

## 5. Diskussion

Die Generierung von transgenen Nutztieren ist von großem wissenschaftlichen, wie auch kommerziellen Interesse. So könnten transgene Nutztiere unter anderem als Krankheitsmodelle bei denen die Ausprägung der Krankheit die Lebensspanne von Mäusen übersteigt, oder auch als Quellen für neue Pharmaka oder Organendonoren für Xenotransplantationen dienen (Niemann *et al.*, 2005). Ein beeindruckendes Beispiel für die kommerzielle Nutzung dieser Idee ist die Zulassung des Medikamentes ATryn® im Juni 2006. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes, humanes Antithrombin, das aus der Milch von Ziegen gewonnen wird. Es ist zur Behandlung von Patienten mit einem erblichen Mangel an Antithrombin III bei operativen Eingriffen zugelassen. Für weitere Anwendungen ist die Zulassung beantragt (<http://www.gtc-bio.com/products/atryn.html>).

Zur Herstellung von transgenen Tieren werden heute hauptsächlich drei Methoden angewandt: Zum einen nutzt man die Mikroinjektion von Fremd-DNA in die Vorkerne von befruchteten Eizellen, zum anderen den Transfer von Zellkernen genetisch modifizierter embryonaler oder somatischer Donorzellen. Weiterhin verwendet man virus-basierte Konstrukte als Vektoren für die Einbringung von exogener DNA in Embryonen (Kues & Niemann, 2004). Ein limitierender Faktor bei Nutztieren ist, dass unter Verwendung der Mikroinjektionstechnologie lediglich etwa 2,6% der lebend geborenen Kälber das Transgen tragen (Pursel & Rexroad, 1993). Zudem konnten bis heute keine „wahren“ embryonalen Stammzellen bei Nutztieren isoliert werden (Niemann *et al.*, 2005). Und auch bei Verwendung von Retroviren als Überträger für Fremd-DNA gibt es deutliche Sicherheitsbedenken (Lavitrano *et al.*, 2006).

Um diese Probleme zu überwinden, ist es das Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, mit deren Hilfe Fremdgene reproduzierbar in das Genom von Nutztieren transferiert werden können. Als Grundlage dienen uns hierbei die Arbeiten über den Spermien vermittelten Gentransfer der Arbeitsgruppe um Lavitrano *et al.* (siehe für eine Übersicht: Gandolfi, 1998). Lavitrano und Kollegen zeigten 1989, dass Nebenhodenschwanzspermien von Mäusen in der Lage sind, Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, und dass die transgenen Tiere in der Lage sind, das Fremdgen an ihre Nachkommen weiterzugeben (Lavitrano *et al.*, 1989). Jedoch kann bei Verwendung von Nebenhodenschwanzspermien jeder Donor nur einmal verwendet werden, zudem ist die Aufnahme der Fremd-DNA abhängig vom Individuum (Lavitrano *et al.*, 2003, 2006). Um diese Nachteile zu umgehen, haben wir uns

entschlossen, kryokonservierte, kommerziell erhältliche Bullenspermien zu verwenden, die wir mit Virosomen fusionieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Viren in der Lage sind, mit kryokonservierten Bullenspermien zu fusionieren (*Nussbaum et al.*, 1993). Auch konnte gezeigt werden, dass Gleiches für die aus diesen Viren entstandenen Virosomen gilt (*Nussbaum und Loyter*, 1995). Bei der Inkubation von Sendaivirosomen mit Spermien fällt auf, dass diese ihren Inhalt in die Spermien abgeben können, aber zu einem Absterben der Spermien nach der Fusion führen (*Nussbaum und Loyter*, 1995). Es konnte auch gezeigt werden, dass Influenzavirosomen in der Lage sind, mit Spermien zu fusionieren und dass ihre Fusionseigenschaften abhängig sind von der Lipidzusammensetzung ihrer Membran (*Markgraf et al.*, 2001). Neben der Überwindung der individuellen Hindernisse beim Transfer von Fremd-DNA in die Spermien ist es das Ziel dieser Arbeit, die Faktoren, die die Fusionseigenschaft und die Funktionalität der Virosomen beeinflussen, für den Spermien vermittelten Gentransfer zu optimieren und zu charakterisieren. Hierzu werden verschiedene Methoden angewandt, die im Hinblick auf eine kommerzielle Nutzung zu einem Charakterisierungsprotokoll zusammengesetzt werden sollen.

### **Einfluss des Elternvirus auf die Virosomen**

Um möglichst effiziente Virosomen generieren zu können, haben wir verschiedene Viren getestet, die durch ihre Rezeptorspezifität in der Lage sind an Spermien zu binden. Hierfür haben wir Sendaiviren gewählt, die an Neuraminsäurereste binden und direkt mit der Zellmembran fusionieren (*White et al.*, 1985). Als zweites Virus wurden Influenza A Viren genutzt. Bei diesen Orthomyxoviren handelt es sich um einen Laborstamm (X-31), der ebenfalls an Neuraminsäurereste bindet, aber für die die Fusion mit der Zielmembran einen Umgebungs-pH von 5 benötigt (*Huang et al.*, 2003). Beiden Virosomenpräparationen wurde die gleiche Menge virales Protein, exogenes Lipid und Reporter-DNA zugesetzt und die Extraktion des Detergens wurde identisch und parallel durchgeführt.

Die Wiederfindungsrate in den Virosomen ist unterschiedlich (s. **Tabelle 8**). In den Influenzavirosomen werden weniger Membranprotein und weniger Lipid wiedergefunden. Lediglich im DNA-Gehalt übertreffen die Influenzavirosomen mit 21,5 µg (35,8% des eingesetzten Plasmids) vor DNase-Verdau die Sendaivirosomen. Nachdem beide Virosomenpräparationen mit DNase verdaut worden sind, ist der DNA-Gehalt gleich. Dies könnte die Ursache darin haben, dass das verwendete Herstellungsprotokoll ursprünglich für Sendaivirosomen optimiert wurde (*Ponimaskin et al.*, 2000; *Bareesel*, 1997).

Nach der Inkubation der kryokonservierten Bullenspermien mit Sendaivirosomen lebten noch 19,8 % der Spermien, während es bei den Influenzavirosomen immerhin noch 36,9 % lebende Spermien sind (s. **Tabelle 8**). Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der beschrieben wird, dass Sendaivirosomen zwar die Fähigkeit besitzen, mit Bullenspermien zu fusionieren, aber bei diesen zum Zelltod führen (*Nussbaum et al., 1995; Markgraf et al., 2001*). *Nussbaum und Loyter (1995)* zeigen zudem, dass die Fusion der Sendaivirosomen mit den Spermien verantwortlich für die reduzierte Motilität dieser ist, da sie nach Inaktivierung der Proteine durch DTT, Glutaraldehyd oder Trypsinierung keine reduzierte Motilität beobachten können. Wir konnten keine lebenden, fusionierten Spermien finden, aber lediglich 2,2 % der toten Spermien sind mit den Sendaivirosomen fusioniert. 34,9% der lebenden Spermien weisen gebundene Virosomen auf.

### **Abhängigkeit der Fusion der Virosomen mit den Spermien von der Anwesenheit des Influenzahämagglutinins**

Zur Absicherung, dass die Fusion mit den Influenzavirosomen kein Artefakt durch Übertritt von fluoreszenzmarkierten Lipiden auf die Spermien ist, wurden verschiedene Präparationen durchgeführt, bei denen den Virosomen keine Proteine zugesetzt wurden, bzw. die Proteine vor Zugabe zu den Spermien deaktiviert wurden, letzteres geschah durch Ansäuerung der Virosomen, was die nicht reversible Konformationsänderung des Influenza-HA auslöst. Durch Verdau der Spermien mit Neuraminidase wurde der Rezeptor für das Influenza-HA beseitigt.

Nach Inkubation mit den Spermien kann bei allen Varianten, bis auf die Spermienpräparation, die vor Zugabe der Virosomen für drei Stunden mit Neuraminidase behandelt worden ist, ein Anteil der lebenden Spermien von über 40% beobachtet werden. Wenn wir die Spermien vor Zugabe der aktiven Virosomen für drei Stunden mit Neuraminidase behandeln, können nur noch ein Anteil von  $28,5 \pm 8,1$  % lebender Spermien beobachtet werden. Vermutlich kommt diese Reduktion des Anteils der lebenden Spermien durch die Inkubationsdauer der Spermien zustande. So zeigen *Thomas et al. (1997)*, dass bei kryokonservierten Spermien nach drei Stunden die mittlere Motilität von anfänglich zwischen 27-83% der Spermien auf 2-33% der Spermien abfällt.

In der Literatur gibt es Studien, bei denen durch die Transfektion von *in vitro*-kultivierten Sertolizellen und männlichen Keimzellen der Maus mit Lipofectin, Lipofectamin oder Cellfectin nur eine niedrige Menge von Fremd-DNA nachgewiesen werden kann (*Celebi et al., 2002*), während es bei der Inkubation von Spermien von *Ascidia ceratodes* mit  $\text{Ca}^{2+}$ -

beladenen Liposomen, deren Zusammensetzung weitgehend der Zellmembranzusammensetzung der Spermien entspricht, zu einer 7,5fachen Erhöhung der Spermienaktivierung kommt (*Garrett et al., 1999*). Deswegen wurden zunächst Virosomen ohne Zugabe von viralem Protein präpariert, um abzuklären, ob bereits ein Gentransfer mit einfachen Liposomen möglich ist. Bei den hier verwendeten Liposomen kann lediglich ein Anteil von 6,4% der lebenden Spermien beobachtet werden, der eine Färbung der Membran mit fluoreszenz-markierten Lipiden aufweist. Dies legt den Schluss nahe, dass durch die Zugabe von Influenzavirusprotein die Effizienz der Fusion gesteigert werden kann. Dass es trotz der Abwesenheit von Influenzahämagglutinin zu einer Markierung der Zellmembran kommt, könnte durch einen unspezifischen Übertritt von fluoreszenz-markierten Lipiden verursacht sein (*Nussbaum et al., 1987*).

Anschließend wurde bei einer funktionstüchtigen Virosomenpräparation das Fusionsprotein auf unterschiedliche Weise unwirksam gemacht. Diese Denaturierung des Influenzahämagglutinins kann auf unterschiedliche Weise herbeigeführt werden, z. B. durch Chemikalien wie Hydroxylamin oder Glutaraldehyd. Auch für die Inkubation der Hämagglutinin enthaltenden Virosomen bei 85°C oder einem niedrigen pH-Wert konnte nachgewiesen werden, dass dies die Fähigkeit der Vesikel zur Fusion mit den Zielzellen beeinträchtigt (*Sato et al., 1983; Schmidt und Lambrecht, 1985; Lapidot et al., 1987*). Zur Überprüfung, ob die Fusion der Virosomen ähnlichen Gesetzmäßigkeiten folgt, wurden die Virosomen angesäuert. Dies führt zur Konformationsänderung des Influenzahämagglutinins vor Zugabe der Spermien, wodurch die Fusion der beiden gegenüberliegenden Membranen nach Zugabe der Spermien nicht mehr gelingt (*Hughson, 1995*). Im Gegensatz dazu berichten *Lapidot et al. (1987)* jedoch, dass trotz 30minütiger Inkubation bei einem pH-Wert von 6,5 noch 5 % Hämolyse von Human Erythrocyte Ghosts (HEGs) und 11% Dequenching bei Fusion mit HEGs beobachtet werden kann. Fusionieren wir Virosomen, die für 10 min bei pH 5 inkubiert worden sind, mit Spermien, kann nur noch ein Anteil von 10,7 % lebender, fusionierter Spermien beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es für die Fusion der Virosomen mit der Spermienmembran notwendig ist, dass das Influenzahämagglutinin die Konformationsänderung durchführt.

Des Weiteren haben wir eine Inkubation der Spermien mit Neuraminidase für 3 h vor Zugabe der Virosomen durchgeführt. Die Neuraminidase spaltet Sialinsäurereste, die als Rezeptor für HA dienen, von den Oberflächen von Zellen ab (*Ada und Jones, 1986; Hirst, 1941*). Wie bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen (*Stegmann et al., 1987; Schoen et al., 1996*) berichtet wurde, kann durch den Verdau der Zielzellen mit Neuraminidase die

Influenzahämagglutinin spezifische Fusion der Viren bzw. Virosomen mit den Zielmembranen nahezu vollständig inhibiert werden. Werden die Spermien nach dem dreistündigen Verdau mit den Virosomen fusioniert, so zeigt sich eine nahezu vollständige Inhibition der Fusion mit den lebenden Spermien, auch der Anteil der gebundenen, lebenden Spermien ist leicht reduziert, von insgesamt 4,8% im Mittel auf 3,3%. Jedoch steigt der Anteil der toten, fusionierten Spermien stark an, von 26,8% auf 68,2% im Mittel. Beim Absterben der Spermien kann es dazu kommen, dass Teile des Akrosoms sich ablösen und es dadurch zu einer Exposition der darin enthaltenen Proteoglykane kommt. Dies würde erklären, weswegen der Anteil der toten, fusionierten Spermien von 26,8% auf 68,2% ansteigt. Zusammengenommen indizieren diese Ergebnisse, dass der von uns beobachtete Übertritt von fluoreszenz-markierten Lipiden auf die Spermien durch die Bindung von Influenzahämagglutinin an Sialinsäurereste auf der Spermienoberfläche und die anschließende Konformationsänderung des Proteins bei der Ansäuerung des Mediums auf pH 5 verursacht wird.

### **Einfluss der Cholesterolmenge auf die Virosomen**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Lipidzusammensetzung der Influenzavirosomen einen entscheidenden Einfluss auf die Motilität der Spermien, die Fusionseffizienz der Virosomen und auf die bevorzugte Region der Fusion besitzt (*Markgraf et al., 2001*). Da besonders Cholesterol eine wichtige Rolle bei der Fusion von Influenzahämagglutinin mit Zielmembranen spielt, sollte getestet werden, ob durch eine Variation der Cholesterolzugabe zu der Virosomenpräparation eine Optimierung der Fusionseigenschaften erreicht werden kann. Die Präparation von Virosomen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zeigt, dass mit Abnahme der exogenen Cholesterolzugabe der Gehalt an Influenzahämagglutinin stetig abnimmt, außer es wurde kein Cholesterol zugegeben. In letzterem Fall steigt der Influenzahämagglutiningehalt über den der Virosomen mit der ursprünglichen Cholesterolzugabe an. Auch die Cholesterol- und Phospholipidgehalte in den Virosomen korrelieren mit der zugegebenen Cholesterolmenge. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des renalen Ceftibuten-Transportsystems in Liposomen um ein 3-4faches gesteigert wird, wenn die Lipidmischung Cholesterol enthält (*Naasani et al., 1996*). Dies stimmt mit unserer Beobachtung überein, dass die Anwesenheit von Cholesterol für einige Proteine notwendig für die Erfüllung ihrer Funktion ist.

Allerdings ist auch ohne Zugabe von exogenem Cholesterol in den Virosomen noch Cholesterol nachweisbar (s. **Tabelle 10**). Vermutlich stammt dieses Cholesterol aus der

viralen Hülle, in der Influenzahämagglutinin vorliegt (*Scheiffele et al., 1997*). Nach dem momentan bevorzugten Modell (zusammengefasst von *Simons und Ikonen, 1997*) sind Lipid-Rafts dicht gepackte Domänen, die sich in der flüssigen Lipiddoppelschicht zusammenfinden. Sie werden gebildet durch Sphingolipide, die seitlich miteinander assoziieren. Durch die großen Kohlenhydratseitenketten an den Kopfgruppen der Sphingolipide kommt es zu Lücken in der Lipidschicht, die mit Cholesterol aufgefüllt werden (*Keller und Simons, 1998; Magee & Parmryd, 2003*). Diese an Sphingolipiden und Cholesterol reichen Domänen sind Detergens-unlöslich bei Verwendung von Triton X-100 bei 4°C (*Keller und Simons, 1998*). Es ist anzunehmen, dass die Lipid-Rafts aus der Virushülle während der Präparation der Virosomen erhalten bleiben und so das Cholesterol in die Virosomen gelangt.

Zusätzlich zu seiner Bedeutung beim Einbau von Proteinen in Lipiddoppelschichten, scheint Cholesterol auch wichtig für die Bildung der Struktur der Virosomen zu sein, denn mit abnehmendem Cholesterolgehalt sind die Lipiddoppelschichten in der Elektronenmikroskopie weniger deutlich zu unterscheiden und bei fehlender Zugabe von Cholesterol können hauptsächlich wolkige Gebilde beobachtet werden. Die von uns gemachte Beobachtung steht im Gegensatz zu dem Befund, dass es durch Verarmung des viralen Cholesterols mit Hilfe von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin zu keiner morphologischen Veränderung des Influenzavirus kommt (*Sun und Whittacker, 2003*).

Betrachtet man die Fusionsparameter mit den Spermien, so fällt auf, dass der Anteil der lebenden Spermien bei allen vier Präparationsarten zwischen 70 und 90 Prozent liegt. Dies deutet darauf hin, dass der Cholesterolgehalt der Virosomen keinen Einfluss auf die Vitalität der Spermien besitzt. Jedoch kommt es mit Reduktion des zugegebenen Cholesterols zu einer Abnahme des Anteils lebender, fusionierter Spermien, dies deckt sich mit Beobachtungen von *Sun und Whittacker (2003)*, die bei der Reduktion des Cholesterolgehaltes in der Influenzavirushülle feststellten, dass dies zu einer verringerten Infektionsrate führt. Vermutlich ist durch das fehlende Cholesterol die Organisation der Influenzahämagglutininmoleküle in der Membran gestört, und es kommt nicht zu einer effizienten Fusion. Den Einfluss der Lipidhülle auf die Fusionsfähigkeit der Virosomen mit Bullenspermien konnten bereits *Markgraf und Kollegen (2001)* nachweisen. Werden Influenzavirosomen unter Zugabe einer Mischung exogener Lipide aus Cholesterol, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin präpariert, führt dies dazu, dass, im Vergleich zu Influenzavirosomen ohne Zugabe von exogenen Lipiden, die Fusionseffizienz von  $60,5 \pm 13,7\%$  auf  $97,0 \pm 2,0\%$  ansteigt. Der Einfluss betrifft jedoch nicht nur die Fusionsrate, sondern genauso den Ort der Fusion. Durch die Wahl der Lipidmischung

kann die Region, mit der die Virosomen fusionieren, auf das ganze Spermium ausgedehnt werden (Markgraf et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Phosphatidylcholin und Cholesterol die Fusionsfähigkeit von Virosomen gesteigert werden kann. Sie wiesen nach, dass Cholesterol in der Zielmembran erst die Fusion ermöglicht (Nussbaum et al., 1987). Dies könnte darauf hinweisen, dass für die Bindung der Virosomen an die Spermien das Influenzahämagglutinin essentiell ist, während für die Fusion sowohl Influenzahämagglutinin als auch Cholesterol in ausreichenden Mengen vorhanden sein müssen. Dies deckt sich mit den hier gemachten Beobachtungen, da wir bei Virosomen ohne exogenes Cholesterol über 80% lebende, nur gebundene Spermien feststellen können (s. **Tabelle 10**).

### **Einfluss der Plasmidmenge auf Virosomen**

Bei diesen Versuchen wurde die Plasmidmenge in der Ausgangslösung zur Herstellung der Virosomen erhöht, während die Zugabe der restlichen Substanzen gleich blieb. Ziel war es zu ermitteln, ob mit der bisher verwendeten Plasmidmenge bereits eine vollständige Beladung der Virosomen erreicht ist. Den im Abschnitt „**Theoretische Zusammensetzung der Influenzavirosomen**“ dargestellten Berechnungen folgend, müsste es einem Virosom möglich sein, drei Plasmide aufzunehmen. Dies würde bei einer angenommenen Zahl von  $10^{13}$  Virosomen, einer Plasmidmenge von  $3 \times 10^{13}$  Plasmiden entsprechen und damit etwa 180  $\mu\text{g}$  DNA.

Die Versuche in dieser Arbeit zeigen, dass durch eine gesteigerte Zugabe von DNA über 60  $\mu\text{g}$  kein erhöhter Einbau der DNA in die Virosomen zu beobachten ist (s. **Tabelle 12**), interessanterweise scheint der absolute DNA-Gehalt in den Virosomen mit gesteigerter Zugabe von Plasmid zu sinken. In der Elektronenmikroskopie ist sichtbar, dass die Anzahl der multilamellaren, geschlossenen Vesikel sinkt, wenn die Virosomensuspension weniger DNA enthält. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, dass bei einem Ladungsverhältnis von 0,2 in einem DNA/Lipidgemisch, die Liposomen hauptsächlich als unilamellare Vesikel vorliegen, während bei einem Ladungsverhältnis von 0,9, also einer erhöhten DNA-Ladung, hauptsächlich multilamelläre Vesikel in der Elektronenmikroskopie zu beobachten sind (Huebner et al., 1999). Dies könnte dann auch die Ursache sein, dass weniger DNA in den Virosomen eingeschlossen ist. Durch die geöffneten Vesikel ist der Schutz vor der DNase nicht mehr gewährleistet und das Plasmid wird bei den Zentrifugationen aus der Suspension entfernt oder durch die DNase verdaut.

Bei der Fusion von kryokonservierten Bullenspermien mit den Virosomen sind keine signifikanten Unterschiede im Anteil der lebenden Spermien festzustellen. Des Weiteren fällt auf, dass bei Inkubation von Spermien, denen 90 bzw. 180 µg DNA-Virosomen zugegeben wurden, die Virosomen nicht mit den Spermien fusionieren (s. **Tabelle 12**). Zu erklären ist dies vielleicht dadurch, dass sich die Proteinmenge in den Virosomen mit steigender DNA-Zugabe verringert. Die Virosomen, denen 90 µg DNA zugegeben wurde, sind immer noch in der Lage zu binden. Andererseits wird für C6 Glioma Zellen und 3T3 NIH Fibroblasten gezeigt, dass das optimale DNA/Lipid-Verhältnis für die Transfektion abhängig von der Zelllinie ist. So ist für C6 Zellen ein Verhältnis von 1:15 bis 1:22 optimal, während 3T3 Zellen ein Verhältnis von 1:12 bis 1:20 vertragen (*Kofler et al., 1998*). Dies würde darauf hinweisen, dass durch die Zugabe der großen Menge DNA sich die Form der Virosomen so verändert hat, dass das Influenzahämagglutinin nicht mehr in der Lage ist, die Fusion zu induzieren, wobei sich die erhöhte DNA-Menge nicht in den Virosomen wiederfindet. Hierfür sprechen die Befunde aus der Elektronenmikroskopie. Interessant ist, dass in den Spermien, die mit den 90 µg Virosomen fusioniert werden, mehr pEGFP-Plasmid nachweisbar ist, als in denen, die mit Virosomen fusioniert werden, die eine höhere Fusionseffizienz besaßen. Dies könnte eventuell daran liegen, dass nach dem NA-Verdau bei den 90 µg Virosomen immer noch Virosomen gebunden waren oder dass durch die hohe Bindungsrate vor dem enzymatischen Verdau und der anschließenden Zentrifugation mehr Virosomen in der Lösung bleiben. Dies könnte dazu führen, dass die in den Virosomen enthaltene DNA mit detektiert wurde. Auszuschließen wäre dies nur durch den optischen Nachweis, dass in den stärker fusionierten Spermien auch mehr DNA vorhanden ist. Allerdings wird durch den Waschschrift das Volumen der Spermienlösung stark reduziert, wodurch der Hauptteil des Volumens durch Spermien eingenommen wird.

### **Einfluss der Tritonextraktionsmethode auf die Virosomen**

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden beschrieben, mit denen Triton X-100 aus einer Virussuspension entfernt werden kann (s. **Tabelle 6**). Ziel dieser Versuche war es zu ermitteln, welche der Methoden für unsere Applikation am günstigsten ist. Hierfür wurden vier Methoden ausgewählt, davon wurde bei drei Methoden das Triton X-100 durch direkte Zugabe von BioBeads SM2 zu der Virosomensuspension entfernt (*Markgraf et al., 2001; Baljinnnyam, 2003; Vainstein et al., 1984*), bei der vierten Methode wurden die BioBeads zu PBS-Puffer gegeben, in dem ein Dialyseschlauch, gefüllt mit der Virosomensuspension, schwamm (*Mukhlis et al., 1984*). Bei Vergleich der Methoden mit gleichen Versuchsansätzen



können deutliche Unterschiede in den resultierenden Virosomen beobachtet werden. Betrachtet man die Ergebnisse aller Analysen, so ist die Tritonextraktionsmethode 3x2 h allen anderen Methoden vorzuziehen. Bei dieser Präparation wird der höchste DNA-Anteil nach der DNase-Behandlung in den Virosomen erreicht und auch der größte Anteil der Lipide scheint in die Virosomen eingebaut zu werden. Allerdings ist der Tritongehalt nach der Extraktion durch die BioBeads etwa 10mal höher als in den Virosomen, denen das Detergens über 3x24 h entzogen wird.

In der Literatur wird der Verlust von Phospholipiden durch die Extraktion von Triton X-100 mit Hilfe von BioBeads SM2 beschrieben (*Nussbaum et al., 1987; Vainstein et al., 1984*). Diese Beobachtung kann beim Vergleich der drei ersten Extraktionsmethoden mit Hilfe von BioBeads nicht bestätigt werden, es werden nahezu 100% des eingesetzten, exogenen Lipids in den Virosomen wiedergefunden, lediglich bei der 3x24 h Inkubation sind die Werte geringer. Zieht man jedoch in Betracht, dass durch die Solubilisierung der Membranproteine mit Hilfe von Triton X-100 auch die viralen Lipide extrahiert werden, dann sollte der Anteil des in den Virosomen wiedergefundenen Lipids über 100% liegen. Dies ist in einigen Präparationen auch der Fall.

Bei der Betrachtung der Fusionsergebnisse der verschiedenen Virosomenpräparationen zeigt sich ebenfalls, dass die 3x2 h Präparation vorzuziehen ist. Die Virosomen zeigen den höchsten Anteil fusionierter, lebender Spermien, sowohl vor als auch nach NA-Verdau.

Jedoch ist der pEGFP-Gehalt in den Spermien die mit den 3x2h-Virosomen inkubiert wurden niedriger als bei den anderen Präparationen (s. **Tabelle 14**). Dies könnte seine Ursache in einem hohen Anteil gebundener Spermien nach NA-Verdau bei den anderen Präparationen haben. Dadurch, dass noch Virosomen an die Spermien gebunden sind, wird deren DNA-Gehalt bei der quantitativen Bestimmung mit einbezogen.

Fraglich ist, weswegen die Fusionsrate trotz der etwa ähnlichen Proteinmenge, ausgenommen die dialysierten Virosomen, bei den längeren Extraktionszeiten so niedrig ist. Eine Ursache für die relativ niedrigen Fusionsraten nach langen Extraktionszeiten könnte sein, dass durch lange Inkubationszeiten die Proteine degradiert bzw. inaktiviert werden (*Vainstein et al., 1984*). Jedoch gibt es auch Versuche, bei denen trotz langer Inkubationszeiten (3x24 h) hohe Fusionsraten erzielt werden konnten (zum Vergleich siehe **Tabelle 13**). Um auszuschließen, dass die Proteine degradiert sind, wurden die Virosomenproben auf SDS-Gele aufgetragen und diese anschließend mit einer Silberfärbung gefärbt. Hierbei zeigen sich für alle Proben klare, scharfe Banden in erwartetem Molekulargewicht.

Stark variierende Versuchsergebnisse könnten auch auftreten, wenn die verwendeten Viruspräparationen sich in ihrer Qualität deutlich voneinander unterscheiden. Um dies zu verhindern, wurden zur Herstellung der Virosomen nur Influenzaviren aus SPF-Eiern verwendet, die direkt nach ihrer Gewinnung eine Fluoreszenzdequenchingrate (FDQ) mit Humanen Erythrozytenghosts (HEG) von mindestens 30% erreichten.

### **Einfluss der Proteinmenge auf die Virosomen**

Nachdem die Bedeutung des funktionsfähigen Influenzahämagglutinins für die Fusion mit den Virosomen untersucht wurde, sollte die Bedeutung der zugesetzten Proteinmenge erkundet werden. Hierfür werden den Virosomen unterschiedliche Mengen viralen Proteins zugesetzt. Es zeichnet sich ab, dass wahrscheinlich ein Optimum für die Menge an zuzusetzendem Protein existiert. Die optimale Zugabemenge liegt bei etwa 1 mg viralem Protein (s. **Tabelle 15**). Wird den Virosomenpräparationen eine größere Menge Protein zugesetzt, verringert sich der Anteil der lebenden, fusionierten Spermien; parallel dazu wird auch eine Verringerung des pEGFP-Gehaltes in den Virosomen beobachtet. Ursache könnte eine sterische Behinderung sein (*Lapidot et al., 1987*). Hinweise auf eine mögliche sterische Behinderung wären eine Zunahme in der absolut eingebauten Proteinmenge oder in der Elektronenmikroskopie sichtbare Spikes in der inneren Schicht der Virosomen, da beides nicht zutrifft kann eine sterische Behinderung wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

### **Ergebnis der Hämagglutinin-Aufreinigung**

Die Angaben in der Literatur über den Anteil des Influenzahämagglutinins an der Gesamtmenge des viralen Proteins des Virus variieren zwischen 20 und 30% (*Lamb und Choppin, 1983; Ada und Jones, 1986; Oxford et al., 1981*). Im Durchschnitt ist in den Virosomen  $10,0 \pm 9,3\%$  des eingesetzten viralen Proteins nachweisbar. Anhand der silbergefärbten Proteingele ist erkennbar, dass die Proteinbanden denen des Influenzahämagglutinins entsprechen und keine anderen Banden zu detektieren sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Proteine in der Virosomensuspension vorhanden sind, ist gering. Mit der hier gewählten Methode, lassen sich bereits Proteinbanden nachweisen, die eine Konzentration von 5 ng/Bande besitzen (*Rehm, 2002*). Im Western Blot (hier nicht gezeigt), können mit Hilfe von Influenzavirus-spezifischen Antikörpern drei Banden detektiert und aufgrund ihres Molekulargewichtes als HA<sub>0</sub>, HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> identifiziert werden. Wie bereits in der Einleitung erläutert, handelt es sich bei HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> um die funktionsfähigen Spaltprodukte von HA<sub>0</sub>, die für die Fusion von Influenzaviren mit den

Zielzellen verantwortlich sind (Wiley und Skehel, 1987). Die Effizienz des Einbaus des HA in die Virosomen liegt bei 30-50% (Bron *et al.*, 1993a), was mit den hier präsentierten Ergebnissen übereinstimmt.

Durch das Fehlen der Nukleoproteinbanden, derjenigen Proteine, die die virale RNA komplexieren, kann davon ausgegangen werden, dass auch die virale RNA aus der Suspension entfernt wurde und damit keine Infektionsgefahr besteht. Um dies jedoch abschließend zu klären, wäre es wünschenswert, die Abwesenheit viraler RNA mittels quantitativer Realtime PCR zu bestätigen.

### **Einfluss verschiedener Poly-L-Lysin-Kondensationszeiten auf Virosomen**

Durch vorherige Arbeiten an Sendaivirosomen konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Komplexen aus Plasmid-DNA und Poly-L-Lysin (PLL) den Transfer der DNA in die Zielzellen erhöht (Ponimaskin *et al.*, 2000). Dieser Effekt ist nicht nur auf Sendaivirosomen beschränkt, sondern scheint allgemein bei der Transfektion von Zellen aufzutreten, da durch die Inkubation der DNA mit PLL unter Zugabe von verschiedenen polykationischen Liposomen die Transferrate immer stieg (Gao und Huang, 1996). Der Mechanismus, der diesem Befund zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings treten zwischen DNA und Poly-L-Lysin, einem Polykation, elektrostatische Anziehungskräfte auf (Ramsay *et al.*, 2000). Mögliche Mechanismen für die Potenzierung der Lipofektion durch PLL sind:

- 1) Auf der Basis des Endozytosemodells gibt es ein Größenlimit für die effiziente Aufnahme von Partikeln in die Zelle (Machy und Leserman, 1983). PLL reduziert signifikant die Größe der gebildeten Komplexe über ein breites Spektrum von Liposom/DNA-Verhältnis (Gao und Huang, 1996).
- 2) Hochgradig verwundene (*supercoiled*) Plasmide werden effizienter exprimiert als Plasmide, die in linearer Form übertragen wurden (Wolff *et al.*, 1992). Ob es zu einer Zunahme der transferierten DNA kommt wurde jedoch nicht untersucht.
- 3) Während DC-Cholesterol Liposomen selbst bei optimalem DNA/Liposomen-Verhältnis keinen absoluten Schutz der DNA vor Nukleasen bietet, gewährt PLL diesen Schutz (Gao und Huang, 1996).

Auch sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, die Komplexbildung zwischen PLL und DNA stabil zu erreichen. Für die dargestellten Versuche wurden verschiedene Protokolle teilweise mit leichten Abwandlungen aus der Literatur angewendet (Gao und Huang, 1996; Ponismaskin *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001). Das Plasmid wurde vor

der Zugabe zu den restlichen Substanzen, 10 min, 30 min oder 120 min mit dem PLL inkubiert. Hierbei zeigt sich, dass bei Inkubation für 120 min der höchste pEGFP-Gehalt in den Virosomen nachweisbar ist. Mit diesen Versuchen kann bestätigt werden, dass durch die längere Inkubation der DNA mit Poly-L-Lysin der Gehalt an DNA in den Virosomen nach DNase-Verdau steigt. Der Lipidgehalt in den Virosomen scheint mit der Länge der PLL-Inkubationszeit zu steigen, wobei der Phospholipidgehalt proportional stärker zunimmt. Dies könnte durch eine ionische Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Phospholipiden und dem positiv geladenen Poly-L-Lysin begründet sein.

Bei der Inkubation der Spermien mit den verschiedenen Virosomenpräparationen zeigen sich nur geringfügige Unterschiede. Sowohl in der Fusionsrate, als auch in der DNA-Transferrate. Dies ist besonders interessant, da der DNA-Gehalt in den 120 min Virosomen deutlich höher ist als in den anderen Präparationen.

### **Variabilität der Fusionsergebnisse bei Verwendung einer Virosomenpräparation und Assoziation von Fluoreszein-markierter DNA an Spermien**

Ein Hinweis darauf, dass Unterschiede in der Fusionsrate bei den hier vorgestellten Versuchen nicht in einer unvollständigen Fusion begründet sind, ist die Feststellung, dass bei der Inkubation von Phospholipid-Liposomen mit kryokonservierten Bullenspermien bereits nach 5 min bei pH 5.0 ein Resonanz Energie Transfer (RET) zwischen Liposomen und Spermien von 90% vorliegt (*Arts et al., 1993*). Um die Variabilität des Fusionsassays einer Virosomenpräparation mit kryokonservierten Bullenspermien zu ermitteln, haben wir bei zwei Präparationen die Fusion jeweils dreimal mit der gleichen Spermien-Charge durchgeführt und ausgewertet (s. **Tabelle 19**). Hierbei ergibt sich bei Virosomen, denen das Triton X-100 über 4h und 16h entzogen wird, ein Anteil von  $58,3\% \pm 13,1\%$ , während bei den 3x2h-Virosomen  $72,5\% \pm 2,8\%$  der lebenden Spermien fusionieren. Da die Variabilität in diesem Assay gering ist, wird die Variation der Fusionsergebnisse in der Präparationsweise der Virosomen begründet liegen. Wie in **Tabelle 21** dargestellt ist, kann auch bei 89,5% der lebenden Spermien mit Fluoreszein kovalent markierte DNA nachgewiesen werden, die mit Influenzavirosomen fusioniert wurden.

In Arbeiten, in denen nicht nur der Anteil der transgen geborenen Tiere untersucht wurde, sondern auch der Anteil der Spermien, die DNA aufgenommen hat, zeigen sich ebenfalls deutliche Variationen in Abhängigkeit von der Methodik. So war bei  $47\% \pm 4\%$  aller Eberspermien, die mit rekombinanten Adenoviren transfiziert wurden, mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung das Transgen nachweisbar. Dasselbe Plasmid war jedoch nur bei  $13\% \pm 3\%$

der Eberspermien nachweisbar, die entweder mit zirkulärer oder linearer, nackter DNA inkubiert wurden (*Farre et al., 1999*). Bei Inkubation kryokonservierter Bullenspermien mit  $^3\text{[H]}$ -markierter Plasmid-DNA konnte erst nach Entfernung der Gefrierschutzmittel eine Bindung der DNA an 39-47% der Zellen beobachtet werden (*Camaioni et al., 1992*).

Allerdings scheint die Stabilität des Gentransfers in die Spermien nicht mit der Rate der transgen geborenen Tiere zu korrelieren. So wurden nach der Befruchtung von Mäuseoozyten zwischen 0-100% transgene Tiere geboren, obwohl der Anteil der DNA-tragenden Spermien immer bei 90% lag (*Lavitrano et al., 1998*).

### **Fusion von Virosomen mit Nebenhodenschwanzspermien vom Rind**

Eines der größten Probleme, über die beim Spermien-vermittelten Gentransfer berichtet wird, sind inhibitorische Faktoren im Seminalplasma. Diese inhibieren die Bindung von exogener DNA an sowohl frische, ejakulierte Spermien als auch an kryokonservierte Spermien, wodurch es zu einer hohen Variabilität der Ergebnisse des Gentransfers kommt (*Maione et al., 1998; Lavitrano et al., 2003*). Um zu untersuchen, ob die Fusion der Virosomen erfolgreicher mit Nebenhodenschwanzspermien (NHS-Spermien) ist, wurden die unter Punkt **4.1.3.** beschriebenen Virosomen auch mit NHS-Spermien fusioniert. Wie aus **Tabelle 22** zu ersehen ist, fusionieren die Influenzavirosomen auch mit Nebenhodenschwanzspermien, wobei jedoch im Gegensatz zu den kryokonservierten Bullenspermien, ein höherer Anteil lebend, fusionierter Spermien zu beobachten ist, wenn den Virosomen lediglich 3 mg Cholesterol zugegeben wurde. Bei zwei Präparationen wurde ebenfalls eine Realtime PCR durchgeführt, mit deren Hilfe das EGFP-Plasmid in beiden Proben nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Bericht, dass sowohl bei ejakulierten, als auch bei epidymidalen Mäusespermien mittels Autoradiographie exogene Plasmid-DNA im Bereich des Equatoralsegments und der postakrosomalen Region dargestellt werden kann. Um jedoch eine Bindung der DNA an die ejakulierten Mäusespermien zu erreichen, müssen diese vorher mehrfach gewaschen werden, dann kann bei 67% der Spermien DNA nachgewiesen werden. Allerdings kann nur bei 47-52% der Nebenhodenspermien eine Assoziation der exogenen DNA beobachtet werden (*Camaioni et al., 1992*).

### **Fusion von Virosomen mit kryokonservierten Spermien verschiedener Individuen**

Ziel vieler Studien, die die Verwendung des Spermien-vermittelten Gentransfers nutzen, ist die Gewinnung von Tieren als Organdonoren für die Xenotransplantation, also die Transplantation von tierischen Organen in Menschen oder die Gewinnung von Arzneimitteln

aus verschiedenen Körperflüssigkeiten von Tieren (für Quellen s. **1.5**). Hierfür ist es sinnvoll, wenn auf einen großen Elternpool zurückgegriffen werden kann. In einer retrospektiven Studie, bei der über 100.000 mikroinjizierte Mäuseeizellen untersucht wurden, konnte nachgewiesen werden, dass für die Generierung von transgenen Mäusen der genetische Hintergrund, also der Mausstamm, des Eizellspenders mit entscheidend ist (Auerbach *et al.*, 2003). Jedoch zeigen Studien von Lavitrano *et al.* (2003), dass die Aufnahme von nackter DNA in die Spermien von Ebern, sowie von Mäusen, abhängig vom Individuum ist. Um diese Problematik zu umgehen, wäre es wünschenswert ein Transfersystem zu haben, das unabhängig vom Individuum, die DNA in die Spermien einbringen kann. Da es sich bei dem Rezeptor für Influenzahämagglutinin, die Sialinsäurereste, um einen ubiquitär vorkommenden Zuckerrest handelt, wollten wir nachweisen, dass dieses Ziel mithilfe der Influenzavirosomen erreicht werden kann.

In unserer Arbeit zeigen wir nun, dass es uns möglich ist, bei vier von vier Individuen die Virosomen mit den Spermien zu fusionieren und die DNA nachzuweisen (s. **Tabelle 23**). Dieser Befund deutet darauf hin, dass es mit den Influenzavirosomen möglich sein könnte, den Gründer einer transgenen Linie, nach z. B. seiner vererbten Milchleistung auszuwählen, statt nach der Fähigkeit seiner Spermien DNA aufzunehmen.

### **Fusion von Virosomen mit flüssigkonservierten Eberspermien**

In einigen Studien wurden verschiedene Spezies bei der Inkubation mit nackter DNA verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass nicht alle Spezies gleich gut DNA aufnehmen. So zeigt sich nach Inkubation mit nacktem, radioaktiv markiertem pMTI-hGH Plasmid, dass bei Mäusespermien noch 2-10 % der DNA-Moleküle mit den Spermien assoziiert sind, bei Karpfenspermien 7,6-10 %, bei Hühnerspermien 7,2-25 %, bei Bullenspermien 1,5-3 % und bei Eberspermien 0,26-0,3 % (Castro *et al.*, 1990). Die Spermien der unterschiedlichen Spezies scheinen auch unterschiedlich empfindlich auf die Inkubation mit nackter DNA zu reagieren. So werden bei der Inkubation von Nebenhodenschwanzspermien der Maus mit 10 ng DNA pro  $10^6$  Spermien Nukleasen aktiviert, die das Plasmid spalten. Bei ejakulierten Schweinespermien ist die Fragmentierung der DNA durch die aktivierten Nukleasen erst ab einer Dosis von 500 ng DNA pro  $10^6$  Spermien zu beobachten (Maione *et al.*, 1997). Um zu eruieren, ob die Influenzavirosomen in der Lage sind, auch mit Spermien anderer Spezies zu fusionieren und in diese DNA zu transferieren, sind kommerziell erhältliche, flüssigkonservierte Eberspermien mit Virosomen

inkubiert worden. Es zeigt sich, dass die Virosomen mit diesen Spermien fusionieren und DNA transferieren (s. **Tabelle 24**).

### **Theoretische Zusammensetzung der Influenzavirosomen**

Vorausgesetzt, dass die meisten Virosomen mindestens 100 nm im inneren Durchmesser groß sind, kann angenommen werden, dass in ihnen ein Würfel von einer Kantenlänge von mindestens 70 nm Platz hätte. Das hier verwendete Plasmid besitzt eine Sequenzlänge von 5600 Basenpaaren besitzt (s. **Abbildung 3**). Dies entspricht einer Kettenlänge von 1904 nm mit einer Dicke von 2 nm. Wird weiter vorausgesetzt, dass das Plasmid in Spiralen angeordnet ist, so könnten entweder 10 Ringe mit einem Durchmesser von 60 nm in dem Würfel Platz finden, oder 30 Ringe mit einem Durchmesser von 20 nm. Durch diese räumliche Anordnung würden drei bis neun Plasmide in ein Virosomen passen. Für die Versuche wurden meistens 60 µg Plasmid-DNA verwendet, dies entspricht ungefähr  $10^{13}$  Plasmiden in der Lösung.

Um die Anzahl der in der Lösung enthaltenen Virosomen zu ermitteln, wird die Menge des in den Virosomen enthaltenen Phospholipids bestimmt. Wie aus dem Ergebnisteil zu ersehen ist, konnten in den Virosomen im Mittel 90% des eingesetzten Cholesterols und der Phospholipide wiedergefunden werden, dabei war kein Unterschied zu der Ausgangszusammensetzung der Lipide feststellbar. Nimmt man eine Membranfläche von  $0,7 \text{ nm}^2$  pro Molekül an und einen durchschnittlichen Phospholipidgehalt von  $11 \text{ µmol}$  ( $66 \times 10^{17}$  Phospholipidmoleküle unter Anwendung der Avogadro-Konstanten), erhält man damit bei Abzug von 10% nicht eingebauten Lipiden eine Molekülzahl von  $59,4 \times 10^{17}$ . Geht man des weiteren davon aus, dass eine Lipiddoppelschicht etwa 5 nm dick ist und ein Vesikel mit fünf Lipiddoppelschichten sechs ineinander geschachtelten Kugeln entspricht, so kann angenommen werden, dass mithilfe des verwendeten Lipids  $10^{13}$  Virosomen gebildet werden könnten. Dies entspricht einem theoretischen Plasmid/Virosomen-Verhältnis von 1:1. Nach der DNase-Behandlung der Virosomen können noch 17% des initial eingesetzten pEGFP (5,4 bis  $15,6 \text{ µg DNA}$ ) in den Virosomen detektiert werden, hierdurch wird das Plasmid/Virosomen-Verhältnis zu 1:6 verschoben. Wie aus diesen Berechnungen ersichtlich wird, wäre es wünschenswert, einen höheren pEGFP-Gehalt in der Virosomensuspension zu erzielen. Durch die Erhöhung der zugesetzten Plasmidmenge konnte jedoch keine deutliche Erhöhung des DNA-Gehaltes in den Virosomen beobachtet werden.

Um die Fusionsfähigkeit der Virosomen abzusichern, wurde der Proteingehalt der Virosomen ermittelt. Es wurden meistens 2 bis 3 mg virales Protein für die Produktion von Virosomen

genutzt. Von diesem war ungefähr 10% in den Virosomen enthalten. Da lediglich HA in den Virosomen gefunden werden konnte, wird angenommen, dass die Hälfte des Virus HA, etwa  $20 \times 10^{14}$  Moleküle, in  $10^{13}$  fünfschichtigen Virosomen verteilt ist. Dies bedeutet, dass 200 HA-Moleküle oder 66 Spikes (HA-Trimere) in der Membran von einem Virosom rekonstituiert sind. Wenn HA gleichmäßig in allen Doppelschichten verteilt ist, kommt 1 HA-Molekül pro  $2400 \text{ nm}^2$  vor und 25% des eingeschlossenen HA sind in der äußeren Schicht der fünf virosomalen Schichten eingeschlossen. Im Virus wird ein HA Molekül auf  $26 \text{ nm}^2$  angenommen. Die niedrigere HA-Oberflächendichte in den Virosomen ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass wenig Spikes auf der Oberfläche der Virosomen zu sehen sind.

Da lediglich 5,4-15,6  $\mu\text{g}$  DNA nach DNase-Behandlung in den Virosomen eingeschlossen waren, was einem Anteil der zugefügten DNA von 9-26% entspricht, müssen etwa 83% der Virosomen leer gewesen sein. Während der Inkubation mit Spermien wurden etwa 17.500 Virosomen mit einem äußeren Durchmesser von 125 nm pro Spermium inkubiert. Ungefähr 7600 Virosomen würden die flachen Seiten des Kopfes eines Bullenspermiums (8,5  $\mu\text{m}$  lang, 4,5  $\mu\text{m}$  breit) und das Mittelstück (11  $\mu\text{m}$  lang und 0,8  $\mu\text{m}$  im Durchmesser) vollständig bedecken. Tatsächlich wurden im Mittel 4400 (90-18550) fg pEGFP pro Mikroliter Spermien suspension (der etwa 10.000 Spermien enthält) gefunden. Dies entspricht einer mittleren Anzahl von 72 (1,5-302) Plasmiden pro Zelle.

Das Maximum an Gentransfer in Spermien, das theoretisch möglich wäre, wird mit den vorgestellten Virosomen noch nicht erreicht. Zwar wird HA in den Virosomen im Vergleich zum Influenzavirus suboptimal auf der Oberfläche präsentiert, doch konnte durch Erhöhung der Menge des eingesetzten viralen Proteins keine Erhöhung des DNA-Gehaltes der Spermien erzielt werden, mehr noch schien es durch einen gesteigerten Proteineinsatz zu einer Verminderung des Anteils der lebenden, fusionierten Spermien zu kommen.

### **Vergleich der Virosomenmethode mit anderen Methoden**

Grundsätzlich konnte in dieser Arbeit die wiederholte Herstellung von funktionellen Virosomen demonstriert werden, die in der Lage sind, DNA in Spermien zu transferieren. Ein Teil der Faktoren, die die Fusionseigenschaften und die Funktionalität der Virosomen beeinflussen, konnten in dieser Arbeit bereits identifiziert werden. Hier sind zu nennen: die Anwesenheit von Cholesterol in der exogenen Lipidmischung, das Elternavirus, die Anwesenheit von funktionellem Hämagglutinin sowie die Qualität der Ausgangsprodukte, z.B. die Funktionalität des Elternavirus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es mithilfe



der Influenzavirosomen möglich ist, unabhängig von Spezies, Individuum oder Konservierungsverfahren DNA in Spermien zu transferieren. Besonders vielversprechend ist hierbei, dass wir bei unseren Versuchen vorwiegend kommerziell erhältliche Spermien verwendet haben. Nachteilig für eine kommerzielle Anwendung ist die schwierigere Herstellung der Virosomen, im Vergleich zu der Inkubation von Spermien mit nackter DNA. Bei der Inkubation der Spermien mit nackter DNA besteht ein deutlicher individueller Unterschied in der Aufnahmefähigkeit für exogene DNA (*Lavitrano et al., 1996*). Diese Tatsache macht es wünschenswert, einen Spermiendonator über die ganze Zeit seiner Reproduktionsperiode zu nutzen (*Lavitrano et al., 2006*). Der Vorteil, die Spermiendonoren ihr ganzes Leben nutzen zu können, wird deutlich, wenn man sieht, dass für die Generierung von hDAF-transgenen Schweinen nur zwei von 20 untersuchten Ebern als Spermiendonoren geeignet waren (*Lavitrano et al., 2002*). Von besonderer Bedeutung für die Aufnahme der DNA scheint die Qualität der Spermien zu sein, wie sie bereits für die üblichen Zuchtprogramme ermittelt wird, besonders aber die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien (*Lavitrano et al., 2003*). Die Tatsache, dass Virosomen in der Lage sind, mit Spermien von verschiedenen Bullen oder Ebern unabhängig von deren Konservierung zu fusionieren, ist ein Vorteil gegenüber der DNA-Inkubation, wie sie durch *Lavitrano et al. (2003)* beschrieben wird. Zudem bieten die Virosomen den Vorteil, dass sie der DNA in den Virosomen Schutz vor DNasen bieten (*Zurbriggen, 2003*). Allerdings soll nicht unerwähnt bleiben, dass durch Inkubation von Eberspermien mit nackten Plasmiden bereits Schweine entstanden sind, die sowohl das EGFP-, das EBFP- und das DsRed2-Protein exprimieren (*Webster et al., 2005*). Ein nächster Schritt in der Etablierung der Influenzavirosomen als System für den Spermien vermittelten Gentransfer ist zu untersuchen, ob die Spermien nach der Fusion mit den Virosomen noch in der Lage sind, Eizellen zu befruchten. In Vorversuchen konnte kein Unterschied in der Befruchtungsrate und in der frühen Entwicklung der Embryonen zwischen Kontrollen und DNA-freien mit Virosomen fusionierten Spermien beobachtet werden. Es sind jedoch weitere Versuche zur Absicherung dieser Ergebnisse notwendig.