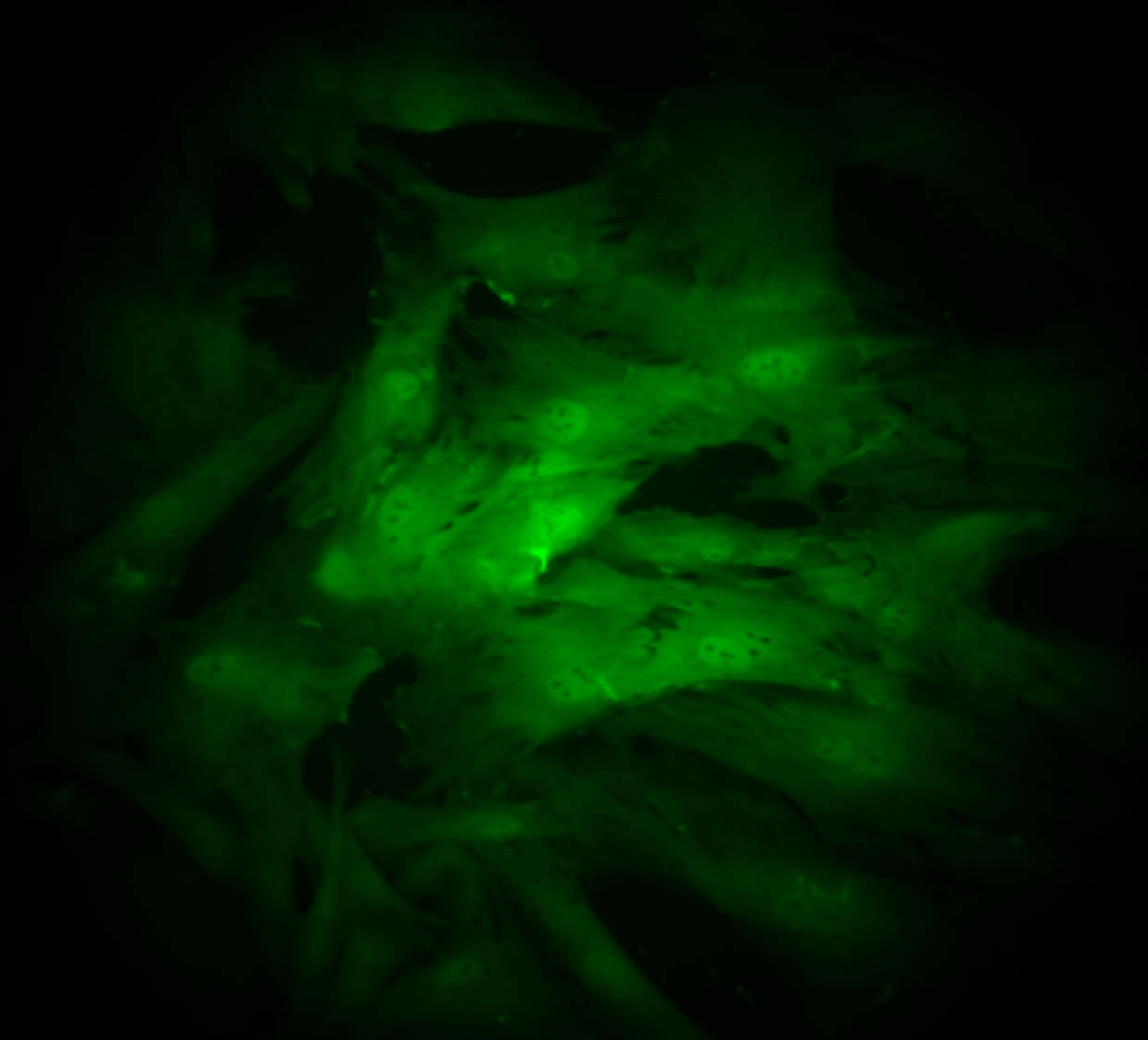


Producción de Embriones Bovinos Transgénicos  
mediante Transferencia Nuclear a partir de  
Fibroblastos Modificados Genéticamente con un  
Sistema Basado en un Transposón  
(Sleeping Beauty)



Alejandro Fili  
Río Cuarto - Marzo de 2018



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

Tesis para acceder al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES BOVINOS TRANSGÉNICOS  
MEDIANTE TRANSFERENCIA NUCLEAR A PARTIR DE  
FIBROBLASTOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE CON UN  
SISTEMA BASADO EN UN TRANSPOSÓN (SLEEPING BEAUTY)**

Mic. Alejandro Ernesto Fili  
DIRECTOR: Dr. Pablo Bosch  
CO-DIRECTOR: Dr. Gariel Amilcar Bo  
Río Cuarto, Marzo de 2018

**Comisión Asesora y Jurado:**

CASALE, Cesar Horacio.

Universidad Nacional de Río Cuarto

---

Firma

---

Aclaración

RADRIZZANI HELGUERA, Martín.

Universidad Nacional de San Martín

---

Firma

---

Aclaración

BELAICH, Mariano Nicolás

Universidad Favaloro/Universidad Nacional de Quilmes

---

Firma

---

Aclaración

**Defensa Oral y Pública**

---

Lugar y fecha

---

Calificación

*“At the heart of science is an essential balance between two seemingly contradictory attitudes--an openness to new ideas, no matter how bizarre or counterintuitive they may be, and the most ruthless skeptical scrutiny of all ideas, old and new. This is how deep truths are winnowed from deep nonsense.”*

*"En el corazón de la ciencia hay un equilibrio esencial entre dos actitudes aparentemente contradictorias: una apertura a las nuevas ideas, sin importar cuán extrañas o contradictorias puedan ser, y el escrutinio escéptico más despiadado de todas las ideas, antiguas y nuevas. Así es como las verdades profundas son acarreadas desde profundos sinsentidos.*

**- Carl Sagan.**

## Agradecimientos

*A vos.*

Todxs ustedes me conocen y saben que siempre le doy una pequeña vuelta de tuerca a las cosas, y las termino haciendo a mi manera. Una manera que la gran mayoría de las veces no es la de todo el mundo.

Me gusta ser diferente a todo el mundo. Más en las cosas personales. Y los agradecimientos de una tesis doctoral CLARAMENTE son algo muy personal.

Se tiene por costumbre ir agradeciendo unx a unx, y puntualmente, a cada una de las personas que cada quien cree conveniente. Pero para mí, termina siendo un tanto injusto de esa manera. Acotado al momento y contexto actual; y probablemente dejando de lado (tanto sea por olvido, o por omisión consciente) a gente que fue parte del proceso. Son 5 años, mucha gente pasa por la vida de una persona y la afecta en 5 años. Es muy difícil nombrar unx por unx a todxs, y no olvidarse de nadie en el proceso. Por eso mismo, yo no voy a hacerlo.

Por eso el inicio de este texto: “*A vos*”.

Cuando digo “A vos”, les estoy hablando a todxs. Vos que estás leyendo esto en persona, a vos que te llegó por internet, por una foto de un Whatsapp; como sea que te haya llegado, vos fuiste importante en menor o mayor medida. Vos fuiste participe de alguna forma en estos 5 años. Ya sea dando una mano directamente con algún experimento, o indirectamente siendo un par de oídos una tarde aleatoria. A vos te agradezco. No importa que seas familiar, amigx, alguien que me facilitó un trámite, lo que seas, este agradecimiento va para vos.

Obviamente, es necesidad hacer un párrafo agradeciendo puntualmente a ciertas personas (o personas jurídicas), entre ellas: a la UNRC por brindar el espacio, equipamiento, insumos y posibilidades necesarias para llevar a cabo este proyecto; a todos los laboratorios que participaron en conjunto con nuestro laboratorio a la hora de sacar adelante ciertos experimentos (Laboratorio del Dr. Cesar Barvero, FCQ UNRC. Laboratorio del Dr. Daniel Salomone, UBA. Laboratorio del Dr. Wilfred Kues, FLI, Mariensee, Alemania.); a mi director Pablo Bosch por siempre darme las posibilidades de crecer, a los jurados/comisión evaluadora de la tesis, por siempre darme una mano y tener excelente predisposición ante cualquier necesidad durante estos 5 años de seguimiento y a la gente del Lab por todas esas horas de trabajo en conjunto.

Por todo eso, y mucho más, *A vos* te digo: **¡Muchas gracias!**

**Indice:**

Introducción.....	i
Capítulo I: Generalidades .....	1
Capítulo II: Transferencia de Genes.....	5
I. Transferencia Directa.....	5
II. Transfección .....	6
III. Transducción.....	8
Capítulo III: Transposones y Mecanismos de transposición .....	10
Clase I: (Retrotransposones). .....	10
Clase II: (Transposones ADN) .....	10
Capítulo IV: Transposones utilizados en mutagénesis y/o transgénesis .....	13
I- Elementos P.....	13
II- Elementos Tcl.....	13
III- Transposón <i>piggyBac</i> .....	13
IV- Transposón <i>Sleeping Beauty</i> .....	14
Capítulo V: Transferencia Nuclear De Células Somáticas (TNCS) .....	19
Maduración in vitro .....	21
Enucleación .....	21
Transferencia Nuclear de células somáticas.....	22
Fusión.....	22
Reprogramación Nuclear y Activación.....	22
Cultivo embrionario.....	24
Transferencia a hembras receptoras.....	24
Eficiencia en el Clonado bovino por TNCS.....	24
Hipótesis y Objetivo General .....	26
Objetivos Específicos.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Vectores Plasmídicos .....	27
Cepas Bacteriana.....	28
Obtención de plásmidos.....	29

Purificación de ADN plasmídico, almacenado y cuantificación .....	29
Miniextracciones de ADN plasmídico.....	30
Miniextracciones a través de Kit Comercial .....	30
Midiextracciones de ADN plasmídico a través de kit comercial .....	30
Almacenado de ADN plasmídico .....	30
Estimación de la concentración .....	31
Identificación de los plásmidos de interés.....	31
Aislamiento y cultivo de Fibroblastos Fetales Bovinos (FFB).....	33
Congelado y descongelado de FFB .....	34
Transfección de FFB con agentes químicos .....	34
Agente poliamínico <i>JetPRIME (Polyplus)</i> .....	35
Diseño de las transfecciones .....	35
Recuento del número de colonias .....	37
Síntesis de los polímeros .....	37
Ensayo de Citotoxicidad-MTT .....	38
Transferencia transitoria de genes mediada por PEI.....	38
Integración estable de transgén utilizando PEI.....	39
Aislamiento de colonias Monoclonales.....	41
Extracción de ANDg a partir de líneas monoclonales .....	41
Protocolo de extracción de ADN Genómico Total.....	41
Determinación del mecanismo de integración del transgén al genoma de la célula mediante PCR .....	42
Identificación del producto de la PCR correspondiente al esqueleto plasmídico religado e inserto en el genoma, después de la transposición.....	45
Determinación de los sitios de inserción en el genoma bovino: <i>Splinkerette</i> -PCR....	45
Cuantificación absoluta del número de copias del transgén mediante qPCR.....	50
Construcción de la curva estándar para la determinación del número de copias del plásmido pT2/RMCE/ <i>Venus</i> .....	51
Relación entre el número de copias presentes en el genoma y la intensidad de Fluorescencia .....	51
Transferencia Nuclear de Células Somáticas.....	52

Día 1: Recolección de Ovocitos/Maduración.....	52
Dia 2: Activación Partenogénica química (6-DMAP) y TNCS .....	53
Vitrificación, descongelado y recuento de células de embriones .....	54
Resultados .....	56
Transformación en bacterias, amplificación y purificación de los plásmidos.....	56
Transfección de FFB, expansión y recuento de colonias .....	57
Aislamiento de líneas monoclonales a partir de colonias en placas.....	59
Extracción del ADNg de cada línea monoclonal.....	59
Determinación del mecanismo de integración del transgén al genoma de la célula mediante PCR .....	60
Determinación de la Citotoxicidad de PEIs de diferentes PM.....	62
Eficiencias de transfección para diferentes PEI.....	63
Efecto del SFB en la transfección con PEI.....	64
Generación de líneas estables con PEI .....	66
Determinación de los sitios de inserción del transposón SB en el genoma bovino <i>Splinkerette</i> -PCR.....	68
Determinación del número de copias del transgén por qPCR .....	70
Relación entre el número de copias presentes en el genoma y la intensidad de Fluorescencia .....	70
Generación de embriones bovinos transgénicos mediante TNCS .....	71
Obtención de ovocitos y Maduración In-vitro .....	71
Transferencia Nuclear de células somáticas: Método <i>Zona Free</i> .....	72
Discusión.....	75
Conclusiones.....	81
Bibliografía.....	83
Anexos .....	102
Anexo 1.....	102
Anexo 2.....	105
Anexo 3.....	106
Anexo 4.....	110
Anexo 5.....	122



## Índice de Tablas

Protocolos de transfección 2 plásmidos.....	36
Protocolos de transfección 3 plásmidos.....	36
Juegos de cebadores utilizados para las PCRs identificatorias de las inserciones.....	43
Eficiencias de transfección con PEI.....	64
Secuencias de inserción SB.....	69
Número de copias del transgen en las LM.....	70
Tasas de generación de embriones TNCS.....	73
Anexos	
Secuencias de los Oligonucleótidos complementarios utilizados.....	105
Medios de trabajo de embriones.....	108
Análisis qPCR.....	123

## Índice de Figuras

Metodologías más ampliamente usadas para generar animales transgénicos.....	3
Mecanismos de movilización de los transposones.....	11
Mecanismo general para la integración del transgen mediada por la transposasa en el genoma hospedador.....	16
Esquematación del sistema de Trasposición de dos componentes.....	17
Esquematación de los posibles destinos del esqueleto plasmídico remanente luego del evento de transposición.....	18
Metodologías más ampliamente usadas para generar animales transgénicos.....	20
Vectores plasmídicos utilizados en el trabajo.....	28
Representacion esquemática de la <i>Splinkerette</i> -PCR.....	49
Fotografía de gel de agarosa con las digestiones enzimáticas de los plásmidos.....	56
Microfotografías tomadas a colonias positivas para la expresión de ambos transgenes...	57
Gráficos correspondientes a los recuentos del número de colonias.....	58
Fotografías tomadas a Líneas Monoclonales.....	59
Fotografía tomada al gel de agarosa correspondiente a la corrida electroforética de las muestras de ANDg purificado a partir de las líneas monoclonales.....	60
Fotografía tomada a los diferentes geles de agarosa correspondientes a las corridas electroforéticas de las amplificaciones por PCR.....	61
Análisis de la inserción al azar del remanente del esqueleto después de la transposición.	62
Efecto dosis-dependiente de los polímeros catiónicos en DMEM sin SFB o pADN.....	63
Efecto de la preincubación de complejos en DMEM solo o suplementado con SFB.....	65
Esquema resumen del protocolo de trabajo con PEI.....	66
Análisis de PCR de ADN genómico de líneas celulares monoclonales transgénicas para SB.....	67
PCR cuantitativa en tiempo real.....	70
Relación entre el número de copias del transgen por qPCR y la intensidad de la fluorescencia.....	71
Procedimiento de enucleación y transferencia celular.....	72
Microfotografías en campo claro y fluorescencia representativas de blastocitos obtenidos por TNCS.....	74

Anexos:

Representación gráfica de los Vectores plasmídicos.....101

Curvas qPCR.....121

## Resumen

La transgénesis activa mediada por transposones es una herramienta valiosa para la investigación básica y aplicada en roedores de laboratorio y ganado. Los principales objetivos de la producción de ganado transgénico son: el estudio de cuestiones biológicas relacionadas con el desarrollo, genética, reproducción y enfermedad, así como la producción de proteínas recombinantes o la evaluación de xenotrasplantes para pacientes humanos. En los últimos años, se han realizado mejoras significativas para introducir y aplicar técnicas activas de transgénesis e ingeniería genética. Estos nuevos enfoques mejoran drásticamente la facilidad y la velocidad con la que las especies de ganado pueden modificarse genéticamente y permiten realizar modificaciones genéticas precisas. En este trabajo ampliamos estudios previos del laboratorio al examinar la capacidad de un transposón *Sleeping Beauty* (SB) para administrar transgenes al genoma de fibroblastos fetales bovinos (FFB), y la capacidad de estas células para el desarrollo de embriones *in vitro* en transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Independientemente de la relación utilizada para transfectar los cultivos de BFF, siempre que se incluyó una transposasa SB funcional (codificada en un vector), el número de colonias fluorescentes y resistentes a G418 fue notablemente mayor en comparación con el control respectivo sin transposasa (hasta 88 veces más). Curiosamente, todas las colonias resistentes a G418 expresaron *Venus*. La caracterización molecular de las inserciones genómicas en seis líneas celulares monoclonales se realizó mediante PCR y *splinkerette*-PCR. El análisis de PCR confirmó la presencia del transgén *Venus* en todas las líneas celulares. La *Splinkerette*-PCR confirmó 15 inserciones genómicas catalizadas por transposasa del transgén. Células individuales de un cultivo de fibroblastos transgénicos (SB) policlonales se usaron como donantes de núcleos para producir embriones TNCS. El 33% de los embriones reconstruidos alcanzó el estadio de blastocisto, y aproximadamente la mitad de los mismos expresaron *Venus*. En conclusión, la SB transposasa es capaz de transponer activamente copias monoméricas de transgenes en el genoma de células bovinas que pueden reprogramarse tras la transferencia nuclear para generar embriones morfológicamente normales que expresan el transgén de interés.

## Abstract

Active transposon-mediated transgenesis is a valuable tool for basic and applied research in laboratory rodents and livestock. 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. In this work we extend our previous research by examining the suitability of a *Sleeping Beauty* (SB) transposon-based methodology to deliver transgenes into the genome of bovine fetal fibroblasts (BFF), and the capacity of these cells to support in vitro embryo development upon somatic cell nuclear transfer (SCNT). 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 (up to 88-times higher). Interestingly, all G418 resistant colonies expressed Venus. Molecular characterization of genomic insertions in six monoclonal cell lines was performed by PCR and *splinkerette* PCR. PCR analysis confirmed presence of the Venus transgene in all cell lines. *Splinkerette* PCR confirmed 15 transposase-catalyzed genomic insertions of the transgene. Individual cells from a polyclonal SB transgenic fibroblast culture were used as nuclear donors to produce zona-free SCNT embryos. Development rate to blastocyst stage reached 33% of reconstructed embryos and about half of the blastocysts expressed Venus. In conclusion, SB transposase is able to actively transpose monomeric copies of transgenes into the genome of bovine cells, which can be reprogrammed upon nuclear transfer to generate morphologically normal embryos expressing the transgene of interest.

## Abreviaturas

6-DMAP	6-Dimetilaminopurina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA*	Albúmina sérica bovina
COCs*	Complejos cumulus-ovocitos
CPI*	Inyección intracitoplasmática
CTCF *	Fluorescencia celular total corregida
DMEM*	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DO	Densidad Óptica
ESC*	Células madre embrionarias
EGC*	Células germinales embrionarias
FFB	Fibroblastos fetales bovinos
FISH*	Hibridación in vitro fluorescente
G418	Geneticina
GFP*	Proteína Verde Fluorescente
GTE	Glucosa/Tris/EDTA
HEK	Células embrionarias de riñón humano 293
Hep G2	Human liver cancer cell line
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etansulfónico
ITR*	Repeticiones terminales invertidas
KDa	Kilodaltons
Kb	Kilopares de bases

LB	Medio Luria-Bertani
LINES*	Long Interspersed Nuclear Elements
LM	Líneas Monoclonales
LOS*	Síndrome de la cría grande
MAPK*	Mitogen Activated Protein Kinases
MIV	Maduración In Vitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MPF*	Factor Promotor de Maduración
Pb	Pares de bases
PB*	piggyBac
PBS*	Fosfato salino baferado
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
pDNA	ADN plasmídico
PEI	Polietilenimina
PM	Peso Molecular
qPCR*	PCR cuantitativa
RNAsa*	Ribonucleasa H
RT*	Retotranscriptasa inversa
SB*	Sleeping beauty
SB100x	Transposasa SB hiperactiva
SFB	Suero fetal bovino
SDS*	Dodecil sulfato de sodio
SEM*	Media del Error estandard
SINES*	Short Interspersed Nuclear Elements
SOF*	Fluido oviductal sintético
TAE	Buffer Tris Acetato EDTA
TE*	Elementos Transponibles

TN	Transferencia Nuclear
TNCS	Transferencia Nuclear de Células Somáticas
TPase*	Transposasa
UV	Ultravioleta
WOWs*	Well of the wells
WT*	Wild type

\*de sus siglas en Inglés.



# Introducción



## Introducción

### *Capítulo I: Generalidades*

Desde sus comienzos, el hombre ha seleccionado plantas y animales mediante el cruzamiento selectivo de individuos con el fin de transferir a la descendencia los caracteres deseados. La ingeniería genética permite la incorporación de genes que de otra forma sería imposible hacerlo con los métodos de mejoramiento tradicional. Los organismos genéticamente modificados, o más comúnmente denominados transgénicos, son organismos vivos (plantas, animales o bacterias) manipulados genéticamente mediante la inserción de un gen, que habitualmente no forma parte del repertorio genético de la especie. La transgénesis, es decir la introducción de un transgén al genoma de un organismo y su apropiada expresión en las generaciones siguientes, o la inactivación de la expresión de un gen endógeno; representa uno de los mayores avances biotecnológicos. La expresión ectópica de transgenes (con ganancia de función) y la disrupción de genes endógenos (con pérdida de función) han sido de gran valor para conocer más cabalmente los mecanismos responsables de la regulación génica (Grabher & Wittbrodt 2007), la función de promotores y secuencias codificantes (Haruyama et al. 2009), el desarrollo de modelos animales de enfermedades humanas (Norgren 2004; Fan & Watanabe 2003), y la producción de tejidos y órganos para xenotransplantes (MacKenzie et al. 2003; Sprangers et al. 2008; Ekser et al. 2009). También, ha permitido la generación de animales para la producción de proteínas de interés farmacológico (Ward & Nancarrow 2002; Houdebine 1994), animales de laboratorio con funciones genéticas modificadas, hasta animales de granja resistentes a enfermedades (Donovan et al. 2005; Richt et al. 2007) y/o que expresan proteínas en diferentes fluidos corporales (Cyranoski 2003). Desde una perspectiva aplicada, la finalidad de estas modificaciones es proporcionar al organismo nuevas características de utilidad para el hombre (John Clark 2002).

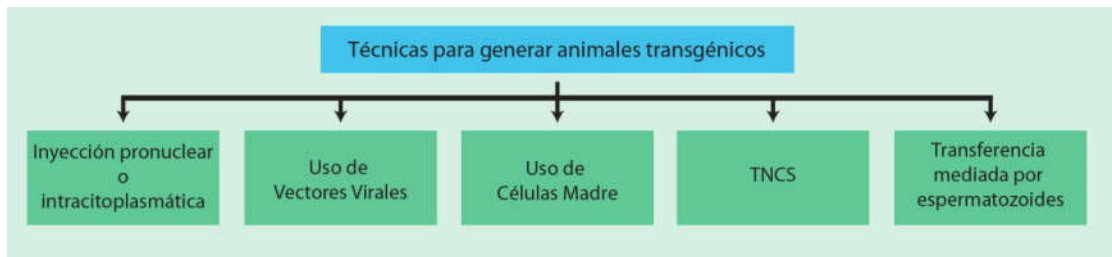
La manipulación genética de animales ha revolucionado nuestro entendimiento de la biología por hacer posible estudiar, como nunca antes se había podido hacer, la expresión y función de genes a nivel de un animal completo. Las técnicas de transferencia génica han sido usadas para producir animales transgénicos, en los cuales cada célula lleva nueva información genética o sus genes endógenos han sido modificados de alguna manera.

El transgén es una secuencia de ADN que contiene una región promotora, la región codificante para la proteína de interés y una región de señalización de poliadenilación

(señal poly-A). El gen de interés que forma parte de la construcción genética puede provenir de otro animal de la misma o distinta especie o desde una bacteria o planta. El tejido o tipo celular donde se expresa el transgén es determinado por la región promotora o las regiones reguladoras de la misma. Así, por ejemplo, si se utiliza el promotor del gen de la  $\beta$ -Lactoglobulina se podría dirigir la expresión y secreción de una proteína recombinante exclusivamente en la leche del animal transgénico.

Clásicamente, la producción de animales genéticamente modificados involucra la introducción del ADN directamente en un ovocito o embrión temprano. En ratones, la producción de animales transgénicos se ha logrado mediante el uso de células madre embrionarias, las cuales provienen de un embrión pre-implantacional y pueden contribuir a la formación de todos los tejidos del animal adulto (incluida la línea germinal), siempre que sean introducidas en un embrión hospedador en el estadio correcto (ver Figura N° 1). Estas células son pasibles de ser modificadas genéticamente, no solamente para adicionar nueva información genética sino también son capaces de realizar recombinación homóloga en alta frecuencia, lo que las hace especialmente apropiadas para ser utilizadas para el direccionamiento de genes. Este fenómeno consiste en el remplazo de un segmento exacto de genoma endógeno con un segmento exógeno de ADN en lugares preestablecidos del genoma. El direccionamiento de genes puede ser utilizado para reemplazar genes endógenos con una copia completamente no funcional (un alelo nulo) o para hacer cambios sutiles, ambos destinados al estudio de las funciones de genes endógenos. Esta misma tecnología puede ser usada con el propósito opuesto, por ejemplo, para el remplazo del alelo mutado por una copia funcional para corregir el defecto.

La posibilidad de producir animales transgénicos existe desde hace muchos años (Gordon et al. 1980). Existen diferentes técnicas que han sido propuestas con este fin, dentro de las que podemos encontrar, (1) transferencia de ADN mediada por retrovirus, (2) microinyección de genes dentro de uno de los pronúcleos del huevo fertilizado o dentro del citoplasma directamente; (3) Inyección de células madre embrionarias (ESC) o de células germinales embrionarias (EGC) genéticamente modificadas, dentro de la cavidad del blastocito; (4) transferencia de ADN foráneo mediada por espermatozoides durante la fertilización in vitro o in vivo; (5) transferencia de ADN dentro de las células y embriones, mediada por liposomas; (6) electroporación de ADN dentro del espermatozoides, huevo o embriones; (7) biolística (*gene gun*), y (8) Transferencia Nuclear de Células Somáticas, ESC o EGC (Wheeler 2003).



**Figura 1:** Metodologías más ampliamente usadas para generar animales transgénicos.  
TNCS: Transferencia Nuclear de Células Somáticas

La metodología para generar animales de granja modificados genéticamente involucraba la microinyección pronuclear, en la cual pequeñas cantidades del ADN de interés (transgén) son inyectadas en el pronúcleo masculino (Gordon & Ruddle 1981; Gordon et al. 1980; Murray et al. 1989). Aunque ampliamente aceptada y utilizada en forma rutinaria en muchos laboratorios de reproducción animal, su eficiencia es muy baja del orden 0,1-5%, dependiendo de la especie considerada (Wall et al. 1997). Al mismo tiempo, las células madre embrionarias (*ES cells*) estaban siendo desarrolladas y utilizadas para experimentos de recombinación homóloga en ratones (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981; Thomas & Capecchi 1987). Esta tecnología ha sido tremendamente eficiente para explotar la capacidad de las células madre embrionarias en contribuir a la línea germinal y realizar recombinación homóloga con ADN exógeno, permitiendo la introducción de modificaciones precisas en el genoma del animal. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de muchos laboratorios, no se han descrito aún células madre embrionarias en otras especies distintas al ratón, hombre, mono y pollo (Primrose et al. 2001), lo que ha limitado la manipulación del genoma en animales de granja. Esta situación se revirtió después del nacimiento de *Dolly*, el primer animal obtenido por transferencia nuclear de una célula adulta (Wilmut et al. 2007). Sin embargo *Polly*, la primera oveja transgénica obtenida por transferencia nuclear (Schnieke et al. 1997), *George* y *Charlie*, los primeros terneros transgénicos obtenidos de la misma forma (Cibelli et al. 1998), son los que han marcado el curso de las investigaciones en este campo. Actualmente, la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) (Campbell et al. 1996) se ha convertido en una alternativa real a la microinyección pronuclear y el resto de las técnicas ya mencionadas (Bosch et al. 1996) debido a que permite un acortamiento del tiempo entre la obtención de un animal transgénico fundador y el establecimiento de un rebaño transgénico (Houdebine 2002). Además, la transferencia nuclear abrió las puertas a la recombinación homóloga en animales de granja la cual estaba restringida al ratón mediante la tecnología de *ES cells*. Esta tecnología posibilita la eliminación de

genes endógenos en animales de granja (*gene knockout*) y/o la inserción de genes específicos en regiones transcripcionalmente activas del genoma, favoreciendo altos niveles de expresión de la proteína de interés, y luego utilizar estas células modificadas como donantes de núcleos para producir animales clonados los cuales portarán la modificación génica deseada (McCreath et al. 2000; Lai et al. 2002).

## Capítulo II: Transferencia de Genes

La transferencia de genes a células animales se puede llevar a cabo principalmente por tres vías.

### I. Transferencia Directa

Ésta comprende la introducción física de ADN foráneo directamente a la célula animal. Entre las que se encuentra la técnica de microinyección que se aplica en células en cultivo y embriones (*in vitro*) y la biolística utilizada *in vivo*, en la cual partículas metálicas cubiertas con ADN son bombardeadas a altas velocidades, mediante el uso de equipos especiales.

La microinyección pronuclear fue la primera estrategia usada para generar ratones transgénicos. La técnica se basa en inyectar ADN desnudo en el pronúcleo de un embrión al estadio de cigoto (Palmiter & Brinster 1986). Como el pronúcleo masculino es más grande, es elegido usualmente como el blanco para la microinyección. El ADN es transferido al pronúcleo a través de una fina aguja, mientras el cigoto es sostenido en posición con una pipeta de succión. Los embriones inyectados son cultivados *in vitro* hasta el estado de mórula y luego son transferidos a una madre adoptiva pseudopreñada (Gordon & Ruddle 1981). Si bien es una técnica confiable, la eficiencia es variable, ya que de 5-40% de los huevos manipulados integran el transgén. Como alternativa a la inyección pronuclear, se ha planteado la inyección del material genético, directamente en el citoplasma del embrión en el estadio de una célula (Inyección intracitoplasmática o CPI de sus siglas en inglés). La microinyección comprende una metodología simple, pero que depende mucho del equipamiento del laboratorio donde se lleva a cabo, siendo factores limitantes en el proceso los micromanipuladores, agujas para microinyección y la destreza técnica del operario.

La biolística es un método físico utilizado principalmente para transformar células vegetales, que se basa en adherir el ADN a partículas biológicamente inertes como átomos metálicos (usualmente tungsteno u oro). Acelerando el complejo ADN-partícula en un vacío parcial y colocando el tejido diana dentro del recorrido de la misma, el ADN es finalmente introducido en la célula (Gan 1989). También, partículas metálicas no revestidas pueden ser disparadas a través de una solución que contenga el ADN rodeando

las células. De esa manera, en el trayecto de la partícula el material genético es recogido y llevado hacia el interior de las células.

## II. Transfección

La transfección de ADN en células animales en cultivo, ocurre en dos etapas: el primero el ADN tiene que ganar acceso al interior de la célula, más específicamente al núcleo, seguido de la integración del ácido nucleico al genoma celular.

Muchas veces, el ADN es mantenido en el núcleo en un estado extracromosomal. Debido a que generalmente no posee origen de replicación eucariota, éste persiste por un corto periodo antes de ser degradado. Cuando ocurre esto se habla de *transfección transitoria*. Sin embargo, en una baja proporción de células, el ADN se integrará al genoma formando un nuevo *locus* que será transmitido a todas las células descendientes. Esto es conocido como *transfección estable* que puede resultar en la formación de una “línea celular” que porta y expresa el transgen. Mientras que la transfección estable es requerida para experimentos analíticos largos y para la producción de grandes cantidades de proteína recombinantes por un tiempo prolongado; la transfección transitoria es suficiente para muchos experimentos de corto plazo, tales como la determinación de la eficiencia de actividad de una secuencia promotora unida a un gen reportero.

La incorporación del ADN se realiza utilizando agentes químicos o mediante métodos físicos, como la electroporación.

- **Agentes químicos:** En la actualidad, existen diversos y numerosos agentes químicos disponibles en el mercado. Los tres más relevantes para este trabajo son: polietilenimina (PEI), la Lipofectamina y *JetPrime*.

- *Polietilenimina:* La Polietilenimina es una macromolécula orgánica con muy alta densidad de cargas positivas. Cada tercer átomo es un nitrógeno amino que puede ser protonado; siendo su estructura química protonada la siguiente:



La PEI conserva su estructura incluso a pH fisiológico; por lo que se piensa que esta simple propiedad molecular buffer a cualquier pH, le confiere a la PEI una muy buena eficiencia para promover el ingreso del DNA al interior celular.

La polietilenimina tiene la capacidad de capturar el ADN en suspensión, condensarlo sobre sí y mantener las propiedades tampón en un ambiente fisiológico. Algunos resultados previos, sugieren que esta simple capacidad molecular está relacionada a la eficiencia del agente en el proceso de transfección. En efecto, se demostró que la PEI posee alta eficiencia como vector para el transporte de oligonucleótidos y plásmidos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Schermant et al. 1995). Además, se logró empleando PEI como agente de transfección, la expresión de un gen reportero y de pequeños fragmentos de oligonucleótidos en cerebro de ratones neonatos. Estos resultados son muy alentadores, ya que ofrecen la posibilidad de usar la PEI como vector universal para transferencia de genes *in vivo* e *in vitro* (Castro & Portelles 1997).

La elección de la PEI entre otros compuestos químicos, se basa en la hipótesis que establece una relación causal entre la reserva protonable de una molécula a pH bajo y su eficiencia de transfección. Esta misma relación puede ser utilizada para el diseño de otras moléculas que combinen características tales como alta reserva protonable y capas lipídicas que ayuden a la difusión a través de la membrana.

A pesar de su elevada eficiencia de transfección y su bajo costo, uno de los grandes inconvenientes que presenta la PEI como agente de transfección es su elevada toxicidad, la cual ha sido estudiada por numerosos autores (Fischer et al. 2003; Xia et al. 2007). Debido a esto, es necesario optimizar la concentración de PEI utilizada según la línea celular, con el fin de minimizar la citotoxicidad de este agente.

Varios estudios han conectado la eficacia de la transfección y la citotoxicidad de las preparaciones de PEI a las propiedades fisicoquímicas, a saber, el peso molecular y la proporción de ramificación del polímero (Godbey et al. 1999; Mintzer & Simanek 2009; Ogris et al. 1998). En consecuencia, se han ideado diferentes estrategias (es decir, tamaño de PEI, densidad de ramificación, desacilación y conjugación con moléculas funcionales, entre otros) con el fin de reducir el daño celular generado por transfecciones con PEI. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas requieren mucha mano de obra y/o requieren etapas de purificación que consumen mucho tiempo (Jiang & Salem 2012; Kichler 2004; Sawant et al. 2012; Swami et al. 2007; Yang et al. 2008)

- *Lipofectamina*: Se trata de un agente de transfección comercial (Life Technologies) que tiene naturaleza lipídica. Su mecanismo de acción se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN al el citosol. Una de las posibles vías es la incorporación de



liposomas a la membrana. Alternativamente, el ingreso podría producirse mediante el mecanismo flip-flop el cual permite el movimiento de los lípidos de una cara a la otra de la bicapa. Es un proceso muy lento y que consume mucha energía, ya que las cabezas polares de los fosfoglicéridos deben atravesar un medio apolar. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias de incorporación, las cuales pueden alcanzar el 70 y el 90% de las células transfectadas. La mayor desventaja de este método, además de su elevado costo, es el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar las condiciones del ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son: relación entre lípido y ADN (relación de cargas), la cantidad de ADN empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

- *JetPrime*: Es un agente de transfección comercial (*Polyplus-transfection SA*, Illkirch, Francia) derivado de la PEI, por lo que posee la misma naturaleza y el mismo mecanismo de acción; aunque ha sido optimizado para que posea una mayor eficiencia y menor toxicidad.

- **Electroporación**: Es una técnica simple, rápida y económica para la introducción de genes a una amplia variedad de células procariotas y eucariotas. Esta técnica se basa en que los pulsos eléctricos de altos voltajes aplicados a una célula inducen poros en la membrana plasmática y permitir que el ADN ingrese a las células desde la solución en la que están suspendidas. Varios factores pueden afectar la eficiencia de electroporación incluyendo: temperatura, parámetros de campo eléctrico (voltaje, resistencia y capacitancia), forma topológica del ADN y varios factores de la célula hospedadora (genética, condiciones de crecimiento y tratamiento post-pulso) (Hanahan et al. 1991).

### III. Transducción:

La transducción implica el empaquetamiento del ADN exógeno dentro de un virus, el cual se usará posteriormente para infectar las células en cultivo. Muchos vectores virales se utilizan de rutina, dentro de los más comúnmente utilizados, encontramos los adenovirus, lentivirus, retrovirus y virus adeno-asociados. En los últimos años, los sistemas virales han sido utilizados para terapia génica con resultados alentadores. Productos como *Glybera* y *Gendicine* (*Amsterdam Molecular Therapeutics* y *SiBiono*

*Gene Tech Co.* respectivamente), son solo algunos ejemplos de vectores adenovirales o adeno-asociados que se encuentran en la actualidad aprobados para su uso en terapias génicas. De manera similar al caso de los vectores no virales, los vectores virales poseen altas capacidades de carga, comparable a lo de los sistemas no virales. A pesar de poseer la aprobación para su uso, la eficiencia de los mismos se encuentra discutida (Wirth et al. 2013). A pesar de sus ventajas a la hora de utilizarlos y que se trate de tecnologías ya habilitadas y comercializadas, las mismas poseen numerosas desventajas, principalmente sus altos costos de manipulación, elevada citotoxicidad, y su alta capacidad mutagénica (Kim & Eberwine 2010; Pfeifer & Verma 2001; Howarth et al. 2010).

### **Capítulo III: Transposones y Mecanismos de transposición**

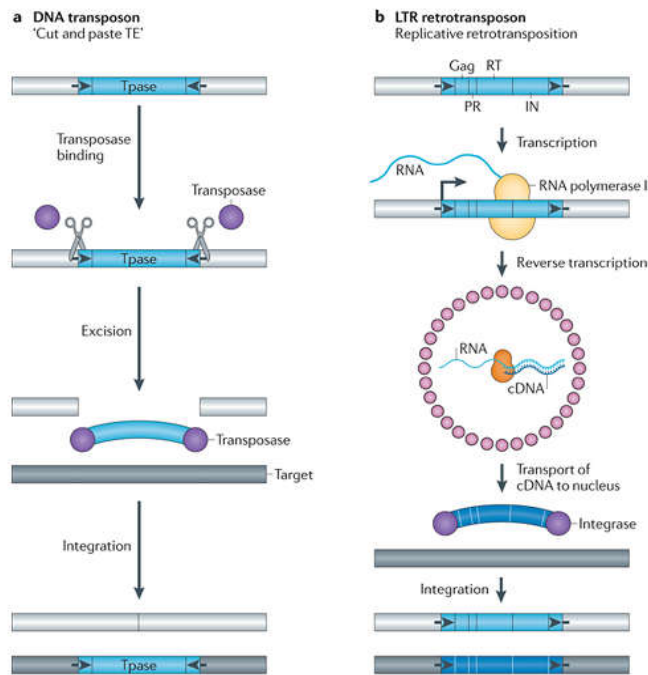
En la década del '50, Barbara McClintock en el curso de un experimento diseñado para revelar la composición genómica del brazo corto del cromosoma 9 del maíz, observó un fenómeno de rara ocurrencia y que aparecía con mayor frecuencia en el maíz: la presencia de patrones inusuales de colores en los granos. Sus estudios, condujeron a determinar que este fenómeno estaba relacionado a la presencia de secuencias genómicas que eran móviles; denominándolas loci mutables que más tarde se llamaron elementos transponibles (TE, de sus siglas en inglés *Transposable Elements*). Los mismos, poseen la habilidad de moverse de un lugar a otro en el genoma, mediante un mecanismo mediado por una enzima conocida como transposasa la cual es codificada dentro de la secuencia del propio elemento móvil (McClintock 1950). Actualmente, se sabe que dichos elementos se encuentran en la mayoría de las especies; los cuales se relacionan con la vida evolutiva de las mismas. En especies como el humano y el ratón, un 40% del genoma se encuentra representado por secuencias derivadas de ellos (Waterston et al. 2002; Lander et al. 2001). Sin embargo, en los mamíferos, estos se encuentran mutados o silenciados para impedir posibles daños en el genoma, principalmente mediante mecanismos que dependen del empaquetamiento de las regiones ricas en transposones en regiones de heterocromatina y de la participación de pequeños ARNs denominados *piwi-RNA (piRNA)*. De estos últimos, no se conoce con seguridad a través de que mecanismo producen dicho silenciamiento. (Halic & Moazed 2009).

Los elementos transponibles se clasifican en dos grandes grupos:

- I. Clase I: (Retrotransposones):** Necesitan de un ARN intermediario en el proceso, el cual será transcrito a partir del ADN presente en el genoma, por medio de la enzima codificada por el mismo transposón (Retrotranscriptasa, RT). Los ejemplos más importantes de retrotransposones son los LTR, LINEs y SINEs (Ver Figura N° 2b).
  
- II. Clase II: (Transposones ADN):** Dentro de esta clase, que se diferencia de la anterior por no generarse un ARN intermediario durante el proceso, podemos distinguir dos subclases según corten una o ambas cadenas que forman el ADN hospedador.
  - *Subclase I:* Comprende los TE clásicos que “cortan y pegan”, caracterizados por sus Repeticiones Terminales Invertidas (ITR, del inglés *Inverted Terminal Repeats*) de longitud variable. La transposición se produce cuando la enzima transposasa, que

reconoce los sitios ITR, corta ambas cadenas del ADN en los extremos del elemento insertándolo posteriormente en otro sitio del genoma (Ver Figura N° 2a). En esta subclase se encuentran distintas subfamilias, que se clasifican según el sitio de reconocimiento de la enzima transposasa. Una de ellas, es la del transposón *piggyBac*; provenientes de una especie de polilla (*Trichoplusia ni*) el cual cataliza la inserción del ADN exógeno dentro del sitio de reconocimiento TTAA presentes en el genoma hospedador (Sim et al. 2003).

- *Subclase II:* esta subclase incluye los TE que mantienen una copia del elemento transponible luego del proceso de transposición; debido a que no se escinden ambas cadenas. Los TE se movilizan por el sistema “copiar y pegar”, que implica que solo una de las cadenas de ADN del transposón se corta y se moviliza a otro sitio en el genoma, obteniendo así dos copias del elemento luego de la transposición.



**Figura 2:** Mecanismos de movilización de los transposones. **a:** Transposones DNA, **b:** Retrotransposones. Imagen tomada de (Murray et al. 1989).

La utilización de elementos transponibles en la producción de animales transgénicos, se planteó como una metodología alternativa y eficiente con respecto a otras como el uso de vectores retrovirales; los cuales poseen importantes desventajas. Una de éstas radica en que la incorporación del ADN heterólogo se produce en diferentes momentos del desarrollo embrionario, lo que causa que el transgén no se integre en todas las células somáticas o incluso en la línea germinal y, por lo tanto, no hay transmisión del transgén

a la descendencia. Además, los animales generados por este método tienen a menudo más de un sitio de integración, lo cual ocurre cuando más de una célula del embrión es transducida por el virus. Finalmente, los vectores retrovirales poseen una capacidad limitada de transportar ADN foráneo (10kb como máximo), lo cual imposibilita muchos experimentos especialmente con secuencias genómicas que pueden superar ampliamente este tamaño (Palmiter & Brinster 1985).

Los transposones han sido utilizados con fines transgénicos en modelos de animales invertebrados como *C. elegans* (Rushforth et al. 1993; Zwaal et al. 1993) y *Drosophila* (Bessereau et al. 2001; Cooley et al. 1988) con mucho éxito. El empleo de transposones en vertebrados comenzó recién en el año 1997, utilizando el sistema transposón denominado *Sleeping Beauty* (SB) (Ivics et al. 1997). Más tarde, se identificaron otros elementos capaces de catalizar una transposición eficiente en organismos vertebrados. Por ejemplo, los TEs *piggyBac* y *Minos* provenientes de insectos; los cuales han demostrado ser útiles en mutagénesis de la línea germinal en vertebrados (Ding et al. 2005).

## **Capítulo IV: Transposones utilizados en mutagénesis y/o transgénesis**

En la actualidad, son varios los transposones que se utilizan para realizar mutagénesis y/o transgénesis en células animales en cultivo. Algunos de ellos se detallan a continuación.

### **I- Elementos P:**

Los elementos P fueron inicialmente clonados de *Drosophila melanogaster* (Spradling & Rubin 1982), como uno de los responsables de digénesis híbrida en *Drosophila* (Bingham et al. 1982; Rubin et al. 1982). Pueden encontrarse entre 30 a 50 copias del elemento P distribuidas en el genoma de la mosca. El tamaño completo de estos elementos autónomos es de 2,9 kb además de dos repeticiones terminales invertidas de 31pb (Spradling & Rubin 1982)(O'Hare & Rubin 1983). Debido a que el intrón 2 del gen codificante de la transposasa solo es empalmado en la línea germinal, ya que en células somáticas este proceso se encuentra inhibido por una proteína represora de empalme, sólo produce transposasa activa en células germinales y no en células somáticas (Tseng et al. 1991; Siebel & Rio 1990). Debido al mecanismo de “corte y pegue” que emplean los elementos P, pueden funcionar como un vehículo para mutagénesis insercional y además, son importantes en el estudio del genoma de *Drosophila*. Como muchos otros transposones, los elementos P no son funcionales fuera de sus hospedadores naturales, indicando que existen factores hospedador-dependientes que son imprescindibles para la transposición (Handler et al. 1993).

### **II- Elementos Tc1:**

Estos elementos pertenecen a la superfamilia Tc1/mariner. Los primeros miembros de esta familia fueron descubiertos en 1983, como una secuencia repetida en el genoma de *C. elegans* (Emmons et al. 1983). Homólogos del Tc1 se han encontrado en los genomas de *Drosophila mauritiana*, hongos, plantas, peces, ranas e incluso en el humano (Jacobson et al. 1986; Plasterk et al. 1999). Los elementos Tc1, así como otros miembros de la superfamilia a la cual pertenecen, han sido muy utilizados en estudios genéticos en *C. elegans* y muchos otros organismos inferiores.

### **III- Transposón piggyBac:**

El transposón *piggyBac* (PB) fue descubierto inicialmente en la polilla del repollo (*Trichoplusia ni*). El PB codifica una transposasa de 594 aminoácidos (Cary et al. 1989). PB puede transportar transgenes de hasta 200 kb (Rostovskaya et al. 2012; Li et al. 2013; Li et al. 2011), la cual es una capacidad de cargo considerablemente mayor a la de los vectores retrovirales o SB. Se ha demostrado que los transposones PB se insertan dentro de sitios genómicos TTAA, el cual es duplicado luego de la inserción (Fraser et al. 1995). El gen codificante de la transposasa PB no muestra tendencia a la integración aunque se ve afectado por el fenómeno de “salto local” (fenómeno por el cual 50-80% de las integraciones nuevas se encuentran relacionadas a eventos de transposición previos en el mismo genoma) (Carlson & Largaespada 2005). Asimismo, a diferencia del sistema *Sleeping Beauty*, el cual deja una “huella” TA después de ser movilizado, PB es completamente escindido del sitio donante durante la movilización.

El transposón contiene dos terminales repetidas de 13 pb idénticas pero invertidas; denominadas ITR las cuales, pueden ser usadas para determinar la orientación del transposón durante la integración.

#### **IV- Transposón Sleeping Beauty:**

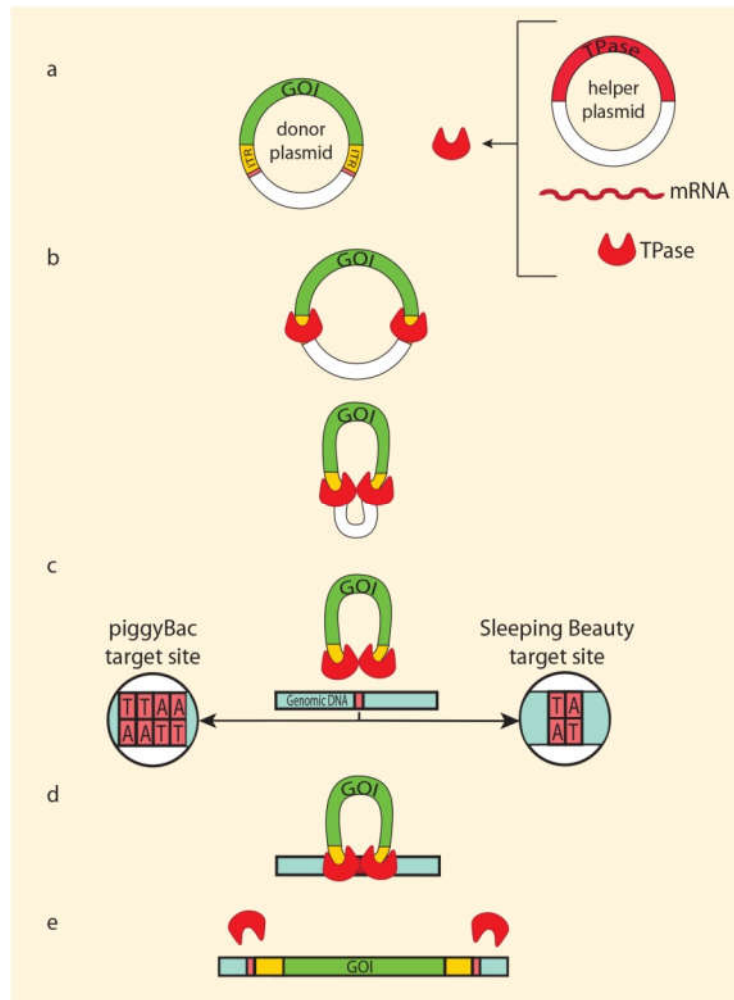
*Sleeping Beauty* es un transposón del tipo *Tc1* que se encontraba inactivo y fue recuperado mediante la eliminación de la mutación que inactivaba la transposasa a partir de una secuencia consenso obtenida desde el genoma de diferentes especies de salmones (Ivics et al. 1997). La secuencia del *SB* está compuesta por una secuencia de ADN (1,6 kb) flanqueada por terminales repetidas de 250 pb (IR y DR) codificando una única proteína, la Transposasa SB, la cual cataliza la movilización del transposón SB de un *locus* genómico a otro.

El SB ha sido adaptado por el hombre para poder ser utilizado como herramienta transgénica. En este caso, la transposasa SB se expresa por separado y la región ubicada entre los ITR en el transposón es remplazada por el gen de interés. El SB sintético fue el primer transposón utilizado para introducir modificaciones en el genoma de vertebrados, incluyendo peces, roedores y humanos (Mátés et al. 2009; Sinzelle et al. 2006; Dupuy et al. 2005; Kitada et al. 2007; Huang et al. 2006). También, se ha demostrado que es activo tanto en células somáticas como en germinales de ratón (Yant et al. 2000; Carlson et al. 2003).

Se sabe que el transposón SB tiende a insertarse dentro de regiones ricas en TA y la secuencia “ANNTANNT” es el motivo preferido para la integración de SB (Carlson et al. 2003). Aunque, SB puede transponerse a casi cualquier ubicación dentro del genoma, su capacidad de carga puede alcanzar un máximo de solo 13kb y su eficiencia se ve disminuida de manera inversamente proporcional con el aumento del tamaño del inserto (Zayed et al. 2004). Además, se ha establecido que SB posee una fuerte preferencia por el “salto local” comparado a otros transposones, lo que lleva a que se produzcan con mucha frecuencia inserciones en las inmediaciones del *locus* donante (rangos de 5-10kb). Más del 70% de los eventos de transposición mediante SB se producen de esta manera (Horie et al. 2003). Los transposones SB también muestran lo que se ha denominado *inhibición por sobreproducción*, el cual hace referencia a una auto-inhibición de la enzima causada por exceso de producción de la misma por mecanismos moleculares no dilucidados hasta ahora. Estas particularidades han limitado la aplicación de SB como un sistema de mutagénesis de genoma completo. A pesar de esto, es un sistema muy activo en células de mamíferos y ha sido la herramienta de elección para transgénesis en grandes animales.

En la Figura N° 3 puede verse una representación esquemática del mecanismo de transposición para el *piggyBac* y *Sleeping Beauty*.

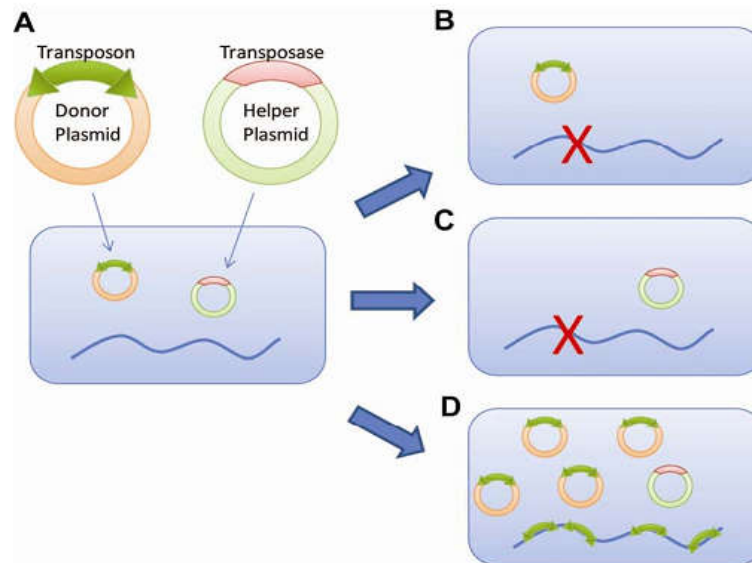




**Figura 3:** Mecanismo general para la integración del transgen mediada por la transposasa en el genoma hospedador. La transposasa (TPase) es comúnmente sintetizada en un vector de expresión (plásmido ayudante), ARNm o directamente provista como proteína. La secuencia codificante del gen de interés (GOI) flanqueado por los ITR es provista en un vector independiente (plásmido donante). **a.** TPase reconoce/se une a los ITRs flanqueando el GOI y catalizan los cortes en la doble hélice en la zona terminal de los ITR. **b.** El elemento resultado de la escisión se integra a los sitios diana específicos en el ADN genómico hospedador (TA/AT para SB y TTAA/AATT para PB). **c.** Otro corte en la doble cadena de ADN en el sitio genómico diana es introducido por la transposasa. **d.** resultando en la integración y duplicación de los sitios de reconocimiento. **e.** Extraído de (Bosch et al. 2015).

El método más común para la introducción del sistema *Sleeping Beauty* dentro de células mamíferas es la co-transfección de un plásmido que codifica la transposasa (“plásmido *auxiliar*”) y otro plásmido que contenga el transposón (“plásmido *donante*”)(Wu et al. 2006). Una vez dentro de la célula hospedadora, la enzima transposasa, originada a partir del plásmido auxiliar, moviliza el transposón (transgen) a partir del plásmido *donante* y cataliza su integración al genoma hospedador (Ver Figura N° 4a y d). Este sistema de

transposición basado en dos plásmidos, posee varios inconvenientes, siendo el más relevante el ingreso a la célula de uno de los plásmidos solamente, situación en la cual la transposición no ocurre. (Ver Figura N° 4b y c).

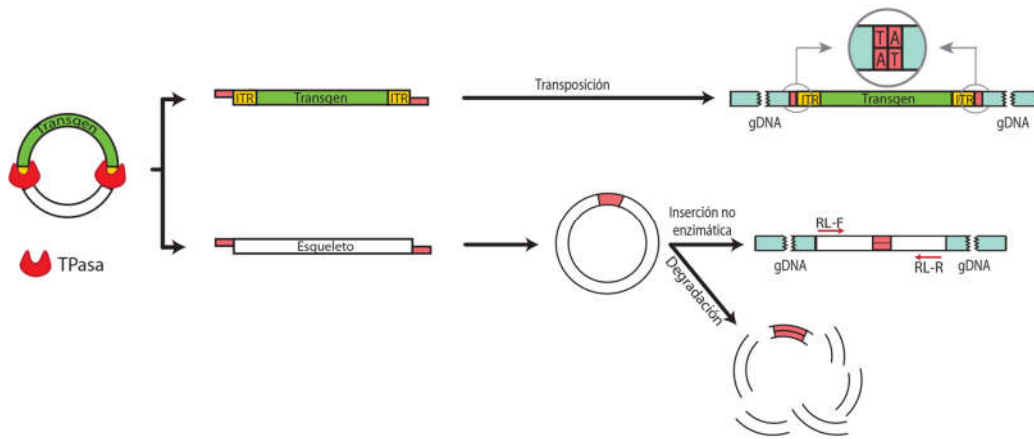


**Figura 4:** Esquematización del sistema de Transposición de dos componentes, basado en el uso de los plásmidos donante y auxiliar empleados en células en cultivo. **a.** Plásmidos Donante y Auxiliar portando el transposón y codificando la enzima transposasa, respectivamente. La falta de la transposasa **b.** o la presencia de la misma sin el transposón **c.** no producirán una transposición exitosa. **d.** Solo se dará la transposición cuando ambos elementos se encuentren disponibles. Imagen tomada de(Bessereau et al. 2001).

Una vez producido el evento de transposición e insertado el transposón en el genoma hospedador, existe la posibilidad no deseada de que la transposasa generada a partir del plásmido o a partir del gen de la misma el cual se ha insertado de manera aleatoria en el genoma hospedador (Ivics et al. 1997)(Yant et al. 2000)(Mátés et al. 2009), catalice la movilidad del transposón dentro del genoma (saltos intragenómicos), causando mutaciones perjudiciales para la célula.

Por otro lado, se ha demostrado que tanto el plásmido donante completo, como el esqueleto remanente luego del evento de transposición; previamente religado por la misma transposasa, eventualmente pueden integrarse al genoma de la célula por mecanismos no transposicionales (Saha et al. 2015; Urschitz, Kawasumi, Owens, Morozumi, Yamashiro & Stoytchev 2010; Bell et al. 2010; Wu et al. 2006; Wilson et al. 2007; Dupuy et al. 2002; Aronovich et al. 2007; Dalsgaard et al. 2009; Ding et al. 2005; Ivics et al. 2009). La inserción del esqueleto religado del plásmido donante es importante,

ya que se pensaba que el único destino de este remanente era la degradación (ver Figura N° 5).



**Figura 5.** Esquemización de los posibles destinos del esqueleto plasmídico remanente luego del evento de transposición.

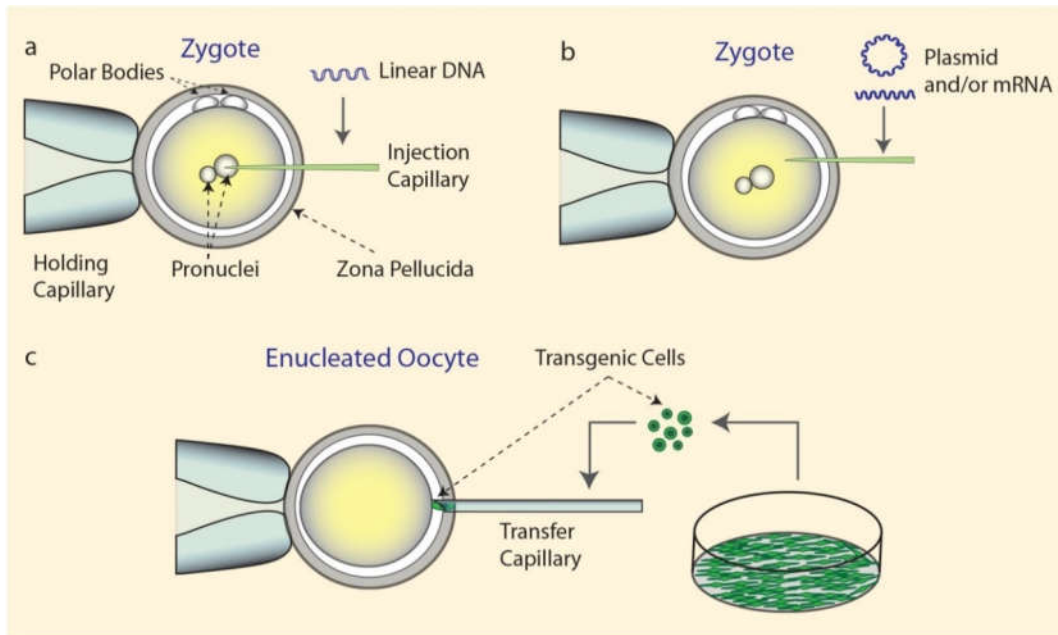
Estos eventos de integración pueden ocurrir de manera indistinta tanto para los plásmidos *donante o auxiliar*, como para el esqueleto religado.

El número de eventos de integración mediados por el transposón puede ser controlado modificando la cantidad total de ambos plásmidos utilizados y la relación molar entre el vector *donante* y el *auxiliar*. Los patrones de integración son por lo general complejos, esto incrementa la dificultad para aislar un clon con las características deseadas de inserción; por ejemplo, el número de copias presentes y la ubicación de la/s misma/s en el genoma. Una vez integrado, la continua expresión de la transposasa puede movilizar nuevamente las secuencias de interés insertadas previamente; generando patrones aún más complejos de integración en las divisiones celulares siguientes.

En razón de estos eventos no controlables es fundamental caracterizar las líneas transgénicas obtenidas, con el fin de mantener aquellas que presenten el menor número de inserciones y no muestren actividad residual de la transposasa.

## *Capítulo V: 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. 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. Tanto la microinyección, como la TNCS se constituyen como las metodologías tradicionales para la generación de embriones transgénicos (ver Figura N° 6). 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 6:** Metodologías más ampliamente usadas para generar animales transgénicos. **a.** Inyección pronuclear. **b.** Inyección intracitoplasmática. **c.** Transferencia nuclear de células somáticas. Extraído 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 & 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.

**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. 1996). 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 hemicitoplastos 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)(Chesné et al. 2002)(Baguisi et al. 1999)(Polejaeva & Mitalipov 2013)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. 2001).

### **Fusión:**

La introducción del material genético donante dentro del ovocito enucleado receptor se realiza mediante la fusión de la membrana celular con la membrana plasmática del ovocito. 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 del ovocito 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. 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 & 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. 2012).

### **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 & 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 bajar la eficiencia 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).

El presente trabajo de investigación se encuadra en un proyecto general más amplio que persigue abordar experimentalmente ciertos problemas particulares asociados a la transgénesis en animales mayores de interés productivo. En este sentido se están desarrollando métodos alternativos como así también perfeccionando los ya existentes para maximizar la eficiencia de las modificaciones génicas controladas en animales domésticos para aplicaciones pecuarias (mejoras en la *performance* productiva) y biomédicas (producción de proteínas recombinantes y modelos animales).

# Hipótesis y Objetivos



## **Hipótesis y Objetivo General**

La hipótesis de trabajo establece que el sistema transgénico basado en un transposón conocido como *Sleeping Beauty* (SB) es capaz de mediar la incorporación de secuencias de ADN heterólogo al genoma de fibroblastos fetales mediante el mecanismo conocido como transposición, en el cual la introducción del transgén es catalizada por una enzima. 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 dichas células transgénicas pueden ser reprogramadas cuando son transferidas a ovocitos enucleados para generar embriones bovinos clonados. El objetivo del proyecto es desarrollar un sistema basado en un transposón conocido como *Sleeping Beauty*, el cual permita introducir eficientemente modificaciones génicas estables en células bovinas en cultivo. Estas células serán utilizadas como donantes de núcleos para generar embriones clonados transgénicos mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS).

## **Objetivos Específicos**

- I.** Optimizar la tasa de cotransfección de fibroblastos bovinos con el sistema SB de 2 plásmidos. Uno de los plásmidos posee el transgén (donante: pT2/VenusRMCE) y el otro posee un casete para expresión eucariota de la enzima transposasa SB (auxiliar: pCMV-SB100X).
- II.** Estudiar la capacidad de diferentes tipos de PEI para vehicular ADN plasmídico al interior de fibroblastos fetales bovinos, y líneas celulares comerciales (HepG2, HEK).
- III.** Investigar el número de copias del transgén que se han incorporado al genoma de las líneas celulares obtenidas empleando la técnica de *Southern Blot* y *FISH*.
- IV.** Establecer con precisión los sitios genómicos donde se ha incorporado el o los transgenes utilizando la técnica PCR inversa.
- V.** Generar embriones bovinos transgénicos a partir de líneas clonales mediante la técnica de TNCS.

# Materiales y Métodos



## *Materiales y Métodos*

### *Vectores Plasmídicos*

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes vectores plasmídicos (ver Figura N° 7):

**pCMV-SB100X:** El primero de los plásmidos correspondientes al sistema transposón *Sleeping Beauty*. El plásmido pCMV-SB100 posee las siguientes características: secuencias que codifican para la transposasa SB hiperactiva la cual es una proteína modificada a través de ingeniería genética, permitiéndole tener una actividad 100X con respecto a la original. La misma se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo CMV. A su vez, posee todas las características necesarias para su correcta replicación y amplificación en la cepa bacteriana DH5 $\alpha$ .

**pT2/RMCE/Venus:** El segundo de los plásmidos correspondientes al sistema transposón SB. El plásmido posee los siguientes componentes: casete de expresión de la proteína *Venus* (una Proteína Verde fluorescente, derivada de la GFP, la cual posee modificaciones genéticas que le confieren mayor actividad y menor citotoxicidad) bajo la regulación del promotor CAGGS, un promotor constitutivo con gran actividad en células de mamíferos.

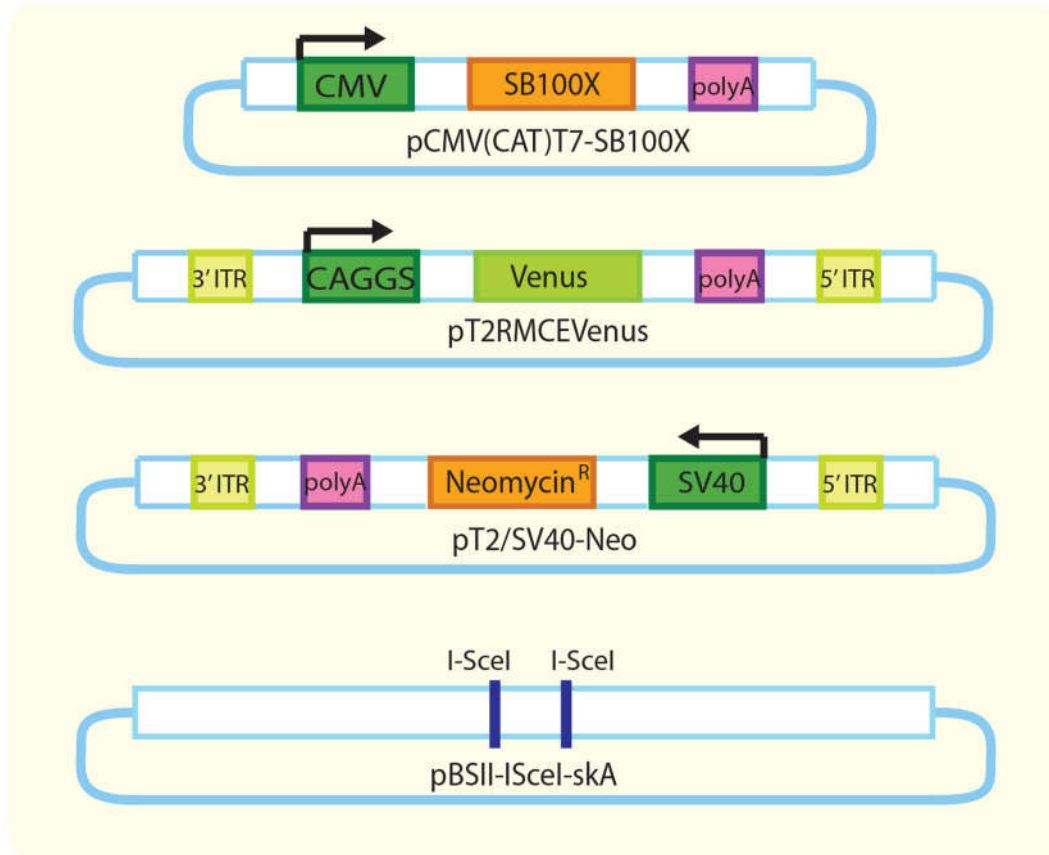
Por otro lado, el gen de la proteína *Venus* se encuentra flanqueado por las secuencias de reconocimiento para la enzima transposasa SB (ITRs).

Además, el esqueleto del plásmido posee todos los componentes que permiten que el plásmido pueda ser propagado en *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ .

**pT2/SV40-Neo:** Posee el gen que codifica para la resistencia a Neomicina bajo el control del promotor SV40, todo esto flanqueado por los ITRs.

Además, cuenta con los componentes que permiten que el plásmido sea propagado en *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ .

**pBII-ISceI-skA:** Este plásmido será utilizado como plásmido control para los experimentos. El plásmido consta solamente de los sitios de restricción para la meganucleasa ISceI, además de los componentes necesarios para su replicación y amplificación en bacterias.



**Figura 7:** Vectores plasmídicos utilizados en el trabajo.

### *Cepas Bacteriana*

Con el fin de clonar los dos plásmidos previamente descritos, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* DH5 $\alpha$  que posee el siguiente genotipo: *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*) *U169 phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*, de las cuales las más importantes son las siguientes:

- La mutación *EndA1*: inactiva una endonucleasa intracelular que degrada ADN plasmídicos.
- *recA* mutado: elimina la recombinación homóloga; lo que reduce la formación de deleciones y la multimerización de plásmidos.
- $\Delta$ (*lacZ*)*M15*: es el alelo alfa receptor que permite usar el sistema LacZ como gen de selección positiva.

Estas mutaciones facilitan el proceso de incorporación de ADN exógeno y su posterior amplificación para ser empleado en la metodología del ADN recombinante.

### ***Obtención de plásmidos***

Debido a que las bacterias utilizadas son incapaces de incorporar ADN exógeno de manera natural, se indujo un aumento en la permeabilidad de la membrana celular mediante la utilización de agentes químicos. Para hacer bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  competentes químicamente (capaces de incorporar ADN heterólogo), se utilizó un cultivo crecido toda la noche al cual se lo sometió a la acción de una solución de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. El cultivo bacteriano se centrifugó a 3000 rpm durante 7 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el precipitado en 1 mL de la solución de CaCl<sub>2</sub> fría. Se transfirió la suspensión a tubos eppendorf preenfriados. y se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 2500 rpm; nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de la solución de Cl<sub>2</sub>Ca. Las células se mantuvieron en hielo 30 minutos, se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de la solución de Cl<sub>2</sub>Ca.

Para la transformación de las bacterias con el plásmido de interés, se colocaron 100  $\mu$ L de células competentes en un tubo tipo eppendorf estéril con 5 $\mu$ L de plásmido almacenado en buffer TE pH=8. Posteriormente, se transfirieron a un baño termostático a 42°C durante 2 minutos para producir un “shock térmico” con el fin de alterar la permeabilidad de la membrana para permitir el ingreso del ADN exógeno. Luego se agregó 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con glucosa 20mM y se cultivaron a 37°C durante 1 hora. Para seleccionar las bacterias transformadas, se sembró la mezcla de transformación en placas de petri con medio LB conteniendo el antibiótico ampicilina (200 $\mu$ g/mL), gen de selección en bacterias, permitiéndoles sobrevivir sólo a aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido de interés. Como control de viabilidad, se sembraron en placas LB sin antibiótico células competentes sin transformar; del mismo modo, para realizar el control negativo se sembraron en medio LB suplementado con ampicilina. Las placas se llevaron a estufa a 37°C por 16 hs.

### ***Purificación de ADN plasmídico, almacenado y cuantificación***



### **Miniextracciones de ADN plasmídico:**

Se tomó una colonia transformada y se realizó un cultivo durante toda la noche en 6 mL de medio LB suplementado con antibiótico. Se cosecharon las bacterias por centrifugación y se las resuspendió en solución Glucosa/Tris/EDTA (GTE) pH=8; a continuación, éstas fueron sometidas a lisis celular mediante tratamiento con una solución alcalina conteniendo 0,2 N de NaOH y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%. Luego, la mezcla se neutralizó con Acetato de Potasio 3 M pH=4,8 el cual forma un complejo con el DNA cromosómico, el cual es removido por centrifugación. Luego, el ADN plasmídico se recuperó del sobrenadante y se eliminaron las proteínas bacterianas por tratamiento con cloroformo. Finalmente, se concentró el mismo por precipitación con isopropanol y se procedió a lavar el pellet de ADN con etanol para luego resuspenderlo en agua ultra pura estéril.

### **Miniextracciones a través de Kit Comercial:**

Con el fin de obtener un ADN plasmídico de mayor pureza, se utilizó el kit comercial GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (*Fermentas*) según las instrucciones del fabricante. El fundamento de la técnica es el mismo que el mencionado en el inciso anterior, aunque con la diferencia de que este procedimiento utiliza una columna de purificación de sílice la cual permite una mayor purificación del plásmido. El kit comercial también incluye RNasa para degradar el ARN contaminante.

### **Midiextracciones de ADN plasmídico a través de kit comercial:**

Las bacterias transformadas fueron cultivadas en 150 mL de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37° C. Éstas se centrifugaron a máxima velocidad durante un minuto, posteriormente se siguieron las especificaciones del kit comercial FastIon MidiKit (*Bioamérica*).

### **Almacenado de ADN plasmídico:**

Los plásmidos purificados por las diferentes técnicas mencionadas anteriormente se almacenaron en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### **Estimación de la concentración:**

La determinación de la concentración de ADN plasmídico se realizó por espectrofotometría. Se sabe que los ácidos nucleicos absorben luz UV a una longitud de onda de 260 nm.

Por otra parte, las proteínas presentan máxima absorbancia de luz UV a 280 nm. Por lo tanto, el grado de pureza o la ausencia de proteínas y otros contaminantes se determinaron relacionando las absorbancias a 260 nm y 280 nm (260/280). Un índice mayor a 1,8 indica que el ADN se encuentra en óptimo estado de pureza, sin contaminación de proteínas.

### *Identificación de los plásmidos de interés*

Para la identificación de los plásmidos se procedió a realizar las siguientes digestiones enzimáticas de los plásmidos:

#### **pCMV(CAT)T7-SB100X:**

<b>ADN Plasmídico</b>	<b>0,5<math>\mu\text{g}</math></b>
<b>Enzima XbaI</b>	10 U
<b>Buffer 10X</b>	2 $\mu\text{L}$
<b>H<sub>2</sub>O</b>	16 $\mu\text{L}$
<b>Calidad HPLC</b>	
<b>Volumen Final</b>	20 $\mu\text{L}$

**pBII-ISceI-skA:**

<b>ADN Plasmídico</b>	<b>0,5µg</b>
<b>Enzima HindIII</b>	10 U
<b>Buffer 10X</b>	2 µL
<b>H<sub>2</sub>O      Calidad</b>	16 µL
<b>HPLC</b>	
<b>Volumen Final</b>	20 µL

**pT2/RMCE/Venus:**

<b>ADN Plasmídico</b>	<b>0,5µg</b>
<b>Enzima HindIII</b>	10 U
<b>Buffer 10X</b>	2 µL
<b>H<sub>2</sub>O      Calidad</b>	16 µL
<b>HPLC</b>	
<b>Volumen Final</b>	20 µL

**pT2/SV40-Neo:**

<b>ADN Plasmídico</b>	<b>0,5µg</b>
<b>Enzima HindIII</b>	10 U
<b>Buffer 10X</b>	2 µL
<b>H<sub>2</sub>O      Calidad</b>	16 µL
<b>HPLC</b>	
<b>Volumen Final</b>	20 µL

Las mezclas de digestión previamente citadas, fueron sometidas a incubación durante toda la noche a 37°C. Posterior a ello, se procedió a la desactivación de las enzimas según las indicaciones del fabricante y a continuación, se sometieron las mezclas de digestión a electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 90 minutos a 70 V en buffer TAE 1X. Se sembraron 10 µL de muestra mezclados con 2 µL de buffer de siembra, también llamado

Loading Buffer (glicerol 30%-azul de bromofenol); como marcador de peso molecular se utilizó Lambda EcoRI + HindIII (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante Según los análisis realizados sobre las secuencias de ADN de los 4 vectores, los patrones de bandas esperados luego de las restricciones son los siguientes:

- **pBII-ISceI-skA:**
  - 3007pb (Plásmido Linealizado)
  
- **pCMV(CAT)T7-SB100X:**
  - 3280pb
  - 1476pb
  
- **pT2/RMCE/Venus:**
  - 3399pb
  - 2902pb
  
- **pT2/SV40-Neo:**
  - 3502pb
  - 1653pb

Para poder visualizar las bandas se adicionó a la agarosa el agente intercalante de bases nitrogenadas *GelGreen (Biotium)*. Dicho reactivo se eligió debido a su muy baja toxicidad y, además, porque se ha encontrado que no es mutagénico en las concentraciones utilizadas a diferencia de los otros reactivos empleados normalmente para el teñido de ácidos nucleicos como por ejemplo Bromuro de Etidio. Finalizada la corrida electroforética, se observó en transiluminador de luz azul, ya que este colorante tiene un pico de excitación a una longitud de onda de 488 nm (luz azul, visible) y hace fluorescentes las bandas de ADN. Los geles fueron fotografiados para su posterior análisis.

### ***Aislamiento y cultivo de Fibroblastos Fetales Bovinos (FFB)***

Se colectaron fetos bovinos de 40-60 días de edad gestacional de hembras bovinas faenadas. La cabeza y los órganos internos de los fetos fueron removidos y descartados mientras que los tejidos correspondientes a los flancos fueron cortados finamente y cultivados en D-MEM suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) en frascos de

cultivo plásticos. Los cultivos se digirieron con tripsina cuando alcanzaron confluencia y las células se repicaron a frascos nuevos para continuar su cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron el pasaje 2 o 3, los FFB fueron utilizados en los diversos experimentos. Alternativamente, se congelaron mediante procedimientos de criopreservación estándares y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso en las experiencias propuestas.

### **Congelado y descongelado de FFB**

Para congelar las células cultivadas en frasco de 75cm<sup>3</sup> confluyente al 90%, se lavaron las mismas con 5 mL de DPBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>; luego se digirieron con 2 mL de tripsina al 0,05% y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se resuspendieron en medio de congelación (DMEM + 20% SFB; 10% DMSO). Posteriormente, se colocó la suspensión celular en crioviales de 2 mL de capacidad y almacenadas en un recipiente apropiado (Mister Frosty) se llevaron a freezer -80°C durante al menos un día. Pasado este tiempo se colocaron los crioviales en un termo de nitrógeno líquido. Los fibroblastos fetales se congelaron a una densidad 1 millón de células/mL de medio de congelación.

Para descongelar las células, los crioviales se transfirieron desde el termo de N<sub>2</sub> líquido a baño de agua a 37° C con agitación (para acelerar el proceso de descongelado) hasta su descongelación. Posteriormente, la suspensión de células se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL de capacidad con 5 mL medio DMEM con 10 % SFB, se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en el volumen de medio adecuado y se transfirieron a placas o frascos de cultivo y se mantuvieron en estufa a 38,5° C, 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad.

### ***Transfección de FFB con agentes químicos***

Previo a realizar la transfección de FFB; se sembraron las células en medio DMEM suplementado con 10% SFB en una placa de cultivo de múltiples pocillos. Se las dejó crecer durante 24 hs hasta que alcanzaran un 90-95% de confluencia.

## **Agente poliamínico JetPRIME (Polyplus)**

Basados en trabajos anteriores del mismo laboratorio, en los cuales se optimizó la transfección con el agente químico *JetPrime*, tomamos como relaciones de trabajo para el mismo 1:2 (ADN:*JetPrime*), la optimización de las transfecciones no fue necesaria y se pasó directamente a los experimentos diseñados.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, como primer paso se diluyó el ADN en el buffer *JetPrime*, se lo agitó durante 10 segundos. Luego, se le agregó el agente *JetPrime*, se vortereó nuevamente durante 10 segundos y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se transfirió lentamente la mezcla de transfección al pocillo de la placa de 96 pocillos con el cultivo de células previamente preparado. Éstos fueron colocados en estufa de cultivo a 38.5° C, 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad. Se incubaron 72 horas y se observó la expresión de la proteína fluorescente en un microscopio de fluorescencia.

Una vez determinada la mejor relación *JetPrime*:DNA para los experimentos de transfección propiamente dichos se utilizaron diferentes relaciones entre los plásmidos del sistema SB, manteniendo la relación óptima *JetPrime*:ADN.

### ***Diseño de las transfecciones***

Se plantearon dos experimentos de cotransfección, con dos plásmidos respectivamente, en el primero de ellos se transfectaron células con el plásmido codificante para la proteína Venus junto al plásmido que codifica la transposasa SB o el plásmido control sin transposasa; teniendo como objetivo estudiar la actividad transposasa SB en el genoma bovino.

El segundo de los experimentos se basó en los mismos fundamentos que el anterior, pero con el agregado de un tercer plásmido que codifica para la resistencia al antibiótico Neomicina, el cual además de permitirnos estudiar los efectos de la transposasa, nos va a permitir la obtención de colonias monoclonales, y posteriormente líneas monoclonales transgénicas para el sistema SB. Los tratamientos de ambos experimentos se detallan en las siguientes tablas:

Tabla N° 1. Transfecciones con 2 plásmidos

Plásmido	pCMV(CAT)T7- SB100X	pT2/RMCE/Venus	pT2/SV40- Neo	pBII- ISceI-skA
<b>Relación</b>				
2:1	2	1	-	-
1:1	1	1	-	-
1:2	1	2	-	-
1:1(c)	-	1	-	1
2:1	0,66 µg	0,33 µg	-	-
1:1	0,5 µg	0,5 µg	-	-
1:2	0,33 µg	0,66 µg	-	-
1:1(c)*	-	0,5 µg	-	0,5 µg

\*Tratamientos control sin transposasa.

Tabla N° 2. Transfecciones con 3 plásmidos

Plásmido	pCMV(CAT)T7- SB100X	pT2/RMCE/Venus	pT2/SV40- Neo	pBII- ISceI-skA
<b>Relación</b>				
1:1:1	1	1	1	-
1:1:1(c)*	-	-	-	1
2:0,5:0,5	2	0,5	0,5	-
2:0,5:0,5(c)*	-	0,5	0,5	2
2:1:1	2	1	1	-
2:1:1(c)*	-	1	1	2
1:1:1(c)*	-	0,33 µg	0,33 µg	0,33 µg
2:0,5:0,5	0,66 µg	0,16 µg	0,16 µg	-
2:0,5:0,5(c)*	-	0,16 µg	0,16 µg	0,66 µg
2:1:1	0,5 µg	0,25 µg	0,25 µg	-
2:1:1(c)*	-	0,25 µg	0,25 µg	0,5 µg

\*Tratamientos control sin transposasa.

Teniendo en cuenta estas relaciones, las cantidades de ADN a agregar para cada mezcla de transfección, fueron las siguientes:

### ***Recuento del número de colonias***

Transcurridas 48 horas después de las transfecciones, las células pertenecientes a cada tratamiento fueron transferidas a placas de cultivo de 100 mm de diámetro, y cultivadas, en ausencia o presencia de G418, según hayan sido células transfectadas con dos o tres plásmidos respectivamente.

Se las mantuvo en crecimiento y bajo selección del antibiótico (en el caso de aquellas que poseían la resistencia a Neomicina) durante 14/21 días, hasta que se formaron colonias discretas. Luego de esto, se llevó a cabo el recuento de colonias fluorescentes/fluorescentes-resistentes bajo microscopio de fluorescencia.

### ***Síntesis de los polímeros***

Los polímeros lineales de PEI (hidrocloruro de poli-etilenimina) de peso molecular 22, 87 y 217KDa fueron sintetizados a partir de la poli(2-etil-2oxazolina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de 50, 200 y 500kDa de peso molecular, respectivamente. La diferencia de tamaños entre los polímeros lineales se debe a mayores o menores monómeros agregados en las respectivas cadenas lineales.

PEIs de diferentes pesos moleculares fueron sintetizados como fue descrito anteriormente (Lázaro-Martínez et al. 2015) salvo por ligeras modificaciones: 1gr de poli(2-etil-2oxazolina) fue agregado a 120mL de una solución de HCl al 24% y sometida a reflujo durante 96hs. La poli(2-etil-2oxazolina) se disolvió a la hora de incubación, mientras que a las 2 hs apareció un precipitado blanco (PEI) que persistió hasta el final de la reacción. A continuación, la mezcla de reacción fue filtrada y el precipitado blanco lavado con 5mL de agua deionizada. Luego, este precipitado fue secado por corriente de aire durante 48 HS, disuelto en 40 mL de agua deionizada y liofilizado durante toda la noche. El PEI 25kDa ramificado, fue comprado a Sigma Aldrich.



Todos los polímeros fueron caracterizados fisicoquímicamente y mediante el ensayo de retardo en gel de agarosa (datos no mostrados).

Todos los polímeros fueron sintetizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Cesar Barbero (Departamento de Química, UNRC).

### ***Ensayo de Citotoxicidad-MTT***

El ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se usó para estudiar el efecto de los polímeros sobre la viabilidad celular. Se sembraron células FFB, HEK 293 o Hep G2 en una placa de 96 pocillos a una densidad inicial de 5000 células/pocillo en 100  $\mu$ L de DMEM+10% SFB. Después de 24 h, las células se expusieron a una concentración creciente de cada uno de los polímeros estudiados y se incubaron en un entorno humidificado con CO<sub>2</sub> al 5% a 38,5° C o 37° C dependiendo de los requerimientos de cada tipo celular. A continuación, se añadió el reactivo MTT (5 mg/mL) a cada pocillo 24 h después de la adición de los polímeros y se incubó durante 3 hs. Se retiró el medio en cada pocillo y se sustituyó por 100  $\mu$ L de DMSO. Se registró la absorbancia a 540 nm mediante un lector de microplacas (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU.). Cada tratamiento se realizó en octuplicados. La viabilidad celular se expresa como porcentaje del cambio respecto al control (considerado el 100%) y se calcula con la siguiente fórmula: Viabilidad de la célula (%) = (DO de la muestra tratada con polímero/DO de la muestra no tratada) x100, Los datos se expresan como el valor medio  $\pm$  SEM.

### ***Transferencia transitoria de genes mediada por PEI***

Veinticuatro horas antes de las transfecciones, las células BFF, HEK 293 y Hep G2 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad inicial de 30,000 células/pocillo. En todos los experimentos de transfección transitoria, se usó el plásmido pZsGreen1 - N1 (*Clontech Laboratories Inc.*, Mountain View, CA purificado a partir de *E. coli* DH5- $\alpha$  utilizando el *ZymoPURE*® maxi prep kit (*Zymo Research*, Irvine, CA, EE.UU.)), el cual codifica un casete de expresión en células de mamíferos para la proteína ZsGreen1 (una

variante modificada proteína fluorescente verde que posee mayor expresión), utilizada como proteína reportera.

Para los ensayos de transfección, cada solución polimérica se ajustó a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , pH 7 y se pasó a través de una membrana de filtro de 0,22 $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se almacenaron en tubos de 1,5ml estériles. Las muestras de polímero se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación (-80 a 37 C) antes de su uso en transfección.

Los complejos de polímero/pADN para la transfección celular se prepararon a diferentes relaciones (p/p) añadiendo una cantidad apropiada de PEI a 0,5, 1 o 2  $\mu\text{g}$  de pZsGreen1-N1 en 300  $\mu\text{L}$  de DMEM más antibióticos, con o sin SFB dependiendo del experimento. Estas relaciones fueron elegidas en base a trabajos previos, en el cual informamos las condiciones óptimas para la transfección de FFB con PEI comercial 25kDa (Forcato et al. 2013).

Las mezclas de polímero/pDNA se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de su uso para permitir que se formen los complejos. Después de 3 hs de incubación de las células con los complejos, 700  $\mu\text{L}$  de DMEM+SFB se añadieron a cada pocillo. Se determinó la expresión del gen reportero 48 hs después de la transfección en un citómetro de flujo *Becton-Dickinson FACScan* (*Becton-Dickinson*, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.).

### ***Integración estable de transgén utilizando PEI***

Con el fin de establecer si las nanopartículas de PEI podrían mediar la integración estable del transgén, células FFB, HEK 293 o Hep G2 fueron transfectadas con los componentes del sistema de transposón *Sleeping Beauty*. Los tres tipos de células se cotransfectaron con un plásmido (pCMV - SB100X) que lleva un casete de expresión para la transposasa SB y dos vectores donantes (pT2/*Venus*/RMCE que contiene un casete de expresión para la proteína fluorescente *Venus*, y pT2 / SV40-Neo portador de un casete de resistencia neo; dichos casetes están flanqueados por las repeticiones terminales invertidas del SB). Todos los plásmidos fueron purificados a partir de la cepa de E. coli DH5 con un kit maxi prep *ZymoPURE®* (*Zymo Research*).

Transcurridas 48 horas desde la transfección, las células fueron transferidas a placas de cultivo de 100 mm de diámetro, y cultivadas, en ausencia o presencia de G418, según hayan sido células transfectadas con dos o tres plásmidos respectivamente.

Se las mantuvo en cultivo y bajo selección del antibiótico (en el caso de aquellas que poseían la resistencia a Neomicina) durante 14/21 días, hasta que se formaron colonias discretas. Las colonias se digirieron con tripsina y se transfirieron a placas de 100 mm para obtener líneas celulares transgénicas monoclonales. El ADN genómico fue aislado a partir de líneas celulares transgénicas usando *QuickgDNA*® MiniPrep (*Zymo Research*) siguiendo el protocolo del fabricante. La integración transgénica fue evaluada por amplificación por PCR de un fragmento de 280pb del gen Venus utilizando los siguientes cebadores:

**Fw:** TAGCCCAGGGTGGTCACCAG;

**Rev:** TGTGACCGGCGGCTCTAGAG.

Las condiciones optimizadas para las reacciones de PCR fueron las siguientes:

<b>Buffer (10 X)</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>Cl<sub>2</sub>Mg (25mM)</b>	1,6 $\mu$ L
<b>dNTPs (10mM)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Primer Forward (50 <math>\mu</math>M)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Primer Reverse (50 <math>\mu</math>M)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Taq Polimerasa (5u/ <math>\mu</math>L)</b>	0,5 U
<b>ADN Plasmídico</b>	50 ng
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.s.p. 10 $\mu$ L

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes.

<b>Protocolo PCR</b>	
<b>95°C</b>	<b>5'</b>
<b>95°C</b>	<b>25'' x35 ciclos</b>
<b>63°C</b>	<b>25'' x35 ciclos</b>
<b>72°C</b>	<b>40'' x35 ciclos</b>
<b>72°C</b>	<b>10'</b>

Los productos de amplificación, se sometieron a electroforésis en gel de agarosa al 1,5% durante 90 minutos a 100 V en buffer TAE 1X. Se sembraron 5  $\mu$ L de muestra mezclados

con 2  $\mu$ L de buffer de siembra, también llamado *Loading Buffer* (glicerol 30%-azul de bromofenol).

### ***Aislamiento de colonias Monoclonales.***

Una vez efectuado el recuento del número de colonias, se procedió con el aislamiento de colonias individuales. Para ello se usó la metodología basada en anillos para clonado. La misma se basó en usar anillos de plástico, los cuales se apoyaron sobre la placa de cultivo, rodeando cada una de las colonias a aislar; permitiendo así la digestión con tripsina de las mismas de manera individual, mediante el agregado a cada anillo de 50  $\mu$ L de tripsina. Las células fueron posteriormente traspasadas a pocillos de una placa de 96 pocillos, donde empezó la expansión de las líneas monoclonales. Cada línea fue controlada individualmente cada 3 días, realizando cambios de medio cuando fuera necesario. Cuando llegaron a confluencia se las pasó a recipientes de mayor tamaño, hasta llegar al número deseado de células ( $2-5 \times 10^6$  células).

### ***Extracción de ANDg a partir de líneas monoclonales***

Para determinar si el transposón se integró en el genoma de los fibroblastos, se realizó una extracción de ADN genómico de las colonias expandidas que derivaron de las células transfectadas con los sistemas de dos o tres plásmidos según correspondía. Posteriormente, los mismos fueron sometidos a un análisis por PCR con cebadores específicamente diseñados para determinar la integración del transgén y si la misma se realizó por el mecanismo de transposición.

### **Protocolo de extracción de ADN Genómico Total**

Luego de los 21 días de selección con el antibiótico, los fibroblastos transgénicos se sometieron a la extracción del ADN genómico, para el cual se utilizó el kit comercial *Quick-gDNA® MiniPrep* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la extracción, se procedió a correr las muestras obtenidas en un gel de agarosa al 1% para analizar la integridad del mismo.

### ***Determinación del mecanismo de integración del transgén al genoma de la célula mediante PCR***

Una vez obtenidos los DNA genómicos, se procedió al análisis mediante PCR; permitiendo dilucidar la forma en que el transgen se incorporó al genoma de las células. Cabe destacar que para todas las experiencias de PCR realizadas, el control positivo (+), se refiere al plásmido purificado utilizado como molde en la PCR.

Se planificaron diferentes PCR, que en conjunto nos permitieron inferir el mecanismo por el cual se produjeron las integraciones del transgen en cada una de las líneas, además de demostrar si se produjo la integración de manera aleatoria, de alguna de las demás partes de los plásmidos (esqueleto) o del plásmido auxiliar. En Tabla N°3, se muestran los juegos de cebadores utilizados, las secuencias que reconoce y sus respectivos productos y la finalidad de los mismos.

Tabla N°3. Juegos de cebadores utilizados para las PCRs identificadoras de las inserciones.

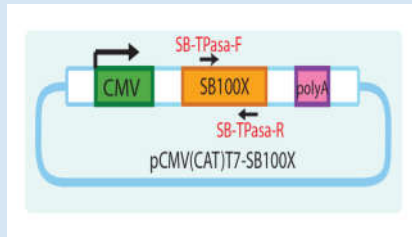
Primers	Secuencia/Sitio de reconocimiento	Tamaño del producto	Función	Resultado esperado en líneas
<b>SB-Venus</b>	SB-Venus-Fw: TAGCCCAGGGTGGTCACCAG SB-Venus-Rv: TGTGACCGGCGGCTCTAGAG	280pb	Corroborar la integración del plásmido en el genoma.	Positivo
<b>SB-ITR</b>	SB-ITR-Fw: CTCGAGAAGCTTGTGGAAGG SB-ITR-Rv: TGACCATGATTACGCCAAGC	408pb	Determinar si hubo inserción del plásmido por un mecanismo al azar.	Negativo
<b>SB-BB</b>	SB-BB-Fw: GCTCTTGATCCGGCAAACAA SB-BB-Rv: GAGGCGGATAAAGTTGCAGG	493pb	Determinar si hubo integración del esqueleto del plásmido.	Negativo
<b>SB-RL</b>	SB-EsqRelig-Fw: GGGGATGTGCTGCAAGGC	233pb	Determina si hubo inserción por	Negativo

SB-EsqRelig-Rv:  
TGACCATGATTACGCCAAGC



transposición,  
se religó el  
esqueleto y se  
produjo la  
inserción al  
azar del  
mismo.

<b>SB-TPasa</b>	SB-TPasa-Fw:	643pb	Determina si	Negativo
	SB-TPasa-Rv:		hubo	
	CAGCAAGGAAGAAGCCACTG		inserción al	
	ACTTGGGTCAAACGTTTCGG		azar del	
			plásmido de	
			la transposasa	
			en el genoma.	



Las condiciones de PCR fueron optimizadas de manera individual para cada juego de cebadores.

Las condiciones optimizadas para las reacciones de PCR fueron las siguientes:

<b>Buffer (10 X)</b>	1 $\mu$ L
<b>Cl<sub>2</sub>Mg (25mM)</b>	1.6 $\mu$ L
<b>dNTPs (10mM)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Primer Forward (50 <math>\mu</math>M)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Primer Reverse (50 <math>\mu</math>M)</b>	0,2 $\mu$ L
<b>Taq Polimerasa (5u/ <math>\mu</math>L)</b>	0,5 U
<b>ADN Plasmídico</b>	50 ng
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.s.p. 10 $\mu$ L

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes:

Protocolo PCR	
95°C	5'
95°C	25'' x35 ciclos
63°C	25'' x35 ciclos
72°C	40'' x35 ciclos
72°C	10'

Los productos de amplificación, se sometieron a electroforésis en gel de agarosa al 1,5% durante 90 minutos a 100 V en buffer TAE 1X. Se sembraron 5 µL de muestra mezclados con 2 µL de *Loading Buffer* (glicerol 30%-azul de bromofenol).

***Identificación del producto de la PCR correspondiente al esqueleto plasmídico religado e inserto en el genoma, después de la transposición.***

Para corroborar que el producto de la PCR correspondía al esqueleto religado del plásmido posteriormente inserto en el genoma por algún mecanismo al azar de la célula, se realizó una amplificación mediante PCR del fragmento, siguiendo las condiciones propuestas anteriormente. Al producto de la misma se la purificó mediante el kit comercial “*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*” (*Promega*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al producto purificado se lo sometió a restricción con la enzima *XhoI* (el producto posee un sitio de reconocimiento para la misma) esperando obtenerse dos fragmentos (158pb y 75pb) luego de la digestión.

***Determinación de los sitios de inserción en el genoma bovino: Splinkerette-PCR***

Para determinar con precisión el sitio de inserción de los transgenes dentro del genoma bovino, se utilizó una técnica derivada de una modificación de la PCR inversa, denominada *Splinkerette-PCR*, que nos permitió obtener las secuencias a ambos lados de los ITR.

El protocolo para llevarla a cabo constaba de los siguientes pasos:



- 1- 5 µg de de una mezcla de ADNg aislado a partir de todas las líneas celulares de digirió con la enzima MboI, en un volumen de reacción de 200µL, durante 5 horas.
- 2- Se extrajo-precipitó el ADN con el método basado en la combinación Cloroformo/Isopropanol y se lo resuspendió en 10 µL de Buffer TE.
- 3- 2µL de la solución de ADN digerido fueron ligados con 10 pmol del *splinkerette linker* (tabla X) y 5U de Ligasa T4 en un volumen final de reacción de 10 µL, durante toda la noche a temperatura ambiente.
- 4- Se inactivó la reacción durante 10 minutos a 65° C.
- 5- Se llevó a cabo la PCR-1 bajo las siguientes condiciones:

Componente	Concentración Final
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-
<b>Buffer PCR 10x</b>	1x
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5mM
<b>dNTP (10mM)</b>	0,2mM
<b>Link3 (10pmol/µL)</b>	0,4pmol/µL
<b>Rev3 (10pmol/µL)</b>	0,4pmol/µL
<b>ADN ligado</b>	-
<b>Taq polimerasa</b>	0,05U/µL
<b>Volumen Final</b>	50 µL

- 6- Se corrió la PCR bajo las siguientes condiciones:

Nº de ciclo	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
<b>1</b>	94°C, 3 min	-	-
<b>2-16</b>	94°C, 30 segundos	70°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos
<b>17-21</b>	94°C, 30 segundos	63°C, 30 segundos	72°C, 2s + 2s por ciclo
<b>22-26</b>	94°C, 30 segundos	62°C, 30 segundos	72°C, 12s+ 2s por ciclo
<b>27-31</b>	94°C, 30 segundos	61°C, 30 segundos	72°C, 22s+ 2s por ciclo
<b>32-36</b>	94°C, 30 segundos	60°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos
<b>37</b>			72°C, 5 mins

7- Se llevó a cabo la PCR-2 en un volumen final de 50µL, bajo las siguientes condiciones:

Componente	Concentración Final
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-
<b>Buffer PCR 10x</b>	1x
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5mM
<b>dNTP (10 mM)</b>	0,2mM
<b>Link4 (10pmol/µL)</b>	0,4pmol/µL
<b>Bal Rev (10pmol/µL)</b>	0,4pmol/µL
<b>PCR-1 (diluido 100x)</b>	-
<b>Taq polimerasa</b>	0,05U/µL
<b>Volumen Final</b>	50 µL

8- Se corrió la PCR-2 bajo las siguientes condiciones:

Nº de ciclo	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
<b>1</b>	94°C, 3 min	-	-
<b>2-11</b>	94°C, 30 segundos	65°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos
<b>12-31</b>	94°C, 30 segundos	58°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos
<b>32</b>	-	-	72°C, 5 minutos

9- Una alícuota de 5µL del producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa al 1% (p/v). Las bandas de cada calle fueron purificadas a partir del gel, mediante kit de purificación, y las muestras enviadas a la empresa *Macrogen inc.* para su secuenciación mediante su servicio standard comercial.

10- Los resultados obtenidos en el secuenciación fueron comparados con secuencias del genoma bovino (Secuencia completa del genoma *Bos Taurus*: Bos\_taurus\_UMD\_3.1.1, *GenBank*) mediante el uso de la herramienta *BLASTn* (megablast, secuencias de más alta similitud). Se tomó como criterios de aceptación de homología un porcentaje >95% con un  $E < 1e-10$ ,

En la Figura N°8 se observa de manera esquemática, el proceso general que se lleva a cabo durante la metodología *Splinkerette-PCR*:

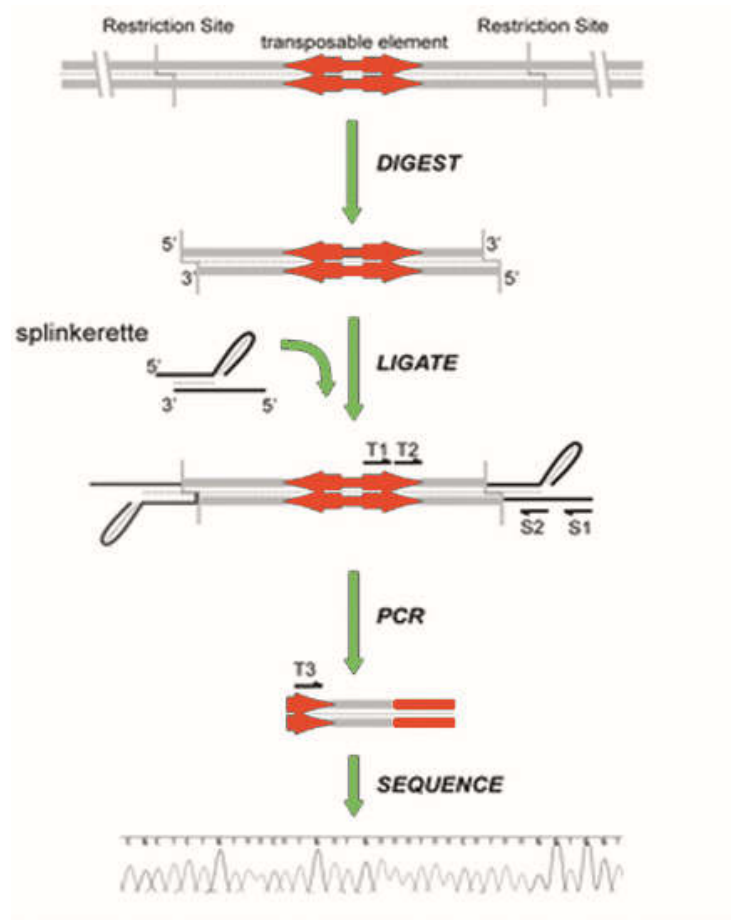


Figura N°8: Se aísla el ADN<sub>g</sub> de la línea que contiene el elemento transponible que se va a mapear. El ADN<sub>g</sub> es digerido por una enzima apropiada que produce extremos adhesivos. La enzima podría cortar dentro del elemento transponible pero dicha digestión no es necesaria para la reacción de *Splinkerette*-PCR. Un oligonucleótido bicatenario de splinkerette con un bucle de horquilla estable y extremos adhesivos compatibles se liga al ADN<sub>g</sub> digerido. Esto es seguido por dos rondas de PCR anidada ('S1' y 'T1' indican los pares de cebadores para la primera ronda de splinkerette y transposón, y 'S2' y 'T2' indican los pares de cebadores para la segunda ronda de PCR). Esto genera un fragmento de PCR que contiene el ADN<sub>g</sub> flanqueante entre el sitio de inserción del elemento transponible y el sitio de digestión genómica. Luego se usa un tercer cebador anidado dirigido contra el transposón (T3) para una reacción de secuenciación estándar de Sanger. En este esquema, solo un extremo del elemento transponible se dirige al aislamiento del ADN genómico flanqueante. El otro extremo también puede ser dirigido usando diferentes pares de cebadores "T" específicos para este otro extremo. Extraído de:(Potter & Luo 2010)

La Tabla N° 1A de la sección anexos detalla las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para esta técnica.

### 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 *PerfeCTa™ SYBR® Green FastMix™, Low ROX™ (Biosystem)*, la mezcla de reacción fue preparada como se indica a continuación:

Concentración Final	
Agua para PCR	-
2X KAPA SYBR®	1X
10 μM RT-PCR-Fw (10μM)	200 nM
10 μM RT-PCR-Rv (10μM)	200 nM
ADN	20 ng
50X ROX High/Low	1X
Volumen Final	20 μL

Los cebadores fueron diseñados con el programa *Primer3* para amplificar un fragmento < 200pb del gen *Venus* y su secuencia se muestra en la Tabla A1 de los anexos.

El protocolo del termociclador fue el siguiente:

Protocolo PCR	
95°C	5'
95°C	25'' x35 ciclos
63°C	25'' x35 ciclos
72°C	40'' x35 ciclos
72°C	10'

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 *Venus*. 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 cebadores 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 fusión o *melting* ( $T_m$ ) del producto de PCR, resultando en un pico en la curva. Por lo tanto, los diferentes fragmentos con diferentes temperaturas de fusión aparecen como picos separados (Lee et al. 2006).

***Construcción de la curva estándar para la determinación del número de copias del plásmido pT2/RMCE/Venus***

Se llevaron a cabo diluciones seriadas 1/10 del plásmido pT2/RMCE/*Venus* (el cual porta una única copia del gen *Venus*), comenzando con 100 ng de ADN plasmídico para llegar a la menor concentración utilizada de 0,1 ng. En la siguiente Tabla se muestra la correlación del N° de copias del gen *Venus* en función de la cantidad de ADN plasmídico presente:

pg de ADN plasmídico	N° de copias
<b>100</b>	5,93E+06
<b>10</b>	5,93E+05
<b>1</b>	5,93E+04
<b>0,1</b>	5,93E+03

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

$$\text{N° de copias} = \frac{6,02.1023 \text{ copias/mol} * \text{Cantidad de ADN (g)}}{\text{Longitud del ADN (pb)} * 660 \text{ g/mol/pb}}$$

***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 *Venus* 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:

$CTCF = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} * \text{medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$

### ***Transferencia Nuclear de Células Somáticas***

Para la generación de los embriones transgénicos a partir de las líneas celulares obtenidas se llevó a cabo un protocolo de varios de duración, que constó de los siguientes pasos:

#### **Día 1: Recolección de Ovocitos/Maduración:**

A partir de Ovarios obtenidos directamente de matadero y transportados inmediatamente al laboratorio, se procedió a la punción folicular. Se punzaron aquellos folículos de tamaño intermedio esto es entre 2 y 8 mm. Los folículos más grandes contienen fibrinógeno, que puede coagular, por lo tanto, se debe mantener separado el material proveniente de los folículos más grandes. Los folículos más pequeños contienen Complejos Ovocitos-Células del cúmulus (COCs) con bajo potencial de desarrollo. El volumen recogido se fue depositando en tubos de 15ml y dejando reposar durante 10-15. El pellet (conteniendo los COCs) fue transferido a una placa grande con medio TALP (medio tamponado para mantención y lavado de embriones. Ver formulación en Anexo) donde se seleccionaron bajo lupa estereoscópica aquellos COCs completamente rodeados por varias capas de células de *cúmulus* compacto y citoplasma homogéneamente granuloso en los ovocitos.

Para la maduración *in vitro* (MIV) los COCs recolectados en el paso anterior fueron colocados en gotas de 100µL de medio TCM suplementado, recubierto con aceite mineral. Se colocaron hasta 20 COCs por gota. Los COCs en TCM se cultivaron durante

20-24 hs en estufa a 38,5° C, con saturación de humedad y atmósfera controlada de gases (5% CO<sub>2</sub>).

## **Día 2: Activación Partenogénica química (DMAP) y TNCS:**

El primer paso para la TNCS fue la denudación de los ovocitos madurados, los cuales se colocaron en tubos con 100µL de Hialuronidasa incubada previamente a 37° C. Luego de someterlos a agitación por vortex durante 2 minutos, se frenó la actividad de la hialuronidasa mediante la dilución de la misma con 1ml de TALP. Se recuperaron y lavaron al menos 2 veces con TALP los ovocitos desnudados.

De los ovocitos desnudados, se seleccionaron aquellos que estaban maduros, y los mismos fueron sometidos a la acción de la Pronasa, para la eliminación de la Zona Pelúcida. Se pusieron los ovocitos maduros en gotas de 100 µL de TALP y se agregaron 10 µL de Pronasa (concentración final: 1.5 mg/mL). Se dejó actuar la Pronasa 3-6 minutos sobre platina a 37° C. Antes que se degradara completamente la ZP los ovocitos fueron transferidos a gotas con medio TALP suplementado con 10% de SFP para frenar la acción de la misma y las ZP fueron removidas mediante pipeteo (de ser necesario).

Los ovocitos sin zona fueron teñidos con *Hoechst 33342* (concentración final 1µg/mL) durante 10-15 minutos y se procedió a la enucleación mediante el uso de micromanipuladores bajo microscopio invertido.

Luego de la enucleación, los ovocitos enucleados fueron tratados con 1mg/mL de Fitohemaglutinina durante algunos segundos y luego adheridos a la célula donante de núcleos (en este caso fibroblastos fetales bovinos procedentes de las líneas monoclonales transgénicas obtenidas previamente). A los complejos ovocito-célula donante se los transfirió al medio de fusión y colocados en la cámara de fusión que contenía 2mL del mismo medio. Los complejos ovocito-célula donante se colocaron perpendiculares a los electrodos y se los sometió a fusión bajo las siguientes condiciones:

<b>Mode</b>	<b>LV</b>
<b>Volt (DC)</b>	0,075
<b>P. length</b>	0,30 µseg
<b>Pulse</b>	2
<b>Interval</b>	100 m seg



Los complejos fusionados se dejaron descansar durante 2 hs en medio SOF (tiempo de reprogramación) y se los activó partenogénicamente.

Para la activación diploide se colocó los embriones reconstituidos en la solución de Ionomicina durante 4 minutos (en oscuridad) y se los lavó al menos 3 veces con TALP luego de transcurrido el tiempo. Inmediatamente posterior a esto, los embriones reconstituidos fueron colocados en gotas de 100  $\mu$ L de medio SOF con 6-DMAP al 1%. Se los cultivó durante 3 Hs en estufa a 38,5° C, con saturación de humedad y atmosfera controlada de gases (5% CO<sub>2</sub>). Luego de las 3 hs de cultivo, fueron retirados del 6-DMAP y lavados al menos 3 veces con medio TALP y colocados en gotas de 100 $\mu$ L de medio SOF recubiertas con aceite mineral y cultivados durante 7-8 días en estufa a 38,5° C, con saturación de humedad y atmósfera controlada de gases (5% de O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>).

Pasado el tiempo de cultivo, se determinó el porcentaje de producción de embriones (tomando como positivos aquellos que habían llegado al estadio de blastocisto) y se observaron bajo luz UV en microscopio invertido para corroborar que se trate de embriones transgénicos (expresaban la proteína fluorescente verde).

Las soluciones y medios que utilizados son detallados en el anexo 2.

### ***Vitrificación, descongelado y recuento de células de embriones***

Embriones clonados que expresaban el transgen fueron vitrificados mediante las metodologías propuestas previamente (Martínez et al. 2016; Traldi et al. 2016). Para ello, los embriones fueron sumergidos brevemente en soluciones seriadas de glicerol y etilenglicol secuencialmente a temperatura ambiente como se detalla a continuación: solución de glicerol al 10% durante 5 minutos, seguida por la solución de 10% de glicerol y 20% de etilenglicol  $\beta$  durante 5 minutos y, finalmente, la solución de etilenglicol  $\beta$  al 25% durante 30 segundos. Los embriones fueron aspirados dentro de tubos crioviales de 1ml y los tubos sumergidos en nitrógeno líquido.

Para la desvitrificación, los embriones recuperados del nitrógeno líquido fueron colocados inmediatamente en PBS suplementado (12,5% etilenglicol, 12,5% glicerol, 0,5M sacarosa, 20% SFB) durante 5 minutos. Luego de ello, los embriones fueron transferidos a soluciones 0,5M y 0,25M de sacarosa, 5 minutos en cada una. Finalmente, los embriones fueron lavados al menos dos veces en PBS suplementado con SFB al 1%.

Luego del descongelado, los embriones fueron puestos en medio SOF y el número de células de los blastocistos expandidos nuevamente fue determinado mediante la tinción con *Hoechst 33342* (1mg/mL) durante al menos 10 minutos.

Los núcleos fueron visualizados y contados usando luz ultravioleta en un microscopio equipado con epifluorescencia.

# Resultados

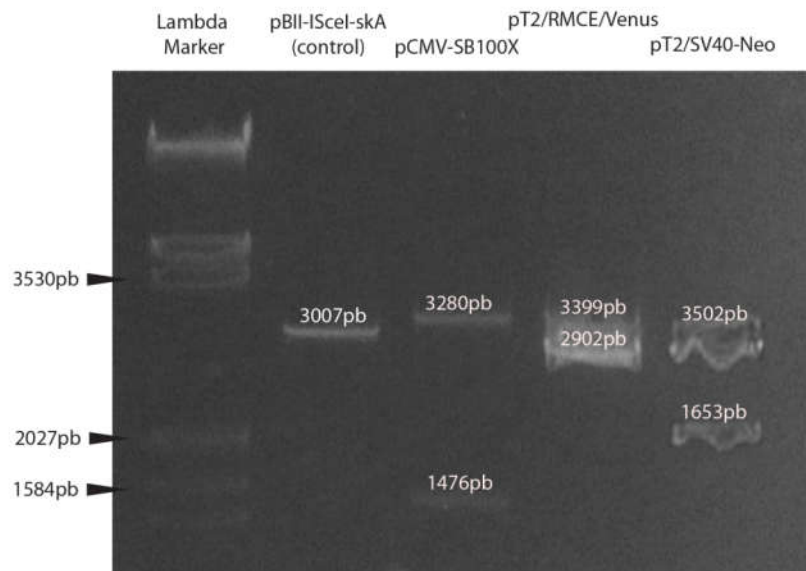


## Resultados

### *Transformación en bacterias, amplificación y purificación de los plásmidos*

Realizando el protocolo de competencia y transformación con bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ , se lograron obtener bacterias transformadas con los distintos plásmidos. Una vez obtenidas las bacterias transformadas, se procedió a realizar las técnicas de extracción de ADN plasmídico para su correspondiente análisis de integridad e identificación.

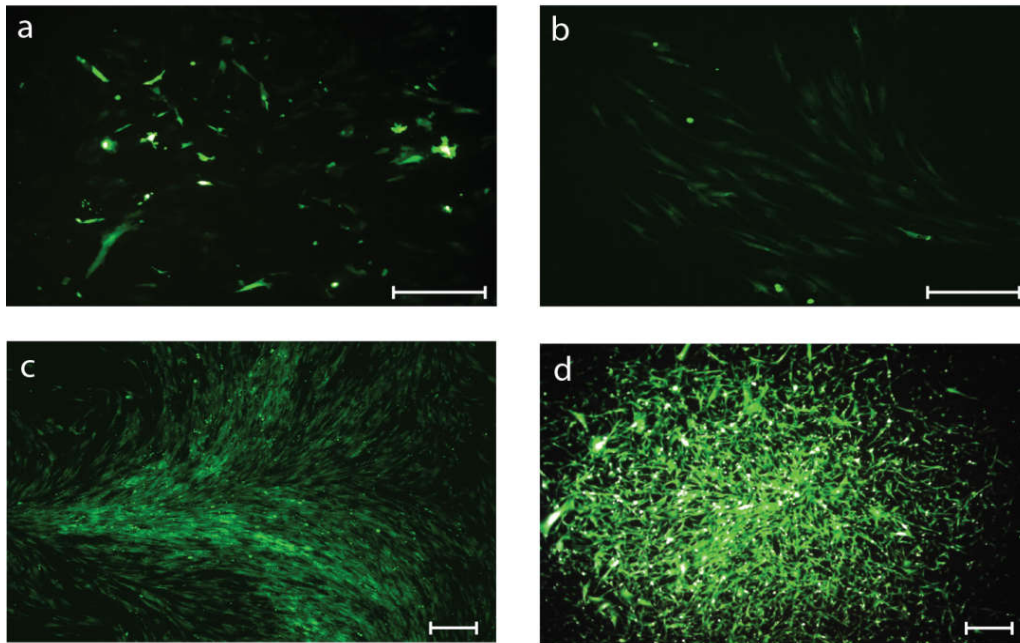
Se comprobó que la integridad del ADN plasmídico obtenido mediante la técnica de miniprep comercial era óptima para su uso en los experimentos propuestos (ve Figura N° 9), obteniéndose las bandas compactas correspondientes a las diferentes conformaciones del plásmido de los pesos esperados teniendo en cuenta los tamaños correspondientes, y ausencia de ADN degradado. Además, mediante el uso de las diferentes enzimas de restricción, se pudieron identificar todos los plásmidos de manera correcta, obteniéndose los patrones de bandeos esperados para cada uno. Los resultados de las identificaciones se muestran en la Figura N° 9.



**Figura N°9.** Gel de agarosa con las corridas correspondientes a los plásmidos enteros y a las digestiones enzimáticas de los plásmidos. pBII-ISceI-skA digerido con XbaI; pCMV-SB100X, pT2/RMCE/Venus y pT2/SV40-Neo digeridos con HindIII.

### *Transfección de FFB, expansión y recuento de colonias*

Una vez los FFB habían alcanzado un 80% de confluencia aproximadamente y se encontraban en activa división, se llevaron a cabo los experimentos de cotransfección con dos y tres plásmidos según el diseño experimental. Luego de 48 hs post tratamiento se confirmaron que las cotransfecciones fueron exitosas, mediante la observación de la expresión de la proteína *Venus* bajo microscopio de fluorescencia.



**Figura N°10.** Colonias positivas para la expresión de ambos transgenes (*Venus* y Resistencia a G418) en diferentes estadios de selección con G418. A) 48Hs post-transfección. B) 6 días de selección. C) 10 días de selección. D) 14 días de selección.

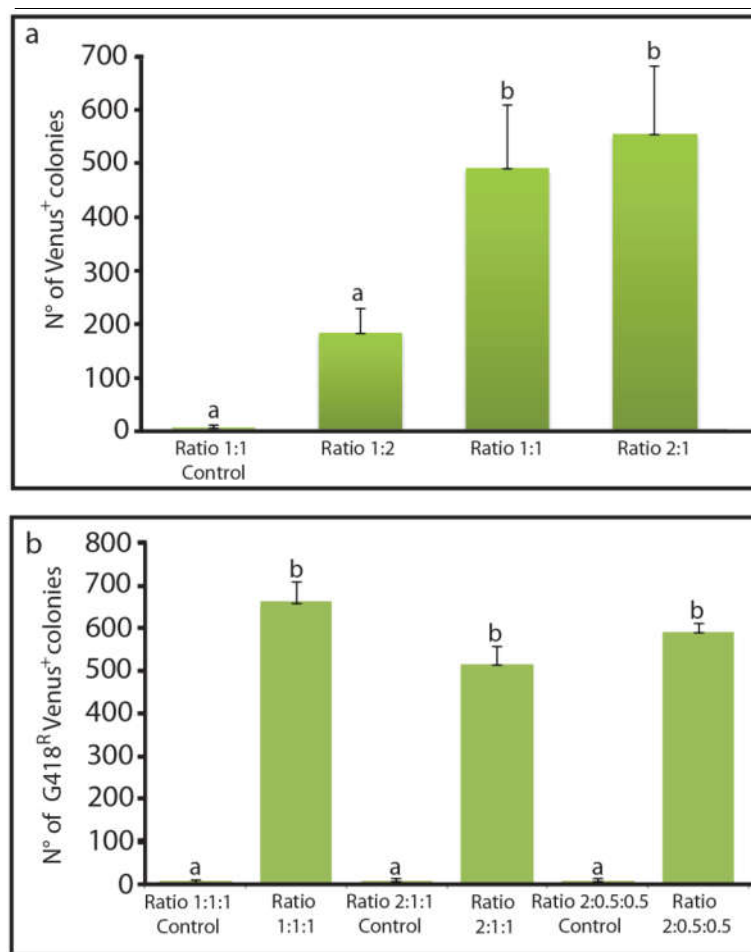
Luego de transcurridas las 48 horas post-transfección, se pasaron las células de los pocillos a placas de 100 mm diámetro y se cultivaron durante el tiempo necesario para que se formaran las colonias, procediéndose al recuento de las mismas para cada tratamiento.

En la Figura N° 10 se observan fotografías tomadas de diferentes colonias *Venus*<sup>+</sup> y resistentes al antibiótico G418, a diferentes momentos durante la selección con antibiótico.

Como se puede ver en ambos gráficos, se obtuvieron diferencias significativas en el número de colonias formadas para cada tratamiento, cuando se los comparaba con sus

respectivos controles; corroborando la elevada actividad de la enzima transposasa como catalizadora de eventos de integración del ADN del transposón en el genoma bovino, en comparación a la posibilidad de inserción del mismo, mediante mecanismos de inserción no facilitados.

Se observaron diferencias en el número de colonias de hasta 88 veces y 95 veces con respecto a los controles para los tratamientos con transposasa en relación a los sin transposasa para las cotransfecciones con dos plásmidos y las cotransfecciones con tres plásmidos respectivamente (ver Figura N° 11).

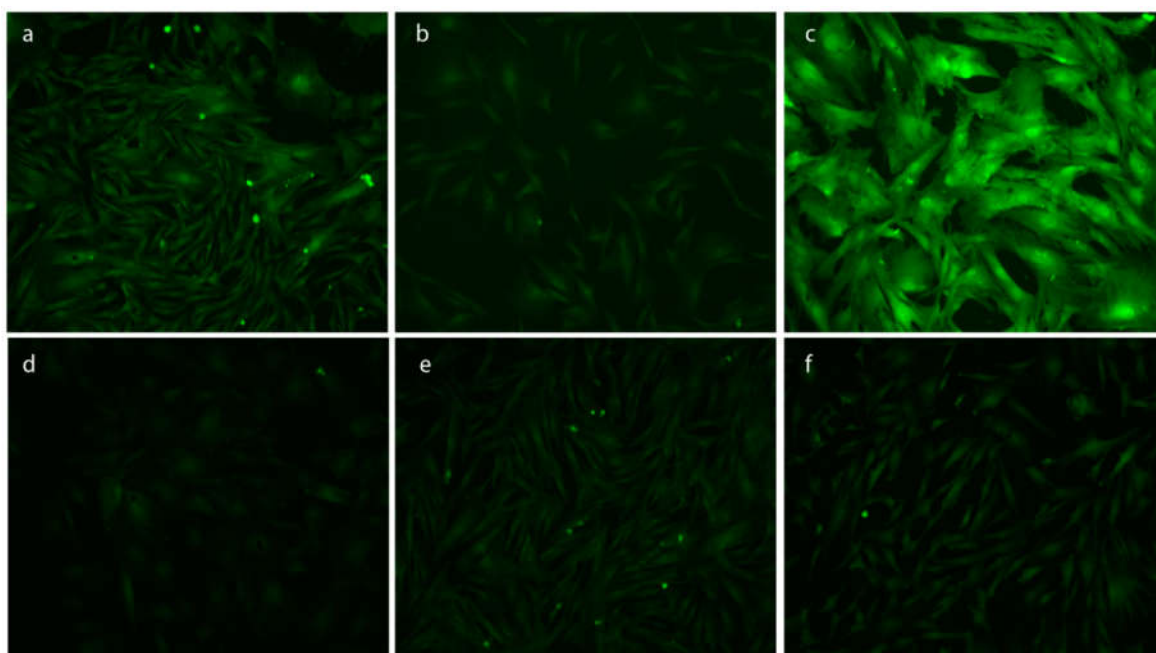


**Figura N° 11.** Recuentos del número de colonias para las cotransfecciones con dos (a) y tres (b) plásmidos. Diferentes letras en las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p < 0,01$ )

### *Aislamiento de líneas monoclonales a partir de colonias en placas*

Una vez que transcurrió el período de selección con G418, se procedió con el aislamiento de colonias individuales, con el fin de obtener líneas monoclonales positivas para ambos transgenes. Mediante el uso de anillos de clonado se levantó el mayor número de colonias monoclonales por placa y se las expandió hasta obtener al menos  $1 \times 10^6$  células por cada línea.

En la Figura N° 12 se observan fotografías tomadas a algunas de las líneas monoclonales obtenidas.



**Figura N° 12.** Líneas Monoclonales para la expresión de ambos transgenes (*Venus* y resistencia a G418) luego de realizado el aislamiento y la expansión. A) Línea Monoclonal 16. B) Línea Monoclonal 25. C) Línea Monoclonal 27. D) Línea Monoclonal 45. E) Línea Monoclonal 82. F) Línea Monoclonal 87.

### *Extracción del ADNg de cada línea monoclonal*

Una vez que las líneas monoclonales fueron suficientemente expandidas en número, se procedió a la extracción del ADNg de las mismas, el cual sería utilizado posteriormente para los estudios orientados a caracterizar los procesos de inserción genómica.

Como se puede observar en la Figura N° 13 se realizaron las extracciones de los ADNg de las 6 líneas monoclonales previamente nombradas (LM16, LM25, LM27, LM45,

LM82 y LM87). En el gel de agarosa obtenido luego de la corrida electroforética de los ADN<sub>g</sub> purificados con un kit comercial se pudo observar las bandas bien definida correspondientes a los ADN genómicos. La presencia de estas bandas definidas y la ausencia de bandas difusas en escalera (“chorreado”) evidencian la integridad del ADN genómico

A pesar de que en la figura los AND<sub>g</sub> correspondientes a las Líneas Monoclonales LM16 y LM25 no se observaron, la concentración de los mismos fue suficiente para las posteriores determinaciones mediante PCR.



**Figura N° 13.** Gel de agarosa correspondiente a la corrida electroforética de las muestras de AND<sub>g</sub> purificado a partir de las líneas monoclonales. En cada calle se sembró 1  $\mu$ L de muestra de ADN<sub>g</sub> de cada una de las líneas.

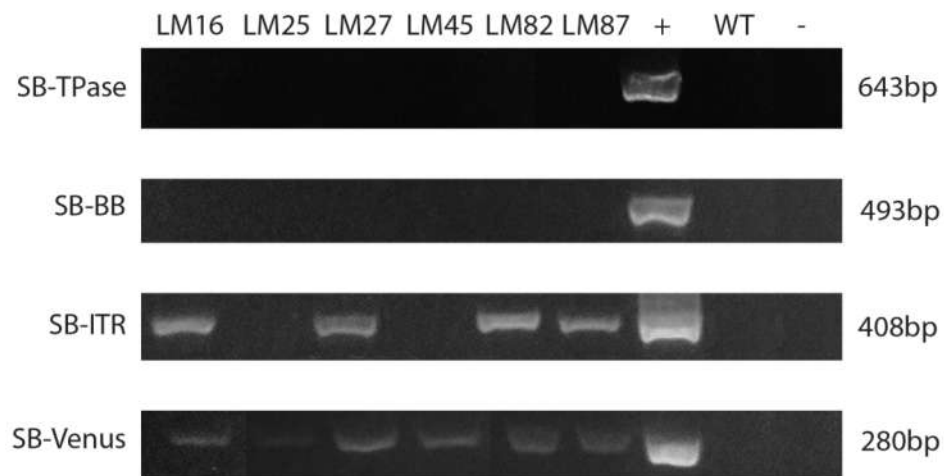
### ***Determinación del mecanismo de integración del transgén al genoma de la célula mediante PCR***

Una vez logradas la optimización del protocolo de PCR de cada juego de cebadores, se procedió directamente al análisis de los ADN genómicos obtenidos.

Como se puede observar en la Figura N° 14, la totalidad de las líneas analizadas fueron positivas para la amplificación de la Venus, como se esperaba. Además, todas las líneas fueron negativas para la amplificación de la transposasa (SB-TPase), indicando que no hubo inserción al azar del vector auxiliar que expresa la transposasa.

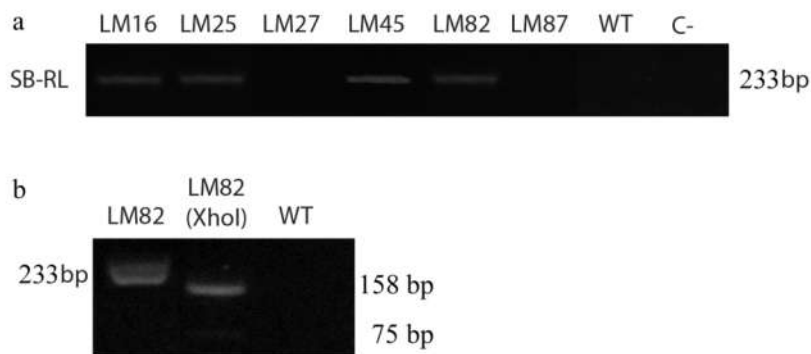
Por otro lado, en 4 de las líneas monoclonales (LM16, LM27, LM82 y LM87), se observó un producto en la PCR correspondiente a la amplificación del plásmido entero (SB-ITR) demostrando que existe al menos una copia del plásmido que se insertó en el genoma de dichas líneas por mecanismos no-transposicionales. A pesar de esto, la PCR correspondiente a parte del esqueleto plasmídico (SB-BB) dio negativa para todas las líneas.





**Figura N° 14.** Geles de agarosa correspondientes a las corridas electroforéticas de las amplificaciones por PCR realizada a cada una de las líneas. Para cada una de las reacciones se corrieron las 6 muestras de ADN<sub>g</sub> de líneas monoclonales (LM16, LM25, LM27, LM45, LM82 y LM87); un control positivo (+), en este caso el plásmido pT2/RMCE/*Venus*; un control negativo (-), que fue agua calidad HPLC y un ADN<sub>g</sub> proveniente de FFB *wild type* (WT). Sobre a derecha de la figura se indican los tamaños productos, coincidentes con los esperados.

Para determinar si hubo inserción genómica al azar del esqueleto del plásmido religado, producto remanente luego del evento de transposición se realizó la amplificación por PCR a las muestras de los ADN<sub>g</sub> de las 6 líneas con el juego de cebadores SB-RL. En 4 de ellas, se obtuvo producto del tamaño esperado, indicando la ocurrencia de este fenómeno (ver Figura N° 14a). Se tomó al azar el producto de una de ellas, se lo purificó mediante un kit y se lo sometió a digestión con la enzima XhoI para corroborar que se trataba del producto esperado. Como puede observarse en la figura N° 15, el producto de la amplificación sometido a la digestión con XhoI dio como resultado el patrón de bandas esperado (dos bandas, una de 158pb y la otra de 75pb; ver Figura N° 15b).



**Figura N° 15.** a) Gel de agarosa correspondiente a las amplificaciones por PCR realizadas a cada una de las líneas (LM16, LM25, LM27, LM45 y, LM82) con los cebadores SB-RL, para el análisis de la inserción al azar del remanente del esqueleto después de la transposición. control negativo (-), que fue agua calidad HPLC y un ADNg proveniente de FFB *wild type* (WT). Se indica al costado derecho, el tamaño del producto esperado.

b) Gel de agarosa correspondiente a la digestión del producto de la PCR con los cebadores SB-RL. Se sometió una muestra del producto de la PCR a digestión (LM82 (XhoI)) y se la corrió junto a un control de producto no digerido (LM82) y uno de una amplificación de ADNg *wild type*.

### ***Determinación de la Citotoxicidad de PEIs de diferentes PM***

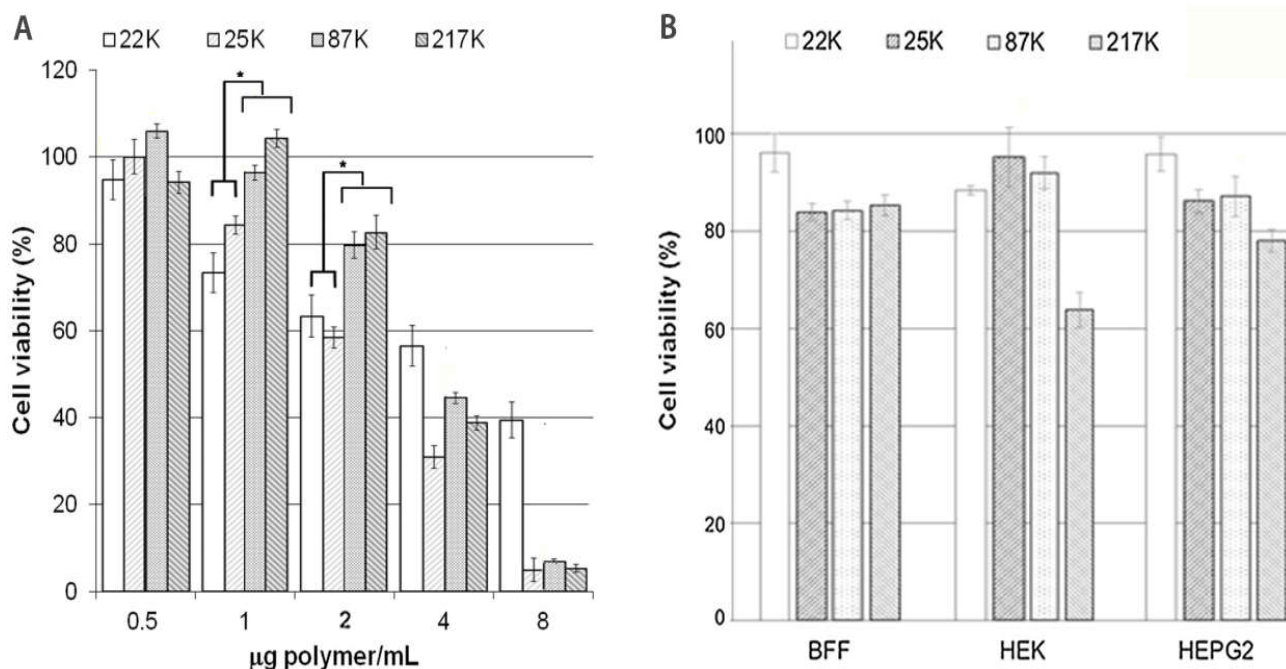
Se sabe que la citotoxicidad de los polímeros catiónicos se ve afectada por el peso molecular de los mismos. Teniendo en cuenta esto, se determinó la citotoxicidad de los diferentes PEI estudiados (22K, 25K, 87K y 217K), a diferentes concentraciones.

Los resultados demuestran que a medida que aumentan las concentraciones, la viabilidad de los FFB disminuye, para todos los polímeros estudiados. No se observó efecto citotóxico a concentraciones de PEI de 0,5µg/ml, para ninguna de las PEI.

Para concentraciones de 1µg/mL y 2 µg/mL de PEI se vio afectada significativamente la viabilidad de los FFB para PEI 22K y PEI 25K, pero no para PEI 87K y 217K. PEI 22K fue el polímero de menor citotoxicidad, sin embargo, tuvo eficiencias de transfección muy pobres (ver Tabla 4). A 4 µg/mL todos los polímeros fueron altamente citotóxicos, disminuyendo la viabilidad celular por debajo del 60%.

Posteriormente a esto, se analizó el efecto de la adición de SFB sobre la toxicidad de los PEI en las 3 líneas celulares. Para ello, se eligió continuar con los experimentos con la concentración de 2 µg/mL de PEI, ya que a concentraciones más altas de 2 µg/mL, la viabilidad de las células sometidas a las mismas, disminuía de manera considerable para todas las PEI. La presencia de suero no generó cambios en la citotoxicidad para ninguna de las PEI en ninguna de las 3 líneas celulares, salvo para PEI 217K en células HEK 293,

donde se vio una marcada disminución de la viabilidad celular, cercana al 60%. Estos efectos se muestran en la Figura N°.16.



**Fig. 16.** Efecto dosis-dependiente de los polímeros catiónicos en DMEM sin FBS o pADN sobre la viabilidad de FFB. La viabilidad celular se midió mediante el metabolismo de MTT. Los resultados se expresan como un porcentaje de la absorbancia de las células no tratadas y se presentan como la media de tres repeticiones independientes  $\pm$  SEM. La viabilidad de las células tratadas con PEI 22K y 25K a 1 y 2  $\mu\text{g}$  de polímero por ml fue significativamente menor en comparación con los otros polímeros estudiados (asterisco denota diferencias en  $p < 0,05$ ). B. Efecto de la exposición a polímeros de diferente tamaño (sin pADN; 2  $\mu\text{g}$  de polímero/ml en DMEM + 10 % FBS) sobre la viabilidad celular medida mediante ensayo MTT. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres repeticiones independientes. Los resultados se expresan como un porcentaje de la absorbancia de las células no tratadas y se presentan como la media de tres repeticiones independientes  $\pm$  SEM Imagen tomada de (Forcato et al. 2017)

### *Eficiencias de transfección para diferentes PEI*

Con el fin de probar la eficiencia del PEI para vehicular pADN al interior de las células, como una alternativa a agentes comerciales de transfección (por ejemplo *JetPrime*), FFB fueron incubados con PEI de diferentes pesos moleculares (22K, 25K, 87K, 217K), y diferentes relaciones PEI:ADN en DMEM sin SFB.

Como puede observarse en la Tabla N°4, las eficiencias de transfección (en porcentaje de células fluorescentes a las 48 hs.) variaron entre 0,5 y 38,4%, siendo las de las relaciones 1:1, para cualquier PEI, las más bajas, salvo para la PEI 25K que fue la que en general dio mejores tasas de transfección en todo el experimento. Así mismo, se observa que estas eficiencias mejoran considerablemente cuando la relación cambia a 2:1, con 1µg de ADN, para todos los PEI.

Relación Polímero/ADN (w/w)	1:1			2:1	
pADN (µg)	2	1	0,5	1	0,5
PEI 22K	2,5	0,7	0,8	21,2	2,6
PEI 25K	32,5	13,5	1,2	38,4	12,2
PEI 87K	1,1	0,5	0,6	24,0	2,7
PEI 217K	13,0	7,3	0,6	22,1	15,1

Tabla N°4. Eficiencias de transfección (porcentaje de células fluorescentes) obtenidas con diferentes relaciones polímero/ADN (1:1, y 2:1) en DMEM sin SFB.

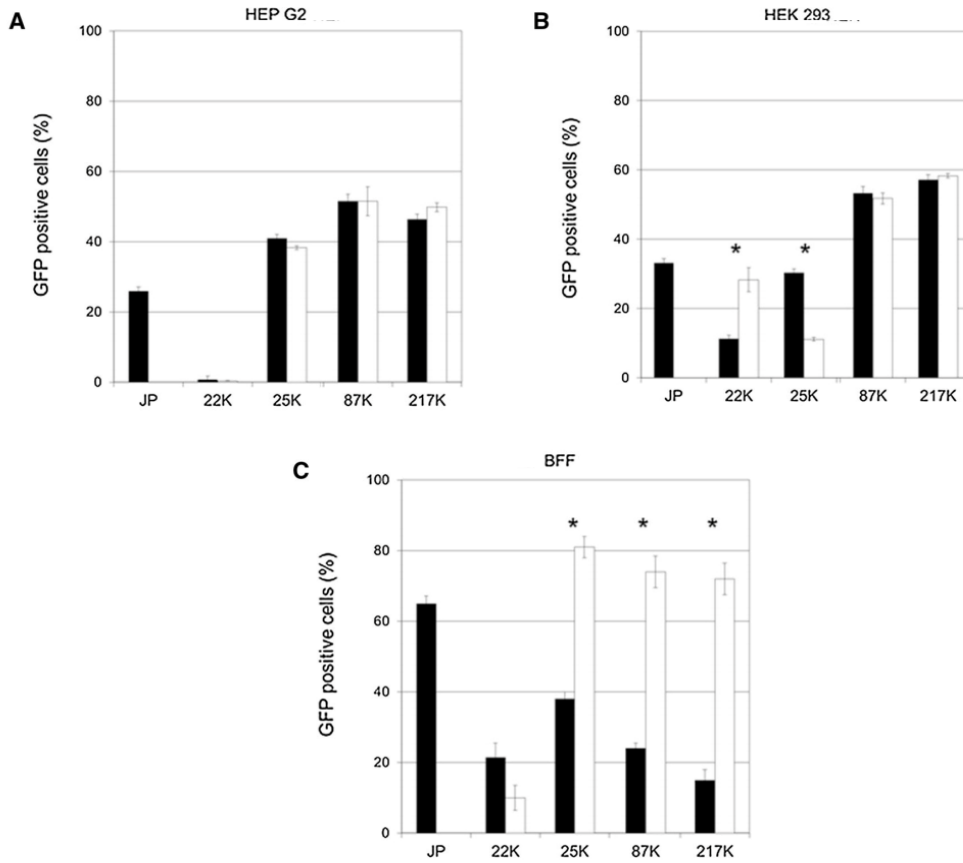
### *Efecto del SFB en la transfección con PEI*

Se hipotetizó que la adición de SFB durante la transfección con PEIs disminuye la citotoxicidad y aumentaba la eficiencia de transfección. FFB fueron transfretados con diferentes polímeros, en ausencia o presencia de SFB (10% en DMEM) y la eficiencia de transfección fue determinada por citometría de flujo. Para este estudio, se eligió la relación polímero/ADN 2:1, asegurando un balance entre eficiencia y toxicidad.

La presencia de SFB durante el paso de complexación incrementó significativamente la eficiencia de transfección tanto para PEI 87K, PEI 217K y PEI 25K, mientras que no incrementó la eficiencia para PEI 22K. Interesantemente, PEI 25K mostraba una elevada toxicidad en ausencia de SFB, comparada con 87K y 217K. El agregado de SFB a PEIs de bajo MW, podría incrementar considerablemente el tamaño de los complejos, reduciendo el efecto toxico de los mismos. (ver Figura N° 17c.).

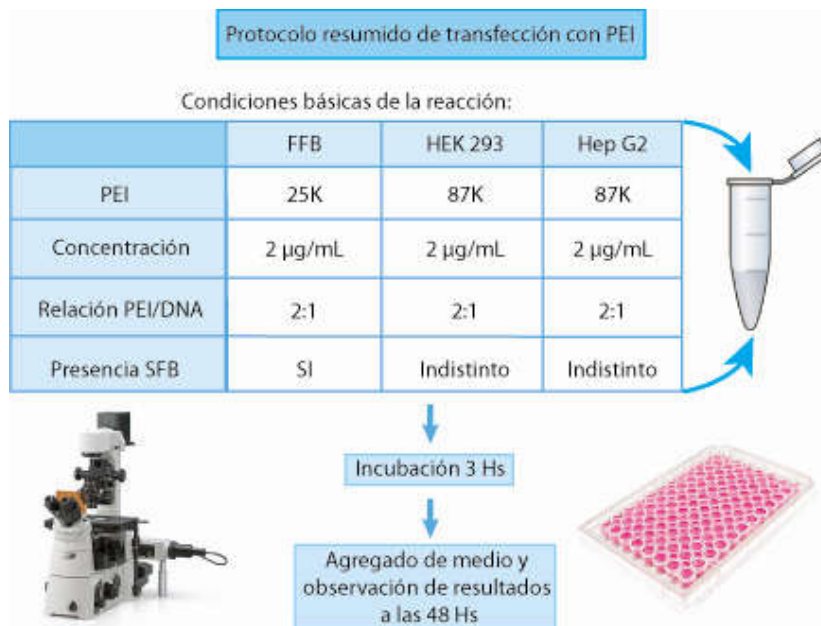
Los mismos experimentos realizados en FFB, fueron replicados en dos líneas muy comunmente utilizadas como modelos, HEK 293 y Hep G2. En ambas, PEI 87K y PEI 217K mostraron eficiencias de transfección más altas que PEI 25K. Por otro lado, la

presencia de SFB no generó un aumento en la eficiencia de transfección en HEK 293 ni Hep G2 (ver Figura N° 17a y c).



**Figura 17.** Efecto de la preincubación de complejos (polímero/ADN, relación 2: 1) en DMEM solo o suplementado con FBS al 10% sobre la eficacia de la transfección (DMEM, barras negras, DMEM+FBS, barras blancas) en Hep G2 y HEK 293 y FFB (A, B y C respectivamente). Los asteriscos indican diferencias ( $p < 0,05$ ) entre DMEM y DMEM+SFB dentro de cada tratamiento de PEI. Imagen tomada de (Forcato et al. 2017)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos previos, se propone un protocolo de trabajo de transfección con PEI, para las 3 líneas utilizadas en el trabajo, detallado en la Figura N°:18

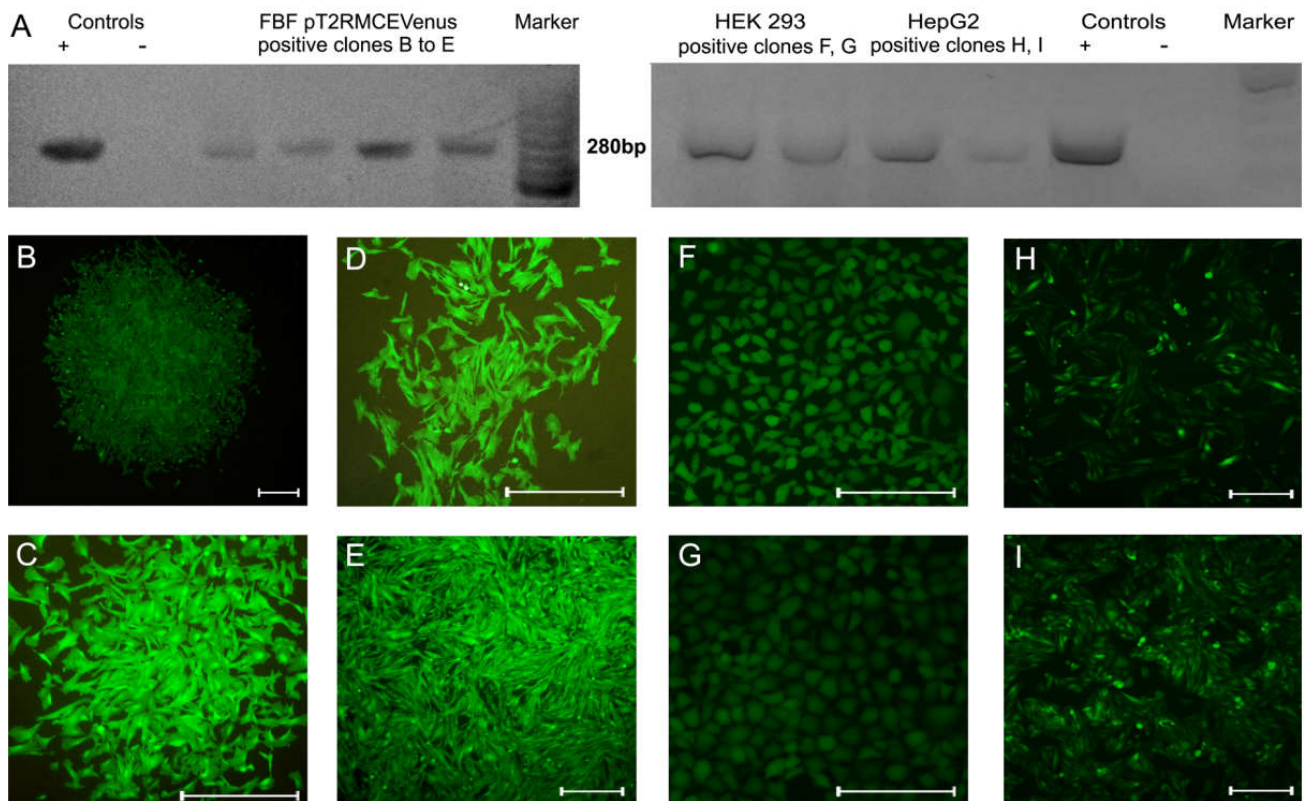


**Figura 18.** Resumen del protocolo de trabajo con PEI para todas las líneas celulares estudiadas en este trabajo.

### *Generación de líneas estables con PEI*

Debido al equilibrio entre eficiencia y toxicidad, PEI 25K fue elegido como vehículo para la generación de las líneas estables para FFB, HEK 293 y Hep G2. Las líneas fueron cotransfectadas con el sistema de dos componentes SB, y seleccionadas con G418 durante un periodo de 21 días.

Se le extrajo ADNg a las líneas resistentes para su posterior genotipificación por PCR. Líneas monoclonales de FFB (ver Figura N° 19a-d), HEK 293 (ver Figura N° 19f-g) y Hep G2 (ver Figura N° 19h-i) fueron positivas para la amplificación de la secuencia de la *Venus*, confirmando su correcta incorporación por PEI con posterior integración por transposición en el genoma.



**Figura 19.** a. Análisis de PCR de ADN genómico de líneas celulares monoclonales transgénicas para SB. Amplicón de Venus (producto de 280 pb) originado a partir de ADN genómico de cuatro líneas monoclonales de FFB (panel izquierdo), dos líneas de HEK 293 y dos de Hep G2 (panel derecho) seleccionadas al azar. C+ = controles positivos. C- = controles negativos. Marcadores PM: *GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, panel izquierdo)* y *100 bp DNA Ladder (InvitrogenTM, panel derecho)*. Imágenes de cuatro colonias monoclonales de FFB (b-e) transfectadas con el sistema *Sleeping Beauty* y seleccionadas durante 21 días con G418. Dos líneas monoclonales de HEK 293 (f, g) y dos de Hep G2 (h, i) transfectadas con el sistema *Sleeping Beauty* y seleccionadas durante 21 días con G418. Barras = 100 μm. Imagen tomada de (Forcato et al. 2017).

***Determinación de los sitios de inserción del transposón SB en el genoma bovino  
Splinkerette-PCR***

Con el fin de determinar de manera precisa los sitios dentro del genoma bovino donde se produjeron las inserciones del transgen mediante el proceso de transposición, se llevaron a cabo *Splinkerette*-PCRs a los ADN<sub>g</sub> extraídos de las diferentes LM, con el posterior análisis por alineamiento con la base de datos de *GenBank*. Mediante el uso de la técnica *Splinkerette*-PCR pudieron amplificarse de manera eficiente y precisa, los fragmentos del genoma correspondientes a los sitios de inserción en el mismo para 20 eventos de integración del transposón *Sleeping Beauty*.

Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se alinearon mediante el software online *BLASTn* con el genoma bovino presente en la base de datos de *GenBank*, pudiendo identificar las secuencias de 15 de ellas. De las integraciones secuenciadas, el 66% (10 integraciones) correspondían a integraciones dentro de secuencias intergénicas, y el 33% de las integraciones restante (5 integraciones) a inserciones dentro de diferentes regiones codificantes. Del total de 19 eventos de integración secuenciados, 4 no lograron ser identificados. Los detalles de los resultados del alineamiento se muestran en la Tabla N° 5 (para mayor facilidad de lectura, solo se muestran las últimas 20 pb de las mismas). En los anexos se detallan las secuencias completas que fueron alineadas. En aquellos casos donde las secuencias obtenidas como resultado del secuenciamiento fueron muy cortas, podrían ser necesarias otras técnicas complementarias para la asignación correcta del *locus*.



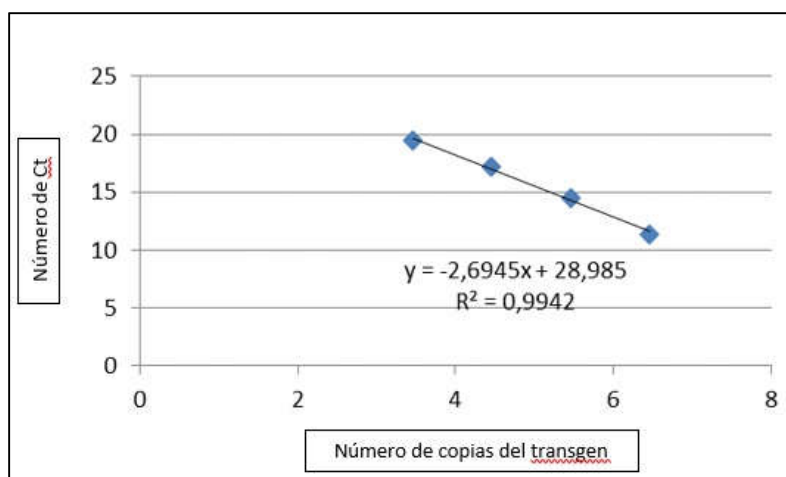
Tabla N°:5. Secuencias de los sitios de inserción del transposón SB y su respectiva localización en el genoma bovino.

Inserción	Cromosoma	Localización	Gen	Secuencia
1	Desconocido	Desconocido	Desconocido	AATNNNANNTCGGATC CCTA <b>TACAGTTGAAGT</b>
2	13	78983	Prion Protein (PRNP)	TAAGGGTGGTGCATA TGCA <b>TACAGTTGAAGT</b>
3	X	1	ZFX gene intron	GCCAAACACTGATCTA AGTA <b>TACAGTTGAAGT</b>
4	25	3016	Sorting nexin 29 (SNX29)	GGGCGTATGCGGAAAG GAAC <b>TACAGTTGAAGT</b>
5	26	2080521	Intergénica	AACAAAACAATATAGT GACC <b>TACAGTTGAAGT</b>
6	12	27360511	Intergénica	GCAGGTTTGAGGGCTG GAAT <b>TACAGTTGAAGT</b>
7	mtDNA	26009	Mitochondrial acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (ACAA2), complete cds	GTTTCCACTGTTTCCC CATC <b>TACAGTTGAAGT</b>
8	19	44952926	Intergénica	CTGGGAGGATCTGGAC CATA <b>TACAGTTGAAGT</b>
9	25	36298502	Intergénica	GATAAAGAAAATATGG CATG <b>TACAGTTGAAGT</b>
10	13	35994	Intergénica	GTTTCCACTGTTTCCC CATC <b>TACAGTTGAAGT</b>
11	22	24703993	Intergénica	ATCTGAATTCTAAGCA TTCAT <b>TACAGTTGAAGT</b>
12	5	Desconocido	Intergénica	GTGTTACATTTATTTTC CAGC <b>TACAGTTGAAGT</b>
13	Desconocido	Desconocido	Desconocido	ACCATATTCATTGTTA CAGC <b>TACAGTTGAAGT</b>
14	Desconocido	Desconocido	Desconocido	GGACTAGGAGAGACAA GAGT <b>TACAGTTGAAGT</b>
15	18	Desconocido	Intergénica	ATAATGGATTATCTGG GATC <b>TACAGTTGAAGT</b>
16	Y	465464	Y-linked ubiquitin-specific protease 9 (USP9Y) gene	TTTTAAAAATTAAATA AATAT <b>TACAGTTGAAGT</b>
17	22	15535315	Intergénica	AAGTTGGAGAGACACA ACTG <b>TACAGTTGAAGT</b>
18	26	24931481	Intergénica	TTTTAAAAATTAAATA AATAT <b>TACAGTTGAAGT</b>
19	Desconocido	Desconocido	Desconocido	GATTGACAAATAGCTT ACAT <b>TACAGTTGAAGT</b>

Tabla tomada de (Alessio et al. 2016)

### ***Determinación del número de copias del transgén por qPCR***

El análisis de PCR cuantitativa en tiempo real fue utilizado para evaluar el número de copias del transgén *Venus* integrados en el genoma bovino. Este número fue obtenido mediante un ensayo de cuantificación absoluta empleando una curva estándar generada con diferentes diluciones del plásmido *Venus* (ver Figura N°20). Los resultados se presentan en la Tabla N°.6 Los valores se encuentran dentro de un rango comprendido entre 1 y 7 copias por genoma.



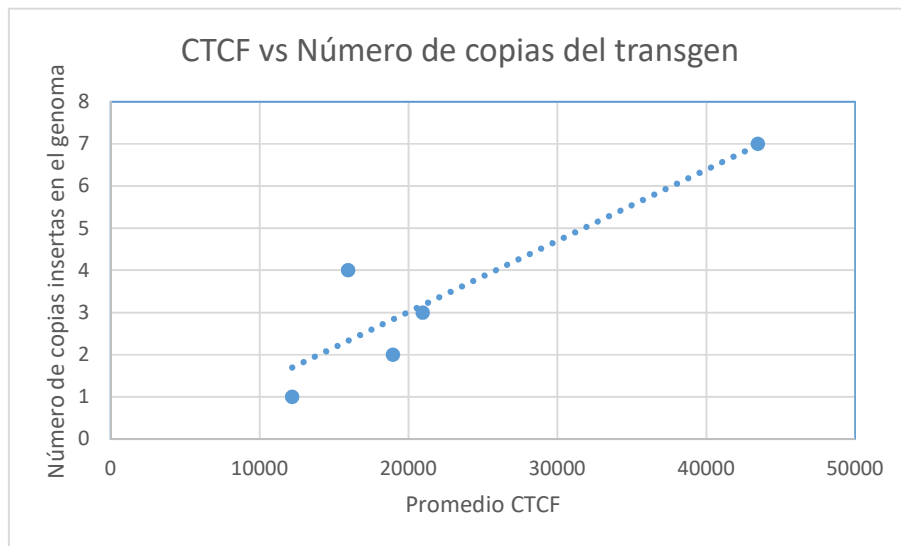
**Figura 20.** PCR cuantitativa en tiempo real. Curva estándar utilizada para la determinación del N° de copias en los clones transgénicos. Se grafica el número de copias del transgen en el genoma en relación al valor de Ct luego de la qPCR.

Tabla N° 6. Número de copias en líneas celulares transgénicas monoclonales determinado por qPCR.

<b>Línea Transgénica</b>	<b>Nro de copias/genoma</b>
<b>LM16</b>	7
<b>LM25</b>	1
<b>LM27</b>	1
<b>LM45</b>	3
<b>LM82</b>	2
<b>LM87</b>	4

### ***Relación entre el número de copias presentes en el genoma y la intensidad de Fluorescencia***

Como era de esperarse, las diferentes líneas transgénicas obtenidas presentaron diferentes niveles de expresión de *Venus* 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) (ver Figura N° 21).



**Figura 21,** Relación entre el número de copias del transgen por qPCR y la intensidad de la fluorescencia. El análisis de regresión lineal demostró una asociación entre las dos variables  $R^2 = 0,82$ ;  $p < 0,05$ )

### ***Generación de embriones bovinos transgénicos mediante TNCS***

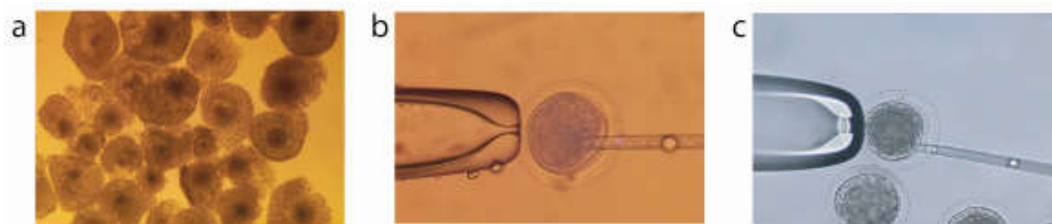
Para comprobar la capacidad de los fibroblastos transgénicos obtenidos para llevar a cabo el proceso de reprogramación nuclear y promover el desarrollo temprano de embriones bovinos, se realizó la TNCS con células pertenecientes a una línea celular policlonal de fibroblastos, obtenida por combinación de 3 líneas monoclonales obtenidas previamente.

### **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  $\mu$ L (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 hs (ver Figura 22a.).

### **Transferencia Nuclear de células somáticas: Método Zona Free**

Luego de 18 hs de maduración in-vitro, los COCs fueron denudados 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. Se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar y fueron enucleados (ver Figura N° 22b.). Luego de la enucleación, se realizó la transferencia nuclear (ver Figura N° 22c.) utilizando PHA y finalmente fueron colocados en el medio de fusión sobre la Cámara de Fusión BTX para recibir el pulso eléctrico. Para el cultivo embrionario fue necesario utilizar el sistema *Well of the Well (WOWs)* para cultivar a los embriones de manera individual



**Figura 22.** 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.

El desarrollo embrionario hasta el estado de blastocisto alcanzó un 36% en el caso de las transferencias con fibroblastos transgénicos (27 del total de 75 sometidos a TNCS),

valores ligeramente inferiores a los controles obtenidos por activación partenogénica (51%, 67 de 126). Los resultados de la TNCS se pueden ver en la Tabla N°.9.

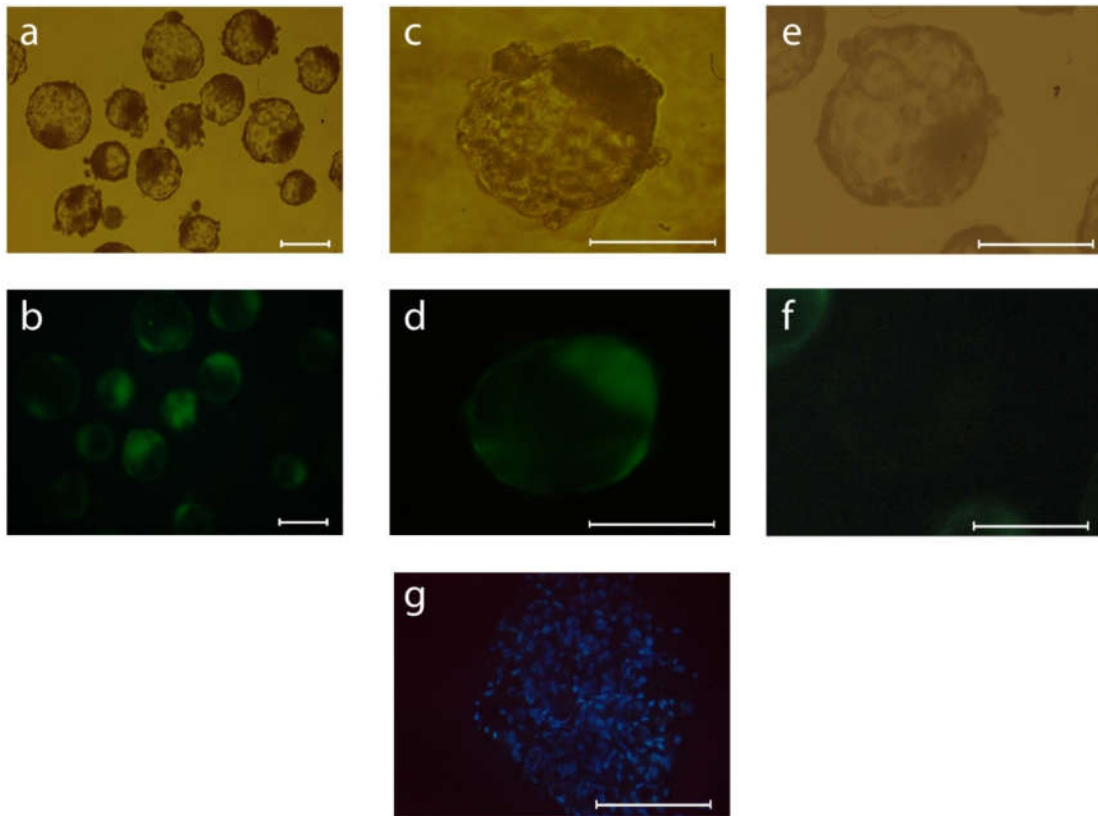
Tabla N°:7 Embriones producidos mediante TNCS con células transgénicas para el transposón *Sleeping Beauty*.

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Morulas (%)	Blastocistos (%)	Transgénicos +	
					Mórulas (%)	Blastocitos (%)
<b>pT2RMCEVenus</b>	75	66 (88.0)	29 (38.6)	27 (36.0)	15 (51.7)	15 (55.5)
<b>PA control</b>	126	122 (96.8)	76 (60,3)	67 (53.1)	-	-

n: número de embriones reconstruidos que fueron puestos en cultivo. Información proveniente de dos sesiones de TN independientes. PA: controles de activación partenogénica y cultivo in vitro. El porcentaje de mórulas y blastocistos transgénicos fue calculado sobre el total de mórulas y blastocistos respectivamente.

De los embriones que alcanzaron el estado de blastocisto, la mitad aproximadamente expresaron la proteína reportera *Venus*, luego de los 7 días de cultivo (ver Figura N° 23a-d). La autofluorescencia observada de los embriones no transgénicos fue insignificante (ver Figura N° 23e y f).

De los embriones que fueron vitrificados luego de la TNCS, dos fueron descongelados y cultivados para su reexpansión, a los mismos se los observó y se procedió al recuento de los núcleos para determinar el número de células, dando como resultado 91 y 165 células respectivamente. En la Figura N° 23g se observa la tinción de uno de los embriones vitrificados.



**Figura 23.** Microfotografías en campo claro (a y c) y fluorescencia (b y d) representativas de blastocitos obtenidos por TNCS con FFB transgénicos con *Sleeping Beauty* (barras= 100 mm). Los blastocitos transgénicos expresaron el fluoróforo reportero homogéneamente en el macizo celular interno y las células del trofoblasto (b y d). Blastocitos transgénicos Vitrificados/desvitrificados fueron teñidos con Hoechst 33342 para determinar el número de células (G). Blastocitos partenogénicos mostraron una autofluorescencia despreciable (f). Figura tomada de (Alessio et al. 2016)

# Discusión



## Discusión

La manipulación genética de animales ha revolucionado nuestro entendimiento de la biología por hacer posible estudiar, como nunca antes se había podido hacer, la expresión y función de genes a nivel de un animal completo. Las técnicas de transferencia génica han sido usadas para producir animales transgénicos, en los cuales cada célula lleva una nueva información genética o sus genes endógenos han sido modificados de alguna manera. Además, la manipulación del genoma, especialmente en aquellos animales de interés productivo, promete ser la base metodológica para desarrollos biotecnológicos aplicables a la producción animal y la salud humana. En este sentido, la producción de proteínas recombinantes con actividad biológica a partir de animales transgénicos hoy es una realidad.

La adaptación de los elementos transponibles para aplicaciones transgénicas en mamíferos está ganando aceptación por su relativa simpleza y seguridad respecto de otros métodos transgénicos clásicos. Además, las características de estos sistemas los convierten en candidatos potenciales en la terapia génica, como así también para introducir modificaciones en el genoma de animales para aplicaciones biotecnológicas. En la presente tesis se aborda el estudio de un transposón *Sleeping Beauty* perteneciente a la familia *Tc1/Mariner* para la introducción de material genético foráneo a fibroblastos fetales bovinos en cultivo, con el objetivo de producir animales transgénicos mediante la TNCS.

Ha sido demostrado que la transposasa SB puede funcionar en células y embriones de diferentes especies domésticas, incluyendo ganado bovino (Carlson et al. 2011; Garrels et al. 2011; Hu et al. 2011; Jakobsen et al. 2011). Cerdos transgénicos que llevan genes reporteros introducidos por transposición han sido producidos en células en cultivo usadas para TNCS (Carlson et al. 2011) o embriones de una célula (Garrels et al. 2011). De manera similar, integraciones de transgenes mediadas por transposición han sido documentadas en células de rumiantes (Hu et al. 2011; Jiang et al. 2011) y cigotos (Garrels et al. 2014). Sin embargo, la función y eficacia del transposón SB en células y embriones bovinos no ha sido rigurosamente examinado.

Los experimentos iniciales de este trabajo fueron orientados a determinar si un sistema SB de dos o tres componentes podría incrementar la eficiencia de integración de



transgenes en el genoma de fibroblastos bovinos, el tipo celular más común utilizado como donante de núcleo para realizar TNCS.

Para estudiar la funcionalidad de la transposasa SB en células bovinas, se cotransfectaron cultivos primarios de fibroblastos con los plásmidos correspondientes al sistema SB de dos componentes. Como se trata de un sistema de dos o más componentes, resulta necesario optimizar las cantidades de los plásmidos donante y ayudante para lograr las eficiencias de transposición deseadas. Relaciones de 1:1 y 1:2 (donante:ayudante) resultaron en 78 y 88 veces más colonias respectivamente, comparados con los controles. Estos resultados pueden indicar que la transposasa SB es altamente activa en células bovinas y que el incremento de la proporción del vector SB100X (ayudante) en la mezcla de transfección posibilita maximizar la integración del transgén en el genoma sin efectos tóxicos aparentes sobre las células. Interesantemente, dentro de los rangos de transposasa SB estudiados en nuestros experimentos, el fenómeno de inhibición por sobreproducción descrito para transposones SB (Lohe & Hartl 1996; Lampe et al. 1998) no fue observado. Debido a que el plásmido donante usado en los primeros experimentos carece de un casete de resistencia a un antibiótico para la selección positiva, realizamos un segundo experimento en el cual las células fueron transfectadas con dos plásmidos donantes, uno llevando el casete de expresión para la *Venus* y el otro conteniendo un gen NeoR el cual le confiere resistencia a G418. Esto permite seleccionar líneas celulares transgénicas clonales usando G418, un análogo a Neomicina. Los resultados de este experimento confirmaron la capacidad de la transposasa SB para mediar la incorporación de ADN exógeno dentro del genoma bovino con alta eficiencia (hasta 95 veces mayor al grupo control). Todas las colonias resistentes examinadas bajo la luz UV expresaban la proteína *Venus*. Esto refleja la habilidad de la transposasa SB para transponer simultáneamente dos transgenes provistos en plásmidos donantes separados (multiplex). Esta característica puede resultar muy práctica cuando el objetivo es obtener animales bitransgénicos. Además, integraciones genómicas independientes del casete de resistencia al antibiótico del gen de interés pueden ser usadas para segregar por cruzamiento el marcador de selección (Carlson et al. 2011), o por remoción del mismo mediante el uso de recombinasas *Cre* (Yu et al. 2013), para generar animales transgénicos sin secuencias para resistencia a antibióticos, facilitando así la aceptación pública de los mismos. Por otro lado, en experimentos de transgénesis, es de interés que se produzcan la menor cantidad posible de inserciones de secuencias no deseadas en el genoma. En el caso de la transgénesis mediada por transposones, estas secuencias pueden ser el esqueleto que se

liga nuevamente en el plásmido (Bell et al. 2010), el plásmido auxiliar que codifica la transposasa (Ivics et al. 1997; Yant et al. 2000; Mátés et al. 2009), y/o alguno de los plásmidos donantes, insertos por mecanismos no transposicionales (Ding et al. 2005; Ivics et al. 2009; Wu et al. 2006; Wilson et al. 2007; Dupuy et al. 2002; Dalsgaard et al. 2009; Aronovich et al. 2007). El análisis de las líneas transgénicas monoclonales estudiadas pudo demostrar que no hubo inserción del gen de la transposasa, lo cual previene futuras translocaciones del transgen en el genoma (saltos intragenómicos), y la producción de mosaicos genéticos. En cambio, se observó la inserción por mecanismos no transposicionales del plásmido completo (en 4 de las 6 líneas estudiadas) pudiendo deberse a un exceso de ADN plasmídico en los protocolos de transfección. Además, copias del esqueleto plasmídico remanente religado después de la transposición se encuentran insertas en el genoma, en concordancia con datos obtenidos previamente por otros autores (Wu et al. 2006; Bell et al. 2010; Saha et al. 2015; Urschitz, Kawasumi, Owens, Morozumi, Yamashiro, Stoytchev, et al. 2010).

Con el fin de incorporar metodologías alternativas a los agentes químicos comerciales, principalmente debido a los elevados costos de los mismos, llevamos a cabo la optimización de PEI de diferentes pesos moleculares para la transfección transitoria y estable de transgenes. En este trabajo, los transgenes son los de la proteína fluorescente *Venus* y la resistencia a Neomicina que fueron transferidos dentro del genoma de FFB y dos líneas comerciales (HEK 293 y Hep G2) muy utilizadas como líneas celulares modelo.

Se sabe que el PM de polímero catiónico afecta tanto a la eficiencia de transfección como a la citotoxicidad (Fischer et al. 1999). Las PEI de bajo PM ofrecen una eficiencia de transfección pobre y no son tóxicas o ligeramente tóxicas para las células expuestas tanto in vitro como in vivo (Lungwitz et al. 2005). Por el contrario, tanto los PEIs de alto PM *acilados* como *deacilados* son eficientes para suministrar ADN en las células, pero causan citotoxicidad significativa, principalmente a altas concentraciones. Se ha reportado que la alta concentración de cationes poliméricos en el medio extracelular es perjudicial para diferentes líneas celulares (Thomas, Ge, et al. 2005; Thomas, Lu, et al. 2005). Aquí se determinó la citotoxicidad de las PEIs de diferentes pesos moleculares (22, 25, 87 y 217 kDa), en células FFB, HEK 293 y Hep G2. Encontramos una considerable citotoxicidad dada por el aumento de las concentraciones de PEI de alto PM en ausencia de FBS. Por el contrario, la exposición de las células a los policationes en presencia de FBS redujo la citotoxicidad en todos los tipos de células estudiadas, apoyando la idea de que la

preincubación con SFB de los polyplexes proporciona una nueva forma de modificar PEI, aumentando su eficiencia como agente de transfección sin comprometer la viabilidad celular. El mecanismo exacto por el cual el SFB ejerce su efecto protector celular aún no se ha dilucidado, pero las posibles explicaciones son: (1) adsorción de PEI libre nociva por proteínas séricas o (2) extinción de carga superficial positiva de polyplexes haciéndolas por lo tanto menos dañinas para las membranas celulares (Tros de Ilarduya et al. 2010).

Los resultados indican que la relación 2:1 (PEI:ADN) fue la que mostró mejor eficiencia para todas las PEI analizadas. Destacamos que los PEI 87K y 217K tuvieron eficiencias similares a PEI 25K en FFB transfectados en presencia de SFB. Para las células HEK 293 y Hep G2, también se obtuvieron altas eficiencias de transfección con las PEI de mayores tamaños, incluso mayores a las obtenidas con agentes comerciales (*JetPrime*). El agregado de SFB en las transfecciones con PEI, generó un marcado incremento en la eficiencia de transfección principalmente en FFB. En las líneas celulares HEK 293 y Hep G2, no se observaron incrementos sobre la eficiencia, salvo para PEIs 22K en HEK 293. Además de esto, se observó una disminución en la deficiencia de transfección con PEI 25k en presencia de SFB para las células HEK 293.

La relación PEI:ADN se sabe que juega un rol crucial para maximizar la eficiencia de transfección, influyendo sobre el tamaño y las cargas superficiales de los complejos PEI:ADN, ya que pequeñas partículas catiónicas median la unión a proteoglicanos superficiales celulares desencadenando endocitosis celular (Huh et al. 2007; Rhaese et al. 2003). Una relación óptima entre polímero y ADN garantiza que no quede ADN o polímero libre, incrementando la eficiencia de la complexación haciendo los poliplexos más susceptibles a la internalización celular por endocitosis (Kichler 2004). Se debe evitar el exceso de polímeros libres, debido a que esta fracción no complejada pueden afectar la función de la membrana plasmática (Fischer et al. 1999). Incluso, la presencia de PEI en el núcleo celular podría interferir con los procesos transcripcionales llevando eventualmente a la muerte celular (Godbey et al. 2001). Los resultados sugieren que la baja citotoxicidad observada para los poliplexos preincubados en presencia de SFB puede estar relacionada a la adsorción de PEI libre a las proteínas del suero (Forcato et al. 2017). Con el objetivo de establecer con precisión los sitios genómicos donde se produjo la integración del transgen en las diferentes líneas monoclonales de fibroblastos fetales bovinos obtenidos previamente, se utilizó la técnica de *Splinkerette-PCR*, a través de la cual se obtuvieron y analizaron las secuencias de 19 inserciones individuales, de las

cuales, 15 pudieron ser secuenciadas e identificadas de manera precisa, mediante alineamiento con el genoma bovino, usando el software BLAST. A pesar de que el número de integraciones identificadas no fue el suficiente como para hacer un análisis estadístico válido, se observa una tendencia a no poseer una predilección para la inserción en regiones transcripcionalmente activas. De las 15 integraciones identificadas, el 66% de tuvieron preferencia regiones intergénicas y el 33% restante secuencias codificantes. Estos porcentajes concuerdan con los informados previamente (Turchiano et al. 2014; Yant et al. 2005; Ikeda et al. 2007). Además los resultados de la *Splinkerette*-PCR demostraron que todas las integraciones secuenciadas correspondían a eventos de transposición, ya que se encontraba la secuencia TA seguida por la secuencia del genoma bovino, de acuerdo a la mecánica a través de la cual se moviliza el transposón *Sleeping Beauty*.

Con el fin de determinar el número de copias del transgen incorporadas en el genoma de las líneas monoclonales obtenidas, se extrajo el ADNg de las mismas y el mismo fue sometido a qPCR. Basándonos en una curva de calibración obtenida con concentraciones conocidas del plásmico que codifica la *Venus*, los resultados de la qPCR mostraron que el número de copias del transgen variaba entre 1 y 7 por genoma. Previamente, otros autores obtuvieron resultados similares a los nuestros (Kacharovsky, 2012; Kolacsek et al., 2011). Los resultados obtenidos muestran a esta tecnología como una alternativa rápida, sensible, no radiactiva y precisa a otras metodologías como por ejemplo Southern blott y FISH para la determinación del número de copias del transgen.

Por último, se pudo comprobar la capacidad de reprogramación de los fibroblastos para la generación de embriones transgénicos mediante TNCS. Se produjeron un total de 27 embriones a partir de las células donantes transgénicas, de los cuales 15 (55,5%) expresaron de manera correcta la proteína fluorescente *Venus*. Se especula un silenciamiento epigenético del transgen en las etapas tempranas del desarrollo en aquellos embriones que no expresaban la *Venus* correctamente. Sin embargo, también puede suceder que los niveles de expresión del transgen haya estado debajo del límite de detección (Alessio et al. 2016). Por otro lado, los porcentajes de desarrollo a blastocisto no fueron diferentes para embriones reconstruidos a partir de células transgénicas para SB (33%) comparados a los controles alcanzados con células no transgénicas como donantes de núcleos (Canel, 2010; Iager et al., 2008; Li, 2006).

Metodologías transgénicas basadas en transposones solas, o combinadas con otras herramientas basadas en enzimas recombinasas pueden simplificar la generación de

ganado bovino transgénico que expresa de manera constante el gen de interés. Estas metodologías expanden las posibilidades para la manipulación directa del genoma bovino para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

# Conclusiones



## Conclusiones

- I. Se lograron amplificar en bacterias, purificar y posteriormente caracterizar mediante restricciones enzimáticas de manera correcta todos los plásmidos de interés para los experimentos (pCMV-SB100X, pBII-ISceI-skA, pT2/RMCE/Venus, pT2/SV40-Neo).
- II. Se lograron transfectar químicamente de manera correcta FFB, obteniendo altos niveles de expresión transitoria del transgen.
- III. Se obtuvieron colonias transgénicas con los plásmidos de interés, mediante la selección positiva con el antibiótico G418, resistiendo los 21 días de tratamiento con el mismo. Como se esperaba, cuando se agregó la transposasa a la mezcla de transfección, se lograron recuentos de colonias mucho más altas (hasta 95 veces mayor) a los grupos control sin transposasa.
- IV. Se lograron aislar y amplificar líneas monoclonales a partir de las colonias seleccionadas a las cuales luego del tiempo de amplificación necesario, se les pudo extraer cantidades suficientes de ADNg para su posterior análisis molecular.
- V. Mediante una metodología simple combinando un set de diferentes cebadores, se pudo demostrar por PCR la correcta inserción del transgen, la ausencia de inserciones por mecanismos no transposicionales del gen de la transposasa y la posible presencia de copias del transgen insertadas de manera no transposicional.
- VI. Se encontraron importantes efectos citotóxicos para todas las líneas celulares con todas las PEIs, a partir de concentraciones más elevadas que 2 µg/mL. No se obtuvo efecto protector significativo del suero, para ninguna de las líneas estudiadas.
- VII. Se obtuvieron tasas de transfección variables en FFB, HEK 293 y Hep G2 con PEI de diferentes pesos moleculares, en presencia o ausencia de SFB; siendo PEI 25K, la que diera los mejores resultados, generando porcentajes de eficiencia de transfección de hasta 38,4%.

**VIII.** Se observó un aumento significativo de la eficiencia de transfección con PEI, con el agregado de SFB, en FFB. No se obtuvieron resultados significativos para las líneas celulares HEP G2 ni para HEK 293.

**IX.** Se lograron obtener líneas monoclonales transgénicas, a partir de transfecciones con PEI, para el sistema de dos componentes SB, las cuales integraron y expresaron de manera correcta el transgen (*Venus*), tanto con FFB (de importancia para experimentos posteriores de TNCS), como con las líneas HEK 293 y Hep G2.

**X.** Se pudieron secuenciar y analizar de manera precisa y correcta los sitios de inserción para 15 eventos individuales de transposición pertenecientes a 6 líneas monoclonales generadas, permitiendo comprobar que todas las inserciones del transgén en el genoma bovino analizadas se debieron a eventos de transposición catalizados por la transposasa SB.

**XI.** Se estimó mediante PCR cuantitativa la cantidad de copias individuales del transgén que se encontraban presentes en el genoma de cada una de las 6 líneas generadas, corroborando la utilidad de la qPCR como técnica alternativa para la determinación del número de copias de un transgén, a otras metodologías clásicas como Southern Blot y FISH.

**XII.** Se pudieron obtener embriones transgénicos que se desarrollaron de manera correcta hasta el estado de blastocisto a partir de células transgénicas pertenecientes a las líneas generadas anteriormente, comprobando la capacidad de las mismas para ser reprogramadas mediante TNCS y de este modo originar embriones transgénicos morfológicamente normales.



# Bibliografía



## **Bibliografia**

- Akagi, S., Geshi, M. & Nagai, T., 2013. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Animal Science Journal*, 84(3), pp.191–199. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480698> [Accessed February 5, 2018].
- Alberio, R. et al., 2005. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Experimental Cell Research*, 307(1), pp.131–141. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922733> [Accessed February 5, 2018].
- Alberio, R. et al., 2001. Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: Effect of activation protocol. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), pp.371–379. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468773> [Accessed February 5, 2018].
- Alessio, A.P. et al., 2016. Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle. *Theriogenology*, 85(7), p.1297–1311.e2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.016>.
- Archibald, A.L. et al., 2010. Pig genome sequence--analysis and publication strategy. *BMC genomics*, 11, p.438. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20642822> [Accessed February 5, 2018].
- Aronovich, E.L. et al., 2007. Prolonged expression of a lysosomal enzyme in mouse liver after Sleeping Beauty transposon-mediated gene delivery: Implications for non-viral gene therapy of mucopolysaccharidoses. *Journal of Gene Medicine*, 9(5), pp.403–415.
- Baguisi, A. et al., 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology*, 17(5), pp.456–461. Available at: [http://www.nature.com/articles/nbt0599\\_456](http://www.nature.com/articles/nbt0599_456) [Accessed February 5, 2018].
- Bell, J.B. et al., 2010. Duration of expression and activity of Sleeping Beauty transposase in mouse liver following hydrodynamic DNA delivery. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(10), pp.1796–

1802. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2010.152>.
- Bessereau, J.-L. et al., 2001. Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature*, 413(6851), pp.70–74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35092567>.
- 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? *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), pp.687–693. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988654> [Accessed February 5, 2018].
- Bingham, P.M., Kidwell, M.G. & Rubin, G.M., 1982. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The role of the P element, a P-strain-specific transposon family. *Cell*, 29(3), pp.995–1004. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867482904639>.
- Bó, G.A. et al., 2012. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), p.272. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394969> [Accessed February 5, 2018].
- Bosch, P. et al., 2015. Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-015-1842-1>.
- Bosch, P., Hodges, C.A. & Stice, S.L., 1996. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*.
- Campbell, K.H. et al., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380(6569), pp.64–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598906>.
- Canel, N. et al., 2010. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cellular reprogramming*, 12(4), pp.491–499.
- Carlson, C.M. et al., 2003. Transposon mutagenesis of the mouse germline. *Genetics*,

- 165(1), pp.243–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179917>.
- Carlson, C.M. & Largaespada, D. a, 2005. Insertional mutagenesis in mice: new perspectives and tools. *Nature reviews. Genetics*, 6(7), pp.568–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15995698>.
- Carlson, D.F. et al., 2011. Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic research*, 20(5), pp.1125–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221779> [Accessed August 29, 2014].
- Cary, L.C. et al., 1989. Transposon mutagenesis of baculoviruses: Analysis of Trichoplusia ni transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172(1), pp.156–169. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0042682289901177>.
- Castro, F.O. & Portelles, Y., 1997. Transfección De ADN a Células De Mamíferos. *Biotecnologia Aplicada*, 14(3), pp.149–161. Available at: <http://www.bioline.org.br/abstract?id=ba97037&lang=en>.
- Chesné, P. et al., 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 20(4), pp.366–369. Available at: <http://www.nature.com/articles/nbt0402-366> [Accessed February 5, 2018].
- Cibelli, J.B. et al., 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280(5367), pp.1256–1258. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.280.5367.1256>.
- Cooley, L., Kelley, R. & Spradling, A., 1988. Insertional mutagenesis of the Drosophila genome with single P elements. *Science*, 239(4844), pp.1121–1128. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544018>.
- Cyranoski, D., 2003. Koreans rustle up madness-resistant cows. *Nature*, 426(6968), p.743. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/426743a>.
- Dalsgaard, T. et al., 2009. Shielding of sleeping beauty DNA transposon-delivered transgene cassettes by heterologous insulators in early embryonal cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(1), pp.121–130.

- Ding, S. et al., 2005. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 122(3), pp.473–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096065> [Accessed July 30, 2011].
- Donovan, D.M., Kerr, D.E. & Wall, R.J., 2005. Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Research*, 14(5), pp.563–567. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16245147>.
- Dupuy, A.J. et al., 2002. Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), pp.4495–4499. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=123676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dupuy, A.J. et al., 2005. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*, 436(7048), pp.221–226. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16015321>.
- Ekser, B. et al., 2009. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transplant Immunology*, 21(2), pp.87–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955143>.
- Emmons, S.W. et al., 1983. Evidence for a transposon in caenorhabditis elegans. *Cell*, 32(1), pp.55–65. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867483904968>.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154–156. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242681>.
- Fan, J. & Watanabe, T., 2003. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacology therapeutics*, 99(3), pp.261–282. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016372580300069X>.
- Fischer, D. et al., 1999. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical research*, 16(8), pp.1273–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468031> [Accessed

October 5, 2017].

Fischer, D. et al., 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), pp.1121–1131.

Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202004453>.

Forcato, D.O. et al., 2013. 331 OPTIMIZATION OF BRANCHED 25 kDa POLYETHYLENIMINE FOR EFFICIENT GENE DELIVERY IN BOVINE FETAL FIBROBLASTS. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(1), p.313.

Available at: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RDv25n1Ab331> [Accessed October 6, 2017].

Forcato, D.O. et al., 2017. Transfection of bovine fetal fibroblast with polyethylenimine (PEI) nanoparticles: effect of particle size and presence of fetal bovine serum on transgene delivery and cytotoxicity. *Cytotechnology*, 69(4), pp.655–665. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28321779> [Accessed October 12, 2017].

Fraser, M.J. et al., 1995. Assay for Movement of Lepidopteran Transposon IFP2 in Insect Cells Using a Baculovirus Genome as a Target DNA. *Virology*, 211(2), pp.397–407. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682285714225>.

Galli, C. et al., 2012. Somatic Cell Nuclear Transfer and Transgenesis in Large Animals: Current and Future Insights. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, pp.2–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681293> [Accessed February 5, 2018].

Gan, C., 1989. Gene Gun Accelerates DNA-Coated Particles To Transform Intact Cells. *The Scientist*, 3(18), p.25.

Garrels, W. et al., 2014. 356 SLEEPING BEAUTY TRANSGENESIS IN CATTLE. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(1), p.266. Available at: <http://dx.doi.org/10.1071/RDv27n1Ab356>.

Garrels, W. et al., 2011. Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PloS one*, 6(8), p.e23573. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3163581&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 29, 2014].
- Garrels, W., Ivics, Z. & Kues, W. a, 2012. Precision genetic engineering in large mammals. *Trends in biotechnology*, 30(7), pp.386–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.03.008> [Accessed August 15, 2014].
- Godbey, W.T., Wu, K.K. & Mikos, A.G., 2001. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials*, 22(5), pp.471–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214758> [Accessed October 5, 2017].
- Godbey, W.T., Wu, K.K. & Mikos, A.G., 1999. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of biomedical materials research*, 45(3), pp.268–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397985> [Accessed October 6, 2017].
- Gordon, J.W. et al., 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(12), pp.7380–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=350507&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gordon, J.W. & Ruddle, F.H., 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214(4526), pp.1244–1246. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/214/4526/1244.abstract>.
- Grabher, C. & Wittbrodt, J., 2007. Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biology*, 8(Suppl 1), p.S10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047687>.
- Halic, M. & Moazed, D., 2009. Transposon Silencing by piRNAs. *Cell*, 138(6), pp.1058–1060.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F.R., 1991. [4] Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. In J. H. M. B. T.-M. in *Enzymology*, ed. *Bacterial Genetic Systems*. Academic Press, pp. 63–113. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799104006A>.

- Handler, A.M., Gomez, S.P. & O'Brochta, D.A., 1993. A functional analysis of the P-element gene-transfer vector in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 22(3–4), pp.373–384. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/arch.940220306/abstract> [Accessed January 12, 2012].
- Haruyama, N., Cho, A. & Kulkarni, A.B., 2009. Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Current protocols in cell biology editorial board Juan S Bonifacino et al*, Chapter 19(March), p.Unit 19.10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2743315&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hill, J.R. et al., 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of reproduction*, 63(6), pp.1787–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090450> [Accessed February 5, 2018].
- Horie, K. et al., 2003. Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Molecular and cellular biology*, 23(24), pp.9189–207. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=309709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Houdebine, L.-M., 1994. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases*, 32(3), pp.269–287. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243312>.
- Houdebine, L.-M., 2002. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *Journal of biotechnology*, 98(2–3), pp.145–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141984>.
- Howarth, J.L., Lee, Y.B. & Uney, J.B., 2010. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biology and Toxicology*, 26(1), pp.1–20.
- Hu, S. et al., 2011. Sleeping Beauty-mediated knockdown of sheep myostatin by RNA interference. *Biotechnology letters*, 33(10), pp.1949–53. Available at:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698446> [Accessed November 26, 2014].
- Huang, X. et al., 2006. Stable gene transfer and expression in human primary T cells by the. *Gene*, 107(2), pp.483–491. Available at:  
<http://www.bloodjournal.org/content/107/2/483.long?sso-checked=true>.
- Huh, S.-H. et al., 2007. Optimization of 25kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals*, 35(3), pp.165–171. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084092> [Accessed October 5, 2017].
- Humpherys, D. et al., 2001. Epigenetic Instability in ES Cells and Cloned Mice. *Science*, 293(5527), pp.95–97. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441181> [Accessed February 5, 2018].
- Iager, A.E. et al., 2008. Trichostatin A Improves Histone Acetylation in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Early Embryos. *Cloning and Stem Cells*, 10(3), pp.371–380.
- Ikeda, R. et al., 2007. Sleeping beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Molecular and cellular biology*, 27(5), pp.1665–76.
- Ivics, Z. et al., 1997. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91(4), pp.501–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390559>.
- Ivics, Z. et al., 2009. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nature methods*, 6(6), pp.415–422. Available at:  
<http://www.nature.com/nmeth/journal/v6/n6/abs/nmeth.1332.html> [Accessed January 10, 2012].
- Jacobson, J.W., Medhora, M.M. & Hartl, D.L., 1986. Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), pp.8684–8688. Available at:  
<http://www.pnas.org/content/83/22/8684.abstract>.
- Jakobsen, J.E. et al., 2011. Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic research*, 20(3), pp.533–45. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803249> [Accessed August 29, 2014].
- Jiang, B.C. et al., 2011. Application of the Sleeping Beauty system in Saanen goat

- fibroblast cells for establishing persistent transgene expression. *Genetics and molecular research : GMR*, 10(4), pp.3347–3355.
- Jiang, D. & Salem, A.K., 2012. Optimized dextran–polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments. *International Journal of Pharmaceutics*, 427(1), pp.71–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037445> [Accessed October 6, 2017].
- John Clark, A., 2002. Generation of Transgenic Livestock by Pronuclear Injection. In A. R. Clarke, ed. *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, pp. 273–288. Available at: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-178-7:273>.
- Kacherovsky, N. et al., 2012. Combination of Sleeping Beauty transposition and chemically induced dimerization selection for robust production of engineered cells. *Nucleic Acids Research*, 40(11), pp.1–10.
- Kato, Y., Tani, T. & Tsunoda, Y., 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Journal of reproduction and fertility*, 120(2), pp.231–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058438> [Accessed February 5, 2018].
- Kichler, A., 2004. Gene transfer with modified polyethylenimines. *The Journal of Gene Medicine*, 6(S1), pp.S3–S10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978746> [Accessed October 5, 2017].
- Kim, T.K. & Eberwine, J.H., 2010. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), pp.3173–3178.
- Kimura, H. et al., 2004. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Molecular and cellular biology*, 24(13), pp.5710–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15216876> [Accessed February 5, 2018].
- Kitada, K. et al., 2007. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nature methods*, 4(2), pp.131–133.
- Kolacsek, O. et al., 2011. Reliable transgene-independent method for determining

- Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mobile DNA*, 2(1), p.5.
- Kues, W. a & Niemann, H., 2004. The contribution of farm animals to human health. *Trends in biotechnology*, 22(6), pp.286–94. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158058> [Accessed August 29, 2014].
- Lai, L. et al., 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 295(5557), pp.1089–1092. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11778012>.
- Lampe, D.J., Grant, T.E. & Robertson, H.M., 1998. Factors affecting transposition of the Himar1 mariner transposon in vitro. *Genetics*, 149(1), pp.179–187.
- Lander, E.S. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp.860–921. Available at:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>.
- Lázaro-Martínez, J.M. et al., 2015. Solid-state Studies of the Crystalline/Amorphous Character in Linear *Poly* (ethylenimine hydrochloride) (PEI·HCl) Polymers and Their Copper Complexes. *Macromolecules*, 48(4), pp.1115–1125. Available at:  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma5023082> [Accessed October 12, 2017].
- Lee, C. et al., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 123(3), pp.273–280.
- Li, G.-P., White, K.L. & Bunch, T.D., 2004. Review of Enucleation Methods and Procedures Used in Animal Cloning: State of the Art. *Cloning and Stem Cells*, 6(1), pp.5–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107241> [Accessed February 5, 2018].
- Li, M.A. et al., 2011. Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. , 44(0), pp.1–9.
- Li, R. et al., 2013. piggyBac as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice. *Disease models & mechanisms*, 6(3), pp.828–33. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Li, X. et al., 2006. Analysis of Development-Related Gene Expression in Cloned Bovine Blastocysts with Different Developmental Potential. *Cloning and Stem Cells*, 8(1), pp.41–50.
- Lohe, a R. & Hartl, D.L., 1996. Autoregulation of mariner transposase activity by overproduction and dominant-negative complementation. *Molecular biology and evolution*, 13(4), pp.549–555.
- Lungwitz, U. et al., 2005. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), pp.247–266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939236> [Accessed October 6, 2017].
- MacKenzie, D.A., Hullett, D.A. & Sollinger, H.W., 2003. Xenogeneic transplantation of porcine islets: an overview. *Transplantation*, 76(6), pp.887–891. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508349>.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), pp.7634–7638. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.12.7634>.
- Martínez, A.G. et al., 2016. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research*, 63(3), pp.288–296. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.03.002>.
- Mátés, L. et al., 2009. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nature genetics*, 41(6), pp.753–761. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19412179> [Accessed August 25, 2014].
- McClintock, B., 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *of the National Academy of Sciences of the United.*
- McCreath, K.J. et al., 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405(6790), pp.1066–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890449>.

- Mintzer, M.A. & Simanek, E.E., 2009. Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews*, 109(2), pp.259–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053809> [Accessed October 6, 2017].
- Moro, L.N. et al., 2015. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. *Reproduction*, 150(1), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25820926> [Accessed February 5, 2018].
- Murray, J.D. et al., 1989. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reproduction fertility and development*, 1(2), pp.147–155. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2552507>.
- Niemann, H. & Lucas-Hahn, a, 2012. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47 Suppl 5, pp.2–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913555> [Accessed August 30, 2014].
- Norgren, R.B., 2004. Creation of non-human primate neurogenetic disease models by gene targeting and nuclear transfer. *Reproductive biology and endocrinology RBE*, 2(1), p.40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=455690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- O’Hare, K. & Rubin, G.M., 1983. Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell*, 34(1), pp.25–35. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867483901332>.
- Ogris, M. et al., 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy*, 5(10), pp.1425–1433. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9930349> [Accessed October 6, 2017].
- Palmiter, R.D. & Brinster, R.L., 1986. Germ-Line Transformation of Mice. *Annual Review of Genetics*, 20(1), pp.465–499. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.002341>.

Palmiter, R.D. & Brinster, R.L., 1985. Transgenic mice. *Cell*, 41(2), pp.343–345.

Available at: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/2985274>.

Pfeifer, A. & Verma, I.M., 2001. GENE THERAPY : Promises and Problems.

*Genomics*, pp.177–211.

Plasterk, R.H.A., Izsvák, Z. & Ivics, Z., 1999. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics*, 15(8), pp.326–332.

Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952599017771>.

Polejaeva, I. & Mitalipov, S., 2013. Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms. *Reproduction (Cambridge, England)*, 145(3), pp.R81-8.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221011> [Accessed February 5, 2018].

Potter, C.J. & Luo, L., 2010. Splinkerette PCR for Mapping Transposable Elements in *Drosophila*. , 5(4), pp.1–9.

Primrose, S.B., Twyman, R.M. & Old, R.W., 2001. *Principles of Gene Manipulation*, Blackwell Science Ltd. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168952585901076>.

Rhaese, S. et al., 2003. Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 92(1–2), pp.199–208. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499197> [Accessed October 5, 2017].

Richt, J.A. et al., 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nature*

*Biotechnology*, 25(1), pp.132–138. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2813193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Rostovskaya, M. et al., 2012. Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic acids research*, 40(19), p.e150. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3479164&tool=pmcent>

rez&rendertype=abstract [Accessed August 29, 2014].

- Rubin, G.M., Kidwell, M.G. & Bingham, P.M., 1982. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations. *Cell*, 29(3), pp.987–994. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867482904627>.
- Rushforth, a M., Saari, B. & Anderson, P., 1993. Site-selected insertion of the transposon Tc1 into a *Caenorhabditis elegans* myosin light chain gene. *Molecular and cellular biology*, 13(2), pp.902–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Saha, S. et al., 2015. Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells. *Nucleic Acids Research*, pp.1–13. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkv017>.
- Sawant, R.R. et al., 2012. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials*, 33(15), pp.3942–3951. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365809> [Accessed October 6, 2017].
- Schermant, D., Demeneix, B. & Behr, J., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. , 92(August), pp.7297–7301.
- Schnieke, A.E. et al., 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278(5346), pp.2130–2133. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405350>.
- Shin, T. et al., 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 415(6874), pp.859–859. Available at: <http://www.nature.com/articles/nature723> [Accessed February 5, 2018].
- Siebel, C.W. & Rio, D.C., 1990. Regulated splicing of the *Drosophila* P transposable element third intron in vitro: somatic repression. *Science*, 248(4960), pp.1200–1208. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/248/4960/1200.short>.
- Sim, A.S.Æ.C., Hogan, Æ.Y.S.H.Æ.J.R. & Collins, M.J.F.Æ.H.M.R.Æ.F.H., 2003. Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family

- and related “ domesticated ” sequences. *Genomics*, pp.173–180.
- Sinzelle, L. et al., 2006. Generation of transgenic *Xenopus laevis* using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research*, 15(6), pp.751–760.
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M., 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*, 218(4570), pp.341–347. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6289435>.
- Sprangers, B., Waer, M. & Billiau, A.D., 2008. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney International*, 74(1), pp.14–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418354>.
- Stice, S.L. & Keefer, C.L., 1993. Multiple generational bovine embryo cloning. *Biology of reproduction*, 48(4), pp.715–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8485235> [Accessed February 5, 2018].
- Swami, A. et al., 2007. Imidazolyl-PEI modified nanoparticles for enhanced gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 335(1–2), pp.180–192. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17169517> [Accessed October 6, 2017].
- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R., 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), pp.503–512. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822260>.
- Thomas, M., Ge, Q., et al., 2005. Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharmaceutical research*, 22(3), pp.373–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15835742> [Accessed October 6, 2017].
- Thomas, M., Lu, J.J., et al., 2005. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(16), pp.5679–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824322> [Accessed October 6, 2017].
- Traldi, A.S. et al., 2016. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified



- in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, 51(1), p.175. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)91734-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)91734-X).
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N., 2010. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), pp.159–170. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359532> [Accessed October 6, 2017].
- Tseng, J.C. et al., 1991. Splicing of the Drosophila P element ORF2-ORF3 intron is inhibited in a human cell extract. *Mechanisms of Development*, 35(1), pp.65–72. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0925477391900425>.
- Turchiano, G. et al., 2014. Genomic analysis of Sleeping Beauty transposon integration in human somatic cells. *PloS one*, 9(11), p.e112712. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112712>.
- Urschitz, J., Kawasumi, M., Owens, J., Morozumi, K., Yamashiro, H. & Stoytchev, I., 2010. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches : Strategies for avoiding potential genotoxic effects. *PNAS*, 107(18).
- Urschitz, J., Kawasumi, M., Owens, J., Morozumi, K., Yamashiro, H., Stoytchev, I., et al., 2010. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches : Strategies for avoiding potential genotoxic effects. *PNAS*, 107(18), pp.8117–8122.
- Vajta, G.G., Lewis, I.M. & Tecirlioglu, R.T.T., 2006. Handmade Somatic Cell Cloning in Cattle. In P. Verma & A. Trounson, eds. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Methods in Molecular Biology™. Humana Press, pp. 183–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988380>.
- Wakayama, T. et al., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394(6691), pp.369–374. Available at: <http://www.nature.com/articles/28615> [Accessed February 5, 2018].
- Wall, R.J., Kerr, D.E. & Bondioli, K.R., 1997. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *Journal of dairy science*, 80(9), pp.2213–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9313167>.
- Ward, K.A. & Nancarrow, C.D., 2002. Biomedical and agricultural applications of

- animal transgenesis. *Molecular Biotechnology*, 180(3), pp.231–244. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247496>.
- 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. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 84(9), pp.631–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829575> [Accessed August 29, 2014].
- Waterston, R.H. et al., 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), pp.520–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466850>.
- Wells, D.N., 2005. Animal cloning: problems and prospects. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 24(1), pp.251–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110893> [Accessed February 5, 2018].
- Wheeler, M., 2003. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Animal Reproduction Science*, 79(3–4), pp.265–289. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003001684> [Accessed September 27, 2011].
- Whelan, J.A., Russell, N.B. & Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278(1–2), pp.261–269.
- Wilmut, I. et al., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), pp.810–813. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/385810a0> [Accessed February 5, 2018].
- Wilmut, I. et al., 2007. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning and Stem Cells*, 7(6619), pp.810–813. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039911>.
- Wilson, M.H. et al., 2007. PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(1), pp.139–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17164785> [Accessed August 26, 2014].

- Wirth, T., Parker, N. & Yl??-Herttuala, S., 2013. History of gene therapy. *Gene*, 525(2), pp.162–169. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>.
- Wu, S.C.-Y. et al., 2006. piggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to Sleeping Beauty, Tol2, and Mos1 in mammalian cells . *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 103(41), pp.15008–15013. Available at: <http://www.pnas.org/content/103/41/15008.abstract>.
- Xia, T. et al., 2007. Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways. *ACS Nano*, 2(1), pp.85–96. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/nn700256c>.
- Yang, Z. et al., 2008. Amphiphilic Block Copolymers Enhance Cellular Uptake and Nuclear Entry of Polyplex-Delivered DNA. *Bioconjugate Chemistry*, 19(10), pp.1987–1994. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729495> [Accessed October 6, 2017].
- Yant, S.R. et al., 2005. High-Resolution Genome-Wide Mapping of Transposon Integration in Mammals. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6), pp.2085–2094.
- Yant, S.R. et al., 2000. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nature Genetics*, 25(1), pp.35–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802653>.
- Yu, Y. et al., 2013. A Site-Specific Recombinase-Based Method to Produce Antibiotic Selectable Marker Free Transgenic Cattle X. (Cindy) Tian, ed. *PLoS ONE*, 8(5), p.e62457. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062457> [Accessed March 19, 2018].
- Zayed, H. et al., 2004. Development of hyperactive Sleeping Beauty transposon vectors by mutational analysis. *Molecular Therapy*, 9(2), pp.292–304.
- Zwaal, R.R. et al., 1993. Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), pp.7431–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=47155&tool=pmcentre&z&rendertype=abstract>.

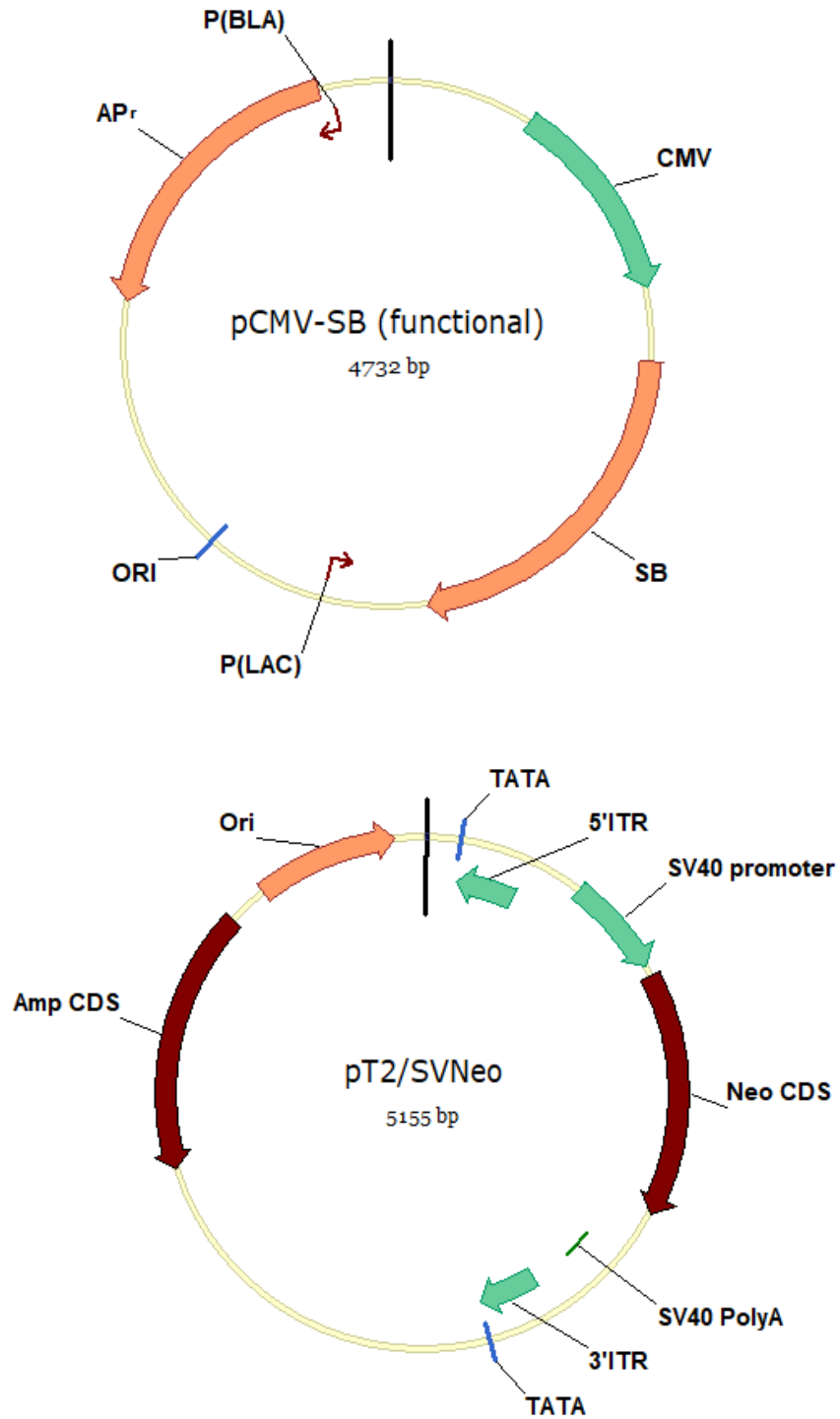
# Anexos

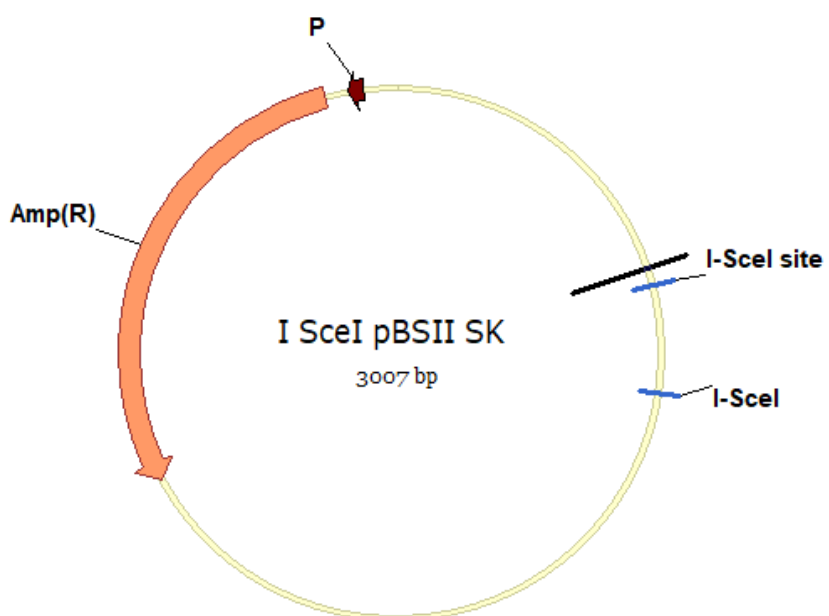
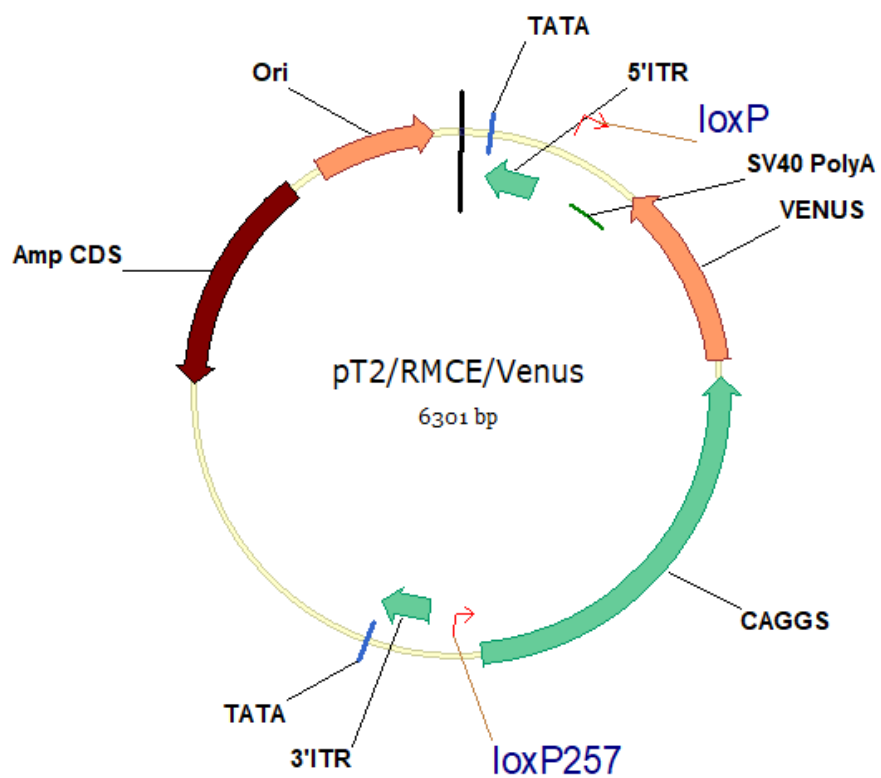


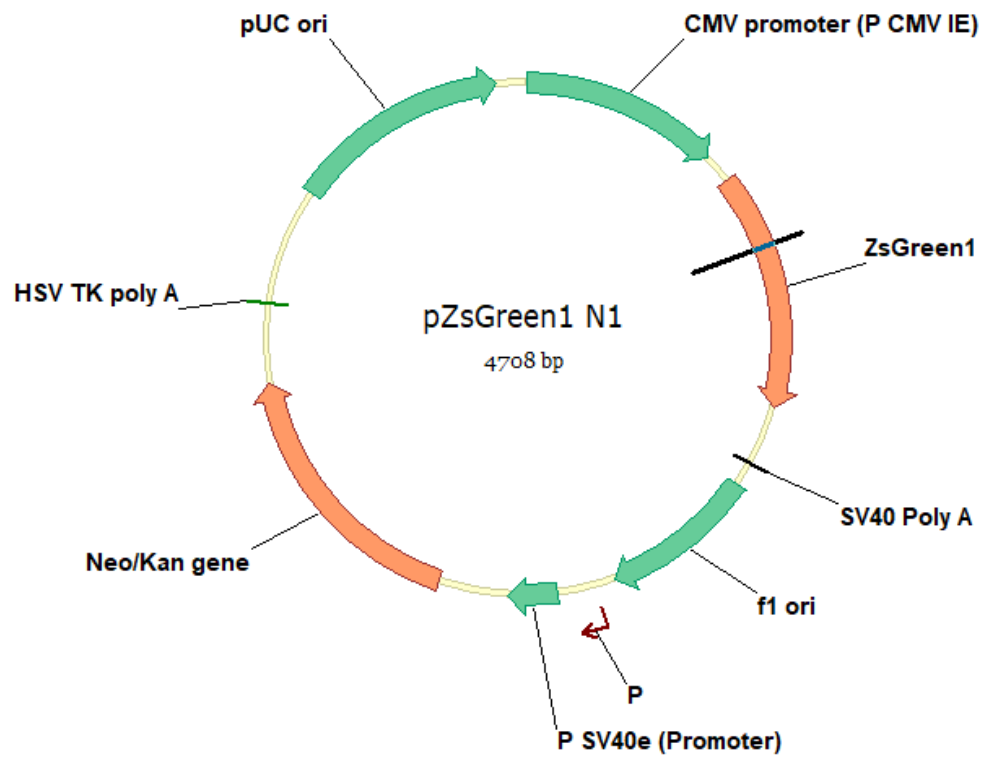
Anexos

Anexo 1

Representación gráfica de los Vectores plasmídicos y sus componentes, utilizados en este trabajo.







## Anexo 2

**Tabla 1A. Secuencias de los Oligonucleótidos complementarios utilizados:**

Primers	Secuencia	Tamaño o del product o	Función
<b>Link1SAU</b>	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGA ATCGCTGTCCTCTCCAACGAGCCA AGG	-	Formar el conector doble cadena para la splinkerette (10pmol/μL Final)
<b>Link2SAU</b>	GATCCCTTGGCTCGTTTTTTTTTG CAAAAA		Formar el conector doble cadena para la splinkerette (10pmol/μL Final)
<b>Link3</b>	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGA A	-	Usado en la Splinkerette PCR-1 junto a Bal REV3 (especifico del transposón).
<b>Link4</b>	TCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTC C		Usado en la Splinkerette PCR-2 junto a Bal REV4 (especifico del transposón)
<b>Bal Rev3</b>	AAAGCCATGACATCATTTTCTGGA ATT		Usado en la Splinkerette PCR-1 junto a Link3 (especifico del transposón)
<b>BalRev4</b>	CTTGTCATGAATTGTGATACAGTG AATTATAAGTG		Usado en la Splinkerette PCR-2 junto a Link4 (especifico del transposón)
<b>qPCR-Fw</b>	TAGCCCAGGGTGGTCACCAG		Primer Forward utilizado junto al correspondiente Reverse, para la qPCR
<b>qPCR-Rv</b>	GTGAACGGCCACAAGTTCTC		Primer Forward utilizado junto al correspondiente Forward, para la qPCR



### Anexo 3

#### Medio de Maduración

TCM-199 (31100-035; Gibco) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB; 10499-044; Gibco), 1 mM piruvato de sodio (P2256), 0,1 mg/mL de FSH (NIH-FSH-P1; Folltropin; Bioniche, Belleville, ON, Canada) y 2% de antibiótico antimicótico (ATB; 15240-096; Gibco).

#### Medio de cultivo de embriones (*Synthetic Oviductal Fluid-SOF*)

50 ml		
Componente	Proveedor	Cant.
NaCl	Sigma S5886	314,65
KCl	Sigma P5405	26,7
CaCl. 2H <sub>2</sub> O	Sigma C7902	12,39
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma P5379	8,1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	Merk 1058861000	9,1
Na HCO <sub>3</sub>	Sigma 55761	105,48
Rojo Fenol	Sigma P0290	50
Na Piruvato	Sigma P2256	18,15
Na Lactato	Sigma C1375	72
BSA - FAF	A6003	400
BME	Sigma B6766	100
MEM	Sigma M7145	50
Na trici	Merk 1064481000	5
Mio Inositol	Sigma 17508	25

<b>SFB</b>	Internegocios	2,50%
	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>53</b>
<b>HEPES (25 mm)</b>		0,74325gr

**TALP**

<b>100 ml</b>		
<b>Componente</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Cant.</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Sigma W- 1503	99ml
<b>NaCl</b>	Sigma S-5886	666,0mg
<b>KCl</b>	Sigma P-5405	24,0mg
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Sigma S-5761	16,8mg
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	Sigma S-9638	4,76mg
<b>Hepes</b>	Sigma H-9136	240mg
<b>Na Lactate</b>	Sigma L-1375	186mg
<b>Phenol Red</b>	Sigma P-0290	100mg
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>	Sigma C-7902	30,0mg
<b>MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	Sigma M-2393	5,0mg

**Procedimiento:**

- Ajustar pH: 7,3-7,4
- Filtrar con filtro 0,2µm
- Osmolaridad debe ser 275 +/-10mOsm
- Guardar at 5°C
- Rotular con la fecha de realización.

### Medio de fusión

Reactivo	Estado	Cf	Cantidad (Vf 25ml)
<b>D-Mannitol (Sigma, M4596)</b>	Sólido	0,3 M	1365 mg
<b>CaCl<sub>2</sub> (Sigma, C7902)</b>	Líquido (100 mM)	0,05 mM	12,5 µL
<b>MgSO<sub>4</sub> (Merck, 1058861000)</b>	Líquido (100 mM)	0,1 mM	25 µL
<b>PVA</b>	Sólido	1 mg/mL	25 mg

- Ajustar: PH a 7.2 con 1N NaOH
- Osmolaridad: 255 +/- 10 mOsm

### Reactivos

- **6- DMAP:** Inhibidor de serin-treonin quinasas

Stock: 200 mM

6-DMAP SIGMA D-2629      1g

PBS Gibco 21600-051      30ml

Disolver 6-DMAP en baño externo con agua hirviendo.

Alicuotar en eppendorff y guardar a -20°C.

**Solución de trabajo:** 2mM, dilución 1/100 en medio de activación.

Cubrir con MO. La solución debería equilibrarse en una hora.

- **Ionomycina:** Intercambiador móvil de Ca<sup>+2</sup>

Stock: 5 mM

1 mg Ionomycina en 267,6 µL de DMSO

Alicuotar y guardar a -20° C o heladera.

**Solución de trabajo:** 5 µM, dilución de la stock 1/1000 en TL-H con Ca<sup>+2</sup>

suplementado con BSA

- **Hoechst mounting media**

Stock:

Bisbenzimidazole 33342 SIGMA B-2261 1mg

PBS 10ml

**Solución de trabajo:**

Stock 1ml

Glycerol SIGMA 65516 9ml

Alicuotar y guardar en heladera.

- **Hialuronidasa:** Enzima que rompe matriz de ácido hialurónico de COCs

Stock: 1 mg / ml PBS

30 mg Hialuronidasa en 30 ml de PBS

Alicuotar en 200  $\mu$ L por tubo. Guardar en a  $-20\text{ C}^\circ$

**Solución de trabajo:** 1 mg / ml PBS

- **Proteasa / Pronasa:** Enzima que degrada la ZP (P8811)

Stock: 15 mg / ml TL-H

Alicuotar y guardar a  $-20\text{ C}^\circ$

**Solución de trabajo:** 1,5 mg / ml TL-H. Dilución 1 / 10 de la solución stock en TL-H.

- **FSH:** Hormona Folículo Estimulante

400 mg FSH-----40 ml PSB

10 mg FSH-----1 ml PBS

Solución stock: 10 mg de FSH / ml.





Solución stock de trabajo: dilución 1/5

**Solución de trabajo:** 1  $\mu$ L stock en 4  $\mu$ L PBS esto es 10000 ng FSH en 4  $\mu$ L de PBS, de esta solución utilizar 1  $\mu$ L / ml de M199 quedando la concentración final de 2000 ng / ml M199.

## Anexo 4

### Secuencias completas analizadas producto de la Splinkerette-PCR

Referencias:

-  Fragmento de la Secuencia Alineado.
-  Sitio TA Generado mediante la transposición SB.
-  Fragmento correspondiente al Plásmido/Transposón
-  Fragmento de Secuencia No Alineado.

#### **Secuencia Inserción 1:**

```
ATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACGAATNNNANNTCGGATCCCTATACAGTTGAAG
TCGGAAGTTTACATACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCACTACTCCAC
AAATTTCTTGTTAACAAACAGTAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCA
TGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT
CCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGNATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGCGCT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAAC
ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAC
ATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC
ATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
CTCAAAGGCGGTAATACGTTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGT
GAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGNAACCGNAAAAGGCCGCGTTTGCTGGCGTTTTT
CCATANGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGANGNTGGC
GAANCCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCNNGNAAGCTCCCTCNGCG
CTCTCCTG
```

#### **Secuencia Inserción 2:**

```
CNTGGCCGGCCGCGGGATTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGNNGNTTGTAACT
TTCTTCCAAGGACTAAGCGTCTTTAATTTTCATGGCTGCAATCACCATCTGCAGTGT
```

TTTGGAGCCCCAAAATATAAAGTCTGACACTGTTTCCACTGTTTCCCCATCTATTTCCC  
AAGAAGTGATGGGACCGGATGCCATGATCTTCATTTTCTGAATGTTGAGCTCTAAGCCA  
ACTTTTTCACTCTCCTCTTTCACTTTCATCAAGAGGCTTTTTAGTTCCTCTTCACTTTC  
TGTATAAGGGTGGTGTATATGCA<sup>TA</sup>CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACTTAAG  
TTGGAGTCATTA AAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAAACAATA  
GTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAAT  
TCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCT  
TGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT  
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG  
TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGC  
CCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG  
GGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCG  
CTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAANGGCGGTAATACGGTTAT  
CCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC  
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA  
GCATCNCAAAAATCNANGCTCAAGTC

**Secuencia Inserción 3:**

CTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGG<sup>ACTAGCCC</sup>  
<sup>AACTCCTTTTATATACTGTTACGAGCAATAAGAAGAAGATGATAAAGATTAACATTTA</sup>  
<sup>TTTCTTCCATGGGCCAAACTGATCTAAGTA</sup><sup>TA</sup>CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATA  
CACTTAAGTTGGAGTCATTA AAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAAC  
AAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCAC  
TAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGAT  
GCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC  
TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC  
ATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG  
CTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCC  
AACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC  
TCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT  
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACATGTGAGCAAAGGCCAGC  
AAANGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC  
CCTGACGAGCATCACAAAANTCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT

ATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC  
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAT  
AGCTCACGCTGGAAGGTATCTCAGTTCGGGNTAGNNCGTTCGCTCCAAGCTGGGGCTN  
NT

#### Secuencia Inserción 4:

CTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGNNAATTCGATTAGGGCTCCGCTTAA GGGACTAGGG  
TGNNNNACTGATCCCTGGTGGGGCGTATGCGGAAAGGAAC TA CAGTTGAAGTCGGAAGT  
TTACATACTTAAGTTGGAGTCATTA AAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCT  
TGTTAAACAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAA  
GAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGC  
GTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGG  
TCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGC  
CGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTG  
CGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA  
ATCGCCAACGCGGGGAGAGGCGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCT  
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGG  
CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACATGTGAGCAAAA  
GGCCAGCAAANGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT  
CCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGA  
CAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT  
CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGNNGCT  
TTCTCATAGCTCACGCTGNAGGNATCTCAGTTCCGGNNAAGGTCGTTT

#### Secuencia Inserción 5:

GGNA CTAGGGAGTCATTTTATGGTAAATGAGACATGACTATGAGNNNGNGATCATAGAC  
TCTACCTATTATTCATATCCTATGTCATCAGGAAAAANAANTGGCCAACAAAACAATA  
TAGTGACC TA CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACTTAAGTTGGAGTCATTA AAACT  
CGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTCACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTT  
AGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGG  
TCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGT

CACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC  
GCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT  
AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGA  
AACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCG  
TATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGC  
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT  
AACGCAGNAANGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAANGGC  
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAANTCGAC  
GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCT  
GGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTNTCTCACTTCGGGAA

### Secuencia Inserción 6:

GGACTAGNTGNTCTCTCCCTCCTTTCTGGGAGGAACTCCCTTTACCATTGTCTGCATA  
GCTTCATGGCAGATGGACATTGGGGAGGCTTTTATTCTAACAGCTGTAACATTTAGTT  
CCTCCCTTCTTTTTAGTGCAGGTTTGAGGGCTGGAATTA  
CAGTTGAAGTCGGAAGTTTA  
CATACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCACTACTCCACAAATTCCTGT  
TAACAAACAATAGCTTTGGCGAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAA  
TCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTT  
GGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCA  
TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGG  
AAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGNGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGT  
TGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATC  
GGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCAC  
TGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGG  
TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCANGAAAGANCATGTGAGCAAAAGGN  
CAGCAANNGCCANNAANCGNANAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGC  
CCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG  
ACTANAAG

### Secuencia Inserción 7:



ANGGCGGCCNGCGGGATTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGAC TAGGTTANNCAAACCTT  
TCCTTCCAAGGAGTAAGCATCTTTTAATTTTCATGGCTACAGTCACCATCTGCAGTGATT  
TTGGAGCCAGAAAAATAAAGTCTGACACTGTTTCCACTGTTTCCCATCTACAGTTGA  
AGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAAACTCGTTTTTCAACTACTCC  
ACAAATTTCTTGTTAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTG  
CATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAG  
CTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGC  
GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA  
ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC  
ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT  
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCG  
CTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCAGCGGTATCAGCT  
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACAT  
GNGAGCAAANGGCCAGCAAANGGCCAGGAACCGTAAAANGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT  
TCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAANTCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG  
CGAAACCCGACAGG

**Secuencia Inserción 8:**

TGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGA CTAGATTGAATTAGGAAAC  
AGCTCGCCAGGCTGGGAGGATCTGGACCATA TACAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACA  
CTTAAGTTGGAGTCATTAAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAA  
ACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTA  
GTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGC  
ATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG  
TTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT  
AAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT  
CACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA  
CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTC  
GCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC  
GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAANGGCCAGCAA  
AAGGCCAGGAACCGTAAAANGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  
TGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTAT  
AAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGNGNGCTCTCCTGTTCCGACCCTG

CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCNGGAAGCGTGGNGCTTTCNCATAG  
CTCNCGCTGTAGGNATCTCAGTTCGGNGNAGGNNNGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG  
CACGAANCCCC

### Secuencia Inserción 9:

CNTGGCGGCCGCGGNATTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGNANNCCNTCAATG  
GATGAATGGATAAAGAAAATATGGCATGTA CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTT  
AAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAAACAAACA  
ATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTG  
AATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA  
GCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTT  
CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAA  
GTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC  
TGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGC  
GCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCT  
GCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGNAATACGGT  
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAANCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG  
ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGANGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA  
AGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGNTCCGACCCTGCC  
GCTTACCGGNATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGNAGCGTGGNNCTTTCTCATANC  
TCACGCTGTAGGNATCTCAGTTCNGTGTANGNGT

### Secuencia Inserción 10:

TTANGGCTCCGCTTAAGGGACTAGNNNGNCCNNA ACTTTCCTTCCAAGGAGTAAGCATC  
TTTTAATTTTCNTGGCTACAGTCACCATCTGCAGTGATTTGGAGCCAGAAAAATAAG  
TCTGACACTGTTTCCACTGTTTCCCCATCTA CAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACT  
TAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAAACAAC  
AATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGT  
GAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAT  
AGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTT

TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAA  
AGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA  
CTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCNNGCCAGCTGCATTAATGAATCNGCCAACG  
CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGC  
TGCGCTCGGTTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGG  
TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGNAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  
GGCCANGAACCGTANAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTG  
ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCNNA

### Secuencia Inserción 11:

TGGCGGCCGCGGAATTTCGATTAGGGCTCCGCTTANGGGA **CTAGAGCANNTGCTCAGTA**  
**CTTGTGGCACACAGGCTTAGTTGTCCCAGGTCACGTGGGACCGTCCTGGATCAGGGATG**  
**GAACCCATGTCTTCTGCCATTGGCAGGCTGATTCTTTACTACTGAGCCACCAGGGAAGC**  
**CCCTGGAATGACTGCTTTTAAATCAACCAAATACTATCCAATAACTATTAAGTATAAC**  
**AGAAGACATAACCCCATTTTCAAAGACTTAAATGTTGTTTTTAAATAGATCTGAATT**  
**CTAAGCATTCA**TACAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATAAA  
ACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAACAATAGTTTTGGCAAGTCA  
GTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGC  
AGGTGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAG  
TGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA  
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG  
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCG  
GGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTT  
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGNCGTTTCG  
GCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCNAAGGNGNAATACGGGTTATCCACAGANTCA  
NNGGANAACNCANGANAGANCATGTG

### Secuencia Inserción 12:

TGNNGCCGCGGAATTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTANNCNGN **CAAATTGTAT**  
**AATTTTAGTTGAGAGAATACAGTGTTCAATGGCTTGTCGTTATCAATTCATCATAGG**  
**CTATTTCTTACTGAATTTTTTTTAAAGTGTACATTTATTTCCAGC**TACAGTTGAAGT

CGGAAGTTTACATACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACA  
AATTTCTTGTTAAACAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCAT  
GACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTC  
CCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTA  
ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACA  
TACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA  
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA  
TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTT  
CCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGNATCAGCTCAC  
TCAAAGGCGGTAANACGGNTATCCACAGAANTCAGGNGATAACGCANGAAAGAATGT  
GAGCNAAGGNCAGCAAAANGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT  
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACNAAAATCGACGCTCAAGTCANANGTGGC  
GAAANNGACAGGACTATAAAGATACCANGCGTTTCCCCTGNNAGCTCCNTCGTGCGC  
NCTCCTGTTNCCGACCCTG

### Secuencia Inserción 13:

CCGTNGNAATTTCGATTAGGGCTCCGCTNAGGACTAGATTNNNAACACCATATTCATT  
GTTACAGCTAAATTTCTTGTTAAACAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTA  
CTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATAT  
GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATA  
GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATT  
CCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG  
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGT  
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGC  
TCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGT  
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA  
AGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAANNGGCCGCGTTGCTG  
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAANTCGACGCTCAAGTCA  
GAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCC  
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT  
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGGAGGTATCTCANTNCGGGGNNAGG  
TCGTTTCGCTCCAAGCTGGNNTGTGTGC

**Secuencia Inserción 14:**

CNNTGGCGGCCGCGGAATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGGAGAGACAAGAG  
TTACAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTT  
CAACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACAT  
CTACTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCA  
TATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA  
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA  
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGT  
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGG  
CGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGC  
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAG  
GAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTG  
CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG  
TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT  
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACNTGTCCGCCTTTCTC  
CCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTA  
NNCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCAGCCCGACNGCTGCGC  
CTTATCCGGTAACNATCGTC

**Secuencia Inserción 15:**

GGCCGCGNNTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGTAANNNAAGTAGAACAGAG  
TTTCTCAAGATTGATTACATAATGGATTATCTGGGATCTACAGTTGAAGTCGGAAGTTT  
ACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTTCTTG  
TTAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACACAAGA  
ATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGT  
TGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTC  
ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCG  
GAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG  
TTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT  
CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCA

CTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCG  
GTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACATGTGAGCAAAGG  
CCAGCAAANGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC  
GCCCCCTGACGAGCATCACAAANNTCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA  
GGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCC  
GACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT  
CTCATAGCTCAGCTGNAGNTATCTCAGTTCGGTGTAGGNCGTTTCGCTCCAAGCTGGGG  
CTGGGTGCACGAACCCCCNGTTCAGCCCCGACCGC

### Secuencia Inserción 16:

ATGGCGGCCGCGGNTATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGTATTNNGCCTGGA  
GAATCCCATGGACAGATGAGCCTGGAAGGCTACAGTTCATGGGTGCCAAGAGTCAAAC  
ATGACTGAGTGACTATCACACACATGTAGTATATAAAATGTAGCTAAGGTATGGAAGTG  
CTTGTTACCTTAAACTAAGGATTTTTAAAAATTAAATAAATAACAGTTGAAGTCGGA  
AGTTTACATACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCACTACTCCACAAATT  
TCTTGTTAAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACA  
CAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAA  
CGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCA  
TGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG  
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA  
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA  
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTC  
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANGAACATGTGAGCA  
AAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAG  
GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC  
CGACAGGACTATAAAGATAACCAGNNTTCCCCCTGGAACTCCCTCGTGCCTCTCCT  
GTTCCGACCNGCCGCTNNCCGGATACCTGGTCCGCTTTCTCCCTTC

### Secuencia Inserción 17:

TGTTTATCCCTGAATTCCCATTTCTCTTTAAGAAAATCCTTCAGTATATTGTTATAGGCA  
TCAGTGGCTTATGCAGACAGAAAACCTTCAGTAAGCCTTAAAGACTTAGGTAGCACTCC  
TACCAAATCATTGATTGACCCACAAAGATATTTTCTTTCATAACTTAACCATATGCA  
TATATTTAAAAAAGCTTATATAAAGAAAAGAAAAGAGAGGGAGAGAGAAAAGAAA  
GGGAGAGCGTGAGACNTTTTCTTTGCTTTCCTCCCTGACAGGGACGTGCTGCTTATTT  
TAAAAAGAGGGCCAAGAATGTTAAGGGTTTGTGGGGGCCAGCGAATCGCATCCCCTT  
TCTCACAGCCTCACTTGAGTCTGAGCCAACCTGAGTCATAAACCAGGGCATAGAGTAAG  
GCAGAGGGGACAAGAAGGTCCTGACNCAGAGCGAAGTGAAGTTGGAGAGACACAACCTG  
TACAGTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAAACCTCGTTTTTC  
AACTACTCCACAAATTTCTTGTTAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATC  
TACTTTTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCA  
TATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAA  
ATAGCTTGNNGNATCATGGTCATAGCTGTTNNCNGNGTGAANTGTTATCCGCTCNCN  
ATTCCNCACANCATACGAGNCGGAAGCATAAAGNGNAAAGCCTGGNGGNGCCTNATGAG  
TGAGCTAACTCACATNANNGCGTNGCGCTCACTGCCCGCTTNC

**Secuencia Inserción 18:**

TGGCGGCCGCGGGNNTTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGTATTTTGGCCTGGAA  
AATCCCATGGACAGATGAGCCTGGAAGGCTACAGTTCATGGGTTGCCAAGAGTCAAACA  
TGACTGAGTACTATCACACACATGTAGTATATAAAATGTAGCTAAGGTATGGAAGTGC  
TTGTTACCTTAAAACCTAAGGATTTTTAAAAATTAATAAATATACAGTTGAAGTCGGAA  
GTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAAACCTCGTTTTTCAACTACTCCACAAATTT  
CTTGTTAACAAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTTTGTGCATGACAC  
AAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAAC  
GCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCAT  
GGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGA  
GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
TGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT  
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG  
CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCANGAAAGAACATGTGAGCAA  
AAGGNCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG  
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCANANGTGGCNAACCC

GACNNGACTATNAAANATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGNGCGCTCTCCTG  
TTCCGACCCTGCNNCTTANCNGANNCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGNAGCGNG

**Secuencia Inserción 19:**

CTCCGGGCCGCCANGGCGGCCGCGGAATTCGATTAGGGCTCCGCTTAAGGGACTAGTA  
TTNNGNCCTGGAAAATCCCATGGACAGATGAGCCTGGAAGGCTACAGTTCATGGGTTC  
CAAGAGTCAAACATGACTGAGTACTATCACACACATGTAGTATATAAAATGTAGCTAA  
GGTATGGAAGTGCTTGTTACCTTAAACTAAGGATTTTTAAAAATTAATAAATA**TACA**  
GTTGAAGTCGGAAGTTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAACTCGTTTTTCAACT  
ACTCCACAAATTTCTTGTTAACAACAATAGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACT  
TTGTGCATGACACAAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGG  
GAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGC  
TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTC  
ACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT  
AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC  
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTC  
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTAT  
CAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAANG  
AACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAANGCCGCGTTGCTGGC  
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAANTCGACGCTCAAGTCAGA  
GGTGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTC  
GTGNNCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCNCNTT



## Anexo 5

### Datos crudos y Análisis detallados de los resultados de qPCR:

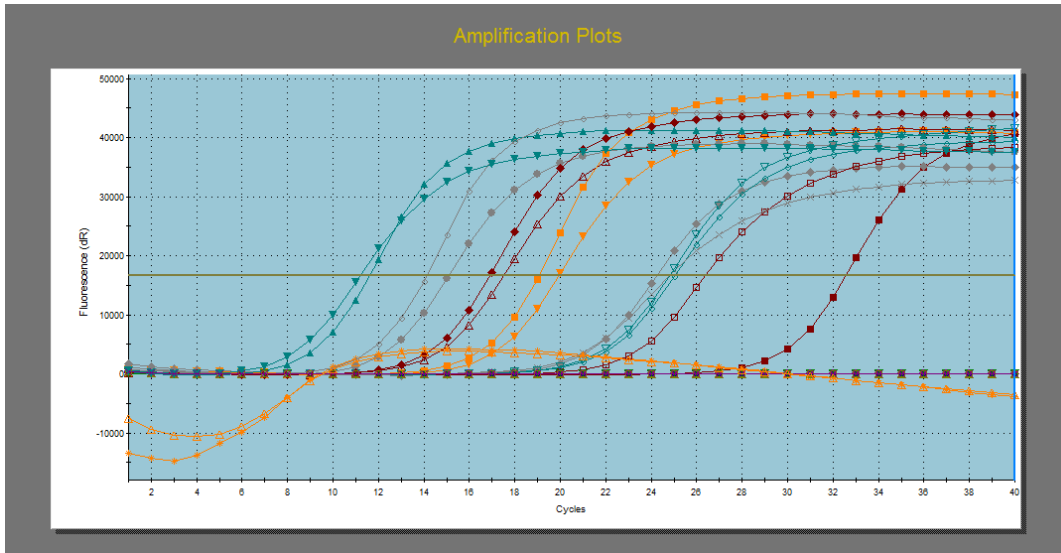


Figura N° 1A. Curvas de amplificación de las muestras correspondientes a la curva de calibración.

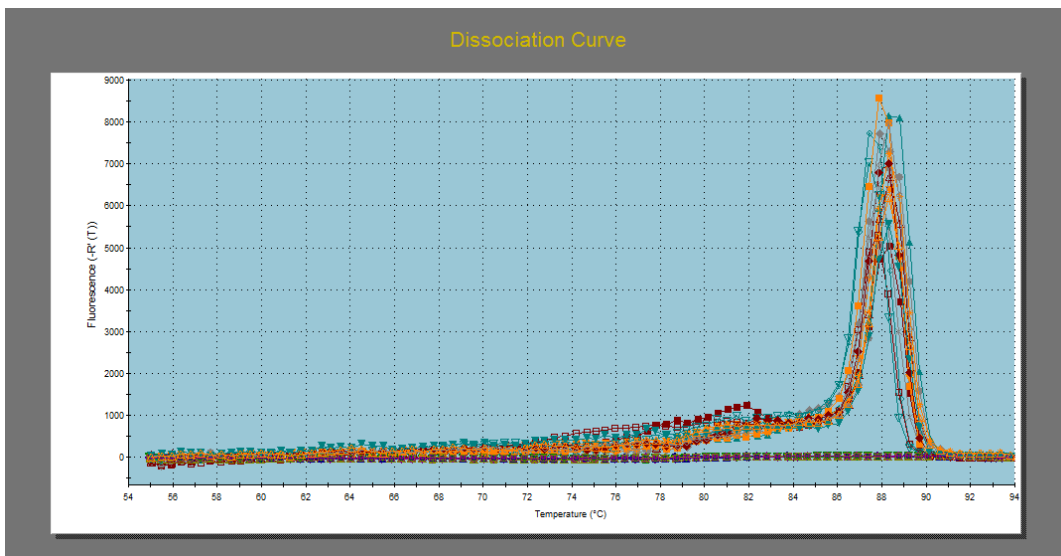


Figura N° 2A. Curvas de disociación de las muestras correspondientes a la curva de calibración.

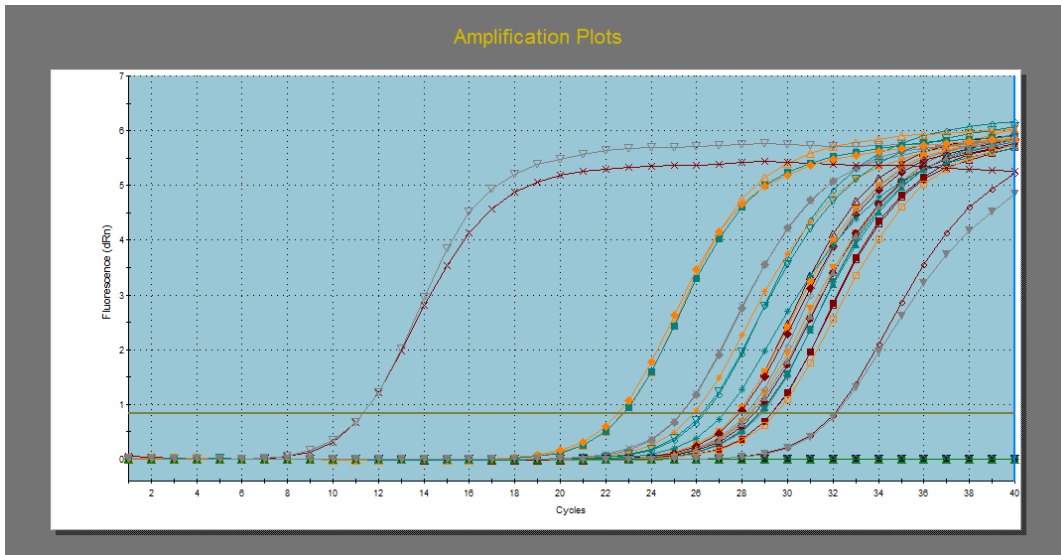


Figura N° 3A. Curvas de amplificación de las muestras correspondientes a la Muestras de ADNg.

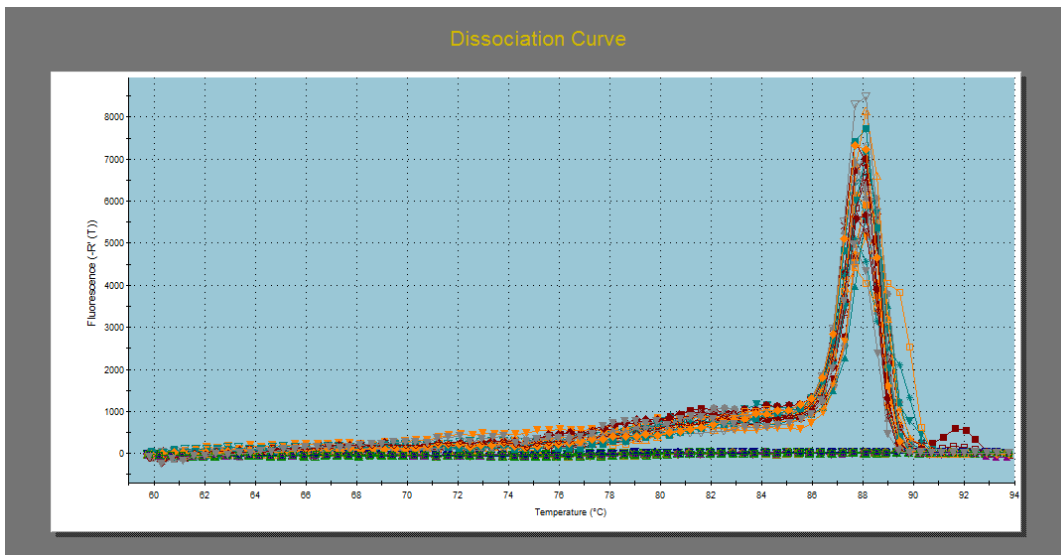


Figura N° 4A. Curvas de disociación de las muestras correspondientes a las muestras de ADNg.

**Tabla N° 2A. Análisis del número de copias:**

Muestra						
Well		Ct (dR)	Ct (dR)	Prom	Despeje x según fórmula	Nro de copias de las líneas
A1	LM16	31,14	31,15	31,145	0,801632956	6,3
A2	LM25	27,3	27,25	27,275	-0,63462609	0,2
A3	LM27	28,36	28,44	28,4	-0,217108926	0,6
A4	LM45	30,66	29,71	30,185	0,445351642	2,8
A5	LM82	29,64	29,87	29,755	0,285767304	1,9
A6	LM87	30,83	29,97	30,4	0,525143811	3,4

# Publicaciones



# 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
TALEN	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].

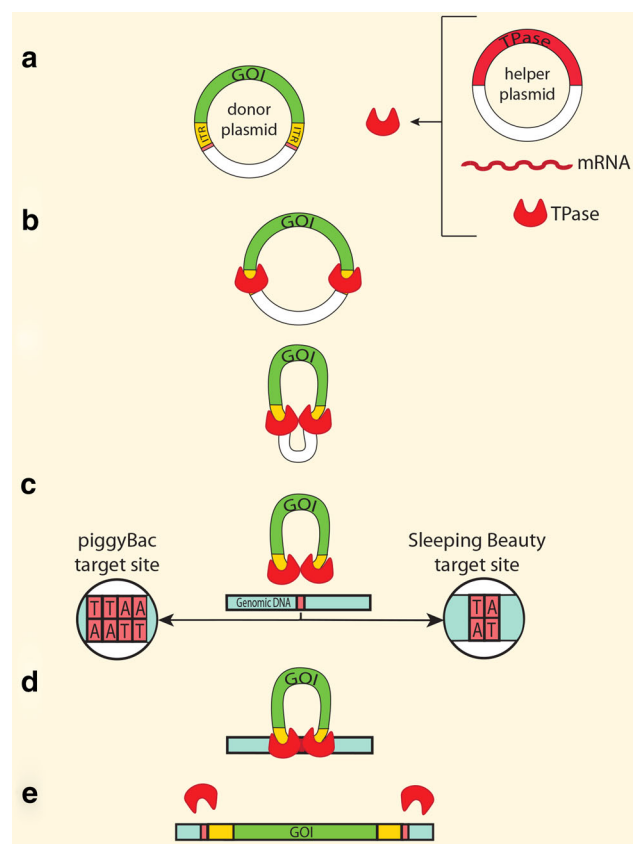
The need for advanced transgenic methodologies that permit precise genetic and highly efficient modifications in preselected DNA sequences has driven research efforts to develop hyperactive and codon-optimized transposases (SB, PB, Tol2) [10, 11, 65–68], recombinases (Cre, flipase) [13, 69] and customized 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 PuroAtk 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 beta1 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 monotocous species with long-generation interval like cattle, in which husbandry expenditures of surrogate females negatively impact the sustainability of transgenic endeavors.

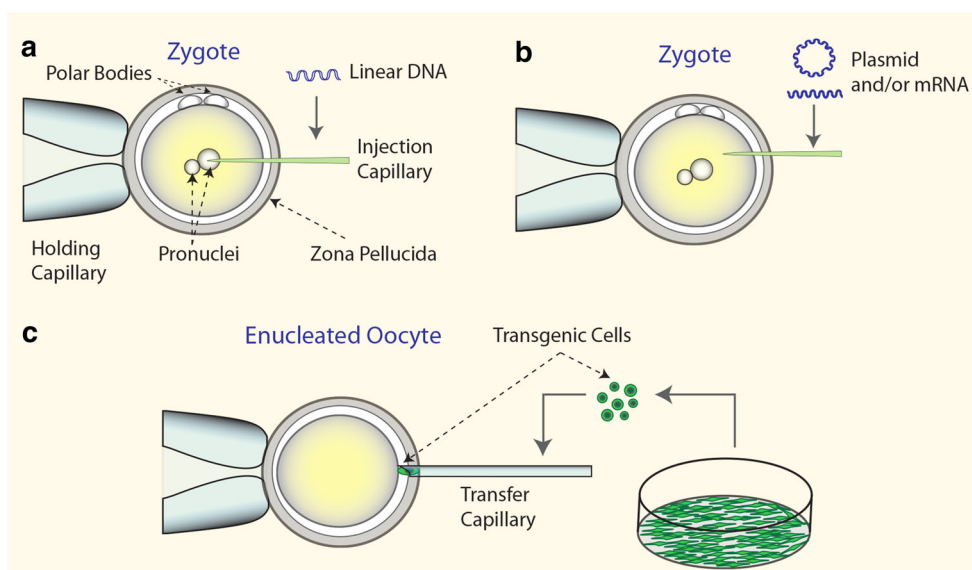
Donor cells can be transfected with linear or circular DNA transgenes for passive integration or with the components of an active system, such as SB or PB (Fig. 2)



**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	FLP R
		Unidirectional	Non-identical	Irreversible	Lambda
				Inversion, excision and integration	HK101 pSAM2
	Serine recombinases	Small	Identical	Irreversible	Beta-six
				Excision	CinH ParA
Large	Non-identical	Irreversible	Inversion, excision and integration	Bxb1 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].

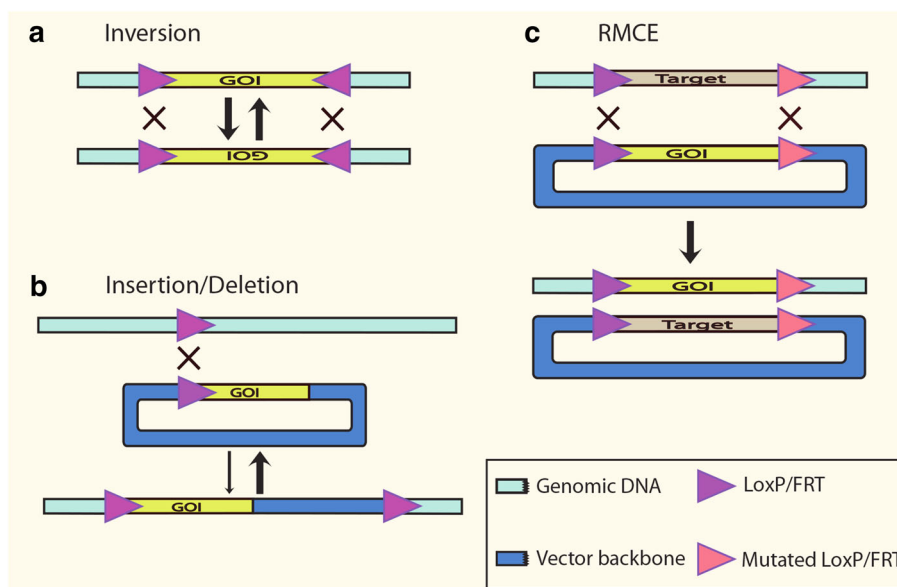
Members of the recombinase superfamily can be grouped according to the active amino acid present within the catalytic site in tyrosine or serine recombinases [126]. The mechanism of strand breakage, exchange and reunion markedly differs for each family (for details see [123]). The former group is further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

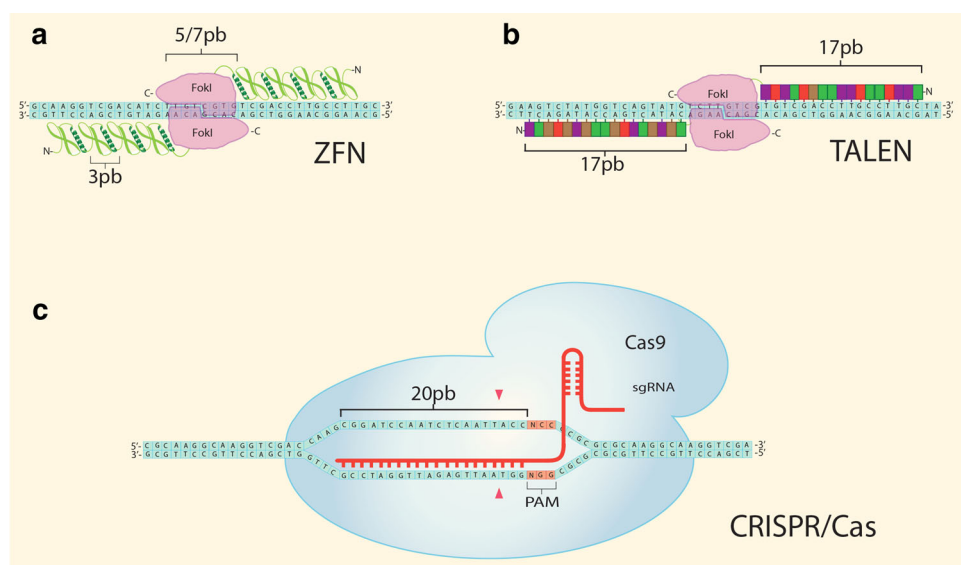
**Table 4** Selected designer nuclease approaches in livestock and monkeys

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	No integration of ZFN constructs	Clonal exp.	[268]
	Pig	<i>CMAH</i>	HDR, b, m	F0	0.4 %	SCNT		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]
	Cattle	Several	NHEJ, m, b	Preimplant	50 %	CPI	High deletion/insertion	NA	[187]
	Cattle	<i>MSTV</i>	NHEJ	F0	15 %	CPI	Mosaicism	NA	[233]
	Sheep	<i>MSTV</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	[248]
	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>MSTV</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; Tik1; 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-strain cleavage capability, are better suited for situations in which HDR-based genome editing 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 HimarI 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, Mairai 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062457)
  15. Whitelaw CB, Lillico 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_21)
  18. Lillico 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](https://doi.org/10.1007/s11248-010-9448-8)
  19. Carlson DF, Tan W, Hackett PB, Fahrenkrug SC (2013) Editing livestock genomes with site-specific nucleases. *Reprod Fertil Dev* 26(1):74–82. doi:[10.1071/RD13260](https://doi.org/10.1071/RD13260)
  20. 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-1878(199807)20:7<532:aid-bies3>3.0.co;2-m)
  59. Kues WA, Schwinzer R, Wirth D, Verhoeven 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](https://doi.org/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, Zarlign 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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, Batzoglu 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, Korf 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, Patrino 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1007/s11248-006-9014-6)
93. Yergeau DA, Johnson Hamlet MR, Kuliyyev 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-42)
96. Baus J, Liu L, Heggestad 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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. *Bio-technology* 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1007/s11248-010-9438-x)
108. Wilmut 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, Wilmut 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](https://doi.org/10.1007/s11248-013-9729-0)
112. Alessio A, Fili A, Forcato D, Olmos-Nicotra F, Alustiza F, Rodriguez N, Owens J, Moisyad 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1038/325401a0)
118. Sadowski P (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* 165(2):341–347
119. Fukushige 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 recombined 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. Ramírez-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. Sclementi 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, Fahrenkrug 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, Fahrenkrug 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, Wilmot 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, Percin 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, Cassidy 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 (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, Ruppiewski 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, Joung JK (2012) Engineered zinc finger nickases 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, Ménoiret 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, Joung 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-muscléd belgian blue and pied-montese cattle. *Genome Res* 7(9):910–916
232. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Méniéssier 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. 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, Joung 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1111/febs.12935)
250. Sung YH, Baek IJ, 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1038/nbt.2623)
254. Gasunas 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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, Grzybowski 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 minipigs with TALENs. *PLoS ONE* 8(12):e84250. doi:[10.1371/journal.pone.0084250](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1538/expanim.14-0034)



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Theriogenology

journal homepage: [www.theriojournal.com](http://www.theriojournal.com)

## 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.unrc.edu.ar](mailto:pbosch@exa.unrc.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.

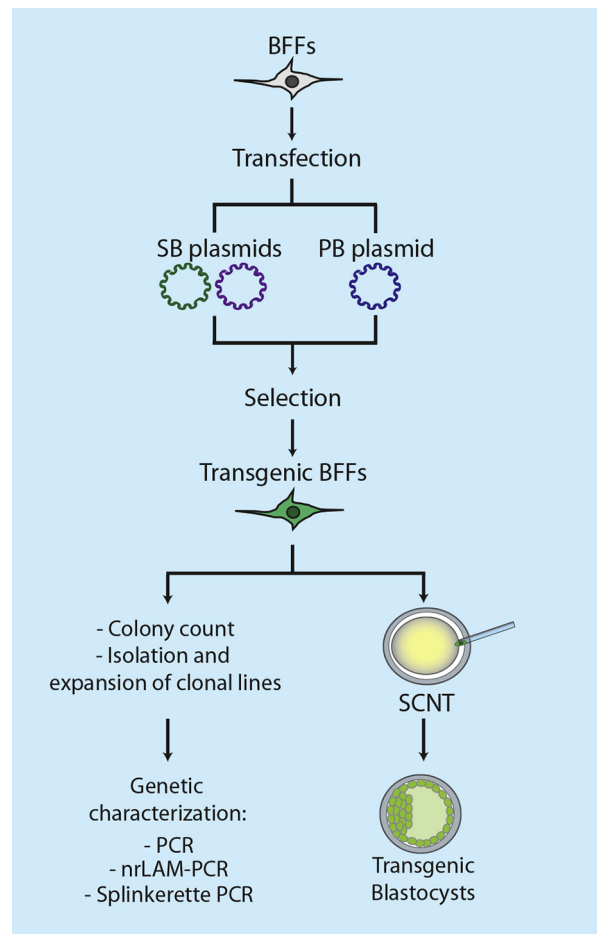


Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

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].

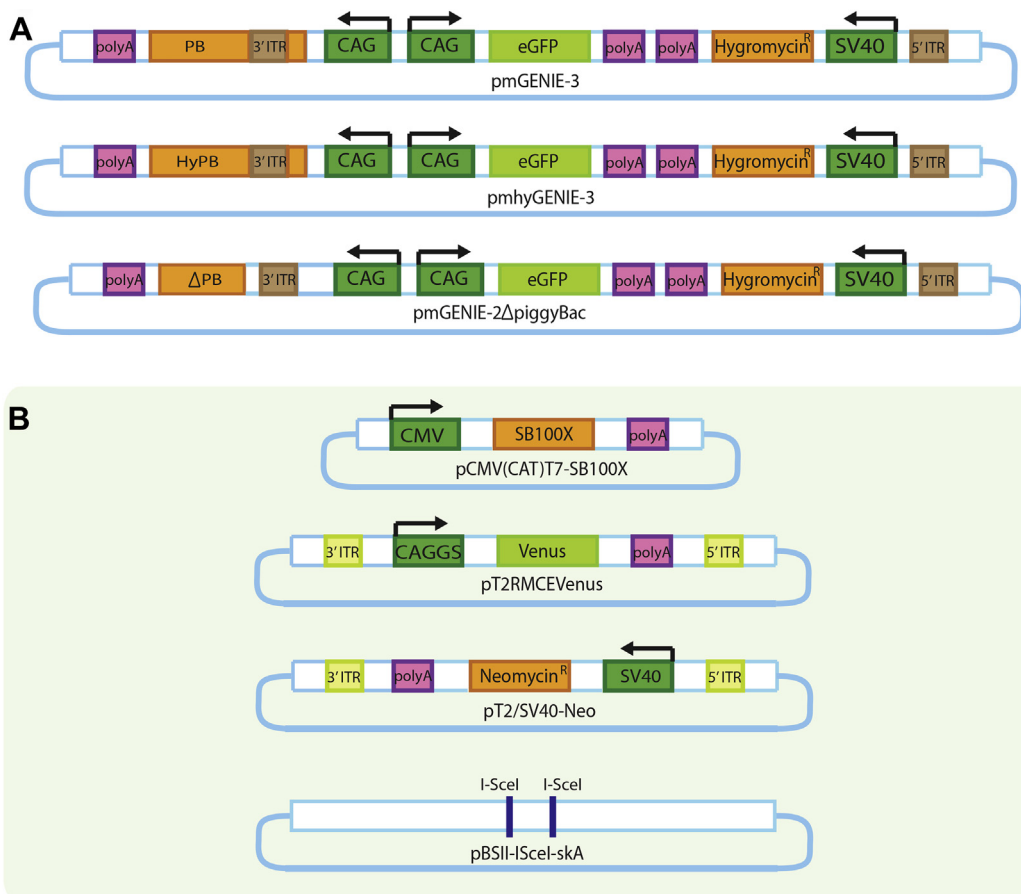
### 2.2.2. Sleeping Beauty plasmids

*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-1Scel-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

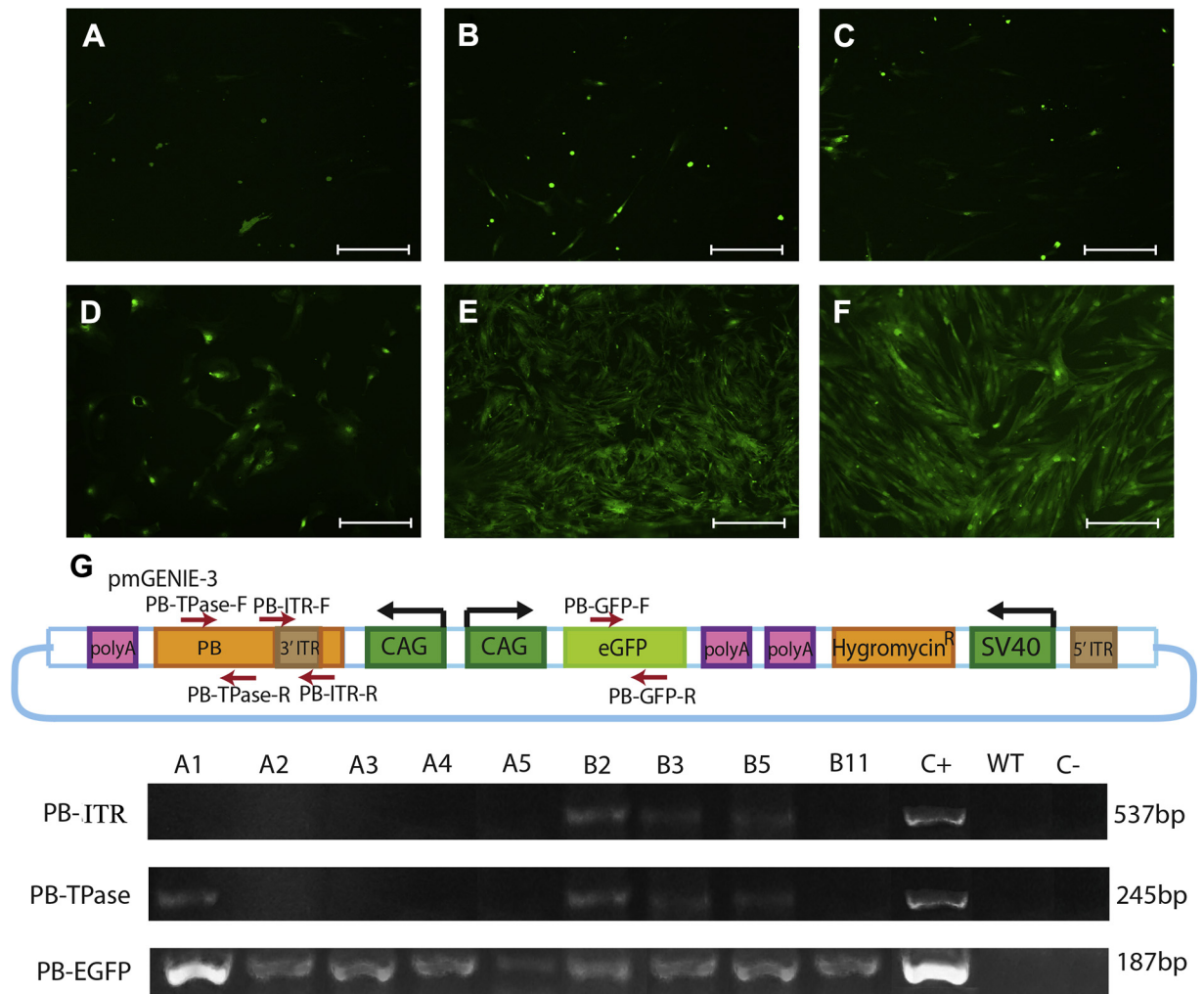
Transfected cells were kept under antibiotic selection for two weeks and the numbers of fluorescent colonies were counted in an inverted microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) with epifluorescence equipment. To assess the transposition activity of the different plasmids, we calculated the relative fold 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 determinate if nontranspositional integration of the recircularized

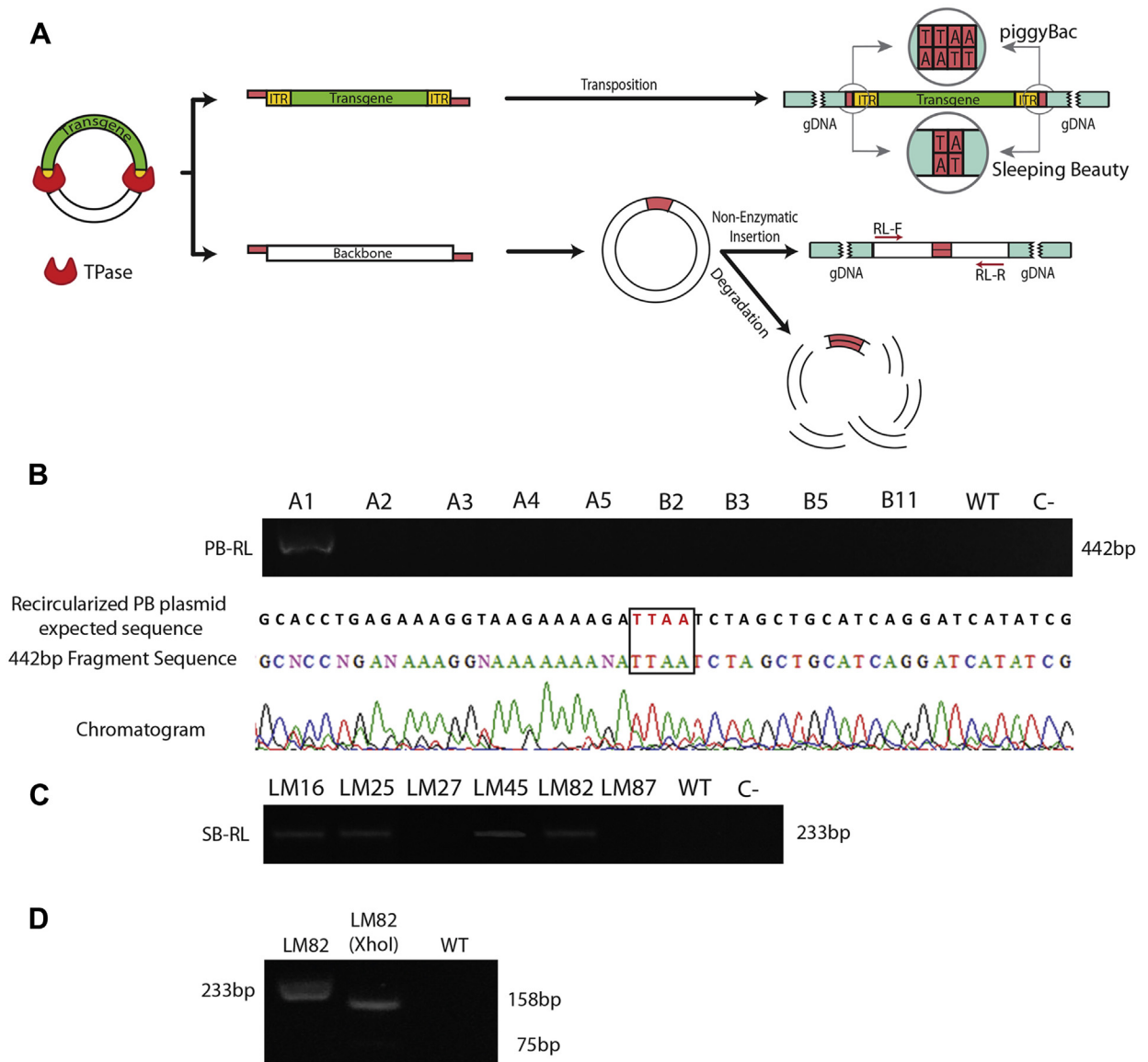


**Fig. 3.** Microphotographs of fibroblast cells two days (A, B, and C) and 16 days (D, E, and F) after transfection with *pmGENIE-2*/ΔpiggyBac (PB; A and D), *pmGENIE-3* (B and E), or *pmhyGENIE-3* (C and F; bars = 100 μm). After 14 days of antibiotic selection, discrete colonies of different sizes 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 TTA 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.

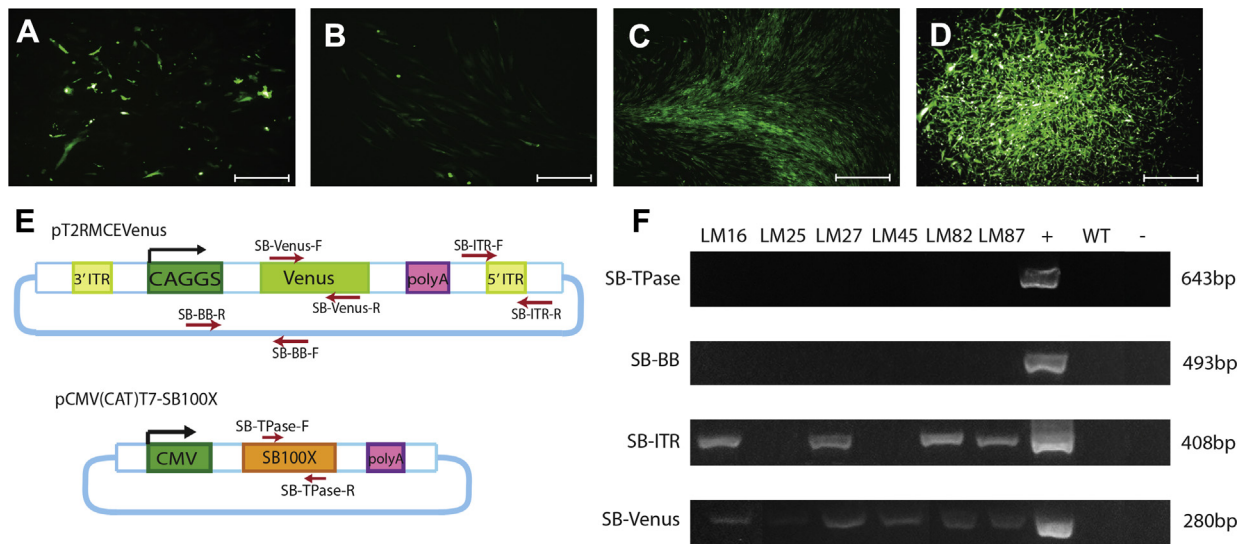
sequences by nontranspositional mechanisms. Polymerase chain reaction<sup>4</sup>: this reaction was conducted with primer pair SB-RL-F/SB-RL-R (Fig. 4A). The presence of a 233-bp amplicon indicated genomic integration of religated backbone after transposition had occurred. Polymerase chain reaction 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-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 °C for 10 minutes followed by 40 cycles of 10 seconds denaturalization at 95 °C, 10 seconds annealing at 61 °C, and 10 seconds elongation at 72 °C. The fluorescent signal was measured at the end of each elongation step at 72 °C. After amplification, a melting curve was performed by increasing the temperature from 70 °C to 95 °C at a rate of 0.1 °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 °C to 30 °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 *pmhyGENIE-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

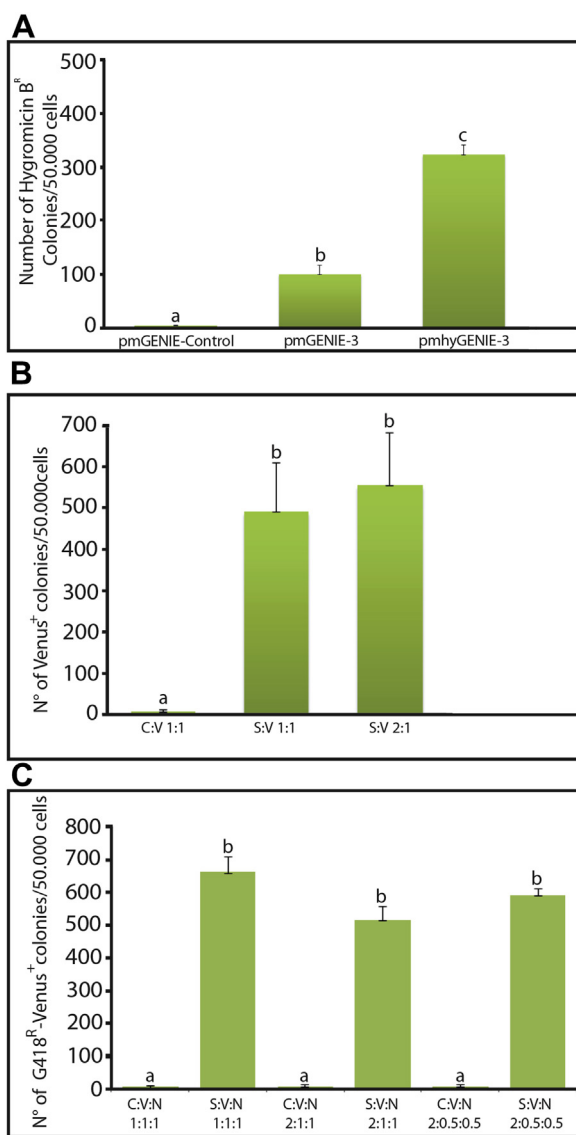
The experimental design is summarized in Figure 1, and the used plasmids are depicted in Figure 2. To assess the

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).

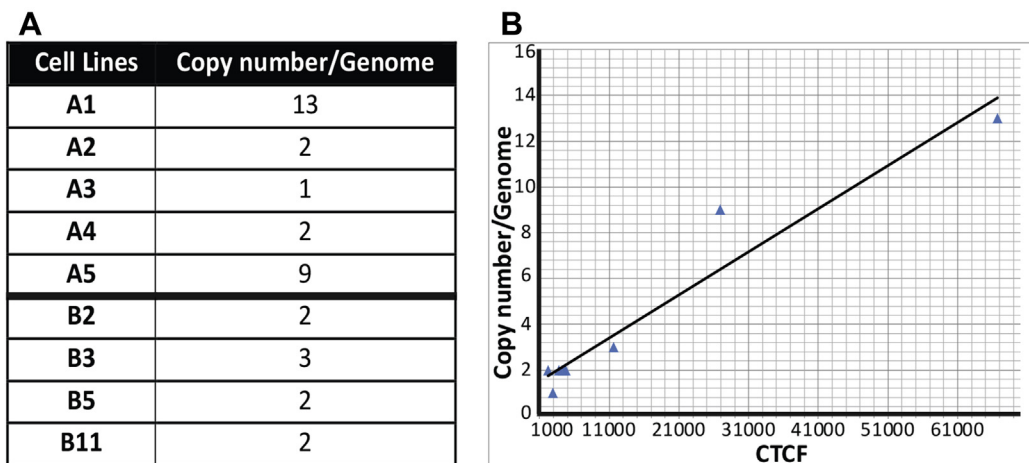
To identify the exact integration sites of the PB transposons in the bovine genome, we performed a non-restrictive linear amplification-mediated PCR as described previously [39,40]. Cloning and sequencing of 17 integration sites from five monoclonal transgenic cell lines transfected with *pmGENIE-3* confirmed specific transposase-mediated integration events at the PB TTA 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- $\lambda$ Scel-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 homogenously 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-3* 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**

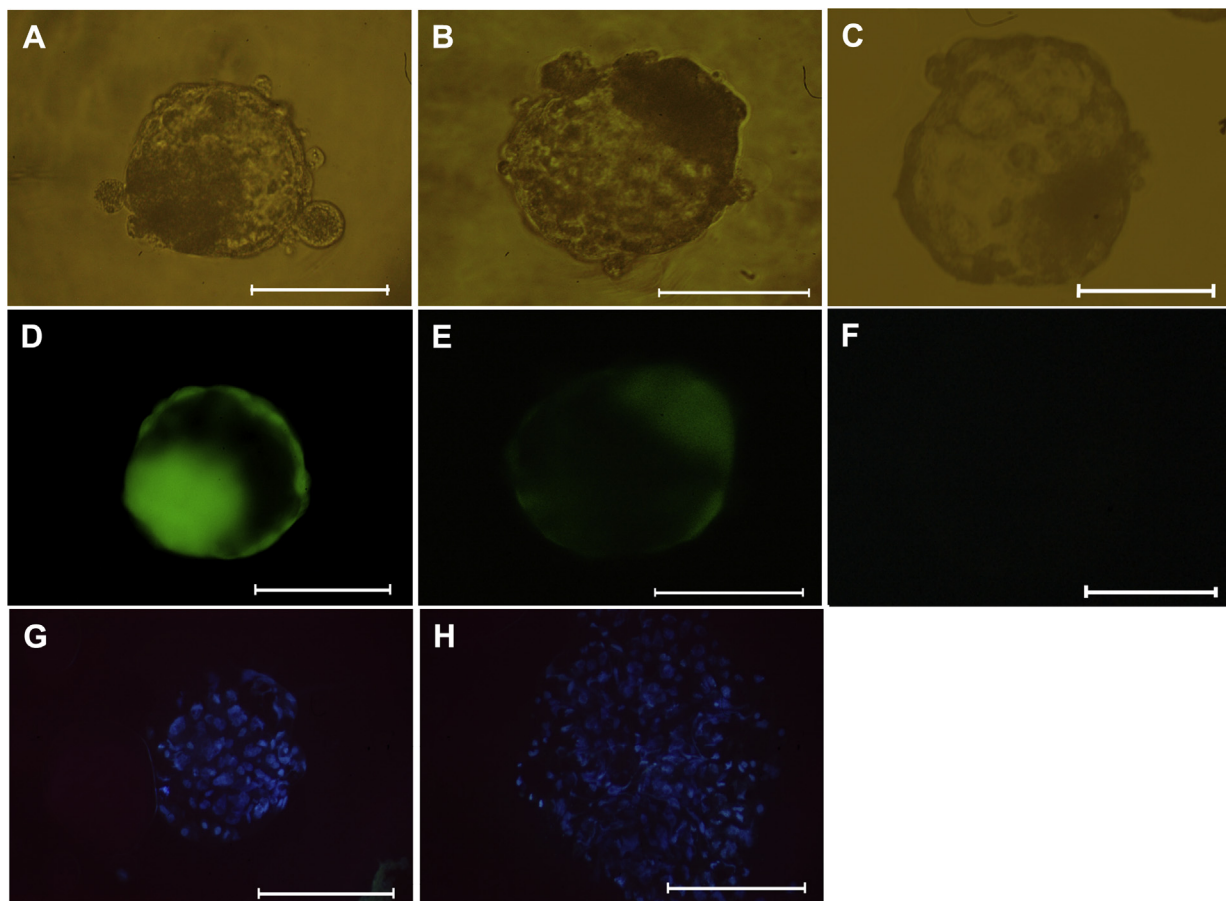
SCNT embryos produced with piggyBac and Sleeping Beauty transgenic cells.

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 transposition-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, Urschitz 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] Urschitz 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.
- [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, Izsvak 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 G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* 2014;13:1400–12.
- [39] Owens JB, Urschitz 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 nRLAM-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 K, 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, Vacacqua RC, Alessio A, Fili A, Forcato D, et al. Sleeping Beauty transgenesis in cattle. *Reprod Fert 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, Kakeda 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] Iager 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	ACTCCAGACATGCCAAGT
PB-TPase-R	AGATCCTGGACGAGCAGAAC
PB-TPase-F	GATCTCGTCGGTGAAGAACAG
PB-RL-F	GGTGCTCTTGAGGTGGAC
PB-RL-R	CCGCGACGAACTGGTATC
SB-Venus-F	TAGCCAGGTTGGTCACCAG
SB-Venus-R	TGTGACCGCGGCTCTAGAG
SB-ITR-F	CTCGAGAAGCTTGTGGAAGG
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 TTAA genomic sequence
1	ch15	19428292	Intergenic	cagactatcttttagggTAAACATATGAACCTTGAGAGGG
2	chrUn_JH122283	39105	unknown	cagactatcttttagggTAAAGGGATTGAGTGAATTTG
3	ch21	25472450	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGACCCC ATGGACTGCAGC
4	chrUn_AAFC03095622	1018	unknown	cagactatcttttagggTAAAGACCCCATGGACTGCAGC
5	ch5	79123143	<i>RBFOX2</i> , intron	cagactatcttttagggTAAATCTCCTTTGCAGAAAGGA
6	ch6	37957543	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGGAGTTTAAACAGGAATCA
7	ch7	105149760	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGTCAGATCCACCAGTCT
8	chrUn_JH121295	390708	unknown	cagactatcttttagggTAAATCTGAAGAAAAGTAAAA
9	ch15	141258670	Intergenic	cagactatcttttagggTAAATGTACTGACAAAGCTCCA
10	chX	529630	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGACAAATGTGCTCTTAAA
11	ch9	82826492	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGCCACAAAAGCGGGGTC
12	ch26	18051846	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAAAGGCAGTTCCGCCAT
13	ch2	8600480	<i>GULP1</i> , intron	cagactatcttttagggTAAAGATTAAGTGTGCCCCATC
14	ch16	19235265	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAAAGATGTTGAATTAAGTT
15	ch27	45374270	<i>UBE2E2</i> , intron	cagactatcttttagggTAAAGATGAAAAATCCCCAGT
16	ch27	10507265	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAAAAGGTAGCCAGTTGCA
17	ch7	49826129	Intergenic	cagactatcttttagggTAAAGTGGAGGAGACTTTTTT

**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> )	TTCTGTCATAAGGGTGGTGCATATGCATACAGTTGAAGT
C5.2	X	1	ZFX intron	TCCCATGGGCCAAACACTGATCTAAGTATACAGTTGAAGT
C5.4	25	3016	Sorting nexin 29 ( <i>SNX29</i> )	CCCTGGTGGGGCGTATGCGGAAAGGAACTACAGTTGAAGT
C5a.2	26	2080521	Intergenic	AANTGGCCAACAAACAATATAGTGACCTACAGTTGAAGT
C5a.5	12	27360511	Intergenic	TTTTTAGTGCAGGTTTGAGGGCTGGAATTACAGTTGAAGT
C6.1	mtDNA	26009	Mitochondrial acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 ( <i>ACAA2</i> ), complete cds	CTGACACTGTTCCACTGTTTCCCCATCTACAGTTGAAGT
C6a.3	19	44952926	Intergenic	GCCAGGCTGGGAGGATCTGGACCATATACAGTTGAAGT
C6a.5	25	36298502	Intergenic	TGAATGGATAAAGAAAATATGGCATGTACAGTTGAAGT
C7.2	13	35994	Intergenic	GACACTGTTCCACTGTTTCCCCATCTACAGTTGAAGT
C7.3	22	24703993	Intergenic	TTAAATAGACTCTGAATTCTAAGCATTACATACAGTTGAAGT
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	GAACTGAAGTTGGAGAGACACAAGTGTACAGTTGAAGT
31.1	26	24931481	Intergenic	AAGGATTTTTAAAAATTAATAAATATACAGTTGAAGT

# Transfection of bovine fetal fibroblast with polyethylenimine (PEI) nanoparticles: effect of particle size and presence of fetal bovine serum on transgene delivery and cytotoxicity

D. O. Forcato · A. E. Fili · F. E. Alustiza · J. M. Lázaro Martínez ·  
S. Bongiovanni Abel · M. F. Olmos Nicotra · A. P. Alessio ·  
N. Rodríguez · C. Barbero · P. Bosch

Received: 4 May 2016 / Accepted: 9 February 2017  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

**Abstract** The development of efficient transfection protocols for livestock cells is crucial for implementation of cell-based transgenic methods to produce genetically modified animals. We synthesized fully deacylated linear 22, 87 and 217 kDa polyethylenimine (PEI) nanoparticles and compared their transfection efficiency and cytotoxicity to commercial branched 25 kDa PEI and linear 58 kDa poly(allylamine) hydrochloride. We studied the effect of PEI size and presence of serum on transfection efficiency on primary cultures of bovine fetal fibroblasts and

established cells lines (HEK 293 and Hep G2). We found that transfection efficiency was affected mainly by polymer/pDNA ratio and DNA concentration and in less extent by PEI MW. In bovine fibroblast, preincubation of PEI nanoparticles with fetal bovine serum (FBS) greatly increased percentage of cells expressing the transgene (up to 82%) while significantly decreased the polymer cytotoxic effect. 87 and 217 kDa PEI rendered the highest transfection rates in HEK 293 and Hep G2 cell lines (>50% transfected cells) with minimal cell toxicity. In conclusion, our results indicate that fully deacylated PEI of 87 and 217 kDa are useful DNA vehicles for non-viral transfection of primary cultures of bovine fetal fibroblast and HEK 293 and Hep G2 cell lines.

---

D. O. Forcato and A. E. Fili have contributed equally to this work.

---

D. O. Forcato · A. E. Fili · M. F. Olmos Nicotra ·  
A. P. Alessio · N. Rodríguez · P. Bosch  
Department of Molecular Biology, FCEFQyN,  
Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina

D. O. Forcato · A. E. Fili · F. E. Alustiza ·  
J. M. Lázaro Martínez · S. Bongiovanni Abel ·  
M. F. Olmos Nicotra · A. P. Alessio · P. Bosch (✉)  
National Scientific and Technical Research Council  
(CONICET), Buenos Aires, Argentina  
e-mail: pbosch@exa.unrc.edu.ar

F. E. Alustiza · S. Bongiovanni Abel · C. Barbero  
Department of Chemistry, FCEFQyN, Universidad  
Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina

J. M. Lázaro Martínez  
IQUIFIB-FFyB, Universidad de Buenos Aires,  
Buenos Aires, Argentina

**Keywords** Transgenesis · Cattle · Fibroblasts ·  
Polyethylenimine · Cell transfection

## Introduction

A broad range of potential applications of transgenic farm animals have been proposed, including disease modeling, recombinant protein production and improvement of productivity traits (Niemann et al. 2009). Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has become a major tool for producing large transgenic farm animals. For SCNT, in vitro cultured cells are genetically manipulated and used as nuclear donor to

generate transgenic offspring. Although somatic cells are not normally considered a limiting resource for SCNT, identification of cheap, efficient and low toxicity protocols for DNA delivery into cells would positively impact SCNT-based transgenic methodologies, particularly when working with hard-to-transfect or low prolificacy cell lines.

Polycations have been extensively used as non-viral alternative vectors for delivery of nucleic acids into cells for many decades (Boussif et al. 1995). One of the most studied polycations is PEI, which can be manufactured to achieve different sizes (kDa) and structures (linear or branched) depending on the particular synthesis process (Lázaro-Martínez et al. 2015; Thomas et al. 2005b). The high positive charge density of PEI at neutral pH could explain its capacity to condense plasmid DNA (pDNA) into polyplexes. These PEI/pDNA complexes are endocytosed by cells and transported through the cytoplasm to the nucleus, while preventing pDNA from enzymatic degradation during cellular trafficking and digestion by nucleases (Lee et al. 2010). The ability of PEI to form complexes with nucleic acids and carry them into the cell nucleus has been extensively documented under *in vivo* and *in vitro* conditions (cells in culture). However, a major drawback associated with the use of PEI as transfection reagent is the cytotoxic effect on exposed cells and tissues. A commonly reported finding is impaired cell viability after *in vitro* transfections with the polymer (Fan et al. 2012; Moghimi et al. 2005; Yang et al. 2008) and severe systemic side effects and inflammation in exposed animals (Chollet et al. 2002; Kawakami et al. 2006).

Several studies have connected transfection efficiency and cytotoxicity of PEI preparations to physicochemical properties, namely molecular weight and branching ratio of the polymer (Godbey et al. 1999; Mintzer and Simanek 2009; Neu et al. 2005; Ogris et al. 1998). Consequently, different strategies have been devised (i.e., PEI size, branch density, deacylation, and conjugation with functional molecules, among others) in order to reduce cell damage after PEI transfections. However, most of these techniques are labor intensive and/or require time consuming purification steps (Jiang and Salem 2012; Kichler 2004; Sawant et al. 2012; Swami et al. 2007; Yang et al. 2008).

The aim of this work was to study the effect of polymer size and polymer/pDNA ratio on bovine fetal fibroblast (BFF), HEK 293 and Hep G2 transfection efficiency and cytotoxicity. We synthesized linear 22, 87 and 217 kDa polymers (22K, 87K and 217K) and compared their transfection efficiency and cytotoxicity with a commercial branched 25 kDa PEI (25K) and a linear 58 kDa poly(allylamine) hydrochloride (58K PAH) in primary cultures of BFF and established cell lines.

## Materials and methods

### Polymer synthesis

The linear poly(ethyleneimine hydrochloride) (PEI) polymers with molecular weights of 22, 87 and 217 kDa were synthesized from the corresponding 50, 200 and 500 kDa poly(2-ethyl-2-oxazoline) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) respectively. Different molecular weight PEIs were synthesized as described by Lázaro Martínez et al. (2015) with minor modifications: 1 g of poly(2-ethyl-2-oxazoline) was added to 120 mL of a 24% HCl solution and refluxed for 96 h. The poly(2-ethyl-2-oxazoline) dissolved approximately in 1 h, and 2 h later a white precipitate (PEI) appeared in the flask and persisted throughout the rest of the reaction. Then, the reaction mixture was filtered and the white solid was washed with 5 mL of deionized water. Then, the solid was air-dried for 48 h, dissolved in 40 mL of deionized water and lyophilized overnight.

The linear poly(allylamine) hydrochloride (PAH) with an average molecular weight of 58 kDa and the branched 25 kDa PEI were purchased from Sigma-Aldrich. JetPRIME<sup>®</sup>, transfection reagent was purchased from Polyplus-transfection SA (Illkirch, France).

### Physicochemical characterization of polymers

Identification and quality of the synthesized products were determined by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ (ppm): 3.58 (s, 2H) and <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz) δ (ppm): 42.7. A comprehensive physicochemical characterization of synthesized polymers can be found in a previous report (Lázaro-Martínez et al. 2015).

### Agarose gel retardation assay

pDNA condensation with polymers was assessed by an electrophoretic mobility assay. For polymer-pDNA polyplex formation, a fixed amount of pDNA (3  $\mu\text{g}$ ) was mixed with increasing amounts of different polymers and incubated 10 min for complexation at room temperature in a humidity chamber. Samples were loaded on a 0.8% agarose gel containing a green fluorescent DNA dye (1:10,000; GelGreen, Biotium, Hayward, CA, USA), and run at 12 V/cm in TAE buffer for 40 min. Gels were observed in a blue light transilluminator and photographed. Then agarose gels were stained with Coomassie Brilliant Blue to reveal polymer nanoparticles.

### Isolation of BFF and culture of BFF, HEK 293 and Hep G2 cells

Bovine fetal fibroblasts were obtained from slaughterhouse fetuses of 90–150 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  $\text{cm}^2$ ) was removed from the flank of the fetus and sectioned with a scalpel blade into smaller pieces. Explants were placed in cell culture plates (3–4 explants per 100 mm plate) in 6 mL of cell culture medium (DMEM, 1  $\times$  antibiotic/antimycotic, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FBS (Natocor, Cordoba, Argentina) and cultured for approximately 10 days at 38.5  $^\circ\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air and high humidity. When the cells reached 70–80% confluence, they were trypsinized (trypsin 0.5%, Sigma-Aldrich Co.) and passaged to a T-75 culture flask for cell propagation. Fibroblasts were frozen in DMEM containing 20% FBS and 10% DMSO (Sigma-Aldrich Co.) and kept in liquid nitrogen until use.

Human embryonic kidney cells 293 (HEK 293, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and Hep G2 (human liver cancer cell line, American Type Culture Collection) were cultured in cell culture medium (DMEM, 1 $\times$  antibiotic/antimycotic, Gibco, CA, USA) at 37  $^\circ\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air and high humidity. When the cells reached 70–80% confluence, they were trypsinized (trypsin 0.5%, Sigma-Aldrich Co.) and passaged to a T-75 culture flask for cell propagation. Both cell types

were frozen in DMEM containing 20% FBS and 10% DMSO (Sigma-Aldrich Co.) and kept in liquid nitrogen until use.

### Transient in vitro gene transfection

Twenty-four hours prior to the gene transfections, BFF, HEK 293 and Hep G2 cells were plated in a 24-well plate at an initial density of 30,000 cells/well. pZsGreen1-N1 mammalian expression plasmid (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA USA) was purified from *E. coli* DH5- $\alpha$  strain with ZymoPURE<sup>TM</sup> maxi prep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and used as reporter construct. This plasmid encodes a human codon-optimized variant of the wild-type *Zoanthus* sp. green fluorescent protein, ZsGreen1 under the control of the constitutive promoter human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter.

For transfection assays, each polymer solution was adjusted to 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , pH 7 and passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  pore size filter and stored in sterile 1.5 mL tubes. Polymer samples were subjected to three freeze–thaw cycles (–80 to 37  $^\circ\text{C}$ ) before used in transfection experiments.

Polymer/pDNA polyplexes for cell transfection were prepared at different ratios (w/w) by adding an appropriate amount of PEI to 0.5, 1 or 2  $\mu\text{g}$  of pZsGreen1-N1 in 300  $\mu\text{L}$  of DMEM plus antibiotics with or without 10% fetal bovine serum (FBS), depending on particular experimental design. These polymer ratios were chosen based on our previous work, in which we reported optimal conditions for transfection of BFF with commercial PEI 25K (Forcato et al. 2012). The polymer/pDNA mixtures were incubated for 15 min at room temperature before use to allow for complexation.

After 3 h of incubation of cells with polyplexes, 700  $\mu\text{L}$  of DMEM + FBS medium were added to each well. Reporter gene expression was determined 48 h after transfection in a Becton–Dickinson FACS-can flow cytometer (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

The JetPRIME/pDNA complexes were prepared according to the manufacturer's recommendations.

### Stable transgene integration

In order to establish if PEI nanoparticles could mediate stable transgene integration into cells

genome, BFF, HEK 293 and Hep G2 cell cultures were transfected with the components of the *Sleeping Beauty* transposon system as previously described for bovine cells (Alessio et al. 2016). Briefly, the three cell types were cotransfected with a helper plasmid (pCMV-SB100X) which carries an expression cassette for the SB transposase, and two donor vectors (pT2/Venus/RMCE which harbors an expression cassette for Venus fluorescent protein, and pT2/SV40-Neo carrying a neo resistance cassette; cassettes in both plasmids are flanked by the SB inverted terminal repeats). All plasmids were purified from *E. coli* DH5- $\alpha$  strain with ZymoPURE™ maxi prep kit (Zymo Research). After 21-days antibiotic selection, monoclonal colonies were individually recovered from 100 mm plates using cloning rings. Monoclonal colonies were trypsinized and transferred to 100 mm plates to obtain monoclonal transgenic cell lines. Genomic DNA was isolated from transgenic cell lines using QuickDNA™ MiniPrep (Zymo Research) following the manufacturer's protocol. Transgene integration was assessed by PCR amplification of a 280-pb fragment from the Venus gene using the following primers: Fw: TAGCCCAGGGTGGTCACCAG; Rev: TGTGACCGGCGGCTCTAGAG.

#### MTT assay

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay was used to study the effect of polymers on cell viability. BFF, HEK 293 or Hep G2 cells were seeded in a 96-well plate at an initial density of 5000 cells/well in 100  $\mu$ L of the DMEM +10% SFB. After 24 h, the cells were exposed to increasing concentration of polymers and incubated in a humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> at 38.5 or 37 °C depending on each cell type requirements. Then, MTT reagent (5 mg/mL) was added to each well 24 h after polymers addition and incubated for 3 h. The medium in each well was removed and replaced by 100  $\mu$ L of DMSO. The absorbance at 540 nm was recorded by a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each treatment was run in octuplicate. The cell viability is expressed as percentage of change over the control (considered 100%) and it was calculated with the following formula: Cell viability (%) = (OD of polymer-treated sample/OD of untreated sample)  $\times$  100. The data are shown as the mean value  $\pm$  SEM.

## Results

### Polymer/pDNA complexation analysis

Polymer/pDNA complexation is known to be prerequisite for cell internalization and successful transfection (Tian et al. 2007). Formation of polymer/pDNA complexes was studied by agarose gel electrophoresis. Complexation was inferred from the retardation of pDNA mobility in the gel.

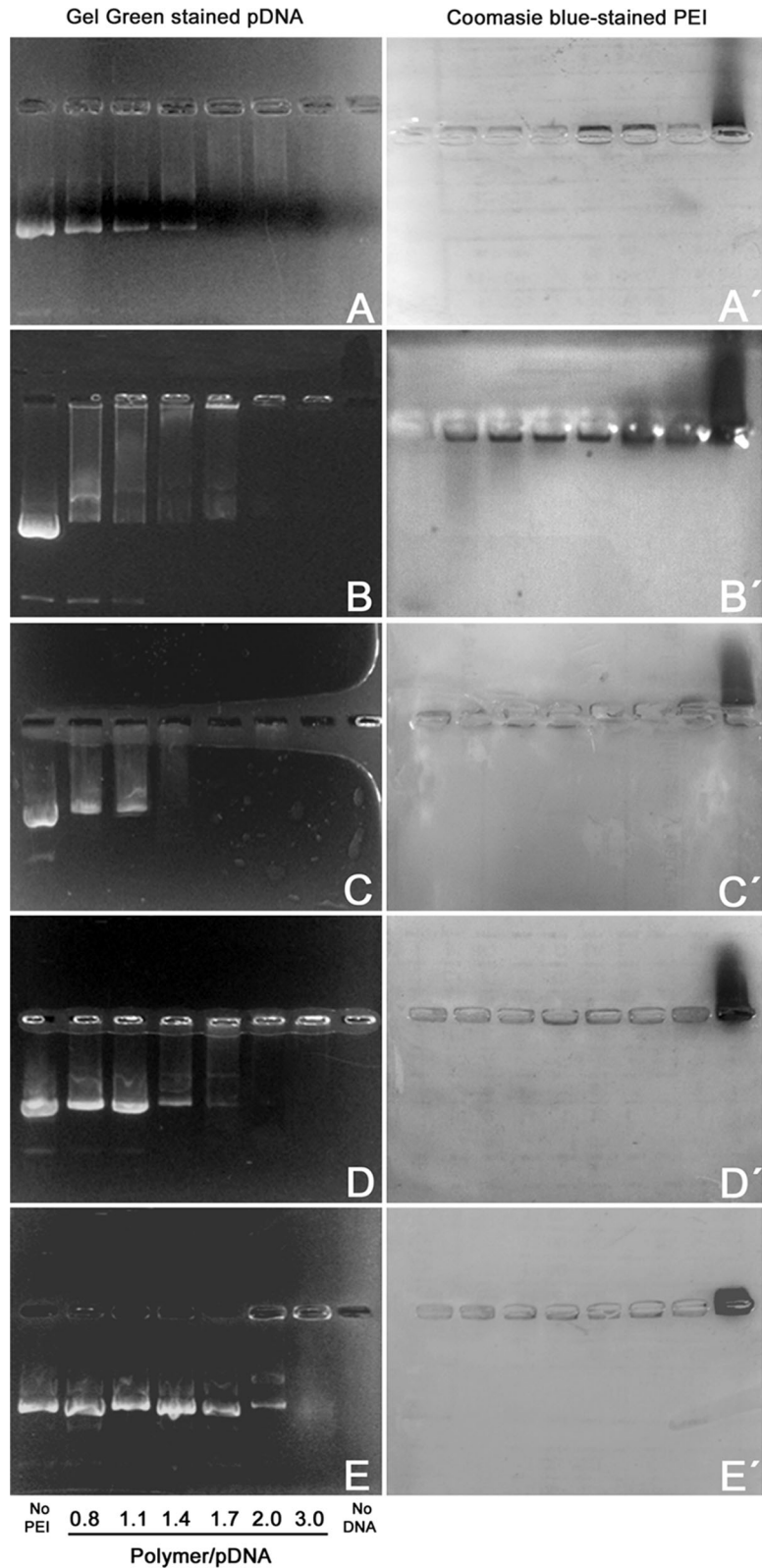
As it can be seen in Fig. 1, PEI 22K, 87K, and 217K and the commercial PEI 25K efficiently complexed pDNA at almost the same PEI/pDNA ratios (no free pDNA mobility was observed at these ratios). Critical PEI/pDNA ratio for complete retardation was similar for all PEIs under study, since for both PEI 22K and 87K it was about 1.7 (Fig. 1a, c, respectively) and for PEI 25K and 217K was about 2.0 (Fig. 1b, d). Complete pDNA retardation with PAH was not observed at the PAH/pDNA ratios studied, what may explain the poor transfection efficiency of PAH observed in our study (see below).

### Polymer cytotoxic effect on BFF

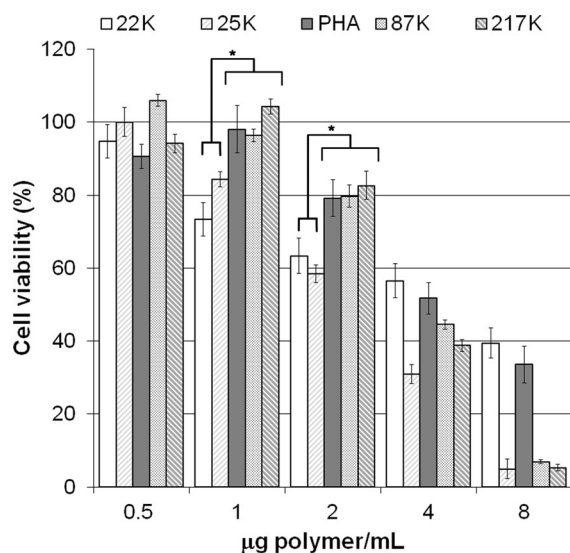
It has long been known that cationic polymer MW affects both transfection efficiency and cytotoxicity (Fischer et al. 1999). Low MW PEIs offer poor transfection efficiency and are nontoxic or slightly toxic to exposed cells both in vitro and in vivo (Lungwitz et al. 2005; Neu et al. 2005). Conversely, both acylated and deacylated high MW PEIs are efficient for delivering DNA into cells but cause significant cytotoxicity, mainly at high concentrations. High concentration of polymeric cations in the extracellular medium has been reported to be harmful to different cells lines (Thomas et al. 2005a, b). Here we determined cytotoxicity of homemade fully deacylated PEIs (22, 87, and 217 kDa), 25 kDa commercial PEI and PAH on BFF, HEK 293 and Hep G2 cells.

For all studied polymers, BFF viability decreased as the polymer concentration increased (Fig. 2). No cytotoxic effect was detected when cells were exposed to 0.5  $\mu$ g/ml of PEIs or PAH. Cell viability of cells incubated with 1  $\mu$ g/mL of PAH, PEI 87K or 217K was not affected by the treatment, but the same concentration of PEI 22K and 25K significantly impaired BFF viability (Fig. 2;  $p < 0.05$ ). Similarly, at 2  $\mu$ g/ml cell viability was compromised in cultures

**Fig. 1** Agarose gel electrophoresis of polymer particles mixed at varying ratios with circular pDNA: 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, 2.0 or 3.0. pDNA (3  $\mu$ g) and polymer alone (5  $\mu$ g) controls were also included. **a** PEI 22K. **b** PEI 25K. **c** PEI 87K. **d** PEI 217K. **e** PAH 58K. Gel photographs on the left show Gel Red stained DNA migration observed under blue LED light. Pictures on the right (a' through e') correspond to the same agarose gels stained with Coomassie Brilliant Blue to reveal polymer electrophoretic migration. Reverse migration of polymers alone can be observed on the rightmost lane in each gel







**Fig. 2** Dose-dependence effect of cationic polymers in DMEM without FBS or pDNA on BFF viability. Cell viability was measured by MTT metabolism. Results are expressed as a percentage of the absorbance of untreated cells and presented as the mean of three independent replicates  $\pm$ SEM. Viability of cells treated with PEI 22K and 25K at 1 and 2  $\mu$ g of polymer per ml was significantly lower compared to the other polymers studied (asterisk denotes differences at  $p < 0.05$ )

treated with PEI 22K and 25K (Fig. 2). PEI 22K and PAH were the less cytotoxic polymers, although their transfection efficiency was poor (Table 1). At 4  $\mu$ g/mL, all polymers were highly cytotoxic since cell viability dropped below 60%.

#### Effect of serum on BFF transfection efficiency

We hypothesized that presence of serum during cell transfection reduces polymer cytotoxicity and enhances transfection efficiency. Therefore, BFF cultures were transfected with different polymers in

**Table 1** Transfection efficiency (percentage of fluorescent cells) obtained with different polymer/pDNA ratios (1:1 and 2:1) in DMEM without FBS

Polymer/pDNA ratio (w/w)	1:1			2:1		
	pDNA ( $\mu$ g)	2	1	0.50	1	0.50
PEI 22K	2.5	0.7	0.8	21.2	2.6	2.6
PEI 25K	32.5	13.5	1.2	38.4	12.2	12.2
PEI 87K	1.1	0.5	0.6	24.0	2.7	2.7
PEI 217K	13.0	7.3	0.6	22.1	15.1	15.1
PAH	16.2	2.5	2.3	7.9	2.3	2.3

absence or presence of 10% FBS and the efficiency of gene delivery determined by flow cytometry. Two different polymer to pDNA ratios were used, i.e., 1:1 and 2:1. Transfection efficiency ranged from 0.5 to 38.4% GFP positive cells, with the best efficiencies obtained with 2  $\mu$ g of polymer complexed with 1  $\mu$ g of pDNA (Table 1).

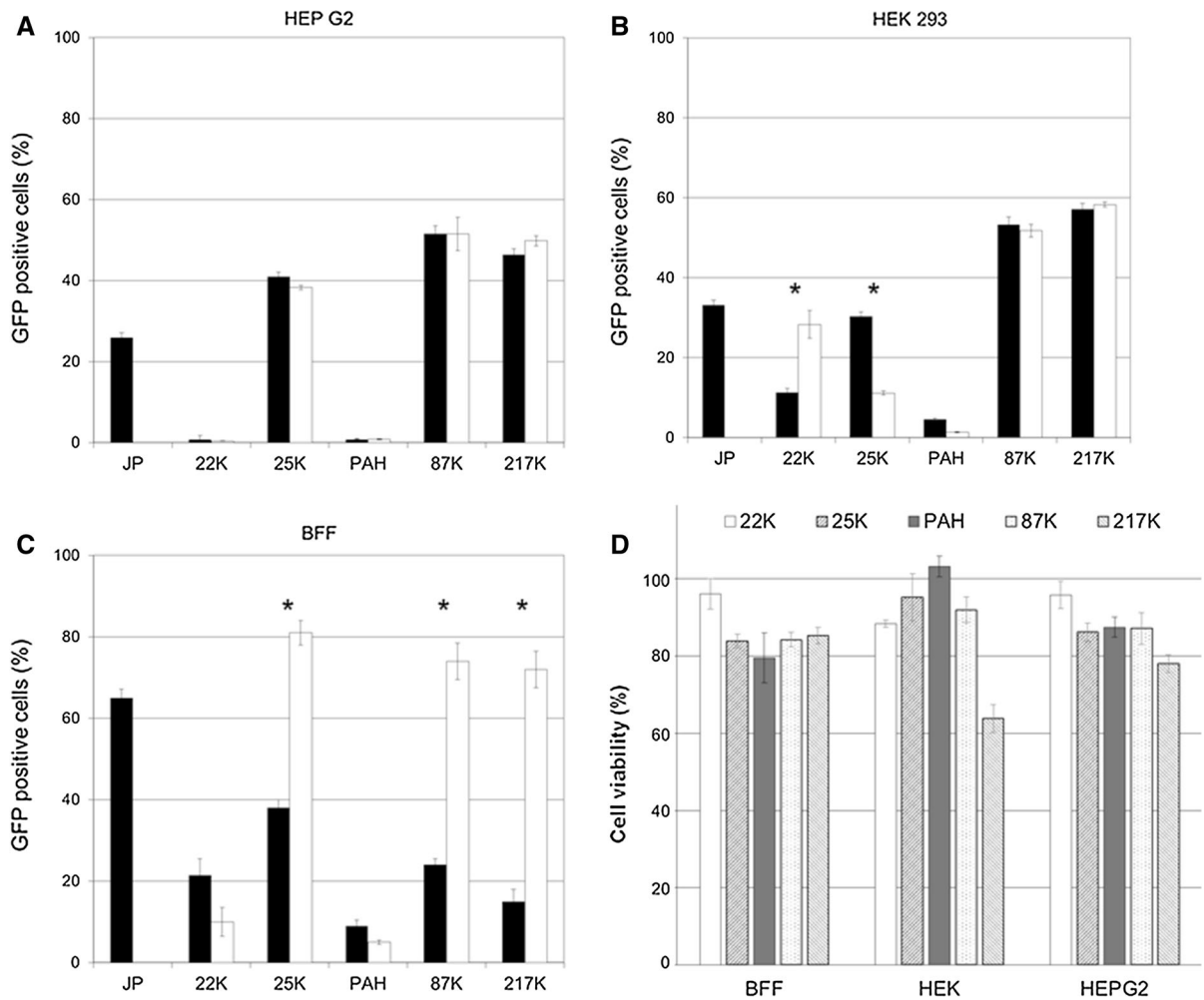
Carrabino et al. (2005) reported that complexation of PEI with pDNA in presence of human serum albumin increased transfection efficiency and markedly decreased polymer toxicity. Since human albumin is difficult to purify and therefore expensive, we decided to use fetal bovine serum (FBS) as a homologous protein source. Polymer/pDNA ratio of 2:1 using 1  $\mu$ g pDNA, which assures a balance of considerable transfection efficiency and acceptable toxicity (cell survival  $>60\%$  for all polymers studied), was chosen to further investigate the effects of FBS on cell toxicity and transfection. Presence of FBS during the complexation step significantly increased cell transfection efficiency for fully deacylated PEI 87K and PEI 217K and for branched 25K, while it failed to increase efficiency of gene delivery for 22K and PAH (Fig. 3).

Interestingly, the commercial branched PEI 25K, which is known to possess a higher charge density than the fully deacylated linear PEIs (Jeong et al. 2001), showed a higher cytotoxic effect compared to 87K and 217K when incubated without FBS, supporting the idea that a higher charge density contributes to the toxic effect due to stronger electrostatic interactions with anionic macromolecules from the cell surface as some authors have suggested (Di Gioia and Conese 2009; Hunter 2006).

However, PEI 22K, which possesses the lower charge density per molecule, caused as much reduction on cell viability as non deacylated 25K, suggesting that particle size could be also related to polymer cytotoxicity. The addition of FBS to small MW PEIs (deacylated or not) could increase significantly polyplexes size, and therefore reduce cell toxic effect of small-PEIs. This effect is clearly observed in Fig. 3d, where PEI 22K and 25K polyplexes assembled in DMEM + FBS improved cell viability to values above 80%.

#### Transfection and cytotoxicity studies in HEK 293 and Hep G2 cell lines

In order to extend the study to other cell lines, we replicated the same experiments performed with BFF,



**Fig. 3** a–c Effect of preincubation of different sized polyplexes (polymer/pDNA at ratio 2:1) in DMEM alone or supplemented with 10% FBS (DMEM + FBS) on transfection efficiency (DMEM, *black bars*; DMEM + FBS, *white bars*) in Hep G2 and HEK 293 cell lines and BFF. Asterisk denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between DMEM versus DMEM + SBF

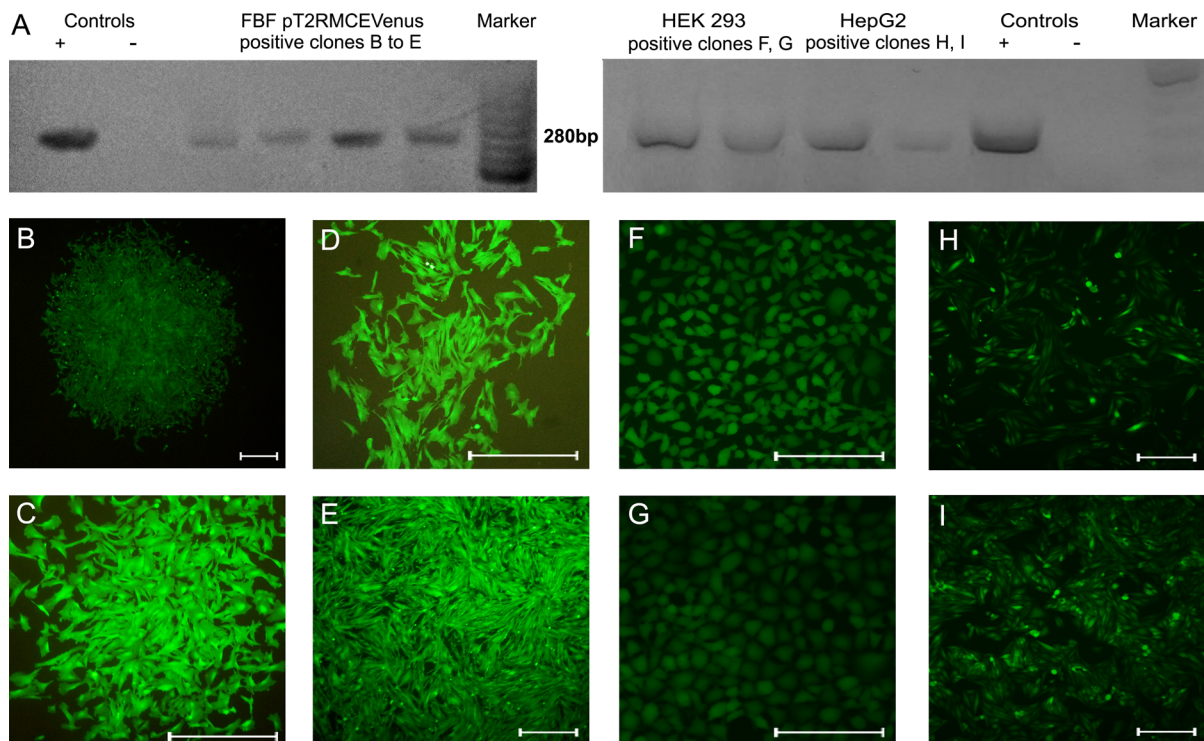
within each PEI treatment. **d** Effect of different sized polymers without pDNA at 2  $\mu$ g polymer/ml in DMEM + FBS on cell viability measured by MTT assay. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM from three independent replicates. Results are expressed as a percentage of the absorbance of untreated cells and presented as the mean of three independent replicates  $\pm$  SEM

in HEK 293 and Hep G2, two established human-derived cell lines commonly used as experimental model. PEI 87K and 217K resulted in higher transfection efficiency than commercial agent and PEI 25K. Addition of FBS did not enhance transfection rates in HEK 293 and Hep G2 cell lines (Fig. 3a, b), as it did for BFF. Presence of FBS did not increase cell toxicity in these cell lines, showing cell viability values around or over 80% in all cases except when HEK 293 was treated with PEI 217K, where cell viability dropped to  $63.8 \pm 3.6\%$  (Fig. 3d), a value comparable to BFF

viability treated with PEI 22K and 25K without FBS (Fig. 2).

#### Stable transgene integration

To assess stable transgene integration using PEI 25K as pDNA vehicle, BFF, HEK 293 and Hep G2 were cotransfected with the SB plasmids (donors and helper) and selected with G418 during 21 days. Genomic DNA from resistant colonies (Fig. 4b–i) was isolated for PCR genotyping. Fluorescent



**Fig. 4** **a** PCR analysis of genomic DNA from SB-transgenic monoclonal cell lines. Venus amplicon (280 pb product) originated from genomic DNA from four BFF (*left panel*), two HEK 293 and two Hep G2 (*right panel*) randomly selected clonal lines. C+ = positive controls. C- = negative controls. MW markers: GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific; *left panel*) and 100 bp DNA Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>, *right*

*panel*). Fluorescence microscopy images of four monoclonal BFF colonies (**b–e**) transfected with the *Sleeping Beauty* system and selected during 21 days with G418. Fluorescence microscopy images of two HEK 293 (**f, g**) and two Hep G2 monoclonal colonies (**h, i**) transfected with the *Sleeping Beauty* system and selected during 21 days with G418. Bar = 100  $\mu$ m

colonies from BFF (Fig. 4a–d), HEK 293 (Fig. 4f, g) and Hep G2 (Fig. 4h, i) were positive for Venus sequence in their genomes (Fig. 4a) demonstrating that PEI-delivered pDNA is released from endosomes and can be integrated into the cell genome.

## Discussion

In this work we performed the optimization of BFF transfection conditions and a comparative analysis of the transfection efficiency and cytotoxicity of home-made, fully deacylated linear PEIs (22K, 87K and 217K) with commercially available 25K branched PEI and PAH 58K, a fully deacylated polymer chemically related to PEI in BFF primary cultures and in two frequently used cell lines, HEK 293 and Hep G2. The results show that as DNA concentration increases the transfection efficiency until it reaches a plateau and

that gene delivery efficiency of different sized PEI was dependent on PEI/pDNA ratio. PEI/pDNA ratio of 2:1 led to the highest transfection efficiency for all PEIs included in this study.

Interestingly, 87K and 217K polyplexes exhibited similar high transfection efficiency as PEI/pDNA 25K in BFF transfected with FBS-supplemented medium. Transfection of HEK 293 and Hep G2 with PEI 87K and 217K was associated with high transgene incorporation rates regardless of presence FBS, transfection rates that were significantly larger compared with those obtained with the commercial agent and 25K PEI.

We also included in the study PAH, which is a polymer chemically related to PEI but by far less studied as gene delivery agent (Zhao et al. 2012). We found that PAH showed lower cytotoxicity than PEIs, however its transfection efficiency was poor. PAH lower toxicity allowed us to test a 2:1 ratio using 4  $\mu$ g

of PAH and 2 µg of pDNA), which resulted in a fair transfection efficiency of  $34.5 \pm 2.7\%$ . Despite the comparatively low transfection efficiency of PAH, its low toxicity allows the use of higher amounts of pDNA per transfection assay, which can be useful in cotransfection experiments where two or more plasmids must be delivered into cells.

To maximize the transfection efficiency, PEI/pDNA ratio is known to play a crucial role by influencing the size and the surface charge of the PEI/pDNA polyplexes, since small cationic particles mediate binding to anionic cell surface proteoglycans triggering cell endocytosis (Huh et al. 2007; Rhaese et al. 2003). The commercial linear PEI 25K was less toxic than its fully deacylated variant, suggesting that a higher charge density contributes to the toxic effect, presumably due to stronger electrostatic interactions with cellular anionic macromolecules.

An optimal polymer/pDNA ratio that warrant that no pDNA nor polymer remains free, increases the efficacy of DNA complexation making polyplexes more prone to cellular internalization via endocytosis (Kichler 2004). Excess polymer should be avoided since uncomplexed free fraction may impair cytoplasmic membrane function (Fischer et al. 1999). Furthermore, the presence of PEI in the cell nucleus might interfere with transcriptional processes (Godbey et al. 2001) eventually leading to the cell death. Our results suggest that lower cytotoxicity observed in FBS preincubated polyplexes could be related to adsorption of free PEI to serum proteins.

On the other hand, high cell PEI/pDNA uptake is desirable for 2 reasons: as we show in this work, more plasmid implies a higher transfection rate (both transient and stable) and a higher amount of PEI inside the endosome may be crucial for modification and permeabilization of endosomal membrane for efficient delivery of pDNA into the cytoplasm (Liang and Lam 2012; Moghimi et al. 2005). Since increasing PEI MW implies more water adsorption, a higher MW PEI should be more desirable in order to maximize these effects.

We found considerable cytotoxicity in increasing high MW PEI concentrations in absence of FBS. On the contrary, exposure of cells to polycations in presence of FBS reduced cytotoxicity in the cell types studied, supporting the idea that FBS preincubation of polyplexes provides a new way to modify PEI, enhancing its gene transfection efficiency without compromising cell viability.

All these findings highlight the importance of an exact PEI/pDNA ratio plus a putative protective effect of FBS, presumably due its albumin content, although other serum proteins and lipoproteins could be implicated in this phenomenon. The exact mechanism by which FBS exerts its cell protective effect remains to be elucidated, but possible explanations are (1) adsorption of harmful free PEI by serum proteins or (2) quenching of positive surface charge of polyplexes that are therefore less harmful to cellular membranes (Tros de Ilarduya et al. 2010). It is important to note that the MTT assay is not indicative of apoptosis as this may occur at later stages depending on cell type. Regarding BFF cells, whose performance in PEI transfection is reported here for the first time, cytometric analysis provide no evidence of apoptosis after 24 h of incubation with PEI (data not shown).

In conclusion, here we demonstrated the effectivity of diverse MW PEIs on transfection of fetal fibroblast primary cultures and on two established routinely used cell lines. We show that high MW deacylated PEIs (87K and 217K) can lead to high-frequency transient transfection in BFF as in other broadly used cell lines like HEK 293 and Hep G2, and are able to generate stable transfected lines under selective pressure when polyplexes are formed in presence of FBS.

The addition of FBS to the PEI/pDNA mixture make it possible to achieve cost-effective transfection of BFF, establishing a foundation to utilize transfected fibroblasts in gene expression studies as well as to generate transgenic cattle through SCNT.

**Acknowledgements** This work was supported by grants from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) and Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), República Argentina.

**Funding** Funding was provided by CONICET (PIP 2012-2014 (114 201101 00278)), MinCyT (PICT-2012-0514).

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** None of the authors have any conflict of interest to declare.

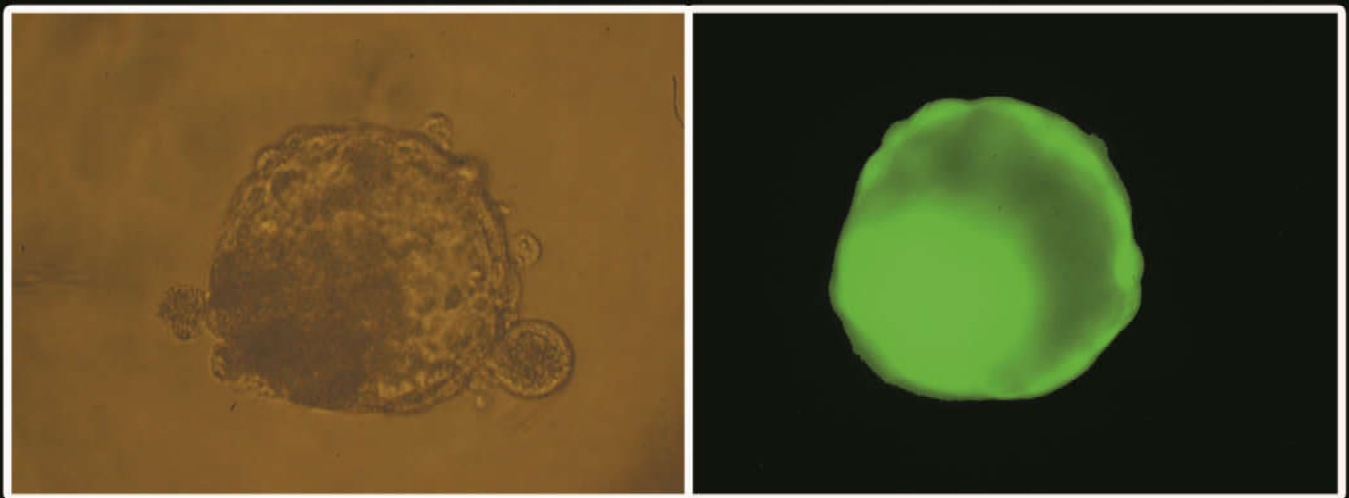
#### References

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 (2016) Establishment of cell-based transposon-mediated transgenesis in cattle. *Theriogenology* 85:e1292
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297–7301
- Carrabino S, Di Gioia S, Copreni E, Conese M (2005) Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells. *J Gene Med* 7:1555–1564
- Chollet P, Favrot MC, Hurbin A, Coll JL (2002) Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J Gene Med* 4:84–91
- Di Gioia S, Conese M (2009) Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications. *Drug Des Devel Ther* 2:163–188
- Fan W, Wu X, Ding B, Gao J, Cai Z, Zhang W, Yin D, Wang X, Zhu Q, Liu J, Ding X, Gao S (2012) Degradable gene delivery systems based on Pluronic-modified low-molecular-weight polyethylenimine: preparation, characterization, intracellular trafficking, and cellular distribution. *Int J Nanomed* 7:1127–1138
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, Kissel T (1999) A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16:1273–1279
- Forcato DO, Olmos Nicotra MF, Ortega NM, Alessio AP, Fili AE, Rodríguez N, Bosch P (2012) Optimization of branched 25 kDa polyethylenimine for efficient gene delivery in bovine fetal fibroblasts. *Reprod Fertil Dev* 25:313
- Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (1999) Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 45:268–275
- Godbey WT, Wu KK, Mikos AG (2001) Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* 22:471–480
- Huh SH, Do HJ, Lim HY, Kim DK, Choi SJ, Song H, Kim NH, Park JK, Chang WK, Chung HM, Kim JH (2007) Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals* 35:165–171
- Hunter AC (2006) Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 58:1523–1531
- Jeong JH, Song SH, Lim DW, Lee H, Park TG (2001) DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J Control Release* 73:391–399
- Jiang D, Salem AK (2012) Optimized dextran-polyethylenimine conjugates are efficient non-viral vectors with reduced cytotoxicity when used in serum containing environments. *Int J Pharm* 427:71–79
- Kawakami S, Ito Y, Charoensit P, Yamashita F, Hashida M (2006) Evaluation of proinflammatory cytokine production induced by linear and branched polyethylenimine/plasmid DNA complexes in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 317:1382–1390
- Kichler A (2004) Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 6:S3–S10
- Lázaro-Martínez JM, Rodríguez-Castellón E, Vega D, Monti GA, Chattah AK (2015) Solid-state Studies of the crystalline/amorphous character in linear poly(ethylenimine hydrochloride) (PEI-HCl) polymers and their copper complexes. *Macromolecules* 48:1115–1125
- Lee K, Bae KH, Lee Y, Lee SH, Ahn CH, Park TG (2010) Pluronic/polyethylenimine shell crosslinked nanocapsules with embedded magnetite nanocrystals for magnetically triggered delivery of siRNA. *Macromol Biosci* 10:239–245
- Liang W, Lam JKW (2012) Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems. In: Ceresa B (ed) *Molecular regulation of endocytosis*. InTech, Croatia, pp 421–467
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A (2005) Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 60:247–266
- Mintzer MA, Simanek EE (2009) Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* 109:259–302
- Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szweczyk A (2005) A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther* 11:990–995
- Neu M, Fischer D, Kissel T (2005) Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 7:992–1009
- Niemann H, Kues W, Carnwath JW (2009) Transgenic farm animals: current status and perspectives for agriculture and biomedicine. In: Engelhard M, Hagen K, Boysen M (eds) *Genetic engineering in livestock*. Springer, Berlin, pp 1–30
- Ogris M, Steinlein P, Kursa M, Mechtler K, Kircheis R, Wagner E (1998) The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 5:1425–1433
- Rhaese S, von Briesen H, Rübsamen-Waigmann H, Kreuter J, Langer K (2003) Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *J Control Release* 92:199–208
- Sawant RR, Sriraman SK, Navarro G, Biswas S, Dalvi RA, Torchilin VP (2012) Polyethylenimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. *Biomaterials* 33:3942–3951
- Swami A, Aggarwal A, Pathak A, Patnaik S, Kumar P, Singh Y, Gupta KC (2007) Imidazolyl-PEI modified nanoparticles for enhanced gene delivery. *Int J Pharm* 335:180–192
- Thomas M, Ge Q, Lu JJ, Chen J, Klivanov AM (2005a) Cross-linked small polyethylenimines: while still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo. *Pharm Res* 22:373–380
- Thomas M, Lu JJ, Ge Q, Zhang C, Chen J, Klivanov AM (2005b) Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5679–5684
- Tian H, Xiong W, Wei J, Wang Y, Chen X, Jing X, Zhu Q (2007) Gene transfection of hyperbranched PEI grafted by hydrophobic amino acid segment PBLG. *Biomaterials* 28:2899–2907
- Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N (2010) Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci* 40:159–170

Yang Z, Sahay G, Sriadibhatla S, Kabanov AV (2008) Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. *Bioconjug Chem* 19:1987–1994

Zhao E, Zhao Z, Wang J, Yang C, Chen C, Gao L, Feng Q, Hou W, Gao M, Zhang Q (2012) Surface engineering of gold nanoparticles for in vitro siRNA delivery. *Nanoscale* 4:5102–5109



“Metodologías transgénicas basadas en transposones solas, o combinadas con otras herramientas basadas en enzimas recombinasas pueden simplificar la generación de ganado bovino transgénico que exprese de manera constante el gen de interés. Estas metodologías expanden las posibilidades para la manipulación directa del genoma bovino para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas”.