel showing a product of 442 bp amplified from the PB religated vector backbone inserted into the genome of BFF line A1. PCRs with gDNA from the remaining cell lines generated no amplification product. A negative control (C-) was included. Alignment between the expected religated backbone sequence and the actual sequence obtained by Sanger sequencing of the purified PCR product is shown in B. Boxed is the reconstituted TTAA tetranucleotide generated after transposition. (C) Agarose gel showing a PCR product of 233 bp amplified from the SB religated vector backbone inserted into the genome of four BFF lines (LM16, LM25, LM45, and LM82). Digestion of PCR product from LM82 with XhoI rendered the expected two products of 75 and 158 bp. (D) Lane one nondigested PCR product, lane two digested PCR product, and lane three wild type control. BFF, bovine fetal fibroblast; gDNA, genomic DNA; PB, piggyBac; PCR, polymerase chain reaction; SB, Sleeping Beauty.

sequences by nontranspositional mechanisms. Polymerase chain reaction<sup>4</sup>: this reaction was conducted with primer pair SB-RL-F/SB-RL-R (Fig. 4A). The presence of a 233-bp amplicon indicated genomic integration of religated backbone after transposition had occurred. Polymerase chain reaction product was identified by restriction enzyme digestion (XhoI). On digestion, the expected product would render two fragments of 75 bp and 158 bp. Polymerase chain reaction<sup>5</sup>: this reaction was run with primer pair SB-TPase-F/SB-TPase-R

(Fig. 5E). The presence of a 643-bp fragment indicated genomic nonfacilitated insertion of the helper SBX100 plasmid.

All PCRs were run with the following parameters: initial denaturalization at 95 °C for 5 minutes followed by 35 cycles of 15 seconds denaturalization at 95 °C, 15 seconds annealing at 63 °C, and 45 seconds elongation at 72 °C, with a final elongation of 10 minutes.

All primer sequences are shown in Supplementary Table 1.



**Fig. 5.** Microphotographs of transient and stable expression of the Venus reporter, two days after transfection (A), 4 days (B), 11 days (C), and 15 days (D) after G418 antibiotic selection of BFF transfected with the SB plasmids. Note colony formation in C and D panels (bar = 100  $\mu$ m). (E) Schematic of pT2RMCEVenus and pCMV(CAT)T7-SB100X plasmids showing the hybridization sites of SB-Venus, SB-ITR, SB-BB, and SB-TPase pairs of primers used in PCRs. (F) Polymerase chain reaction analysis of gDNA from six SB monoclonal cell lines. Genomic DNA from all transgenic cell lines generated an expected PCR product of 280 bp corresponding to the Venus gene. A PCR product corresponding to a 408-bp fragment extending from the 3'-ITR into the backbone of the plasmid was present in LM16, LM27, LM82, and LM87 and absent in LM25 and LM45. None of the cell lines gDNAs generated a PCR product with primers SB-BB (amplification of part of plasmid backbone) or SB-TPase (amplification from pCMV(CAT)T7-SB100X). Positive control (C+) and negative controls (C-) were included. BFF, bovine fetal fibroblast; gDNA, genomic DNA; ITR, inverted terminal repeat; PCR, polymerase chain reaction; SB, Sleeping Beauty.

## 2.7. Real-time quantitative polymerase chain reaction

The number of EGFP copies per clonal cell line ( $n = 9$ ) was determined by real-time PCR as described previously by Lee et al. [37]. Briefly, 20 ng of gDNA was used as template in real-time quantitative PCR (qPCR) using KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystem Inc., Boston, MA, USA) and Applied Biosystems 7500 instrument (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Primer set used to amplify EGFP transgene was PB-GFP-F-PB-GFP-R (Supplementary Table 1). Quantitative PCR was run using the following parameters: initial denaturalization at 94  $^{\circ}$ C for 10 minutes followed by 40 cycles of 10 seconds denaturalization at 95  $^{\circ}$ C, 10 seconds annealing at 61  $^{\circ}$ C, and 10 seconds elongation at 72  $^{\circ}$ C. The fluorescent signal was measured at the end of each elongation step at 72  $^{\circ}$ C. After amplification, a melting curve was performed by increasing the temperature from 70  $^{\circ}$ C to 95  $^{\circ}$ C at a rate of 0.1  $^{\circ}$ C/s to confirm the identity of PCR product. The number of copies was calculated from a standard curve which was generated using 10-fold serial dilution pmGENIE-3 ( $5.93 \times 10^2$ – $5.93 \times 10^6$  copies/ $\mu$ L).

## 2.8. Measurement of cell line fluorescence intensity

To establish a putative association between transgene copy number and fluorescence intensity of transgenic cell lines ( $n = 9$ ), we measured fluorescence in individual cells using ImageJ software (V1.49, NHI) and corrected total cell fluorescence (CTCF) using the following equation:  $CTCF = \text{integrated density} - (\text{area of selected cell} \times \text{mean fluorescence of background readings})$  as previously described [38]. Linear regression analysis was performed using CTCF

as an independent variable and transgene copy number as a dependent variable.

## 2.9. Nonrestrictive linear amplification-mediated polymerase chain reaction

Identification of transpositionally generated sites of insertion was achieved by nonrestrictive linear amplification-mediated PCR (nrLAM-PCR) according to published protocols [39,40]. Genomic DNA from pmGENIE-3 transgenic cell lines was used as a template for linear amplification, and nested PCR was implemented to amplify the sequence flanking the PB insertions. Polymerase chain reaction products were cloned into a vector and sequenced. DNA sequences directly flanking the transposon were mapped to the bovine genome by doing a BLAST search at the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 2.10. Splinkerette PCR

Sleeping Beauty insertions in six Venus+/Neo monoclonal cell lines were characterized by a splinkerette PCR method as previously described [41]. Transgene flanking sequences were used to map insertion sites to the publicly available bovine genome (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 2.11. Somatic cell nuclear transfer

Oocyte collection and *in vitro* maturation: bovine ovaries were collected from abattoirs and transported to the laboratory at 25  $^{\circ}$ C to 30  $^{\circ}$ C. Cumulus-oocyte complexes were aspirated with 21-gauge needles from follicles with a

diameter of 2 to 5 mm into HEPES-buffered Tyrode's albumin lactate pyruvate (HEPES-TALP). Oocytes covered with at least three layers of granulosa cells were selected for IVM. The maturation medium was bicarbonate-buffered tissue culture medium 199 (TCM-199) (31100-035; Gibco, Grand Island, NY, USA), containing 10% FBS (013/07; Inter-negocios, Buenos Aires, Argentina), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH (NIH-FSH-P1, Folltropin; Bioniche, Caufield North, Victoria, Australia), 0.3-mM sodium pyruvate (Sigma, P2256), 100  $\mu\text{M}$  cysteamine (Sigma, M9768), and 2% antibiotic-antimycotic (15240-096; Gibco). The oocytes were incubated for 21 hours in 100  $\mu\text{L}$  droplets under mineral oil (Sigma, M8410), in 6.5%  $\text{CO}_2$  in humidified air at 39 °C.

Enucleation procedure: after 21 hours of IVM, metaphase II oocytes were subjected to hyaluronidase treatment followed by incubation in 1.5 mg/mL pronase to remove the zona pellucida (ZP). Zona-free oocytes were stained with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Hoechst 33342 for 10 minutes and afterward transferred into 50  $\mu\text{L}$  microdroplets of HEPES-TALP supplemented with 0.3 g/mL BSA, under mineral oil, in 100  $\times$  20 mm tissue culture dishes (430167; Corning, Horseheads, NY, USA). The stained oocytes were mechanically enucleated using a Narishige hydraulic micromanipulator (Narishige Sci., Tokyo, Japan) mounted on a Nikon Eclipse E-300 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Enucleation was performed using a blunt 20  $\mu\text{m}$  internal diameter pipette. Zona-free oocytes were supported for enucleation with a closed holding pipette (100–150  $\mu\text{m}$  outer diameter, perpendicular break, closed fire-polished tip). Metaphase chromosomes were visualized under ultraviolet light (<10 seconds) and aspirated into the blunt pipette with a minimal volume of oocyte cytoplasm. Chromosome removal was confirmed by the presence of stained metaphase II chromosomes inside the pipette.

Donor cell preparation and fusion to enucleated oocytes: cells transfected with *pmhy*GENIE-3 or SB plasmids, selected during 20 days, were used as donors for cloning. Briefly, the ZP-free enucleated oocytes were individually transferred to a drop of 1 mg/mL phytohemagglutinin (Sigma, L8754) dissolved in TCM-199 without serum, where they remained for a few seconds. After this, they were quickly dropped over a single cell resting on the bottom of a 100  $\mu\text{L}$  TALP-H drop. After attachment, the ZP-free enucleated oocyte and/or cell pair was picked up, transferred to fusion medium (0.3-M mannitol, 0.1-mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.05-mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mg/mL polyvinyl alcohol), for 2 to 3 minutes and then to a fusion chamber (BTX Instrument Division; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) containing 2 mL of the same warm medium. Fusion was performed with a double direct current pulse of 75 V, each pulse for 30 ms, 0.1 second apart. The reconstructed zygotes were then carefully transferred to synthetic oviductal fluid culture droplets for 2 hours to allow for nuclear reprogramming.

Chemical oocyte activation: embryos produced by SCNT were activated with 5- $\mu\text{M}$  ionomycin (I24222, Invitrogen; Van Allen Way Carlsbad, California, USA) in HEPES-TALP for 4 minutes and subsequently transferred individually to 1.9-mM 4-(Dimethylamino)pyridine (Sigma, D2629) in SOF droplets for 3 hours. Embryos were then washed three times in HEPES-TALP to remove the inhibitor and cultured as described below.

*In vitro* embryo culture: reconstructed SCNT embryos were cultured in SOF medium in a system similar to the well of the well (WOW) [42], whereby microwells were produced using a heated glass capillary slightly pressed to the bottom of a culture dish and then covered with a 100  $\mu\text{L}$  microdrop of SOF medium (20–30 WOW in each microdrop, one embryo per WOW). During nuclear transfer embryo culture, the medium was 50% replaced on Day 2 and supplemented with 7.5% FBS on Day 5. Cleavage was evaluated on Day 2, morula formation at Day 5, and blastocyst formation on Day 7 after fusion.

Evaluation of fluorophore expression in embryos: cloned embryos were briefly exposed to blue light using specific excitation (460–498 nm) and an emission filter (510–540 nm) to determine EGFP or Venus expression on Days 5 and 7 after chemical activation. Images were captured with a Nikon DS-Qi1Mc camera using the same acquisition settings for all pictures taken.

## 2.12. Embryo vitrification, thawing, and cell counting

Transgene expressing cloned blastocysts were vitrified as previously reported [43,44]. Briefly, embryos were immersed sequentially in a series of glycerol and ethylene glycol solutions at room temperature (25 °C) as follows: 10% glycerol for 5 minutes followed by 10% glycerol + 20% ethylene glycol for 5 minutes and finally 25% ethylene glycol + 25% glycerol for 30 seconds. The embryos were aspirated into 1- $\mu\text{L}$  tips and cryotubes immersed in liquid nitrogen. For devitrification, immediately after recovery of embryos from liquid nitrogen, they were placed for 5 minutes in a solution of 12.5% ethylene glycol + 12.5% glycerol + 0.5-M sucrose in PBS with 20% FBS. Afterward, they were placed in 0.5-M sucrose solution and 0.25-M sucrose solution (5 minutes in each solution). Finally, the embryos were washed two times in PBS supplemented with 1% serum. After thawing, embryos were placed back in synthetic oviductal fluid (SOF) medium with amino acids, and cell numbers of blastocysts that reexpanded were determined by staining with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Hoechst 33342 (B-2261; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) for 10 minutes. Nuclei were visualized and counted using ultraviolet light in a microscope equipped with epifluorescence.

## 2.13. Statistical analysis

The number of colonies of each group was analyzed by ANOVA followed by Tukey's test to compare the means of different treatments. Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean and different letters in graph bars indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). All statistical analyses were performed with Statgraphics software (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, Virginia).

## 3. Results

### 3.1. Assessment of PB transposon activity in bovine fetal fibroblasts

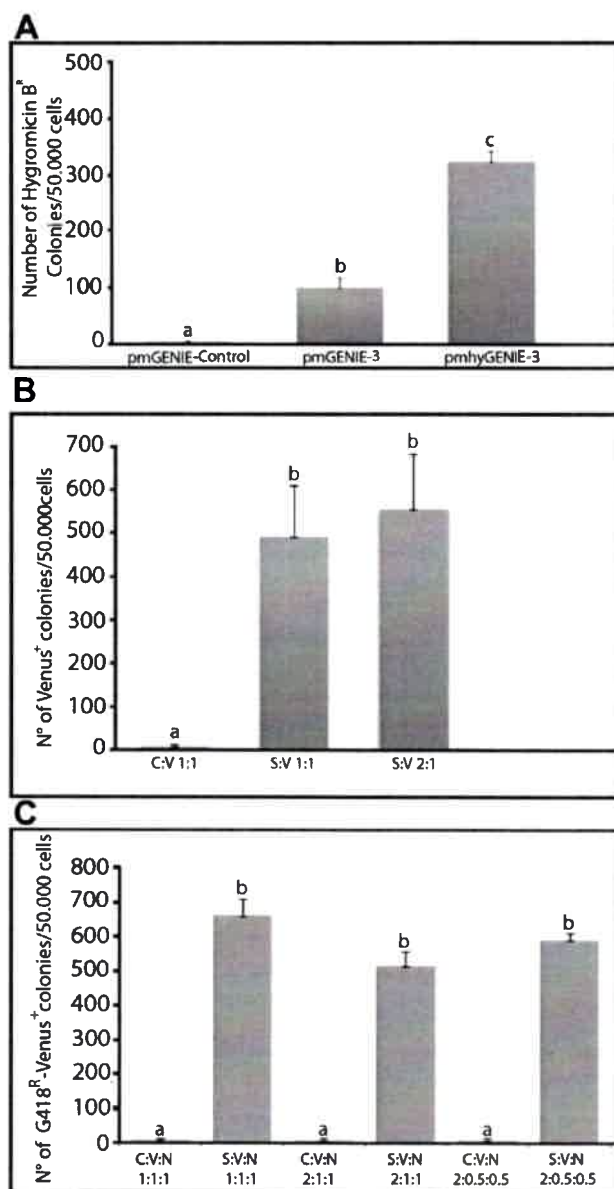
The experimental design is summarized in Figure 1, and the used plasmids are depicted in Figure 2. To assess the

activity of PB transposase to mediated gene transfer into the bovine genome, BFFs were transfected with 1  $\mu$ g of *pmGENIE-3* or *pmhyGENIE-3* (self-inactivating hyperactive PB transposase-based plasmid). As control for random non-transpositional integration, BFFs were transfected in parallel with the control *pmGENIE-2/ $\Delta$ PB* plasmid (Fig. 3A–F). The mean number of hygromycin B-resistant colonies was markedly different among treatments (ANOVA,  $P < 0.0001$ ; Fig. 6A). In cell cultures transfected with PB constructs containing a functional sequence of PB transposase (i.e., *pmGENIE-3* and *pmhyGENIE-3*) the number of resistant clones was higher compared with that in cultures transfected with the control plasmid in which only a few colonies developed (range 0–4 resistant colonies). More active at delivering DNA into the genome was the hyperactive version of the PB transposase, as *pmhyGENIE-3*–transfected group developed 3.24 times more colonies compared with that in the *pmGENIE-3* group and 85-fold above of those in the *pmGENIE-Control* group (Fig. 6A).

### 3.2. Molecular characterization of transgene integration sites

Molecular analyses by PCR were performed on gDNA isolated from a total of nine transgenic monoclonal cell lines. *pmGENIE-3* and *pmhyGENIE-3* plasmid DNA were used as positive controls. As expected, we obtained EGFP amplicons from all gDNA samples from *pmGENIE-3* transgenic group, demonstrating that analyzed cell lines carried the EGFP transgene (Fig. 3G), conversely the same PCR product was absent when gDNA from wild type cells was used as a template. Furthermore, no amplification product was obtained from gDNA isolated from six individual cell clones subjected to PCR to amplify a region extending from the 3'-ITR into the backbone of the plasmid (Fig. 3G). These data support a transposase-mediated transgene integration mechanism and the absence of random, noncatalyzed whole plasmid integration events in six of nine analyzed cell lines. In the remaining three transgenic cell lines (B2, B3 and B5; Fig. 3G), PCR products of the correct size were obtained in PCR2 and PCR3 what indicates random, non-facilitated genomic integration of full-length plasmids. Results from PCR4 revealed that one of nine *pmGENIE* transgenic cell lines (A1) analyzed carried at least a religated plasmid backbone incorporated randomly into the genome (Fig. 4B) but no evidence of full-length plasmid insertion (Fig. 3G). Religated plasmid backbone integration was confirmed by sequencing the 442-bp PCR product (Fig. 4B).

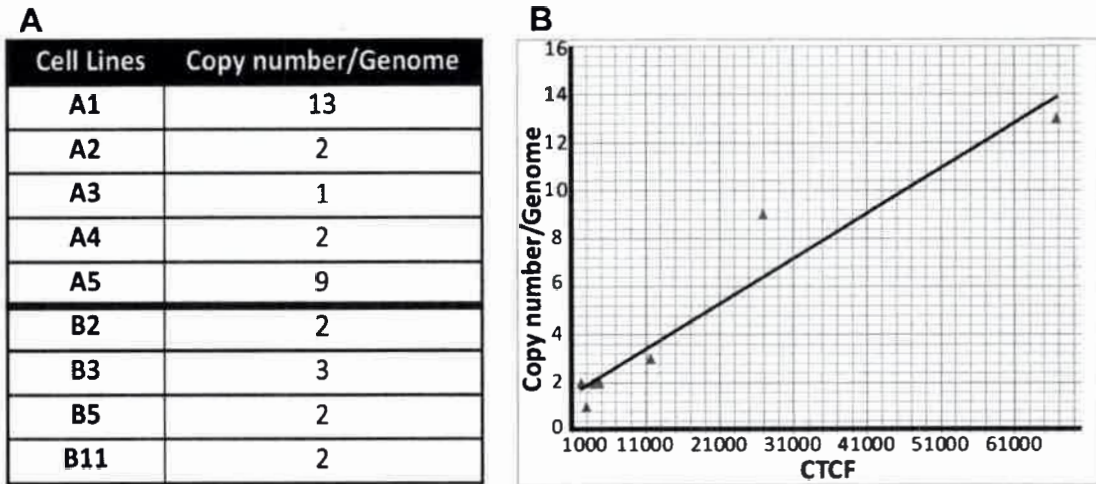
To identify the exact integration sites of the PB transposons in the bovine genome, we performed a nonrestrictive linear amplification-mediated PCR as described previously [39,40]. Cloning and sequencing of 17 integration sites from five monoclonal transgenic cell lines transfected with *pmGENIE-3* confirmed specific transposase-mediated integration events at the PB TTAA tetranucleotide consensus sites. Fourteen of the 17 analyzed integration sites could be assigned to specific positions in the bovine genome. Eleven of these were located in intergenic regions and three in intronic regions of genes (Supplementary Table 2).



**Fig. 6.** Results of the colony formation assay obtained from cells transfected with PB (A) or SB transposon systems (B and C). Transposition activity was measured by counting EGFP-positive and hygromycin-resistant colonies after two-week selection period. (A) The colony counts assay was performed in triplicated and the data were expressed as mean of no. of hygromycin B resistant colonies  $\pm$  standard error of the mean ( $n = 4-7$ ). (B) Transposition activity in cultures transfected with different ratios of helper to donor plasmids was measured by counting Venus-positive colonies after a two-week culture period. (C) Number of Venus-positive and G418-resistant colonies in BFF cultures transfected with different ratios of helper-to-donor plasmids (pT2RMCEVenus and pT2/SV40-Neo) after two-week antibiotic selection. Different letters indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). C, pBSII-ISceI-skA (control plasmid); S, pCMV(CAT)T7-SB100X; V, pT2RMCEVenus; N, pT2/SV40-Neo. BFF, bovine fetal fibroblast; PB, piggyBac; SB, Sleeping Beauty.

### 3.3. Transgene copy number and cell line fluorescence intensity

The number of transgene copies per genome in *pmGENIE-3* and *pmhyGENIE-3* transgenic cell clones ranged from



**Fig. 7.** Number of copies of transgene as determined by RT-qPCR (A) and relationship between fluorescence intensity (CTCF) and transgene copy number (B). Linear regression demonstrated an association between the two variables ( $R^2 = 0.93$ ;  $P < 0.05$ ). Cell lines A1 to A5 correspond to cell lines transfected with *pmGENIE-3*, whereas cell lines B2, B3, B5, and B11 were transfected with *pmhyGENIE-3*.

one to 13 copies. However, most cell lines carried one to three copies per genome (Fig. 7A).

Phenotypic analysis of each PB transgenic cell line revealed different fluorescence intensity among cell lines with larger CTCF values in those cell lines with a higher number of transgene copies per genome. Linear regression analysis demonstrated that fluorescence intensity is associated with transgene copy numbers ( $R^2 = 0.93$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 7B).

#### 3.4. Sleeping Beauty activity in bovine fetal fibroblasts

Two separate experiments were conducted to study SB transposase activity in cultured BFF cells. In the first experiment, BFFs were cotransfected by a chemical method (Polyethylenimine-based transfection reagent) with different ratios of donor (the plasmid carrying the gene for Venus protein) and helper (SB100X) plasmids of the SB system. The presence of the transposase expression vector SBX100 in the transfection mixture boosted the number of colonies compared with those in the control treatment without transposase. We studied the effect of different weight ratios of helper to donor plasmid in the transfection reaction on the number of fluorescent colonies. When vectors were used at ratios of 1:1 and 2:1 (helper:donor), it caused a 78-fold and 88-fold increase in the number of colonies compared with that in the no transposase control and 1:2 ratio treatment respectively ( $P < 0.05$ ; Fig. 6B).

Because the Venus vector lacks an antibiotic selection cassette, we designed an experiment to study SB transposition activity when two donor vectors are present. In this experiment, we cotransfected BFFs with the helper vector plus two donor plasmids; one was carrying the gene for Venus protein and the other an antibiotic resistance gene (*neo*). After transfection, BFFs were cultured for 14 days in media containing G418 for resistant colony formation (Fig. 5A–D). Regardless of the ratio used to transfect the BFF cultures, every time a functional SB transposase vector was included, the number of fluorescent and G418 resistant colonies was markedly higher compared with that

in the respective control without transposase ( $P < 0.001$ ; Fig. 6C). Interestingly, all G418 resistant colonies expressed the fluorescent protein.

Selected SB transgenic colonies were propagated for gDNA isolation, PCR analysis, and SCNT.

#### 3.5. Molecular characterization of SB transgene genomic integrations

We designed five PCRs to characterize SB transposon integrations into the genomes of six monoclonal cell lines generated by cotransfection (ratio 2:0.5:0.5). As anticipated gDNA from all cell lines rendered an amplification product (280 bp) from Venus sequence (Fig. 5F). To allow identification of putative nontranspositional genomic integration of the SB plasmid, we designed a PCR in which the forward primer hybridize in the 5'ITR and reverse primer on the vector backbone; therefore, a product (408 bp) is generated if the complete plasmid is integrated by a nonfacilitated mechanism. Polymerase chain reactions using gDNA from cell lines LM16, LM27, LM82, and LM87 generated a 408 bp product. The absence of a 408 bp product in gDNAs from lines LM25 and LM45 (Fig. 5F) and concurrent amplification of Venus sequences from the same gDNA provides strong evidence for SB transposase-mediated transgene integration. None of the gDNA samples from transgenic cell lines generated a PCR product using the set of primers specific for the plasmid backbone (Fig. 5E and F). We found no PCR evidence for genomic integration of SB helper plasmid (pCMV(CAT)T7-SB100X) in any SB transgenic cell lines studied. PCR analysis revealed that four of six cell lines had at least one copy of the religated backbone plasmid inserted in their genomes (Fig. 4C). Identity of PCR product was confirmed in by restriction enzyme digestion (Fig. 4D).

We have applied a splinkerette PCR method to clone and analyze junctions of integrated SB transposons and the bovine genome. We identified 15 SB integrations that were mappable on the bovine genome and showed hallmarks of

SB transposase-mediated integration; i.e., insertion at a TA target site dinucleotide. Ten of these were located in intergenic regions and five in genes (Supplementary Table 3).

### 3.6. Reprogramming transposon transgenic cells by SCNT

To test the ability of transposon transgenic cells to undergo nuclear reprogramming to support early embryo development, we performed SCNT with *pmhyGENIE-3* or Venus<sup>+</sup>/G418-resistant transgenic polyclonal cell line. Development to blastocyst stage reached 33.0% and 36.0% for PB and SB transgenic cell lines, respectively (Table 1; representative blastocysts are shown in Fig. 8A and B). Approximately half of the blastocyst homogeneously expressed the reporter fluorophore protein (EGFP or Venus) at Day 7 (Fig. 8D and E). Autofluorescence was negligible in nontransgenic blastocysts (Fig. 8C and F). One of three GFP expressing blastocysts from the *pmhyGENIE* group reexpanded upon thawing and culture; this blastocyst had 99 nuclei (Fig. 8G). Two of four nuclear transfer blastocysts generated with SB transgenic cells reexpanded after vitrification/devitrification procedure and consisted of 176 (Fig. 8H) and 81 nuclei, respectively.

## 4. Discussion

Transposons belong to a new generation of nonviral transgenic tools, known generically as active transgenesis methods, which have in common an enzyme-mediated mechanism of genome modification [8]. Being an enzymatic-based process, active transgenesis is more efficient and precise than traditional techniques in which transgenes are randomly integrated at natural occurring chromosomal double-strand breaks and resolved by nonhomologous end joining.

In this study, we have implemented a transposon-mediated transgenic approach to introduce transgenes into the bovine genome. Both transposons, a helper-independent PB and a bicomponent SB system, catalyzed efficient reporter gene integration into the bovine genome, and these genetically modified cells were amenable to nuclear reprogramming to drive development to morphologically normal blastocysts on SCNT.

It has been demonstrated that PB and SB transposases are functional in cells and embryos from different species including livestock [12,20,28,30,45–49]. Transgenic pigs carrying reporter genes introduced by transposition in cultured cells used for SCNT [20,29] or one-cell embryos [12,28] have been produced. Similarly, transposase-

mediated transgene integration has been documented in ruminant cells [33,45,47,50] and zygotes [51]. However, function and efficacy of PB and SB transposons in bovine cells and embryos have not been rigorously examined [52].

Initial experiments were designed to study if a PB helper-independent transgenic system already validated in different species [13,28] and a bicomponent SB transposon [10] could increase the efficiency of DNA integration into bovine fibroblast genome, the type of cell most commonly used as nuclear donor for SCNT.

Transfection of cultured BFFs with *pmGENIE-3* plasmids was associated with higher numbers of resistant cell colonies, indicating that the PB transposase facilitated genome integration of reporter and antibiotic resistance genes. Transfection of bovine cells with an upgraded version of *pmGENIE-3* carrying a hyperactive variant of PB transposase [13] enhanced genome integration of reporter genes as indicated by approximately three-fold increase in colony formation over the conventional nonoptimized enzyme and an unprecedented 85 times over those transfected with the control vector. High rates of transgene delivery have been achieved with both binary and single-plasmid PB transposon systems in cultured cells using classic colony formation assay [16]. *pmGENIE-3* and its hyperactive version *pmhyGENIE-3* were able to enhance HEK-293T colony formation seven and ten times respectively over those in the control without transposase [13]. Even higher transposition efficiency was observed in an established porcine cell line (28-fold) [32] and primary porcine fibroblasts (30-fold) transfected with the two-component PB system [29]. Under our experimental conditions, *pmhyGENIE-3* was highly active in bovine cells being able to increment 85 times the number of resistant colonies compared with the control. With  $324 \pm 17.8$  resistant colonies obtained in *pmhyGENIE-3* transfected cultures per  $0.5 \times 10^5$  plated fibroblasts, we can calculate a 21.6% of stably transfected cells on the basis of ~3% of transient transfection efficiency. The observed higher gene transfer activity in bovine cells compared with that reported by others in pig [29] and sheep cells [45] may reflect species-specific cell characteristics or conditions that favor transgene transposition, such as the presence or absence of cellular cofactors that affect transposase function, availability of DNA repair enzymes among others factors beyond intrinsic transposase activity. We also looked for nonenzymatic full-length or vector backbone insertion into the host cell genome. We found PCR evidence for nontranspositional genomic insertions of full-length PB vectors in three of nine cell lines analyzed and in four of six SB

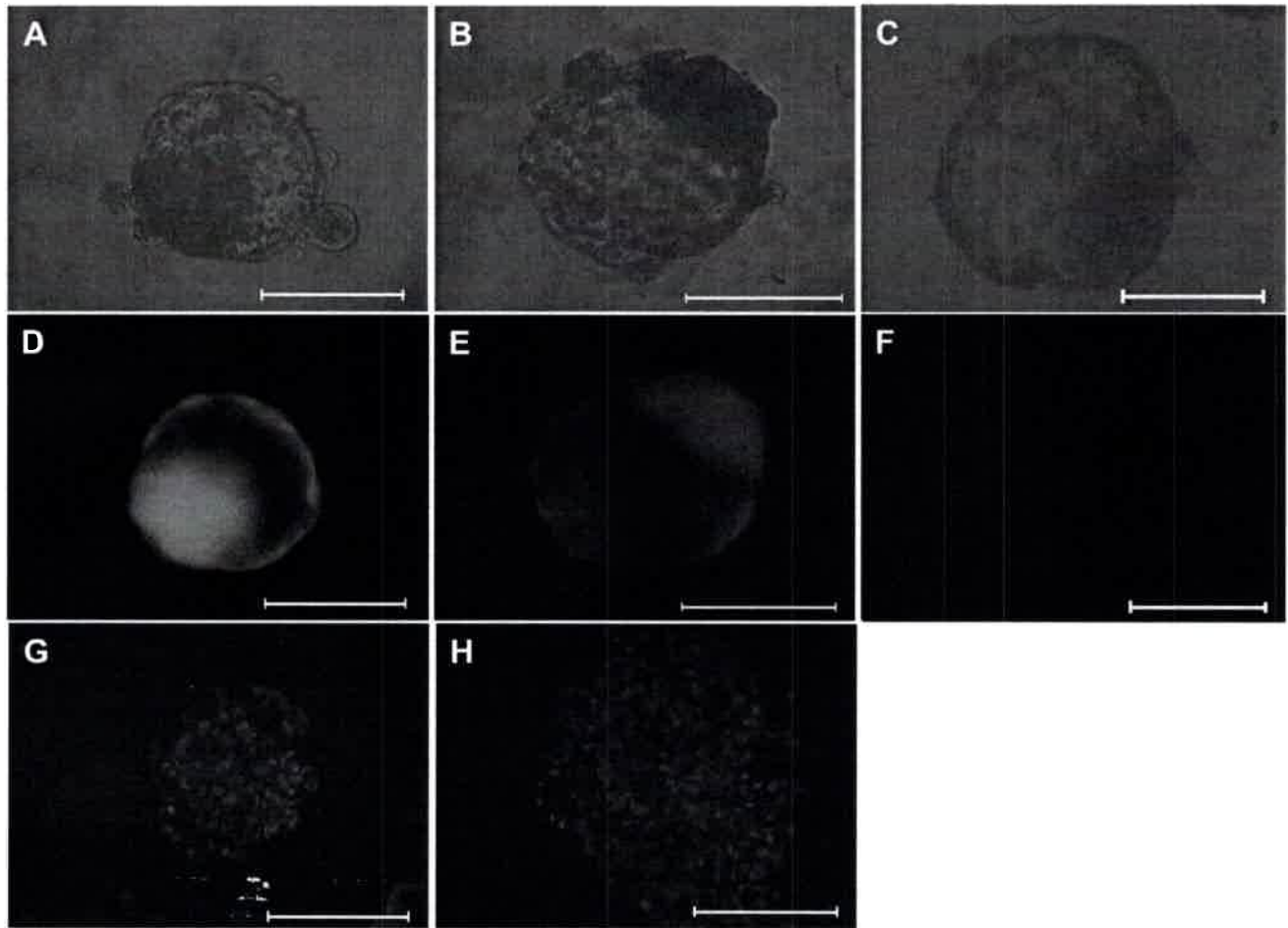
**Table 1**  
SCNT embryos produced with piggyBac and Sleeping Beauty transgenic cells.

Treatment	n	Cleaved (%)	Morulae (%)	Blastocysts (%)	Tg <sup>+</sup> <sup>a</sup>	
					Morulae (%)	Blastocysts (%)
<i>pmhyGENIE-3</i>	124	108 (87.0)	43 (34.6)	41 (33.0)	23 (53.4)	23 (56.0)
pT2RMCEVenus	75	66 (88.0)	29 (38.6)	27 (36.0)	15 (51.7)	15 (55.5)
PA control	126	122 (96.8)	76 (60.3)	67 (53.1)	—	—

n: number of reconstituted/fused presumptive embryos that were put in culture. Data from two independent replicates.

Abbreviations: PA, parthenogenetic activation and *in vitro* culture control; Tg<sup>+</sup>, Venus and/or EGFP expressing morulae and/or blastocyst.

<sup>a</sup> Tg morulae and blastocysts were calculated over total morulae and blastocysts, respectively.



**Fig. 8.** Representative bright-field (A and B), fluorescent (D, E, G, and H) microphotographs of blastocysts obtained by SCNT with PB (A, D, and G) or SB (B, E, and H) transgenic BFF (bars = 100  $\mu$ m). Transgenic blastocysts homogeneously expressed reporter fluorophore in the inner cell mass and trophoblast cells (D and E). Vitrified/de-vitrified transgenic blastocysts were stained with Hoechst 33342 to determine cell numbers (G and H). Parthenogenic blastocyst (C) displayed negligible autofluorescence (F).BFF, bovine fetal fibroblast; PB, piggyBac; SB, Sleeping Beauty.

transgenic cell lines. In addition, recircularization of the remnant plasmid backbone after transposon excision followed by random genomic insertion has been documented for PB [14,21] and SB transposon systems [53]. PCR analysis of gDNA from nine PB transgenic cell lines revealed that only one harbored plasmid backbone sequences in its genome, whereas four of six SB transgenic cell lines had at least one copy of the religated plasmid backbone. These findings support the idea that besides degradation [54], chromosome integration is a potential fate for the plasmid backbone.

To study the function of SB transposase in bovine cells, we cotransfected primary fibroblast cultures with the plasmids that comprises a binary SB system. Being a bicomponent system, it seemed reasonable to optimize the amounts of helper to donor plasmids to achieve the desired transposition efficiency. Ratios of 1:1 and 2:1 (helper:donor) resulted in 78 and 88 times more colonies respectively compared with the control. These results can be interpreted as SB transposase is highly active in bovine cells and by increasing the proportion of SBX100 helper vector in the transfection mixture it is possible to maximize transgene integration into the cell genome without

apparent cell toxic effects. Interestingly, within the range of SB transposase studied in our experiment, the well-characterized overproduction inhibition phenomenon described for SB transposons [16,55] was not observed.

In the second SB experiment, we use two donor plasmids, one carrying the Venus expression cassette and the other harboring a *neo* gene which confers resistance to G418. This design allows for selection of transgenic clonal cell lines using the neomycin analog G418. Results from this experiment confirmed the capacity of SB transposase to mediate incorporation of exogenous DNA into the bovine genome very efficiently. Surprisingly, all resistant colonies examined expressed the Venus protein what highlights the ability of SB transposase to simultaneously transpose two transgenes provided in separate donor plasmids. This multiplex feature could be of interest when the objective is to obtain bitransgenic animals. In addition, independent genomic integration of the antibiotic selection cassette from the transgene of interest may be used to segregate the selectable marker by breeding [20] to generate transgenic animals devoid of antibiotic resistance sequences to comply with the recommendations of most regulatory agencies.

Our nrLAM-PCR and splinkerette PCR data demonstrated that transgene integrations in the bovine genome corresponded with transposon-mediated events catalyzed by PB and SB transposase. All detected genomic integrations had on the right side the tetranucleotide TTAA for PB or TA dinucleotide for SB, followed by bovine genomic sequences, structures that agree with the known PB and SB transposition mechanisms [17,56]. Transposition ensures single copy, independent genomic integrations of transgenes thus reducing markedly epigenetic problems, namely silencing and variegated transgene expression as observed with viral vectors [57] and transgenic methods that rely on nonfacilitated transgene integration. The limited number of PB and SB genomic integration sites (17 and 15, respectively) in the bovine genome does not allow us to make conclusive statements about the preferences of PB or SB transposase to direct transgenes to particular domains of the bovine genome. Analysis of 575 PB transposase-mediated integration sites in the human genome showed that there is a slight tendency to incorporate the transposon into transcriptionally active regions or near them [16]. On the other hand, it has been established that SB transposase shows no predilection for transcription units, it rather preferentially recombines at intergenic chromosomal regions [58,59]. In our study, a clear copy number-dependent fluorescence intensity was found in nine PB transgenic cell lines indicating that most transgenes landed in transcriptionally permissive chromatin domains allowing for a faithful transgene expression [60].

We have produced a total of 38 transgenic cloned bovine blastocysts using cells from PB and SB polyclonal lines as nuclear donor for SCNT. Developmental rates to blastocyst were not different for embryos reconstructed with PB or SB transgenic cells (36.0% vs. 33.0%; respectively) and they are comparable to current standards of nuclear transfer blastocyst development rates reached with nontransgenic cells as nuclear donors [61–63]. Our nuclear transfer results reveal that transposon transgenic cells retain the ability to undergo nuclear reprogramming to support early embryo development. Of the embryos that reached blastocyst stage, about half expressed the reporter fluorophore as per direct observation under blue light in an inverted microscope. We speculate that epigenetic silencing of transgene sequences could have occurred during initial cleavage divisions of the embryo. However, it cannot be ruled out that low-level reporter gene expression in some blastocysts was below the detection limit. Persistence of fluorophore expression without mosaicism in nuclear transfer blastocyst generated from cells transfected with PB plasmids was reported by Kim et al. [52].

#### 4.1. Conclusions

In conclusion, both transposon systems under study were able to efficiently and precisely transpose monomeric copies of transgenes into bovine cell chromosomes. Transfection of primary bovine cell cultures with a helper-independent PB or the components of SB binary system notably increased (up to 88 times) the efficiency of genomic integration of foreign DNA molecules. Although donor cells are not normally considered a limiting resource

for SCNT, improvements in stable gene integration in primary cells can be of value when working with difficult-to-transfect primary cells. Demonstrated multiplexing ability of SB is an asset when more complex genetic manipulations of the bovine genome are sought. These transposon-transgenic cells can be reprogrammed on transfer to enucleated mature oocytes to morphologically normal blastocysts that expressed the transgene. Transposon-based transgenic methods alone or combined with other recombinase-based tools will simplify the production of transgenic cattle that consistently express the gene of interest. Incorporation of this active transgenesis method to the bovine transgenesis toolkit will certainly expand the opportunities for directed manipulation of the bovine genome for agricultural and biomedical applications.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank K. Pötsch for her technical assistance in SB splinkerette PCRs. This research was supported by grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCYT; Grant number: PICT-2012-0514), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET; Grant number: PIP 2012-2014 -114 201101 00278), DAAD, and DFG (travel grants).

Drs. Alessio and Fili contributed equally.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.016>

#### References

- [1] Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002;20:251–5.
- [2] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000;405:1066–9.
- [3] Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod* 2003;69:437–45.
- [4] Mendicino M, Ramsoondar J, Phelps C, Vaught T, Ball S, LeRoith T, et al. Generation of antibody- and B cell-deficient pigs by targeted disruption of the J-region gene segment of the heavy chain locus. *Transgenic Res* 2011;20:625–41.
- [5] Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008;321:1837–41.
- [6] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaseelan J, Sullivan EJ, Kakitani M, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat Genet* 2004;36:775–80.
- [7] Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, Sathiyaseelan T, Vargas F, et al. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 2007;25:132–8.
- [8] Bosch P, Forcato DO, Alustiza FE, Alessio AP, Fili AE, Olmos Nicotra MF, et al. Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1907–29.
- [9] Laible G, Wei J, Wagner S. Improving livestock for agriculture – technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnol J* 2015;10:109–20.



- [10] Mátés L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 2009;41:753–61.
- [11] Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1531–6.
- [12] Garrels W, Mates L, Holler S, Dalda A, Taylor U, Petersen B, et al. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS One* 2011;6:e23573.
- [13] Marh J, Stoytcheva Z, Urschütz J, Sugawara A, Yamashiro H, Owens JB, et al. Hyperactive self-inactivating piggyBac for transposase-enhanced pronuclear microinjection transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19184–9.
- [14] Urschütz J, Kawasumi M, Owens J, Morozumi K, Yamashiro H, Stoytchev I, et al. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8117–22.
- [15] Mikkelsen JG, Yant SR, Meuse L, Huang Z, Xu H, Kay MA. Helper-Independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther* 2003;8:654–65.
- [16] Wilson MH, Coates CJ, George Jr AL. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther* 2007;15:139–45.
- [17] van Luenen HG, Colloms SD, Plasterk RH. The mechanism of transposition of Tc3 in *C. elegans*. *Cell* 1994;79:293–301.
- [18] Fraser MJ, Cary L, Boonvisudhi K, Wang HG. Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *Virology* 1995;211:397–407.
- [19] Plasterk RH, Izsvák Z, Ivics Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet* 1999;15:326–32.
- [20] Carlson DF, Garbe JR, Tan W, Martin MJ, Dobrinsky JR, Hackett PB, et al. Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Res* 2011;20:1125–37.
- [21] Saha S, Woodard LE, Charron EM, Welch RC, Rooney CM, Wilson MH. Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells. *Nucleic Acids Res* 2015;43:1770–82.
- [22] Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:51–8.
- [23] Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, Mátés L, Yau TY, Bashir S, et al. Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nat Protoc* 2014;9:794–809.
- [24] Ivics Z, Mátés L, Yau TY, Landa V, Zidek V, Bashir S, et al. Germline transgenesis in rodents by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nat Protoc* 2014;9:773–93.
- [25] Katter K, Geurts AM, Hoffmann O, Mates L, Landa V, Hiripi L, et al. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *FASEB J* 2013;27:930–41.
- [26] Jang CW, Behringer RR. Transposon-mediated transgenesis in rats. *CSH Protoc* 2007;2007. [pdb.prot4866](https://doi.org/10.1101/pdb.prot4866).
- [27] Staunstrup NH, Madsen J, Primo MN, Li J, Liu Y, Kragh PM, et al. Development of transgenic cloned pig models of skin inflammation by DNA transposon-directed ectopic expression of human beta1 and alpha2 integrin. *PLoS One* 2012;7:e36658.
- [28] Li Z, Zeng F, Meng F, Xu Z, Zhang X, Huang X, et al. Generation of transgenic pigs by cytoplasmic injection of piggyBac transposase-based pmGENIE-3 plasmids. *Biol Reprod* 2014;90:1–10.
- [29] Wu Z, Xu Z, Zou X, Zeng F, Shi J, Liu D, et al. Pig transgenesis by piggyBac transposition in combination with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic Res* 2013;22:1107–18.
- [30] Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, Christoffersen C, Mortensen MB, Tolbod LP, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Sci Transl Med* 2013;5:166ra1.
- [31] Ivics Z, Garrels W, Mátés L, Yau TY, Bashir S, Zidek V, et al. Germline transgenesis in pigs by cytoplasmic microinjection of Sleeping Beauty transposons. *Nat Protoc* 2014;9:810–27.
- [32] Clark KJ, Carlson DF, Foster LK, Kong BW, Foster DN, Fahrenkrug SC. Enzymatic engineering of the porcine genome with transposons and recombinases. *BMC Biotechnol* 2007;7:42.
- [33] Alessio A, Fili A, Forcato D, Olmos-Nicotra F, Alustiza F, Rodriguez N, et al. Efficient piggyBac transposon-mediated transgene integration into bovine fetal fibroblast genome. *Reprod Domest Anim* 2014;49:8.
- [34] Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991;108:193–9.
- [35] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 1997;91:501–10.
- [36] Mathupala S, Sloan AA. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques* 2009;46:305–7.
- [37] Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2006;123:273–80.
- [38] McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;13:1400–12.
- [39] Owens JB, Urschütz J, Stoytchev I, Dang NC, Stoytcheva Z, Belcaid M, et al. Chimeric piggyBac transposases for genomic targeting in human cells. *Nucleic Acids Res* 2012;40:6978–91.
- [40] Paruzynski A, Arens A, Gabriel R, Bartholomae CC, Scholz S, Wang W, et al. Genome-wide high-throughput integrome analyses by nLAM-PCR and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 2010;5:1379–95.
- [41] Ivics Z, Izsvák Z, Medrano G, Chapman KM, Hamra FK. Sleeping Beauty transposon mutagenesis in rat spermatogonial stem cells. *Nat Protoc* 2011;6:1521–35.
- [42] Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 2000;55:256–64.
- [43] Martínez AG, Valcárcel A, Furnus CC, de Matos DG, Iorio G, de las Heras MA. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Rumin Res* 2006;63:288–96.
- [44] Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999;51:175.
- [45] Hu S, Ni W, Sai W, Zhang H, Cao X, Qiao J, et al. Sleeping Beauty-mediated knockdown of sheep myostatin by RNA interference. *Biotechnol Lett* 2011;33:1949–53.
- [46] Jakobsen JE, Li J, Kragh PM, Moldt B, Lin L, Liu Y, et al. Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic Res* 2011;20:533–45.
- [47] Bai DP, Yang MM, Chen YL. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in Cashmere goat fetal fibroblast cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012;76:933–7.
- [48] Liu X, Li N, Hu X, Zhang R, Li Q, Cao D, et al. Efficient production of transgenic chickens based on piggyBac. *Transgenic Res* 2013;22:417–23.
- [49] Park TS, Han JY. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:9337–41.
- [50] Jiang BC, Kaleri HA, Zhang HX, Chen J, Liu HL. Application of the Sleeping Beauty system in Saanen goat fibroblast cells for establishing persistent transgene expression. *Genet Mol Res* 2011;10:3347–55.
- [51] Garrels W, Talluri TR, Bevacqua RC, Alessio A, Fili A, Forcato D, et al. Sleeping Beauty transgenesis in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2015;27:266.
- [52] Kim S, Saadeldin IM, Choi WJ, Lee SJ, Lee WW, Kim BH, et al. Production of transgenic bovine cloned embryos using piggyBac transposition. *J Vet Med Sci* 2011;73:1453–7.
- [53] Bell JB, Aronovich EL, Schreifels JM, Beadnell TC, Hackett PB. Duration of expression and activity of Sleeping Beauty transposase in mouse liver following hydrodynamic DNA delivery. *Mol Ther* 2010;18:1796–802.
- [54] Wang X, Sarkar DP, Mani P, Steer CJ, Chen Y, Guha C, et al. Long-term reduction of jaundice in Gunn rats by nonviral liver-targeted delivery of Sleeping Beauty transposon. *Hepatology* 2009;50:815–24.
- [55] Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu G, Cui Z, Dupuy AJ, et al. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Mol Ther* 2003;8:108–17.
- [56] Mitra R, Fain-Thornton J, Craig NL. piggyBac can bypass DNA synthesis during cut and paste transposition. *EMBO J* 2008;27:1097–109.
- [57] Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005;16:1241–6.
- [58] Ikeda R, Kokubu C, Yusa K, Keng VW, Horie K, Takeda J. Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 2007;27:1665–76.

- [59] Yant SR, Wu X, Huang Y, Garrison B, Burgess SM, Kay MA. High-resolution genome-wide mapping of transposon integration in mammals. *Mol Cell Biol* 2005;25:2085–94.
- [60] Grabundzija I, Irgang M, Mátés L, Belay E, Matrai J, Gogol-Döring A, et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Mol Ther* 2010;18:1200–9.
- [61] Canel N, Bevacqua R, Fernández-Martín R, Salamone DF. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cell Reprogram* 2010;12:491–9.
- [62] Li X, Amarnath D, Kato Y, Tsunoda Y. Analysis of development-related gene expression in cloned bovine blastocysts with different developmental potential. *Cloning Stem Cells* 2006;8:41–50.
- [63] Lager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, et al. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 2008;10:371–9.

**Supplementary Table 1**

Primers name and sequences.

Primer name	Sequence
PB-GFP-F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC
PB-GFP-R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
PB-ITR-F	GATCTCGTCGGTGAAGAACAG
PB-ITR-R	ACTCCAGACATGCCCAAGT
PB-TPase-R	AGATCCTGGACGAGCAGAAC
PB-TPase-F	GATCTCGTCGGTGAAGAACAG
PB-RL-F	GGTGCTCTGGAGGTGGAC
PB-RL-R	CCGCGACGAACCTGGTATC
SB-Venus-F	TAGCCCAGGGTGGTCACCAG
SB-Venus-R	TGTGACCGGGCTCTAGAG
SB-ITR-F	CTCGAGAAGCTTGTGAAAGG
SB-ITR-R	TGACCATGATTACGCCAAGC
SB-BB-F	GCTCTTGATCCGGCAAACAA
SB-BB-R	GAGGCGGATAAAGTTGCAGG
SB-RL-F	GGGGATGTGCTGCAAGGC
SB-RLR	TGACCATGATTACGCCAAGC
SB-TPase-F	CAGCAAGGAAGAAGCCACTG
SB-TPase-R	ACTTGGGTCAAACGTTTCGG

**Supplementary Table 2**

Bovine genomic insertion sites for piggyBac transposons.

Insertion number	Chromosome	Location	Gene	ITR TAA genomic sequence
1	ch15	19428292	Intergenic	cagactatctttctagggtTAACATATGAACTTGAGAGGG
2	chrUn_JH122283	39105	unknown	cagactatctttctagggtTAAGGGATTTGAGTGAATTTG
3	ch21	25472450	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAGACCCC ATGGACTGCAGC
4	chrUn_AAFC03095622	1018	unknown	cagactatctttctagggtTAAGACCCCATGGACTGCAGC
5	ch5	79123143	<i>RBFOX2</i> , intron	cagactatctttctagggtTAATCTCCTTGCAGAAAGGA
6	ch6	37957543	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAGGAGTTAACAGGAATCA
7	ch7	105149760	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAGTCAGATCCACCAGTCT
8	chrUn_JH121295	390708	unknown	cagactatctttctagggtTAATCTGAAGAAAAGTAAAA
9	ch15	141258670	Intergenic	cagactatctttctagggtTAATGTACTGACAAAAGCTCCA
10	chX	529630	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAGCCACAAAAGCGGGGGTC
11	ch9	82826492	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAGGAGTTTCCGCCAT
12	ch26	18051846	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAGATTAAGTGTGCCCAT
13	ch2	8600480	<i>GULP1</i> , intron	cagactatctttctagggtTAAAGATTAAGTGTGCCCAT
14	ch16	19235265	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAGATTTGAATTAAGTT
15	ch27	45374270	<i>UBE2E2</i> , intron	cagactatctttctagggtTAAAGATGAAAAATCCCCAGT
16	ch27	10507265	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAAAAGGTAGCCAGTTGCA
17	ch7	49826129	Intergenic	cagactatctttctagggtTAAAGTGGAGGAGACTTTTTT

**Supplementary Table 3**

Bovine genomic insertion sites for SB transposon.

Insertion	Chromosome	Location	Gene	Genomic sequence TA SB-ITR
C5.1	13	78983	Prion Protein ( <i>PRNP</i> )	TTCTGTATAAGGGTGGTGTTCATATGCATACAGTTGAAGT
C5.2	X	1	ZFX intron	TCCCATGGGCCAAACACTGATCTAAGTATACAGTTGAAGT
C5.4	25	3016	Sorting nexin 29 ( <i>SNX29</i> )	CCCTGGTGGGGCGTATGCGGAAAGGAACTACAGTTGAAGT
C5a.2	26	2080521	Intergenic	AAANTGGCCAACAAAACATATAAGTGACCTACAGTTGAAGT
C5a.5	12	27360511	Intergenic	TTTTTAGTGCAGGTTTGAGGGCTGGAATTACAGTTGAAGT
C6.1	mtDNA	26009	Mitochondrial acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 ( <i>ACAA2</i> ), complete cds	CTGACACTGTTCCACTGTTTCCCATCTACAGTTGAAGT
C6a.3	19	44952926	Intergenic	GCCAGGCTGGGAGGATCTGGACCATATACAGTTGAAGT
C6a.5	25	36298502	Intergenic	TGAATGGATAAAGAAAATATGGCATGTACAGTTGAAGT
C7.2	13	35994	Intergenic	GACACTGTTTCCACTGTTTCCCATCTACAGTTGAAGT
C7.3	22	24703993	Intergenic	TTAAATAGATCTGAATCTAAGCATTACATACAGTTGAAGT
C7a.1	5	Unknown	Intergenic	TTTTAAGTGTTACATTTATTTCCAGCTACAGTTGAAGT
C8a.2	18	Unknown	Intergenic	TTGATTACATAATGGATTATCTGGGATCTACAGTTGAAGT
11.1	Y	465464	Y-linked ubiquitin-specific protease 9 ( <i>USP9Y</i> ) gene	CTAAGGATTTTTAAAAATTAATAAATATACAGTTGAAGT
11.3	22	15535315	Intergenic	GAACTGAAGTTGGAGAGACACAACCTGACAGTTGAAGT
31.1	26	24931481	Intergenic	AAGGATTTTTAAAAATTAATAAATATACAGTTGAAGT

