

## Biotechnica 2009

„Leben aus dem Eis“ war das Thema, mit dem die REBIRTH-JRG Biothermodynamik, das Institut für Mehrphasenprozesse und das Zentrum für Biomedizintechnik auf dem Niedersachsenstand auf der Biotechnica vom 06. bis 08. Oktober 2009 vertreten hat. Hier zeigten 650 Aussteller aus 28 Ländern neueste Produkte und Anwendungsmöglichkeiten der Biotechnologie in Gesundheitswesen, Industrie und Umweltschutz. Durch die hohe Zahl von Ausstellern und Fachbesuchern aus vielen Nationen ergaben sich neben interessanten Firmenkontakten die Möglichkeiten zu fachlichem Austausch mit Fachbesuchern. Die größte europäische Messe für Biotechnologie und Life Science hat gezeigt, dass Akzeptanz und Bedeutung dieser Fachgebiete auch in der Wirtschaft wachsen und Belange der Regenerativen Medizin auf große Resonanz treffen. So hat auch die Langzeitlagerung von biologischen Materialien mittels tiefkalten Temperaturen beim Publikum großes Interesse hervorgerufen.



## Biotechnica 2009

At the Biotechnica, held from 6 to 8 October 2009, REBIRTH's JRG on Biothermodynamics represented the Institute of Multiphase Processes and the Centre for Biomedical Engineering under the thematic heading 'Life from Ice'. 650 exhibitors from 28 different countries showcased their latest biotechnological products and applications in medicine, industry and ecology. The event not only led to promising contacts with various companies, but provided great opportunities for engaging both the public and fellow exhibitors on technical-related issues. This leading European trade show for biotechnology and the life sciences highlighted the growing importance of these fields in commerce, and the great interest in regenerative medicine. For example, long-term storage of biological materials using cryopreservation met with a highly positive response.

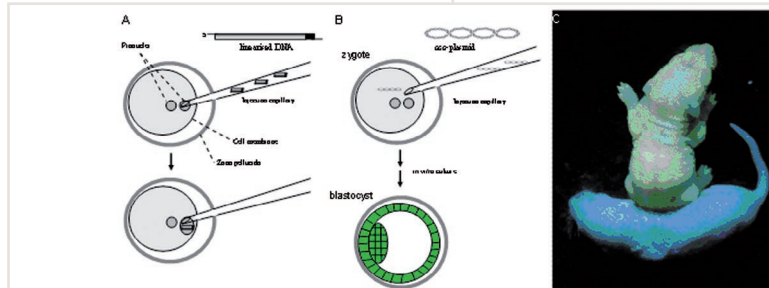
N. Hofmann (JRG Biothermodynamics)

## Nichtvirale Episomen ermöglichen die gezielte Genexpression in Mammalia-Embryos

**Zirkuläre superhelikale (ccc-) DNA: ein Vektorsystem mit vereinfachtem Kerntransfer und authentischen Expressions-eigenschaften.**

## Nonviral episomes permit targeted expression in mammalian embryos

**Covalently closed circular (ccc) DNA, a vector system with improved nuclear transfer and authentic gene expression characteristics.**



### Ansätze und Resultate pro-nucleärer Applikation

A) Klassisches Verfahren: linearisierte DNA wird in die Pronuclei einer Zygote injiziert. Deren Anschwellen zeigt erfolgreichen Transfer. Die Effizienz des Verfahrens leidet darunter, dass Zygoten vieler Säuger (Schwein, Kuh) nicht transparent sind, so dass Pronuclei ohne Nachbehandlungen schwer auszumachen sind.

B) Auf die cytoplasmatische Injektion zirkulärer superhelikaler (ccc-)Vektoren folgt deren effizienter Transport in den Zellkern. Dies beweist die Expression eines Markergens (Iqbal et al., 2009).

C) Transgene Maus (oben), die ihre Entstehung der cytoplasmatischen Injektion eines eGFP-Gens verdankt. Expression wird durch grüne Fluoreszenz deutlich (W. Garrels und W. Kues, unpublizierte Daten). Ein nicht modifiziertes Tier erscheint aufgrund des reflektierten Lichtes blau (unten).

### Injection of DNA into a pronucleus or into the cytoplasm of a zygote

A) Standard technique for injecting linearized DNA into the pronucleus of zygotes. Swelling of the pronucleus indicates successful injection. Note that the zygotes of several mammalian species other than mouse are opaque and the pronuclei are not readily visible.

B) Cytoplasmic injection of supercoiled circular plasmids results in efficient nuclear transport and expression, as shown in this contribution

C) Transgenic mouse with stably integrated fluorescence marker gene generated via cytoplasmic plasmid injection (unpub. data W. Garrels, W. Kues) viewed under fluorescence excitation: transgenic mouse pup with specific fluorescent protein expression (green/yellow), non-transgenic sibling (blue appearance due to reflected light).

Traditionelle Gentransfertechniken führen zur ungezielten Integration zumeist mehrerer Kopien eines Transgens und in der Folge häufig zum Verlust der Genaktivität. Die Expertise zweier Gruppen im REBIRTH-Cluster resultierte jetzt in einem neuartigen Ansatz, der geeignet erscheint, diese Unzulänglichkeiten mit Hilfe nicht-integrierender (episomaler) Vektoren zu beheben. Bis vor wenigen Jahren kannte man replizierende Episomen nur als Teil viraler Systeme (SV40, EBV) und in Hefe (ARS-Vektoren). Wie diese Beispiele zeigten, sind zur Replikation Elemente erforderlich, die die Trennung der DNA-Stränge fördern und solche, die eine Segregation auf Tochterzellen durch Anheftung an Chromosomen vermitteln („molecular glue“-Funktion). Beide Funktionen konnten einem Plasmid durch Einfügen einer S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment) - Region verliehen werden. Nach diesem grundsätzlichen Schritt ließen sich die Charakteristiken des Systems vor allem dadurch weiter verbessern, dass prokaryontische Sequenzanteile und Selektionsmarker durch einen Rekombinationsansatz beseitigt wurden. Die resultierenden „Minicircles“ widerstehen den Abwehrmechanismen der Wirtszelle, die andernfalls zum Erliegen der Genaktivität („silencing“) führen können. Ihrem Potential zur genetischen Modifikation von Geweben, befruchteten Eizellen (Zygoten) und Stammzellen wird in diesem Bericht nachgegangen.

To date, the generation of transgenic mammals with predictable properties has been hampered by the shortcomings of standard gene-transfer technologies. The reasons for this include the consequences of randomly integrating transgenes (unpredictable copy numbers and insertion loci leading to silencing) and the characteristics of common DNA transfer routes. The combined expertise of two REBIRTH-affiliated laboratories has made possible a novel approach with the potential to overcome these limitations. Until recently, replicating, non-integrating episomes have been restricted to viral systems (paradigms: SV40, EBV) and to yeast (ARS vectors). These examples show that replication requires DNA strand separation and 'molecular glue' functions by which these vectors are segregated owing to their non-covalent association with the endogenous chromosomes. Both functions were successfully provided by an S/MAR (scaffold/matrix attachment region) element. Subsequent improvements followed the conversion of plasmid derivatives into 'minicircles', i.e. DNA vectors devoid of prokaryotic sequences and selection markers, which trigger host-defence mechanisms and gene silencing. Minicircles have proven to have almost unlimited replication potential in dividing cell lines and are currently being investigated for their potential to modify tissues, zygotes and stem cells.

Injektion von Transgenen in die Vorkerne (Pronuclei) von Zygoten ist eine verbreitete Methode zur Erzeugung modifizierter Embryos. Der klassische Ansatz verwendet hier linearisierte DNA, die zielgenau appliziert werden muss, was aufgrund der Sensitivität des Systems aufwändige Mikromanipulationstechniken und große Erfahrung erfordert (Abb. A). Diese DNA integriert in nicht kontrollierbarer Weise in das Genom der Zielzelle. Genom-Beobachtungen, wonach die cytoplasmatische Injektion zirkulärer superhelikaler DNA bis zu 60% exprimierender Blastocysten ergibt, zeigen, dass ccc-Vektoren (die für ihre Stabilität und ihr Transkriptionspotential bekannt sind) einen vereinfachten Kerntransfer ermöglichen (Abb. B). Dies gab Anlass zu den folgenden Untersuchungen der Expressionseigenschaften in den frühesten Entwicklungsstadien muriner und boviner Systeme. In beiden Fällen ermöglichten der virale CMV-Promoter und der Keimbahn-spezifische Oct4-Promoter aktive Transkription, beginnend mit dem jeweils typischen Einsatzpunkt. Erwartungsgemäß führte der  $\gamma$ AChR-Promoter (welcher die Expression im Muskel treibt) zu keinem Signal. Während ein nicht-modifiziertes Oct4-eGFP-Konstrukt im murinen System 12 Std. nach Injektion zur Fluoreszenz führte, geschah dies im bovinen Fall erst nach 50 Std. Dies stimmt mit dem Zeitpunkt embryonaler Genomaktivierung überein, die bei der Maus im späten Einzell-Stadium und in bovinen Embryos im 8-Zell-Stadium erfolgt. Für DNA-methylierte Vektoren verschoben sich diese Zeitpunkte in Übereinstimmung mit epigenetischen Prinzipien.

Zusammenfassend ermöglicht cytoplasmatische Injektion die verlässliche und effiziente ektopische Genexpression in Embryos. Daraus ergibt sich eine einfache Methode zum Studium von Reprogrammierungsschritten in der frühen Ontogenese. Aktuelle Verbesserungen des Verfahrens betreffen Maßnahmen, die geeignet sind, das Replikationspotential von Minicircles in Oocyten (nach dem Muster von Zelllinien) zu verbessern. Dies erfordert ein vertieftes Verständnis der Schritte, die zur funktionellen Etablierung eines S/MAR-Episoms in der Kernarchitektur führen. Neueste, noch unpublizierte Daten unterstreichen die Vielseitigkeit unseres Ansatzes: die cytoplasmatische Injektionsroute eignet sich nachweislich zur Expression funktioneller Gene wie der Telomerase in Embryos und damit für die stabile Transgenese von Mammalia (Abb. C).

*W. Kues, H. Niemann, K. Iqbal, W. Garrels, (Reprogramming and Transgenesis)  
J. Bode (Molecular Imaging and Marking)*

**Iqbal, K., Barg-Kues, B., Broll, S., Bode, J., Niemann, H., Kues, W.A. (2009)** Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos; *BioTechniques* 47: November 2009, in press. doi 10.2144/000113270

Injection of DNA constructs into the pronuclei of fertilized mammalian eggs is a common method of generating transgenic embryos and animals. Traditionally, the procedure requires injection of linearized DNA constructs into the pronuclei of fertilized eggs, which – owing to their vulnerability – requires a high level of technical skill and expensive micromanipulation equipment (Fig. A). We previously observed that, for covalently closed circular (ccc) DNA circles, cytoplasmic injection is sufficient to produce a high proportion (up to 60 %) of plasmid-expressing blastocysts. This indicated that ccc species (which are known for their stability and transcriptional potential) allow a facilitated nuclear transfer route (Fig. B). This motivated the present study, in which the fate and the expression characteristics of these entities are traced during the initial steps of development. Our experiments confirm that injection of ccc plasmids into the cytoplasm of zygotes from mouse and cattle is a robust and reliable technique for inducing expression of fluorescent marker genes in early embryos. In both cases, the ubiquitous CMV promoter and the germ line-specific Oct4 promoter directed active transcription in injected embryos but with different onset times. As expected, the  $\gamma$ AChR promoter (which is active only in skeletal muscle) did not give rise to detectable fluorescence. While the unmodified Oct4-eGFP evoked immediate expression of eGFP in late one-cell stage mouse embryos ~12 h post-injection, for bovine embryos eGFP fluorescence was initiated only 50 h post injection. The species-specific onset of transcription therefore coincides well with major embryonic genome activation in these species, which starts at the late one-cell stage in mouse embryos and at the eight-cell stage in bovine embryos. DNA-methylated plasmids showed delayed onset of transcription, i.e. this epigenetic mark influences plasmid expression in an authentic manner.

In summary, cytoplasmic injection of supercoiled DNAs is a reliable, robust and efficient method for ectopic gene expression in embryos, well suited for studying reprogramming events during early ontogenesis. Present research addresses refinements of the system designed to improve the replication potential of minicircles in early embryos (to an extent resembling cell lines). This will require better understanding of the steps and molecular interactions by which episomes become productively established in the nuclear architecture of both systems. Recent unpublished data demonstrate the versatility of this system; the cytoplasmic plasmid injection can be extended to express functional genes, such as telomerase in embryos, or to produce stable transgenesis in mammals (Fig. C).

## SU ESC besucht den transgenen Affen

**Im September besuchte Dr. Thomas Müller das Labor von Dr. Erika Sasaki im CIEA Japan, mit dem die MHH seit 2006 eng kooperiert.**

Den japanischen Forschern gelang es, dem ersten Weißbüschelaffen ein künstliches Gen einzuschleusen (Nature 459, 2009), was auch an die nächste Generation weitergegeben wurde, so dass nun schon fünf transgene Tiere namens Hisui, Banko, Wakaba, Kei und Kuo existieren. Mit dem transgenen Tier eröffnen sich neue Möglichkeiten für näher am Menschen orientierte Krankheitsmodelle für die Alzheimer-, Parkinson-, Multiple Sklerose- und Diabetesforschung. Die SU ESC- und CIEA-Arbeitsgruppen arbeiten zurzeit zusammen an reprogrammierten Zellen des Tieres. Weiterhin wurde die Kooperation mit Prof. Shoen Kume vom Institut für molekulare Embryologie und Genetik gefestigt, die als Kapazität für Reprogrammierung von somatischen in pankreatische Zellen in Japan gilt. Ein fruchtbarer Austausch zwischen der Kumamoto-Universität und der MHH ist für das Jahr 2010 geplant.



*Links/left: Takashi Inoue, Ryoji Ito, Erika Sasaki, Thomas Müller and Ikuo Tomioka*

## SU for ESC visits the transgenic monkey

**In September, Dr Thomas Müller visited the group headed by Dr Erika Sasaki at Japan's CIEA, with which the SU for ESC has collaborated closely since 2006.**

The Japanese researchers successfully introduced an artificial gene into the common marmoset monkey (Nature 459, 2009) which was passed on to the offspring; to date, there are five transgenic animals (named Hisui, Banko, Wakaba, Kei and Kuo). The transgenic marmoset has opened up new possibilities for better, more human-like disease models for Alzheimer's and Parkinson's disease, multiple sclerosis and diabetes. Scientists from the SU for ESC and the CIEA are currently working on reprogrammed cells from these animals. In addition, collaboration with Professor Shoen Kume of the Institute for Embryology and Molecular Genetics – which is a highly renowned player in the reprogramming of somatic cells into pancreatic cells – was further strengthened. A fruitful exchange between Hannover Medical School (MHH) and Kumamoto University is planned for 2010.

*T. Müller (SU Embryonic Stem Cells)*