

Generación de animales transgénicos. Regulación de la expresión genética

Transgenic animals generation. Regulation of gene expression

Dr. Brian M. Cavagnari^a

RESUMEN

Los animales transgénicos son organismos con un gen foráneo incorporado en su genoma cuyo desarrollo fue uno de los avances biotecnológicos más importantes. Los animales con genes anulados (*knockout*) se desarrollaron hace ya veinte años y la creación de animales transgénicos es prácticamente rutinaria, pero gran parte del equipo de salud todavía no comprende su impacto en la investigación biomédica y su capacidad de mejorar la salud humana. En este artículo se presentan las formas más relevantes de generación de animales transgénicos y se discute cómo un gen puede ser activado o inactivado en un animal vivo. **Palabras clave:** animales transgénicos, animales knockout.

SUMMARY

Transgenic animals are organisms with a foreign gene incorporated into their genome, and their development was one of the most important advances in biotechnology. Although knockout animals have already been developed twenty years ago and being transgenic mice generation quite routine, many health care providers still do not understand their impact on biomedical research and their capability of improving human health. In this article, I present the most relevant approaches to generate transgenic animals and discuss how specific genes can be activated or inactivated in a living animal.

Key words: transgenic animals, knockout animals.

INTRODUCCIÓN

El impacto que los animales transgénicos y genoprivos o *knockout* han tenido en las biociencias es innegable, en particular para el estudio de la función y la regulación de los genes, y para la simulación de enfermedades humanas, con la consiguiente búsqueda de nuevas terapéuticas.

En la actualidad, su uso excede ampliamente el de la investigación biomédica y el fruto de las investigaciones que los tuvieron como centro de atención ya se reflejan en la producción de proteínas recombinantes de alto valor biológico en la leche de animales transgénicos¹⁻³ y en su uso como eventual fuente de órganos para xenotrasplantes.^{1,4}

Sin embargo, muchos de los médicos que seguramente recurrirán a las bondades de esta tecnología continúan considerando a la transgénesis como producto de la ciencia ficción.

El objetivo de este artículo es comentar algunas de las técnicas más comúnmente utilizadas para la generación de animales transgénicos y animales genoprivos o *knockout*, así como compartir el estado actual de algunas técnicas de biología molecular que permiten, en un animal vivo, activar e inactivar un gen específico en el momento deseado.

Animales transgénicos

Los animales transgénicos son organismos manipulados genéticamente para incorporar un gen foráneo en su genoma.

Hoy en día, la inserción de genes foráneos en bacterias es prácticamente rutinaria. El procedimiento de aislamiento de los genes, así como el de su incorporación a las bacterias, excede el propósito de este texto. Tampoco se desarrollará el tema de los vegetales transgénicos, pero nos enfocaremos en el desarrollo de animales transgénicos, que son los de mayor relevancia biomédica.

A través del tiempo se fueron desarrollando varias técnicas para la creación de animales transgénicos.

Inyección pronuclear

Hace ya 30 años, Gordon y cols. describieron una técnica en la cual un ADN (ácido desoxirribonucleico) foráneo se microinyectaba en el pronúcleo de un ovocito de ratón recientemente fertilizado, que luego era transferido a una hembra receptora.⁵

Básicamente, primero se produce una construcción en donde el gen

a. Servicio de
Pediatria. Hospital
Materno Infantil
de Tigre "Dr.
Florencio Escardó".
Docencia e
Investigación.
Secretaría de
Política Sanitaria y
Desarrollo Humano.
Municipalidad de
Tigre.

Correspondencia:
Dr. Brian M. Cavagnari:
bcavagna@gmail.com

Conflicto de intereses:
Ninguno que declarar.

Recibido: 13-4-10
Aceptado: 25-6-10

de interés se coloca bajo el control de un promotor de quien dependerá la cronoespecificidad y la histo-especificidad de la expresión del gen.⁶ Si se desea, se puede evaluar esta expresión temporo-espacial del gen mediante el uso de "genes reporteros" bajo el control del mismo promotor. Un gen reportero es aquel que al expresarse, transforma al organismo que lo porta en fácilmente identificable (por cambiar de color frente a un sustrato en el medio, por presentar fluorescencia, etc.).

Una vez obtenida esta construcción con el gen de interés (región codificante y región reguladora), ésta se microinyecta en el pronúcleo de un ovocito fertilizado. El ADN extraño se insertará al azar, y generalmente en varias copias, en el ADN del ovocito. Este ovocito fertilizado, que ya lleva la nueva información genética, se transfiere a una hembra receptora.

Si efectivamente el embrión se halla en el estado de una célula, la integración temprana del transgén hará que el ratón que nazca exprese el gen de interés en todas sus células somáticas y en la línea germinal, de modo que puede heredarse en la descendencia de estos animales transgénicos.

Si la inserción del transgén se produce luego de la primera división celular, se obtendrán animales fundadores que presentan dos o más poblaciones celulares cuyas composiciones genéticas difieren y que también pueden transmitir el transgén a su descendencia, pero a una frecuencia menor.

La mayor complicación de esta técnica de generación de animales transgénicos es la de no poder determinar el sitio de inserción ni el número de copias del transgén, ya que se producen al azar. Algunos efectos posicionales pueden alterar la expresión del transgén, pero, a su vez, la inserción de este gen foráneo puede afectar posicionalmente la expresión de algún gen endógeno,⁷ pues se sabe que la posición de un gen influye sobre su propia actividad y la de los genes circundantes.

Esta técnica ha permitido crear no sólo ratones transgénicos, sino también conejos,⁸ ovejas,⁹ cerdos,¹⁰ cabras¹¹ y vacas¹² transgénicas productoras de proteínas de alto valor biológico.

Recombinación homóloga en células madre embrionarias

La recombinación homóloga es un concepto que resulta familiar para el médico generalista, pues se trata del proceso que ocurre durante la profase I de la meiosis. Se basa en el hecho de que las regiones con homología en la secuencia de ADN "se atraen" mutuamente, lo cual permite el intercambio de material genético entre esas regiones.¹³

Esta técnica emplea regiones de homología entre el ADN endógeno (cromosómico) y el exógeno (transgén), para insertar el gen de interés en un área específica del cromosoma. Así, cuando se genera una construcción en la cual el gen por insertar posee secuencias de homología con el ADN endógeno, estas secuencias "se encontrarán" y se puede escoger el sitio específico de inserción del transgén.^{14,15} De esta forma, no sólo se puede predecir el sitio en donde terminará insertado el gen exógeno, sino que también se evita el inconveniente de la inserción al azar (como sucede en la inyección de pronúcleos) y se puede prescindir del promotor en la construcción, ya que se hace uso de las regiones reguladoras (promotores, *enhancers*, etc.) endógenas.

Es importante destacar que, en el proceso de recombinación homóloga, el ADN es intercambiado (se inserta en el genoma el ADN foráneo y se elimina el endógeno), a diferencia del proceso de inyección de pronúcleos, en donde el ADN resulta añadido.

El proceso de recombinación homóloga tiene una eficiencia baja que, a diferencia de la inyección pronuclear, no permite su empleo directo en embriones, por lo cual debe realizarse en células pluripotenciales: las células madre embrionarias.¹³

Estas células se obtienen del macizo celular interno de blastocistos y tienen la capacidad de permanecer en cultivos celulares sin perder su estado indiferenciado. A su vez, mantienen la capacidad de diferenciarse bajo los patrones normales de control al ser reinsertadas en un embrión y contribuyen así a la formación de todos los tejidos del individuo, incluida la línea germinal.^{7,13}

En definitiva, el transgén es introducido por el mecanismo de recombinación homóloga, en un sitio específico y bajo la regulación del promotor endógeno de las células en cultivo. Una vez seleccionadas las células que incorporaron correctamente el gen de interés, se las inyecta en un embrión huésped.

Las señales responsables del desarrollo del embrión son recibidas tanto por las células propias del embrión como por las células madre embrionarias que llevan el transgén. Así, se desarrollan animales con dos tipos de tejido (el propio del huésped y el transgénico proveniente de las células madre embrionarias). Estos animales fundadores, luego de ser cruzados, pueden producir prole con el genotipo normal del huésped y con el genotipo transgénico, pudiéndose generar líneas estables con la modificación genética específica.^{16,17}

Este método es el más utilizado para la generación de ratones genoprivos o, según la concepción sajona, con genes "fuera de combate" o

knockouts. Básicamente, se logran inactivar genes específicos mediante la inserción de un transgén que lleva información para la eliminación de uno o varios exones del gen que se desea anular. De esta forma, se impide la producción de la proteína de interés o se obtiene una proteína truncada no funcional⁷ (Figura 1).

Con esta técnica se han obtenido cientos de ratones *knockout* que han servido para analizar la función de genes endógenos y que han permitido simular enfermedades humanas para su estudio.^{15,18-21}

La principal complicación de esta técnica es que se limita prácticamente al ratón, pues no resulta sencillo obtener células madre embrionarias de otras especies, evolutivamente más cercanas al ser humano, que conserven su totipotencialidad en cultivo.^{22,23}

Mutagénesis de células somáticas y transferencia nuclear

La transferencia nuclear consiste en extraer el material genético de un ovocito (enucleación) para luego introducir en él, el material genético de una célula del animal por clonar. Así es como se

obtuvo la oveja Dolly en 1997:²⁴ el núcleo de una célula mamaria de oveja adulta se introdujo en un ovocito enucleado, lo cual dio origen a una oveja idéntica a la original (clonación).

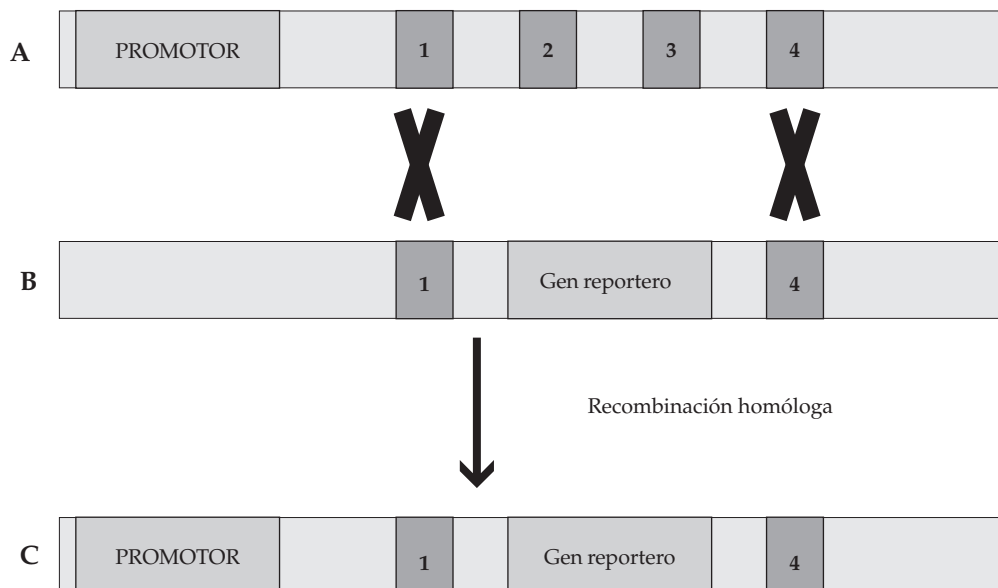
Para obtener animales transgénicos de especies en las cuales no se han obtenido aún líneas estables de células madre embrionarias, se desarrolló esta técnica que combina la introducción del transgén en una célula somática del animal de interés, con posterior transferencia del núcleo celular modificado (con el transgén) a un ovocito enucleado.⁷

De esta manera, primero se inserta el transgén de interés en células somáticas (fibroblastos) del animal por ser clonado. Estas células no son totipotentes, pero ya no se requiere esta cualidad, pues el núcleo de estos fibroblastos transgénicos será transferido a un ovocito enucleado que iniciará su desarrollo.

La transferencia nuclear asegura que la totalidad de los animales obtenidos sea transgénica, de modo que se obvia una generación. Todos los animales transmitirán el transgén a la siguiente generación.

Con esta combinación de técnicas se han obtenido ovejas,²⁵ cerdos²⁶ y vacas²⁷ transgénicas. Es-

FIGURA 1. Recombinación homóloga para la generación de knockouts



A: Simplificación del gen hipotético por anular, con cuatro exones (numerados del 1 al 4) y su promotor. Este gen forma parte del genoma del animal.

B: Construcción que lleva un gen reportero (genes cuya expresión es fácilmente detectable. Ej.: proteína fluorescente verde) y regiones de homología con el gen de interés (se muestran con "X"), que forman parte del plásmido.

C: Luego de la recombinación homóloga, se eliminan los exones 2 y 3. En el genoma queda incorporado el gen reportero (que permite identificar la recombinación exitosa). El gen original ya no se expresará en el animal: se ha generado un *knockout* del gen de interés.

to posibilita tanto la expresión de transgenes que permitan sintetizar proteínas de interés biomédico en animales de granja, como la eliminación de genes endógenos (*knockout*) en animales filogenéticamente más cercanos al ser humano.

Vectores retrovirales

Los primeros animales transgénicos se crearon mediante la inyección del ADN del virus SV40 en la cavidad de blastocistos de ratón.²⁸

Los retrovirus siempre fueron candidatos para la transgénesis viral debido a la capacidad de integrar su material genético al de la célula huésped, luego de la transcripción inversa. Dentro de los retrovirus, los lentivirus no requieren la división celular para integrar su genoma, por lo que son vectores ideales para infectar células que no estén en activa división.⁷ Los lentivirus serán entonces los vectores que lleven incorporados el transgén de interés. Estos virus serán luego inyectados en el espacio perivitelino entre la zona pelúcida y la membrana citoplasmática del embrión²⁹ o incubados directamente con los embriones libres de la zona pelúcida,³⁰ de forma tal que el transgén sea incorporado al genoma del embrión por un mecanismo intrínseco al virus.

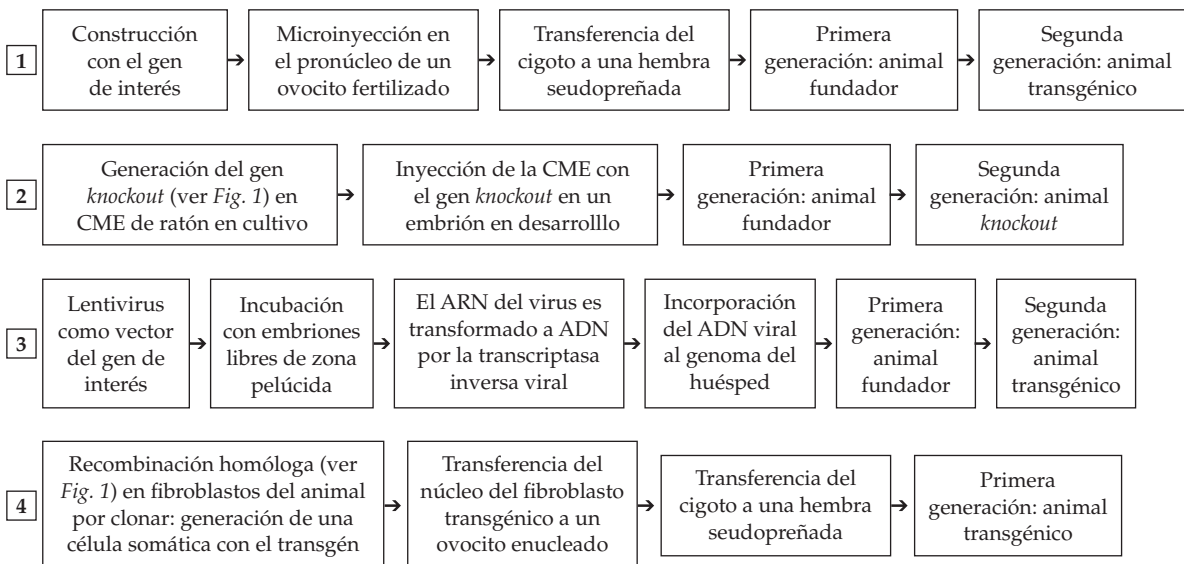
Con esta técnica se han creado ratas,²⁹ cerdos,³¹ toros³² y pollos³³ transgénicos.

Las desventajas de este sistema son que el tamaño del transgén debe ser limitado (menor a 8 Kb), que la integración del genoma viral con el transgén se produce en diferentes etapas del desarrollo del embrión (por lo que el transgén no siempre involucra a la línea germinal, en cuyo caso no existe transferencia a la descendencia) y que, muchas veces, se obtiene la integración del transgén en más de un sitio diferente.⁷

En la *Figura 2* se aprecia un esquema que resume las técnicas más comúnmente empleadas para la generación de animales transgénicos y animales genoprivos o *knockout*.

Vale la pena destacar que otra forma de anular la expresión de un gen determinado es actuando sobre el ARN. La interferencia del ARN es un proceso celular que logra silenciar un gen por acción a nivel postranscripcional. Tal interferencia se lleva a cabo mediante pequeños ARN de interferencia (*siRNA*, por *small interfering RNA*) que son sintetizados dentro de la célula blanco, gracias a un vector de expresión introducido en ella. Estos ARN de interferencia poseen secuencias complementarias al ARN mensajero endógeno (producto del gen que deseo anular) por lo que, al encontrarse, el ARN mensajero será degradado por la maquinaria celular.

FIGURA 2. Esquema simplificado de los métodos más comúnmente empleados para la generación de animales transgénicos y knockouts



1. Inyección de pronúcleos.
2. Recombinación homóloga en células madre embrionarias (CME).
3. Lentivirus.
4. Recombinación homóloga en células somáticas más transferencia nuclear.

Animal fundador: individuo que porta un transgén en su línea germinal y que se utiliza para obtener una línea transgénica pura a través de cruzamientos.

De esta forma se genera un *knockdown* del ARN mensajero deseado, con la consiguiente abolición de la expresión del gen.³⁴

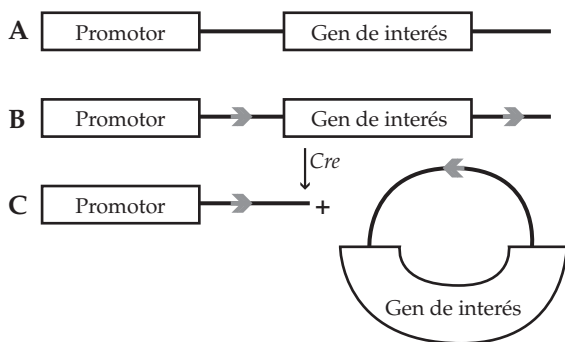
Sistema Cre/loxP y *knockouts* condicionales

Hasta el momento hemos repasado los métodos que se utilizan para generar animales que son transgénicos o *knockout* desde su nacimiento.

Definitivamente, sería mucho más interesante crear un animal que exprese toda su carga genética habitual y, en un momento determinado, poder transformarlo en *knockout*. Sería algo así como “apagar” el gen en un animal que hasta el momento se desarrolló normalmente. Esto se puede llevar a cabo haciendo uso del sistema Cre/loxP (Figura 3).

Cre es una enzima que cataliza una recombinación específica de sitio, de secuencias de ADN situadas entre dos sitios loxP.³⁵ Los sitios loxP son secuencias de 34 pb en donde se une la enzima Cre para catalizar la recombinación. Si ambos sitios loxP se encuentran en la misma dirección, la enzima cataliza la escisión del ADN que se encuentra entre ellos.⁷

FIGURA 3. Sistema de recombinación Cre/loxP para la generación de ratones *knockout*



A. Esquema simplificado del gen que se desea eliminar. Este gen forma parte del genoma del ratón y se expresa normalmente.

B. Por recombinación homóloga (ver Figura 1) se introducen dos secuencias loxP (en gris) flanqueando uno o más exones del gen de interés. Si ambas secuencias se orientan en igual sentido, el gen queda “marcado” para su ulterior delección. Como los sitios loxP se introducen en intrones circundantes, el gen flanqueado se expresa normalmente en el ratón.

C. Si los ratones portadores de la construcción anterior (B) se cruzan con otros que expresan la recombinasa Cre, se catalizará la escisión del gen flanqueado, generándose un ratón *knockout*. Esta escisión es irreversible.

La actividad enzimática de Cre puede ser regulada mediante la creación de quimeras que respondan, por ejemplo, al tamoxifeno. En este *knockout* condicional inducible por tamoxifeno, el ratón expresa normalmente el gen “marcado” pero, al recibir tamoxifeno, el gen se escinde y se genera un ratón *knockout*.

Por recombinación homóloga, como se vio previamente, se pueden colocar dos sitios loxP flanqueando al gen que se quiere anular. De esta forma, los ratones expresarán normalmente el gen, pero éste queda “sentenciado” (flanqueado por dos loxP) para un evento posterior: generar el *knockout*.

En estos ratones “sentenciados” se puede regular la expresión temporal de Cre mediante quimeras que respondan, por ejemplo, al tamoxifeno,³⁶ pero su armado y utilización no se desarrollarán en el presente artículo.

En definitiva, se pueden obtener ratones que expresen normalmente el gen en estudio y, en un momento determinado, transformarlos en *knockouts* por expresión de Cre.

Cabe destacar que así como se puede “apagar” un gen, con producción de un ratón genotipo (*knockout*), también se puede “encender” un gen, con producción de un ratón transgénico en un momento determinado. Esto se puede lograr mediante una estructura de tipo loxP-codón de terminación-loxP, colocada entre el promotor y su región codificante.³⁷ Mientras no se exprese Cre, el codón de terminación impedirá la expresión del gen. Pero cuando se exprese la enzima, se escindirán el codón de terminación, lo cual permitirá la expresión del transgén.

Es importante mencionar que, como el proceso de “encendido” o “apagado” de estos genes depende de una escisión de material genético, ambos procesos son irreversibles.

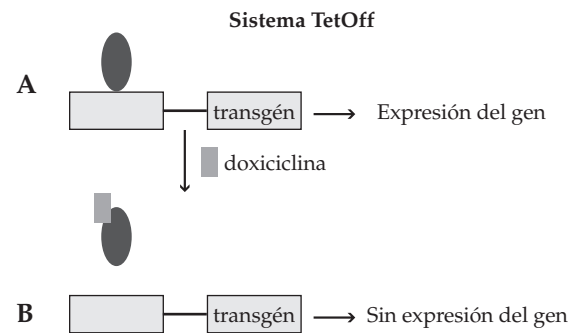
Expresión inducible de transgenes: sistema regulado por tetraciclina

Acabamos de ver cómo actualmente se puede inducir la expresión de una proteína o anular dicha expresión “in vivo”, de forma irreversible, en un mismo individuo. El paso siguiente sería obtener un animal cuyos genes se puedan “encender” y “apagar” cada vez que uno desee. Hoy en día, por increíble que parezca, este “switch genético” es también posible. El sistema más utilizado para este fin es el regulado por tetraciclina (tet).³⁸

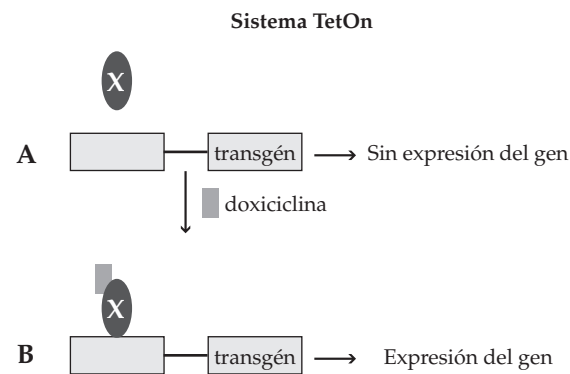
Normalmente, en *E. coli* existe un operón tet (los genes bacterianos se organizan en operones) que funciona de la siguiente manera: una proteína, el represor tet (tetR), se une a una secuencia de ADN conocida como operador tet (tetO). Esta unión inhibe la transcripción de los genes del operón. La tetraciclina impide la unión de tetR a tetO, por lo que favorece la transcripción de los genes del operón. Sobre la base de esta estructura bacteriana se ha diseñado una construcción para

su empleo en animales transgénicos, que funciona de una manera similar, con un promotor que responde a tetraciclina o doxiciclina.³⁹ Existen dos sistemas: *TetOff* y *TetOn* (Figura 4).

FIGURA 4. Sistemas regulados por tetraciclina. Expresión inducible de genes



A. Sin doxiciclina. El activador transcripcional (●) se une a la región reguladora (□) para que el gen se exprese normalmente.
B. Con doxiciclina. El activador transcripcional no se une a la región reguladora, por lo que el gen deja de expresarse. El proceso es reversible y, al dejar de beber doxiciclina, el ratón vuelve a expresar el gen normalmente.
 Con el sistema *TetOff* existe una expresión permanente del gen, el cual "se apaga" cuando el ratón bebe doxiciclina.



A. Sin doxiciclina. Mutaciones en el activador transcripcional (⊗) revierten su comportamiento habitual, por lo que éste no se une a la región reguladora (□) y el gen no se expresa.
B. Con doxiciclina. El activador transcripcional mutante sí se une a la región reguladora, por lo que el gen se expresa normalmente. El proceso es reversible y, al dejar de beber doxiciclina, el ratón deja de expresar el gen.
 Con el sistema *TetOn* no existe una expresión basal del gen, pero éste "se enciende" cuando el ratón bebe doxiciclina.

En el sistema *TetOff*, la expresión del transgén se suprime cuando se le da a beber doxiciclina en el agua a los ratones. El gen se expresa cuando se elimina la doxiciclina. Por lo tanto, el gen está "encendido" en condiciones normales y "se apaga" cuando los ratones beben doxiciclina.⁴⁰

En el sistema *TetOn* (mutantes de la construcción anterior), el gen en estudio está "apagado" en condiciones normales y "se enciende" cuando los ratones beben doxiciclina.⁴¹

De esta manera, actualmente estamos en condiciones de generar animales transgénicos o animales genoprivos o *knockout* en donde se pueden "prender" y "apagar" genes en el momento que lo deseamos, lo cual abre enormes posibilidades para el estudio de la función de varios genes y de muchas enfermedades humanas.

CONCLUSIÓN

Situaciones que pocos años atrás parecían extraídas de un libro de ciencia ficción (como el uso cotidiano de técnicas moleculares para hacer el diagnóstico de muchas enfermedades o la utilización de productos obtenidos por biotecnología para el tratamiento de muchas de ellas), actualmente son de uso cotidiano. No es de extrañar entonces, que en un tiempo cercano estemos utilizando como parte de nuestro quehacer médico habitual, terapia génica para curar algunas enfermedades o adaptando el uso de fármacos de acuerdo a la genética de cada individuo.

Parte importante e innegable de esta "ciencia ficción", que ya forma parte de nuestra vida cotidiana, son los animales transgénicos.

Muchos son los mitos y fantasías que se tejen alrededor de los animales transgénicos y a cómo el uso de los productos obtenidos en estos animales podría afectar la salud humana. La única manera de poder sacar conclusiones propias, basadas en la ciencia y no en la ficción, es conocer los mecanismos de generación de estos animales y las posibilidades que nos ofrecen.

Cuanto más conozca el médico los alcances de la biotecnología aplicada a la medicina, mejor podrá compartir sus conocimientos y asesorar a los pacientes y sus familias sobre el uso y limitaciones de esta ciencia que día a día ofrece más oportunidades para el estudio y tratamiento de las dolencias humanas.

Agradecimiento

Al Dr. Diego J. Rodríguez Gil (Facultad de Medicina de la Universidad Yale de New Haven, CT, EE.UU.) por la lectura crítica del manuscrito y por sus oportunas sugerencias. ■

BIBLIOGRAFÍA

- Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 2007;48(1):47-61.
- Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. Making recombinant proteins in animals- different systems, different applications. *Trends Biotechnol* 2003;21:394-9.
- Redwan RM. Animal-derived pharmaceutical proteins. *J Immunoassay Immunochem* 2009;30:262-90.
- Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int* 2008;74:14-21.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7380-4.
- Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB. Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Curr Protoc Cell Biol* 2009; 19:unit19.10.
- Gama Sosa MA, De Gasperi R, Elder G. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct* 2010;214(2-3):91-109.
- Buhler T, Bruyere T, Went D, Stranzinger G, et al. Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Biotechnology* 1990; 8:140-3.
- Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)* 1991;9:830-4.
- Wall R, Pursel V, Shamay A, McKnight R, et al. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1696-700.
- Ebert KM, Selgrath JP, Di Tullio P, Denman J, et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology (NY)* 1991; 9:835-8.
- Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, van der Schans A, et al. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnology* 1991;9: 844-7.
- Piedrahita J. Los animales transgénicos y su potencial en el desarrollo de la biotecnología animal. *Revista Corpoica* 1996;1:29-33.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985;317(6034):230-4.
- Koller B, Smithies O. Altering genes in animals by gene targeting. *Annu Rev Immunol* 1992;10:705-30.
- Kato Y, Tsunoda Y. Production of ES cell-derived mice. En: Notarianni E, Evans MJ, eds. *Embryonic stem cells: a practical approach*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2006. Págs. 41-71.
- Murphy C. Signaling in embryonic stem cell differentiation. En: Turksen K, ed. *Embryonic stem cell protocols*. Totowa: Humana Press; 2006. Págs. 101-12.
- Melton W. Gene targeting in the mouse. *BioEssays* 1994;16 (9):633-8.
- Shastri BS. Gene disruption in mice: models of development and disease. *Mol Cell Biochem* 1998;1:163-79.
- Kolb A, Ansell R, McWhir J, Suddell S. Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* 1999;227:21-31.
- Wallace H, Ansell R, Clark J, McWhir J. Pre-selection of integration sites imparts repeatable transgene expression. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1455-64.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman IR, Clark PM, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4471-75.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998;280:1256-8.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-3.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000;405:1066-69.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002;295:1089-92.
- Richt JA, Kasinathan P, Hamir AN, Castilla J, et al. Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 2007; 25:132-8.
- Jaenish R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in healthy adult mice derived from preimplantation blastocyst injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(4):1250-54.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002;295:868-72.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2140-5.
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2003;4(11):1054-60.
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, et al. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 2004;71(2):405-9.
- McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 2004;5:728-33.
- Tenenhaus Dann C. New technology for an old favorite: lentiviral transgenesis and RNAi in rats. *Transgenic Res* 2007;16:571-80.
- Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 1984;178:481-6.
- Hayashi S, McMahon AP. Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 2002;244:305-18.
- De Gasperi R, Rocher AB, Sosa MA, Wearne SL, et al. The IRG mouse: a two-color fluorescent reporter for assessing Cre-mediated recombination and imaging complex cellular relationships *in situ*. *Genesis* 2008;46:308-17.
- Stieger K, Belbellaa B, Le Guiner C, Moullier P, et al. *In vivo* gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:527-41.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995;268:1766-9.
- Furth PA, St Onge L, Boger H, Gruss P, et al. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9302-6.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10933-8.