

The 10th International Transgenic Technology Meeting

Verslag van een bijeenkomst over transgene technologie Nanda van Eeken¹, Marian A. van Roon²

¹Animal Research Institute AMC, Meibergdreef 67, 1105 BK Amsterdam,
n.vaneeken@amc.uva.nl, ²Universitair Proefdiercentrum VU/VUmc, Amsterdam

Van 24-26 oktober 2011 werd in St. Pete Beach, Florida de 10de internationale transgenese technologie bijeenkomst gehouden. Deze bijeenkomsten worden georganiseerd door de ISTT (International Society for Transgenic Technology) en vinden een keer in het anderhalf jaar plaats. De bijeenkomsten bevatten altijd zeer veel informatie over het maken van genetisch gemodificeerde dieren en aanverwante technieken zoals cryopreservatie en sanering. Dit jaar werd de bijeenkomst gehouden in het Trade Winds hotel. Dit was een zeer mooie locatie aan het strand waar je elke ochtend van de zonsopgang kon genieten, compleet met pelikanen en dolfijnen. De bijeenkomst was ook deze keer weer druk bezocht met ruim 400 deelnemers. Het leuke van deze bijeenkomsten is dat het erg informeel en voor iedereen toegankelijk is. Professoren, postdocs, alo's, maar ook analisten, biotechnici en studenten zijn hier goed op hun plek.

De bijeenkomst duurde drie dagen en was verdeeld in verschillende sessies:

- Sessie 1: muizengenetica
- Sessie 2: muismodellen van ziekten
- Sessie 3: ethiek, welzijn en regels met betrekking tot dierexperimenten
- Sessie 4: oerbetoon aan en lezing van Ralph Brinster
- Sessie 5: fundamentele methodes voor een transgenese faciliteit
- Sessie 6: web resources voor transgene/KO-muizen
- Sessie 7: nieuwe technieken
- Sessie 8: verder dan muis transgenese
- Sessie 9: biotechnologie
- Sessie 10: manipulatie van het rat genoom
- Posters

Eerste sessie

In de eerste sessie werd gesproken over superovulatie van de muis, vachtkleur van chimere en hun nakomelingen en over de vraag hoe geef ik mijn muis de juiste, voor iedereen begrijpbare, »

naam. Voor het injecteren van een construct is het belangrijk om in een keer een grote hoeveelheid zygotes/embryo's te verkrijgen uit het liefst zo weinig mogelijk dieren. De superovulatie speelt hierbij een erg belangrijke rol en is afhankelijk van een aantal factoren zoals genetische achtergrond, leeftijd, gewicht, techniek, dosis, tijd, huisvestingcondities. De factoren leeftijd en gewicht zijn de belangrijkste factoren te noemen die bepalen welke aantallen embryo's je kunt isoleren. De optimale waarden verschillen per stam en zijn beschreven in een recent artikel van Luo et al. (1). Als je niet over een eigen fokkolonie kan beschikken is het bijna onmogelijk om ze op de juiste leeftijd (gelijk na spenen) te kunnen superovuleren. Je zult dan uit moeten wijken naar de tweede mogelijkheid voor oöcyt productie, meestal het tijdstip rond seksuele rijping. Ook dit is per stam verschillend, maar ligt meestal rond de 7-9 weken.

Na het injecteren van zygotes en embryo's worden er transgene en chimere dieren geboren. Bij een juiste combinatie van embryonale stamcellen (ES) en gastheer blastocyst hoeven chimere dieren geen genetische screening te ondergaan maar kunnen ze op vacht kleur worden beoordeeld. Om dit te kunnen doen moet je goed weten welke ES je gaat injecteren in welke host blastocyst. Als je niet de juiste combinatie maakt kun je niet op vacht kleur beoordelen. In het praatje werden de juiste en meest efficiënte combinaties besproken door Marina Gertsenstein (2). Informatie over de genetica van vacht kleuren en de bijbehorende genotypen kun je terugvinden onder de tab 'coat color anomalies' op de website <http://www.informatics.jax.org>. Nog meer informatie en een referentie naar een boek over de vacht kleur van muizen kun je vinden op de site van de Europese vereniging voor Pigment Cell Research (www.ifpcr.org).

Als je na het injecteren van zygotes of blastocysten een transgene of chimere muis hebt verkregen, is het belangrijk om je muis de juiste naam te geven. The Mouse Genome Informatics database (MGI) is een organisatie die de regels volgt van de nomenclatuur die is vastgesteld door de International committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. Deze regels zijn terug te vinden op <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>.

Tweede sessie

De tweede sessie over diermodellen voor genetische ziekten bevatte onder andere een heel interessant en goed gebracht verhaal over horen en doofheid. Het binnenoor detecteert geluid en zwaartekracht met behulp van zeer gevoelige mechanoreceptorcellen, de zogenaamde 'sensory haircells'. Deze cellen kunnen gemakkelijk beschadigd raken en afsterven door bijvoorbeeld omgevingslawaaï, sommige antibiotica en sommige chemotherapieën. Zoogdieren zijn niet in staat om deze cellen te vervangen en daarom is gehoorverlies in zoogdieren (en ook bij



mensen) progressief en blijvend. Met behulp van transgene muismodellen is veel duidelijk geworden over het waarom van dit ontbrekend vermogen en worden ze ook ingezet om strategieën te ontwikkelen om het herstellend vermogen weer te repareren. Muizenstammen die van nature op oudere leeftijd doof worden zijn de NOD muis en de C57BL/6J-muis. Deze stammen zijn dus niet handig om te gebruiken in studies die beïnvloed kunnen worden door het gehoorvermogen.

Derde sessie

De derde sessie over ethiek en de nieuwe Europese Richtlijn is aan bod geweest, maar heeft niet veel implicaties voor de wetgeving in Nederland. De

huidige Nederlandse wetgeving is strikter dan de nieuwe Europese Richtlijn. Mogelijk zal een deel van de strengere Nederlandse wetgeving gehandhaafd blijven na implementatie van de Europese Richtlijn (per 1 januari 2013). Op de Biotechnische Dagen van oktober 2011 is de nieuwe Europese Richtlijn geïntroduceerd en besproken.

Vierde sessie

De vierde sessie was de uitreiking van de 8ste ISTT-prijs 'for outstanding contributions to Transgenic Technologies Mammalian Germline Modification' aan Ralph L. Brinster. Ralph Brinster is de grondlegger van de zoogdieren transgenese. In de jaren 60 is hij begonnen met het opzetten van een in vitro-kweekstelsel voor vroege embryo's. Deze techniek vormt tot op heden nog steeds de basis voor alle experimenten met embryo's. Ook is hij pionier in de ontwikkeling van technieken voor het manipuleren van de cellulaire en genetische samenstelling van de vroege muizenembryo's. De eerste transgene muis waarover gepubliceerd is (3,4) was ook van Brinster's hand. Brinster werd geëerd met de ISTT-prijs, maar was een paar dagen eerder ook al gehuldigd op het Witte Huis door president Obama met de National Medal of Science 2010. Brinster vertelde dat hij blij was met beide onderscheidingen en met veel plezier de ISTT-prijs hier in Florida in ontvangst nam, mede omdat hij eigenlijk niet hield van zulke ongeorganiseerde plaatsen als het Witte Huis. Brinster hield een inspirerende voordracht en benadrukte dat je alles kunt bereiken als je er zelf maar in gelooft. Als ze in een goede bui was, noemde zijn vrouw deze eigenschap zijn 'inner arrogance'. Brinster, zelf al in de 80, riep alle jonge mensen op te geloven in zichzelf en deze 'inner arrogance' te koesteren en te exploiteren.



Vijfde sessie

In de vijfde sessie werd veel aandacht besteed aan het invriezen van sperma en de in vitro-fertilisatie (IVF). Het invriezen van sperma is een goed alternatief voor het invriezen van embryo's. Het invriezen van sperma heeft ook vele voordelen. Zo gebruik je onder andere minder dieren. Voor sperma heb je aan 3-4 mannen genoeg en voor embryo's heb je al snel rond de 15-20 vrouwen nodig in de pre-puberale leeftijd. Deze zal je eerst moeten fokken of moeten kopen. Sperma invriezen scheelt dan ook in de kosten.

Voor het invriezen van sperma heb je een hoge kwaliteit sperma en een goed Cryo Protectant Agent (CPA) nodig. Sperma van goede kwaliteit kun je krijgen door de mannen aan pre-mating te laten doen. Je zet de mannen 5-10 dagen voordat het sperma wordt ingevroren in met een vrouwtje. Dit vrouwtje zal hij dan dekken waardoor hij weer vers beweeglijk sperma krijgt. Het sperma wordt ingevroren in een standaard CPA van 3% Skim Milk met 18% Raffinose. Gebleken is dat dit 50% vermindering geeft aan de beweeglijkheid van het sperma. Om dit te verbeteren wordt er Monothioglycerol(MTG) (5) toegevoegd aan het medium. Ook is snelheid tijdens het isoleren van sperma van belang zodat het sperma warm blijft. Er zijn nu speciale stoven te koop die je voor je op de tafel kunt zetten waardoor je het sperma weer snel in de stoof kan zetten zonder dat het afkoelt. Ook kunnen deze stoven ten opzichte van gewone stoven sneller equilibreren tot de juiste temperatuur en CO₂-concentratie (6).

nen minimaal vijf klonen te bestellen om er één te hebben die kiembaantransmissie geeft. Voor de meeste andere lijnen is drie klonen meestal voldoende, maar het verdient zeker aanbeveling om de klonen voor het injecteren te controleren op het juiste aantal van 40 chromosomen (euploid). Wanneer minder dan 60% van de cellen het normale chromosoomaantal van 40 hebben, heeft het weinig zin om die cellen te injecteren (9).

Sessies 7 t/m 10

Sessies 7 en 10 toonden de nieuwe ontwikkelingen en richtten zich toch voornamelijk op de transgenese bij ratten. De rat embryonale stamcellen lijken nu toch echt ontwikkeld te zijn en er zijn toepassingen die inderdaad tot de kiembaan doordringen. Het gebruik van de Zinc-finger nucleases en de meganucleases (enzymen die breuken aanbrengen in het DNA en op die manier een spot creëren in het genoom waar gemakkelijk recombinatie kan plaatsvinden) neemt ook een grote vlucht in de transgenese. Ook werd het PITT (PI-based targeted transgenesis) systeem gepresenteerd (10). Hierbij maakt men gebruik van 'seed mice', muizen die op een bekende plek in hun genoom een lox site hebben, en deze muizen injecteert men dan met een construct dat eveneens een lox site bevat. De twee lox-sites zullen elkaar opzoeken en recombineren waardoor het construct geïntegreerd wordt in het genoom op die specifieke plek. Injectie van DNA in de kern van een eicel is toch een vrij traumatisch proces waarbij er flinke schade kan ontstaan aan de bevruchte eicel. Een Japanse groep (10) denkt groot trauma te kunnen voorkomen door niet direct te injecteren met een naald, maar door te trillen. Zij toonden resultaten van drie opeenvolgende prototypen, maar de resultaten lieten zien dat de trilling eigenlijk alleen handig is om je naald schoon te houden van eiwitresiduen, dat je sneller kunt injecteren, maar dat de uiteindelijke resultaten niet efficiënter waren in het produceren van het aantal transgene nakomelingen. Extra bezwaar is dat bij deze injectiemethode frequenties gebruikt worden (5kHz tot 44 kHz) die gemakkelijk als storend ervaren worden door de muizen. Ook dit soort negatieve ontwikkelingen zijn belangrijk om verteld en gehoord te worden.

En tenslotte is duidelijk geworden dat we niet meer alleen de muis genetisch modificeren maar ook vele andere organismen, en met succes. Zo waren er varkensmodellen voor Lesch Nyhan, cystic fibrose, en Duchenne Muscular Dystrophy, transgene zebrafissen, transgene kippen en natuurlijk de transgene ratten. Bovendien werd er aandacht besteed aan de wetgeving en de publieke opinie met betrekking tot voedsel afkomstig van genetisch gemodificeerde dieren.

Je merkt het: er zijn nog voldoende ontwikkelingen in het veld van transgene technieken. Om bij te blijven zijn dit soort congressen, in het bijzonder voor de biotechnici, proefdierversorgers en studenten, bijzonder interessant en handig om collega's te ontmoeten en technieken uit te wisselen. Lidmaatschap van de ISTT (www.transtechsociety.org) kost je maar 25 euro per jaar en daarvoor heb je vrij toegang tot een website, een forum, het vakblad Transgenic Research, korting bij meetings en cursussen, reisbeurzen en meer dan 500 collega's in het zelfde veld voor wie allemaal geldt.

"Success is the ability to go from one failure to another, with no loss of enthusiasm!"

Literatuur

- 1 Luo C, Zufuga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parker-Thoenburg J. (2011) Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains, *J Am Assoc Lab Anim Sci*;50(4):471-8.
- 2 Gertsenstein M (2011) Coat Colour in Generation of Chimeras, 10th transgenic Technology Meeting, presentatie terug te vinden op http://www.transtechsociety.org/members/docs/TT2011_MarinaGertsenstein.pdf
- 3 Brinster RL (1974) The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development; *J Exp Med*. 1974 Oct 1;140(4):1049-56.

-
- 4 Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Bimberg NC, Evans RM (1982); Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes.; *Nature* Dec 16;300(5893):611-5
 - 5 Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, Taft RA; (2008); Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation.; *PLoS One*. 2008 Jul 30;3(7):e2792
 - 6 Minc™ Benchtop Incubator via Cook Medical, Cook Europe shared service centre, O' Halloran Road, National Technology Park Limerick, Ireland; www.cookmedical.com of
 - 7 Labotect Incubator "Labo C-Top" via Labor-Technik-Göttingen, Kampweg 12, D-37124 Rosdorf, Duitsland; www.Labotect.com
 - 8 Parker-Thornburg J (2011) Factors Affecting In Vitro Fertilization, 10th transgenic Technology Meeting, presentatie terug te vinden op http://www.transtechsociety.org/members/docs/TT2011_JanParkerThornburg.pdf
 - 9 Takeo T, Nakagata N(2011); Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin; *Biol Reprod*. 2011 Nov;85(5):1066-72. Epub 2011 Jul 20.
 - 10 Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP (1997); The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germcell chimaerism; *Transgenic Res*. 1997 Sep;6(5):321-8.
 - 11 Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H (2012); Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs; *Transgenic Res*. 2012 Feb;21(1):225-6. Epub 2011 Mar 25

«

