

# 1. Einführung

## 1.1. Influenza Viren

Influenza Viren gehören zu der Familie der Orthomyxoviren, bei denen es sich um behüllte Viren mit einem einzelsträngigen, segmentierten RNA-Genom in Negativstrangorientierung handelt. In dieser Familie wurden vier Genera definiert: Influenza A, Influenza B, Influenza C und Thogotovirus (auch Influenza D; *Moorman, 2003*).

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der vier Genera ist ihr Wirtsspektrum. Während Influenza C-Viren bisher nur aus Menschen und Schweinen isoliert worden sind und Influenza B-Viren humanspezifisch zu sein scheinen, besitzen Influenza A-Viren ein breites Wirtsspektrum, das neben Schweinen, Pferden, Seehunden und Geflügel auch den Menschen umfasst. Weitere Unterschiede bestehen in der Funktion der jeweiligen Oberflächenproteine und in der Anzahl der vorhandenen Gensegmente (*Modrow et al., 2003*).

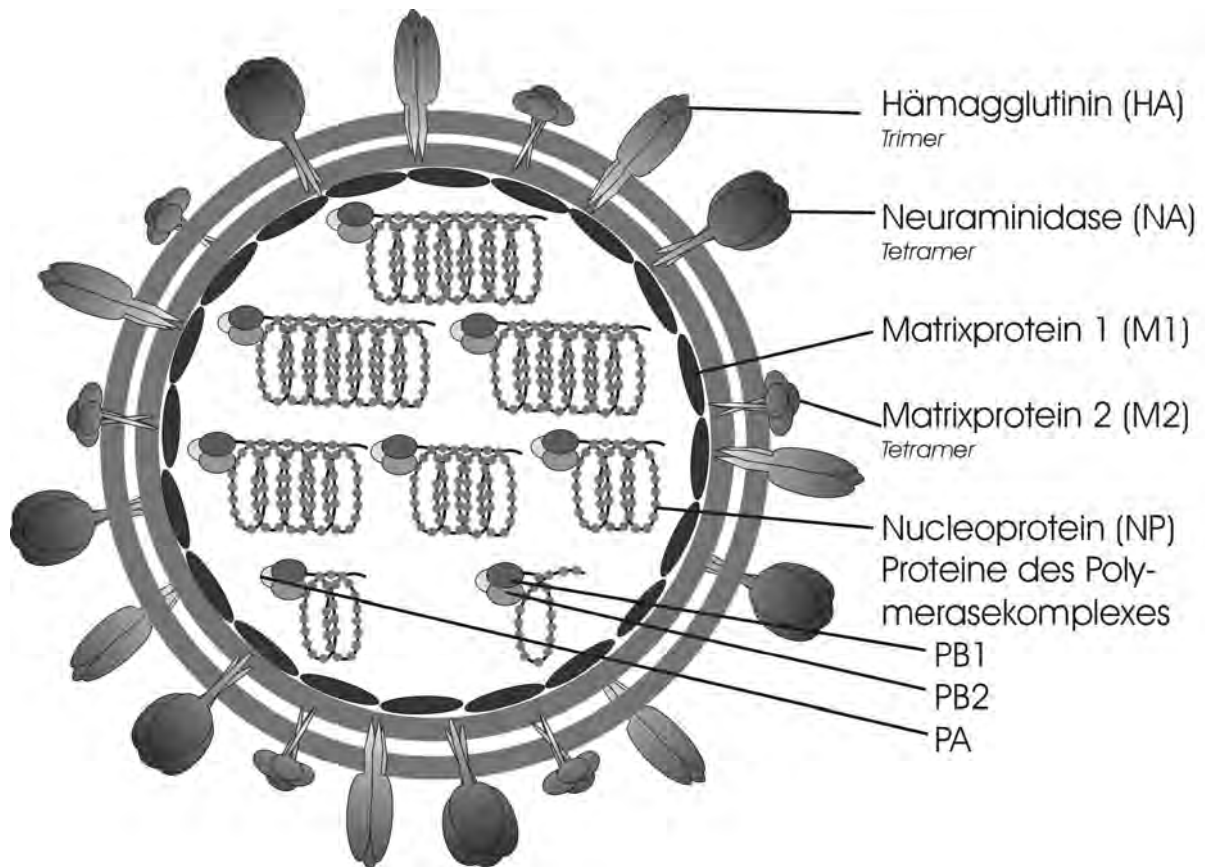
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das zur Gruppe der Influenza A-Viren gehörende Influenza Virus X-31 verwendet. In der Einführung wird nur noch auf diesen Genus Bezug genommen.

### 1.1.1. Aufbau von Influenza A-Viren

Influenza A-Viren sind pleomorph, sie kommen hauptsächlich in sphärischer Form vor, aber auch filamentöse Formen sind bekannt. Der mittlere Durchmesser beträgt 120 nm. Ihr segmentiertes Nukleokapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, in die glykosilierte und zum Teil fettsäuremodifizierte Oberflächenproteine („Spikes“) eingelagert sind. Bei Influenza A-Viren sind dies: Influenzahämagglutinin (HA), das als Homotrimer vorliegt, die Neuraminidase (NA), ein Homotetramer, und das Protein M2, ebenfalls ein Homotetramer. Unterhalb der Lipiddoppelschicht, vermutlich über die zytoplasmatischen Anteile der Glykoproteine, ist das M1-Protein mit der Lipiddoppelschicht assoziiert. Bei Influenza A-Viren wurden bis heute 16 verschiedene HA-Subtypen und neun Subtypen der NA identifiziert. Der hier verwendete Stamm (X-31) besitzt ein HA vom Typ 3 und eine NA vom Subtyp 2.

Das Nukleokapsid besteht aus acht Gensegmenten einzelsträngiger RNA, die auf ihrer ganzen Länge mit Nukleoproteinen (NP) komplexiert sind. An jedes dieser Gensegmente sind zusätzlich noch die Proteine des Polymerasekomplexes (PB1, PB2 und PA) assoziiert.

Die sonstigen in Influenza A Viren vorkommenden Proteine und ihre Funktionen werden kurz in **Tabelle 1** erläutert.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenza A-Viruspartikels (modifiziert nach *Cross et al., 2001*).

### 1.1.2. Struktur des Influenzahämagglutinin

Influenzahämagglutinin ist ein Typ I-Membranglykoprotein. Es besteht aus 550 Aminosäureresten mit einer Signalsequenz am N-Terminus, einer Transmembranregion am C-Terminus und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich (*Cross et al., 2001*). HA trägt sieben an Asparagin gebundene Zuckerseitenketten und drei Palmitinsäurereste an drei Cysteinresten in der zytoplasmatischen Domäne (*Roberts et al., 1993; Keil et al., 1985; Schmidt, 1982*). Im Golgiapparat wird HA weiteren Glykosilierungen unterzogen und assoziiert mit Sphingolipid-Cholesterol enthaltenden Mikrodomänen, die als „Detergent-insoluble glycolipid-enriched domains“ (DIGS) oder Lipid Rafts bezeichnet werden (*Keller und Simons, 1998*).

**Tabelle 1:** Auflistung der in Influenza A-Viren vorkommenden Proteine, ihres Molekulargewichtes und ihrer Funktion, mod. nach *Modrow et al., 2003*

Protein	Größe	Funktion	Quelle
<b>Strukturproteine</b>			
<b>HA<sub>0</sub></b>	77 kD	glykosyliert, fettsäuremodifiziert, Vorläuferprotein für HA <sub>1</sub> und HA <sub>2</sub>	<i>Modrow et al., 2003</i>
<b>HA<sub>1</sub></b>	50 kD	glykosyliert, fettsäuremodifiziert, aminoterminaler Anteil von HA, Adsorption an Neuraminsäure	<i>Modrow et al., 2003</i>
<b>HA<sub>2</sub></b>	26 kD	glykosyliert, fettsäuremodifiziert, carboxyterminaler Anteil von HA, Membranfusion	
<b>NA</b>	56 kD	glykosyliert, Neuraminidase, Abspaltung endständiger Neuraminsäurereste; Tetramer	
<b>M1</b>	28 kD	mit dem zytoplasmatischen Teil von HA, NA und M2 assoziiert, mit NP verbunden, Förderung des Budding-Prozess	<i>Ali et al., 2000</i>
<b>M2</b>	15 kD	fettsäuremodifiziert, Tetramer, 20-60 Moleküle/ Virus, hochselektiver Protonenkanal	<i>Lamb et al., 1994</i>
<b>NP</b>	55 kD	Hauptkomponente des Nukleokapsids, komplexiert einzelner Segmente der RNA, pro Protein etwa 20 Nukleotide	<i>Modrow et al., 2003</i>
<b>PB1</b>	90 kD	Teil des P-Protein Komplexes, pro Viruspartikel ca. 50 Komplexe, mit Enden der Genomsegmente assoziiert; RNA-abhängige RNA-Polymerase; reich an basischen Aminosäuren	
<b>PB2</b>	80 kD	reich an basischen Aminosäuren, bindet 5'-Cap-Strukturen zellulärer mRNA-Moleküle, Primer für die virale mRNA-Synthese	
<b>PA</b>	83 kD	Teil vom Nukleokapsid und Polymerasekomplex, saures Protein	
<b>Nichtstrukturproteine</b>			
<b>NS1</b>	26 kD	Bindung der doppelsträngigen RNA durch N-terminale RNA-bindende Domäne	<i>Krug et al., 2003</i>
<b>NS2</b>	11 kD	Funktion unbekannt	<i>Modrow et al., 2003</i>

## 1. Einführung

---

HA bildet auf der Virusoberfläche Trimere (220 kDa) aus identischen 70 kDa Untereinheiten (*Cross et al., 2001*). Das Vorläuferpolypeptid ( $HA_0$ ) des Monomers wird in die zwei Untereinheiten  $HA_1$  (36 kDa, mit Modifikationen etwa 50 kDa) und  $HA_2$  (26 kDa) gespalten (*Modrow et al., 2003*). Diese sind durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 14 von  $HA_1$  und Cystein 137 von  $HA_2$  verbunden (*Cross et al., 2001; Ada und Jones, 1986*). Erst durch die Spaltung in die zwei Untereinheiten erlangt HA die Fähigkeit, die Membranfusion einzuleiten (*Wiley und Skehel, 1987*).

In kristallografischen Untersuchungen an Bromelain-fragmentiertem HA (bei Bromelain handelt es sich um eine Protease, die  $HA_2$  knapp oberhalb des N-terminalen Endes der Transmembrandomäne von der Oberfläche des Influenzavirus abtrennt) konnte gezeigt werden, dass jedes HA zwei Hauptregionen enthält: eine dreisträngige Spule von  $\alpha$ -Helices („coiled-coil“) und eine globuläre Region mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (*Wiley et al., 1981; Wilson et al., 1981*). Die Zellrezeptor-Bindungsstelle und die variable Antigen determinante sind auf der globulären Domäne lokalisiert. Die  $HA_2$ -Kette ist über eine 25-32 Aminosäurereste lange, hydrophobe Sequenz am C-Terminus in der Virushülle verankert (*Ada und Jones, 1986*). Influenza-HA stellt 20-30% des gesamten viralen Proteins (*Lamb und Choppin, 1983, Ada und Jones, 1986; Oxford et al., 1981*).



**Abbildung 2:** Lineare Darstellung von Influenzahämagglutinin.

Grau:  $HA_1$  (328 AS); Kariert: Fusionspeptid von  $HA_2$  (AS 1-23 von  $HA_2$ );

Gestreift: Transmembrandomäne von  $HA_2$  (AS 185-221 von  $HA_2$ ). S-S:

Disulfidbrücke zwischen AS 14 von  $HA_1$  und AS 137 von  $HA_2$ .

### 1.1.3. Influenza A-Virus induzierte Fusion

HA dient bei der Infektion von Wirtszellen der Bindung des Virus an die Zielzelle und der Fusion von viraler mit zellulärer Membran (*Hughes, 1995*).

Das Influenza Virus dringt in Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ein (*Hoekstra und Lima, 1992; Gaudin et al., 1995*), indem es über eine Tasche aus 27 Aminosäureresten

am distalen Ende des HA-Moleküls an Oligosaccharide bindet, die 5-N-Acetyl-Neuraminsäure enthalten (*Ada und Jones, 1986; Hirst, 1941*). Es erfolgt die Aufnahme in ein behülltes Vesikel, das mit einem Endosom fusioniert (*Simons et al., 1982*). Durch Änderung des pH-Wertes im Endosom wird eine Konformationsänderung des HA induziert. HA wird fusionsaktiv und vermittelt die Annäherung der viralen Hülle an die endosomale Membran (*Hoekstra und Lima, 1992; Gaudin et al., 1995*). Die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran ermöglicht es dem Nukleokapsid, ins Zytoplasma einzudringen (*Simons et al., 1982*).

Auf molekularer Ebene umfasst die HA-vermittelte Membranfusion mindestens zwei Schritte. Zunächst kommt es wahrscheinlich bei niedrigem pH zur Dissoziation der globulären Domänen, wodurch sich die monomeren HA<sub>1</sub>-Moleküle voneinander entfernen (*White und Wilson, 1987*). Dies führt zur Exposition der im Kontaktbereich der Monomere verborgenen „Fusionspeptide“, wobei es sich um kurze, hydrophobe Sequenzen von ca. 20 Aminosäureresten handelt.

Weiterhin lassen Röntgenkristall-Aufnahmen vermuten, dass sich in der Ektodomäne des HA der Bogen, der die zwei  $\alpha$ -Helices verbindet, zu einer  $\alpha$ -Helix transformiert. Dadurch wird eine verlängerte, trimere „coiled-coil“-Struktur gebildet (*Carr und Kim, 1993; Bullough et al., 1994; Qiao et al., 1998; Chen et al., 1995; Chen et al., 1999*). Dieser sogenannte „spring loaded“-Mechanismus (Mechanismus einer gespannten Sprungfeder; *Carr und Kim, 1993*) befördert das Fusionspeptid an die Spitze des HA und damit in Richtung Zielmembran. Es wird angenommen, dass die Bindung des C-Terminus von HA<sub>2</sub> an den N-Terminus der vollständig verlängerten „coiled-coil“-Struktur essentiell für die Annäherung der Membranen ist (*Gething et al., 1986; Huang et al., 2003*).

Die HA-Konformationsänderung wird unter sauren Bedingungen sehr schnell vollzogen. So konnten *Huang et al. (2003)* eine Halbwertszeit für die Exposition des Fusionspeptides bei pH 5.0 und 37°C von 15 sec ermitteln. Diese Konformationsänderung ist irreversibel. Es wurde vermutet, dass durch die Inkubation von Viren mit einem niedrigen pH die ungebundenen Viren die Konformationsänderung durchlaufen und anschliessend nicht in der Lage sind die Fusion zu induzieren (*Ramalho-Santos et al., 1993*). Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Influenza Viren ihre fusogenen Eigenschaften auch bei niedrigem pH über eine lange Zeit behalten und in der Lage sind, die Mischung der Membranen zu induzieren (*Ramalho-Santos et al., 1996*). Möglich ist, dass zumindest einige Aspekte der Konformationsänderung, namentlich die Positionierung des HA im Verhältnis zu seiner möglichen Zielmembran, bei neutralem oder saurem pH, reversibel sind (*Tatulian und Tamm, 1996*). Eine andere

## 1. Einführung

---

Hypothese ist, dass nicht alle HA-Trimere auf der Virushülle an der Fusion beteiligt sind und tatsächlich die physiologisch wichtige pH-abhängige Strukturänderung vollziehen (*Tsurudome et al., 1992*).

### 1.2. Sendaivirus

Das Sendaivirus (auch Hemagglutinating virus of Japan oder Murines Parainfluenzavirus, Serotyp 1) gehört zur Familie der Paramyxoviren und kann bei Mäusen eine interstitielle Pneumonie verursachen (*Fukai und Suzuki, 1955; Ishida und Homma, 1978*). Es besitzt eine pleomorphe Struktur mit einem Durchmesser von ca 150 nm (*Kuroya et al., 1953*). Das Nukleokapsid ist helikal, unsegmentiert und wird durch eine Lipiddoppelschicht umgeben, in die zwei Glykoproteine eingebettet sind (*Lyles, 1979; Caldwell und Lyles, 1981*). Die Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) vermittelt die Bindung an den zellulären Rezeptor (*Nagai und Klenk, 1977*). Sie bindet an Sialoglykoproteine oder -lipide (*Markwell et al., 1981*). Das HN liegt hauptsächlich in Oligomeren vor, wobei die Dimere durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Ausbildung von Tetrameren erfolgt durch nichtkovalente Bindungen (*Markwell und Fox, 1980*).

Das zweite Oberflächenglykoprotein des Sendaivirus ist das Fusionsprotein (F-Protein). Dieses ist für den Eintritt des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle notwendig (*Choppin et al., 1981*). Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert, welches in zwei durch Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten F1 und F2 gespalten wird (*Scheid und Choppin, 1977; Iwata et al., 1994*). Durch Konformationsänderung kommt es zur Exposition eines hydrophoben, aminoterminalen Segments der F1-Untereinheit, des Fusionspeptids (*Scheid und Choppin, 1974; Hsu et al., 1981*). Dieses interagiert mit der Wirtszellmembran und führt zur Einleitung des Fusionsvorganges (*Gething et al., 1978a, 1978b; Hsu et al., 1981*).

### 1.3. Virosomen

Bei Virosomen handelt es sich um rekonstituierte, virale Hüllen. Der Versuch, Influenzahämagglutinin und Neuraminidase in Vesikel einzufügen und so ihre infektiösen Eigenschaften unabhängig vom viralen Genom zu nutzen, wurde erstmals 1975 von *Almeida*

*et al.* beschrieben. Die vollständige, funktionelle Rekonstitution dieser zwei Proteine gelang jedoch erst *Stegman et al. (1987)*. Ziel ist es, rekonstituierte, virale Hüllen herzustellen, die die Fähigkeit besitzen, Zellen zu lysieren, mit Zellmembranen zu fusionieren oder Zell-Zell-Fusionen zu induzieren (*Loyter und Volsky, 1982; Rott und Klenk, 1977; Uchida et al., 1980*). Auf diese Weise kann z. B. auch in Virosomen eingebautes Material in Zellen eingeschleust werden (*Bron et al., 1993a*).

Zur Herstellung der Virosomen werden die viralen Hüllen durch Zugabe eines Überschusses an Detergens solubilisiert, das Nukleokapsid durch Ultrazentrifugation und das Detergens durch BioBeads entfernt (*Bron et al., 1993a*). Die funktionelle Rekonstitution der Membranfusionsaktivität gelingt nur unter Verwendung eines nicht-ionischen Detergens mit einer möglichst niedrigen kritischen Mizellar-Konzentration (CMC), wobei sich sowohl Octaethylenglycol-Mono(n-dodecyl)ether als auch Triton X-100 als geeignet erwiesen haben (Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV): *Metsikkö et al., 1986*; Influenza Virus: *Stegman et al., 1987; Nussbaum et al., 1987; Lapidot et al., 1987*; Sendavirus: *Vainstein et al., 1984*). Wird das Influenza A-Virus mit Triton X-100 inkubiert, sind weder Matrix- noch Nukleokapsidproteine in der Lösung nachweisbar; lediglich die Glykoproteine lassen sich auf diese Weise eluieren. Mit dieser Methode gewonnene virale Hüllen weisen elektronenmikroskopisch hinsichtlich Größe und Spikebesatz starke Ähnlichkeiten mit den Elternviren auf (*Nussbaum et al., 1987*).

Neben den in den Virosomen enthaltenen Proteinen sind auch die in den Vesikeln enthaltenen Lipide von Bedeutung; beispielsweise ist Cholesterol für die Fusion von Virosomen und Viren essentiell (*Lapidot et al., 1987*). Durch Zugabe unterschiedlicher exogener Lipide kann die Größe der Virosomen verändert werden. So sind Virosomen, denen Phosphatidylcholin zugegeben wurde, im Durchmesser etwa 170 nm groß, während bei Zugabe kationischer Lipide ein mittlerer Durchmesser von 240 nm gemessen werden konnte (*Schoen et al., 1999*). In beiden Fällen blieb die Fusionsfähigkeit jedoch gleich (*Schoen et al., 1999*).

Ein Vorteil von Virosomen gegenüber kationischen Lipid/DNA-Komplexen ist, dass bei geringerer eingesetzter DNA-Menge die Zellen effektiver transfiziert werden und dabei weniger zytotoxische Effekte auftreten (*Mizuguchi et al., 1996*). Die Fähigkeit, das Gen in die Fremdzelle zu transferieren, ist überwiegend abhängig von der Anwesenheit des Virusrezeptors auf der Oberfläche der Zielzellen, im Fall von Influenzavirosomen von der Anwesenheit von Sialoglykolipiden und Sialoglykoproteinen (*White et al., 1983*). Dies lässt vermuten, dass die Funktion der Bindung von HA an Sialinsäurereste die Auslösung der

rezeptorvermittelten Endozytose und die Aufrechterhaltung der direkten Nachbarschaft zwischen Virus/Virosom und endosomaler Membran ist (*Mastrobattista et al., 2001*).

### 1.4. Spermien-vermittelter Gentransfer (SMGT)

Bereits 1971 konnten *Brckett et al.* nachweisen, dass es Spermien möglich ist, fremde DNA zu internalisieren und bei der Befruchtung zu transferieren. Diese Publikation wurde jedoch erst 1989 von *Lavitrano et al.* aufgegriffen, die Nebenhodenschwanzspermien verwendeten, um transgene Mäuse zu generieren. Diese Methode des DNA-Transfers wird als Spermien-vermittelter Gentransfer (SMGT) bezeichnet.

Vorteile dieser Methode sind der geringe instrumentelle Aufwand und die in der Praxis gut etablierte Gewinnung und Lagerung von Nutztierspermien.

#### 1.4.1. Aufnahme von DNA in Spermien

Bisher konnte bei allen untersuchten Spezies die Assoziation von DNA an die Spermien beobachtet werden (*Gandolfi, 2000*). Dies geschieht bevorzugt in der postakrosomalen Region (*Brckett et al., 1971; Atkinson et al., 1991; Camaioni et al., 1992*), wo auch andere negativ geladene Makromoleküle wie z. B. Heparin, Dextran-Sulfat oder bestimmte Proteine bei neutralem pH-Wert binden (*Lavitrano et al., 1992*). Es wird vermutet, dass ein eventuell vorhandener Rezeptor für die DNA erst während der Spermatogenese in die Spermienmembran eingebaut wird, da Nebenhodenschwanzspermien noch nicht in der Lage sind, DNA zu binden (*Carballada und Esponda, 2001*). Die Bindung der DNA an die Spermien scheint von der negativen Gesamtladung der DNA (Fragmentlänge), von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und von der Vitalität der Spermien abhängig zu sein (*Lavitrano et al., 1992; Carballada und Esponda, 2001; Lavitrano et al., 1989; Horan et al., 1991*).

Als begünstigende Faktoren für die DNA-Aufnahme in Spermien wurden drei Proteingruppen identifiziert, die DNA binden können. Unter diesen sind bestimmte Proteine mit einer Größe von 30-35 kDa die wahrscheinlichen „physiologischen“ Bindungsproteine für DNA; sie kommen sowohl bei Säugern, Fischen als auch Echinoiden vor (*Gandolfi, 2000*).

Andere Studien an Knockout-Mäusen konnten die Beteiligung von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHC II) und CD4 zeigen (*Lavitrano et al., 1997a*).



MHC II-Knockout Mäuse wiesen eine reduzierte DNA-Bindungsfähigkeit auf, wobei allerdings keine MHC II-Expression auf Wildtyp-Spermien detektierbar war. CD4-defiziente Mäuse hingegen waren in der Lage DNA zu binden, konnten diese aber nicht aufnehmen (*Lavitrano et al., 1997a*).

Negativ auf die Assoziation bzw. Aufnahme von DNA in die Spermien wirken sich besonders Faktoren im Seminalplasma aus, darunter vermutlich Glycosaminoglycane und Polyamine (*Camaioni et al., 1992*). Es wurde jedoch auch ein 37 kDa großes, DNA-bindendes Glykoprotein bei Echinoiden, „inhibitory factor 1“ (IF-1), isoliert. Bei Präinkubation von Spermien mit diesem Faktor konnte die Bindung der DNA an das 30-35kDa-Protein um ein 206faches gesenkt werden (*Zani et al., 1995*). IF-1 bindet bei ejakulierten Spermien wie DNA im postakrosomalen Bereich. Seine inhibitorische Funktion ist Spezies-übergreifend (*Macha et al., 1997*).

Nach einer Hypothese bindet sich die Fremd-DNA demnach an das 30-35 kDa DNA-Bindungsprotein (DBP) auf der Spermienoberfläche, wenn eine solche Interaktion nicht durch die Anwesenheit von IF-1 verhindert wird. Diese Bindung muss durch die Expression von MHC II während eines bisher unidentifizierten Zeitpunktes der Spermatogenese signalisiert werden. Die Internalisierung der DNA wird innerhalb von Minuten durch CD4-Moleküle auf der Spermienmembran vermittelt. Der DNA-DBP-CD4-Komplex wird aufgenommen und erreicht die Kernmatrix, wo die DNA dissoziiert (*Gandolfi, 2000*). Allerdings scheint die Internalisierung von exogener DNA über einem bestimmten Grenzwert (10-30 ng/10<sup>6</sup> Spermien) die Aktivierung von endogenen Nukleasen zu stimulieren und damit die Apoptose des Spermiums auszulösen (*Maione et al., 1997; Magnano et al., 1998*). Diese Reaktion scheint jedoch nur in Nebenhodenschwanzspermien ausgelöst zu werden. In ejakulierte Spermien aufgenommene DNA wird mit der genomischen DNA des Spermiums rekombiniert. Die Integration exogener DNA findet an unabhängigen Stellen des Genoms statt, jedoch wird die integrierte DNA durch Topoisomerase II Consensus Sequenzen flankiert (*Zoraqui und Spadafora, 1997*). Zu bemerken ist noch, dass *Sciamanna et al. (2000)* einen Dosisabhängigen toxischen Effekt auf Embryonen durch die exogene DNA feststellen konnten.

### 1.4.2. Transfektion von Spermien durch Inkubation in DNA-haltigen Medien und SMGT (Transfektion von nackter DNA)

Beim Gentransfer in Spermien durch Inkubation in DNA-haltigen Medien werden die Spermien vom Seminalplasma befreit, in adäquatem Medium resuspendiert und mit DNA inkubiert. Die dadurch mit DNA beladenen Spermien werden für die *in vitro*-Fertilisation (IVF) oder die künstliche Besamung (AI) verwendet.

*Brackett et al. (1971)* inkubierten 1 µg isolierte, [<sup>3</sup>H]Thymidin-markierte SV40-DNA mit 10<sup>6</sup> Spermien. Nach 24-48 h Inkubation enthielten 30-35% der Spermien radioaktives Material. Dieses war vornehmlich in der postakrosomalen Region nachweisbar. In Spermien, die mit vollständigen SV40-Viren inkubiert wurden, konnte kein radioaktives Signal in den Spermien detektiert werden. Weitere Berichte über die Inkubation von Spermien mit nackter DNA sind in der **Tabelle 2** zusammengefasst.

In den letzten Jahren wurde über die Generierung von transgenen Schweinen mittels SMGT berichtet (*Lavitrano et al., 1997, 1999, 2002, 2003; Lazzereschi et al., 2000*). Diese Schweine tragen das Mini-Gen für den „human Decay Accelerating Factor (hDAF)“. hDAF ist mit verantwortlich dafür, dass es nicht zur hyperakuten Abstoßungsreaktion von transgenen Schweineorganen nach Transplantation in nicht-humane Primaten kommt (*Cozzi et al., 2000*). Erst 2005 wurde über die Geburt von dreifach transgenen Schweinen berichtet, die durch Inkubation der Spermien mit DNA entstanden (*Webster et al., 2005*).

Ein Nachteil des SMGT bei Inkubation mit DNA-haltigen Medien ist, dass diese Methode individuell unterschiedlich effizient ist. So konnten bei der Generierung der hDAF-transgenen Schweine nur zwei von 20 getesteten Ebern als Spermiodonoren verwendet werden (*Lavitrano et al., 2002*). Zusätzlich variiert der Anteil der transgenen F<sub>0</sub>-Tiere stark von Versuch zu Versuch (*Maione et al., 1998; Lavitrano et al., 2003*).

**Tabelle 2:** Erfolge des SMGT nach Inkubation von Spermien mit nackter DNA unter Berücksichtigung der Spezies, des DNA-Konstruktes und der Art der Spermien (ES: ejakulierte Spermien, NHS: Nebenhodenschwanzspermien, DNA/10<sup>6</sup> Spermien bezieht sich auf die Menge der eingesetzten DNA, Transgene [%]: prozentualer Anteil transgener Tiere).

Spezies	ES/ NHS	Plasmid	DNA/ Spermien	10 <sup>6</sup>	DNA- Nachweis	Methode	Transgene [%]	Quelle
Maus	NHS	pSV <sub>2</sub> CAT	10-20 µg/ml	Spermien	FISH	?	<i>McCarthy und Ward, 2000</i>	
Maus	NHS	pSV <sub>2</sub> CAT	0,5 µg	Embryo	Southern Blot	7,4 %	<i>Maione et al., 1998</i>	
Maus	NHS	pSV <sub>2</sub> CAT	0,2-2 µg	F <sub>0</sub>	Southern Blot, CAT-Assay	~30 % (F <sub>0</sub> )	<i>Lavitrano et al., 1989</i>	
Maus	NHS	pCMVhGH/ pVLCN <sub>h</sub> GH	1-500 ng	F <sub>0</sub>	Southern Blot	2,3-41,4 %	<i>Sciamaana et al., 2000</i>	
Schwein	ES	pCMVhGH/ pVLCN <sub>h</sub> GH	50-1000 ng	F <sub>0</sub>	Southern Blot	66 %	<i>Sciamaana et al., 2000</i>	
Schwein	ES	pEBFP-C1/ C2/ pDsRed2- C1	40 ng	F <sub>0</sub>	RT-PCR	up to 43% tripple transgenic	<i>Webster et al., 2005</i>	
Schwein	ES/ NHS	β-LG Plasmid	1-500 ng	Spermien	Southern Blot	?	<i>Maione et al., 1997</i>	
Schwein	ES	λ- Bakteriophage / p(RSV-bGH)	1 µg	Spermien	Autoradio- graphie, <i>in situ</i> - Hybridisierung	30 %	<i>Horan et al., 1991</i>	

Spezies	ES/ NHS	Plasmid	DNA/ 10 <sup>6</sup> Sper- mien	DNA- Nachweis	Methode	Transgene [%]	Quelle
Schwein	ES	pSV <sub>2</sub> CAT	0,3-0,5 µg	Spermien	PCR, Southern Blot	12-17,1 %	<i>Gandolfi et al., 1996</i>
Schwein	ES	pRSVhDAF	0,4 µg	F <sub>1</sub>	PCR, Southern Blot, RT-PCR, Northern Blot	40 %	<i>Lazzereschi et al., 2000; Lavitrano et al., 2003</i>
Schwein	ES	pSV <sub>2</sub> CAT/pRSV-LT/pBR322/HBs7	400 ng	F <sub>0</sub>	PCR, Southern Blot	6,1 %	<i>Sperandio et al., 1996</i>
Kaninchen	ES	SV40-DNA	0,1-1 µg	Zweizell- Stadium	Zytopathische Effekte	39,1 %	<i>Brackett et al., 1971</i>
Kaninchen	ES	pRK3lacZ	10 <sup>4</sup> -10 <sup>8</sup> cpm	F <sub>0</sub>	PCR	~ 65,3 %	<i>Kuznetsov et al., 2000</i>
Goldhamster/ Mensch	NHS/ ES	pCMXoGH	3,75 ng/ 15 ng/ 750 ng	Oozyten	Slot Blot, PCR	?	<i>Fernandez et al., 1999</i>
Mensch	ES	HPV-DNA	50 µg	Blastozyste	PCR	?	<i>Chan et al., 1995</i>
Krallenfrosch	ES	pAPrC	0,1 µg	F <sub>1</sub>	PCR, Southern Blot	15-20 %	<i>Jonak, 2000</i>
Zebrafisch	ES	pUSVCAT	u. ?	F <sub>2</sub>	Southern Blot	?	<i>Khoo, 2000</i>

weitere

Spezies	ES/ NHS	Plasmid	DNA/ 10 <sup>6</sup> Sper- mien	DNA- Nachweis	Methode	Transgene [%]	Quelle
Karpfen	ES	?	~ 5 pg	Spermien	Messung der Radioaktivität	7,6-10 %	Castro et al., 1990
Huhn	ES	?	~ 20 pg	Spermien	Messung der Radioaktivität	1,5-3 %	Castro et al., 1990
Huhn	ES	pβact-Luc	0,1 µg	Embryo	PCR	47 %	Nakanishi und Iritani, 1993
Rind	ES	?	~ 50 pg	Spermien	Messung der Radioaktivität	7,2-25 %	Castro et al., 1990
Rind	ES	pSV2-cat / lacZ	RSV- 0,5 µg	F <sub>1</sub>	PCR, Southern Blot	2,4 %	Schellander et al., 1995
Rind	ES	pSV2CAT/ LT/ pBR322/ HBs7	400 ng	Blastozyste	PCR, Southern Blot	0,4-22 %	Sperandio et al., 1996
Wasser- büffel	ES	?	~50 pg	Spermien	Radioaktivität	0,07-0,1 %	Castro et al., 1990
Schaf	ES	?	~5 pg	Spermien	Radioaktivität	0,2-0,3 %	Castro et al., 1990
Ziege	ES	?	~5 pg	Spermien	Radioaktivität	6,4-10 %	Castro et al., 1990

### 1.4.3. Transfektion von Spermien mittels Elektroporation und SMGT

Bei der Elektroporation werden Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld hoher Spannung ausgesetzt. Es bilden sich Poren in der Zellmembran, durch die in der Lösung enthaltene Makromoleküle frei diffundieren können. Die Poren in der Zellmembran schließen sich nach einiger Zeit wieder (*Günzburg und Salmons, 1997*). Die Porengröße kann durch Veränderungen in der Pulslänge (Millisekunden), der Feldstärke (Volt/cm) und der Ionenstärke des Mediums variiert werden (*Tsong, 1983*).

Es wurden einige Berichte über die erfolgreiche Elektroporation von Spermien publiziert (s. **Tabelle 3**). Besonders erfolgreich scheint die Elektroporation bei Fischen zu sein (*Tsai et al., 1997; Sin et al., 2000; Tsai, 2000*). Im Gegensatz dazu wird von Untersuchungen mit elektroporierten Rinderspermien berichtet, dass die Motilität sowie die Befruchtungsrates und die Entwicklungsrate nach Elektroporation reduziert sind (*Rieth et al., 2000; Gagné et al., 1991*). Bei Hühnerspermien konnte eine Verringerung der Befruchtungsrates nach Elektroporation ohne Reduzierung der Motilität beobachtet werden (*Nakanishi und Iritani, 1993*). Durch DNase I-Verdau nach Elektroporation wurde der Hauptteil der Spermien-assoziierten DNA aus der Lösung entfernt, eine Erklärung könnte der vorzeitige Verlust des Akrosoms durch die Elektroporation sein.

**Tabelle 3:** Erfolge des SMGT nach Transfektion von Spermien durch Elektroporation unter Berücksichtigung der Spezies, des DNA-Konstrukts und der Art der Spermien (ES: ejakulierte Spermien, NHS: Nebenhodenschwanzspermien).

Spezies	ES/ NHS	Plasmid	DNA/ 10 <sup>6</sup> Sper- mien	DNA- Nachweis	Methode	Transgene [%]	Quelle
Rind	ES	pRGRH527	0,1 µg	Embryo	PCR	12-22 %	<i>Gagné et al., 1997</i>
Rind	ES	PstI β-actin GFP- Konstrukt	0,1 µg	Embryo	PCR	3,5 %	<i>Rieth et al., 2000</i>
Huhn	ES	pβact-Luc	0,1 µg	Embryo	PCR	23 %	<i>Nakanishi und Iritani, 1993</i>
Abalone (Seeohr)	ES	opAFP- 2000CAT	0,1-3,2µg	Larve	PCR, Dot blot Hybridisierung, Southern Blot, CAT-Assay	~25 %	<i>Tsai et al., 1997</i>
Lachs	ES	pRSVlacZ/ pSV2CAT	10-200µg/ml	Embryo	PCR	20-30 %	<i>reviewed in Sin et al., 2000</i>

### 1.4.4. Transfektion von Spermien mittels kationischer Lipide und SMGT

Die Verwendung kationischer Lipide (Lipofektion) für den Transfer von exogener DNA in Zellen gehört zu den Standardtechniken des DNA-Transfers (*Felgner et al., 1987*). Die positiv geladene Kopfgruppe der kationischen Lipide vermittelt die Bindung der negativ geladenen DNA an die Lipide. Es bilden sich DNA/Lipid-Komplexe, in denen die DNA kondensiert vorliegt. Durch Interaktion der Komplexe mit der Zellmembran wird die nicht-spezifische Endozytose stimuliert. Zu einem bestimmten Zeitpunkt dringt die DNA, wahrscheinlich durch Destabilisierung der Endosomenmembran, in das Zytoplasma ein (*Zhou und Huang, 1994; Wrobel und Collins, 1995; Friend et al., 1996; Gershon et al., 1993; Felgner et al., 1987; Legendre und Szoka, 1992; Farhood et al., 1995*).

Das erste kationische Lipid, welches für Gentransferexperimente verwendet wurde, war DOTMA (1,2-Diolyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid; *Felgner et al., 1987*). Um die maximale Transfektionseffizienz durch kationische Lipide zu erreichen, wird ein Ladungsverhältnis Lipide zu DNA mit einem Wert größer 1 angestrebt. Dadurch soll die DNA besonders kompakt werden und damit die Voraussetzungen für den Eintritt in die Zelle und den optimalen Transfer geschaffen werden (*Gershon et al., 1993*). Im Vergleich zum viralen Gentransfer ist die Verwendung von kationischen Lipiden einfacher und weniger toxisch und ermöglicht den Transfer von großen DNA-Fragmenten (*Gao und Huang, 1995*).

Nachteil dieser Technik ist der mangelhafte Transfer des Komplexes vom perinukleären Bereich zum Kern und die geringe Dissoziation des Komplexes für die Transkription im Nukleus (*Zabner et al., 1995*).

Einige der veröffentlichten Berichte über den Spermien-vermittelten Gentransfer mittels kationischer Lipide sind in **Tabelle 4** zusammengefasst. *Shemesh et al. (2000)* berichten, dass unter Verwendung von kationischen Lipiden vier Kälber generiert wurden, die das eGFP-Gen trugen. Neben der Lipofektion wurde hier auch die „restriction enzyme mediated integration (REMI)“ angewendet. Bei dieser Technik wird das Transgen durch ein Restriktionsenzym linearisiert und dieses Restriktionsenzym zusammen mit dem Transgen in die Zielzelle eingebracht. Es wird angenommen, dass das Restriktionsenzym die genomische DNA schneidet und es der exogenen DNA so ermöglicht sich zu integrieren (*Kuspa und Loomis, 1996; Kroll und Amaya, 1996*).



**Tabelle 4:** Erfolge des SMGT nach Transfektion von Spermien durch kationische Lipide unter Berücksichtigung der Spezies, des DNA-Konstruktes und der Art der Spermien (ES: ejakulierte Spermien, NHS: Nebenhodenschwanzspermien).

Spezies	ES/ NHS	Plasmid	DNA/ 10 <sup>6</sup> Spermien	DNA- Nachweis	Methode	Transgene [%]	Quelle
Kaninchen	ES	poMT-	2-4 µg	F <sub>0</sub>	PCR, Southern	8,4 %	<i>Wang et al.,</i>
		PGH-GFP			Blot, Fluoreszenz Mikroskopie		<i>2001</i>
Rind	ES	pEGFP	?	F <sub>0</sub>	Flow Cytometry, PCR, RT-PCR, Southern Blot	100 %	<i>Shemesh et</i> <i>al., 2000</i>
Huhn	ES	pEGFP	?	F <sub>0</sub>	Flow Cytometry, PCR, RT-PCR, Southern Blot	83-90 %	<i>Shemesh et</i> <i>al., 2000</i>
Schwein	ES	pd2 EGFP-	1 µg	Embryo	Fluoreszenz	29,4 %	<i>Lai et al.,</i>
		N1			Mikroskopie		<i>2001</i>
Maus	NHS	diverse	0,2-1 µg	F <sub>0</sub>	Konfokale Mikroskopie	0 %	<i>Bachiller et</i> <i>al., 1991</i>
Huhn	ES	pβact-Luc	0,1 µg	Embryo	PCR	67 %	<i>Nakanishi</i> <i>und Iritani,</i> <i>1993</i>

### 1.4.5. Transfektion von Spermien mittels Liposomen und SMGT

Liposomen sind künstliche Membranvesikel, die sich spontan in wässriger Lösung aus Lipidmolekülen bilden können und so Makromoleküle umschließen. Diese Moleküle lassen sich durch Fusion mit der Zellmembran in Zielzellen einschleusen (*Günzburg und Salmons, 1997*).

Die Interaktion zwischen Spermien und Liposomen beruht auf passiver Zielfindung: Durch die elektrostatische Anziehung zwischen den polaren Kopfgruppen und Interaktionen der Phospholipide der gegenüberliegenden Membranen kann es zur Fusion kommen (*Garrett et al., 1999*). Wurden spezielle Phospholipide mit Hilfe von Liposomen in die Membranen von Bockspermien eingebracht, so konnte die Spermienaktivität verändert und die Penetrationsrate gesteigert werden (*Graham et al., 1991*). Es konnte nachgewiesen werden, dass Säugetierspermien in der Lage sind, nach der Akrosomenreaktion mit Liposomen zu fusionieren (*Arts et al., 1993*) und auf diesem Weg Fremd-DNA aufzunehmen (*Rottmann et al., 1992*).

Bei Untersuchung des Effektes der einzelnen Lipide auf die Menge der eingeschlossenen DNA konnte ein positiver Effekt bei Verwendung von Lipiden mit Fettsäuren einer Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen festgestellt werden. Zudem nahm mit steigender Lipidkonzentration auch die DNA-Konzentration zu (*Nikolau et al., 1987; Squires und Drake, 1993*), dies hatte jedoch einen negativen Effekt auf die Transferrate in die Spermien und die Befruchtungsfähigkeit der Spermien. *Squires und Drake (1993)* fanden in einer umfassenden Studie heraus, dass Liposomen zusammengesetzt aus DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin) in Kombination mit Lysophosphatidylcholin und Stearylamin optimal für den Gentransfer von DNA in Hühnerspermien sind. Diese Liposomen zeichnen sich durch hohe Verpackungsraten (> 40 %) und Transferraten (> 40 %) der DNA sowie eine hohe Fertilität der Spermien (> 80 %) aus.

1992 wurde über die Generierung von transgenen Hühnerembryonen berichtet, die Effizienz variierte hier jedoch zwischen 0 und 92 %, ohne dass der Nachweis für die Integration des Transgenes in das Genom erbracht wurde (*Rottmann et al., 1992*).

### 1.4.6. Transfektion von Spermien mittels viraler Vektoren und SMGT

Beim Gentransfer mittels viraler Vektoren wird die Fähigkeit von Viren genutzt, ihr Genom in die Zielzelle einzubringen und sich auf diesem Wege zu vermehren. Hierfür werden vornehmlich Retroviren oder Adenoviren genetisch verändert, mit den Zielzellen inkubiert und so die Zellen transfiziert.

Da Spermien ausdifferenziert sind und sich nicht teilen, ist die Anwendung der meisten Gentransfermethoden nicht möglich. Replikations-defiziente Adenoviren hingegen wurden schon bei einigen nicht replizierenden Säugetierzellen mit Erfolg für den Transfer von Fremdgenen verwendet (*Gómez-Foix et al., 1992; Lemarchand et al., 1992; Kirshenbaum et al., 1993; LaSalle et al., 1993*). Mit ihrer Hilfe können DNA-Fragmente bis zu 7,5 kb Länge übertragen werden (*Becker et al., 1994*). Nachteilig ist, dass ihre DNA nicht integriert wird, sondern episomal bleibt (*Wivel et al., 1999*).

Mit Hilfe des Replikations-defizienten, rekombinanten Adenovirus Ad-CMV- $\beta$ Gal, der das *E. coli lacZ* Reportergen unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors trägt, wurden Eberspermien transfiziert. Bei  $47\% \pm 4\%$  der Spermien konnte das Fremdgen im Kopfbereich nachgewiesen werden. Jedoch verursachte das Virus eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Spermien und eine Steigerung der Akrosomveränderungen. Nach künstlicher Befruchtung wurden 56 Ferkel geboren, von denen 4 positiv für das Transgen waren, jedoch konnte keine Proteinexpression nachgewiesen werden. Zwei der transgenen Ferkel waren Totgeburten (*Farre et al., 1999*).

### 1.4.7. Transfektion von Spermien mittels Virosomen und SMGT

Wie bereits unter 1.3 erläutert, sind Virosomen fusogene Lipidvesikel, in deren Membran virale Glykoproteine eingebaut sind.

Bei Inkubation von Bullenspermien mit Fluoreszenz-markiertem Sendaivirus konnten ähnliche Fusionsraten wie bei Inkubation des gleichen Virus mit humanen Erythrozyten-Ghosts (HEGs) oder Zellkulturzellen gemessen werden. Jedoch waren die Spermien nach der Inkubation nicht mehr motil. Als Ursache hierfür wurde eine reduzierte Vitalität der Spermien diskutiert (*Nussbaum und Loyter, 1995; Nussbaum et al., 1993*). Ähnliches wurde nach Fusion mit Sendaivirosomen beobachtet (*Nussbaum und Loyter, 1995; Markgraf et al., 2001*).

Wurden die Spermien mit Influenzavirosomen, die unter Zugabe von exogenen (nicht-viralen) Lipiden rekonstituiert worden waren, inkubiert, so konnte keine Reduktion der Vitalität bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils fusionierter Spermien beobachtet werden (*Markgraf et al., 2001*).

Die Fusion von Influenza Virus und Semliki Forest Virus mit Bullenspermien konnte ebenfalls mit Hilfe von Fluoreszenz-dequenching-Assays nachgewiesen werden (*Nussbaum et al., 1993*).

### 1.4.8. Weitere Spermien-vermittelte Gentransfermethoden

#### **Linker-based sperm-mediated gene transfer**

Bei dieser Methode wird DNA an Antikörper gebunden, die gegen Spermien gerichtet sind. Es kommt zur Bindung der Antikörper an die Spermien und zum Transfer der DNA in die Eizellen. Mithilfe dieser Methode konnten transgene Schweine generiert werden, wobei 37,5% der F1-Generation das Fremdgen trugen. Vorteilhaft scheinen eine hohe Keimzell-Transmissionsrate, die Insertion der DNA an mehreren Stellen und die Insertion von mehreren Kopien an einer Stelle, wie sie beobachtet wurden, zu sein (*Chang et al., 2002*).

#### **Intrazytoplasmatische Injektion transgener Spermien**

Diese Technik wurde erstmals von *Perry et al. (1999)* angewendet. Hierbei werden die Membranen von Spermien durch Gefrier/Tau-Zyklen oder Detergens-Behandlung zerstört. Es folgt die Inkubation mit DNA und die Injektion der Spermien in Eizellen. Intrazytoplasmatische Spermien Injektion (ICSI) wurde erfolgreich bei Menschen, Kaninchen, Schafen, Rindern, Pferden und Mäusen angewendet um lebenden Nachwuchs zu erzeugen. (*Martin, 2000*).

*Chan et al. (2000)* verwendeten Fluoreszenz-markierte DNA, die für GFP codierte. Die Spermien von Rhesusaffen wurden mit der DNA inkubiert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht, wobei die DNA im Bereich des Kopfes der Spermien nachgewiesen werden konnte. Im 4-Zellstadium der Embryonen wurde GFP-Expression beobachtet; das Transgen konnte jedoch bei den drei geborenen Nachkommen nicht nachgewiesen werden.

Von sieben Embryotransfers konnten drei Trächtigkeiten etabliert werden. Dabei wurde ein gesundes, männliches Tier geboren, und ein Paar anatomisch korrekter Zwillinge kam am Tag 35 der Trächtigkeit tot zur Welt. In allen drei Fällen war das Transgen nicht nachweisbar (*Chan et al., 2000*).

### **Testes-mediated Genetransfer (TMGT)**

Beim TMGT wird die Fremd-DNA direkt in den Hoden injiziert, um auf diese Weise die testikulären Keimzellen zu transfizieren und so transgene Tiere zu generieren (*Sato et al., 2002*).

Nach Injektion von DNA/Liposomen-Komplexen in die Hoden von adulten Mäusen und anschließender Verpaarung konnte gezeigt werden, dass mit einer Effizienz von 50-100% das Transgen in den F<sub>0</sub>-Feten nachgewiesen werden konnte, die Fremd-DNA eine Mosaikverteilung in den fetalen Geweben aufwies, da weniger als eine Kopie des Transgens pro diploider Zelle vorhanden war (*Sato et al., 1999a*) und die Fremd-DNA zumindest in die F<sub>1</sub>-Generation weitergegeben wurde (*Sato et al., 1999b*). Allerdings war die Expression der DNA nur in F<sub>0</sub>-Blastozysten nachweisbar (*Ogawa et al., 1995; Sato et al., 1999 a, b*). Andere Arbeitsgruppen hingegen berichten von der Generierung transgener F<sub>1</sub>-Tiere, konnten das Transgen aber in der F<sub>2</sub>-Generation nicht mehr nachweisen (*Celebi et al., 2002*).

## **1.5. Herstellung und Nutzen transgener Tiere**

Der erste Bericht über den Transfer von Fremd-DNA in landwirtschaftliche Nutztiere wurde 1985 durch *Hammer et al.* bei Schafen, Schweinen und Kaninchen publiziert. Die Anwendungsmöglichkeiten solcher Tiere im landwirtschaftlichen Sektor sind weit gestreut, die Hauptrichtungen sind jedoch:

1. Verbesserung des Wachstums, der Tagesgewichtszunahme und der Schlachtkörperzusammensetzung (*Wagner et al., 1984*).
2. Verbesserung der Milchproduktionsleistung und Veränderung der Proteinzusammensetzung der Milch durch Einführung von zusätzlichen Kopien vorhandener Gene, Transfer von Milchproteinen einer anderen Spezies oder Transfer modifizierter Gene (*Wilmut et al., 1990*).

## 1. Einführung

---

3. Übertragung von Resistenzen gegen Infektionskrankheiten oder Parasiten, z. B. durch Übertragung von Immunglobulin-Genen gegen spezifische Antigene (*Pursel et al., 1989*).
4. Steigerung der Reproduktionsrate durch Übertragung von Genen wie dem Booroola-Gen der Booroola Schafe auf andere Schafrassen, durch das die Ovulationsrate gesteigert wird (*Davis et al., 1982*).
5. Manipulation der Pansenmikroben, sodass z. B. im Futter enthaltene Rohfasern besser verwertet werden können (*Wagner et al., 1984*).
6. Veränderung des Stoffwechsels durch Einführung von Genen, die neue Stoffwechselwege ermöglichen oder vorhandene, aber mutierte, reparieren (*Ward et al., 1986*).

Des Weiteren bietet die Übertragung von Fremdgenen auch die Möglichkeit, diese Tiere als Organendonoren für Menschen oder als Bioreaktoren für die Produktion von Pharmazeutika zu nutzen (*Edwards et al., 2003*).

Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen als Pharmazeutika stehen verschiedene Körperflüssigkeiten als Sekretionsort zur Verfügung. Angedacht bzw. teilweise erfolgreich durchgeführt wurden Versuche mit:

- a) Serum, wobei viele Proteine in Anwesenheit von Serum nicht stabil sind und die Proteine im Serum die Gesundheit der Tiere negativ beeinflussen könnten.
- b) Urin wird heute bereits verwendet, um Proteine für die Pharmaindustrie zu produzieren (z. B. Gonadotropine).
- c) Seminalplasma ist in einigen Spezies in großen Mengen vorhanden und kann leicht gewonnen werden. In Mäusen wurde diese Methode bereits erfolgreich angewandt (*Dyck et al., 1999*).
- d) Hühnereiweiß ist in großen Mengen vorhanden und proteinreich, weswegen erwartet wird, dass es sich gut für die Gewinnung rekombinanter Proteine eignet.
- e) Der Kokon der Seidenraupe (*Houdebine, 2000*).
- f) Die Milchdrüse ist ein natürlicher Synthesort großer Proteinmengen, wobei die Gewinnung der Proteine für die Tiere stressfrei ist und durch die selektive Expression des Proteins in der Milchdrüse das Tier weitgehend vor unvorhergesehenen Nebeneffekten geschützt ist. Zusätzlich verringert die Isolierung der Proteine aus der Milch die Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen mit infektiösen Agentien wie HIV oder anderen Viren (*Wilmot et al., 1991*).

Es wurden zwei Hauptfaktoren identifiziert, die Einfluss auf die Produktion von Proteinen in der Milch haben können: die genetische Kontrolle der Expression von Milchprotein-Genen

und die Fähigkeit der Milchdrüse zu den notwendigen posttranslationalen Modifikationen (Wilmot *et al.*, 1991).

Bislang wurden mehr als 50 Proteine in der Milch von transgenen Kaninchen (Buhler *et al.*, 1990; Riego *et al.*, 1993), Ziegen (Denman *et al.*, 1991; Ebert *et al.*, 1991), Schafen (Clark *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1991), Schweinen (Wall *et al.*, 1991) und Milchkühen exprimiert (Zusammenfassung **Tabelle 5**). Im Jahr 1996 wurden Phase I-klinische Studien erfolgreich mit transgenen Ziegen beendet. Die Tiere exprimierten humanes Antithrombin III in der Milch, die Phase II Studien schlossen sich in den USA an. In Großbritannien befindet sich im Moment  $\alpha$ 1-Antitrypsin in Phase I-Studien. Humanes Lactoferrin und Fibrinogen, exprimiert in der Milchdrüse, sind in den letzten Stadien der präklinischen Evaluierung (Meade *et al.*, 1999).

Das Problem bei der Generierung transgener Nutztiere ist die geringe Effizienz. Der Anteil lebend geborener Nachkommen, die positiv für das Transgen sind (Transformationseffizienz), liegt für Rinder bei ungefähr 2,6% oder weniger, bei Schweinen bei 4,0% und bei Schafen bei 4,5% (Pursel und Rexroad, 1993). Sie ist bei Rindern bedingt durch die lange Trächtigkeit, die geringe Anzahl von Nachkommen pro Trächtigkeit und das dadurch verursachte lange Generationsintervall (Wall, 1994).

## 1. Einführung

**Tabelle 5:** Übersicht bisher veröffentlichter Versuche, Nutztiere zu generieren, die pharmazeutisch interessante Proteine in der Milch exprimieren.

<b>Protein</b>	<b>Tierart</b>	<b>Quellen</b>	<b>Menge</b>
humaner Faktor IX	Schaf	<i>Clark et al., 1989</i>	5µg/ml
humanes $\alpha$ -Antitrypsin	Schaf	<i>Wright et al., 1991</i>	35 mg/ml
humanes Protein C	Schwein	<i>Velander et al., 1992</i>	1mg/ml
humaner Faktor VIII	Schaf	<i>Halter et al., 1993</i>	-
humanes Wachstumshormon	Ziege	<i>Archer et al., 1994</i>	12 ng/ml
humaner, langwirksamer Tissue-type Plasminogenactivator (tPA)	Ziege	<i>Ebert et al., 1994</i>	3,5-8,0 mg/ml
humanes Wachstumshormon (hGH)	Kaninchen	<i>Limonta et al, 1995</i>	~ 10 ng/ml
humanes Fibrinogen	Schaf	<i>Carver, 1996</i>	5 mg/ml
humaner Faktor VIII	Schwein	<i>Paleyanda et al., 1997</i>	-
humaner Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (hG-CSF)	Ziege	<i>Ko et al., 2000</i>	50µg/ml
humanes Lactoferrin	Rind	<i>van Beerke et al., 2002</i>	2mg/ml
$\kappa$ -Kaseinprotein	Rind	<i>Brophy et al. (2003)</i>	8,4-10,1 mg/ml
humanen $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor	Ziege	<i>Genzyme Transgenics Corp.</i>	20mg/ml
humanes Antithrombin III	Ziege		20 mg/ml
Kolonkrebs mAb	Ziege		10 mg/ml