

Gentechnologie und Veterinärmedizin [Fortsetzung]

Autor(en): **Gassmann, M. / Hübscher, U. / Kuenzle, C.C.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **129 (1987)**

PDF erstellt am: **20.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593446>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Institut für Pharmakologie und Biochemie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich

Gentechnologie und Veterinärmedizin

III. Transgene Tiere: Fakten und Perspektiven

*M. Gassmann, U. Hübscher und C. C. Kuenzle**

Einleitung

Mit Schutzimpfungen hat man im Reich der Mitte bereits vor über tausend Jahren begonnen. Damals haben die Chinesen eingetrocknete Pockenkrusten fein zermalmt und anschliessend den Kindern in die Nase eingeführt. Die wissenschaftliche Erforschung dieses Phänomens begann allerdings erst anfangs des letzten Jahrhunderts und führte zu den z. T. heute noch gebräuchlichen Lebend- und Totimpfstoffen. Zu diesen sog. Ganzagensvakzinen haben sich vor nicht allzu langer Zeit die «Subunit»-Vakzinen gesellt. Die Gentechnologie ermöglichte es, Bakterien, die eine rekombinierte Plasmid-DNA besitzen, für die gezielte Produktion von Proteinen zu verwenden. Die Grundlagen dieses Verfahrens sind in den zwei vorangehenden Artikeln [1, 2] beschrieben. Vor Einführung gentechnologischer Methoden benötigte man für die Herstellung von 1g Interferon 600 Hektoliter Blut; heute ist dies mit einem Hektoliter Bakterienkultur möglich. Wird man in Zukunft die gleiche Interferonmenge aus wenigen Litern frisch gemolkener Kuhmilch reinigen können? Liessen sich in der Milchdrüse von Wiederkäuern nicht auch andere interessante Proteine wie Insulin produzieren? Kann das Euter zum Bioreaktor modifiziert werden?

Man nimmt an, dass Interferon indirekt antiviral wirkt, indem es andere Abwehrproteine – u. a. das Mx-Protein – induziert. Forschungsergebnisse von Prof. Lindemann an der Universität Zürich zeigten, dass bestimmte Inzuchtstämme von Mäusen, welche das zugehörige Mx-Gen tragen, gegen Infektionen mit Inflenzaviren resistent sind, während die übrigen im Labor gebrauchten Mausstämme, die Mx-negativ sind, hochgradig erkranken [3]. An Inflenzainfektionen leiden aber nicht nur Mäuse, auch Pferde, Schweine und Vögel werden befallen. Liesse sich dieses murine Resistenz-Gen nicht in die Erbmasse solcher Nutztiere übertragen? Bei stabilem Einbau würden die Tiere erblich influenzaresistent. Schweinemäster hätten wegen Inflenzabefall keine Einbussen mehr, die klassische Geflügelpest und andere Inflenzaerkrankungen des Geflügels gehörten der Vergangenheit an, und die Skalmimpfung des Pferdes würde sich erübrigen.

Neben der Inflenzaresistenz kennt man weitere natürlich vorkommende Resistenzen, die gentechnologisch zur Prophylaxe wirtschaftlich einschneidender Krank-

* Adresse: Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich

heiten eingesetzt werden könnten. So macht beispielsweise eine Untersuchungskommission im Auftrage des Deutschen Bundestages [4] auf die Möglichkeit aufmerksam, die Trypanosomenresistenz des N'Dama Rindes in Westafrika auf qualitativ bessere Rinderrassen zu übertragen. Die Trypanotoleranz ist ein polygenes Merkmal, das sich durch klassische Zuchtmethoden nicht leicht herauszüchten lässt. Es liegt darum nahe, gentechnologische Verfahren zu versuchen. Eine Utopie? Der nachfolgende Artikel soll auf bereits vorhandene Resultate aufmerksam machen und die Zukunftsaussichten für den Einsatz transgener Nutztiere beleuchten.

Definition und Methodik

Was ist ein transgenes Tier? In die befruchtete Eizelle eines Tieres wird ein fremdes DNA-Konstrukt der Wahl (Transgen) eingeschleust. Individuen, in denen sich das Transgen stabil in die Erbmasse (Genom) integriert hat, bezeichnet man als *transgene Tiere*. Das neue Gen wird nach den Mendel'schen Regeln an die Nachkommenschaft weitervererbt. Vor wenigen Jahren lagen die ersten Berichte über die erfolgreiche Einführung und Expression fremder DNA vor. Mit anderen Worten: das transgene Tier war in der Lage, das neuintegrierte Gen in ein ihm fremdes Protein zu übersetzen. In der Zwischenzeit hat sich die Anzahl erfolgreicher Versuche vervielfacht [5]. Die gegenwärtige Technik erlaubt aber nur das Einschleusen *zusätzlicher* DNA ins Genom, nicht jedoch den Ersatz vorhandener Gene.

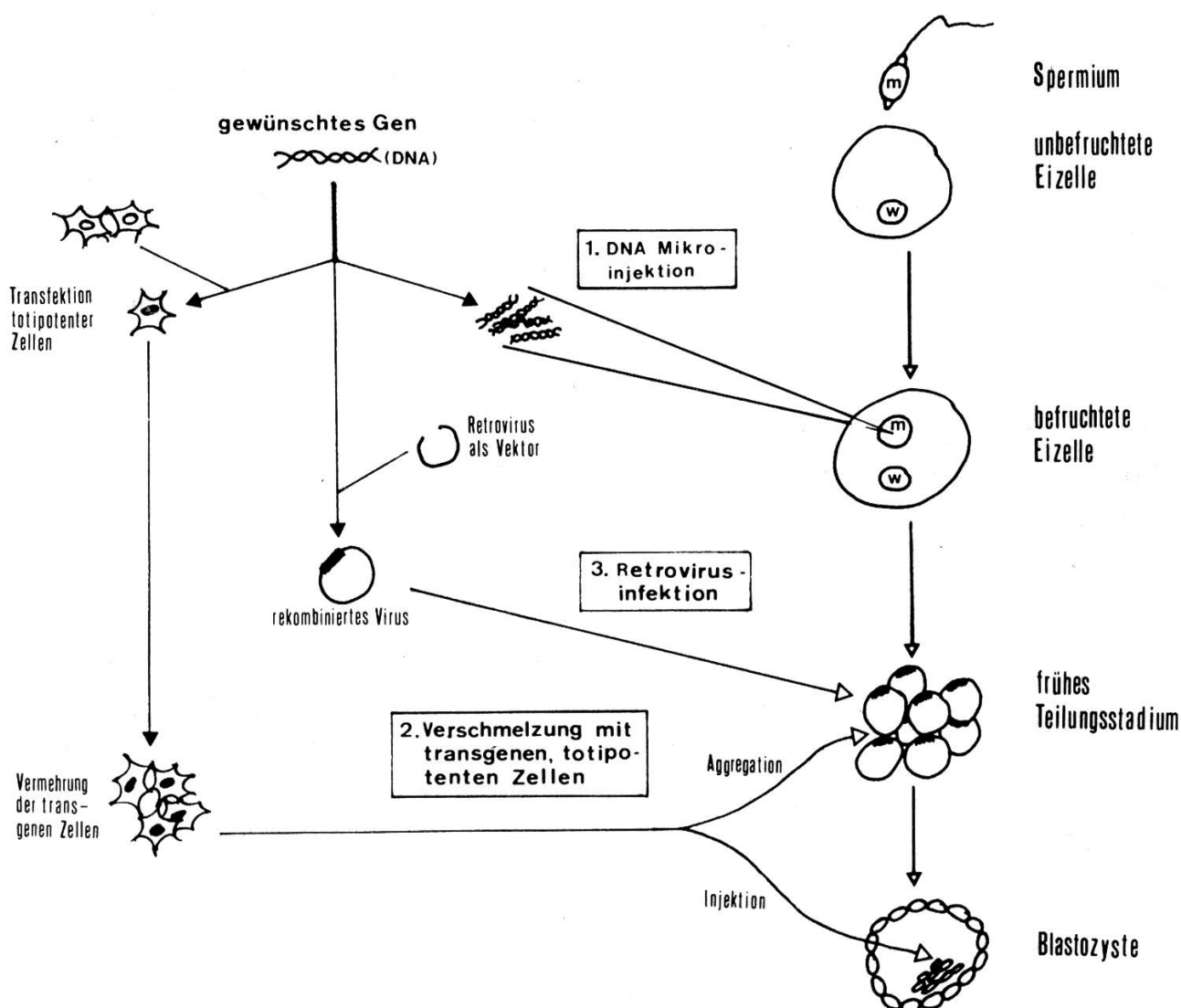
Bei der Erzeugung transgener Tiere – hier am Beispiel des Modelltieres Maus gezeigt – geht man folgendermassen vor. Die befruchteten Eizellen einer Spendermaus werden ausgespült. Danach erfolgt die DNA-Transfektion, d.h. die Einführung des Transgens in die intakten Eizellen. Diese werden in pseudogravide Empfängermäuse überführt, wo sie ausgetragen werden. Nicht der Embryotransfer, sondern die gezielte DNA-Transfektion stellt die Forscher vor grosse technische Probleme. Heutzutage werden hauptsächlich 3 Methoden praktiziert (Fig. 1).

1. Mikroinjektion fremder DNA [5, 6]

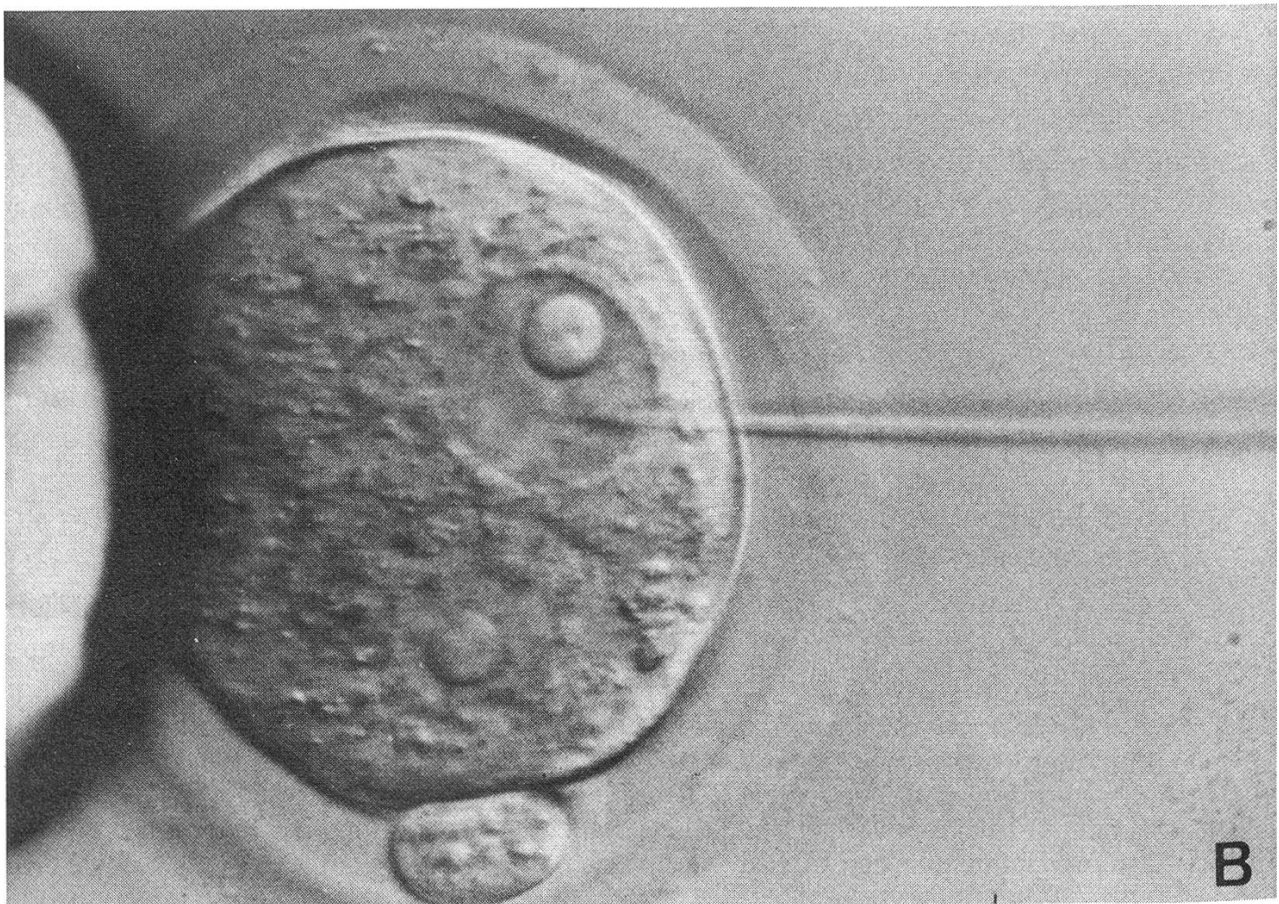
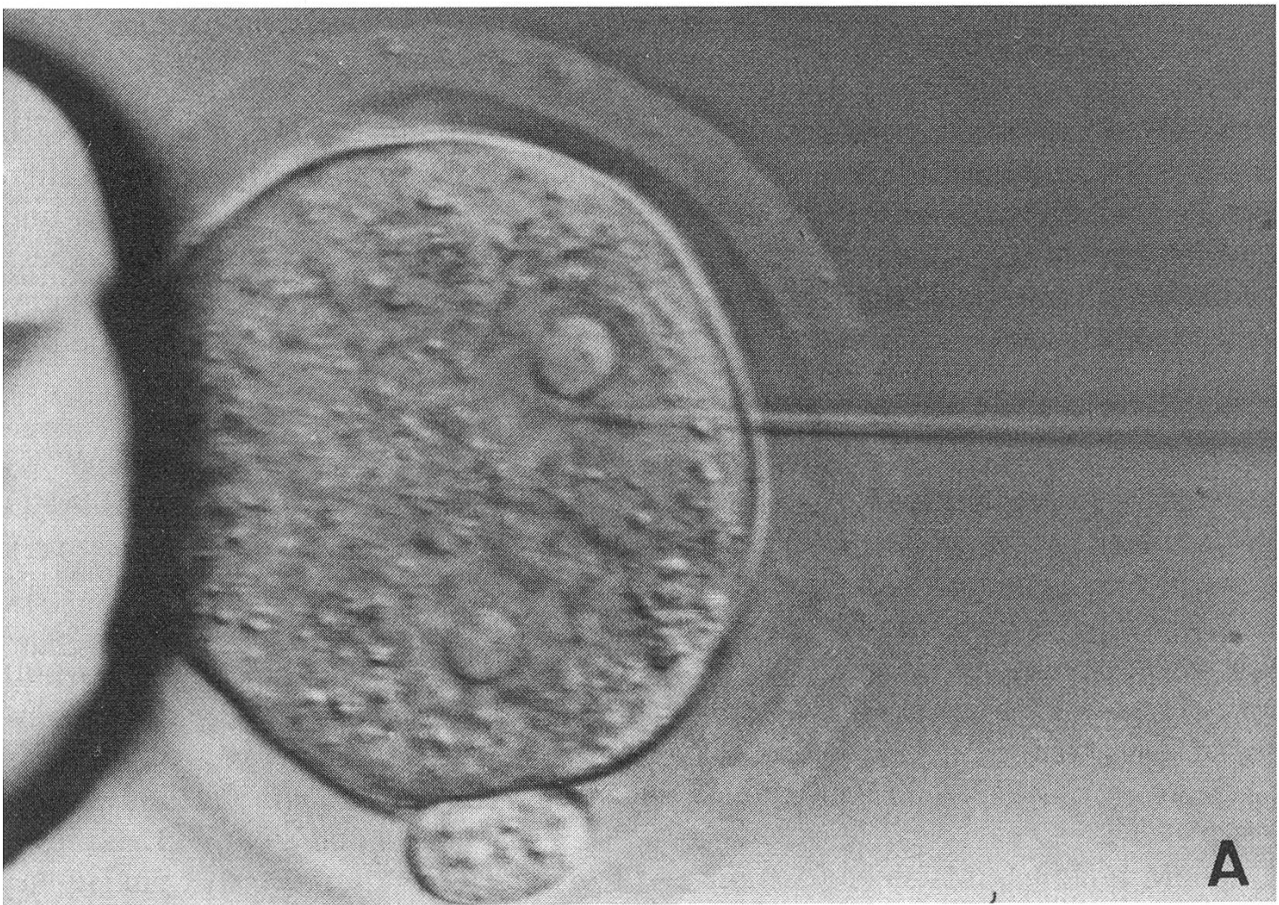
Die befruchteten Eizellen müssen noch vor der Verschmelzung des weiblichen und männlichen Vorkerns (Pronukleus) zur Zygote chirurgisch aus dem Eileiter gewonnen werden. Durch diese Vorbedingung wird der Zeitpunkt wie auch die Zeitspanne des Eingriffes sehr limitiert. Unter dem Mikroskop (320–400fache Vergrösserung) werden die Eizellen (Durchmesser: 70µm) mit einer feinen Pipette angesaugt und festgehalten. Der weibliche Vorkern ist schwach, der grössere, männliche Pronukleus etwas besser sichtbar. Mit Hilfe einer sehr feinen Kanüle (Durchmesser der Spitze: 1,5 µm) wird das gentechnologisch hergestellte und gereinigte Transgen in vielfacher Kopie in den männlichen Vorkern injiziert (Fig. 2). Es müssen Mikromanipulatoren zur Untersetzung der Bewegungen der menschlichen Hand eingesetzt werden. Das Transgen wird meist in mehrfach hintereinandergeschalteten Kopien an einer zufälligen Stelle des Genoms integriert. Der Integrationsmechanismus ist unbekannt. Der Einbau kann jedes Autosom wie auch das X- oder Y-Chromosom betreffen. Verschiedentlich wurde die stabile Vererbung des Transgens über mehrere Mäusegenerationen nachgewiesen [7].

2. Erzeugung von Chimären aus Embryonen und transgenen totipotenten Zellen [8, 9]

Stevens gelang es 1970, Teratokarzinome durch ektopische Implantation von 3 bis 6 Tage alten Mäuseembryonen ins Hodengewebe einer adulten Maus zu erzeugen. Nach intraperitonealer Injektion solcher Teratokarzinome in eine weitere Maus entwickelten sich sog. «embryoid bodies», die undifferenzierte, totipotente Zellen enthielten und morphologisch den Mäuseembryonen sehr ähnlich sahen. Diese «embryoid bodies» lassen sich über viele Generationen weiterzüchten. Solche totipotente Teratokarzinomzellen wurden mit dem Transgen transfektiert und anschliessend entweder in die Bla-



Figur 1 Drei Methoden zur Erzeugung transgener Tiere. Das gewünschte Gen wird eingeführt durch: 1) direkte Mikroinjektion von mehreren Kopien der fremden DNA in den männlichen Vorkern, 2) Aggregation von transgenen, totipotenten Zellen mit frühen Teilungsstadien oder Injektion in die Blastozyste, oder 3) Infektion von frühen Teilungsstadien mit rekombinierten Retroviren. Weitere Details siehe Text. m: männlicher, w: weiblicher Vorkern (Pronukleus) mit je dem haploiden Chromosomensatz.



stozyste von Empfängerembryonen injiziert oder mit einem Embryo im Achtzellstadium aggregiert. Nach erfolgreicher Aufzucht entstanden gesunde Mosaiktiere (Chimären), deren Zellen sich teilweise vom Empfängerembryo, teilweise von den transgenen Teratokarzinomzellen herleiteten. Letztere verloren also ihren bösartigen Charakter, sobald sie Teil eines normalen Embryos wurden. Erwünscht ist die Integration der Teratokarzinomzellen in die Keimbahn der Chimären, weil dadurch das Transgen vererbbar wird. In der Zwischenzeit ist es möglich geworden, totipotente Zelllinien direkt aus in vitro kultivierten Mäuseembryonen zu isolieren, so dass man auf die Verwendung von Karzinomzellen nicht mehr angewiesen ist. Es zeigte sich dabei, dass die Kolonisierung der Keimbahn durch die «männlichen» Fremdzellen (XY) weit häufiger war als durch die «weiblichen» Zellen (XX). Die aufgenommenen neuen XY-Zellen wandelten weibliche Empfängerembryonen phänotypisch in Männchen um, die später fertil wurden. Dadurch verschob sich das Geschlechtsverhältnis der Chimären zugunsten der männlichen Population [10]. Diese Tatsache ist für die Tierzucht von grossem Interesse.

Der grosse Vorteil der Chimärenerzeugung liegt in der Möglichkeit, nur solche Zellen für die Verschmelzung mit dem Embryo auszuwählen, die bereits auf *erfolgreiche DNA-Integration* und *Expression* getestet wurden. Von besonderem Interesse wäre die Anwendung bei den Nutztieren, da diese Methode schneller und einfacher ist als die Mikroinjektion von DNA in befruchtete Eizellen.

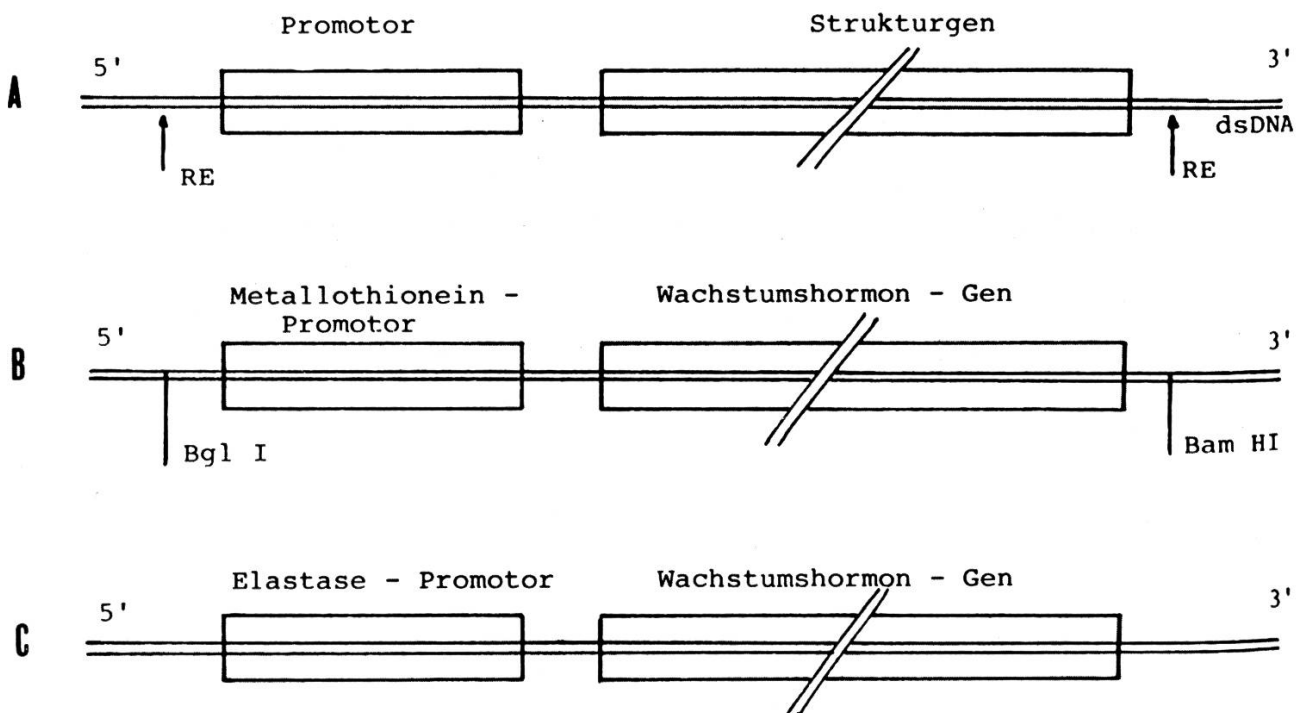
3. Retroviren als Vektoren des Transgens [11, 12]

Das genetische Material von Retroviren ist RNA. Letztere wird durch eine reverse Transkriptase in DNA rücküberschrieben und ins Wirtsgenom eingebaut. Das gewünschte Gen kann nun in einen apathogenen Retrovirusstamm eingeschleust werden. Mit diesem rekombinierten Virus infiziert man einen Embryo etwa im Achtzellstadium. Das Virus baut sich samt dem Transgen in alle Embryonalzellen ein. Die Vorteile dieser Methode sind: (a) das Verfahren ist einfach, (b) es lassen sich viele Zellen gleichzeitig infizieren, (c) es werden *Einzelkopien* dieser DNA ins Wirtsgenom eingebaut. Nachteile dagegen sind: (a) Die Konstruktion der Virusrekombinante ist aufwendig, (b) die Länge des einzubauenden Transgens ist limitiert, (c) die Vererbung des Transgens kann ausbleiben, wenn die künftigen Keimzellen von der Infektion ausgespart werden, (d) die Retrovirus-DNA kann sich als Fremdling auf die Lebensfähigkeit der Embryonen nachteilig auswirken, und (e) es besteht potentiell die Gefahr einer Verschleppung des Retrovirus. Aus diesen Überlegungen wird diese Methode relativ selten angewendet.

Figur 2 *Mikroinjektion der DNA*. A) Die befruchtete Eizelle vor der Mikroinjektion des Transgens. Links die Festhaltepipette, rechts die Injektionskanüle, welche die Eizelle bereits penetriert hat und sich im männlichen Pronukleus befindet. Etwas unterhalb davon ist der weibliche Pronukleus sichtbar. B) Die Eizelle nach der Mikroinjektion. Der stark angeschwollene, männliche Pronukleus ist gut sichtbar. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. G. Brem, München).

Riesenmäuse: der Metallothionein-Durchbruch

Bis Ende 1981 waren sechs wichtige Publikationen über die Mikroinjektion von DNA in murine Eizellen erschienen [13–18]. Die Applikation dieser Methode lag in der Luft. Da veröffentlichte die Arbeitsgruppe um *Palmiter* und *Brinster* die erfolgreiche Herstellung von transgenen Riesenmäusen [19]. Diese entstanden durch die Einführung eines Genkonstruktes, das sich aus dem Promotor für Metallothionein und dem Strukturgen für das Wachstumshormon zusammensetzte (Fig. 3 A, B). Metallothionein ist ein schwermetallbindendes Protein der Leber, der Milz und des Darms, welches bei Kontakt mit Cadmium, Zink und Kupfer induziert wird und dadurch eine Schutzfunktion vor diesen toxischen Schwermetallen ausübt. Die Induktion erfolgt dabei am Metallothionein-Promotor (siehe Lit. 1, Fig. 8 und 9). Dieser arbeitet sehr effizient, d. h. bereits sehr geringe Mengen von Cadmium (4 μ M) führen zu einer 50fach gesteigerten Metallothioneinsynthese. Der Metallothionein-Promotor wurde mit dem Strukturgen für das Wachstumshormon der Ratte zu einem *Metallothionein-Wachstumshormon-Fusionsgen* verschmolzen. Die Absicht war, das Fusionsgen ins Erbgut einer Maus einzuführen und anschliessend die Synthese des Wachstumshormons durch Verabrei-



Figur 3 *Fusionsgene*. A) Allgemeines Prinzip. Dem zur Expression vorgesehenen Strukturgen wird ein Promotor der Wahl vorgesetzt (Details siehe Lit. 1, Fig. 8 und 9). dsDNA: doppelsträngige DNA, RE: Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen, wie z.B. BglI, BamHI. B) Fusionsgen bestehend aus dem Metallothionein-Promotor und dem Strukturgen für das Wachstumshormon der Ratte (ohne eigenen Promotor). Dieses DNA-Fragment wurde mit BglI und BamHI aus dem Vektor pBR 322 herausgeschnitten und danach – wie in Fig. 1 beschrieben – in eine befruchtete Eizelle mikroinjiziert. C) Fusionsgen bestehend aus dem Elastase-Promotor und dem Strukturgen für das Wachstumshormon (ohne eigenen Promotor).

chung von Cadmium anzukurbeln. Würden die Mäuse ins Unermessliche wachsen? Ein potentieller Patient mit Wachstumsschwierigkeiten, die sog. «dwarf little mouse», sass bereits im Wartezimmer. Diese Mutante weist einen genetischen Defekt im Lokus des Wachstumshormons auf.

Etwa 600 Kopien dieses Fusionsgens wurden zunächst in die befruchteten Eizellen normaler Labormäuse injiziert. Im ersten Experiment entwickelten sich aus 170 injizierten Eiern 21 Jungtiere, sieben davon trugen das Gen. Nach wiederholter Verabreichung von Cadmium stieg der Wachstumshormon-Blutspiegel bei sechs der sieben Tiere deutlich an und führte zu durchschnittlich 50% grösserem Wachstum als bei den Kontrolltieren. Obwohl der Hormonspiegel bereits bei 13 Tage alten Föten erhöht war, begannen die Tiere erst etwa drei Wochen nach der Geburt übermässig zu wachsen und erreichten ihr Höchstgewicht in der 12. Lebenswoche [5]. Spätere Versuche mit der «dwarf little mouse» zeigten, dass sich der genetische Defekt durch Einführung des Fusionsgens korrigieren lässt; die transgenen Zwergmäuse wurden ca. dreimal grösser als ihre nicht transgenen Geschwister. Eine weitere interessante Beobachtung betraf das Fortpflanzungsgeschehen: die Fruchtbarkeit der «dwarf little mouse» ist bei Weibchen normal und bei Männchen reduziert; bei Trägern des Fusionsgens war merkwürdigerweise die Relation gerade umgekehrt [7].

Erwartungsgemäss erfolgte die Expression des Wachstumshormons nicht in der Hypophyse, dem Ort der physiologischen Wachstumshormonsynthese, sondern in Leber, Niere und Darm, in Organen also, in denen das Metallothionein gebildet wird. Die Frage, ob man den Expressionsort eines Transgens ganz allgemein durch Wahl eines geeigneten Promotors steuern könnte, drängte sich sofort auf. Der Ersatz des Metallothionein-Promotors durch den Elastase-Promotor führte zu einer ersten Antwort [20]. Elastase – ein proteolytisches Enzym – wird spezifisch in den azinären Pankreaszellen exprimiert. Demzufolge müsste ein *Elastasepromotor-Wachstumshormon-Fusionsgen* (Fig. 3C) ebenfalls dort exprimiert werden. Die Erwartungen wurden erfüllt. Allerdings wurde kein erhöhtes Wachstum der transgenen Mäuse festgestellt, da das Wachstumshormon via Ductus pancreaticus in den Darmtrakt gelangte, wo es abgebaut wurde.

Mit grossen Mäusen kann man allerdings der Landwirtschaft nicht dienen. *Hammer* und Mitarbeiter [21] führten deshalb Versuche durch mit dem Ziel, das Metallothionein-Wachstumshormon-Fusionsgen ins Genom des Schweines einzuführen und anschliessend exprimieren zu lassen. Die transgenen Schweine zeigten jedoch kein grösseres Wachstum als die Kontrolltiere, eine Tatsache, die nicht weiter erstaunte, zeigten doch Kontrollschweine nach exogener Applikation von Wachstumshormon kaum eine Wachstumssteigerung. Spekulativ wird behauptet, dass das Hausschwein dank jahrhundertlanger Züchtung bereits eine innere Wachstumslimite erreicht hat. Entsprechende Resultate beim Kaninchen stehen noch aus.

Influenzaresistente Nutztiere dank dem Mx-Protein?

Gewisse Mäusestämme weisen eine Resistenz gegen das Influenzavirus auf. Prof. J. Lindenmann (Institut für Immunologie und Virologie der Universität Zürich) stellte fest, dass diese Widerstandskraft im Genom der Tiere verankert ist [3]. Das verantwort-

liche Resistenzgen trägt den Namen *Mx* (myxovirus-resistant), befindet sich auf Chromosom 16 und wird dominant vererbt. Influenzavirusempfindliche Mäuse tragen ein defektes *Mx*-Gen und erkranken bei einer Infektion schwer, Todesfälle sind häufig. Der Resistenzmechanismus des *Mx*-Gens bzw. seines Genprodukts, des *Mx*-Proteins, ist nicht genau bekannt. Man weiss lediglich, dass eine Interaktion mit dem Interferon stattfindet. Interferon greift Viren nicht direkt an; vielmehr übt es eine Signalwirkung aus, unter anderem auf das *Mx*-Gen, das seinerseits zur Expression des *Mx*-Proteins in Lunge und Leber angeregt wird. *Mx*-positive Mäuse erkranken zwar leichtgradig, genesen aber sehr schnell. Ein *Mx*-Protein ähnliches Eiweiss wurde bereits in Zellen von Mensch und Ratte gefunden [22].

Influenzainfektionen bedeuten nicht nur bei Labormäusen ein Problem, sondern auch bei Pferd, Schwein und Geflügel. Influenzakeranke Pferde können je nach Immunitätslage mehrere Wochen bis Monate nicht voll geritten werden, geschweige denn an Wettbewerben teilnehmen. Die in Europa wieder aufgetretene Schweineinfluenza hinterlässt nach überstandener Krankheit starke Leistungseinbussen, wie Gewichtsverlust und verzögerte Gewichtszunahme. Eine allzeit wirksame Schutzimpfung gegen Schweineinfluenza ist bis heute nicht bekannt. Schliesslich spielen die Vögel bei der Influenza eine epidemiologisch wichtige Rolle. Sie scheiden das Virus im Kot aus. Man glaubt, dass durch natürliche Rekombination von Menschen-, Vogel-, Schweine- und möglicherweise auch Pferdeinfluenzaviren alle 10–15 Jahre antigenetisch «neue» Virusstämme entstehen, gegen welche die Bevölkerung keine Immunität besitzt. Folge davon sind die periodisch wiederkehrenden menschlichen Influenzapandemien. Diese Pandemien gehen meist von China aus, wo Menschen seit jeher in engem Kontakt mit Enten und Schweinen zusammenleben [23]. Eine solche Influenzapandemie forderte 1918–19 gegen 40 Millionen Todesopfer. Andererseits erleidet die Geflügelproduktion in den Vereinigten Staaten bei Influenzabefall grosse wirtschaftliche Verluste.

Grundsätzlich sollte es doch möglich sein, das Resistenzgen der *Mx*-Maus ins Genom dieser Nutztiere einzubauen. Prof. C. Weissmann (Institut für Molekularbiologie I der Universität Zürich) stellte deswegen in Zusammenarbeit mit den Professoren J. Lindenmann und O. Haller *Mx*-Genkonstrukte für diesen Zweck her. Diese werden zur Zeit von Dr. G. Brem am Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät in München auf ihre Eignung zur Erzeugung von *Mx*-Schweinen untersucht [24]. Dabei erwies sich die Mikroinjektion des Transgens als äusserst schwierig. Die Eizellen des Schweines sind nämlich opalfarbig und müssen zur Sichtbarmachung der Vorkerne zuerst zentrifugiert werden. Die Überlebenschance der Zygoten ist eingeschränkt und die Trächtigkeitsrate beträgt nur 5%. Weniger als ein Zehntel davon tragen das Transgen. Mit anderen Worten: aus 1000 Zygoten erhält man maximal fünf, meist aber nur ein einziges transgenes Tier. Aus diesem Grund ist man bemüht, auf die wirtschaftliche und zeitsparende Methodik der Chimärenherstellung mit den totipotenten Zellen (Fig. 1) auszuweichen, was aber bis anhin noch nicht gelungen ist. Physiologische Daten über das erste *Mx*-Schwein stehen noch aus. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass auch an der Herstellung *stressresistenter Schweine* gearbeitet wird [4]. Man möchte das verantwortliche Resistenzgen – vielleicht gleich zusammen mit dem *Mx*-Gen? – ins Erbgut unserer Zuchtschweine einschleusen.

Die Herstellung von *Mx-Hühnern* verlangt wegen den besonderen anatomischen Verhältnissen von Ovar und Infundibulum, der fehlenden Möglichkeit zur Superovulation und der Polyspermie (ca. 30 Spermien penetrieren das Ei) eine andere Strategie. Anfangs Juli 1987 wurde an einer Konferenz in London (*Nature's 9th Intern. Conference, Plant and Animal Biotechnology*) eine vielversprechende Methode von einer schottischen Arbeitsgruppe (Dr. G. Bulfield, Edinburgh) vorgestellt. Man entnimmt die befruchteten Eier im Einzellstadium aus dem Ovidukt und vollzieht danach die ganze Entwicklung des Embryos in Kultur, später sogar in einer künstlichen Eischale. Die ersten 16 dieser *in vitro*-Küken schlüpften problemlos und sind völlig gesund. Es wird sich in den nächsten Jahren zeigen, ob sich Transgene im Einzellstadium einbauen und zur Expression bringen lassen. Vielleicht wird es dann auch möglich sein, transgene *Mx-Hühner* mit Influenzaresistenz zu erzeugen. Berichte über den Versuch, transgene Pferde herzustellen, liegen bisher keine vor.

«Gene Farming»: Die Milchdrüse als Bioreaktor

Ende September 1986 berichtete Dr. L. Archibald (Edinburgh) anlässlich des Symposiums «Bio-Genetic Engineering for Animal Production» in Grangeneuve über die biotechnologische Produktion von Fremdproteinen in der Milch [25]. Die Arbeit erschien anfangs August 1987 in der Zeitschrift «*Nature*» [26]. Der schottischen Arbeitsgruppe war es gelungen, in der Milchdrüse einer transgenen Maus das ovine β -Laktoglobulin produzieren zu lassen. β -Laktoglobulin macht den Hauptanteil der Molkenproteine aus und kommt nur in der Milch von Wiederkäuern vor. Das klonierte Gen wurde vom Schaf gewonnen und in die Eizellen der Mäuse mikroinjiziert. Von 325 injizierten Eiern wurden 199 in Ammen reimplantiert, was zur Geburt von 46 Mäusen führte; 16 davon waren transgen. Erwartungsgemäss wurde das β -Laktoglobulin spezifisch nur in der Milchdrüse synthetisiert. Störungen des physiologischen Gleichgewichts wurden keine festgestellt.

Der Gebrauch der «Milchdrüse als Bioreaktor» zur Erzeugung technisch schwer herstellbarer Produkte könnte folgende Vorteile bringen:

a) Gewisse «fremde» Proteine lassen sich in *E. coli* nur schwer herstellen, da sie im Bakterium oft nicht korrekt modifiziert werden und deshalb biologisch inaktiv bleiben [2]. Ausserdem sind gewisse bakterielle Nebenprodukte für den Menschen toxisch, was die Aufbereitung und Reinigung der Fremdproteine erschwert. Die Milchdrüse des Säugetieres besitzt die erforderlichen Enzymsysteme in einer physiologischen Umgebung.

b) Die Gewinnung von Plasmaproteinen aus menschlichem Blut (z. B. Gerinnungsfaktoren) birgt ein Infektionsrisiko (AIDS, Hepatitis), das nicht vernachlässigt werden darf. Diese Gefahr besteht beim Einsatz transgener Tiere kaum.

c) Die Gene der wichtigsten Milchproteine (Kasein, α -Laktalbumin und β -Laktoglobulin) werden effizient exprimiert. Der Molekularbiologe spricht von einem starken Promotor. Es ist deshalb zu erwarten, dass ein Fusionsgen, bestehend aus einem Milchprotein-Promotor und einem Strukturgen für ein medizinisch interessantes Protein, von der Milchdrüse mit hoher Syntheserate produziert wird.

d) Proteine sind aus der Milch leicht isolierbar.

Durch den alleinigen Verzehr von einem halben Liter Milch kann der Tagesbedarf an den meisten essentiellen Aminosäuren gedeckt werden. Die Milch ist aber nicht für alle Menschen verträglich. Zum Beispiel führt die Laktose-Malabsorption, die auf eine stark reduzierte oder fehlende Aktivität der β -Galaktosidase im Darm zurückzuführen ist, zu profuser Diarrhoe. Während in Industrieländern weniger als 10% der Erwachsenen davon betroffen sind, leiden in den Mittelmeerländern 20–80%, in Afrika, Asien und Südamerika fast 100% der Bevölkerung unter dieser Unverträglichkeit [27]. Milchpulver für Länder der Dritten Welt ist deshalb heute vielfach frei von Laktose. Dieses Disaccharid wird durch Monosaccharide, wie Glukose, ersetzt. Man könnte nun biotechnologisch den Laktosegehalt der Milch über zwei Wege senken: Einerseits könnte die Expression der β -Galaktosidase im Euter erhöht und damit der Abbau der Laktose gefördert werden. Andererseits könnte man die Translation von Proteinen, die an der Synthese des Milchzuckers beteiligt sind, unterbinden. Ein solches Protein ist beispielsweise das α -Laktalbumin, das eine Untereinheit der Laktose-Synthetase darstellt. Durch das Einschleusen einer «antisense»-Kopie dieses α -Laktalbumin-Gens in ein transgenes Tier würde während der Laktation eine «antisense»-mRNA synthetisiert. Dies würde die gleichzeitig synthetisierte komplementäre «sense-mRNA» des natürlich vorkommenden α -Laktalbumin-Gens durch Basenpaarung inaktivieren und deren Translation wie gewünscht verhindern (siehe Lit. 1, Fig. 9).

Als weitere Anwendungsmöglichkeit des «gene farming» soll schliesslich die Produktion *euterfremder Proteine* kurz vorgestellt werden. So erwähnt *Simons* [26] die erfolgreiche Erzeugung transgener Schafe, die ein β -Laktoglobulin-Gerinnungsfaktor IX-Fusionsgen oder ein β -Laktoglobulin- α 1-Antitrypsin-Fusionsgen tragen. Das Fehlen des Blutgerinnungsfaktors IX (Christmas-Faktor) führt beim Menschen zur Hämophilie B, und der α 1-Antitrypsin-Mangel ist eng mit dem Auftreten des Lungenemphysems beim Menschen vergesellschaftet. Vom β -Laktoglobulin-Segment erhofft man sich das milchdrüsenspezifische Signal. Gespannt wartet man nun auf die erste Laktation dieser transgenen Schafe.

Mit einem analogen System arbeitet Prof. G. Stranzinger (Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich). Auch in diesem Fall dient die Milchdrüse als Bioreaktor. Statt des β -Laktoglobulin-Promotors wird aber der ebenfalls euterspezifische Kasein-Promotor verwendet. Viele pharmazeutisch wichtige Produkte könnten mit diesem System erzeugt werden, z. B. das anfangs erwähnte Interferon, monoklonale Antikörper, Hormone, virale Proteine zur Verwendung als «Subunit»-Vakzinen und therapeutisch interessante Serumproteine. Bislang ist allerdings nicht geklärt, inwieweit fremde Proteine vom Euter korrekt modifiziert werden und hernach in der Milch stabil sind. Überdies ist unbekannt, ob eine Überproduktion von biologisch hochaktiven Produkten (z. B. Interferon) und deren eventueller Transport ins Blut für die Tiere selbst problematisch ist. Schliesslich soll noch die Möglichkeit erwähnt werden, medizinisch wichtige Proteine im Hühnerei zu erzeugen.

Diskussion

Transgene Tiere eröffnen neue Wege auf drei grundsätzlich verschiedenen Gebieten: (A) in der Grundlagen- und angewandten Forschung zum Studium wichtiger me-

dizinisch-biologischer Probleme, (B) in der Tierzucht zur Entwicklung ertragreicherer Nutztiere und (C) in der pharmazeutischen Industrie zur Produktion biologisch aktiver Proteine in Milch und Ei.

(A) *Forschung*

Die transgene Maus ist in erster Linie ein Werkzeug der Forschung. Es ist zwar möglich geworden, fremde DNA ins Genom zu integrieren, doch sind Integrationsort sowie Ausmass, Zeitpunkt und Gewebsspezifität der Genexpression noch nicht beherrschbar. Aus diesen Gründen ist eine Prognose über die biologische Wirkung eines Transgens kaum möglich. Aber gerade die Beeinträchtigung der Integrität des Empfängergenoms kann wichtige Anhaltspunkte über molekularbiologische Wechselwirkungen im Chromosom liefern. Transgene Tiere ermöglichen die Erforschung der Genregulation (z. B. An- und Abschalten von Genen), der embryonalen Entwicklung, der Tumorentstehung und anderer physiologischer und pathologischer Vorgänge.

(B) *Tierzucht*

Seit über 10 000 Jahren versucht der Mensch durch gezielte Züchtung die Leistung der Nutztiere zu verbessern. Die Einführung der künstlichen Besamung hat den Zuchterfolg sprunghaft erhöht. Heute stehen wir vor einem Fleischberg und einem Milchsee von kaum überblickbarer Grösse, während unsere Kühe von Jahr zu Jahr höhere Milchleistungen erbringen. Der Zuchtfortschritt auf Populationsebene in bezug auf Leistung wird auf 1–2% pro Jahr geschätzt, eine Effizienz, die wesentlich höher liegt, als bei transgenen Tieren zu erwarten ist. Diese müssten nach grossem Arbeitsaufwand während drei Generationen als Zuchtlinie selektioniert werden. Eine quantitative Leistungssteigerung durch transgene Techniken wäre deshalb unwirtschaftlich, unnötig oder gar kontraproduktiv. Es wird in erster Linie um *qualitative* Verbesserungen wie Resistenzerhöhung, Anpassungsfähigkeit und Veredlung tierischer Produkte (z. B. bessere Wollqualität beim Schaf) gehen. Einen wichtigen Punkt bilden dabei die tierschützerischen Aspekte, die unter keinen Umständen vernachlässigt werden dürfen. Es liegt beispielsweise nicht im Sinne einer vernünftigen Wissenschaft, dass ein transgenes Riesenschwein als Nebeneffekt eine Osteochondrose davonträgt. Letztlich darf die Erzeugung transgener Tiere keine Verarmung des natürlichen Genreservoirs bewirken.

(C) *Pharmazie*

Die Möglichkeit zur Gewinnung medizinisch wichtiger Proteine aus der Milch ist verlockend. Sollte sich diese Methode als durchführbar erweisen und die Expression des Transgens nicht auf Kosten der Gesamtphysiologie und Gesundheit des Tieres gehen, so wäre die Gewinnung gewisser Medikamente stark vereinfacht. Der grosse Vorteil läge darin, dass man hochgereinigte Proteine in grossen Mengen billig herstellen könnte. Es gibt Schätzungen, die voraussagen, dass zehn transgene Schafe genügen würden, um den jährlichen Weltbedarf von 1 kg des Blutgerinnungsfaktors IX zu decken. Dieser entspricht einem Marktwert von 25 Mio US-Dollar. Weitere Anwendungs-

beispiele wären Proteohormone, Enzyme, «Subunit»-Vakzinen und andere, mit konventionellen Methoden nicht herstellbare Medikamente. Gelänge dank dem «gene farming» auch die Produktion mono- und polyklonaler Antikörper für Diagnostik und Therapie, könnte man sich den Einsatz vieler Labortiere ersparen. Ausserdem wäre eine solche transgene Herstellung von Medikamenten weit weniger umweltbelastend und erst noch energiesparend gegenüber der herkömmlichen Produktion.

Ob diese hochgesteckten Ziele zu verwirklichen sind, wird uns die Zukunft zeigen. Die Schweiz sollte hier jedoch nicht abseits stehen und aktiv an dieser Forschung teilnehmen. Deswegen hat sich durch Zusammenschluss von verschiedenen Instituten der Universität Zürich und der ETH eine Interessengemeinschaft «Transgene Tiere Zürich» gebildet. Ihr Ziel ist die Förderung der Nutztierforschung auf diesem vielversprechenden Gebiet.

Zusammenfassung

Das Einschleusen fremder DNA in das Erbgut von Empfängerorganismen gelingt heute nicht nur in Bakterien und Hefen, sondern auch in Säugetieren. Tiere, welche das Fremdgen (Transgen) stabil in ihr Genom eingebaut haben, nennt man transgen. Sie vererben das Transgen an ihre Nachkommen. Erwünscht ist die Expression der Fremdgene, d.h. die Synthese der entsprechenden Proteine im Empfängertier. Man verspricht sich Fortschritte in der Grundlagenforschung (z. B. Kenntnisse über das An- und Abschalten von Genen), qualitative Leistungsverbesserung der landwirtschaftlichen Nutztiere (z. B. Resistenzerhöhung) und die Erzeugung therapeutisch wichtiger Proteine in Milch und Ei (z. B. Proteohormone und Gerinnungsfaktoren). Die hauptsächlich verwendeten Methoden zur Erzeugung von transgenen Tieren sind [1] die Mikroinjektion des Transgens in die befruchtete Eizelle, [2] die Verschmelzung von transgenen, totipotenten Zellen in einem Empfängerembryo zu einer Chimäre und [3] die Infektion früher Embryonalstadien mit rekombinierten Retroviren, die sich samt der fremden DNA in das Genom des Embryos einbauen.

Résumé

L'introduction d'ADN étranger dans le génome d'organismes récepteurs n'est pas restreinte aux bactéries et aux levures, mais se réalise aujourd'hui également dans les mammifères. Les animaux qui ont intégré le gène étranger (transgène) de manière stable dans leur génome sont appelés transgéniques. Ils transmettent le transgène à leurs descendants. On cherche avant tout à faire exprimer des gènes étrangers, c'est-à-dire à obtenir la synthèse de protéines correspondantes à ces gènes dans l'animal récepteur. Ce procédé devrait permettre ainsi des progrès dans la recherche des mécanismes de base (par ex. connaissance de la régulation des gènes), des améliorations qualitatives de la production des animaux de rente (par ex., augmentation de la résistance) et la production de protéines thérapeutiques dans le lait et les œufs (par ex. protéohormones et facteurs de coagulation). Les méthodes principales utilisées pour la production d'animaux transgéniques sont: 1) la microinjection du transgène dans l'ovule fécondé, 2) la fusion des cellules transgéniques totipotentes dans l'embryon récepteur afin de créer une chimère et 3) l'infection des stades précoces embryonnaires avec des rétrovirus recombinés, qui s'intègrent avec l'ADN étranger dans le génome de l'embryon.

Riassunto

L'introduzione di DNA estraneo nel genome di un organismo ricevitore è oggi possibile non solo nei batteri e nei lieviti ma anche nei mammiferi. Gli animali che possiedono nel loro genoma un gene estraneo (transgene), stabilmente integrato, vengono chiamati animali transgenici. Così, il gene estraneo diventa ereditabile. Il pieno successo, tuttavia, dipende dalla corretta espressione del gene, dal fatto cioè che la proteina specifica venga sintetizzata dalle prole. La generazione di animali transgenici promette (a) di penetrare più a fondo nei meccanismi fisiologici di base (per es. la regolazione genica),

(b) di migliorare la produttività del bestiame (per es. rendendolo resistente verso certe malattie), e (c) di aprire nuove vie per la produzione di proteine biologicamente attive, per es. protoormoni o fattori di coagulazione del sangue (che vengono oggi preparate, con non poche difficoltà) partendo dal latte o dalle uova degli animali da fattoria. Fra le più importanti tecniche per generare animali transgenici possiamo annoverare: (1) la microiniezione del transgene nelle uova fertilizzate, (2) l'aggregazione delle cellule transgeniche totipotenti con un embrione ricevente, così da produrre una chimera, e (3) l'infezione di un embrione in uno stadio precoce dell'ontogenesi con retrovirus ricombinanti quali, una volta nelle cellule embrionali, integreranno nel genoma dell'animale ricevente il proprio DNA contenente il DNA estraneo.

Abstract

The introduction of foreign DNA into the genome of recipient organisms is possible today not only in bacteria and yeast but also in mammals. Animals that have stably integrated a foreign gene (transgene) into their genome are referred to as being transgenic. Thus, the foreign gene becomes heritable. The ultimate success, however, depends on whether the gene also becomes properly expressed, i.e. whether the protein specified by the introduced gene is being synthesized by the offspring. The generation of transgenic animals promises (a) to yield new insights into basic physiological mechanisms (e.g. gene regulation), (b) to enhance the productivity of livestock (e.g. by providing disease resistance) and (c) to open up new ways in the production of pharmacologically active proteins (e.g. proteohormones and blood clotting factors), otherwise difficult to prepare, by being secreted in the milk and eggs of farm animals. Major techniques for generating transgenic animals involve (1) microinjection of the transgene into a fertilized ovum, (2) aggregation of transgenic, totipotent cells with a recipient embryo to produce a chimera, and (3) infection of an early stage embryo with recombinant retroviruses, which subsequently integrate into the recipient's genome together with the foreign DNA.

Literatur

- [1] *Hübscher U.*: Gentechnologie und Veterinärmedizin. I Generelles Prinzip und praktische Anwendungsbeispiele. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde* 129, 513–528 (1987). – [2] *Hübscher U.*: Gentechnologie und Veterinärmedizin. II Gentechnologisch hergestellte Vakzinen und Analyse hochvariabler DNA-Abschnitte. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde* 129, 553–564 (1987). – [3] *Lindenmann J.*: Inheritance of resistance to influenza virus in mice. *Proc. Soc. Exp. Med.* 116, 506–509 (1964). – [4] Bericht der Enquete-Kommission «Chancen und Risiken der Gentechnologie». Deutscher Bundestag, 10. Wahlperiode, Drucksache 10/6775 (1987). – [5] *Brinster R. L., Palmiter R. D.*: Introduction of genes into the germ line of animals. *Harvey Lectures, Series 80*, 1–38, New York (1986). – [6] *Tam A. W.*: Gene transfer by direct pronuclei microinjection. In: *Genetic engineering of animals* (Evans J. W. and Hollaender A., eds.). *Basic Life Sci. Plenum Press, New York* 37, 187–194 (1986). – [7] *Palmiter R. D., Brinster R. L.*: Germ-line transformation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 20, 465–499 (1986). – [8] *Brem G.*: Mikromanipulationen an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht. (copythek) Enke Verlag, Stuttgart, 136–139 (1986). – [9] *Gardner R. L.*: Mouse chimaeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 220, 596–597 (1968). – [10] *Robertson E., Bradley A., Kuehn M. and Evans M.*: Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445–448 (1986). – [11] *Van der Putten H., Botteri F. N., Miller A. D., Rosenfeld M. G., Fan H., Evans R. M. and Verma I. M.*: Efficient insertion of genes into germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148–6152 (1985). – [12] *Anderson W. F., Kantoff P. W., Eglitis M. A. and Gilboa E.*: Gene transfer into animals by retroviral vectors. In: *Genetic engineering of animals* (Evans J. W. and Hollaender A., eds.). *Basic Life Sci. Plenum Press, New York* 37, 59–65 (1986). – [13] *Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J., Barbosa J. A. and Ruddle F. H.*: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7380–7384 (1980). – [14] *Wagner E. F., Stewart T. A. and Mintz B.*: The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5016–5020 (1981). – [15] *Wagner T. E., Hoppe P. C., Jollick J. D., Scholl D. R., Hodinka R. L. and Gault J. B.*: Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and

their offspring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6376–6380 (1981). – [16] *Costantini F. and Lacy E.*: Introduction of a rabbit β -globin gene in the mouse germ line. Nature 294, 92–94 (1981). – [17] *Brinster, R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Senear A. W., Warren R. and Palmiter R. D.*: Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. Cell 27, 223–231 (1981). – [18] *Harbers K., Jahner D. and Jaenisch R.*: Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes: integration and expression in the animal. Nature 293, 540–542 (1981). – [19] *Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C. and Evans R. M.*: Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300, 611–615 (1982). – [20] *Swift G.H., Hammer R.E., MacDonald R.J., Brinster R.L.*: Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase 1 gene in transgenic mice. Cell 38, 639–46 (1984). – [21] *Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E.Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D. and Brinster R.L.*: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. Nature 315, 680–683 (1985). – [22] *Staheli P. and Haller O.*: Interferon-induces Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus. In: Interferon 8 (Gresser, I. ed.) Academic Press, New York, in press (1987). – [23] *Shortridge K.F. and Stuart-Harris C.H.*: An influenza epicentre? Lancet, 8302, 812–813 (1982ii). – [24] *Brem G.*: Gene transfer into pigs by DNA-microinjection into pronuclei. In: Germline manipulation of animals, EMBO-Workshop, Nethybridge (Scotland), p. 41 (1987). – [25] *Archibald L.*: Germline manipulation in livestock, Swiss Biotech 4 (6), 15–17 (1986). – [26] *Simons J.P., McClenaghan M. and Clark A.J.*: Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. Nature 328, 530–532 (1987). – [27] *Kielwein G.*: Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene. Pareys Studentexte 11, Berlin und Hamburg (1976).

Manuskripteingang: 21. September 1987

BUCHBESPRECHUNG

Plant Poisoning in Animals. A Bibliography from the World Literature. No. 2, 1980–1982, herausgegeben von Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, U. K. Bearbeitet von *M. R. Hails*, 1986. Preis £ 15.– oder US \$ 28.50.

Diese im wesentlichen aus dem Veterinary Index und dem Veterinary Bulletin ausgezogene Bibliographie wird für alle an pflanzlichen Vergiftungen beim Tier Interessierte ein wertvolles Instrument sein. Auf 69 zweiseitigen Seiten werden eine 6seitige Einleitung und anschliessend Kurzreferate unter den Titeln Photosensibilisierung, Giftstoffe (Allgemeines, Alkaloide, cyanogene Glykoside, Nitrate, Östrogene), Geographisches (Afrika, Asien, Australien, Europa, USA, Südamerika), Angiosperma, Gymnosperma, Farne, Algen, Flechten gebracht. Dann folgen 23 Seiten Register (Autoren, Pflanzenarten, Tierarten, Giftstoffe, Symptome und Pathologie, Geographische Verteilung).

Die praktische Bedeutung (teilweise vielleicht eher die Intensität der wissenschaftlichen Bearbeitung oder aber die Dichte der Excerptionen durch Weybridge: Sprachprobleme?) der Pflanzenvergiftungen von Tieren lassen sich an der Anzahl Pflanzen im geographischen Index ablesen: Australien 42 (!), Brasilien 18, Indien 21, Südafrika 17, USA 51 (!) als echter Ausdruck der Problematik, China 7 und UdSSR 5, vermutlich eher als Informations-Vakua!

Aus der Schweiz sind nur *Senecio alpinus*, *Sinapis alba* und *Trisetum flavescens* (wovon 2 der angeführten 6 Arbeiten aus dem SAT!) erwähnt. Ob die Computertechnik immer befriedigt, muss man sich wieder einmal fragen: aus der Bundesrepublik ist nur der Goldhafer mit 2 Nummern angegeben (im Register), in den Referaten findet sich richtigerweise ein rundes Dutzend weiterer Arbeiten zum Thema, zumeist aus der Münchener Schule (G. Dirksen u. a.).

R. Fankhauser, Bern