



UPPSALA  
UNIVERSITET

Evolution på ett klick med genteknik: Vilka tekniker finns och vilken är mest effektiv?



Linnea Bäckström

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2013  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

# Evolution på ett kick med genteknik: Vilka tekniker finns och vilken är mest effektiv?

**Linnea Bäckström**

## Sammandrag

Genteknik är ett vetenskapsfält som är under ständig förändring. Möjligheterna att ändra organismers DNA har öppnat dörrar för sjukdomsforskning och ökat förståelsen för människokroppen och alla dess processer. Idag finns flera olika tillvägagångssätt för att skapa transgena däggdjur. Det mest använda är pronukleär mikroinjektion, en metod som trots flera års användning och utveckling är väldigt ineffektiv och tidskrävande. Andra metoder, som könscellsmedierad genöverföring har flera fördelar vid en jämförelse. Vid metoden gentargeting används pluripotenta stamceller som genmodifierats och sedan sätts in i ett växande embryo, en metod som är enkel att genomföra men ger få transgena avkommor i verkligheten. Denna litteraturstudie jämför olika tekniker för genmodifiering med avseende på utförandets svårighetsgrad och dess effektivitet med syfte på andelen lyckade genmanipulationer per försök. Slutsatsen blev att de enklare teknikerna ofta är mer effektiva, men specificiteten för vilka gener som ska modifieras i en organism kräver mer förarbete i form av skapandet av specifika plasmider, transposoner, virusvektorer och nukleaser. Det krävs stor kunskap om genen som ska modifieras för att önskade resultat ska uppnås samtidigt som antalet lyckade försök maximeras. Teknikerna som finns idag fokuserar antingen på specificitet eller på effektivitet och utmaningen för framtiden är att utveckla tekniker som har båda fördelarna.

## Introduktion

Genuttryck och mutationer har sedan Mendels tid intresserat människan. Förmågan att effektivisera avel och skynda på det naturliga urvalet har gjort mycket för vår utveckling och vår levnadsstandard. Den allra första gentekniken var våra förfäder som avlade på djur och växter med tilltalande egenskaper och på så vis skapade avkomma med samma egenskaper (Brändén 2011). I modern tid har vi insett att evolutionen kan snabbas på ytterligare med hjälp av laboratorieteknik och vi kan till och med bestämma vilka gener som ska uttryckas. Numera finns det oändliga möjligheter att utveckla förståelse för människokroppen och dess sjukdomar genom att studera genuttrycket hos andra däggdjur (Nguyen & Xu 2008). Med dagens teknik kan vi skapa djurmodeller för alla tänkbara mänskliga sjukdomar, dessutom har nya möjligheter öppnats för effektivare djuravel, med högre avkastning och djur med önskade egenskaper som resultat (Miao 2013).

År 1967 kom en artikel skriven av Schlager och Dickie om mutationsfrekvens hos möss. De hade under tre års tid avlat och undersökt fenotyperna på 3,5 miljoner möss. Mutationerna uppstod genom aktiv inavel av mössen för att homozygoter för muterade alleler skulle synas (Schlager & Dickie 1967). Förfarandet var tidskrävande och ineffektivt, utav de 3,5 miljoner mössen identifierades att 1193 möss var muterade med totalt 146 olika mutationer (Schlager & Dickie 1967). Därför utvecklades snart fler tekniker för att effektivare skapa intressanta mutationer. På 1970-talet lyckades forskaren Jaenisch att injicera virus in i en muszygot och kunde sedan se virus-DNA uttryckas hos avkomman (Jaenisch *et al.* 1975). Detta var starten för utvecklingen av genteknik på däggdjur. Liknande experiment hade redan gjorts på invertebrater som rundmasken *Caenorhabditis elegans*, bananflugan *Drosophila melanogaster* och jästen *Saccharomyces cerevisiae*, men det var ett stort genombrott att samma sak kunde göras på däggdjur.

Gentekniken har avancerat sedan 1975 och idag finns flera metoder att skapa transgena organismer. Exempel är: pronukleär mikroinjektion (Gordon *et al.* 1980), muterande ämnen (Russel & Montgomery 1982), spermie-medierad genöverföring både *in vitro* (Lavitrano *et al.* 1989) och *in vivo* (Brackett *et al.* 1971), genmodifierade äggceller (Carballada *et al.* 2000) och gentargeting (Evans & Kaufman 1981). I denna översiktsartikel kommer dessa tillvägagångssätt beskrivas och sedan följer en jämförande diskussion om för- och nackdelar med teknikerna med avseende på effektivitet och svårighetsgrad.

## Transgena djur

Idag har forskare tagit fram flertalet transgena däggdjur för olika syften. Det handlar främst om möss som modeller för mänskliga genom vid sjukdomsforskning (Nguyen & Xu 2008). Men även däggdjur för effektivare livsmedelsproduktion i både ekonomiska och ekologiska hänseenden har skapats. Transgena djur går också att använda som bioreaktorer. Det kan handla om en get eller ko som producerar önskade proteiner i sin mjölk, blod eller urin (Houdebine 1994). Människan kan sedan använda proteinerna till läkemedelsframställning eller som ett tillskott direkt i mjölken. Ett annat exempel på bioreaktorer är transgena djur som används för xenotransplantation, det vill säga att man använder deras organ för transplantation till människor. Detta har inte varit möjligt tidigare eftersom människans kropp stöter bort de främmande cellerna. Men med genteknik kan djurets celler bli kompatibla med människans (Ramsoondar *et al.* 2003). Detta har lyckats med till exempel insulinproducerande langerhanska öar till patienter med diabetes (Morner 2006). För en bättre förståelse för hur de olika genteknikerna går till kommer nu en kort beskrivning av modellorganismen som nästan uteslutande använts i lästa artiklar - Musen.

### Embryologi hos mus

Musen är det djur som främst används som modellorganism när det kommer till gentekniken. Detta eftersom möss har kort livscykel, är lätt att hantera och avla samt att dess DNA liknar människans både fysiologiskt och genetiskt (van der Weyden *et al.* 2002).

Studier har gjorts för att bestämma hur forskare ska kunna få ut ett så stort antal oocyter från en äggstock som möjligt, eftersom en effektiv avel är viktig för experimentens framgång. Numera finns närmast standardiserade doser av hormon som ger mössen förhöjd ägglossning (Belizário *et al.* 2012). Exempel på hormon är gonadotropin (PMSG) som utvinns från livmodern på dräktiga hästar eller follikelstimulerande hormon (FSH) följt av en dos luteiniserande hormon (LH) eller humant koriogonadotropin (hCG) som gör att oocyterna får längre hållbarhet och bättre kvalitet eftersom hormonerna framkallar en dräktighetsreaktion hos mössen. Produktiviteten är en av nycklarna till ett framgångsrikt experiment eftersom forskarna behöver embryon till både själva studien och som kontroller (Belizário *et al.* 2012).

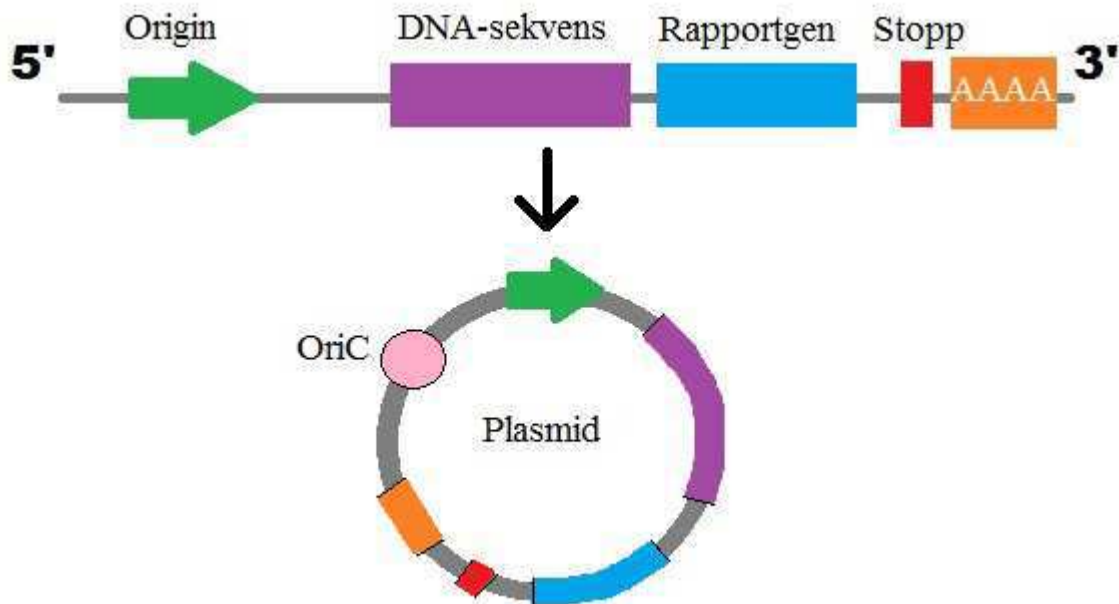
### Att skapa plasmider med önskat DNA

Innan man ens kan börja tänka på att avla transgena möss så måste man ha en klar bild av vilken gen det är man vill studera. De mest använda sätten att studera en gen är att stänga av den eller att mutera den och sedan se vilken effekten blir på fenotypen. För att mutera en specifik gen måste genen bytas ut mot en som är modifierad på önskat sätt. Forskaren måste då klippa ut DNA som kodar för just den önskade genen och amplifiera den med hjälp av polymeraskedjereaktion (PCR, från eng. Polymerase Chain Reaction).

## PCR

PCR är en metod där primers och DNA polymeras tillsätts till den önskade DNA-sekvensen, som först hettats upp så DNA-helixens strängar har delat på sig. Primers sätter sig på ändarna av DNA-sekvensen och polymeraset börjar replikera enkelsträngen mellan dem. Reaktionen är exponentiell och på så vis får man på kort tid stora mängder av den önskade DNA-sekvensen (NCBI 2013).

DNA-sekvensen kan sedan göras till en plasmid tillsammans med allt den behöver för att uttryckas, såsom transkriptions-origin, stoppkodon, 5' och 3' otranslaterade regioner, en eventuell rapportgen samt en polyadenylerings-site (Figur 1: Belizário *et al.* 2012). Ett ännu enklare sätt är att ta en plasmid från en bakterie, klyva den med restriktionsenzymer och låta sin DNA-sekvens sättas ihop med de öppna ändarna på plasmiden. Den återtar då sin cirkulära form. Det går att få tag på många olika plasmider kommersiellt, så forskarna behöver bara skapa egna plasmider från grunden i specialfall (Liu *et al.* 1998). Plasmiden kan sedan mikroinjiceras i celler där det önskade DNA:t sedan uttrycks självständigt utan att inkorporeras i cellens egna DNA, eller så sker homolog rekombination så den nya genen blir en del av kromosomen.



**Figur 1.** Linjära DNA-fragment kopplar gärna ihop ändarna och skapar ett cirkulärt DNA, en så kallad plasmid. I plasmider som används för genmodifiering behövs transkriptions- och translationsfaktorer såsom ett origin för translation och ett stopp.

## Användning av rapportgener

När en ny gen introduceras i en organism så vet forskaren oftast inte om genen faktiskt har integrerats i dess kromosom och uttrycks som den ska. Ett sätt att få bevis för att genen faktiskt är aktiv är att sätta ihop den önskade genen med en rapportgen (eng. reporter gene). Rapportgenen har ett uttryck som är lätt att identifiera och när rapportgenen uttrycks innebär det att även den önskade genen uttrycks i genomet. Exempel på rapportgener är  $\beta$ -galaktosidas från *E.coli* (*lacZ*) som ger upphov till blå kolonier när cellerna odlas i medium som innehåller laktos, grönt fluorescensprotein (GFP) eller eldflugans protein luciferas som båda färgar cellen när de uttrycks (Belizário *et al.* 2012).

# Tekniker för att skapa genmodifierade däggdjur

## Pronukleär mikroinjektion

Mikroinjektion används för att injicera en liten mängd vätska innehållandes till exempel DNA in i en cell. Detta görs med en tunn glaskapillär under mikroskop (Nationalencyklopedin 2013). Pronukleär innebär att injektionen sker direkt in i cellkärnan. Mikroinjektionen görs med stadig hand och kräver tålamod (Wall 2001).

### *Historia*

Föregångaren till pronukleär mikroinjektion var att virus-DNA mikroinjicerades direkt in i en zygot (Jaenisch & Mintz 1974). Försöket gick ut på att en zygot tas ut från livmodern på i det här fallet en mus, sedan mikroinjicerades virus-DNA från Simian virus 40 (SV40). SV40 är ett virus som kan orsaka tumörer, men som också kan ligga latent i cellerna utan att uttryckas.

SV40-DNA var radioaktivt märkt med  $^{32}\text{P}$ . Av 80 mikroinjicerade muszygoter föddes 30 stycken. När de var ett år gamla undersöktes DNA från deras lever, njurar och hjärna. Jaenisch och Mintz kunde konstantera att cellerna innehöll virus-DNA. Dock gick det inte att påvisa om virus-DNA faktiskt var integrerat i mössens eget DNA. Det kunde lika gärna varit vektorer inuti cellen som gav utslaget. Ingen av mössen fick heller några tumörer av viruset, något som kunde bero på att de inte fått leva tillräckligt länge för att utveckla några, men också kunde tyda på att virus-DNA inte var fullt integrerat (Jaenisch & Mintz 1974).

Jaenisch gjorde ett nytt försök 1975 där han mikroinjicerade 29 musembryon med Moloney murine leukemivirus (M-MuLV). Av de 15 möss som överlevde till födseln utvecklade en leukemi efter 8 veckor, vilket sågs som ett bevis för att virus-DNA inkorporerats i värdens eget DNA (Jaenisch *et al.* 1975). Dock fanns problemet att när DNA injicerades in i en zygot, som består av ett litet antal celler, så finns det risk att bara en/ett par av cellerna tar upp det främmande DNA. Det är då endast de celler som är delade utifrån just den cellen som får det nya uttrycket. Detta kallas för genetisk mosaik och gör det svårare att bestämma om nytt DNA faktiskt finns i vävnaderna. Jaenisch *et al.* grundade med denna studie underlag för både mikroinjektion i embryon och användandet av lentivirus, i detta fall M-MuLV (Park 2007).

Svårigheterna med dåtidens metod ligger bland annat i att zygoterna inte klarar sig mer än ett par dagar utanför livmodern. Även om de odlas i provrör med ungefär samma temperatur och näringstillgång som i livmodern avstannar celldelningen. Efter ett par dagar behöver zygoten inplanteras i en surrogathona för att överleva (Chan 1999). Ett annat problem med de första försöken var att det genetiska materialet som inkorporerades i zygoten var icke-specifikt (Smithies *et al.* 1985). Dåtidens teknik tillät inte forskaren att välja ut vilka sekvenser som skulle överföras till cellen (Brinster *et al.* 1985).

### *Pronukleär mikroinjektion*

Användandet av pronukleär mikroinjektion är den äldsta och mest använda tekniken för att skapa transgena däggdjur (Lavitrano *et al.* 1989). Tekniken beskrevs först av Gordon *et al.* 1980. De förfinade Jaenisch och Mintzs teknik genom att göra injiceringen direkt in i det nyligen befruktade äggets kärna, det vill säga pronukleärt. Med detta tillvägagångssätt skulle samtliga celler i den bildande zygoten få en uppsättning av de injicerade generna och på så sätt undvika mosaikismen (Gordon *et al.* 1980). De beskrev tekniken som användbar för att studera genetiska problem under utvecklingsfaser hos ett foster, studera genreglering samt undersöka vilken roll nya genprodukter kunde spela i en organism. De uppskattade att tekniken skulle vara användbar på samtliga däggdjur. Rapporten påpekar också möjligheten

att använda gentransformerade djur till avel, då avkomman skulle få samma genotyp. Man skulle enligt Gordon *et al.* kunna avla fram många transgena djur med endast en stammoder som utgångspunkt (Gordon *et al.* 1980). Detta är något som har utvecklats och precis som rapporten föreslår används metoden idag för att skapa gentransformerade däggdjur med möjligheten att överföra genotypen till sin avkomma.

För att kunna injicera DNA till cellkärnan måste själva kärnan vara synlig i mikroskopet. Detta är oftast inget problem då många djurarter har en genomskinlig äggcell. Det blev problem först när celler från boskap såsom gris, får och ko skulle mikroinjiceras. Deras celler är grumliga och cellkärnan kan inte urskiljas från cytoplasman. Är cellen grumlig behöver den centrifugeras innan injektionen för att tvinga cytoplasmas lipider åt sidan så kärnan kan identifieras (Wall *et al.* 1985). Gordon *et al.* använde sig av en rekombinant plasmid innehållandes DNA från flera olika virus. Endast två av 78 möss visade sig ha fått sitt DNA rekombinerat med virus-DNA (Gordon *et al.* 1980). Det är vanligt att cellkärnan spricker när vätskan injiceras i den, något som förstör försöket och dödar zygoten (Brinster *et al.* 1985). Också här var det ett problem att de befruktade äggen snabbt måste in i en surrogathona för att kunna fortsätta dela sig, något som är ett problem än idag. Fortfarande är andelen lyckade mikroinjektioner mycket låg, man räknar med 5-20 % lyckade injektioner per försöksserie på möss (Le Provost *et al.* 2010) och mindre än 1 % på övriga däggdjur. Därför kräver denna metod mycket arbete med många replikat för att få relevanta resultat (Robl *et al.* 2007).

### **Genöverföring med könsceller**

Könsceller från både honor och hanar kan modifieras innan de används för befruktning antingen *in vivo* (Blanchard & Boekelheide 1997) eller *in vitro* (Lavitrano *et al.* 1989).

#### *Spermie-medierad genöverföring*

Genöverföring där man använder hanliga könsceller innebär att transgena spermier får befrukta normala äggceller. Den ursprungliga tekniken kallas spermie-medierad genöverföring (Niu & Liang 2008). I den enklaste varianten inkuberas spermerna i medium som innehåller främmande DNA (Figur 2A) och sedan insemineras en hona med dem. Vid inkuberingen kan könscellerna ta upp ungefär 5 kilobaspar DNA från omgivningen. Dessa transgena spermier kan även användas till olika fertiliseringstekniker *in vitro*, till exempel kan ägg inkuberas tillsammans med spermerna, (Lavitrano *et al.* 1989) eller så används en intracytoplasmisk injektion av spermerna direkt in i ägget. För att hjälpa DNA-upptaget kan spermerna och DNAt inkuberas med hjälpmolekyler (Figur 2B). Till exempel liposomer som underlättar upptaget av främmande DNA. Spermerna kan också inkuberas tillsammans med virus-DNA-vektorer och på så vis få nya DNA-fragment (Figur 2C: Niu & Liang 2008).

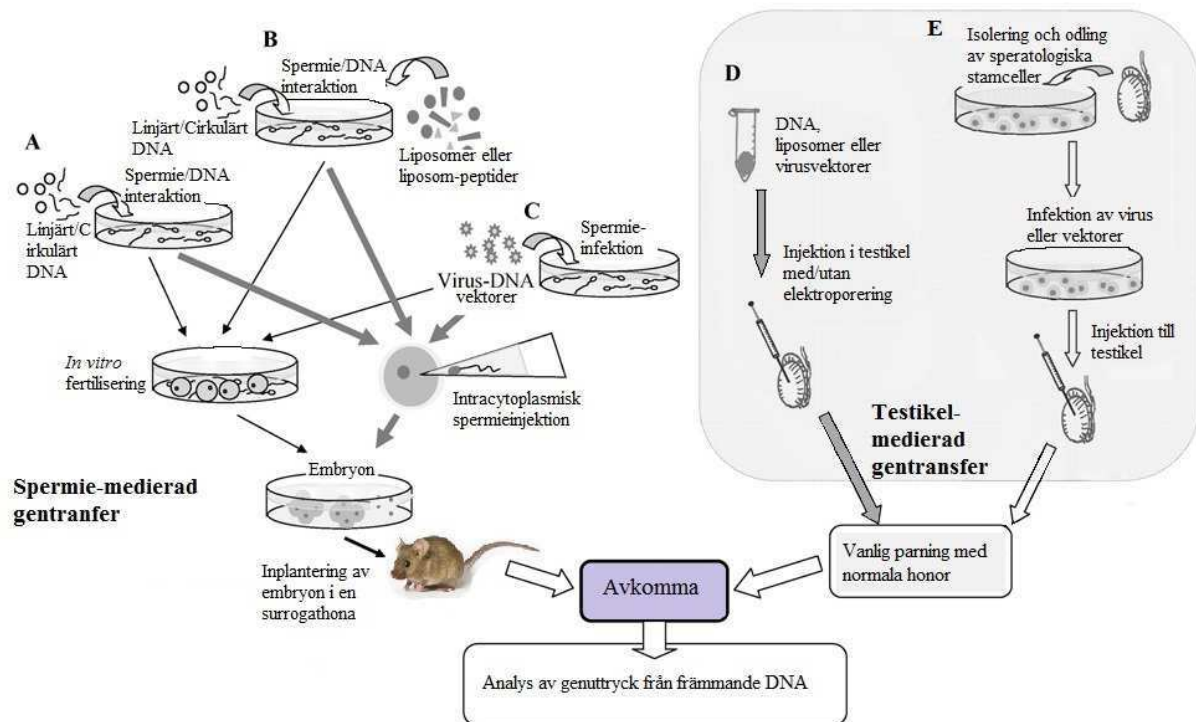
De första som använde metoden med spermie-medierad genöverföring var Brackett *et al.* 1971. De exponerade kaninsperma för SV40-DNA innehållandes <sup>3</sup>H-märkt thymidin (radioaktivt). Sedan inseminerades en fertil kaninhona med sperman. Efter 26 timmar nackades honan och Brackett och hans team kunde identifiera att SV40-DNA hade blivit inkorporerat i fostren (Brackett *et al.* 1971). År 1989 visade Lavitrano och hennes team samma resultat (Lavitrano *et al.* 1989).

#### *Testikel-medierad genöverföring*

DNA kan också injiceras direkt i testiklarna för att spermerna ska få det inkorporerat. Denna teknik kallas testikel-medierad genöverföring (Figur 2D: Blanchard & Boekelheide 1997). Omogna spermier, spermatogonium, kan skördas ur testikeln och sedan inkuberas

tillsammans med DNA-vektorer för att sedan injiceras tillbaka in i testikeln (Figur 2E) och sedan används hanen för konventionell parning.

Resultaten av dessa studier ledde till stora kontroverser. Motståndare menade att om könsceller inte kunde stänga ute främmande DNA skulle det påverka evolutionen något enormt och borde inte vara möjligt. De senaste 20 åren har dock olika studier bevisat att spermie-medierad genöverföring är möjlig för kräddjur (Chen *et al.* 2006), fisk (Khoo 2000), amfibier (Jonák 2000), fågel (Nakanishi & Iritani 1993) och däggdjur (Lavitrano *et al.* 1989). Det är med andra ord numera allmänt accepterat att spermier går att manipulera på detta sätt.



**Figur 2.** Schematisk bild över olika metoder för genöverföring med hanliga könsceller. Spermie-medierad genöverföring: **A:** Naket DNA inkuberas med spermier som sedan fertiliserar ägg *in vitro* eller via intracytoplasmisk spermieinjektion direkt in i äggcellen. **B:** Liposomer kan hjälpa integrationen av DNA att inkorporeras med spermiernas DNA. **C:** Spermier infekteras med hjälp av virusvektorer. Testikelmedierad genöverföring: **D:** DNA, virusvektorer eller liposomer injiceras direkt in i testikeln och vanlig parning sker. **E:** Spermatogoniska stamceller skördas och inkuberas med virusvektorer. Sedan överförs de tillbaka till testikeln innan parning med en normal hona. Bilden omarbetad efter original från Niu & Liang (2008).

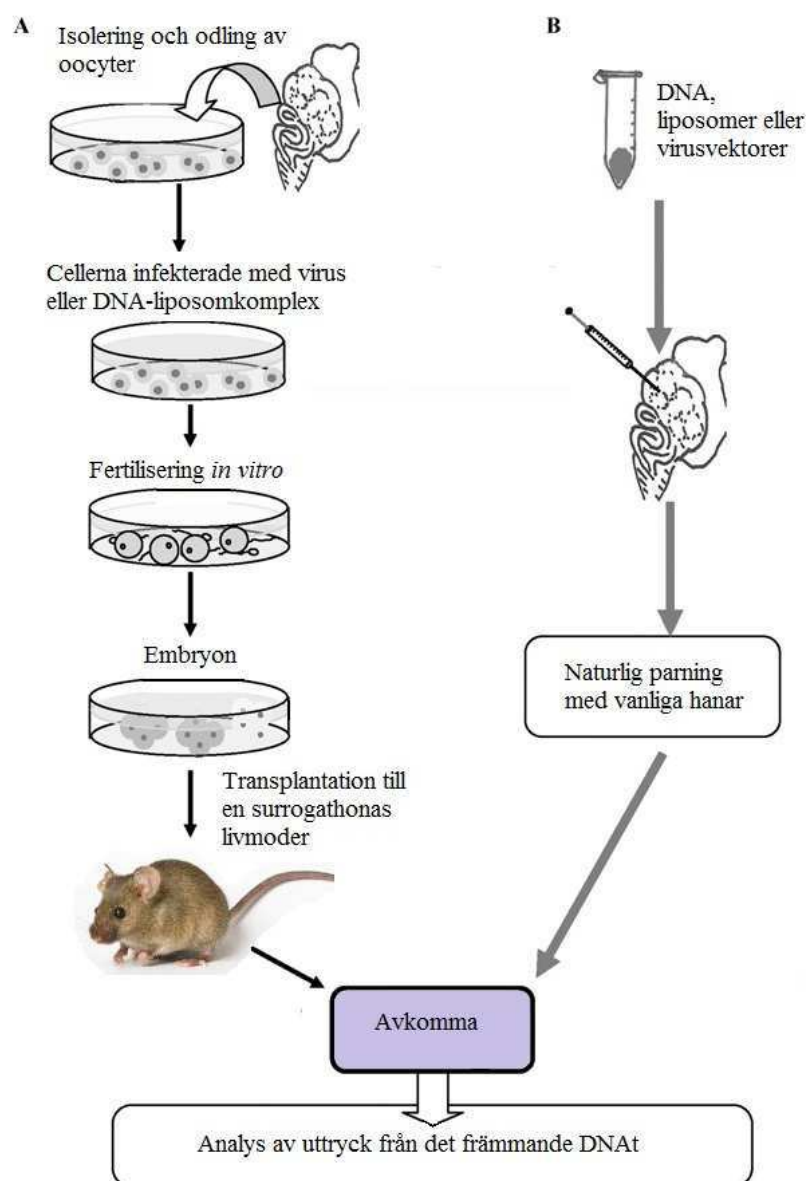
### Genöverföring med honliga könsceller

Honliga könsceller har inte undersökts i lika stor utsträckning som hanliga. Det var först år 2000 som ett spanskt forskarlag med Carballada i spetsen undersökte möjligheterna att få äggceller att ta upp främmande DNA (Carballada *et al.* 2000). Deras studie visade att äggceller som ännu inte mognat i äggstocken lätt kunde infekteras med främmande DNA inneslutet i en lipidbubbla (Figur 3A). Mogna äggceller som lämnat äggstocken var svårare att infektera då de har ett skyddande yttre lager, zona pellucida. För att kunna föra in främmande DNA var de tvungna att först behandla det mogna ägget med en syralösning för att zona pellucida skulle bli permeabelt för lipidbubblan (Belizário *et al.* 2012).

Resultatet av Carbedallas försök var att omogna ägg var lättare att infektera med främmande DNA. I samtliga försök kunde de konstatera att äggen innehöll nya DNA-fragment. De ägg där zona pellucida hade blivit manipulerad var dock besvärliga att hantera då de kladdade fast överallt och risken för att skada äggen var hög (Carballada *et al.* 2000).

En senare studie på honliga könsceller visar att det räcker med att injicera en lösning med plasmider innehållandes främmande DNA direkt in i äggstocken för att omogna ägg skulle ta upp DNAt (Figur 3B). För att plasmiden skulle kunna ta sig igenom cellmembranet behövdes en elektroporering av äggstocken först (Sato *et al.* 2003). Elektroporering innebär att ett svagt elektriskt fält läggs över cellen och orsakar att porerna i cellväggen tillfälligt öppnas så plasmiden kan ta sig in.

Ytterligare en studie som stöder resultatet att äggceller kan ta upp plasmider som injicerats i äggstocken har gjorts av Yang *et al.* Då bevisades att de transgena äggcellerna dessutom kan ge upphov till transgen avkomma (Yang *et al.* 2007). Studien visade även att det går att göra en injektion direkt in i äggstocken utan att det påverkar fosterutvecklingen *in vivo*. I Yangs studie användes inte elektroporering av äggstockarna, men resultatet blev ändå detsamma som i Satos studie där elektroporering användes.



**Figur 3.** Genöverföring med honliga könsceller. **A:** Oocyter skördas och odlas. Sedan infekteras de med virusvektorer eller DNA-liposomkomplex innan de fertiliseras *in vitro*. De resulterande embryona transplanteras till en surrogathona och utvecklas i livmodern. **B:** DNA, DNA-liposomkomplex eller virusvektorer injiceras direkt in i äggstocken på musen. Sedan sker naturlig parning med normala hanar. Omarbetad från ett original av Niu & Liang (2008).

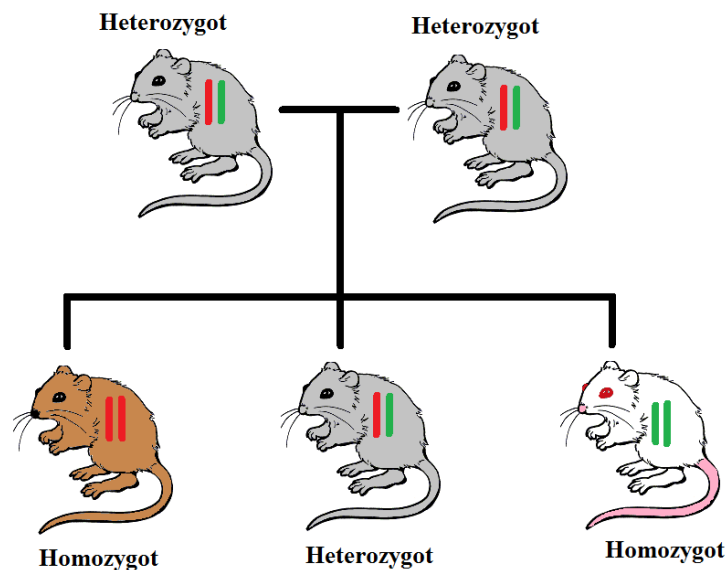


## Gentargeting

Vid gentargeting används pluripotenta stamceller från embryon som mottagarcell för det inkommande DNA:t (Evans & Kaufman 1981). Målet med gentargeting är att skapa organismer med specifika mutationer och transgena könsceller (Capecchi 1989a). När mottagarkromosomen har runt 5 kilobaspar gemensamt med det inkommande DNA-fragmentet sker en hög grad av homolog rekombination mellan dem. Dock kan inkommande DNA ha så lite gemensamt som 25-50 baspar och homolog rekombination kan ändå ske. Homolog rekombination sker främst i cellcykelns S-fas, då DNA-replikationen sker. När DNA sedan packas ihop i kromosomer under senare cellcykelfaser förhindras rekombination på grund av DNAs supercoiling (Capecchi 1989b).

När en vektor introduceras i en embryonal stamcell med hjälp av mikroinjektion eller elektroporering kommer DNA-sekvensen oftast infogas slumpmässigt i kromosomen (Smithies *et al.* 1985). I vissa celler kan dock det introducerade DNA:t para med en liknande sekvens i kromosomen och föra över mutationen via homolog rekombination. De behandlade cellerna undersöks och man bestämmer vilka som fått den önskade mutationen på rätt ställe i genomet. De önskade cellerna klonas och förs sedan in i ett embryo som inplanteras i en surrogathona. Ungarna som föds blir så kallat chimära. Chimärism innebär att alla celler inte kommer från den enskilda äggcellen. Eftersom nya celler har lagts till i det tidiga embryonalstadiet består avkomman av celler från två individer. Detta kan jämföras med en genetisk mosaik, då alla celler har sitt ursprung i den enskilda befruktade äggcellen (Capecchi 1989a). Dessa chimära avkommor är heterozygoter för mutationen, de har en muterad allel och en vanlig. De kan då korsas med sina heterozygota syskon och skapa en avelslinje med individer som är homozygota för mutationen (Figur 4: Capecchi 1989a).

I artikeln menar Capecchi också att gentargeting skulle kunna användas för att ändra defekta vävnader hos till exempel människan. Att man skulle kunna byta ut defekta gener mot fungerande, så kallad genterapi. År 2007 fick ovan nämnda Mario Capecchi, Martin Evans och Oliver Smithies Nobelpriset för deras utveckling av tekniken för att skapa genspecifika modifieringar hos möss genom gentargeting och homolog rekombination (Belizário *et al.* 2012).



Figur 4. Två heterozygota individer kan paras och ge upphov till både homozygot och heterozygot avkomma.

## Lentivirusvektorer

Användandet av lentivirusvektorer startade redan med Jaenisch *et al.* på 70-talet. Som beskrivet i tidigare avsnitt använde de sig av Moloney murine leukemivirus som injicerades direkt in i musembryon (Jaenisch *et al.* 1975).

Det finns flera virusbaserade vektorer som framställts för genmodifiering. Något de flesta har gemensamt är att de inte integreras i kromosomen hos värdcellen (Park 2007). Lentivirus har däremot visat sig framgångsrika som vektorer eftersom de har alla nödvändiga komponenter för att integreras och uttryckas som en del av värdgenomet (Park 2007). Lentivirus är en undergrupp av familjen retrovirus, dit bland annat HIV hör (Nationalencyklopedin 2013). De är RNA-virus som använder sig av enzymet omvänt transkriptas (eng. reverse transcriptase), så kallat eftersom det kan skapa DNA av RNA istället för den normala transkriptionsprocessen i cellen som gör om DNA till RNA. Det omvända transkriptaset kan därmed inkorporera virusets RNA till mottagarcellens egna DNA (Encyclopædia Britannica 2013). Lentivirus är långsamt verkande och kan behålla ett genuttryck i värdcellerna längre än en vanlig plasmid (Park 2007). Dock måste cellerna vara i delningsfasen av cellcykeln för att lentiviruset ska inkorporeras (Niu & Liang 2008).

En fördel med lentivirusvektorer är att RNA:t snabbt inkorporeras i värdcellens DNA. Detta är viktigt för att undvika mosaikism hos de infekterade cellerna. Mosaikism uppstår dock ändå, om än i mindre utsträckning än med mikroinjektion (Park 2007). Tekniker som använder lentivirus går ut på att forskaren antingen inkuberar äggceller utan zona pellucida eller tidiga embryon tillsammans med virusvektorn. Det är även möjligt att injicera vektorn direkt in i cytoplasman på zygoten (Park 2007). Denna typ av mikroinjektion är enklare än den pronukleära mikroinjektionen då injektionen sker i cytoplasman och inte i cellkärnan (Yang *et al.* 2007). Effektiviteten i användandet av lentivirus är hög. Studier visar en hög grad av lyckade försök på till exempel gris. Hoffman *et al.* rapporterade 2003 om 70 % lyckade försök på grisar (Hoffman *et al.* 2003). För möss är andelen något lägre, en rapport om ca 30 % lyckade försök publicerades av Yang *et al.* 2007.

## Transposoner

Transposoner är kortare DNA-sekvenser (400-40 000 baspar) som kan förflytta sig runt inom ett genom. De kallas också för ”hoppande gener” och används på samma sätt som plasmider. Alla kända transposoner kodar för enzymet transposas som hjälper dem att flytta sig igenom att både klyva DNA-strängen på sidorna om transposonen samt att klyva DNA på den nya insertionsplatsen. En annan typ av transposon är retrotransposonen som istället för att bara flytta DNA-sekvensen gör en kopia av sig själv som sätts in på en annan plats i genomet. Detta ger flera upprepade sekvenser med samma DNA på olika platser i genomet (Britannica Online Encyclopedia 2013).

Transposoner upptäcktes först i majs (*Zea mays ssp. mays*) av Barbara McClintock på 1930-talet, något som gav henne Nobelspriset i fysiologi eller medicin 1983 (Nobelprize.org 2013). Idag används transposoner för att integrera nytt DNA i en kromosom. Det fungerar precis som med en plasmid, med skillnaden att forskare har designat transposoner så att de kan plockas ut från genomet igen utan att lämna några spår. Flera färdiga transposoner finns att köpa, till exempel PiggyBac och SleepingBeauty (Nguyen & Xu 2008).

### *SleepingBeauty*

*SleepingBeauty* uppfanns 1997 av Ivics och hans team. Det var en transposon som de tagit från fisk och provat på möss och mänskliga celler med lyckade resultat (Ivics *et al.* 1997).

Transposonens grund kommer från bakterier, vilket ger transposonen en kort livstid i eukaryota celler som rensar bort igen de främmande sekvenserna. Det är dessutom fortfarande svårt att få transposonen att infektera en specifik vävnad (Aronvich *et al.* 2011).

### *PiggyBac*

PiggyBac har blivit populärt att använda på eukaryota celler. Den används så att transposonen amplifieras med PCR, sedan sätts önskade DNA-sekvenser in i mitten av transposonen, som bildar ett cirkulärt DNA (likt en plasmid). Sedan inkuberas PiggyBac tillsammans med cellerna som ska ta emot transposonen. Vätskan elektroponeras och sedan får cellerna vila någon dag innan selektionsprocesser tar vid för att se vilka celler som har fått transposonen integrerad (Ding *et al.* 2005). I Dings studie hade cirka 30 % av F<sub>0</sub>-generationen, det vill säga den första generationen, fått PiggyBac integrerad i kromosomen. Metoden är relativt effektiv och det är en fördel att forskaren kan ta bort transposonen igen utan att förstöra genomet. Inga mikroinjektioner behövs och både PiggyBac och Sleepingbeauty är dessutom relativt billiga (Aronvich *et al.* 2011).

### **Villkorliga mutanter**

För att förstå genernas uttryck och funktion är det användbart att studera vad som händer om vi ändrar genen eller helt stänger av den. Först då kan dess funktion klarläggas genom att undersöka vad som inte fungerar normalt när genen har ändrats. Tidigare har forskare fått undersöka organismer som muterat naturligt. De har helt fått gå på vilken fenotyp organismen uppvisar och utifrån det studera generna. Innan genmodifieringstekniken fanns det bara ett fåtal sätt att få dessa muterade organismer: Antingen avla till exempel möss och vänta på att en muterad, annorlunda mus skulle födas, eller att snabba på mutationsprocessen genom att utsätta organismen för mutagena ämnen eller strålning (Nguyen & Xu 2008). Därför har gentargeting fått ett så stort genomslag. Nu kan forskare välja vilken gen som ska muteras och även hur den ska ändras (Rajewsky *et al.* 1996).

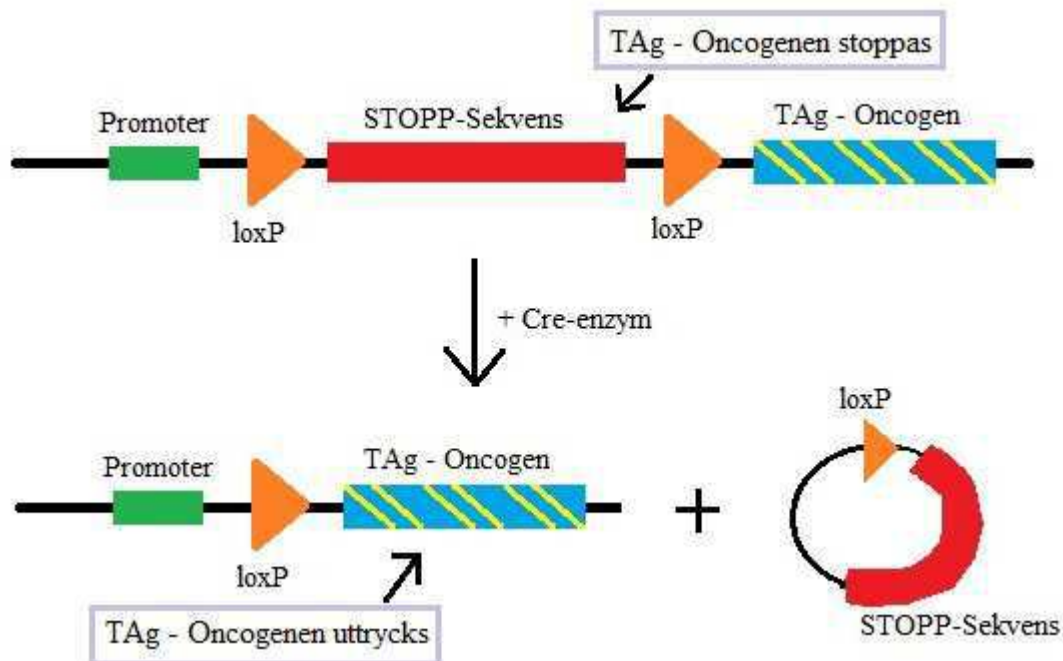
Något som är väldigt användbart när man vill studera gener vars uttryck är essentiella för organismen är att skapa villkorliga mutanter (eng. conditional mutants). Eftersom en mutation eller deletion av en essentiell gen skulle ta livet av organismen så är de väldigt svåra att studera. Vanligt i bakterieforskningen är att skapa temperaturkänsliga mutanter. Detta innebär att mutationen bara visar sig vid en viss temperatur. Forskaren kan då välja när genen ska uttryckas (Rajewsky *et al.* 1996).

### *Cre/loxP – En villkorlig mutant*

När en gen eller ett DNA-fragment har en loxP-sekvens på vardera sida om sig så kan Cre, som är ett rekombinas-enzym specifikt för just loxP, komma in och klippa ut en av loxP-siterna samt DNA-fragmentet som satt mellan loxP-siterna. Detta ger en deletion. Cre-enzymet kan tas in i cellen och uttryckas via en plasmid eller så paras ett djur med två loxP-siter samt DNA-sekvensen som önskas studeras med en artfrände som har ett dominant uttryck för Cre-enzymet (Rajewsky *et al.* 1996).

Cre/loxP-plasmiden testades i en studie av Lakso med kolleger. De skapade en transgen mus med gensekvensen TAg som orsakar cancer på ögats lins (TAg - Tumor Antigen). Mellan promotern (mA) för genen och själva TAg-oncogenen lades en stopp-sekvens flankerad av loxP-sites. Mössen med genotypen -mA-loxP-STOPP-loxP-TAg- korsades med möss som hade genotypen -mA-Cre-. Samtliga avkommor fick cancer i ögonen då genotypen -mA-Cre- gjorde att sekvensen -loxP-STOPP- togs bort. TAg blev då aktivt och orsakade sjukdom (Figur 4: Lakso *et al.* 1992).

Systemet med Cre/loxP kan alltså användas antingen direkt med hjälp av en plasmid som uttrycker Cre, eller med hjälp av korsning med ett djur som har genotypen Cre. Cre/loxP-systemet kan användas både för att skapa deletioner av hela gener eller att stänga av gener (Lakso *et al.* 1992).



**Figur 5.** Schematisk bild över Cre/loxP-systemet där den övre DNA-sekvensen innehåller en stoppsekvens som förhindrar att TAg-oncogenen uttrycks. När sedan Cre-enzymet tillsätts klipps stoppsekvensen ut tillsammans med en av loxP. TAg-oncogenen kan nu uttryckas och ge sjukdom.

### Mutationer med ENU

En av de absolut tidigaste genmodifieringsteknikerna var att utsätta DNA för muterande ämnen såsom radioaktiv strålning, UV-strålning samt interkalerande eller alkylerande ämnen. Vanligen gick behandlingen till som följer: Mushanar eller -honor behandlades med ett misstänkt mutagent ämne. Sedan fick de para sig med artfränder. Gravida honor avlivades i slutet av dräktigheten och fostren samlades in. Man räknade levande foster, döda foster och zygoter som dött strax efter befruktning. Antalet dödliga mutationer kunde användas för att beräkna mutationsfrekvensen och därmed avgöra huruvida ämnet är mutagent eller inte (Guénet 2004).

N-etyl-N-nitrosurea (ENU) är ett populärt alkylerande ämne (NCBI 2013) då det inte är speciellt toxiskt för cellen jämfört med andra ämnen som har liknande mutagena effekter. En mushane kan få sina spermatogonier utsatta för ENU, vilket resulterar i att spermieproduktionen avstannar under 10-13 veckor. De allra flesta spermatogonier har dött, och de som är kvar har troligen fått mutationer. När spermieproduktionen sedan kommer igång igen kommer alla spermier att komma från dessa muterade spermatogonier (Guénet 2004).

ENU är bra på det vis att det skapar mest punktmutationer (Russel & Montgomery 1982), ungefär en punktmutation per 1-2 megabaspar. Vanligen resulterar mutationer i en gen att den förlorar sitt uttryck helt, men med ENU är det mer troligt att mutationerna blir hypomorfa, det vill säga att funktionen hos proteinet är delvis bevarat. Dessa mutationer är ofta lika dem som

ger människan sjukdomar (Nguyen & Xu 2008). Sedan får forskare avgöra baserat på djurets fenotyp om en användbar mutation har skett. En mutation som ger fenotyper som liknar den hos en mänsklig sjukdom kan till exempel vara värd att studera närmare.

### **Nukleastekniker**

Nukleasteknikerna har utvecklats för att skapa specifika dubbelsträngsbrott på DNAt hos mottagarcellen. När ett dubbelsträngsbrott sker måste det lagas med hjälp av homolog rekombination och då har eventuella utifrån kommande genfragment och DNA-sekvenser chansen att inkorporeras i värdcellens DNA. Nedan följer ett par av de mest kända nukleasteknikerna.

#### *Meganukleaser*

Meganukleaser är en kombination av DNA-bindande endonukleaser som från början kommer från det målsökande endonukleaset *ICreI*. Endonukleaset skapar dubbelsträngsbrott vid specifika DNA-sekvenser i genomet. Det finns idag över 16.000 olika meganukleasproteiner som känner igen olika klyvningsställen (Le Provost *et al.* 2010). Igenkänningsplatserna för klyvning i genomet finns dock bara var  $10^6$  baspar, så även med 16.000 olika meganukleaser att välja mellan är det långt mellan möjliga klyvningsställen i genomet (Le Provost *et al.* 2010). Detta är något som går att komma runt med hjälp av zinkfingernukleaserna.

#### *Zinkfingernukleaser*

Zinkfingernukleaser har visat sig väldigt användbara för att få en mer specifik integration av främmande DNA in i kromosomen. Zinkfingernukleaser är endonukleaser som designats för att känna igen en specifik DNA-sekvens (Urnov *et al.* 2010). Sätter man sedan ihop zinkfingernukleaset med ett endonukleas som till exempel *FokI* orsakas ett dubbelsträngsbrott på DNA som sedan måste lagas genom homolog rekombination (Scheuring Vanamee *et al.* 2001). Detta gör att nya homologa sekvenser som liknar den utvalda sekvensen får chansen att integreras samtidigt under lagningen av dubbelsträngsbrottet. *FokI* har en N-terminal igenkänningsdomän samt en C-terminal klyvningsdomän. Det klyver DNA specifikt vid 9 och 13 nukleotider från DNA-sekvensen 5'-GGATG-3' (Scheuring Vanamee *et al.* 2001), vilket gör det möjligt att styra precis vart den nya sekvensen ska sättas in. Zinkfingernukleaserna är på så vis mer specifika än meganukleaserna (Le Provost *et al.* 2010). Ett annat endonukleas som forskare specialgjort är TALENs som endast klyver på ett specifikt ställe i genomet. TALEN står för "Transcription activator-like effector nukleases", ungefär: Transkriptions aktiverings-liknande effektor nukleaser (Hockenmeyer *et al.* 2011). Dessa är jämförbara med zinkfingernukleaserna, även om de inte utvecklats lika långt än.

### **Diskussion**

Det finns stora variationer mellan de olika teknikernas användarvänlighet och effektiviteten med avseende på andelen lyckade försök. På följande sida återfinns en sammanställning av de olika teknikerna som idag används för genmodifiering av däggdjur (Tabell 1) samt hur specifika, användarvänliga och effektiva metoderna är. Effektiviteten avser hur stor andel av avkomman som fått sina gener modifierade i varje försöksserie. Andelarna tar ingen hänsyn till huruvida avkomman är homozygot eller heterozygot för genmodifieringen. Är avkomman heterozygot för modifieringen kommer den behöva korsas med ett kullsyskon för att skapa avkomma som är homozygot den aktuella allelen.

Tabell 1. Jämförelse av egenskaper hos gentekniker utövade på däggdjur.

<b>Teknik</b>	<b>Specificitet</b>	<b>Effektivitet (%)</b>	<b>Teknisk svårighetsgrad</b>
Pronukleär Mikroinjektion	Ospecifik	Låg (<1-20 %)*	Hög
Genöverföring med hanliga könsceller	Ospecifik	Medel (>20 %)²	Medel (Operationskunskaper)
Genöverföring med honliga könsceller	Ospecifik	Hög (>50 %)²	Medel (Operationskunskaper)
Lentivirusvektor	Ospecifik	Hög (31-70 %)§	Medel
Gentargeting	Specifik	N/A	Medel
Transposoner	Specifik	Medel (<30 %)⁵	Medel
ENU	Ospecifik	Hög (>60 %)⁶	Låg
Nukleastechniker	Specifik	Medel (~20 %)⁷	Medel

\*Det högre talet för möss, det lägre för övriga däggdjur (Le Provist *et al.* 2010 , Robl *et al.* 2007)

² Niu & Liang 2008

§ Det högre talet för gris, det lägre för mus. (Hoffman *et al.* 2003, Yang *et al.* 2007)

⁵ Ding *et al.* 2005

⁶ Russel & Montgomery 1982

⁷ Le Provist *et al.* 2010

### **Pronukleär mikroinjektion och virala vektorer**

Den mest frekvent använda tekniken idag är trots svårighetsgraden och kostnaden fortfarande pronukleär mikroinjektion. Tekniken är mest utbredd då det var det första rapporterade tillvägagångssättet för att skapa transgena djur i laboratoriemiljö (Wall 2001). Eftersom mest studier har gjorts på denna metod finns mer information att tillgå angående utförandet, hur stor andel av försöken som lyckas och vilka kostnader det handlar om jämfört med andra tekniker. Denna trygghet gör att de flesta forskare fortfarande använder sig av metoden, trots svårigheterna och den låga andelen lyckade försök. Virala vektorer har en del fördelar gentemot pronukleär mikroinjektion. Det faktum att injektionen med virala vektorer görs in i cytoplasman och inte direkt in i cellkärnan gör denna metod avsevärt mycket lättare att utföra. Metoden ger ett högre antal positiva embryon med bättre embryonalutveckling då kärnan lämnas orörd. Mosaikismen som sker vid pronukleär mikroinjektion kan till stor del undvikas, om än inte helt. Eftersom könscellerna kan infekteras direkt *in vivo* är förfarandet troligen det allra enklaste och billigaste då vanlig parning kan användas (Carballada *et al.* 2000).

Användandet av virala vektorer har dock fortfarande sina nackdelar. För att vektorn ska integreras så snabbt som möjligt i värdgenomet kan vektorns skyddande lager förstöras innan injektionen (Yang *et al.* 2007). Görs denna manöver innan kan vektorn integreras snabbare i värdgenomet, något som ger mindre mosaikism hos avkomman. Dock måste vektorerna utan skyddande lager injiceras i utrymmet mellan zona pellucida och äggets membran istället för direkt i cytoplasman. Detta ger en mycket hög procent lyckade genöverföringar, uppemot 97 % har rapporterats (Yang *et al.* 2007) samtidigt som metodens enkelhet går om intet när en mer specifik injektion krävs.

### **Könsmedierad genöverföring**

Användandet av könsmedierad genöverföring verkar mycket lovande för framtiden. Det enkla tillvägagångssättet och den relativt höga framgångsgraden för framför allt könsmedierad genöverföring med honliga könsceller talar för att denna teknik kommer kunna bli en effektiv,

billig metod att skapa transgena däggdjur. Naket DNA kan användas, eller vektorer som till exempel retrovirus, transposoner eller nukleaser som kan ge en specifikare integration av DNA i värdgenomet. Används vektorer måste de dock först skapas, vilket höjer svårighetsgraden något gentemot att bara använda den nakna DNA-produkten direkt från PCR och inkubera det tillsammans med spermier (Niu & Liang 2008). Hanteringen av äggceller med intakt zona pellucida är något besvärlig, försök har gjorts med att injicera vektorer och plasmider direkt in i äggstocken, men inga försök med naket DNA har gjorts. Metoderna för användandet av både hanliga- och honliga könsceller är dock billigt och ger ett stort antal avkommor som ökar chanserna för att åtminstone någon eller några ungar i varje kull ska födas med transgent DNA. Tekniken kräver endast basala operationskunskaper och kunskap inom generella molekylärbioologiska metoder (Niu & Liang 2008).

### **ENU**

Att använda det alkylterande ämnet ENU är en väldigt snabb och enkel teknik för att skapa muterade möss eller andra däggdjur. Arbetet kommer först senare, när mössen är födda (Augustin *et al.* 2005). ENU i hög dos ger många mutationer, ofta över 60 % av utsatta embryon visar någon muterad fenotyp (Russel & Montgomery 1982) men det är tidskrävande och dyrt att bestämma vilken gen som muterats på alla udda fenotyper som framställs. Detta kräver mödosamt avlande, kartläggande och sekvenserande av alla mutationer (Augustin *et al.* 2005). Eftersom flera mutationer ofta skett i samma genom måste alla punktmutationer hittas och det måste bestämmas vilken mutation som ger upphov till fenotypen och huruvida det är flera mutationer som samverkar för att ge den givna fenotypen. Dock behöver forskarna inte ha någon förkunskap om genomet som ska studeras, något som är en förutsättning för att använda till exempel homolog rekombination för att skapa mutationer. Detta är med andra ord en billig metod att skapa intressanta mutationer, även om arbetsbördan är större (Guénet 2004).

### **Gentargeting**

Gentargeting utförs med olika plasmider och vektorer. Det finns stora utvecklingsmöjligheter inom området och framsteg inom skapandet av specifika mutationer kommer förhoppningsvis inom en snar framtid. Utvecklingen av transposoner, nukleastechniker och virala vektorer kommer göra att tekniker som könsmedierad genöverföring och pronukleär mikroinjektion kommer bli effektivare. Idag är metoder inom gentargeting inte så utvecklade, men transposoner som PiggyBac och SleepingBeauty har redan gjort att gentekniken tagit ett stort steg framåt i avseende på att få specifika mutationer inom genom. Ett problem med transposonerna kan vara att genom ofta har flera likadana gener, något som kan leda till att transposonerna integreras i flera kopior per genom. Detta är även ett problem med användandet av zinkfingernukleaser. Mer komplexa genom har flera kopior av samma eller liknande gener. Detta gör att nukleaserna kan ge dubbelsträngsbrott även där det inte är önskat (Urnov *et al.* 2010).

### **Slutsats**

Den transgena tekniken är fortfarande inte perfekt. I varje experiment är det bara ett litet antal djur som faktiskt får den önskade förändringen i sitt DNA (Miao 2013). Den äldsta tekniken pronukleär mikroinjektion kommer troligen snart att vara utdaterad och ersatt av enklare och effektivare tekniker såsom könsmedierad genöverföring. Utvecklingen av plasmider och transposoner som bär det inkommande DNA:t in i värdcellen kommer utvecklas vidare, bli mer effektivt och mer specifikt. Det kommer förhoppningsvis snart finnas fler färdiga produkter på marknaden där önskad DNA-sekvens endast behöver amplifieras med PCR och sedan sättas in i den annars färdigproducerade plasmiden/transposonen.

När den transgena tekniken har utvecklats ytterligare kommer oändliga möjligheter för sjukdomsforskning, läkemedelsframställning och livsmedelsproduktion att presenteras. I framtiden kommer det snarare vara frågan om vad som är etiskt försvarbart som sätter gränsen för vad vi kan göra med ett genom. Gentekniken kommer inte bara att rädda mängder av människoliv genom att till exempel bota sjukdomar och nära en växande världsbefolkning, den kommer också att kunna förutbestämma hur en människas genom ser ut innan människan ens är född. Att modifiera mänskliga genom ligger troligen långt i framtiden, men redan med dagens tekniker har vi kommit en bra bit på väg.

## Tack

Tack till min handledare Anna Suarez Larsson och mina kursare Julia Jäderqvist och Oscar Cidon Sporrang för all konstruktiv feedback och förbättringsförslag under arbetets gång. Ett jättetack också till min pappa Peter Bäckström för all hjälp med strulande teknik.

## Referenser

- Aronvich EL, Mclvor RS, Hackett PB. 2011. The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Human Molecular Genetics* **20**: 14–20.
- Augustin M, Sedlmeier R, Peters T, Huffstadt U, Kochmann E, Simon D, Schöniger M, Garke-Mayerthaler S, Laufs J, Mayhaus M, Franke S, Klose M, Graupner A, Kurzmann M, Zinser C, Wolf A, Voelkel M, Kellner M, Kilian M, Seelig S, Koppius A, Teubner A, Korthaus D, Nehls M, Wattler S. 2005. Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis. *Mammalian Genome* **16**: 405–413.
- Belizário JE, Akamini P, Wolf P, Strauss B, Xavier-Neto J. 2012. New routes for transgenesis of the mouse. *Journal of Applied Genetics* **53**: 295–315.
- Blanchard KT, Boekelheide K. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis *in vivo*. *Biology of Reproduction* **56**: 495–500.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. 1971. Uptake of Heterologous Genome by Mammalian Spermatozoa and Its Transfer to Ova through Fertilization. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **68**: 353–357.
- Brinster RH, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RR. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **82**: 4438–4442.
- Britannica Online Encyclopedia. 2013 'transposon'. WWW-dokument 2013-11-20: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/603176/transposon>. Hämtad 2013-11-20.
- Brändén Henrik. 2011. När människan förändrar andra arter – en titt i verktygslådan. Jonas Förare (red.). *Genteknik som tar skruv*, ss 21-38. Edita AB, Stockholm.
- Capecchi MR. 1989a. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, **5**: 70–76.
- Capecchi MR. 1989b. Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288–1292.
- Carballada R, Degefa T, Esponda P. 2000. Transfection of mouse eggs and embryos using DNA combined to cationic liposomes. *Molecular Reproduction and Development*, **56**: 360–365.
- Chan AW. 1999. Transgenic Animals: Current and Alternative Strategies. *Cloning* **1**: 25–46.



- Chen H-L, Yang H-S, Huang R, Tsai H-J. 2006. Transfer of a foreign gene to Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) by direct testis-injection. *Aquaculture* **253**: 249–258.
- 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**: 473–483.
- Encyclopædia Britannica. 2013. Retrovirus. WWW-dokument 2013-11-28: <http://www.britannica.com.ezproxy.its.uu.se/EBchecked/topic/500146/retrovirus>. Hämtad 2013-11-28.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154–156.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic Transformation of Mouse Embryos by Microinjection of Purified DNA. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **77**: 7380–7384.
- Guénet J-L. 2004. Chemical mutagenesis of the mouse genome: an overview. *Genetica* **122**: 9–24.
- Hockenmeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. 2001. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology* **29**: 731-734.
- Hoffman A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. 2003. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *European Molecular Biology Organization*. **4**: 1054-1060.
- Houdebine L-M. 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *Journal of Biotechnology* **34**: 269–287.
- 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**: 501–510.
- Jaenisch R, Fan H, Croker B. 1975. Infection of preimplantation mouse embryos and newborn mice with leukemia virus: Tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **10**: 4008–4012.
- Jaenisch R, Mintz B. 1974. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **71**: 1250–1254.
- Jonák J. 2000. Sperm-mediated preparation of transgenic *Xenopus laevis* and transmission of transgenic DNA to the next generation. *Molecular reproduction and development* **56**: 298–300.
- Khoo H-W. 2000. Sperm-mediated gene transfer studies on zebrafish in Singapore. *Molecular reproduction and development* **56**: 278–280.
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Jr Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **14**: 6232–6236.

- 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**: 717–723.
- Le Provost F, Lillico S, Passet B, Young R, Whitelaw B, Vilotte J-L. 2010. Zinc finger nuclease technology heralds a new era in mammalian transgenesis. *Cell* **28**: 134-141.
- Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ. 1998. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Current Biology* **24**: 1300–1309.
- Miao X. 2013. Recent advances in the development of new transgenic animal technology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**: 815–828.
- Morner, M., 2006. Xenotransplantation åter på banan. WWW-dokument. Smittskyddsinstitutet. 2013-11-19: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/smittskydd/arkiv/2006/nr-5-2006/xenotransplantation-ater-pa-banan/>. Hämtad 2013-11-19.
- Nakanishi A, Iritani A. 1993. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Molecular reproduction and development* **36**: 258–261.
- Nationalencyklopedin, 2013. mikroinjektion | Nationalencyklopedin WWW-dokument 2013-11-08: <http://www.ne.se/mikroinjektion>. Hämtad 2013-11-08.
- Nationalencyklopedin, 2013. retrovirus | Nationalencyklopedin WWW-dokument 2013-12-03: <http://www.ne.se/retrovirus>. Hämtad 2013-12-03.
- NCBI. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR). WWW-dokument 2013-11-13: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>. Hämtad 2013-11-13.
- NCBI. 2013. N-Ethyl-N-nitrosourea. WWW-dokument 2013-11-27: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=12967#x395>. Hämtad 2013-11-27.
- Nguyen D, Xu T, 2008. The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. *Disease Models & Mechanisms* **1**: 56–66.
- Niu Y, Liang S. 2008. Progress in gene transfer by germ cells in mammals. *Journal of genetics and genomics* **12**: 701–714.
- Nobelprize.org. 2013. Barbara McClintock - Facts WWW-dokument 2013-11-20: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1983/mcclintock-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1983/mcclintock-facts.html) Hämtad 2013-11-20.
- Park F. 2007. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiological Genomics* **31**: 159-173.
- Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UAK, Müller W, Roes J, Schwenk F. 1996. Conditional gene targeting. *The Journal of Clinical Investigation* **98**: 600–603.
- Ramsoondar JJ, Macháty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. 2003. Production of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-Knockout Cloned Pigs Expressing Human  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase. *Biology of Reproduction* **69**: 437–445.
- Robl J, Wang Z, Kasinathan P, Kuroiwa Y. 2007. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology* **67**: 127–133.

- Russel LB, Montgomery CS. 1982. Supermutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse spot test: Comparisons with methyl nitrosourea and ethylnitrosourethane. *Mutation research/Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* **92**: 193–204.
- Sato M, Tanigawa M, Kikuchi N, Nakamura S, Kimura M. 2003. Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent *in vivo* electroporation. *Genesis* **35**: 169–174.
- Scheuring Vanamee É, Santagata S, Aggarwal AK. 2001. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *Journal of Molecular Biology* **309**: 69–78.
- Schlager G, Dickie MM. 1967. Spontaneous Mutations and Mutation Rates in the House Mouse. *Genetics* **57**: 319–330.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal B-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**: 230-234.
- Urnov F, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang SH, Gregory PD. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* **11**: 636–646.
- Wall R, Pursel V, Hammer R, Brinster R. 1985. Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei and nuclei. *Biology of Reproduction* **32**: 645–651.
- Wall RJ. 2001. Pronuclear Microinjection. *Cloning Stem Cells* **4**: 209–220.
- Van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A. 2002. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiological Genomics* **11**: 133–164.
- Yang S-H, Agca Y, Cheng P-H, Yang J-J, Agca C, Wing Sang Chan A. 2007. Enhanced transgenesis by intracytoplasmic injection of envelope-free lentivirus. *Genetics* **45**: 177-183.
- Yang S-Y, Wang J-G, Cui H-X, Sun S-G, Li Q, Gu L, Hong Y, Liu P-P, Liu W-Q. 2007. Efficient generation of transgenic mice by direct intraovarian injection of plasmid DNA. *Biochemical and Biophysical research communications* **358**: 266–271.