
Aus dem Genzentrum der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand:
Prof. Dr. Rudolf Grosschedl

**Expression eines rekombinanten humanen Proteins
in vitro und *in vivo* in Eileiterzellen des Huhnes,
am Beispiel von humanem Erythropoietin, hrEPO**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Moritz von Specht

aus

München

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Enders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. D. Rupprecht
Priv. Doz. Dr. T. M. Strom

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Horst Domdey

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2002

Für Barbara, Uli, Katharina und Florian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1. Transgene Tiere als Bioreaktoren	8
1.2. Transgene Hühner	10
1.3. Der Ovalbuminpromotor	13
1.4. Virofektion	15
1.5. Erythropoietin (EPO)	19
2. Zielsetzung	21
3. Material	22
3.1. Geräte	22
3.2. Chemikalien und Biochemikalien	24
3.3. Enzyme	26
3.4. Kulturmedien, Lösungen und Puffer	26
3.5. Kits für molekularbiologische Arbeiten	27
3.6. Bakterienstämme und Plasmide	28
3.7. EPO-Gen	28
3.8. Versuchstiere	28
3.9. Oligonukleotide	29
4. Methoden	30
4.1. Arbeiten mit DNA	30
4.1.1. Phenol-/Chloroform -Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren	30
4.1.2. Dephosphorylierung von DNA	31
4.1.3. Agarose-Gelelektrophorese	31
4.1.4. Generierung glatter DNA-Enden von PCR-Produkten	32
4.1.5. Bestimmung von DNA-Konzentrationen	32
4.1.6. Ligation von DNA	33
4.1.7. Mini-Präparation nach der modifizierten „boiling method“ [67]	34
4.1.8. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
4.1.9. Restriktionshydrolyse	36
4.1.10. DNA-Sequenzierung	36
4.2. Arbeiten mit Bakterien (E. coli)	40
4.2.1. Anlegen von Dauerkulturen	40
4.2.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen (EMBL-Sequencing Manual 1990)	40
4.2.3. Elektroporation	40
4.3. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen und Geweben	41

4.3.1. Anästhesie der Hühner	41
4.3.2. Gewinnung einer primären Oviduktzellkultur	42
4.3.3. Gewinnung primärer fetaler Leberzellen von Hühnerembryonen	43
4.3.4. Gewinnung einer embryonalen Fibroblastenkultur	44
4.3.5. Lipofektion	45
4.3.6. Virofektion	45
4.3.7. <i>In vivo</i> Genegun-Transfektion	46
4.4. Arbeiten mit Proteinen	48
4.4.1. Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA).....	48
5. Ergebnisse	49
5.1. Identifikation eines geeigneten Promotorbereiches aus dem Ovalbumingen.....	49
5.1.1. Klonierung der Promotorkonstrukte pOVP und pOVP+exo.....	49
5.1.2. Transfektion einer primären Oviduktzellkultur.....	51
5.2. Expression von Erythropoietin in Oviduktzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	52
5.2.1. Konstruktion von pCMV EPO EGFP.....	53
5.2.2. Konstruktion von pOVP EGFP.....	53
5.2.3. Konstruktion von pOVP EPO EGFP.....	55
5.2.4. Expression von Erythropoietin in einer primären Ovidukt-Zellkultur.....	56
5.2.5. Expression von Erythropoietin <i>in vivo</i> in Oviduktzellen des Huhnes durch gene-gun-Transfektion und Nachweis des Hormons im Hühnerei.....	59
5.2.6. Versuche zum histologischen Nachweis einer <i>in vivo</i> -Aktivität des klonierten Ovalbuminpromotorfragmentes.....	62
5.3. Anwendung eines viralen Transfektionssystems auf Eileiterzellen des Huhnes zur Expression von Erythropoietin.....	62
5.3.1. Konstruktion von pLZ OVP EGFP, pLZ CMV EPO EGFP und pLZ OVP EPO EGFP.....	62
5.3.2. Test der Expressionsfähigkeit der viralen Vektoren pLZ OVP EGFP, pLZ OVP EPO EGFP und pLZ CMV EPO EGFP in fetalen Leberzellen.....	66
5.3.3. <i>In vivo</i> Expression von Erythropoietin nach gene-gun Transfektion des Oviduktes mithilfe retroviraler Konstrukte	68
6. Diskussion	70
6.1. Nachweis der Aktivität des Ovalbuminpromotors in Primärkulturen von Hühneroviduktzellen.....	72
6.2. Nachweis von humanem Erythropoietin im Überstand transfizierter primärer Hühnereileiterzellen.....	74
6.3. Nachweis von humanem Erythropoietin in den Eiern nach <i>in vivo</i> Transfektion von Hühnern	75
6.4. Der Einsatz von „Virofektion“ bringt keine Verbesserung der Expressionsrate von humanem EPO im Wirtsorganismus Huhn.....	77
7. Zusammenfassung	80
8. Literaturverzeichnis.....	82
8.1. numerisch	82
8.2. alphabetisch.....	86

9. Anhang.....	90
Lebenslauf.....	90
Danksagung.....	91

1. Einleitung

Durch das erweiterte Wissen um die Entstehung von Krankheiten, sind heute viele Proteine bekannt, deren Mangel oder Fehlen schwere Krankheiten auslöst. Als Beispiele seien Diabetes mellitus Typ I (Insulin), die Hämophilien (Gerinnungsfaktoren) oder Anämie (Erythropoietin) bei Nierenerkrankungen genannt.

Zwar ist es möglich diese Stoffe aus menschlichem Urin oder Blut zu reinigen und Patienten zu substituieren, jedoch sind die so gewonnenen Produkte extrem teuer, da sie im menschlichen Körper nur in sehr geringen Mengen vorkommen und entsprechend grosse Mengen Blut oder Urin verarbeitet werden müssen. Ein zweites, bisher nicht vollständig gelöstes Problem stellt die Infektionsgefahr beispielsweise mit Hepatitisviren dar, die von solchen Arzneimitteln trotz verbesserter Screening-Methoden nach wie vor ausgeht.

Auf der Suche nach Lösungen werden heute einige menschliche Proteine in Fermentern aus Mikroorganismen gewonnen, denen ein entsprechendes Gen eingeführt wurde. Man spricht dann von rekombinanten Proteinen. Einen limitierenden Faktor stellt jedoch die Unfähigkeit prokaryontischer Organismen dar, bestimmte postrtranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Glykosylierungen durchzuführen, die für die biologische Aktivität vieler Proteine Voraussetzung sind.

Dieser Nachteil trifft im allgemeinen nicht auf eukaryontische Zellen zu [1], die in Fermentern kultiviert in der Lage sind biologisch aktive Proteine zu produzieren.

Allerdings ist dieses Verfahren extrem teuer und aufwendig.

Eine Alternative versprechen transgene Tiere, die als lebende Bioreaktoren menschliche Proteine beispielsweise in die Milch sezernieren, ohne auf eine aufwendige Apparatur angewiesen zu sein [2].

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die postrtranslationale Modifikation dieser rekombinanten Proteine sich durchaus von der im Muttergewebe unterscheiden kann, was oft zu einer veränderten biologischen Aktivität und Pharmakokinetik führt [3].

1.1. Transgene Tiere als Bioreaktoren

Unter einem transgenen Organismus versteht man ein Lebewesen, in dessen Keimbahn eine neue Erbinformation eingeführt worden ist, und das in der Lage ist diese Erbinformation an seine Nachkommen weiterzugeben.

Seitdem es 1987 erstmals gelungen war Fremdproteine in Brustdrüsenzellen von Mäusen zu exprimieren und aus der Milch zu isolieren [4, 5], ist die Entwicklung transgener Tiere für die heterologe Expression sprunghaft vorangeschritten.

1992 gelang es erstmals den menschlichen Blutgerinnungsfaktor IX unter der Kontrolle des schafeigenen Beta-Laktoglobulinpromotors in Brustdrüsenzellen eines „Nutztieres“, nämlich eines Schafes zu exprimieren [6].

Inzwischen ist es gelungen, 17 heterologe Proteine [7] in einer Reihe von Nutztieren zu exprimieren, vor allem in Kühen [8, 9], Schafen [10-13] und Ziegen [14-16], aber auch in Schweinen [17, 18] und Hasen [9, 19-24].

Unter den erfolgreich exprimierten Proteinen finden sich sehr grosse und komplexe Proteine wie der menschliche Gerinnungsfaktor VIII (7,6 kb cDNA) [17], besonders kleine Proteine wie beispielsweise das Lachs-Calcitonin [9], das zu diesem Zweck an humanes α -Lactalbumin gekoppelt werden musste, aber auch Proteine, die in hohem Masse von posttranslationaler Aktivität abhängig sind, wie beispielsweise das humane Protein C [2] und humanes Antithrombin III [25].

Nach wie vor stellt die Generierung transgener Tiere als Bioreaktoren jedoch ein teures, aufwendiges und verhältnismässig ineffizientes Verfahren dar. Aktuelle Bemühungen konzentrieren sich deshalb auf eine Maximierung der Fremdgen-Expression, sowie auf die Verbesserung der Transfektionsmethoden [7].

Es existieren verschiedene Techniken transgene Tiere herzustellen. Die populärste Methode stellt nach wie vor die Mikroinjektion dar [26], bei der die DNA in den Pronukleus injiziert wird. Weitere verwendete Verfahren sind der Einsatz transfizierten Spermias [27], die Transfektion von embryonalen Keimzellen und deren Implantation in einen Empfänger-Embryo [28], die Transfektion embryonaler Stammzellen [29], sowie der retrovirale Gentransfer [30].

Hauptprobleme bei der Herstellung transgener Tiere stellen nach wie vor die hohe Mortalitätsrate der transfizierten Embryos, die niedrige Integrationsrate der Transgene und deren unberechenbares Expressionsverhalten dar [31-33].

Nur 15-25% der Embryos, die aus einer mikroinjizierten befruchteten Eizelle entstehen überleben die pränatale Phase, und nur ein kleiner Teil der Überlebenden trägt das Transgen. Tiere wie Kühe und Schweine zeigen schlechtere Integrationsraten als die stark von Inzucht betroffenen Laborstämme von Mäusen, Ratten und Hasen [32-34]. Auch der Zeitpunkt der Mikroinjektion spielt eine Rolle bei der Integration der eingebrachten DNA in das Erbgut. Untersuchungen weisen darauf hin, dass die frühe S-Phase den optimalen Zeitpunkt für die Transfektion darstellt [35]. Die Pronuklei von Schwein und Kuh lassen sich jedoch erst in der späten S-Phase bioptisch, ohne das Gewebe zu schädigen, einstellen.

Schliesslich integriert immer eine unbekannte Anzahl Kopien der Fremd-DNA in das Wirts-Genom, und ihr Integrationsort spielt eine grosse Rolle für die Expressionsrate. Wird das Transgen in Bereiche der Wirts-DNA integriert, die wenig transkribiert werden, scheint auch dessen Expressionsrate zu sinken. Man spricht von einem „Positionseffekt“, der auch dazu führen kann, dass das eingebrachte Gen zur falschen Zeit oder im falschen Gewebe exprimiert wird [32].

Trotz dieser Schwierigkeiten befanden sich 1998 drei von transgenen Tieren stammende Proteine in klinischen Versuchsphasen auf dem Weg zur Zulassung als Therapeutika beim Menschen [36]:

Antithrombin III (Phase III, transgene Ziege), α 1-Antitrypsin (Phase II, transgenes Schaf) sowie α -Glucosidase (Phase I, transgener Hase).

1.2. Transgene Hühner

Ein Tier, das sich gut als „Expressionstier“ zu eignen scheint, ist das Huhn.

Die Generationszeit von Hühnern ist im Gegensatz zu anderen Tieren mit 6 Monaten relativ kurz und ein einzelnes Huhn ist in der Lage, jährlich bis zu 220 Eier zu legen.

In einem durchschnittlichen Hühnerei von 60 g findet man 3,35 g Protein. Ovalbumin stellt mit 54% Gesamtproteinanteil den grössten Teil der Eiweissfraktion im Hühnerei. Unter dem Einfluss von Östrogen werden bei legenden Hühnern im oberen Teil des Eileiters, dem Magnum, täglich ca. 3×10^{19} Moleküle Ovalbumin synthetisiert. *Tabelle 1* zeigt die typische Zusammensetzung eines Hühnereies. Die Mechanismen der Eientstehung sind bekannt und Gene von zwei der Proteine im Eiweiss, Ovalbumin und Lysozym [37], wurden auf molekularer Ebene eingehend erforscht.

Auch ist es bereits gelungen, heterologe Proteine, nämlich menschliche Antikörper, in das Eidotter zu sezernieren, allerdings nicht in transgenen Hühnern [38].

Zusammensetzung Gesamtgewicht:			
Eiweiss	60%	Wasser: 88%	
		Protein: 11%	
Eidotter	30%	Wasser: 50%	
		Lipide: 30%	
		Protein: 20%	
Schale	10%		
Anteile der wichtigsten Proteine :	in Gramm pro 60g Ei		Anteil am Gesamteiweiss
Ovalbumin	2,2g		54%
Ovotransferrin	0,5g		12%
Ovomukoid	0,5g		12%
Lysozym	0,15g		3.4%

Tabelle 1: Zusammensetzung eines Hühnereies [39]

Um die verschiedenen Methoden der gentechnischen Manipulation von Hühnererbgut und ihre Ansatzpunkte im Eizyklus zu verstehen, ist es nützlich, sich kurz die frühen Entwicklungsstadien eines Huhnembryos zu vergegenwärtigen.

Nach der Insemination wird das Spermium des Hahnes in der utero-vaginalen Drüse der Henne gespeichert. Danach ist das Huhn für ca. 10 Tage in der Lage, befruchtete Eier zu legen.

Die Henne ovuliert einmal täglich, und kurz darauf kommt es zur Vereinigung der beiden Keimzellen im proximalen Eileiter. Die so gebildete befruchtete Eizelle wird nun gemeinsam mit dem Eidotter von Eiweiss aus Oviduktzellen umhüllt, während sie den Eileiter durchwandert. Abschliessend wird eine Kalkschale um das Ei gebildet.

Vom Eisprung bis zur Eiablage vergeht ca. 1 Tag. Direkt nach der Konjugation der Keimzellen befinden sich die Pronuclei dicht unter der Oberfläche der Eizelle in der sogenannten Keimscheibe, einer kleinen Ansammlung weissen Zytoplasmas [40]. Die Verschmelzung zu einem diploiden Chromosomensatz erfolgt ca. 3,5 h nach der Konjugation, zur ersten Teilung kommt es etwa 1,5 h später. Weitere Teilungen folgen auf dem Weg durch das Ovidukt, und zum Zeitpunkt der Eiablage befindet sich der Embryo im 60.000-Zellstadium [41].

Auf der Suche nach einem geeigneten Verfahren, Hühner als Produktionsstätte für heterologe Proteine zu nutzen, sind verschiedene Techniken entwickelt worden, deren Ziel entweder ein transgenes Huhn oder zumindest ein transgenes Organ war.

Die bewährteste Methode in Säugerzellen, die Entnahme der befruchteten Eizelle und deren Reimplantation nach Transfektion, hat sich als technisch nicht realisierbar erwiesen, da hierfür ein massiver operativer Eingriff unumgänglich wäre. Es ist aber gelungen, den Embryo in einem sehr frühen Entwicklungsstadium zu entnehmen, zu transfizieren und in einem künstlichen Brutsystem aus geöffneten Eiern auszubrüten [42], das Haupthindernis für einen effizienten Gentransfer besteht jedoch nach wie vor darin, dass es nicht möglich ist, in der befruchteten Eizelle die Pronuclei zu erkennen. Hier findet eine von Helen Sang entwickelte Methode ihre Anwendung: die Mikroinjektion von DNA in die Keimscheibe in die Nähe der vermuteten Pronuclei [43]. In den geschlüpften Tieren liessen sich in bis zu 50% der Fälle ein oder mehrere Kopien der Fremd-DNA nachweisen, die Mortalität lag jedoch mit 95% der Versuchstiere sehr hoch.

Auch der Versuch, mit Hilfe transfizierten Hahnspermas transgene Stammzellen zu erhalten, misslang [44]. Verglichen mit der Transformation von Eizellen ist es einfacher, den Embryo im 60.000- Zellstadium, nach der Eiablage, zu transfizieren. Transgene Tiere, die aus diesem Verfahren resultieren, müssen jedoch zwangsläufig Mosaikstruktur zeigen, da es nicht möglich ist, sämtliche 60.000 Zellen des Blastoderms zu transformieren. Hier haben sich vor allem retrovirale Transfektionssysteme bewährt. Die bisher vielversprechendsten Ergebnisse stammen von der Arbeitsgruppe Bosselmann et al, die replikationsdefekte Retroviren, denen ein Markergen eingesetzt worden war, in das Blastoderm injizierte. Es gelang in bis zu 8% der geschlüpften Tiere das Transgen nachzuweisen [45]. Den guten Resultaten steht die Gefahr gegenüber, rekombinante Wildtyp-Viren zu generieren.

Ein sehr vielversprechendes Verfahren, genetisch veränderte Hühner zu schaffen, wurde 1993 beschrieben. In Hühnern sind embryonale Stammzellen, die Vorläuferzellen der Keimzellen, extraembryonalen Ursprungs. Am dritten Tag der embryonalen Entwicklung ist es möglich, diese aus dem Blut zu isolieren, bevor sie ihren Bestimmungsort, die Gonaden, erreichen.

Diese Stammzellen liessen sich mit Hilfe retroviraler Vektoren transformieren und in andere Hühnerembryos injizieren, die sich im 60.000-Zellstadium der Embryonalentwicklung befanden. In zumindest einem Fall ist es so gelungen, die Keimbahn des Versuchstiers genetisch zu verändern [28].

Vor 2 Jahren wurden erstmals Teile eines Hühneroviduktes *in vivo* gentechnisch verändert: Durch *in vivo*-Elektroporation konnte Erythropoietin unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert werden. Das Protein konnte jedoch nicht in den Eiern des Huhnes nachgewiesen werden [46].

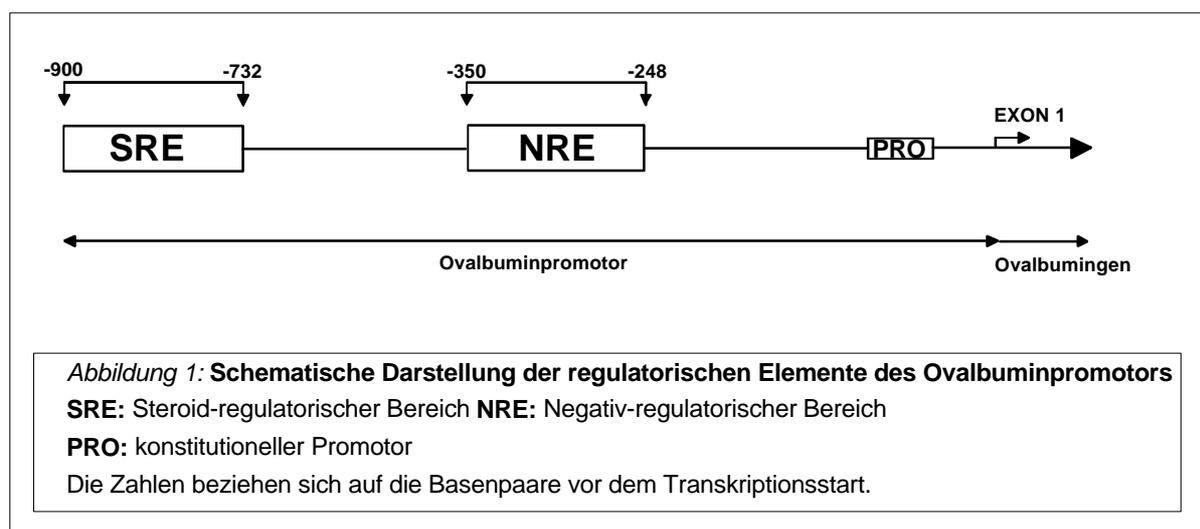
1.3. Der Ovalbuminpromotor

Der erste Schritt auf dem Weg zu einem Genkonstrukt, welches die Expression heterologer Proteine in Eileiterzellen des Huhnes erlaubt, ist die Identifikation eines geeigneten Promotors. Folgende Eigenschaften werden hierbei gefordert:

1. Gewebespezifische Expression in Eileiterzellen des Huhnes. Diese Eigenschaft ist besonders wichtig, möchte man die Keimbahn eines Organismus verändern, da sich das fremde Gen dann in allen Zellen nachweisen lässt. Eine unspezifische Expression birgt aber die Gefahr, schädlich oder letal für einzelne Gewebetypen zu sein, mit unvorhersehbaren Folgen für das Individuum.
2. Expression des regulierten Genes entsprechend dem physiologischen Eizyklus im Huhn, um die zellbiologischen Vorgänge im Eileiter möglichst wenig zu stören und den natürlichen Ablauf weitgehend nachzuahmen.
3. Möglichst hohe Expressionsraten.

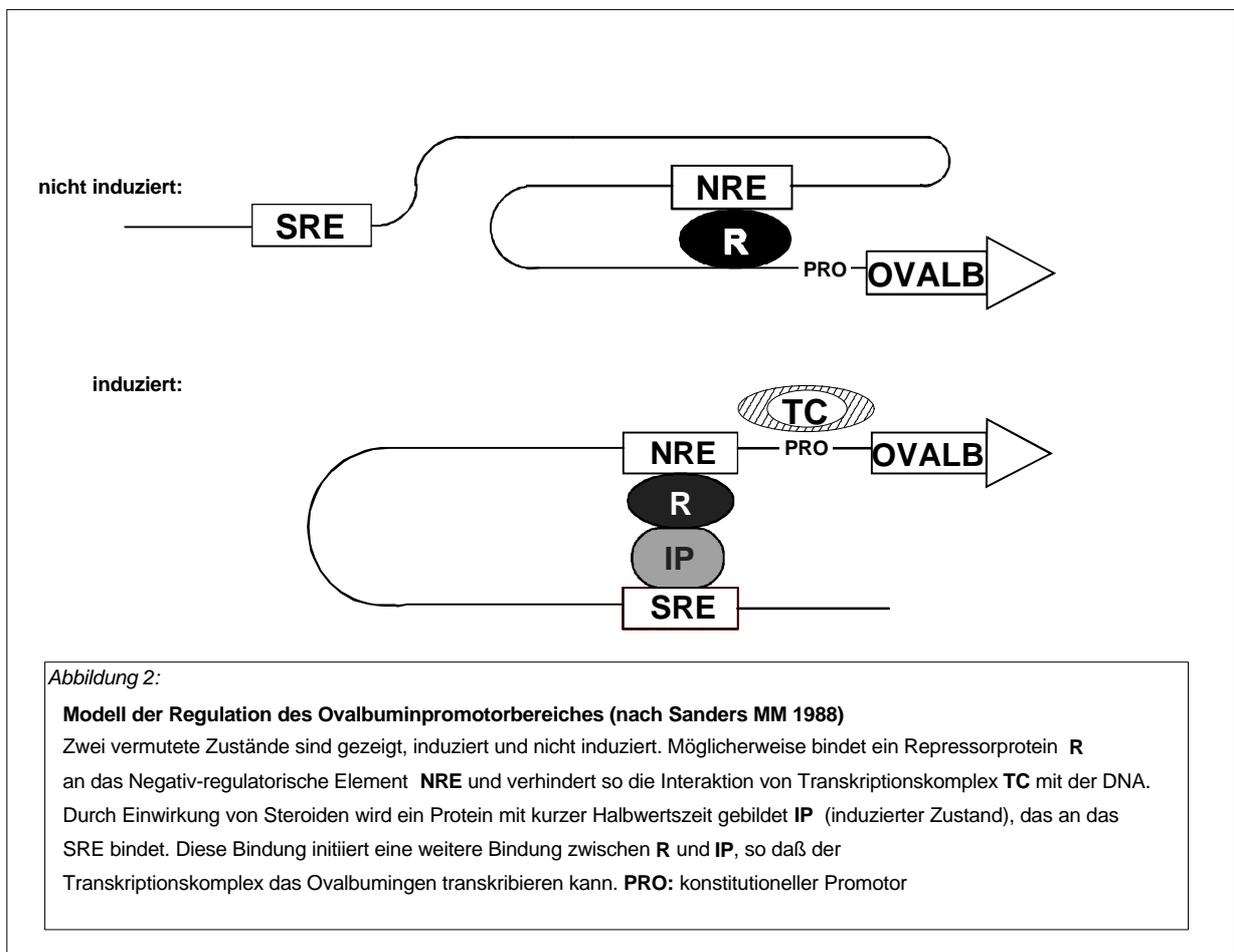
Diese Anforderungen werden vom Ovalbuminpromotor erfüllt. Ausser in fetalen Leberzellen von Hühnerembryonen zeigt der Promotor ausschliesslich in Oviduktzellen Aktivität, und seine Regulation im Eizyklus des Huhnes unterliegt der Kontrolle von Steroidhormonen.

Es sind eine Reihe regulatorischer DNA-Abschnitte für diesen Promotor beschrieben worden (*Abbildung 1*).



In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Ovalbuminexpression sowohl positiver als auch negativer Regulation unterliegt und durch 4 Klassen von Hormonen induzierbar ist, die meisten davon sind Steroidhormone: Insulin [47], Glukokortikoide [48], Androgene und Progesteron. So konnten im 5' Bereich des Ovalbuminpromotors ein Bereich identifiziert werden, das „steroid-regulatorische Element“, (-900 bis -732 bp vor Beginn des Ovalbumingens), das zu einer Steigerung der Ovalbuminexpression in Anwesenheit von Steroidhormonen um den Faktor 20 führt. Weiter wurde ein Bereich gefunden (-350 bis -248), das „negativ-regulatorische Element“, der unter Steroidmangelbedingungen die Ovalbuminexpressionsrate auf minimalstes Niveau senkt.

Abbildung 2 zeigt eine Vorstellung von der Funktionsweise der regulatorischen Bereiche des Ovalbuminpromotors [49].



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ovalbuminpromotor mit seiner sehr hohen Expressionsrate (durchschnittlich 3×10^{19} Moleküle täglich pro Huhn) und seiner ausgeprägten Gewebespezifität ein ideales Werkzeug für die Konstruktion eines Expressionsvektors darstellt, mit dessen Hilfe heterologe Proteine im Eileiter des Huhnes hergestellt werden können.

Wie bereits angedeutet, verfügt die Molekularbiologie heute über viele verschiedene Verfahren, Erbinformationen in Zellen einzuschleusen. Elektroporation, Lipofektion, „gene-gun“ und Mikroinjektion sind etablierte Verfahren und werden in vielen Laboratorien angewandt. Alle diese Methoden verfügen jedoch über einen entscheidenden Nachteil: Das Schicksal der eingebrachten DNA ist ungewiss und nur in den seltensten Fällen wird sie stabil in das Genom der Zelle integriert.

1.4. Virofektion

Als Virofektion wird eine Methode bezeichnet, bei der von Retroviren abgeleitete Vektoren zum Gentransfer benutzt werden. Die DNA wird dabei stabil in das Erbgut integriert.

Retroviren sind eukaryontische Viren deren genetisches Material aus einzelsträngiger RNA besteht. Aufgebaut sind diese 80-120nm grossen Viruspartikel aus einer äusseren, mit Glykoproteinen durchsetzten Hülle, die aus der Membran der Wirtszelle stammt und einer inneren Kapsel, dem sogenannten „Capsid“, das zwei Kopien der RNA als Ribonukleoprotein enthält.

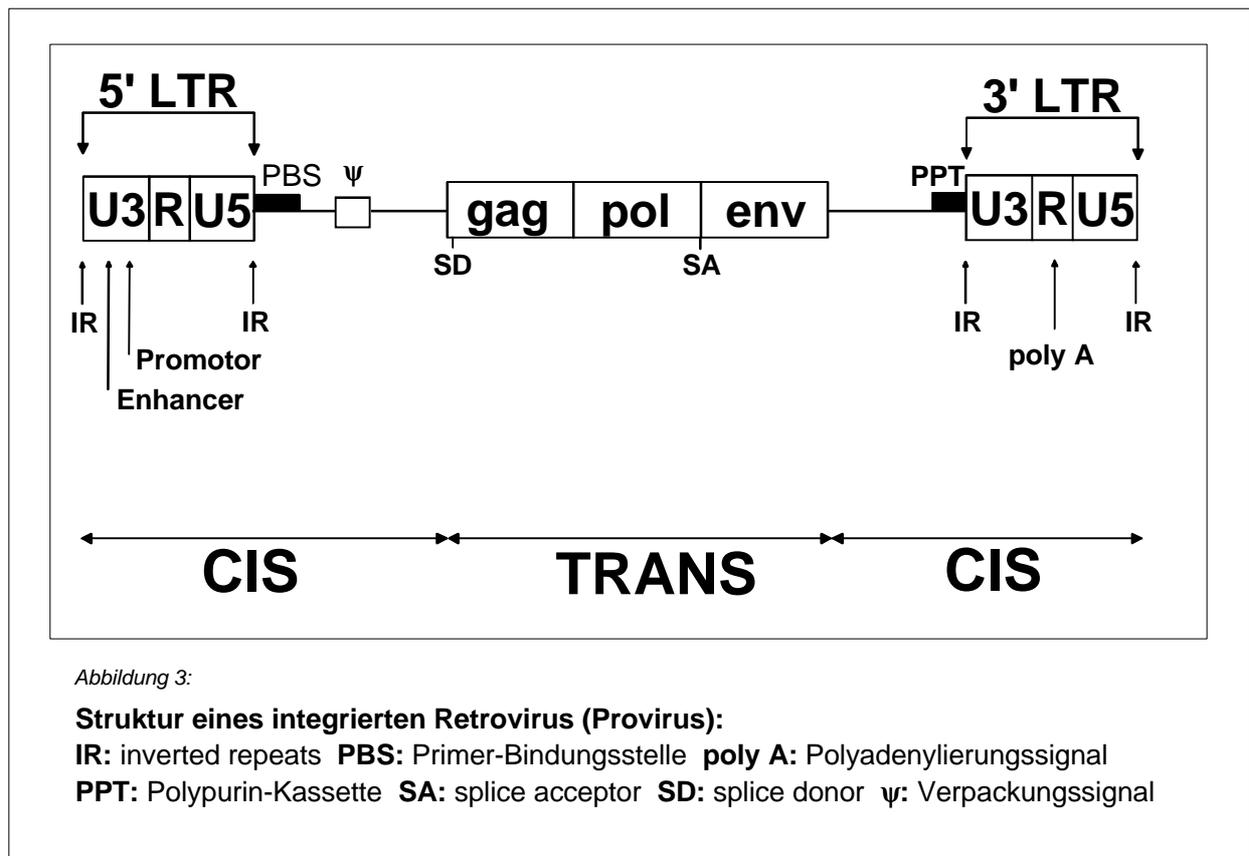
Das Genom aller Retroviren ist ähnlich aufgebaut und besteht aus drei kodierenden Regionen: dem *gag*-Gen, kodierend für die viralen Capsid- und Matrix-Proteine; dem *pol*-Gen, das die Information für die virusspezifische *Reverse Transkriptase* und andere virale Nukleasen trägt; und schliesslich dem *env*-Gen, das für Glykoproteine in der viralen Lipidhülle kodiert.

Ausserdem besitzen alle Retroviren an ihren Enden sogenannte „Repeats“ oder **R-Segmente**, direkte Sequenzwiederholungen, die 10-80 Nukleotide lang sein können. Dem R-Segment folgt im 5'-Bereich des Virusgenoms ein sogenanntes **U5-Segment**, im 3'-Bereich ein sogenanntes **U3-Segment** (siehe *Abbildung 3*).

Retroviren nutzen Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle um anzudocken. Im Cytosol wird die

virale RNA von der Hülle befreit und die vom Virus mit eingeschleuste *Reverse Transkriptase* beginnt, die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben.

Transkriptionsstartpunkt ist eine als Primer fungierende t-RNA, die aus dem vorangegangenen Replikationszyklus stammt. Diese ist mit der sogenannten „Primer binding site“ **PBS** basengepaart.



Durch Zirkularisation und Transkription entstehen schliesslich im 5' und im 3'-Bereich der Virus-DNA identische Bereiche in denen U5-Segment, R-Segment und U3-Segment aufeinanderfolgen. Diese Bereiche werden als „long terminal repeats“, **LTR**, bezeichnet.

Der LTR der 5'-Region trägt einen starken Promotor, während der 3'-LTR die Polyadenylierung übernimmt. Ausserdem spielen die LTR-Sequenzen eine wichtige Rolle bei der nun folgenden Integration in das Wirtsgenom. Diese findet nicht spezifisch statt, sondern kann praktisch überall im Genom erfolgen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie bevorzugt in transkriptionsaktiven DNA-Abschnitten erfolgt. Die **Integrase**, ein weiteres virales Protein, spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Nachdem die virale DNA in das Wirtsgenom integriert hat - man spricht nun von einem sogenannten „Provirus“ - werden die zelleigenen Transkriptionsmechanismen für die Virusreplikation genutzt.

Die entstehenden Transkripte sind teilweise identisch mit der Original-Virus-RNA, teilweise handelt es sich jedoch auch um subgenomische RNA-Spezies. Sie dienen als Matrizen für die Synthese der viralen Proteine, die schliesslich prozessiert und zum Zusammenbau kompletter Viruskapside genutzt werden, die alle viralen Proteine enthalten. Das Viruskapsid verlässt schliesslich die Zelle durch Knospung.

Retrovirale Vektoren haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglichen den Gentransfer von DNA-Fragmenten bis zu 10 kb Länge sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und haben sich als geeignet erwiesen, ein breites Spektrum von verschiedenen Spezies zu transfizieren, ohne eine chronische virale Infektion hervorzurufen [50].

Virofektion setzt zwei verschiedene Plasmide voraus: ein Vektorplasmid, das die Information eines replikationsunfähigen Retrovirus trägt und in das die zu transformierende DNA eingesetzt ist, sowie ein Helferplasmid, das ein Expressionsvektor für die dem Vektorplasmid fehlenden Replikationssequenzen ist [51, 52].

Beide Plasmide werden in Zellen kotransfiziert. Hier wird nun die retrovirale Sequenz des Vektorplasmides wie bei einem „normalen“ Retrovirus in mRNA umgeschrieben. Die infektiösen Partikel, in die die mRNA verpackt wird, werden durch das Helferplasmid beigesteuert, sind in dieser artifiziellen Form jedoch sehr instabil. Die mRNA des Helferplasmides kann hingegen nicht verpackt werden, da ihr das „minimal packaging signal“ fehlt. Die entstandenen Viren knospen aus der Zelle aus und transfizieren Nachbarzellen (siehe *Abbildung 4*). In diesen Zellen integriert das Virus stabil, kann sich nun aber nicht mehr replizieren, da die dafür nötigen Informationen des Helferplasmides fehlen.

Hauptproblem bei diesen Experimenten stellt die Gefahr dar, in Zellen, die bereits durch einen Wildtypvirus infiziert waren, durch Rekombination mit dem Vektorplasmid einen neuen, replikationsfähigen Virus zu kreieren. Diese Gefahr besteht auch, wenn Vektor- und Helferplasmid ausgeprägte Sequenzhomologien zeigen [52]. In letzterem Fall kann man jedoch die Wahrscheinlichkeit einen neuen Vollvirus zu erhalten, stark verringern, indem man die Helfersequenzen auf zwei Expressionsvektoren aufsplittet.

Wie bereits erwähnt hat sich das Prinzip der Virofektion bei Versuchen mit verschiedenen Zellen vom Huhn bewährt.

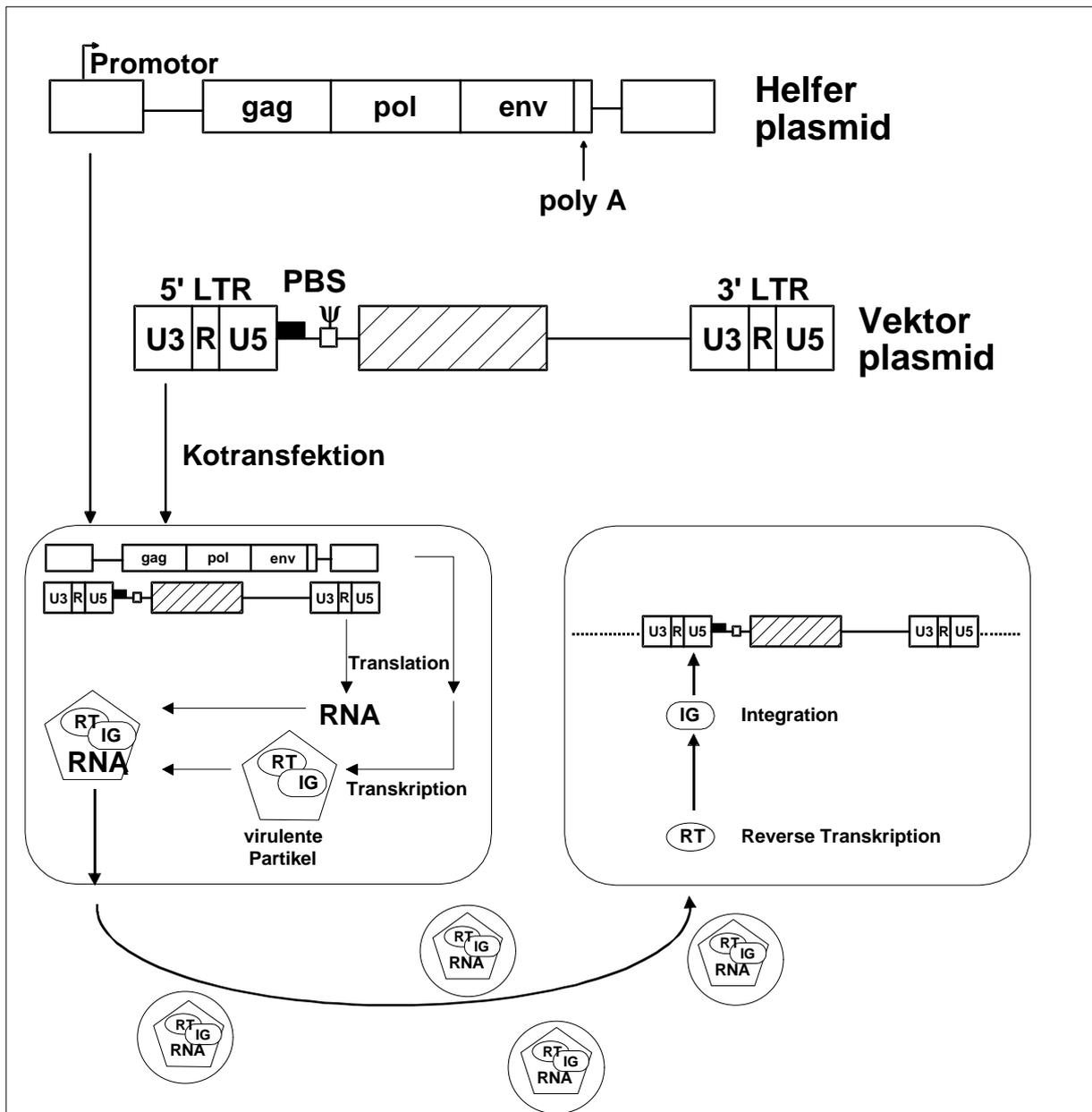


Abbildung 4:

Prinzip der Virofektion:

Zwei Plasmide werden in die Zelle kotransfiziert: das Helferplasmid enthält die für die Rekombination benötigten Sequenzen von *gag*, *pol* und *env*. Das Vektorplasmid trägt das einzuführende Gen und enthält das Verpackungssignal Ψ . Da dieses Signal dem Helferplasmid fehlt wird dessen RNA nicht in die infektiösen Partikel verpackt, die sich durch Expression von *gag*, *pol* und *env* gebildet haben.

Nach einigen Tagen können im Zellüberstand virulente Partikel gefunden werden, die Vektor-RNA und die zur Integration benötigten Proteine enthalten. Diese können weitere Zellen transfizieren, das Vektorplasmid kann stabil integrieren, sich jedoch nicht mehr replizieren (nach Flamant F.1995)

RT: Reverse Transkriptase **IG:** Integrase

1.5. Erythropoietin (EPO)

Die Existenz von Erythropoietin ist seit über 100 Jahren bekannt. Dennoch gelang es erst 1977 EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie zu isolieren [53]. 1985 entschlüsselten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die DNA-Sequenz des EPO-Gens und konnten das Gen erfolgreich in Säugetierzellen exprimieren ([54, 55]. 1989 erhielt rekombinantes EPO als erstes rekombinantes Protein überhaupt die Zulassung als Therapeutikum in den USA zur Behandlung der chronischen Anämie terminal niereninsuffizienter Patienten [56, 57].

Erythropoietin ist ein Zytokin, das zum einen die Differenzierung von Vorläuferzellen der Erythropoese zu Erythrozyten steuert, zum anderen die Proliferation der Vorläuferzellen anregt. Das Hormon, das aus 166 Aminosäuren zusammengesetzt ist, wird zu 85% in der Niere von Endothelzellen der tubulären und juxtatubulären Kapillaren sowie von Interstitialzellen produziert. Den Grossteil der extrarenalen Produktion stellt die Leber bereit, die beim Feten Hauptbildungsort von EPO ist. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die messbare Serumkonzentration im Mittel 15-30 mU/ml, sie kann bei verschiedenen Anämien, die mit Hypoxie einhergehen, vermindertem inspiratorischem p_iO_2 , kardialen Erkrankungen und verschiedenen Lebererkrankungen jedoch um ein 1000-faches ansteigen.

Die Glykosylreste, deren Anteil am Molekulargewicht von ca. 35 kDa fast 40% betragen, sind verantwortlich für die Pharmakokinetik von EPO [58, 59]. Nicht-glykosyliertes Erythropoietin hat eine extrem kurze Halbwertszeit, besitzt jedoch zumindest *in vitro* eine höhere biologische Aktivität. Unter physiologischen Bedingungen sind mehrere verschieden glykosylierte Formen von EPO nachweisbar.

Neben Sialisierungen sind ausserdem zwei Disulfidbrücken vorhanden, die ebenfalls einen nachweisbaren Einfluss auf die biologische Aktivität haben [60].

Die Substitution mit (rekombinantem) EPO hat sich in der Therapie von Anämien verschiedenster Genese bewährt. Hauptanwendungsgebiet sind chronische Nierenerkrankungen [61], die zu einer starken Einschränkung der endokrinen Funktion der Niere führen. So entwickeln über 50% aller dialysepflichtigen Patienten eine normochrome, normozytäre Anämie. Aber auch Patienten mit chronischen Entzündungen, aplastischer Anämie [62], multiplem Myelom [63] und nach Strahlen- oder Chemotherapie profitieren in

hohem Masse von einer Substitution. Der Effekt beschränkt sich dabei nicht nur auf die Verbesserung der Hämatokritwerte, auch verbesserte Thrombozytenaggregation und verkürzte Blutungszeiten sind zu vermerken.

1997 erhielten Patienten in den USA durchschnittlich 5400 Units rekombinantes EPO, die hierfür anfallenden Kosten betragen 901,5 Millionen US\$ gesamt, oder 6245 US\$ pro Patient [56].

Es ist gelungen, EPO in verschiedenen Zelltypen zu exprimieren [54, 64, 65]. Trotz unterschiedlicher Glykosylierung zeigt das rekombinante Hormon biologische Aktivität. Zu kommerziellen Zwecken wird rekombinantes EPO heute in erster Linie in CHO-Zellen (Ovarzellen von chinesischen Hamstern) exprimiert [66]. Erfolglos wurde bisher versucht EPO in Oviduktzellen von Hühnern *in vivo* zu exprimieren und aus dem Ei zu isolieren [46]. Darüber hinaus wird an gentherapeutischen Ansätzen gearbeitet, um beispielsweise mittels viraler Transfektion Patienten wieder zu einer endogenen EPO-Produktion zu verhelfen.

Die vielfältigen Indikationen und die nach wie vor beschränkten Herstellungsmöglichkeiten für rekombinantes EPO machen das Protein zu einem lohnenden Modell für die Expression in Oviduktzellen des Huhnes, auch im Hinblick auf eine mögliche Massenproduktion im transgenen Huhn.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein heterologes Protein, humanes Erythropoietin, in Eileitergewebezellen des Huhnes zu exprimieren, um die Eignung des Huhnes als Bioreaktor zu demonstrieren.

In vivo-Versuche sollten dabei zeigen, ob das exprimierte Protein auch im gelegten Ei nachzuweisen war. Ferner sollte versucht werden, eine gewebespezifische Expression im Huhnovidukt unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors zu erreichen, um erste Grundlagen für die Schaffung transgener Tiere zu gewinnen.

3. Material

3.1. Geräte

Cell-Spinner Flaschen	Biosciences/Integra
Elektrophorese-Apparaturen	Harnischmacher
Elektroporator	Gene Pulser, BioRad
Feinstwaage	Mettler
Gefrierschränke	Forma Scientific, Siemens
Geldokumentationssystem	Eagle Eye II Still Video System, Stratagene
Geltrockner	Biorad, Modell 583
Genkanone	Biorad
Grobwaage	Sartorius
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320 Werkstatt Eigenbau
Inkubator (Brutschrank)	WTC Binder, Heraeus
Konservierungsgefäße	Nunc
Kühlschrank	LKB
Labor-Hebebühne	Swiss Boy, Grauer AG
Magnetrührgerät	Ikamag Reo, Janke +Kunkel IKA-Werk
Mikromanipulator	MSM System, Singer Instruments
Mikroskop	Olympus CH, Leitz
Multikanal-Pipetten	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Brand
Petrischalen	Greiner
pH-Meter	761 Calimatic, Bachofer
Pipetten	Gilson Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000
sterile 1x Pipetten	Greiner
Pipettierhilfe	Sarstedt
Phosphorimager	Storm, Molecular Dynamics
Photometer	Beckman DU-65 Spektrophotometer

Rotoren	Sorvall SS34, GSA, GS3, SLA-1500, SLA-300, SA600; Beckmann C0650, C1015
Schüttelinkubator	ISF-1-V, Adolf Kühner AG
Spannungsgeräte	Mikrocomputer Elektrophoresis Power Supply E321
Speed Vac	Vacuum Concentrator, Bachofer
Sterile Werkbank	BDK UVF 6.12 S
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 TA
Thermocycler (PCR-Maschine)	Perkin Elmer
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallbad	Öve
UV-Illuminatoren	Bachofer (254 nm, 366 nm)
Vakuum-Blot-Apparatur	VacuGene XL, Pharmacia
Vortex	Vortex Genie, Bender & Hobein
Wasserbäder	Bachofer Julabo U3, UC
sterile Werkbank	Heraeus
Zellkulturflaschen	Costar
Zellsortierer	Becton-Dickinson
Zentrifugen	Beckman GS-15R ROTANTA/TR, Hettich Hettich EBA 3S Tischzentrifuge Eppendorf-Zentrifuge 5417 Sorvall RC 5Bplus Sorvall RC 5Cplus Hettich Universal
Zentrifugenröhrchen	Greiner Falcon

3.2. Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamidlösung 30 %, Rotiphorese Gel 30	Roth
Acrylamidlösung 30 %; Rotiphorese Gel A	Roth
Agarose	Gibco BRL, Bio-Rad
Aminosäuren	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Bisacrylamidlösung 2 %, Rotiphorese Gel B	Roth
Borsäure	Merck
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid (X-Gal)	Boehringer Mannheim
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Riedel de Haën
Deoxyribonucleosidtriphosphate	USB
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid (Pulver)	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA, Titriplex III)	Merck
Galaktose	Merck
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco
Glukose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
HEPES	BIOMOL
Isoamylalkohol	Merck
Isofluran	Forene

Isopropanol	JT Baker
Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Boehringer Mannheim
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lithiumacetat	Merck
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methanol	JT Baker
b-Mercaptoethanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BDH
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natronlauge (NaOH)	Merck
Phenol	Merck
Polyethylenglycol (PEG) 4000, 8000	Serva
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Polyvinylpyrollidon	BioRad
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
Roti Phenol/Chloroform-Lösung	Roth
Salzsäure (HCl, 37 %)	Riedel de Haën
Schwefelsäure	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylendiamid (TEMED)	Serva
Trishydroxymethyl-aminoethan (Tris)	Riedel de Haën
Triton-X-100	Sigma
Trypan-Blau	Sigma
Trypsin-EDTA	Sigma

Tryptone	Difco
Xylencyanol	BioRad

3.3. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	New England Biolabs
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI Fermentas
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
	MBI Fermentas
	Boehringer Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
Taq/Pwo-DNA-Polymerase Mix	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
	Boehringer Mannheim
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs

3.4. Kulturmedien, Lösungen und Puffer

Dexamethason	Amersham
FCS	Gibco
Fungizone	Gibco
Hank'sche Lösung	Seromed
HEPES-Puffer	Gibco
Hydrocortison	Sigma
ICS	Sigma
Insulin	Serva
NaCl 0,9% steril	Fluka
Östradiol	Sigma

PBS-Lösung steril	Seromed/Biochrom
Penizillin-Streptomycin	Gibco
Propanol	J.T. Baker
Refobazin	Merck
Yeast-Extract	Difco
Dulbecco's Medium	D-5796, Sigma
LB-Medium:	1 % (w/v) Bacto Trypton
	0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract
	0,5 % (w/v) NaCl
	1,5 % Bacto-Agar (nur für Festmedien)
	pH 7,5
William's E Medium	Gibco

3.5. Kits für molekularbiologische Arbeiten

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Cat. No. 12362	Qiagen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Cat. No. 12243	Qiagen
EPO-ELISA	Cat.No. 1693417	Roche
Expand Long Template PCR System	Cat.No. 1681834	Roche
PerFect Lipid Transfection Kit	Cat. No. K925-01	Invitrogen
T ⁷ Sequencing Kit	Cat.No. 27-1682-01	Pharmacia

3.6. Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstämme:

E. coli XL1-Blue (Bullock, W. 1987)
F':::Tn 10 pro A⁺B⁺lacI^q_(lacZ)M15/recA1
endA1 gyrA96 (NaI^R) thi hsdR17 (r_K-m_K+)
supE44 relA1 lac

E. coli GM 2163 (Woodcock, D.M. 1989)
(Palmer, B.R.1994)

F- ara- 14 leuB6 thi- fhuA31 lacY1 tsx-78
galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136
(Str^r) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 (Cam^r)
dcm-6 mcrB1 hsdR2 (r_K-m_K+) mcrA

Plasmide:

pBluescript II SK⁻ und KS⁻ (Stratagene)
pUT 110 (Cayla)
pIRES EGFP (Clontech)
pLZ 10 (Gray, G.E. 1988)
pRSV COD (Flamant, F. 1995)

3.7. EPO-Gen

EPO-cDNA, CellGenics, Freiburg (freundlicherweise von Dr. Kulmburg zur Verfügung gestellt)

3.8. Versuchstiere

Huhn (*gallus gallus*):

„Weisses Leghorn“, Züchter Haas, Hochschwarzwald

3.9. Oligonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz 5'-3'
Lead+	PCR für pUT OVP+exo	ggactagtgc ttaccttcg agcttgactg
Lead-	PCR für pUT OVP	ggactagtca gacactggct gagccctg
Lead-Cla-	PCR für pOVP EGFP und pOVP EPO EGFP	ccatcgatca gacactggct gagccctg
pLZ 1	PCR zur Sequenzkontrolle	gcggcgctct cccagcgg
Retro 3'	PCR für pLZ OVP EGFP, pLZ CMV EPO EGFP, pLZ OVP EPO EGFP	tgctctagac gcttacttg tacagctcgt cc
Retro 5'	PCR für pLZ OVP EGFP, pLZ CMV EPO EGFP, pLZ OVP EPO EGFP	ccgctcgagg gttaggcgtt ttgcgctgc
Retro-pLZ	PCR zur Sequenzkontrolle der viralen Konstrukte	cgtacatcgc gaagcagcgc
Retro-XhoI	PCR zur Sequenzkontrolle der viralen Konstrukte	atgcactcga gccccagctg g
SRE	PCR für pUT OVP und pUT OVP+exo	ataagaaagc ggccgcaaca gtgctttaca gaggtcag
SRENruXba	PCR für pOVP EGFP und pOVP EPO EGFP	gctctagagg tcgcgaaaca gtgctttaca gaggtcag
XbaNruCMV	pOVP EPO EGFP	gctctagact tcgcatgta cgggccag

4.1.2. Dephosphorylierung von DNA

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) entfernt in einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. Eine Entfernung von Phosphatresten wird durchgeführt, wenn bei Klonierungen die Religation eines Vektors durch die anschliessende DNA-Ligase-Reaktion verhindert werden soll.

Es werden in einem Restriktionsansatz 0,1 U Enzym pro pmol DNA mit kohäsiven 5'-überhängenden Enden eingesetzt. Die Reaktion wird für 1 h bei 37°C durchgeführt. Da das Enzym in allen gebräuchlichen Restriktionspuffern arbeitet, muss meistens kein spezieller Phosphatasepuffer mehr zugegeben werden. Eine Inaktivierung der Phosphatase ist nicht notwendig, wenn die DNA-Fragmente anschliessend auf ein Gel gegeben werden. Ist dies nicht der Fall, wird EDTA (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben, 10 min auf 75°C erhitzt und die DNA anschliessend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

Phosphatase-Puffer:	50 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl, pH 7,9
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT

4.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese kann die Grösse und annähernd auch die Menge von DNA-Fragmenten abgeschätzt werden. Sie wird in einer horizontalen Gelapparatur durchgeführt.

Die Agarose-Konzentration wird je nach Grösse der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente gewählt und kann zwischen 0,7% und 2% liegen. Die Agarose wird durch Aufkochen in 1 x TBE in der Mikrowelle gelöst. Nachdem gelöstes Ethidiumbromid zugesetzt wurde (Endkonzentration 0,5 µg /ml), lässt man die Agaroselösung bis auf ca 50°C abkühlen, bevor sie in die Gelapparatur gegossen werden kann. Die DNA-Proben werden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und der Elektrophorese unterzogen (5 V/cm, 1 x TBE Laufpuffer).

von RNA schliessen.

Zur groben Schätzung der DNA-Konzentration wird die DNA in einer Agarose-Gelelektrophorese neben einem DNA-Standard aufgetrennt und die Intensität der DNA-Banden miteinander verglichen.

4.1.6. Ligation von DNA

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen endständigen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen in einer doppelsträngigen DNA.

Die zu ligierenden DNA-Fragmente werden durch Elektrophorese (5 V/cm) in einem Low-melting-Agarosegel gewünschter Konzentration aufgetrennt, unter UV-Kontrolle (366 nm) ausgeschnitten, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 70°C geschmolzen. Beste Ergebnisse erzielt man bei einem molaren Verhältnis Vektor/Insertion von 1/9, wobei die Gesamtmenge der DNA zwischen 50 ng und 100 ng liegt. Das Endvolumen des Ligationsansatzes beträgt 30 µl und enthält neben der DNA-Lösung und Wasser noch 10x Ligationspuffer und T4-Ligase. Die Ligation von kohäsiven Enden wird mit 1-2 U einer T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) über Nacht bei RT durchgeführt. Bei der Ligation von glatten Enden werden 2-3 U einer T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) eingesetzt.

10 x Ligase-Puffer (New England Biolabs): 500 mM Tris/HCl, pH 7,5
 100 mM MgCl₂
 100 mM DTT
 10 mM ATP
 25 µg /ml BSA

10 x Ligase-Puffer (Boehringer Mannheim): 660 mM Tris/HCl, pH 7,5
 50 mM MgCl₂
 10 mM DTE
 10 mM ATP

4.1.7. Mini-Präparation nach der modifizierten „boiling method“ [67]

Mit einem sterilen Zahnstocher werden Zellen einer Bakterienkultur in 2-4 ml LB-Medium, dem ein geeignetes Antibiotikum beigefügt worden war, überführt und für 12-16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 15 sec abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 14.000 rpm, RT).

Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wird das Sediment in 250 µl Lysispuffer suspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Um die Zellwand aufzulösen, wird 25 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben und 30 sec auf höchster Stufe mittels Vortex gemischt. Zur Denaturierung der DNA wird nun der Ansatz 1,5 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt und anschliessend 5 min auf Eis abgekühlt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (Tischzentrifuge, 14.000 rpm, 20 min) werden nun Zellreste, chromosomale DNA und ribosomale RNA sedimentiert und können anschliessend mit einem Zahnstocher entfernt werden. Dem plasmidhaltigen Überstand werden 500 µl Ethanol zugesetzt, geschüttelt und 15 min bei RT inkubiert; anschliessend wird das Präzipitat bei RT sedimentiert (Tischzentrifuge, 14.000 rpm, 10 min). Die Plasmid-DNA wird mit 70% Ethanol gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und in 10-50 µl TE aufgenommen.

Lysispuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 62,5 mM EDTA 0,4 % (v/v) Triton X-100 2,5 M LiCl
LB-Medium:	1% (w/v) Bacto Trypton 0,5 % (w/v) Bacto Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl
Antibiotikum:	Ampicillin 100 µg/ml
TE:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA

4.1.8. Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Eine typische PCR-Reaktion wurde auf Eis gekühlt in einem 0,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert.

Üblicherweise wurde ein Ansatz von 50 µl zusammengestellt, der folgende Komponenten enthielt:

≥1 ng Matritzen-DNA
je 1 mM Primer
je 100 mM dNTPs
1/10 (v/v) 10x PCR-Puffer
0,5 U Taq-DNA-Polymerase

Die Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden kurz und vorsichtig mit der Pipette vermischt und mit einem Tropfen Mineralöl beschichtet, um ein Verdampfen von Wasser während der Aufheiz- und Abkühlzyklen zu verhindern. Die Reaktion wurde gestartet, indem das Reaktionsgefäß in den auf 94°C vorgeheizten Heizblock gestellt wurde („Hot Start“).

Die Aufheizphase, die üblicherweise 1 min lang erfolgte, wurde auf 5 min ausgedehnt wenn genomische DNA als Matrize verwendet wurde, um so eine vollständige Denaturierung der DNA sicherzustellen. Ausserdem beinhaltete jeder Zyklus einen Denaturierungsschritt von 30 sec bei 94°C. Die Hybridisierungsbedingungen von Oligonukleotid und DNA wurden von dem 3' Bereich des Primers abhängig gemacht: Bestanden die letzten 6 Basen zu mehr als 50% aus G oder C, konnte erfahrungsgemäss eine Annealingtemperatur von 55°C gewählt werden. Diesem Schritt wurden 30 sec pro Zyklus eingeräumt.

Die Dauer des letzten Reaktionsschrittes war von der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes abhängig, da die Taq-Polymerase bei 72°C in der Lage ist ca. 1000 bp/min fertigzustellen. So wurden beispielsweise für die Amplifikation eines 3 kb DNA-Fragmentes für diesen Schritt pro Zyklus 3 min programmiert. Standardgemäss wurden 30 Zyklen durchgeführt. Das Ergebnis der Reaktion wurde durch Analyse von 10 µl des Reaktionsgemisches auf einem geeigneten Agarosegel überprüft.

10 x PCR-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,3
	15 mM MgCl ₂
	500 mM KCl

4.1.9. Restriktionshydrolyse

Der Versuch wird im allgemeinen in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt.

Neben der Plasmidpräparation enthält der Reaktionsansatz einen von Hersteller mitgelieferten passenden 10x Restriktionspuffer und die entsprechende Restriktions- endonuklease (2-10 U). Es ist auch möglich, einen Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen gleichzeitig vorzunehmen, vorausgesetzt die Enzyme hydrolysieren unter den gleichen Pufferbedingungen.

Das Volumen des zugegebenen Restriktionsenzym sollte wegen des relativ hohen Gehaltes an Glycerin 1/10 des Gesamtvolumens des Spaltungsansatzes nicht überschreiten.

Die Inkubation erfolgt bei der vom Hersteller angegebenen optimalen Temperatur für 1 h bei analytischen Ansätzen, bei RT über Nacht bei präparativen Ansätzen.

4.1.10. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wird mit einem Sequenzier-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt, der auf dem von Sanger *et al.* (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren basiert. Dieser wurde für die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA modifiziert (Chen und Seeburg, 1985). Es werden die mitgelieferten „short range“ Nukleotidpräparationen verwendet, die eine Sequenzierung von bis zu 500 nt pro Reaktionsansatz ermöglichen. Die Reaktionen werden leicht modifiziert nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

4.1.10.1. Sequenzreaktion

Denaturierung der DNA: 2 µg doppelsträngige Plasmid-DNA werden zusammen mit 2 µl 2 M NaOH + 2 mM EDTA in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 10 min bei RT inkubiert.

Fällen der DNA: Durch Zugabe von 8 µl 5 M Ammoniumacetat und 112 µl Ethanol wird die DNA gefällt und durch anschliessende Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 14.000 rpm, 20 min, 4°C) präzipitiert. Es folgt ein Waschschrift mit 70 %igem Ethanol (Hettich-Kühlzentrifuge, 14.000 rpm, 10 min, 4°C). Die gefällte DNA wird in der Speed-Vac getrocknet und in 10 µl H₂O aufgenommen.

Primer-Anlagerung: Zu der denaturierten DNA werden 2 µl des gewünschten Primers (5 pmol/µl) und 2 µl Annealing-Puffer zugegeben und bei 37°C für 20 min inkubiert.

Markierung und Kettenabbruch: Für jeden Reaktionsansatz werden 2,5 µl der ddNTP-Terminationsgemische pipettiert und bei 37°C vorinkubiert. Die Markierungsreaktion der mit Primern angelagerten DNA erfolgt durch Zugabe von 3 µl des Markierungsgemisches (dATP), 1 µl α-[³⁵S]-dATP (10 mCi/ml) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (verdünnt mit Enzym-Verdünnungspuffer auf 1,6 U/µl). Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden je 4,5 µl des markierten Reaktionsansatzes zu den Terminationsgemischen gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 5 µl Formamid-Auftragspuffer gestoppt. Die Proben können bis zum Auftragen bei -20°C gelagert werden. Es werden je 1,5 µl jeder Reaktion nach dreiminütigem Denaturieren auf 95°C auf ein Sequenzgel aufgetragen.

Annealing-Puffer: 1 M Tris/HCl, pH 7,6
 100 mM MgCl₂
 160 mM DTT

ddATP-Terminationsgemisch:	je 840 μ M dCTP,dGTP,dTTP 93,5 μ M dATP 14 μ M ddATP 40 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM NaCl
ddCTP-Terminationsgemisch:	je 840 μ M dATP,dGTP,dTTP 93,5 μ M dCTP 17 μ M ddCTP 40 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM NaCl
ddGTP-Terminationsgemisch:	je 840 μ M dATP, dCTP, dTTP 93,5 μ M dGTP 14 μ M ddGTP 40 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM NaCl
ddTTP-Terminationsgemisch:	je 840 μ M dATP, dCTP, dGTP 93,5 μ M dTTP 14 μ M ddTTP 40 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM NaCl
Markierungsgemisch-dATP:	je 1,375 μ M dCTP, dGTP, dTTP 333,5 mM NaCl
Enzym-Verdünnungspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 5 mM DTT 100 μ g BSA / ml 5 % (v/v) Glycerin

Formamid-Auftragspuffer: 0,3 % (w/v) Bromphenolblau
 0,3 % (w/v) Xylencyanol
 10 mM EDTA, pH 7,5
 97,5 % (v/v) deionisiertes Formamid

4.1.10.2. Anfertigung eines Sequenzgels und Durchführung der Gelelektrophorese

Die Produkte der DNA-Sequenzierungsreaktion werden in 6 % Polyacrylamid-Gelen unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dafür wird eine Ohrenplatte und eine Haftplatte (20 cm x 40 cm) gründlich mit Spülmittel gereinigt und mit Ethanol trockengerieben. Beide Platten werden dann, durch Abstandhalter (0,5 mm) getrennt, waagrecht plaziert. Nach dem Eingiessen der Lösung (50 ml 6 %ige Acrylamidlösung mit 250 µl 10 %igem APS und 50 ml TEMED) wird der Geltaschenformer eingesetzt und das Gel für mindestens 1,5 h auspolymerisiert.

Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Apparatur für 5 min bei 5 mA, 30 min bei 30 mA und ca. 2 h bei 25 mA. Als Laufpuffer wird 1 x TBE verwendet. Vor dem Probenauftrag werden die Geltaschen gründlich mit 1 x TBE gespült, um den aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Für eine gleichmässige Erwärmung während des Laufs sorgt eine hinter die Glasplatte geklammerte Aluminiumplatte. Nach der Gelelektrophorese wird die Ohrenplatte vorsichtig abgenommen und die Haftplatte mit dem Gel zum Entfernen des Harnstoffes für 10 min in deionisiertes Wasser gelegt. Das Gel wird auf 2 Lagen Whatman 3 MM Papier überführt, mit einer Haushaltsfolie abgedeckt und für 30 min auf einen Geltrockner gelegt. Anschliessend kann eine Autoradiographie angefertigt werden.

Gellösung: 6% (w/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 29:1)
 7 M Harnstoff
 in 1 x TBE
 filtrieren und bei 4°C im Dunkeln aufbewahren

4.2. Arbeiten mit Bakterien (*E. coli*)

4.2.1. Anlegen von Dauerkulturen

Es ist möglich, Bakterien unter folgenden Bedingungen für mehrere Jahre zu lagern:

0,85 ml einer ÜN-Kultur werden zusammen mit 0,15 ml 100% Glycerin in ein steriles, durch Schraubverschluss verschliessbares Reaktionsgefäss gegeben. Die Komponenten werden vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei -70°C gelagert.

Um eine neue Kultur hochzuziehen, werden mit einer sterilen Skalpellspitze einige Zellen der gefrorenen Dauerkultur entnommen und auf Festmedium ausgestrichen.

4.2.2. Herstellung elektrokompenter Zellen (EMBL-Sequencing Manual 1990)

10 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* XL1-Blue werden in 1 l LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin (0,1 mg/ml) überimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5-1,0$ gezogen.

Anschliessend wird die Kultur in vorgekühlte GS3 Becher überführt, 10 min auf Eis inkubiert und schliesslich abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, GS3-Rotor, 5.000 rpm, 10 min, 4°C).

Der Überstand wird abgenommen und das Sediment in 1000, 500 und 20 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und gewaschen. Nach jedem einzelnen Waschschrift werden die Zellen abzentrifugiert. Schliesslich werden die nochmals sedimentierten Zellen in 2,5 ml 10% sterilem Glycerin aufgenommen, zu Portionen von 40 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

4.2.3. Elektroporation

Die zu transformierende DNA (ca. 5 ng Plasmid-DNA oder ca. 25 ng DNA nach Ligation) werden zu einem tiefgefrorenen Aliquot elektrokompenter *E. coli*-Zellen (XL1-Blue) zugegeben. Die Zellen werden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut und anschliessend in eine ebenfalls auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (BioRad Gene Pulser Küvetten, 1mm Elektrodenabstand) überführt, um sie sofort bei 1,25 kV/cm (200 Ohm; 25 μF) zu

transformieren.

Direkt im Anschluss daran wird der Transformationsansatz in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C für 45 min inkubiert. Schliesslich kann die gewünschte Menge Zellsuspension auf Festmedium mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden.

SOC-Medium:

- 2% (w/v) Bacto-Trypton
- 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 1 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- autoklavieren
- sterilfiltrierte Stammlösung zugeben für:
- 20 mM Glukose (frisch zusetzen)

4.3. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen und Geweben

(Teile der Arbeit mit eukaryotischen Zellen und Geweben wurden durch eine medizinisch-technische Assistentin durchgeführt)

4.3.1. Anästhesie der Hühner

Die Anästhesie des Versuchstieres erfolgt in einer Narkosekammer aus Plexiglas (L 400xH 300xB 200 mm) durch Einleitung von 3-4 Vol% Isofluran in Sauerstoff (Inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO₂) 100%; Flow: 7l/min).

Nach Verlust der Stellreflexe und mit Eintreten der Hypnose wird das Huhn aus der Kammer entnommen und die Anästhesie per Maske mit 2,5 Vol% Isofluran in Sauerstoff (FiO₂: 100%; Fluss 1,5 l/min) aufrechterhalten. Die intraoperative Analgesie des Versuchstieres wird durch intramuskuläre Injektion von 5mg/kg KG Ketamin erreicht.

Der Eileiter kann nun unter sterilen Bedingungen nach medianer Laparotomie dargestellt und entnommen werden, das Huhn wird anschliessend durch Entblutung über die Bauchorta getötet.

4.3.2. Gewinnung einer primären Oviduktzellkultur

Der steril entnommene Eileiter wird mit eiskalter Hank'scher Lösung perfundiert. Anschliessend wird das Gewebe in einem sterilen 50 ml Falconröhrchen mit einer Schere zerkleinert. Das Gewebe wird kurz anzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Anschliessend wird das Gewebe in Trypsin-EDTA Lösung aufgenommen, die entstehende Suspension wird in eine Rührzelle gefüllt und 10 min bei sehr langsamer Geschwindigkeit vorsichtig gerührt. Nach Verwerfen des Überstandes, werden die trypsinisierten Zellen in einem 20 ml Falcon-Reagenzglas aufgenommen. Die Trypsinierungsreaktion wird durch Zugabe von Stop-Medium beendet. Je nach Gewebeverband muss dieser Vorgang bis zu 8x wiederholt werden.

Schliesslich werden die Zellen 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wird in „Vollmedium Huhn“ aufgenommen und die Zellen werden begutachtet und gezählt.

Dazu werden 100 µl Zellsuspension zu 100 µl Trypanblau-Lösung gegeben und in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Tote Zellen färben sich blau.

Die Zellen werden nun in gewünschter Konzentration in 6-well Platten oder in Flaschen ausgesät. Um nun den Anteil der Oviduktzellen gemessen am Anteil der Fibroblasten zu erhöhen, wird nach ca.12 h erneut der Überstand abpipettiert. Zu diesem Zeitpunkt ist der Grossteil der Fibroblasten bereits adhärent und bleibt in der Flasche zurück, die Oviduktzellen befinden sich hingegen noch in Suspension und können ausgesät werden.

Das Verhältnis Oviduktzellen zu Fibroblasten liegt nun bei durchschnittlich 1/10.

Vollmedium Huhn:	500 ml Dulbecco-Medium
	15% [w/v] FCS
	50 nM Östradiol
	0,12 U Insulin
	1% Penicillin/Streptomycin
	1% Hühnerserum

Stopmedium:	500 ml Dulbecco-Medium
	15% [w/v] FCS

Ammonium-Chlorid-Lösung: 0,14 M NH₄Cl
 0,017 M Tris, pH 7,65
 mit HCl auf pH 7,2 kalibriert

Die Lyse-Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml William's E-Vollmedium gestoppt. Nach Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) wird das Pellet erneut in 2 ml frischem William's E-Vollmedium aufgenommen. Nachdem ein zweiter Zentrifugationsschritt erfolgt ist (10 min, 1000 rpm), wird das Zellpellet in 2 ml William's E-Vollmedium aufgenommen und ausgezählt.

William's E-Vollmedium: 500 ml William's E Medium
 5 mg Insulin
 150 µg Dexamethason
 1% [w/v] IST
 5% [w/v] FCS

4.3.4. Gewinnung einer embryonalen Fibroblastenkultur

Um embryonale Hühnerfibroblasten zu gewinnen, wird ein ca. 8 Tage altes, befruchtetes Hühnerei sorgfältig mit 70% Ethanol desinfiziert. Anschliessend wird die Eischale mit einer Schere aufgeschnitten und das Embryo mit einer sterilen Pinzette aus der Schale gehoben.

Das Embryo wird nun mit steriler Hank'scher Lösung mehrmals gründlich abgespült.

Das gereinigte Gewebe wird durch ein Falconnetz in ein steriles 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen gemörsert. Dieses wird anschliessend mit steriler Hank'scher Lösung auf 15 ml aufgefüllt und mehrmals vorsichtig von Hand geschwenkt. Die Zellen werden nun 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand über dem Zellpellet wird vorsichtig abpipettiert. Um letzte kleine Zellverbände aufzulösen, wird das Pellet in Trypsin-Lösung aufgenommen, und bei 37°C 5 min im Wasserbad inkubiert.

Schliesslich wird die Reaktion durch Zugabe von 14 ml William's E-Vollmedium beendet, und das Röhrchen abermals vorsichtig von Hand geschwenkt.

Die Zellen werden nun in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschliessend in 6-well Platten ausgesät.

4.3.5. Lipofektion

Dieses Verfahren dient dazu, DNA-Moleküle in Zellen einzuschleusen, um eine (meist) transiente Expression der entsprechenden Erbinformation beispielsweise in Oviduktzellen und Fibroblasten zu erreichen.

Für diese Arbeit wurde der „PerfFect™ Lipids“ Lipofektionskit verwendet. Die Zellen werden in 6-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50-60% gezüchtet. 1 ml serumfreies Medium werden mit 15 µl (30µg) Pfx-2 Lipidlösung in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Gefäss vermischt. Ebenso wird mit 1 ml serumfreiem Medium und 5 µg Plasmidlösung (in sterilem 1x TE, mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits aufgereinigt) verfahren. Die Ansätze werden 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend werden die beiden Lösungen vorsichtig vermengt und bei Raumtemperatur weitere 10 min. inkubiert.

Inzwischen wird das Medium aus der Zellkultur abgesaugt, die Zellen zweimal mit jeweils 2,5 ml steriler PBS-Lösung gewaschen und mit der Lipidlösung beschichtet. Anschliessend werden die Zellen 4 h in einem Inkubator bei 37⁰C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wird die Transfektionslösung wieder entfernt und durch 2,5 ml „Vollmedium Huhn“ ersetzt. Nach einer erneuten Inkubation von 48 h im Inkubator kann abschliessend ein geeignetes Detektionsverfahren durchgeführt werden.

4.3.6. Virofektion

Zur Virofektion wird das unter Lipofektion beschriebene Verfahren mit einer Fibroblastenzellkultur durchgeführt. Die DNA-Lösung entspricht hierbei einem 1:1 Gemisch aus Helferplasmid und Vektorplasmid. Nach der zweitägigen Inkubationszeit im Zellinkubator wird das Medium mit den darin enthaltenen infektiösen Partikeln abgesaugt und erneut über 50-60% dicht gewachsene Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 48h werden an den Zielzellen die der transfizierten Erbinformation entsprechenden Genprodukte nachgewiesen.

4.3.7. *In vivo* Genegun-Transfektion

Das Einschleusen von DNA in Zellen mit Hilfe der „Genkanone“ stellt eine sichere und einfach zu etablierende Methode dar, um transiente oder stabile Transfektion von Zellen zu erreichen.

Die DNA wird bei diesem Transfektionsverfahren an Goldpartikel gebunden, welche mittels Druckluft auf Gewebe oder Zellen in Kultur geschossen werden. Ein Teil der Mikroträgerpartikel findet so seinen Weg in das Zytoplasma, von wo aus die eingebrachte DNA in den Zellkern transportiert und abgelesen werden kann.

4.3.7.1. Vorbereitung der Mikroträgerpartikel

Pro Transfektionsverfahren werden 25 mg Goldpartikel (für ca. 30 Schuss) abgewogen und in 3 ml 100% Ethanol in einem 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Anschliessend wird das Gemisch auf dem Vortex in Suspension gebracht, während gleichzeitig 100 µl einer 0,05 M Spermidinlösung tropfenweise zugegeben werden. Um Verklumpungen der Goldpartikel zu lösen, wird das Zentrifugenröhrchen im Anschluss daran ca. 5 sec. in einem Ultraschallbad behandelt, bevor 50 µg der einzuschleusenden DNA (1 µg /µl, QIAfilter Plasmid Midi Kit-Aufreinigung) der Lösung zugegeben werden. Um ein Absetzen der Goldpartikel zu verhindern wird das Zentrifugenröhrchen sofort wieder auf dem Vortex geschüttelt, während tropfenweise 100 µl einer 1 M CaCl₂-Lösung zugegeben werden. Danach wird das Gemisch 10 min bei RT inkubiert. Die nun mit DNA beladenen Goldpartikel werden anschliessend 1 min bei 6000 U abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml 100% Ethanol aufgenommen. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt, wobei das Sediment im letzten Schritt in 3 ml einer frisch zubereiteten PVP-Lösung aufgenommen wird.

Schliesslich wird das Gemisch auf dem Vortex erneut in Suspension gebracht. In dieser Form können die DNA-Goldpartikel entweder gleich zur Vorbereitung des Munitionsschlauches weiterverwendet werden, oder bei -20°C bis zu 2 Monate gelagert werden.

4.3.7.4. Probensammlung aus Eiern

Sowohl präoperativ, als auch postoperativ wird der Käfig der Tiere täglich nach frisch gelegten Eiern durchsucht. Diese werden gesammelt, mit Datum und Herkunftstier gekennzeichnet und anschliessend in einem Kühlschrank bei 4°C gelagert. Nach maximal einer Woche erfolgt die Probengewinnung. Die Eischale wird aufgeschlagen und Eiweiss und Eigelb in eine Petrischale gegeben. Dabei lässt sich eine Trennung des Eiweisses in eine dick- und eine dünnflüssige Fraktion beobachten. Ca. 1 ml der dünnflüssigen Fraktion wird in einem 1,5 ml Eppendorfgefäss aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

4.4. Arbeiten mit Proteinen

4.4.1. Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA)

Dieses Verfahren wird verwendet um Erythropoietin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand oder im Hühnerei zu messen. Es wird ausschliesslich der EPO-ELISA Kit Cat. No. 1693417 (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgt nach Standardvorschriften.

Wird als Substrat Überstand verwendet, so wird dieser nach Abnahme aus der Zellkultur unverdünnt eingesetzt.

5. Ergebnisse

5.1. Identifikation eines geeigneten Promotorbereiches aus dem Ovalbumingen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, humanes Erythropoietin in Eileitergewebezellen des Huhnes zu exprimieren, um Erkenntnisse über den Nutzen des Tieres als „Bioreaktor“ zu gewinnen. Wenn möglich sollte die Expression spezifisch in den eileitereigenen, auf Sekretion spezialisierten Oviduktzellen unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors erfolgen. Dieser zeigt im reifen Organismus Huhn ausschliesslich in Oviduktzellen Aktivität.

Dazu musste in einem ersten Schritt ein geeignetes Promotorfragment identifiziert und kloniert werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, findet man im Promotorbereich des Ovalbumingens stromaufwärts vom konstitutionellen Promotor das „Steroid-regulatorische Element“ (SRE) und das „Negativ-regulatorische Element“ (NRE). Um gewebespezifische Expression zu erreichen, musste das zu klonierende Fragment alle drei Bereiche enthalten.

Ausserdem gibt es im Ovalbumingen ein nicht translatiertes Exon (bp 1343-1389) (Woo SL 1981). Da ein Einfluss dieses Exons, beispielsweise auf die Stabilität der mRNA, nicht auszuschliessen war, wurden zwei Konstrukte kloniert, von denen eines neben den Promotorelementen zusätzlich dieses Exon einschloss. Um die Aktivitäten der Promotorkonstrukte testen zu können, wurden die zwei Konstrukte stromaufwärts des lacZ-Gens in den Vektor pUT 110 kloniert. Nach Transfektion des Plasmids in Oviduktzellen konnte eine erfolgreiche Expression anhand der Blaufärbung der Zellen erkannt werden.

5.1.1. Klonierung der Promotorkonstrukte pOVP und pOVP+exo

Mittels PCR-Reaktion wurden zwei Fragmente des Ovalbumingens amplifiziert. Als Matrize wurde hierfür genomische DNA aus Hühnerleberzellen verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die Fragmente über den selben 5'-Promotorbereich verfügten. Im 3'-Terminus unterschieden sich die Fragmente jedoch. Fragment 2 (1004 bp, pOVP+exo) beinhaltete, im Gegensatz zu Fragment 1 (949 bp, pOVP), zusätzlich ein nicht

translatiertes Exon (siehe *Abbildung 5*). Die Sequenz der Primer war so gewählt worden, dass dem 3'-Ende der Fragmente eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SpeI* eingefügt wurde.

Der Vektor pUT 110 wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *BstEII* linearisiert und die Enden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* geglättet. Nach Reinigung durch Phenolextraktion wurde eine weitere Spaltung mit dem Restriktionsenzym *SpeI* durchgeführt und die DNA nach Gelelektrophorese aus einem low-melting-Agarosegel isoliert.

Die PCR-Fragmente wurden nach einem Restriktionsverdau mit *SpeI* ebenfalls aus einem low melting-Agarosegel isoliert. Anschliessend wurden die Fragmente 1 und 2 mit dem Vektor ligiert (*Abbildung 5*).

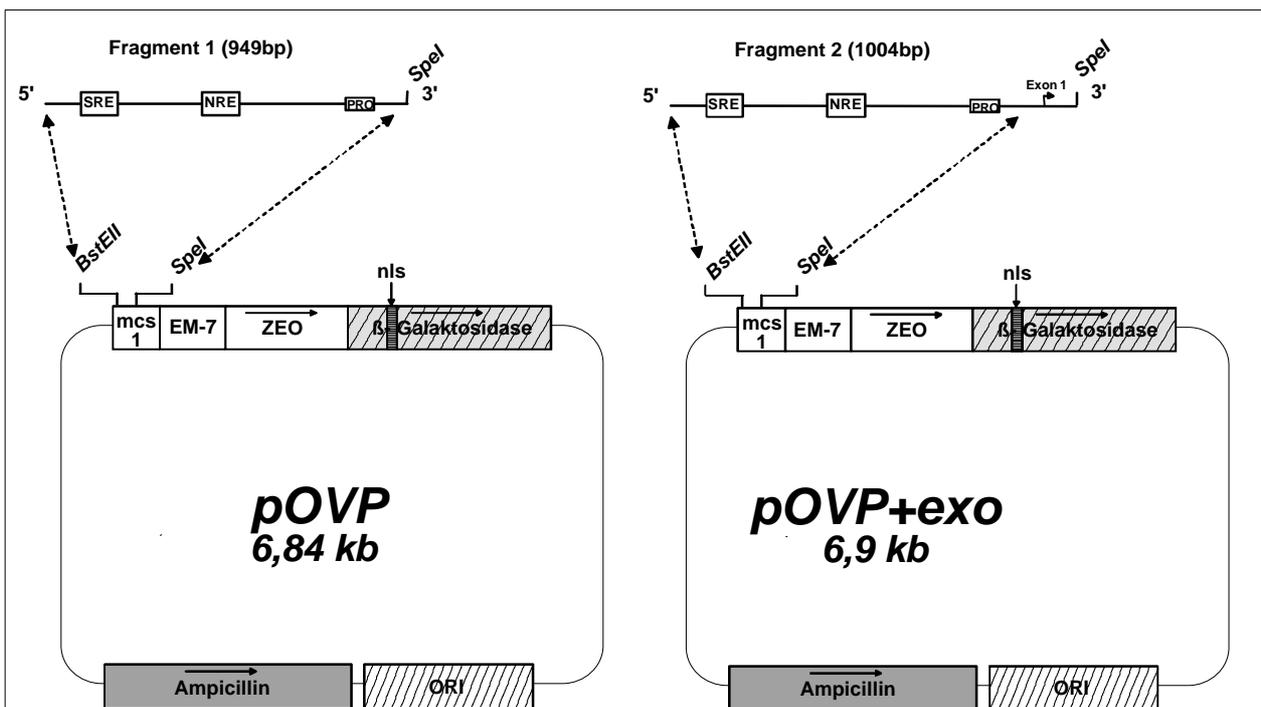


Abbildung 5: Konstruktion von pOVP und pOVP+exo

Die Fragmente 1 und 2 des Ovalbuminpromotors wurden jeweils in den mit den Restriktionsenzymen *SpeI*/*BstEII* vorgeschrittenen Vektor pUT 110 einkloniert.
Ampicillin: Ampizillin-Resistenzgen, β -*Galactosidase*: β -Galactosidase-Gen,
EM-7: *E. coli*-Promotor, *mcs*: multiple cloning site, *nls*: nuclear location signal,
NRE: Negativ-regulatorisches Element, *ORI*: Origin of Replication,
PRO: konstitutioneller Promotor, *SRE*: Steroid-regulatorisches Element,
ZEO: Zeomycin-Resistenzgen

5.1.2. Transfektion einer primären Oviduktzellkultur

Um die Funktionalität der klonierten Promotorfragmente auszutesten, wurden mit den Konstrukten pOVP und pOVP+exo primäre Eileiterzellen vom Huhn *in vitro* mittels Lipofektion transformiert. Bei diesem Verfahren wird die DNA in Liposomen verpackt, welche mit der Zellwand verschmelzen und dabei die DNA in das Zellinnere entlassen.

Folgender Versuchsaufbau wurde gewählt:

Nachdem im Verlauf des 2.-4. Tages nach Entnahme des Eileiters die Oviduktzellen adhärent geworden waren, wurde die Lipofektion durchgeführt.

Für eine Transfektion wurden folgende DNA-Mengen eingesetzt:

	pOVP	3µg
	pOVP+exo	3µg
Positivkontrolle	pcDNA 3.1 ^(CMV-Promotor)	3µg
Negativkontrolle	pUT 110 ^(kein Promotor)	3µg

Nach weiteren 48 h Stunden Inkubation wurde überprüft, ob die Zellen eine Blaufärbung aufwiesen.

In ca. der Hälfte der Fälle gelang es nicht, in den mit pOVP/pOVP+exo transfizierten Zellen eine β -Galactosidase-Aktivität zu beobachten.

Konnte eine Blaufärbung gesehen werden, so handelte es sich bei den positiv identifizierten Zellen offensichtlich um Oviduktzellen, es wurde jedoch kein Unterschied in der Intensität zwischen positiven pOVP-Zellen und positiven pOVP+exo-Zellen beobachtet. Allerdings lag der Anteil positiver Zellen unter pOVP jedesmal deutlich höher (0,5-1% positive) als bei Zellen mit pOVP+exo (0,2-0,3%). Auch nachdem die Konzentration von pOVP+exo von 3µg auf 5µg erhöht worden war, konnte kein Angleich erreicht werden. Der Anteil der Zellen mit Blaufärbung in der Positivkontrolle (pcDNA 3.1) lag im allgemeinen bei 10 - 30%.

Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde in den folgenden Versuchen nur noch Fragment 1 aus pOVP eingesetzt. *Abbildung 6* zeigt β -Galaktosidase-positive Oviduktzellen, die mit Plasmid pOVP transfiziert worden waren.

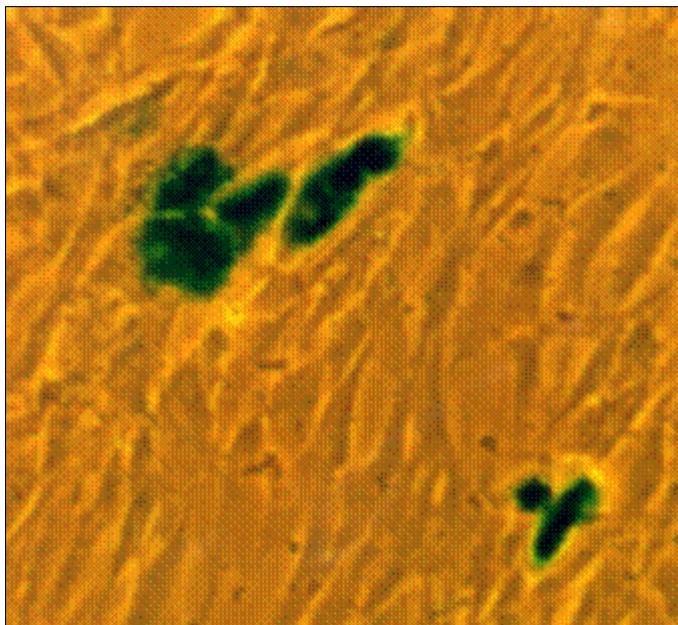


Abbildung 6: lacZ-positive Oviduktzellen nach Transformation mit pOVP

5.2. Expression von Erythropoietin in Oviduktzellen *in vitro* und *in vivo*

Nachdem also ein geeignetes Promotorfragment gefunden und kloniert worden war, sollte am Beispiel von Erythropoietin untersucht werden, ob es möglich war, ein humanes Protein in Eileiterzellen des Huhnes zu exprimieren und aus dem Zytoplasma auszuschleusen. Sowohl die unspezifische Expression unter Kontrolle des viralen CMV-Promotors, als auch spezifische Expression unter der Kontrolle des Ovalbumin-Promotors wurden getestet.

Als Vektor wurde das Plasmid pIRES EGFP gewählt. Dieses enthält das Reportergen „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP), ein Protein, das in der Zelle durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 488 nm fluoresziert. Die Zellen werden durch den Nachweis nicht geschädigt. Ausserdem verfügt das Plasmid über eine dem EGFP vorangestellte „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES), eine DNA-Sequenz, die es ermöglicht, zwei Proteine unter der Kontrolle desselben Promotors zu exprimieren. Durch die gleichzeitige Expression zweier Proteine sollte sichergestellt werden, dass transfizierte Zellen auch erkannt werden konnten, wenn es nicht möglich sein sollte, EPO aus Oviduktzellen auszuschleusen und zu detektieren.

Es wurden drei verschiedene Konstrukte hergestellt:

5.2.1. Konstruktion von pCMV EPO EGFP

Unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors sollten EPO und EGFP, unabhängig vom Zelltyp, exprimiert werden (*Abbildung 7*).

Das EPO cDNA Fragment (500bp) wurde aus dem Bluescript-Vektor durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Clal* und *NotI* ausgeschnitten und über Gelelektrophorese aus einem low-melting-Agarosegel isoliert.

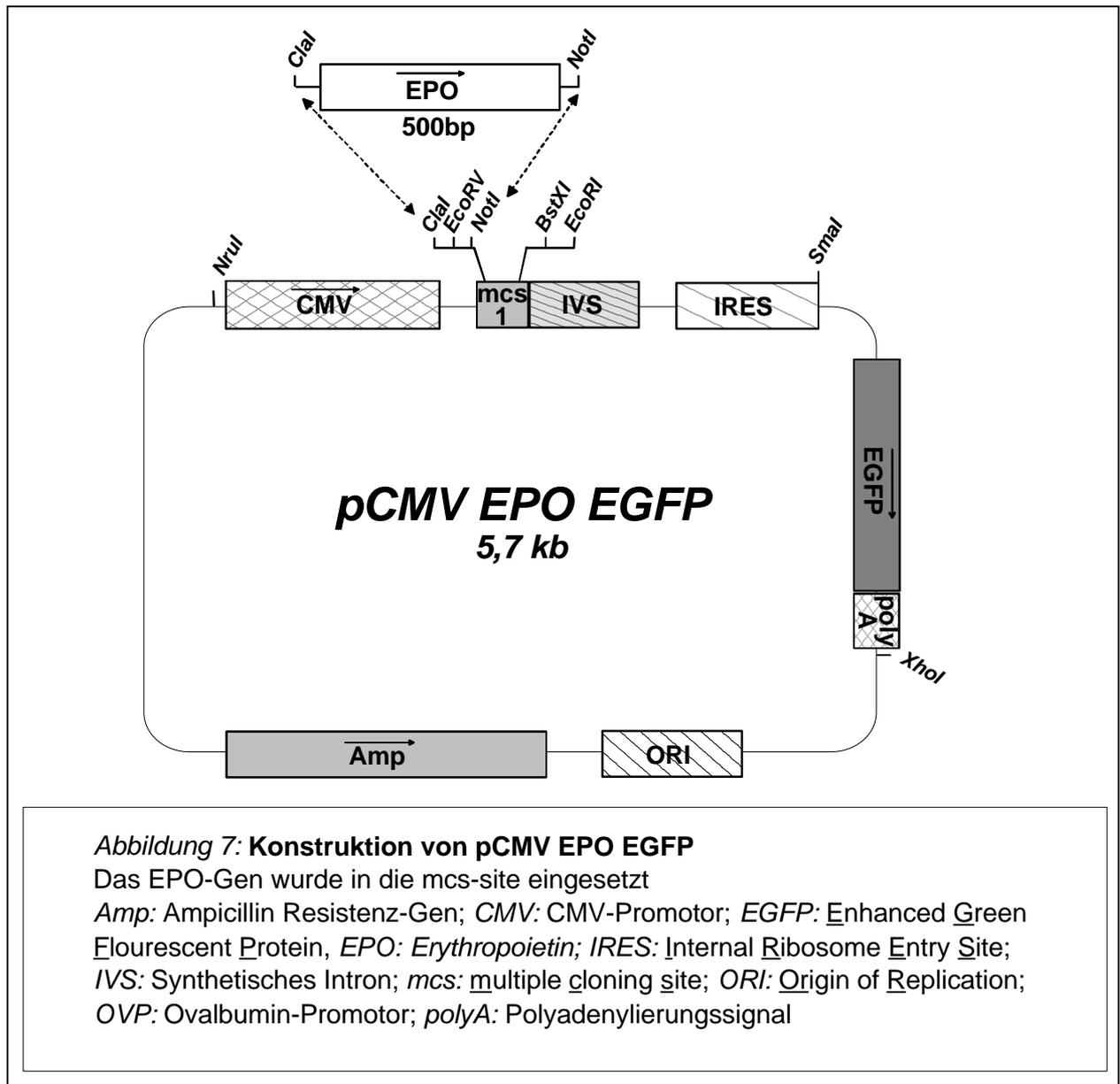
Da die *Clal*-Schnittstelle des Vektors pIRES EGFP eine dam-Methylierungssequenz enthält, musste das Plasmid zuvor in den dam-negativen Stamm *E. coli* GM 2163 transformiert werden. Danach wurde auch der Vektor einem Doppelverdau durch die Restriktionsendonukleasen *Clal* und *NotI* unterzogen und über Gelelektrophorese aus einem Low-melting-Agarosegel isoliert. Anschliessend wurden die beiden isolierten Fragmente ligiert und in *E. coli* transformiert. Positive Klone wurden durch das spezifische Bandenmuster nach Restriktionsverdau identifiziert.

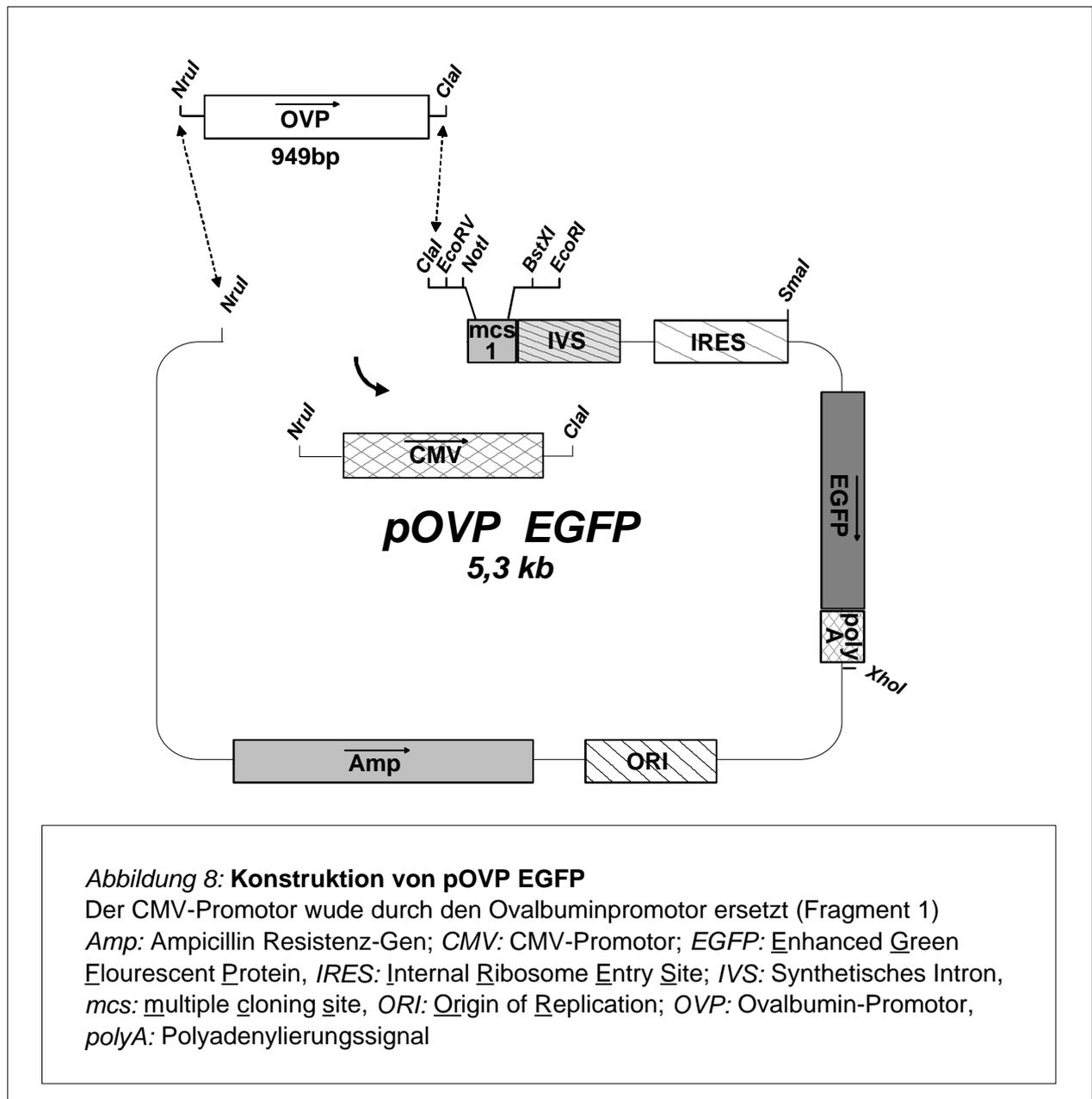
5.2.2. Konstruktion von pOVP EGFP

Das Konstrukt pOVP EGFP ermöglichte die Expression von EGFP unter Kontrolle des Ovalbuminpromotors. Da das Vektorsystem und damit auch das Reportersystem gegenüber den in 4.1. beschriebenen Versuchen gewechselt worden waren, sollte das Plasmid die Aktivität des Ovalbuminpromotors auch in diesem System zeigen.

Zur Umklonierung des Promotorfragmentes aus pOVP (*Abbildung 8*), wurde dieses unter Verwendung der Oligonukleotide „*SreNruXba*“ und „*LEAD-Clal*“ in einer PCR-Reaktion, mit Plasmid pOVP als Matrize, amplifiziert. Anschliessend wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NruI* im 5'-Oligonukleotid und *Clal* im 3'-Oligonukleotid geschnitten.

Der Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *NruI* und *Clal* geschnitten. Vektor und Insertion wurden aus low-melting-Agarosegelen isoliert und schliesslich ligiert. Positive Klone wurden wieder durch das spezifische Bandenmuster nach Restriktionspaltung identifiziert.

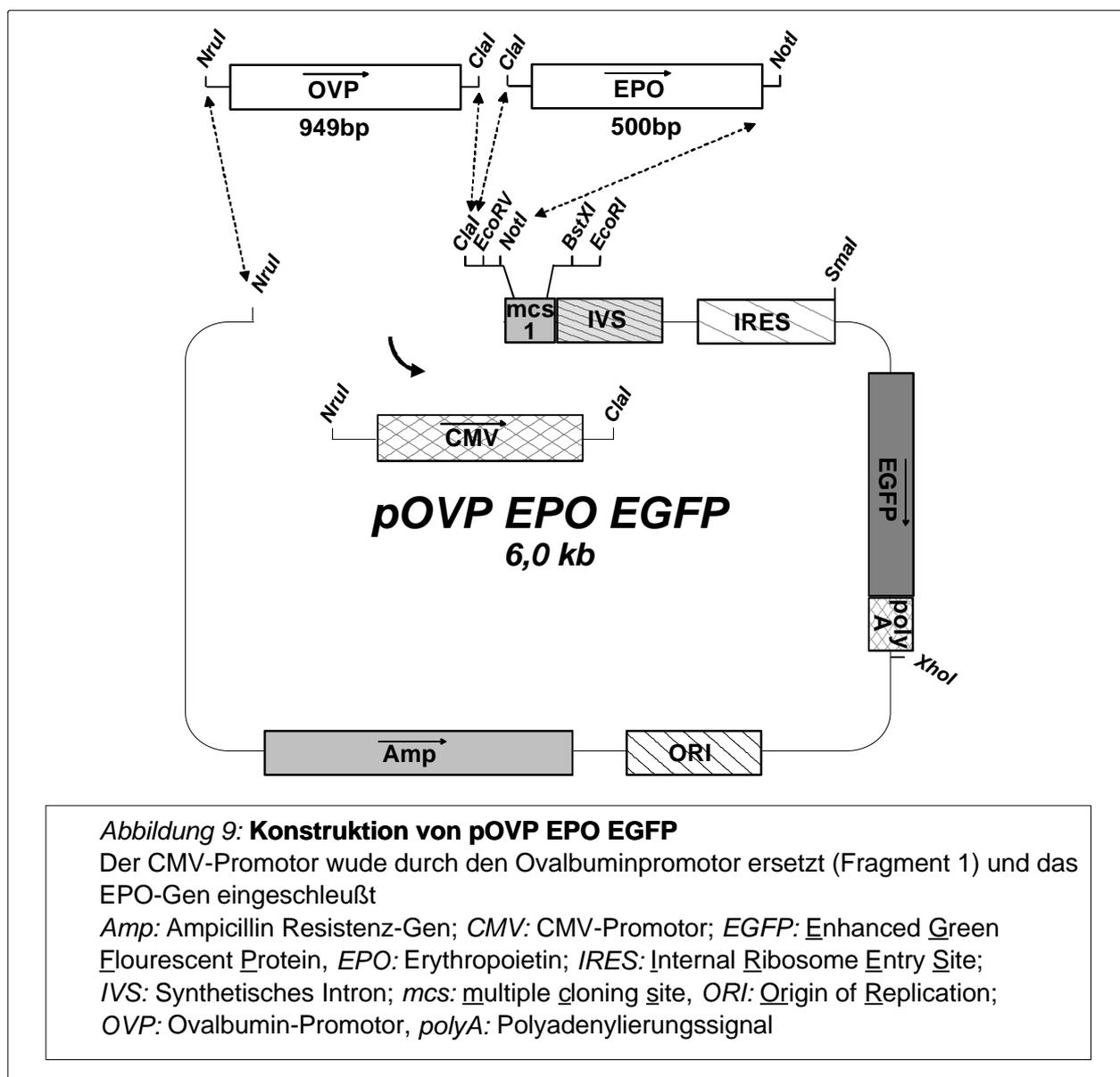




5.2.3. Konstruktion von pOVP EPO EGFP

Das Konstrukt pOVP EPO EGFP (Abbildung 9) sollte ermöglichen, EPO und EGFP gleichzeitig unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors, also spezifisch in Oviduktzellen, zu exprimieren.

Plasmid pOVP EGFP wurde mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *NotI* zwischen Promotor und IRES-Kassette hydrolysiert und in low-melting-Agarose isoliert. Anschliessend wurden Vektor und das mit den Restriktionsenzymen *ClaI* und *NotI* aus Bluescript ausgeschnittene EPO-Fragment in low-melting-Agarose ligiert.



5.2.4. Expression von Erythropoietin in einer primären Ovidukt-Zellkultur

Um die Frage zu klären, ob es möglich ist, Erythropoietin in Eileitergewebezellen zu exprimieren und aus der Zelle auszuschleusen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

Primäre Eileiterzellen vom Huhn wurden an den Tagen 1-12 nach Entnahme des Gewebes mittels Lipofektion transfiziert.

Erfolgte die Transfektion in den ersten 2 Tagen, befand sich ein Grossteil der Zellen noch in Suspension, erfolgte die Transfektion hingegen nach dem 5. Tag, waren die Eileiterzellen bereits adhärent geworden.

Frühe Transfektionszeitpunkte, das heisst in den ersten 12h nach Entnahme des Eileiters, sollten mit pOVP EGFP und pOVP EPO EGFP eine oviduktzellspezifische Expression unter der Kontrolle des Ovalbuminpromoters zeigen, da nach Ablauf dieser Zeit die Aktivität des Promotors in der Zelle eingestellt wird.

Transfektionszeiten im Zeitraum 48-72h sollten überprüfen, ob es generell möglich ist, EPO in Eileiterzellen des Huhnes zu exprimieren (in diesem Fall unter der Kontrolle des CMV-Promotors) und aus der Zelle auszuschleusen. Für die Transfektion wurden folgende Plasmide eingesetzt:

pIRES EGFP	2-5µg
pOVP EGFP	2-5µg
pCMV EPO EGFP	2-5µg
pOVP EPO EGFP	2-5µg

48-72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit UV-Licht der Wellenlänge 488nm angeregt und auf Fluoreszenz getestet. Ausserdem wurde der Überstand der Zellkultur abzentrifugiert und mittels ELISA die Konzentration von Erythropoietin quantifiziert.

Nachdem erste Experimente positive Ergebnisse gezeigt hatten, wurde das Plasmid pCMV EPO EGFP zusätzlich in linearisierter Form eingesetzt, um zu testen, ob sich mithilfe dieser Massnahme eine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz erzielen liess.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Plasmid	EPO-Titer (mU/ml)	Anteil fluoreszierender Zellen/Gesamtzellzahl	Bemerkung
Negativkontrolle	0	Keine	
pIRES EGFP	0	10-12%	- Ausschliesslich Fibroblasten positiv - In einem Fall falsch positiver EPO-Titer (50 mU/ml)
pOVP EGFP	0	Keine	- In einem Fall vereinzelt positive Zellen (<i>Abb. 10B</i>)
pOVP EPO EGFP	0	Keine	
pCMV EPO EGFP	125-170	10-12%	- fast ausschliesslich Fibroblasten
pCMV EPO EGFP lin.	60-170	8-10%	- fast ausschliesslich Fibroblasten

Tabelle 2: Ergebnisse der Transfektion primärer Eileiterzellen vom Huhn.

Zellen in Suspension liessen sich mit keinem getesteten Plasmid transfizieren. Es konnte weder Fluoreszenz gesehen werden, noch liess sich im Überstand der Zellkultur EPO im ELISA nachweisen.

In Zellkulturen, die ab Tag 5 nach Entnahme aus dem Zellverband transfiziert wurden, stiegen die Transfektionsraten, gemessen am Anteil fluoreszierender Zellen in der Kultur, mit der Menge eingesetzter DNA an. Positive, fluoreszierende Zellen konnten regelmässig für Plasmid pCMV EPO EGFP entdeckt werden. Bei den positiven Zellen, die ca. 8-12% der Zellpopulation entsprachen, handelte es sich um fast ausschliesslich um Fibroblasten. Durch Linearisierung des Plasmides konnte keine weitere Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden. Die ELISA-Ergebnisse bestätigten die Fluoreszenz-Beobachtungen. Die gemessenen EPO-Titer betragen mindestens 75 mU/ml, lagen jedoch häufig im oberen linearen Bereich der Standardkurve (170 mU/ml).

Fluoreszenz konnte ebenfalls nach Einsatz des Plasmides pIRES EGFP gesehen werden.

Der Anteil positiver Zellen lag ebenfalls bei ca 10% der Gesamtpopulation, und entsprach grösstenteils Fibroblasten. In einem Fall wurde mit 50 mU/ml ein falsch positiver EPO-Titer nachgewiesen.

EGFP-Expression unter Kontrolle des Ovalbuminpromotors konnte (pOVP EGFP und pOVP EPO EGFP) nicht beobachtet werden. Lediglich in einem Fall konnten vereinzelte, positive Zellen für Plasmid pOVP EGFP gesehen werden, die phänotypisch am ehesten Oviduktzellen entsprachen (*Abbildung 10*). EPO-Titer waren im Überstand nie nachweisbar.

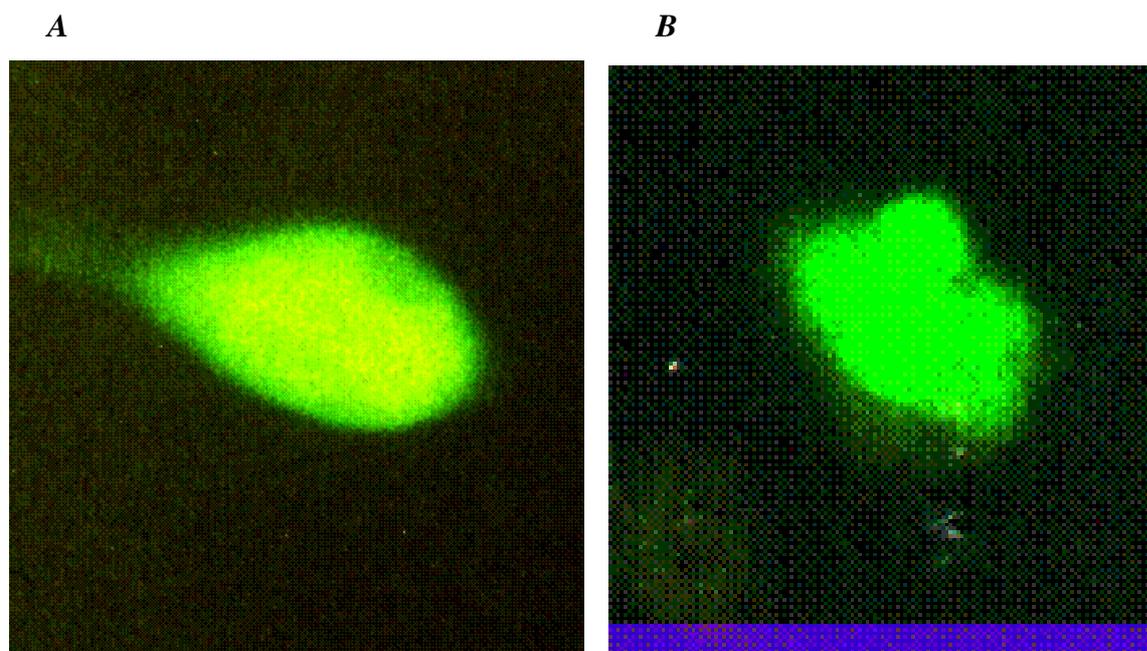


Abbildung 10: Enhanced Green Fluorescent Protein-Expression in primären Eileitergewebezellen

A: Fibroblast nach Transfektion mit pCMV EPO EGFP

B: Zelle (am ehesten Oviduktzelle) nach Transfektion mit pOVP EGFP

5.2.5. Expression von Erythropoietin *in vivo* in Oviduktzellen des Huhnes durch gen- gun-Transfektion und Nachweis des Hormons im Hühnerei

Es war gezeigt worden, dass Erythropoietin in Eileiterzellen vom Huhn exprimierbar war und aus der Zelle ausgeschleust wurde, wenn auch unter diesen experimentellen Bedingungen nicht unter Kontrolle des Ovalbuminpromotors. Nun sollte untersucht werden, ob die Expression auch *in vivo* erzielt werden konnte und ob das Hormon im Hühnerei nachweisbar war. Ausserdem sollte untersucht werden, ob es *in vivo* möglich war, eine spezifische Expression in Oviduktzellen unter Kontrolle des Ovalbuminpromotors zu erreichen.

Hierzu wurden Hühner anästhesiert, laparotomiert, und der Eileiter intraoperativ, *in situ* grossflächig mit Plasmid-DNA beschichteten Goldpartikeln beschossen. Anschliessend

wurden über mehrere Wochen die Eier des Huhnes gesammelt und das Eiweiss auf den Gehalt an Erythropoietin untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Huhn	Plasmid	Schuss	Menge eingesetzter DNA	max. EPO-Konzentration
1	pCMV EPO EGFP	3	5µg	152 mU/ml
2	pCMV EPO EGFP	6	10µg	72 mU/ml
3	pOVP EPO EGFP	6	10µg	†
4	pCMV EPO EGFP	6	10µg	†
5	pOVP EPO EGFP	6	10µg	†
6	pCMV EPO EGFP	6	10µg	keine Eiablage
7	pOVP EPO EGFP	6	10µg	†
8	pOVP EPO EGFP	6	10µg	keine Eiablage
9	pOVP EPO EGFP	6	10µg	40 mU/ml
10	pCMV EPO EGFP	6	10µg	38 mU/ml
11	pOVP EPO EGFP	6	10µg	42 mU/ml

Tabelle 3: Ergebnisse der *in vivo*-Transfektionsversuche: 4 der 11 Versuchstiere verstarben postoperativ vor der ersten Eiablage.

In den Eiern des Versuchstieres 1, das mit dem Plasmid pCMV EPO EGFP transfiziert worden war, konnten über den Zeitraum von drei Wochen positive Erythropoietintiter gemessen werden (*Abbildung 11*).

Die Ergebnisse zeigten in der ersten Woche postoperativ einen starken Anstieg auf Werte zwischen 110-152 mU/ml, fielen dann auf Werte um 60-70 mU/ml ab und konnten in den folgenden zwei Wochen des Beobachtungszeitraumes in diesen Konzentrationen gemessen werden. Die Messwerte zeigten, im Gegensatz zu den präoperativ gewonnenen Kontrollen starke Schwankungen.

In den Eiern von Versuchstier 2, mit Plasmid pCMV EPO EGFP transfiziert, konnten an den Tagen 6 und 7, sowie erneut nach 2 Wochen positive EPO-Titer bis zu 72 mU/ml nachgewiesen werden (*Abbildung 12*).

Die Versuchstiere 3,4,5 und 7, von denen drei mit Plasmid pOVP EPO EGFP und eines mit Plasmid pCMV EPO EGFP transfiziert worden waren, starben postoperativ vor der ersten Eiablage. Zwei weitere Versuchstiere, 6 und 8, die mit jeweils einem der beiden Plasmide transfiziert worden waren, überlebten zwar die ersten postoperativen Tage, kamen jedoch nicht mehr zu einer Eiablage.

Drei weitere Tiere, Huhn 9-11 legten zwar postoperativ Eier, EPO-Spiegel, die über den Kontrollen lagen, konnten jedoch nicht gemessen werden.

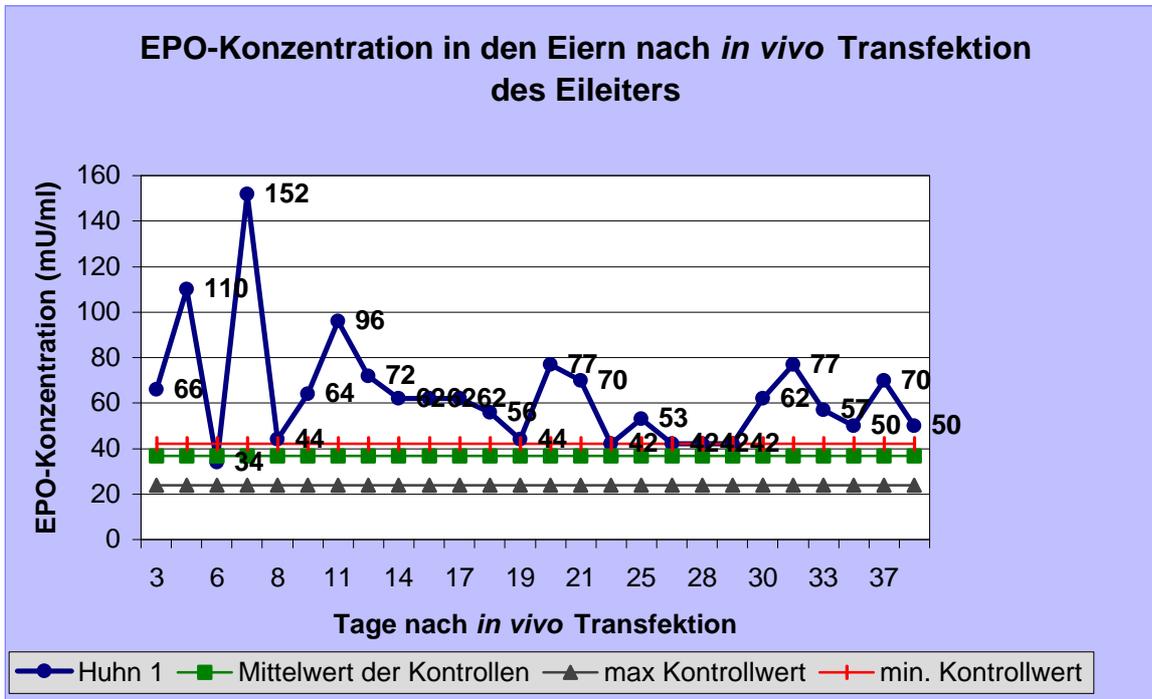


Abbildung 11: Postoperative positive EPO-Titer im Hühnereiweiß bei einem Huhn (Versuchstier 1) mit pCMV EPO EGFP transfiziertem Eileiter.

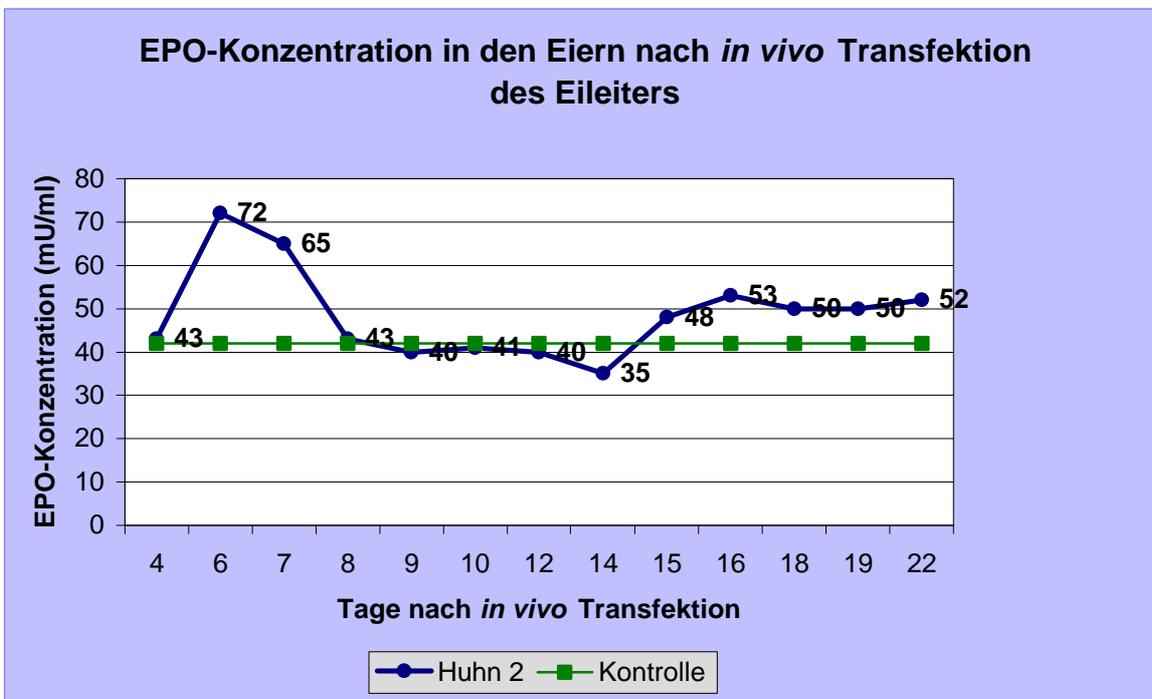


Abbildung 12: Postoperative positive EPO-Titer im Hühnereiweiß bei einem Huhn (Versuchstier 2) mit pCMV EPO EGFP transfiziertem Eileiter.

5.2.6. Versuche zum histologischen Nachweis einer *in vivo*-Aktivität des klonierten Ovalbuminpromotorfragmentes

Da in den Experimenten 4.2.4. und 4.2.5. zwar Expression unter CMV-Promotorkontrolle, nicht jedoch unter der des klonierten Ovalbuminpromotorfragmentes in diesem Reportersystem gezeigt werden konnte, wurde ein weiteres, mutmasslich sensitiveres Experiment unternommen um eine eventuelle *in vivo*-Aktivität des einklonierten Promotorfragmentes nachzuweisen. Der Eileiter zweier Versuchstiere wurde operativ dargestellt (siehe 3.3.4.3.) und ein ca. 3-5 cm langes Eileiterfragment mit 6 Schuss, entsprechend 10 µg DNA von Plasmid pOVP EGFP, beschossen. Das transfizierte Eileiterareal wurde mit einem nicht resorbierbaren Dexon OP-Faden, Stärke 6,0 markiert. Anschliessend wurde die Bauchhöhle wieder verschlossen. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Versuchstiere getötet, und von dem markierten Eileitergewebe wurden 4µm dicke Gefrierschnittpräparate angefertigt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde nach EGFP-Expression gesucht. Grünfluoreszenz, als Zeichen für Expressionsaktivität des Ovalbuminpromotorfragmentes, liess sich jedoch in keinem Schnittpräparat nachweisen.

5.3. Anwendung eines viralen Transfektionssystems auf Eileiterzellen des Huhnes zur Expression von Erythropoietin

Um eine schonendere, „physiologischer“ Transfektion der Zellen zu erreichen und gleichzeitig ein alternatives Verfahren zur Produktion transgener Hühner zu testen, wurden retrovirale „Pendants“ der Plasmide pOVP EGFP, pCMV EPO EGFP und pOVP EPO EGFP kloniert. Als Vektorplasmid wurde pLZ 10 gewählt.

5.3.1. Konstruktion von pLZ OVP EGFP, pLZ CMV EPO EGFP und pLZ OVP EPO EGFP

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion und den Oligonukleotiden Retro 5' und Retro 3' wurde die Expressionskassetten der Plasmide pOVP EGFP, pCMV EPO und pOVP EPO EGFP amplifiziert. Bei der Generierung des 3'-Oligonukleotides wurde darauf geachtet, dass das

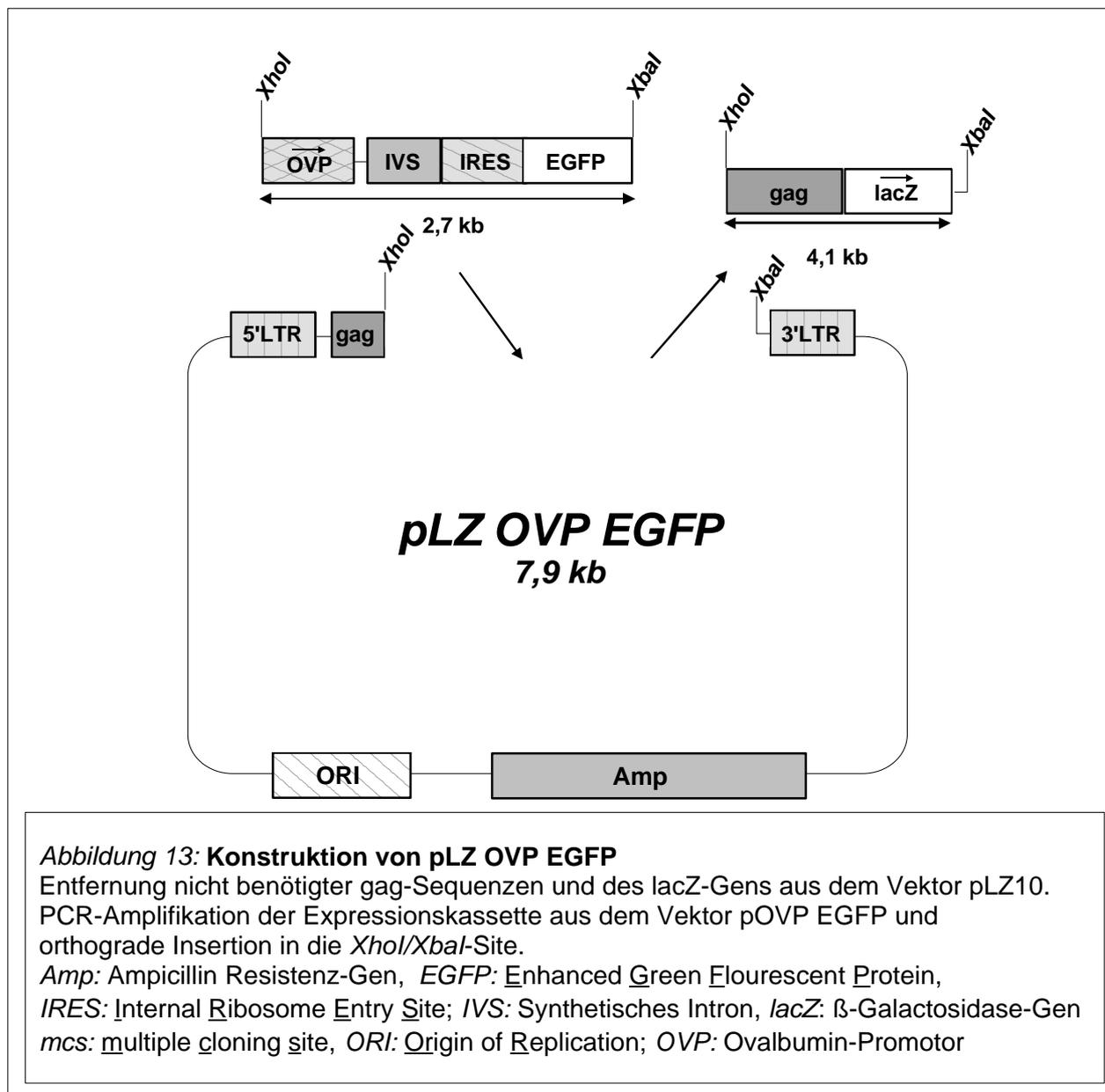
Polyadenylierungssignal des EGFP-Gens ausserhalb des amplifizierten Bereichs lag.

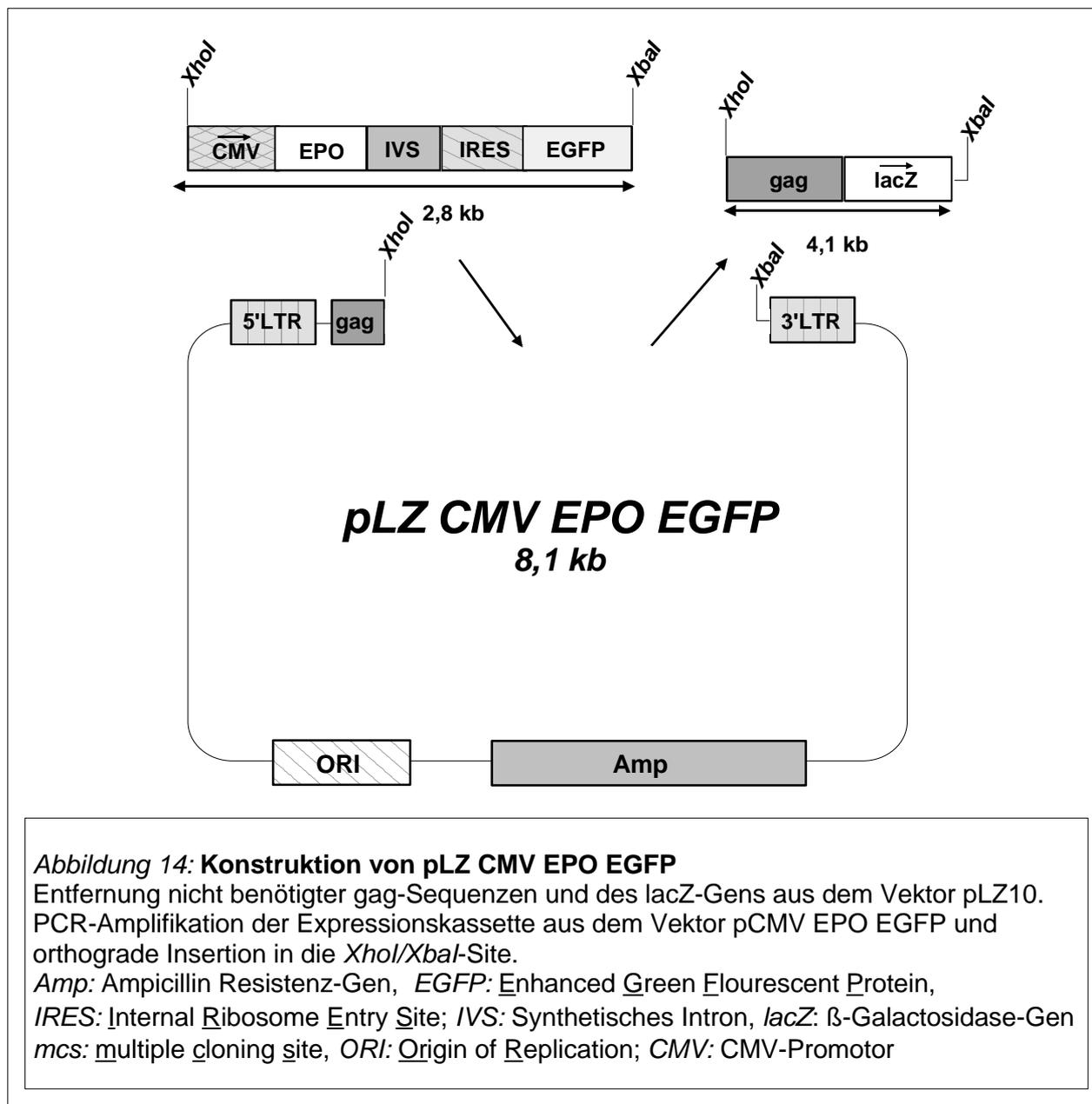
Die PCR-Fragmente wurden anschliessend mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI geschnitten, wobei die Schnittstelle für XhoI im 5'-Oligonukleotid, die XbaI-Schnittstelle im 3'-Oligonukleotid enthalten war.

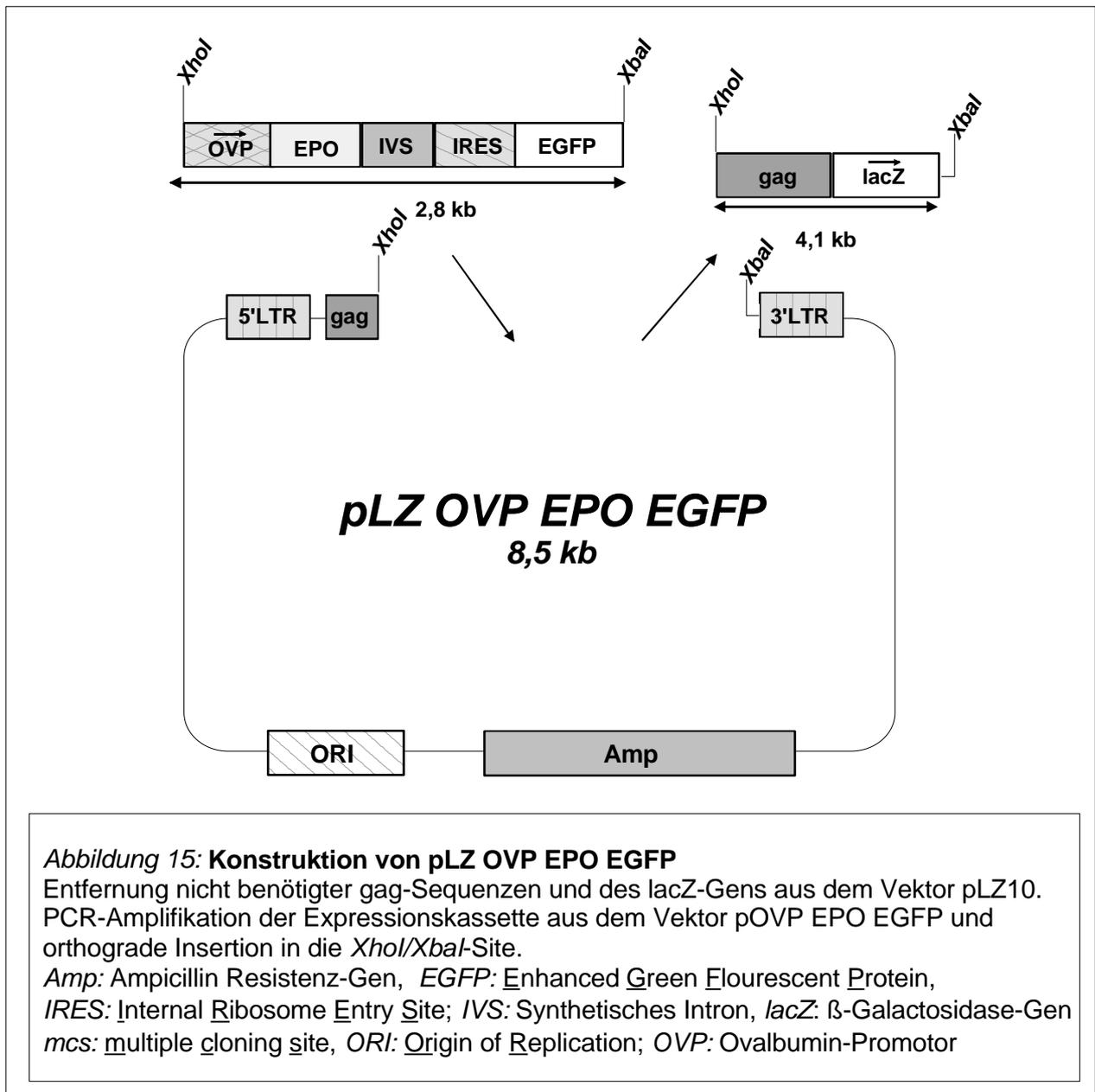
Das Vektorplasmid pLZ 10 wurde ebenfalls mit den Enzymen XhoI und XbaI hydrolysiert.

Auf diesem Weg konnte ein 4.1 kb grosses, zwischen den Long Terminal Repeats gelegenes Fragment aus dem Vektor entfernt werden, das das β -Galaktosidase-Gen und für die Virofektion nicht essentielle Sequenzen des gag-Genes enthielt. Der Vektorrest und die PCR-Fragmente wurden anschliessend über Gel-Elektrophorese aus low-melting Agarosegelen isoliert. Schliesslich wurde jeweils ein PCR-Fragment mit dem verbliebenen Vektor ligiert.

Die Insertion in den retroviralen Vektor wurde anschliessend mit speziell generierten Oligonukleotiden (pLZ1 und Retro pLZ) überprüft, deren Sequenzen deren des Vektors an geeigneten Stellen im 3' und 5' Bereich der Insertionsstelle entsprachen. Zusätzlich wurden die Konstrukte pLZ CMV EPO EGFP und pLZ OVP EPO EGFP sequenziert.







5.3.2. Test der Expressionsfähigkeit der viralen Vektoren pLZ OVP EGFP, pLZ OVP EPO EGFP und pLZ CMV EPO EGFP in fetalen Leberzellen

Da eine Expression von EPO oder EGFP unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors in primären Oviduktzellen nicht gelungen war, und letztlich nicht geklärt war, ob die Ursache hierfür in der Schwierigkeit, diese Zellen zu transfizieren, oder in den eingesetzten Plasmiden begründet lag, wurden die viralen Konstrukte nun in fetalen Leberzellen von Hühnern

getestet. Versuche anderer Arbeitsgruppen hatten in diesen Zellen Ovalbuminpromotor-Aktivität nachweisen können.

Dabei wurden Transfektionen sowohl mit, als auch ohne Helferplasmid pRSV COD durchgeführt. So sollte verglichen werden, ob das Helferplasmid im Sinne einer Virofektion zu deutlich höheren Transfektionsraten beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Transfektionsexperimente sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Plasmid	Menge DNA	Fluoreszenz (Positive Zellen / Gesamtzellzahl)	ELISA	Bemerkung
pLZ OVP EGFP	5µg	negativ	0 mU/ml	
pLZ CMV EPO EGFP	5µg	ca 3%	> 170 mU/ml	
pLZ OVP EPO EGFP	5µg	negativ	0 mU/ml	
pLZ OVP EGFP +pRSV COD	5µg 5µg	negativ	0 mU/ml	
pLZ CMV EPO EGFP +pRSV COD	5µg 5µg	ca 3%	> 170 mU/ml	in 2 Versuchen negativer ELISA trotz Fluoreszenz
pLZ OVP EPO EGFP +pRSV COD	5µg 5µg	einzelne Zellen	0 mU/ml	in zwei Versuchen vereinzelt fluoreszierende Zellen trotz negativem ELISA
Leerwert		negativ	0 mU/ml	

Tabelle 4: Ergebnisse der *in vitro* Experimente mit den retroviralen Konstrukten

Auch in diesen Experimenten konnte keine Expression der Reportergene unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors nachgewiesen werden.

Zwar konnten in zwei Fällen vereinzelt fluoreszierende Zellen unter dem Mikroskop entdeckt werden, im Überstand dieser Zellen liess sich jedoch kein Erythropoietin nachweisen.

Nach Transfektion mit Plasmid pCMV EPO EGFP zeigten hingegen regelmässig bis zu ca. 3% der Zellen Fluoreszenz. Diese Beobachtung konnte in zwei Versuchen durch entsprechende EPO-Titer im Überstand bestätigt werden, in zwei weiteren Versuchen liess sich kein Erythropoietin nachweisen. Die Kotransfektion mit Helferplasmid pRSV COD führte zu keiner messbaren Verbesserung von Transfektionseffizienz oder

Expressionsaktivität.

5.3.3. *In vivo* Expression von Erythropoietin nach gene-gun Transfektion des Oviduktes mithilfe retroviraler Konstrukte

Auch die retroviralen Konstrukte wurden in 10 *in vivo* Experimenten getestet. Zusätzlich wurde 1 Versuchstier scheintransfiziert, das heisst mit Goldpartikeln beschossen, die nicht mit DNA bestückt worden waren. So wurde eine Verfälschung der Ergebnisse durch das Transfektionsprozedere ausgeschlossen.

Huhn	Plasmid	Schuss	Gesamtmenge DNA	EPO-Konzentration
1	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	negativ*
2	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	negativ*
3	pLZ OVP EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	123 mU/ml
4	pLZ OVP EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	negativ*
5	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	5	8,3 µg	negativ*
6	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	5	8,3 µg	42 mU/ml
7	pLZ OVP EPO EGFP + pRSV COD	5	8,3 µg	39 mU/ml
8	pLZ OVP EPO EGFP + pRSV COD	5	8,3 µg	negativ*
9	Kontrolle	6	0 µg	54 mU/ml
10	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	48 mU/ml
11	pLZ CMV EPO EGFP + pRSV COD	6	10 µg	22 mU/ml

Tabelle 5: Ergebnisse von Gene-gun-Transfektionen von 11 Hühnern

* nicht anhand einer Standardkurve quantifiziert, Absorption jedoch im Bereich der Negativkontrolle

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Nur in einem Fall gelang es in einem postoperativ gesammelten Ei eines Tieres einen Erythropoietinspiegel nachzuweisen, der über den in Kontrolleiern gemessenen Titern lag. Der Ovidukt dieses Tier war mit Konstrukt pLZ OVP EPO EGFP transfiziert worden (Huhn 3). Das Tier verstarb jedoch vor einer weiteren Eiablage.

In den Eiern der übrigen Tiere liessen sich keine erhöhten Erythropoietinspiegel nachweisen.

6. Diskussion

Die Produktion humaner Proteine in lebenden Tieren ist heute ein zunehmend genutztes gentechnisches Verfahren. Verschiedene Spezies, wie beispielsweise Kuh, Schaf und Ziege haben sich dabei schon als nützliche Bioreaktoren erwiesen [7] [8-13] [14-16].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzbarkeit des Huhnes als Produzent medizinisch relevanter rekombinanter Proteine untersucht. Die hervorstechendsten Vorteile des Huhnes in diesem Zusammenhang sind eine relativ kurze Generationszeit und einfache Haltungsbedingungen. Das Augenmerk wurde besonders auf den Eileiter des Tieres gerichtet, in dem täglich grosse Mengen Protein gebildet und im Ei verpackt ausgeschieden werden.

Als Modellprotein diente menschliches Erythropoetin (EPO), das bei der Erythropoese eine Schlüsselrolle spielt und dessen Mangel beim Menschen zur Anämie führt [68, 69]. Eine erfolgreiche Substitution ist möglich [61], aber die therapeutisch notwendigen Mengen sind auf dem konservativen Weg der Proteinisolierung aus dem gesunden menschlichen Organismus nur schwer zu erzielen, da die physiologische endogene EPO-Produktion des menschlichen Körpers nur sehr gering ist. Die Produktion von rekombinantem EPO, zum Beispiel in den Ovarzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen), ist nach wie vor technisch aufwendig und teuer [65].

Im ersten Teil der Arbeit wurden Strategien zur nachfolgenden Herstellung verschiedener Expressionsplasmide entwickelt, mit deren Hilfe die kodierende Sequenz des menschlichen Erythropoietingens in das heterologe Hühnerzellensystem eingeschleust und dort zur Expression gebracht werden konnte. Es sollte untersucht werden, ob ein im Eileiter gebildetes rekombinantes Protein, in diesem Fall EPO, in das Lumen des Eileiters sezerniert wird und anschliessend im Ei nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde zur Regulierung der Transkription des rekombinanten Gens der virale Promotor des menschlichen Cytomegalie- Virus (CMV) gewählt, der in allen Zellen aktiv ist und eine hohe Expression der dahintergeschalteten Gene erlaubt (konstitutiver Promotor).

Unter optimalen Bedingungen sollte die Produktion eines heterologen Proteins im Eileiter in möglichst vielen Zellen stattfinden, um grosse Mengen Protein gewinnen zu können. Dies ist mit den regionalen Transfektionsverfahren (Lipofektion, Elektroporation etc.) nicht

erreichbar, wohl aber in einem transgenen Huhn, das idealerweise das Transgen in alle somatischen Zellen integriert hat. Eine unkontrollierte Expression eines heterologen Proteins in einem solchen Organismus kann jedoch fatale Folgen für das Tier haben, beispielsweise durch eine toxische Wirkung des fremden Proteins[21].

Die weiterführende Strategie bestand deshalb darin, Konstrukte zu klonieren, die im transgenen Huhn eine möglichst eng an die physiologische Eiproduktion angelehnte Expression des Modellproteins erlauben sollten. Als Promotor wurde der hühneigene Ovalbuminpromotor gewählt, der im Eileiter die Expression eines der drei Haupt-Proteine im Ei steuert. Im Gegensatz zum CMV-Promotor ist seine transkriptionelle Aktivität ausschliesslich auf Oviduktzellen (und embryonale Leberzellen) beschränkt[70], und somit hoch gewebespezifisch. Trotz seiner, verglichen mit dem CMV-Promotor relativ schwachen Aktivität, erlaubt der Ovalbumin-Promotor dennoch die Produktion grosser Mengen Protein, wie das Ovalbumin zeigt, das im Hühnerei in Grammmengen gefunden wird (bis zu 2,2 g in einem 60 g schweren Ei). In einem ersten Schritt sollte ein geeignetes Promotorfragment identifiziert werden, und dieses anschliessend in einem zweiten Schritt zur Expression des Erythropoietin-Gens verwendet werden.

Eine weitere Überlegung betraf das Reportergen. Um die Aktivität der Promotorfragmente in den Vektorplasmiden relativ einfach in Hühnerzellen nachweisen zu können, wurde zuerst eines der gängigen Reportergene, das bakterielle LacZ-Gen, unter die Kontrolle der beiden Promotoren gestellt. Promotoraktivität wird durch Blaufärbung der Zellen nach entsprechender Vorbehandlung angezeigt (siehe Material und Methoden). Die blauen Zellen sind leicht unter einem Lichtmikroskop zu erkennen und auszuzählen. Um auch im Falle der Erythropoietin-Expression einen leicht messbaren Marker zu haben, wurde die Erythropoietin- codierende Sequenz in den pIRES EGFP Vektor (Clontech®) inseriert, in dem das Transgen (EPO) und das Reportergen (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) in eine bicistronische mRNA überschrieben werden. Die Anwesenheit einer IRES-Sequenz (Internal Ribosome Entry Site)[71] oberhalb des Reportergens bewirkt, dass beide Proteine dennoch voneinander getrennt (also nicht als artifizielles Fusionsprotein) translatiert werden: ein wichtiger Punkt, wenn das zu exprimierende rekombinante Protein auch biologisch aktiv sein soll. EGFP-exprimierende Zellen erscheinen in einem Fluoreszenz-Mikroskop leuchtend grün und lassen sich in einer Facs-Analyse auch quantitativ erfassen.

Eine letzte Überlegung galt der Zeitdauer der Expression. Extrachromosomale Elemente, wie

die beschriebenen Expressionsplasmide, die in den Hühnerzellen nicht replizieren können, werden bei einer Zellteilung nicht systematisch weitervererbt. Nur deren Integration in das Genom könnte das gewährleisten. (Diese Überlegung spielte vor allem in Hinblick auf die Generierung transgener Hühner eine entscheidende Rolle.) Deshalb wurde eine Strategie aufgegriffen, die von Flamant et al. propagiert worden war [52], die sogenannte Virofektion mittels retroviraler Vektoren.

Die zugrundeliegende Idee ist, dass ein DNA-Fragment, das von den beiden LTRs des Rous Sarcoma Virus flankiert wird, mit grosser Wahrscheinlichkeit integriert, wenn es zusammen mit einem Helfervirus (der die Reverse Transkriptase und die Integrase liefert) in die Zellen geschleust wird. Gleichzeitig verspricht Flamant durch die Anwendung dieses Ko-Transfektionsverfahren eine Vervielfachung der anfänglichen Transfektionsrate. Es wurden deshalb noch zwei weitere Genvehikel angefertigt, für die die beiden Expressionskassetten aus den pIRES EGFP Konstrukten in retrovirale Vektoren umgesetzt wurden, die Flamant für diesen Zweck freundlicherweise zur Verfügung gestellt hatte.

6.1. Nachweis der Aktivität des Ovalbuminpromotors in Primärkulturen von Hühneroviduktzellen

Im Gegensatz zu dem viralen, scheinbar universell aktiven, konstitutiven CMV Promotor, bei dem ein 500 bp grosses Fragment ausreicht, um diesem (auch ausserhalb des natürlichen Kontextes) seine volle Stärke zu vermitteln, ist die Situation im Falle des gewebsspezifischen Ovalbumin-Promotors komplexer. Die meisten Untersuchungen dazu stammen aus den Laboren von Chambon, Sanders und McKnight . Demnach wird ein etwa 950 bp grosses Promotorfragment benötigt, um eine hormon-abhängige Gewebespezifität des Ovalbuminpromotors in embryonalen Hühnerhepatozyten und primären Oviduktzellen zu vermitteln [49, 72]. Diese Versuche waren allerdings nicht mit dem Ovalbumin durchgeführt worden, dessen Transkription mit einem nicht-translatierten Exon beginnt, sondern mit einem Reportergen. Da ein positiver Einfluss dieser Exon-Sequenz auf die Genexpression nicht auszuschliessen war, wurden aus genomischer DNA aus Hühnerleberzellen zwei Promotorfragmente isoliert und getestet: beide enthielten das in der Literatur beschriebene Promotorfragment vor dem LacZ-Reportergen, unterschieden sich aber in der Anwesenheit des besagten Exons (pOVP und pOVP-exo).

Die Ergebnisse der Transfektionsversuche, bei denen die pOVP-Konstrukte mit Hilfe der

Lipofektion in primäre Zellkulturen des Hühnerovidukts eingeschleust werden sollten, waren wie erwartet schwer zu reproduzieren. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erfahrungen zahlreicher Arbeitsgruppen, wie den einschlägigen Publikationen zu entnehmen ist [46, 73]. Es gelang jedoch, in etwa der Hälfte der Versuche eine β -Galactosidase-Reaktion in den transfizierten Zellen nachzuweisen.

Experimente mit dem Ovalbuminpromotor in primären Oviduktzellen haben sich generell als besonders diffizil erwiesen. Sanders und McKnight konnten 1988 zeigen, dass die Promotoraktivität direkt nach Entnahme der Eileiterzellen aus dem Gewebeverband am höchsten ist, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Transfektionseffizienz bei etwa 0,2% liegt. Transfektionsversuche zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise nach 24 h, nachdem ein Teil der Zellen bereits adhärent, und somit einfacher zu transfizieren war, führten dagegen zu einer starken Abnahme der Ovalbuminexpression, offensichtlich als Folge reduzierter Promotoraktivität [49]. Daher muss davon ausgegangen, dass, zumindest in einem Teil der Experimente, erfolgreich transfizierte Oviduktzellen keine Expression eines der Transgene zeigten (LacZ/EGFP/EPO), da die Aktivität des Ovalbuminpromotors bereits unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Wider Erwarten unterschieden sich beide in vorliegender Arbeit verwendete Konstrukte nicht in der Intensität der hervorgerufenen Blaufärbung (Transkriptionseffizienz), dafür aber in der Anzahl blauer Zellen (Transfektionseffizienz): So lag der Anteil β -Galaktosidase-positiver Zellen nach Transfektion mit pOVP bei durchschnittlich 0,5-1% , nach Transfektion mit pOVP+exo hingegen nur bei durchschnittlich 0,2-0,3%.

Da die beschriebenen Resultate gezeigt hatten, dass das pOVP Konstrukt funktionierte und der Promotor letztendlich im Huhn, also an seinem natürlichen Wirkort eingesetzt werden sollte, wurden keine weiteren Optimierungsversuche in der Zellkultur unternommen (die ohnehin den zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit gesprengt hätten) und alle weiteren Versuche ausschliesslich mit dem exonlosen Promotorfragment durchgeführt.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass eine LacZ-Expression aufgrund der Spezifität des verwendeten Promotors nur in transfizierten Oviduktzellen auftreten konnte. Bei der mikroskopischen Untersuchung der β -Galaktosidase-positiven Zellen liessen diese sich auch eindeutig als Oviduktzellen identifizieren.

6.2. Nachweis von humanem Erythropoetin im Überstand transfizierter primärer Hühnereileiterzellen

Um ein rekombinantes Protein bequemerweise aus dem Hühnerei isolieren zu können, sollte es wie ein endogenes Protein, beispielsweise Ovalbumin, aus den Eileiterzellen sezerniert und im Ei abgelagert (deponiert) werden. Als ein Hormon wird EPO ebenfalls von den Zellen, in denen es gebildet wird (Nierenzellen), sezerniert, allerdings war bisher nicht bekannt, ob das auch mit rekombinanten EPO, oder mit einem anderen rekombinanten Protein im heterologen Wirts- und Organsystem „Hühnerovidukt“ geschieht. Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die an der Expression von Proteinen, unter anderem auch EPO, im Eileiter des Huhnes arbeiten, zeigten, dass es bisher nicht gelungen war, das Hormon oder irgendein anderes Fremdprotein nach der Transfektion ausserhalb der Zelle, insbesondere nicht im Ei nachzuweisen. Zwar wurden nach *in vivo* Elektroporation EPO-mRNA und auch das Protein im lysierten Eileitergewebe gefunden, der Nachweis, dass das Protein aus der Zelle ausgeschleust wurde, ist jedoch nicht erbracht worden [46]. Auch waren die im Zellextrakt gemessenen Proteinmengen mit maximal 5,1 mU/ml unter der Kontrolle des miw-Promotors (Hybrid zwischen RSV LTR und dem Huhn beta-Actin Promotor) und 0,8 mU/ml unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors äusserst gering.

Im Gegensatz dazu lieferte das in dieser Arbeit eingesetzte Genkonstrukt (pCMV EPO EGFP), in dem die EPO Expression über den konstitutiven CMV-Promotor gesteuert wurde, sehr hohe EPO-Titer. Die im EPO-spezifischen ELISA-Test gemessenen Proteinkonzentrationen im Überstand einer transfizierten, primären Ovidukt-Zellkultur erreichten dabei bis zu 170 mU/ml, und lagen damit am oberen Grenzbereich des Testsystems. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass in Hühnerzellen relevante Mengen humanen Erythropoietins exprimiert werden können, und dass diese anschliessend tatsächlich aus der Zelle ausgeschleust werden. Die Fluoreszenzanalyse, mit der die EGFP-exprimierenden, grünen Zellen optisch erfasst werden ergab, dass sich die Expression vor allem in Fibroblasten vollzog.

Parallel dazu wurden die Konstrukte pOVP EGFP und pOVP EPO EGFP in den primären Eileiterzellen getestet. Im Gegensatz zu den CMV-Promotorexperimenten, konnte jedoch im Überstand kein EPO nachgewiesen werden, und auch EGFP war nicht detektierbar.

Zwei Faktoren haben dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle gespielt. Zum einen handelte es sich bei dem Vektor pIRES EGFP, in das der Ovalbuminpromotor inkloniert wurde, um ein Plasmid, das für die Expression von Proteinen konzipiert wurde. Die Entfernung des plasmideigenen CMV-Promotors und dessen Ersatz durch einen Fremd-Promotor, in diesem Fall OVP, war nicht vorgesehen und konnte sich theoretisch nachteilig auf die Expressionsaktivität auswirken. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei dem Vektor pUT 110, der für die ersten erfolgreichen Ovalbuminpromotor-Experimente verwendet wurde, um ein Plasmid, das primär für die Erprobung von Promotoren optimiert worden war.

Zum anderen bestand nach wie vor das Problem, dass sich die Zeitdauer, die zwischen Entnahme des Eileiters und dem Zeitpunkt der Transfektion liegt, genau gegensätzlich auf die Transfektionseffizienz wie auf die Ovalbumin-Promotoraktivität auswirkt. Wahrscheinlich konnte also eine erfolgreich transfizierte Oviduktzelle unter dem Fluoreszenzmikroskop dennoch nicht grün erscheinen, da vom bereits inaktiven Ovalbumin-Promotor keinerlei Transkription mehr ausgeht. Offensichtlich konnte so die niedrige Gesamteffizienz (0,5-1% in den pOVP-Experimenten) leicht unter die Nachweisgrenze gedrückt werden.

6.3. Nachweis von humanem Erythropoetin in den Eiern nach *in vivo* Transfektion von Hühnern

Mit den Experimenten an primären Zellkulturen aus dem Hühnerovidukt war gezeigt worden, dass menschliches Erythropoietin, sobald es in Hühnerzellen zur Expression gebracht werden konnte, im Medium nachweisbar war, also wie im authentischen Wirtsorganismus aus den Zellen ausgeschleust wird. Ein weiterer Vorversuch auf dem Wege das Huhn als Produzent menschlichen EPOs im Ei zu benutzen, war, den Verbleib dieses rekombinanten Hormons *in vivo*, also im Ovidukt eines lebenden Huhns zu untersuchen.

Dazu wurde versucht, die gleichen Genkonstrukte, wie sie bereits bei den Zellkulturversuchen zur Anwendung gekommen waren, durch lokale Transfektion via „Genkanone“ (gene gun) in den laparotomisch freigelegten Hühnereileiter einzuführen. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das operative Verfahren selbst auszuschließen, wie beispielsweise einen erhöhten endogenen EPO-Spiegel als Folge des intraoperativen Blutverlustes, wurde eines der Versuchstiere „scheintransfiziert“, das heißt, der Eileiter wurde mit Goldpartikeln aus der Genegun beschossen, die nicht zuvor mit Plasmid bestückt worden waren. Anschliessend wurden in den darauffolgenden Tagen die Eier der Versuchshühner gesammelt und mittels

ELISA auf ihren Erythropoietingehalt untersucht.

Auffällig war, dass in den Eiern von nicht- oder scheintransfizierten Hühnern bereits ein EPO-Leerwert von etwa 40 mU/ml \pm 5 mU/ml zu verzeichnen war. Dass es sich dabei um die endogene EPO-Produktion des Huhnes handelte, erscheint unwahrscheinlich, da dieser „Leerwert“ in scheintransfizierten Tieren nicht anstieg, obwohl diese aufgrund der intraoperativen Blutverluste zu diesem Zeitpunkt sicherlich erhöhte endogene EPO Konzentrationen aufwiesen. Darüberhinaus war auch in den Zellkulturüberständen, denen Hühnerserum zugesetzt worden war, zu keinem Zeitpunkt EPO gemessen worden. Es wurde deshalb geschlossen, dass es sich bei diesem Leerwert um eine artifizielle Reaktion des Antikörpers auf eine im Ei vorhandene Komponente handelte. Der angewendete ELISA-Test war ursprünglich zur Erfassung von EPO in humanen Blutseren entwickelt worden.

Von insgesamt fünf Versuchstieren, deren Eileiter mit dem Plasmid pCMV EPO EGFP transfiziert worden waren, starb eines postoperativ, eines blieb eierlos und eines war negativ; zwei davon zeigten jedoch in den Tagen nach der Transfektion einen signifikant erhöhten EPO-Titer in den Eiern. Im Gegensatz zu den Messwerten in den Kontrolleiern unterlagen sie aus bisher nicht bekannten Gründen sehr starken Schwankungen. Die höchsten Werte (152 bzw. 72 mU/ml) waren in den ersten 10 Tagen nach der Transfektion messbar. Bemerkenswerterweise waren die erhöhten EPO-Konzentrationen bei beiden Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar, also über 22 bzw. 37 Tage. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen vergleichbarer Experimente, bei denen Mäusen EPO-cDNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors *in vivo* mittels Elektroporation in Skelettmuskulatur eingebracht worden war. Im Blut der Tiere konnte das rekombinante Erythropoietin ebenfalls über einen langen Zeitraum nachgewiesen werden (6 Monate). Auch dort waren die höchsten EPO-Konzentrationen nach ca. einer Woche zu verzeichnen [74].

Somit ist erstmals die Expression eines medizinisch relevanten, heterologen Proteins im Ovidukt des lebenden Huhnes, und der anschließende Nachweis dieses Proteins im Ei gelungen. Die Ergebnisse belegen darüber hinaus zum ersten Mal eindeutig, dass das Huhn als Bioreaktor ein vielversprechendes Tiermodell darstellt.

Zwar wurde auch in der Arbeitsgruppe von Ochiai ein Teil des Eileiters *in vivo* mittels Elektroporation transfiziert. Es wurden jedoch nur sehr niedrige EPO-Konzentrationen im

Eileitergewebe gefunden (0,8 bzw 5,1 mU/ml) und Messungen des Proteins im Hühnerei sind nicht beschrieben[46].

Wie von vorneherein zu erwarten war, ist es *in vivo* nicht gelungen, mit den OVP-Konstrukten einen Hinweis auf die Aktivität des Ovalbumin-Promotors zu erhalten. Von den 6 Tieren, deren intraoperativ freigelegte Eileier mittels Genkanone mit dem Plasmid pOVP EPO EGFP beschossen worden waren, überlebten 3 der Tiere die postoperative Phase nicht und verstarben vor der ersten Eiablage. Ein weiteres Huhn kam nach der Operation nicht mehr zur Eiablage. Aber auch bei den zwei Versuchstieren, von denen Eier in den Tagen nach der Operation gesammelt und untersucht werden konnten, liessen sich keine Erythropoietinspiegel nachweisen, die über den Kontrollwerten lagen. Der Versuch, das parallel zu EPO exprimierte EGFP Reporterprodukt 5 Tage nach der Transfektion direkt im transfizierten Eileiterfragment histologisch über Fluoreszenz nachzuweisen, ist bisher nicht gelungen. Damit haben sich die von vorneherein geringen Hoffnungen nicht erfüllt, den Ovalbumin-Promotor *in vivo* zu einer nachweisbaren Aktivität zu bringen. Offensichtlich gelingt es mit den eher groben regionalen Transfektionsverfahren nicht, eine genügend grosse Anzahl Oviduktzellen, die nur ca. 1% der Eileiterzellen stellen, zu transfizieren, um anschliessend einen positiven Nachweis führen zu können.

6.4. Der Einsatz von „Virofektion“ bringt keine Verbesserung der Expressionsrate von humanem EPO im Wirtsorganismus Huhn

Konzeptionell erschien die von Flamant propagierte Transfektionsstrategie, für die er selbst den Begriff der „Virofektion“ geprägt hat, als der vielversprechendste Weg, um die kodierende Gensequenz eines humanen Proteins in Hühnerzellen zur effizienten und darüberhinaus stabilen Expression zu bringen.

In dem von Flamant verwendeten Expressionvektor [51] wird die rekombinante Gensequenz von den LTRs (Long Terminal Repeats) des retroviralen Hühnervirus RSV (Rous Sarcoma Virus) flankiert, eine Anordnung, wie sie für die genomische RNA und integrierte Genome aller Retroviren charakteristisch ist. Der Vektor wird zusammen mit einem weiteren Plasmid, auf dem die Proteine des RSV kodiert sind, in die Zellen eingeschleust. Transkripte des Expressionsvektors, die vom Promotor der 5'-LTR ausgehen und somit einer viralen

genomischen RNA ähneln, werden von den entsprechenden Helferplasmid-kodierten Virusproteinen in Capside verpackt. Dabei entstehen instabile, aber infektiöse Viruspartikel, die die Zelle verlassen und noch untransfizierte Nachbarzelle(n) in der Zellkultur infizieren können. Die dort freigesetzte RNA, die die codierende Sequenz des Transgens trägt, wird von der im Capsid mitgebrachten reversen Transkriptase in eine doppelsträngige DNA-Kopie überführt, die dann ihrerseits mit Hilfe der viralen Integrase in das Wirtsgenom eingebaut wird: in der Theorie eine ideale Voraussetzung für die Erzeugung transgener Hühner.

Der Hauptunterschied des in der Literatur erfolgreich eingesetzten Konstruktes zu dem in dieser Arbeit verwendeten war, dass in den vorliegenden EPO-Konstrukten zwei Promotoren miteinander konkurrieren konnten (Promotorinterferenz): der virale LTR-Promotor, dessen Aktivität die Vervielfältigung und Integration der DNA-Kopie ins Hühnergenom garantieren sollte und der 1,1 kb stromabwärts gelegene CMV- bzw. Ovalbumin-Promotor, von denen jeder die Expression des EPO steuern und, im Falle des Ovalbumin-Promotors, zusätzlich auch Gewebespezifität vermitteln sollte. Die ausschliessliche Verwendung des retroviralen Promotors sollte nicht ausreichend sein, denn abgesehen davon, dass der 5'LTR-Promoter nicht die gewünschte Gewebsspezifität zeigt, kodieren Transkripte, die von ihm ausgehen, mit grosser Wahrscheinlichkeit nicht für ein funktionelles EPO. Grund dafür ist, dass in diesen Transkripten vor dem authentischen Initiationskodon des EPO Proteins mehrere AUG-Sequenzen auftreten. Da die Translation normalerweise am ersten AUG einer mRNA beginnt, hätte das im vorliegenden Fall die Synthese eines Proteins zufolge, das nicht im Leserahmen des EPO läge und/oder zu früh durch ein Stopkodon abgebrochen würde. Anders verhält es sich mit der Expression des EGFP-Markergens. Dessen Translation wird über eine IRES gesteuert und ist damit unabhängig von Sequenzen, die oberhalb dieser Ribosomeneintrittsstelle vorkommen. Die Resultate zweier Experimente in der Reihe der Virofektionsversuche mit primären fetalen Leberzellen, in denen zwar grün-fluoreszierende Zellen (also EGFP-Expression) beobachtet wurden, aber kein EPO im ELISA nachzuweisen war, sind höchstwahrscheinlich Beispiele für das oben beschriebene Szenario.

Wieder waren es die CMV-Promotorkonstrukte, die in den Zellkulturversuchen (zwei) positive Ergebnisse lieferten, allerdings unabhängig von der Gegenwart des Helferplasmides.

Das einzige Mal, in dem das OVP-Promotorkonstrukt anscheinend zu einer rekombinanten EPO-Produktion geführt hat, war in einem der Genegun Versuche, bei denen das Konstrukt direkt in den Eileiter des operativ-freigelegten Eileiters eines Huhnes geschossen worden war.

In den postoperativ gesammelten Eiern wurden Werte von über 100 mU/ml gemessen. Wenn man von einer möglichen Verwechslung absieht, so könnte es tatsächlich gerade der hormon-induzierbare Ovalbumin-Promotor gewesen sein, der der Promotorinterferenz durch die 5' LTR entkommen konnte und unter Hormon-Einfluss, die Transkriptionsinitiation vermitteln konnte. Dass ein Protein-DNA-Komplex tatsächlich die Passage der bereits elongierenden RNA-Polymerase II blocken kann, wurde bereits in der Literatur beschrieben [75].

Fazit der vorliegenden Versuche ist, dass die Einschleusung eines heterolog exprimierten menschlichen Proteins im Hühnerei möglich ist. Damit ist eine der zentralen Voraussetzungen für die Nutzung des Huhnes als Bioreaktor erfüllt worden.

Angesichts der technisch aufwendigen Methodik des *in vivo* Gentransfers mittels Genkanone in den Eileiter des Huhnes erscheint eine organspezifische Expression des heterologen Proteins im Eileiter eines transgenen Huhnes wünschenswert, zumal auf diesem Wege nochmals eine deutliche Steigerung der Proteinausbeutung zu erwarten ist.

Ein geeignetes Promotorfragment des Ovalbuminpromotors hierfür konnte im Rahmen der Experimente für diese Arbeit identifiziert und kloniert werden.

Weiterführende Experimente mit diesem Promotorfragment zeigten jedoch erwartungsgemäss noch keine eindeutigen Ergebnisse, da weder primäre Oviduktzellkulturen, noch lokale Transfektionsverfahren am Ovidukt des Huhnes geeignete experimentelle Bedingungen liefern, und eindeutige Ergebnisse erst im transgenen Tiermodell zu erwarten sind.

Hierzu ist anzumerken, dass der Organismus Huhn weiterhin experimentell in jeder Hinsicht eine grosse Herausforderung darstellt. So ist es bis heute trotz zahlreicher Anstrengungen verschiedenster Arbeitsgruppen nicht gelungen, transgene Hühner zu klonieren, die das Transgen in allen somatischen Zellen tragen. Lediglich einige Chimären haben bisher das Licht der Welt erblickt, sie stehen zahllosen erfolglosen Experimenten gegenüber[39].

Ein wichtiger Erfolg scheint jedoch kürzlich der Arbeitsgruppe um Helen Sang gelungen zu sein.

Mit dem „Mariner-Element“, einem aus dem Genom der Fruchtfliege isolierten Transposon, das als Vektor fungiert, konnte die Integrationswahrscheinlichkeit eines heterologen Genes in das Huhn-Genom um ein Vielfaches erhöht werden[76]. Damit ist das Ziel, die Generierung eines transgenen Huhnes, endlich in greifbare Nähe gerückt.

7. Zusammenfassung

Die Produktion heterologer, medizinisch verwertbarer Proteine in Tieren ist heute ein Standardverfahren und viele Spezies haben sich als hierfür geeignet erwiesen.

Das Huhn sollte sich besonders als Bioreaktor eignen, es verfügt zum einen über kurze Generationszeiten, und in seinem Eileiter werden täglich grosse Mengen Protein gebildet und im Ei ausgeschieden. Dennoch war es bis heute, trotz zahlreicher Anstrengungen von verschiedenen Arbeitsgruppen nicht gelungen, den Organismus eines Huhnes genetisch derart zu verändern, dass ein heterologes Protein im Eileiter gebildet, und im Ei nachweisbar ausgeschieden wird.

Im Rahmen der Experimente, die in dieser Dissertation vorgestellt werden, ist es erstmals gelungen im Eileiter des Huhnes ein heterologes Protein, EPO, zu exprimieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Protein aus den Zellen des Eileiters ausgeschleust wird und schliesslich im gelegten Ei in grosser Menge zu finden ist.

Hierzu wurden geeignete Genkonstrukte kloniert, *in vitro* in primären Eileiterzellen getestet, und schliesslich per Gengun-Verfahren *in vivo* in den Eileiter eingebracht. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors, das EPO-Protein war in den Eiern der positiv getesteten Tieren über Wochen nachweisbar.

Aufgrund dieses Erfolges wurde versucht eine gewebespezifische Expression unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors zu erreichen.

Es gelang ein geeignetes Promotorkonstrukt zu identifizieren und zu klonieren, sowie *in vitro* eine gewebespezifische Expression von β -Galactosidase zu erreichen, eine Expression von EGFP und EPO konnte jedoch nicht sicher nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür ist das komplexe Regulierungssystem des Ovalbuminpromotors, das durch Transfektionsverfahren empfindlich gestört wird und *in vitro*-Versuche beinahe unmöglich macht.

Unter Zuhilfenahme eines alternativen Transfektionsverfahrens, der Virofektion gelang es jedoch unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors *in vivo* einmalig EPO-Expression in das Hühnerei nachzuweisen.

Experimente, die nach Abschluss der Arbeiten an dieser Dissertation durchgeführt wurden, haben die Funktionsfähigkeit der retroviralen Konstrukte bestätigt. Insbesondere konnte unter der Kontrolle des Ovalbuminpromotors eine zellspezifische Expression von Erythropoietin erreicht werden, die Transfektion hat sich als stabil erwiesen. Das so gewonnene

Erythropoietin wird aktuell auf seine biologische Aktivität untersucht, die Veröffentlichung der Ergebnisse befindet sich in Vorbereitung.

8. Literaturverzeichnis

8.1. numerisch

1. Wold, F., *In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification)*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 783-814.
2. Velandar, W.H., H. Lubon, and W.N. Drohan, *Transgenic livestock as drug factories*. Sci Am, 1997. **276**(1): p. 70-4.
3. Lubon, H., et al., *Blood proteins from transgenic animal bioreactors*. Transfus Med Rev, 1996. **10**(2): p. 131-43.
4. Pittius, C.W., et al., *A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5874-8.
5. Archibald, A.L., et al., *High-level expression of biologically active human alpha 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5178-82.
6. Clark, A. and J. Bishop, *Expression of human antihemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep*. Biotechnology (N Y), 1989. **7**: p. 487-492.
7. Rudolph, N.S., *Biopharmaceutical production in transgenic livestock*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 367-74.
8. Krimpenfort, P., et al., *Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 844-7.
9. McKee, C., et al., *Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 647-51.
10. Butler, S.P., et al., *Current progress in the production of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic animals*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 537-42.
11. Wright, G., et al., *High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 830-4.
12. Niemann, H., J Anim Breed Genet, 1996. **113**: p. 437-444.
13. Clark, A.J., et al., *The molecular manipulation of milk composition*. Genome, 1989. **31**(2): p. 950-5.
14. Meade, H., *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, J.M. Fernandez and J.M. Hoeffler, Editors. 1999. p. 399-427.
15. Ebert, K.M., et al., *Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(7): p. 699-702.
16. Archer, J.S., et al., *Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 6840-4.
17. Paleyanda, R.K., et al., *Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(10): p. 971-5.

18. Velandar, W.H., et al., *High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12003-7.
19. Stromqvist, M., et al., *Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits*. Transgenic Res, 1997. **6**(4): p. 271-8.
20. Korhonen, V.P., et al., *Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits*. Eur J Biochem, 1997. **245**(2): p. 482-9.
21. Massoud, M., et al., *The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits*. Reprod Nutr Dev, 1996. **36**(5): p. 555-63.
22. Limonta, J.M., et al., *Transgenic rabbits as bioreactors for the production of human growth hormone*. J Biotechnol, 1995. **40**(1): p. 49-58.
23. Brem, G., et al., *Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits*. Gene, 1994. **149**(2): p. 351-5.
24. Buhler, T.A., et al., *Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(2): p. 140-3.
25. Edmunds, T., et al., *Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4561-71.
26. Gordon, J.W. and F.H. Ruddle, *Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei*. Science, 1981. **214**(4526): p. 1244-6.
27. Gruenbaum, J. and A. Fainsod, *Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chicken*. J Cell Biochem, 1991. **15E**: p. 194.
28. Vick, L., Y. Li, and K. Simkiss, *Transgenic birds from transformed primordial germ cells*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1993. **251**(1332): p. 179-82.
29. Bronson, S.K. and O. Smithies, *Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27155-8.
30. Tsukui, T., et al., *Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(8): p. 982-5.
31. Wall, R.J., H.W. Hawk, and N. Nel, *Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale*. J Cell Biochem, 1992. **49**(2): p. 113-20.
32. Wall, R.J., et al., *Transgenic animal technology*. J Androl, 1997. **18**(3): p. 236-9.
33. Wall, R.J., D.E. Kerr, and K.R. Bondioli, *Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale*. J Dairy Sci, 1997. **80**(9): p. 2213-24.
34. Wall, R.J., *A new lease on life for transgenic livestock*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(5): p. 416-7.
35. Bondoli, K. and R. Wall, *Transgenic livestock*, in *Biotechnology in Agriculture*, A. Altmann, Editor. 1997, Marcel Dekker: New York.
36. Rohricht, P., BioPharm, 1999. **12**: p. 46-49.
37. Burley, R. and D. Vadehra, *The Avian Egg*. 1989.
38. Mohammed, S.M., et al., *Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens*. Immunotechnology, 1998. **4**(2): p. 115-25.

39. Sang, H., *Transgenic chickens--methods and potential applications*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(10): p. 415-20.
40. Eyal-Giladi, H. and S. Kochav, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology*. Dev Biol, 1976. **49**(2): p. 321-37.
41. Spratt and Haas, J Exp Zool, 1960. **144**: p. 139-157.
42. Naito, M. and M.M. Perry, *Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch*. Br Poult Sci, 1989. **30**(2): p. 251-6.
43. Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(1): p. 60-3.
44. Gavora, J.S., et al., *Endogenous viral genes: association with reduced egg production rate and egg size in White Leghorns*. Poult Sci, 1991. **70**(3): p. 618-23.
45. Bosselman, R. and R. Stewart, *Transmission of exogenous genes into the chicken*. J Reprod. Fertil., 1990. **Suppl. 41**: p. 183-195.
46. Ochiai, H., et al., *Synthesis of human erythropoietin in vivo in the oviduct of laying hens by localized in vivo gene transfer using electroporation*. Poult Sci, 1998. **77**(2): p. 299-302.
47. Ewans and M. Knight, Endocrinologie, 1984. **115**: p. 368-377.
48. Sanders, M.M. and G.S. McKnight, *Chicken egg white genes: multihormonal regulation in a primary cell culture system*. Endocrinology, 1985. **116**(1): p. 398-405.
49. Sanders, M.M. and G.S. McKnight, *Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6550-7.
50. Samarut, J., F. Flamant, and J.M. Heard, *Replication-competent and -defective retrovirus vectors for oncogenic studies*. Methods Enzymol, 1995. **254**: p. 206-28.
51. Flamant, F., F.L. Cosset, and J. Samarut, *Vectors derived from avian leukosis and sarcoma viruses*. J Mol Med, 1995. **73**(4): p. 181-7.
52. Flamant, F. and J. Samarut, *Virofection: a one-step procedure for using replication-defective retrovirus vectors*. Virology, 1995. **211**(1): p. 234-40.
53. Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser, *Purification of human erythropoietin*. J Biol Chem, 1977. **252**(15): p. 5558-64.
54. Lin, F.K., et al., *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7580-4.
55. Jacobs, K., et al., *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 806-10.
56. Greer, J., R. Milam, and P. Eggers, *Trends in use, cost, and outcomes of human recombinant erythropoietin, 1989-98*. Health Care Financ Rev, 1999. **20**(3): p. 55-62.
57. Winearls, C.G., *Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13 Suppl 2**: p. 3-8.
58. Takeuchi, M., et al., *Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7819-22.

59. Takeuchi, M., et al., *Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12127-30.
60. Goldwasser, E., C.K. Kung, and J. Eliason, *On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action*. J Biol Chem, 1974. **249**(13): p. 4202-6.
61. Eschbach, J.W., et al., *Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial*. N Engl J Med, 1987. **316**(2): p. 73-8.
62. Stein, R.S., R.I. Abels, and S.B. Krantz, *Pharmacologic doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Blood, 1991. **78**(7): p. 1658-63.
63. Ludwig, H., et al., *Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma*. N Engl J Med, 1990. **322**(24): p. 1693-9.
64. Tsuda, E., et al., *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin*. Eur J Biochem, 1990. **188**(2): p. 405-11.
65. Lee, S., et al., *Heterologous gene expression in avian cells: potential as a producer of recombinant proteins*. J Biomed Sci, 1999. **6**(1): p. 8-17.
66. Sinacore, M., *CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins*. Biotechnol. Bioeng., 1996. **52**: p. 518-528.
67. Holmes, D.S. and M. Quigley, *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*. Anal Biochem, 1981. **114**(1): p. 193-7.
68. Krantz, S.B., *Erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
69. Schuster, S.J. and J. Caro, *Erythropoietin: physiologic basis for clinical applications*. Vox Sang, 1993. **65**(3): p. 169-79.
70. Dierich, A., et al., *Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoters*. Embo J, 1987. **6**(8): p. 2305-12.
71. Oh, S. and P. Sarnow, *Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 295-300.
72. Gaub, M.P., et al., *The chicken ovalbumin promoter is under negative control which is relieved by steroid hormones*. Embo J, 1987. **6**(8): p. 2313-20.
73. Park, H.M. and T. Muramatsu, *In vivo manipulation of foreign gene expression by steroid administration in the oviduct of laying hens*. J Endocrinol, 1999. **163**(2): p. 173-9.
74. Rizzuto, G., et al., *Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6417-22.
75. Deuschle, U., R.A. Hipskind, and H. Bujard, *RNA polymerase II transcription blocked by Escherichia coli lac repressor*. Science, 1990. **248**(4954): p. 480-3.
76. Sherman, A., et al., *Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(11): p. 1050-3.

8.2. alphabetisch

- Archer, J.S., et al., *Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 6840-4.
- Archibald, A.L., et al., *High-level expression of biologically active human alpha 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5178-82.
- Bondoli, K. and R. Wall, *Transgenic livestock*, in *Biotechnology in Agriculture*, A. Altmann, Editor. 1997, Marcel Dekker: New York.
- Bosselman, R. and R. Stewart, *Transmission of exogenous genes into the chicken*. J Reprod. Fertil., 1990. **Suppl. 41**: p. 183-195.
- Brem, G., et al., *Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits*. Gene, 1994. **149**(2): p. 351-5.
- Bronson, S.K. and O. Smithies, *Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27155-8.
- Buhler, T.A., et al., *Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(2): p. 140-3.
- Burley, R. and D. Vadehra, *The Avian Egg*. 1989.
- Butler, S.P., et al., *Current progress in the production of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic animals*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 537-42.
- Clark, A. and J. Bishop, *Expression of human antihemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep*. Biotechnology (N Y), 1989. **7**: p. 487-492.
- Clark, A.J., et al., *The molecular manipulation of milk composition*. Genome, 1989. **31**(2): p. 950-5.
- Deuschle, U., R.A. Hipskind, and H. Bujard, *RNA polymerase II transcription blocked by Escherichia coli lac repressor*. Science, 1990. **248**(4954): p. 480-3.
- Dierich, A., et al., *Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoters*. Embo J, 1987. **6**(8): p. 2305-12.
- Ebert, K.M., et al., *Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(7): p. 699-702.
- Edmunds, T., et al., *Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4561-71.
- Eschbach, J.W., et al., *Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial*. N Engl J Med, 1987. **316**(2): p. 73-8.
- Ewans and M. Knight, *Endocrinologie*, 1984. **115**: p. 368-377.
- Eyal-Giladi, H. and S. Kochav, *From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology*. Dev Biol, 1976. **49**(2): p. 321-37.
- Flamant, F. and J. Samarut, *Virofection: a one-step procedure for using replication-defective retrovirus vectors*. Virology, 1995. **211**(1): p. 234-40.

- Flamant, F., F.L. Cosset, and J. Samarut, *Vectors derived from avian leukosis and sarcoma viruses*. J Mol Med, 1995. **73**(4): p. 181-7.
- Gaub, M.P., et al., *The chicken ovalbumin promoter is under negative control which is relieved by steroid hormones*. Embo J, 1987. **6**(8): p. 2313-20.
- Gavora, J.S., et al., *Endogenous viral genes: association with reduced egg production rate and egg size in White Leghorns*. Poult Sci, 1991. **70**(3): p. 618-23.
- Goldwasser, E., C.K. Kung, and J. Eliason, *On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. 13. The role of sialic acid in erythropoietin action*. J Biol Chem, 1974. **249**(13): p. 4202-6.
- Gordon, J.W. and F.H. Ruddle, *Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei*. Science, 1981. **214**(4526): p. 1244-6.
- Greer, J., R. Milam, and P. Eggers, *Trends in use, cost, and outcomes of human recombinant erythropoietin, 1989-98*. Health Care Financ Rev, 1999. **20**(3): p. 55-62.
- Gruenbaum, J. and A. Fainsod, *Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chicken*. J Cell Biochem, 1991. **15E**: p. 194.
- Holmes, D.S. and M. Quigley, *A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids*. Anal Biochem, 1981. **114**(1): p. 193-7.
- Jacobs, K., et al., *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 806-10.
- Korhonen, V.P., et al., *Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits*. Eur J Biochem, 1997. **245**(2): p. 482-9.
- Krantz, S.B., *Erythropoietin*. Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
- Krimpenfort, P., et al., *Generation of transgenic dairy cattle using 'in vitro' embryo production*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 844-7.
- Lee, S., et al., *Heterologous gene expression in avian cells: potential as a producer of recombinant proteins*. J Biomed Sci, 1999. **6**(1): p. 8-17.
- Limonta, J.M., et al., *Transgenic rabbits as bioreactors for the production of human growth hormone*. J Biotechnol, 1995. **40**(1): p. 49-58.
- Lin, F.K., et al., *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7580-4.
- Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(1): p. 60-3.
- Lubon, H., et al., *Blood proteins from transgenic animal bioreactors*. Transfus Med Rev, 1996. **10**(2): p. 131-43.
- Ludwig, H., et al., *Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma*. N Engl J Med, 1990. **322**(24): p. 1693-9.
- Massoud, M., et al., *The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits*. Reprod Nutr Dev, 1996. **36**(5): p. 555-63.
- McKee, C., et al., *Production of biologically active salmon calcitonin in the milk of transgenic rabbits*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 647-51.
- Meade, H., *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, J.M. Fernandez and J.M. Hoeffler, Editors. 1999. p. 399-427.

- Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser, *Purification of human erythropoietin*. J Biol Chem, 1977. **252**(15): p. 5558-64.
- Mohammed, S.M., et al., *Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens*. Immunotechnology, 1998. **4**(2): p. 115-25.
- Naito, M. and M.M. Perry, *Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch*. Br Poult Sci, 1989. **30**(2): p. 251-6.
- Niemann, H., J Anim Breed Genet, 1996. **113**: p. 437-444.
- Ochiai, H., et al., *Synthesis of human erythropoietin in vivo in the oviduct of laying hens by localized in vivo gene transfer using electroporation*. Poult Sci, 1998. **77**(2): p. 299-302.
- Oh, S. and P. Sarnow, *Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 295-300.
- Paleyanda, R.K., et al., *Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(10): p. 971-5.
- Park, H.M. and T. Muramatsu, *In vivo manipulation of foreign gene expression by steroid administration in the oviduct of laying hens*. J Endocrinol, 1999. **163**(2): p. 173-9.
- Pittius, C.W., et al., *A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5874-8.
- Rizzuto, G., et al., *Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6417-22.
- Rohricht, P., BioPharm, 1999. **12**: p. 46-49.
- Rudolph, N.S., *Biopharmaceutical production in transgenic livestock*. Trends Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 367-74.
- Samarut, J., F. Flamant, and J.M. Heard, *Replication-competent and -defective retrovirus vectors for oncogenic studies*. Methods Enzymol, 1995. **254**: p. 206-28.
- Sanders, M.M. and G.S. McKnight, *Chicken egg white genes: multihormonal regulation in a primary cell culture system*. Endocrinology, 1985. **116**(1): p. 398-405.
- Sanders, M.M. and G.S. McKnight, *Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter*. Biochemistry, 1988. **27**(17): p. 6550-7.
- Sang, H., *Transgenic chickens--methods and potential applications*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(10): p. 415-20.
- Schuster, S.J. and J. Caro, *Erythropoietin: physiologic basis for clinical applications*. Vox Sang, 1993. **65**(3): p. 169-79.
- Sherman, A., et al., *Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(11): p. 1050-3.
- Sinacore, M., *CHO DUKX cell lineages preadapted to growth in serum-free suspension culture enable rapid development of cell culture processes for the manufacture of recombinant proteins*. Biotechnol. Bioeng., 1996. **52**: p. 518-528.
- Spratt and Haas, J Exp Zool, 1960. **144**: p. 139-157.
- Stein, R.S., R.I. Abels, and S.B. Krantz, *Pharmacologic doses of recombinant human erythropoietin in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Blood, 1991. **78**(7): p. 1658-63.

- Stromqvist, M., et al., *Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits*. Transgenic Res, 1997. **6**(4): p. 271-8.
- Takeuchi, M., et al., *Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7819-22.
- Takeuchi, M., et al., *Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12127-30.
- Tsuda, E., et al., *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin*. Eur J Biochem, 1990. **188**(2): p. 405-11.
- Tsukui, T., et al., *Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(8): p. 982-5.
- Velander, W.H., et al., *High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12003-7.
- Velander, W.H., H. Lubon, and W.N. Drohan, *Transgenic livestock as drug factories*. Sci Am, 1997. **276**(1): p. 70-4.
- Vick, L., Y. Li, and K. Simkiss, *Transgenic birds from transformed primordial germ cells*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1993. **251**(1332): p. 179-82.
- Wall, R.J., *A new lease on life for transgenic livestock*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(5): p. 416-7.
- Wall, R.J., D.E. Kerr, and K.R. Bondioli, *Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale*. J Dairy Sci, 1997. **80**(9): p. 2213-24.
- Wall, R.J., et al., *Transgenic animal technology*. J Androl, 1997. **18**(3): p. 236-9.
- Wall, R.J., H.W. Hawk, and N. Nel, *Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale*. J Cell Biochem, 1992. **49**(2): p. 113-20.
- Winearls, C.G., *Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13 Suppl 2**: p. 3-8.
- Wold, F., *In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification)*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 783-814.
- Wright, G., et al., *High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 830-4.

9. Anhang

Lebenslauf

Name: von Specht
Vorname: Moritz
Geburtstag: 07.02.1972
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Ulrich von Specht
Leiter der Chirurgische Forschung
Universitätsklinik Freiburg im Breisgau

Barbara von Specht, geb. von Kaldenberg
PR-Beauftragte
Staatliches Museum für Völkerkunde, München

Schulausbildung

1978-1982 Grundschole Engelschalking, München
1983-1991 Willi-Graf Gymnasium, München
1991 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
(Gesamtnote 2,1)

10/1991-12/1992 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Wolfratshausen

Studium

5/1993-6/2000 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians Universität, München
(Gesamtnote 1,99)

3/1995 Physikum
3/1996 1. Staatsexamen
8/1998 2. Staatsexamen

3/1999-2/2000 Absolvierung des Praktischen Jahres (PJ)
1. Terial Chirurgie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
2. Terial Innere Medizin, Krankenhaus Starnberg
3. Terial Anästhesiologie, Klinikum Innenstadt, München
und Herzklinik der Universität München am Augustinum

6/2000 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 11/2000 Tätigkeit als Arzt im Praktikum im Institut für Anästhesiologie,
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. Dr. h.c. Peter

Dissertation

5/1996-10/1998 Experimentelle Arbeit an der Dissertation
„Expression eines rekombinanten humanen Proteins *in vitro* und *in vivo* in Eileiterzellen des Huhnes, am Beispiel von humanem Erythropoietin, hrEPO“
unter Leitung von Prof. Dr. H. Domdey, Genzentrum München

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker danke ich für das hervorragende wissenschaftliche Umfeld, das er mit dem Genzentrum München geschaffen hat.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey möchte ich für die Bereitstellung aller Mittel danken, die für die Fertigstellung dieser Dissertation notwendig waren, sowie für die Aufnahme und Betreuung eines „Mediziners“ in seiner Arbeitsgruppe.

Meinem Vater, Prof. Dr. Dr. Bernd-Ulrich von Specht verdanke ich die dieser Arbeit zugrunde liegende Idee. Ferner möchte ich ihm für die grosse wissenschaftliche und persönliche Unterstützung danken, die er in allen Phasen der Arbeit geleistet hat.

Herrn Prof. Dr.med. Georg Enders danke ich für die Annahme als Doktoranden und für die Mitbetreuung durch die Medizinische Fakultät.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Wiebauer. Gleichwohl nicht Betreuerin der Arbeit, stand sie vor allem in schwierigen Phasen oft mit Rat und Tat zur Seite, und hat in erheblichem Maße zum Gelingen der Dissertation beigetragen. Ihre Unterstützung kann nicht wertvoll genug eingeschätzt werden.

Danken möchte ich auch Frau Schmidt-Pilger und Frau Bieber, die in der Chirurgischen Forschung Freiburg als medizinisch-technische Assistentinnen wichtige Experimente vorbereitet und unterstützt haben und durch ihr persönliches Engagement sehr zum Gelingen dieser Arbeiten beigetragen haben.

Ausserdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Domdey, sowie allen Mitarbeitern des Genzentrum München, die bei Problemen jederzeit Ansprechpartner waren und mich sehr unterstützt haben. Namentlich erwähnt seien vor allem Dr. Susanne Braun, Horst Würfl, Dr. Andreas Goppelt, Dr. Joseph Gabelsberger, Dr. Helmut Blum, Dr. Stefan Bauersacks, sowie Willi und Angelika.