

Inhalt

Abkürzungen	7
1. Einführung	9
1.1. Influenza Viren	9
1.1.1. Aufbau von Influenza A-Viren	9
1.1.2. Struktur des Influenzahämagglutinin	10
1.1.3. Influenza A-Virus induzierte Fusion	12
1.2. Sendaivirus	14
1.3. Virosomen	14
1.4. Spermien-vermittelter Gentransfer (SMGT)	16
1.4.1. Aufnahme von DNA in Spermien	16
1.4.2. Transfektion der Spermien mittels Inkubation in DNA-haltigen Medien und SMGT	18
1.4.3. Transfektion der Spermien mittels Elektroporation und SMGT	22
1.4.4. Transfektion der Spermien mittels kationischer Lipide und SMGT	24
1.4.5. Transfektion der Spermien mittels Liposomen und SMGT	26
1.4.6. Transfektion der Spermien mittels viraler Vektoren und SMGT	27
1.4.7. Transfektion der Spermien mittels Virosomen und SMGT	27
1.4.8. Weitere Spermien-vermittelte Gentransfermethoden	28
1.5. Herstellung und Nutzen transgener Tiere	29
2. Zielsetzung	33
3. Material und Methoden	34
3.1. Material	34
3.1.1. Chemikalien, Enzyme und Immunreagenzien	34
3.1.2. Viren und Zellkultur	36
3.1.3. Spezielle Geräte und Testbestecke	37
3.2. Methoden	37
3.2.1. Virusanzucht, -reinigung und -charakterisierung	37
3.2.2. Herstellung der Virosomen	40
3.2.3. Biochemische Charakterisierung der Virosomen und Spermien	43

3.2.4.	Elektronenmikroskopie der Virosomen	47
3.2.5.	Fusion mit Spermien	47
3.2.6.	Fluoreszenzmikroskopie fusionierter Spermien	50
3.2.7.	Statistik	52
4.	Ergebnisse	54
4.1.	Optimierung der Virosomen bezüglich der Fusion mit gefrierkonservierten Bullenspermien	54
4.1.1.	Einfluss des Elternvirus auf die Virosomen	54
4.1.2.	Abhängigkeit der Fusion der Virosomen mit den Spermien von der Anwesenheit des Influenzahämagglutinins	57
4.1.3.	Einfluss der Cholesterolmenge auf die Virosomen	59
4.1.4.	Einfluss der Plasmidmenge auf Virosomen	62
4.1.5.	Einfluss der Tritonextraktionsmethode auf die Virosomen	66
4.1.6.	Einfluss der Proteinmenge auf die Virosomen	70
4.1.7.	Einfluss verschiedener Poly-L-Lysin-Kondensationszeiten auf Virosomen	74
4.2.	Variabilität der Fusionsergebnisse bei Verwendung einer Virosomenpräparation	76
4.3.	Transfer von Fluoreszein-markierter DNA aus Virosomen in Spermien	77
4.4.	Fusion von Virosomen mit Nebenhodenschwanzspermien (Rind)	81
4.5.	Fusion von Virosomen mit kryokonservierten Spermien verschiedener Individuen	82
4.6.	Fusion von Virosomen mit flüssigkonservierten Eberspermien	83
5.	Diskussion	85
6.	Zusammenfassung	102
7.	Summary	103
8.	Anhang	104
9.	Literaturverzeichnis	106

Danksagung

132

Publikationsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung