

15.

Weitere transgene Tiermodelle und ihre Anwendung

Wie bereits mehrfach erwähnt, handelt es sich bei den meisten transgenen Tieren, die aufgrund von Vorkerninjektion ein Transgen überexprimieren, um Mäuse. Die homologe Rekombination wurde bisher nur in der Maus beschrieben. Transgene Tiere, die ein Transgen überexprimieren, sind jedoch auch in anderen Spezies, vor allem in Säugern, beschrieben worden. In der Grundlagenforschung werden als Alternative vor allem in Ratten Transgene exprimiert. Hinzu kommen noch Haustiere und Wiederkäuer. Letztere werden hauptsächlich zur Großproduktion von Transgenprodukten herangezogen. Damit stellt sich dann die Frage nach dem kommerziellen Nutzen der transgenen Technologie. Der Vollständigkeit halber seien auch niedrigere Tiere erwähnt, in denen Transgene beschrieben wurden.

15.1 Transgene Ratten

Transgene Ratten wurden vor allem deshalb hergestellt, weil die Maus für manche transgenen Modelle ungeeignet ist. Beispielsweise lassen sich Mäuse fast nie als Modell für humane Autoimmunerkrankungen verwenden. Die Ratte eignet sich jedoch recht gut, um diese Krankheiten zu untersuchen [1]. Mehrere Gruppen versuchten zum Beispiel, mit Hilfe transgener Mausmodelle menschliche Autoimmunerkrankungen zu studieren. Verschiedenen Hinweisen zufolge leiden Menschen, die das humane Transplantationsantigen HLA B27 tragen, besonders häufig an Autoimmunerkrankungen. Deshalb lag

es nahe, HLA B27 in der Maus überzuexprimieren. An diesen Mäusen war jedoch bei Expression des funktionsfähigen HLA B27 (das heißt bei Expression zusammen mit dem humanen β_2 -Mikroglobulin) selbst nach längerer Zeit keine Autoimmunreaktion zu beobachten [2]. Zieht man jedoch die Ratte als Modell für die Überexpression des funktionsfähigen HLA B27 heran, so lassen sich typische Symptome einer Autoimmunerkrankung zum Beispiel im Darm zeigen [3].

Die Herstellung transgener Ratten erfolgt ähnlich wie die transgener Mäuse. Wichtig ist jedoch, daß man eine Superovulation, wie dies mit Injektionen bei der Maus möglich ist, in der Ratte so nicht durchführen kann. Um Ratten zu superovulieren, muß man diesen eine osmotische Pumpe implantieren, die dann über den gewünschten Zeitraum hinaus die beiden Hormone in die Ratte abgibt. Dafür ist ein kleiner Eingriff unter Narkose erforderlich.

Weiterhin ist die Zona pellucida der Eizellen bei Ratten wesentlich härter als bei Mäusen. Man kann deshalb nur mit einer sehr spitzen Injektionskapillare injizieren, die dann auch schnell verstopft oder abbricht. Als Hormone zur Superovulation werden meistens PMSG und hCG verwendet, aber auch das follikelstimulierende Hormon FSH [3, 4]. Als Embryonenspender werden möglichst Hybridtiere verwendet.

15.2 Transgene Kaninchen

Das bekannteste Modell für große transgene Haustiere sind transgene Kaninchen. Das erste transgene Kaninchen wurde von Hammer et al. [5] beschrieben. Das Transgen war ein Metallothioneinpromotor-kontrolliertes menschliches Wachstumshormongen. Später wurden weitere Arbeiten zu diesem Thema publiziert [6, 7, 8]. Die Kaninchen waren das erste Tiermodell für Arteriosklerose. Es gibt eine Kaninchenmutante, die spontan Hypercholesterinämie entwickelt und sich somit als Modell für humane Arteriosklerose eignet. Ein entsprechendes transgenes Tiermodell wurde von Perevozchikov et al. [9] publiziert.

Kaninchen unterscheiden sich von anderen Mammalia durch verschiedene Verhaltensweisen, die diese Tiere für Forschungen an Embryonen sehr beliebt gemacht haben. Zum einen kann die Ovulation und die Ausbildung des funktionellen Corpus luteum durch Verpaarung, Kontakt mit anderen Weibchen, cervikale Stimulation oder

Hormonbehandlung ausgelöst werden, denn die Kaninchen sind Reflexovulatoren. Die Ovulation beginnt etwa 10 bis 13 Stunden nach der Verpaarung. Während der vier folgenden Tage wandern die Eizellen durch den Ovidukt in den Uterus [10]. Eine andere besondere Eigenschaft der Kaninchen ist eine dicke Mucopolysaccharidschicht, auch Muzin genannt, welche die Embryonen umgibt. Die Sekretion des Muzins ist östrogenabhängig. Wenn die Embryonen in den Uterus einwandern, verdünnt sich die Muzinschicht am Tag 6 oder 7 der Trächtigkeit. Die Gesamtträchtigkeit dauert bis zum Wurf der Jungen etwa 32 Tage. Bei einer nichtfertilen Verpaarung treten 16 bis 17 Tage lang Symptome einer Scheinträchtigkeit auf.

Die Superovulation von Kaninchen gestaltet sich schwieriger als bei Mäusen. Wegen der Körpergröße müssen die Injektionen mit FSH an verschiedenen Stellen gegeben werden, hCG muß intravenös gespritzt werden. Zum Erzeugen der scheinträchtigen Embryonempfänger ist ebenfalls eine hCG-Gabe erforderlich, nicht aber unbedingt die Verpaarung mit einem vasktomierten Männchen [4].

Die Embryonen von Kaninchen sind sehr anspruchslos und können in einer Krebsringerbicarbonatlösung mit 20% FCS oder in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit 20% FCS bis zum Blastocystenstadium kultiviert werden.

Die befruchteten Embryonen im Einzellstadium werden den Kaninchen unter Anästhesie entnommen. Dabei verwendet man zweckmäßigerweise ebenfalls Ketamin, jedoch ist das Narkoseprotokoll komplizierter als bei Mäusen. Die Embryonen werden aus dem Eileiter gespült. Die Embryonenspende können mindestens ein weiteres Mal superovuliert und zur Spende von Embryonen herangezogen werden. Da nach dem Ausspülen der Embryonen aus dem Eileiter keine hundertprozentige Garantie besteht, daß alle befruchteten Eizellen entnommen wurden, behandelt man diese Tiere mit Postglandin $F_{2\alpha}$, um eine Gluteolyse zu induzieren.

Die Mikroinjektion wird ähnlich wie bei Mäusen oder Ratten durchgeführt. Als Injektionsmedium verwendet man jedoch DPBS mit 20% FCS. Die Kaninchenembryonen sind etwas größer als Mausembryonen (160 $m\mu$ Durchmesser bei Kaninchen, 110 $m\mu$ bei Mäusen). Ansonsten sind sie in ihrer Struktur mit den Mäusen vergleichbar. Die Zona pellucida ist erheblich dicker, und 20 Stunden nach der hCG-Gabe ist oft noch eine dünne Muzinhaut vorhanden. Beide lassen sich allerdings mit der Injektionskapillare leicht durchstoßen. Nach der Mikroinjektion werden die Embryonen ähnlich wie bei der Maus bis zum Transfer in CO_2 -Kultur gehalten.

Der Embryotransfer wird unter Narkose durchgeführt. Eine Trächtigkeit kann etwa zwei Wochen nach dem Transfer durch vaginale Palpierung festgestellt werden. Die Feten können mit den Fingern am Uterushorn ertastet werden. Etwa fünf Tage vor dem errechneten Wurftermin sollte man den Kaninchenweibchen die Möglichkeit geben, ein Nest zu bauen. Das ist sehr wichtig und muß permanent beobachtet werden. Bei überlanger Trächtigkeit kann es nötig werden, die Jungen mit Hilfe eines Kaiserschnitts zu entbinden.

Wichtig ist, daß die Zahl der frisch geworfenen Jungen so groß ist, daß man eine akzeptable Überlebensrate erhält, wobei die injizierten Embryonen oft schlecht überleben. Es ist deshalb sinnvoll, die Jungen von zwei oder drei Tieren zusammenzulegen, falls diese Tiere verfügbar sind. Sicherheitshalber sollte man auch parallele Verpaarungen ansetzen; so stehen Ammen zur Verfügung, beziehungsweise diese Jungen können der Mutter, die transferierte Embryonen ausgetragen hat, mit unterlegt werden.

Um festzustellen, ob die Jungtiere transgen sind, kann man bereits etwa nach einer Woche die Spitze des Schwanzes kupieren, um daraus die DNA zu analysieren. Allerdings sind wegen Infektionsgefahren größere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich als bei Mäusen. Ein Problem stellt eine Markierung der Tiere dar, da in diesem Alter keine Chips implantiert werden können und Ohrmarken unter Umständen erheblich stören, da sie in der Nähe der marginalen Ohrvene angebracht werden, die man später zur Blutentnahme benötigt.

15.3 Transgene Schweine

Die erste Publikation über transgene Mäuse [11] zeigte, daß die transgenen Tiere etwa doppelt so groß werden können wie ihre nicht-transgenen Geschwister. Das rief kommerzielle Tierzüchter auf den Plan. Da die Zuchtierhaltung ein ganz wesentlicher Wirtschaftszweig ist, kamen sehr schnell Gedanken auf, ökonomisch interessante Tiere wie Kühe, Schweine, Schafe Ziegen und Geflügel genetischen Modifikationen zu unterziehen, die ihren Marktwert erhöhen. Dabei ging es zum einen um die Größe der Tiere [12], zum anderen um eine Verminderung der Krankheitsanfälligkeiten [13, 14, 15]. Hinzu kam noch die Idee, diese Tiere zur Produktion humaner Proteine heranzuziehen, die man dann aus Blut oder Milch isolieren kann [16, 17, 18].

Die meisten Genkonstrukte, die in Schweine eingebracht wurden, codieren Wachstumshormone anderer Spezies. Im Gegensatz zu Mäusen mit einem Transgen, das einen Wachstumsfaktor codiert, zeigen Schweine mit einer Ausnahme [19] im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren kein beschleunigtes Wachstum.

Ein anderer Ansatz war der Versuch, Schweine als Bioreaktoren zu verwenden. Man erzeugte transgene Schweine, die in ihren Milchdrüsen ein Transgen exprimieren [20]. Diese Proteine lassen sich dann aus der Milch isolieren. Da relativ große Mengen an Milch produziert werden, kann man auch entsprechend große Mengen des transgen-abhängigen Proteins erhalten. Man kann aber auch erythroides Gewebe in ähnlicher Weise nutzen [17].

Die Herstellung transgener Schweine ist wesentlich weniger effizient als die transgener Mäuse. Grundsätzlich ist jedoch auch hier die Mikroinjektionstechnik im Vorkern die Methode der Wahl [5, 12].

Zur Synchronisierung und Superovulation kann man wie bei Mäusen PMSG und hCG verwenden. Alternativ dazu bietet sich das oral verfütterbare synthetische Progestin an, mit dessen Gabe sehr hohe Raten der Synchronisierung erreicht werden. PMSG wird am Tag 15 bis 16 des Zyklus verabreicht, und 72 bis 80 Stunden später folgt hCG [5, 21]. Mit der PMSG/hCG-Gabe erhält man etwa 40 befruchtete Eizellen, wobei die Gefahr, degenerierte oder anderweitig abnormale Zellen zu erhalten, zunimmt, wie das auch bei den Mäusen der Fall ist. Die Eizellen, die aus superovulierten präpubertären Ferkeln erhalten werden, entwickeln sich wesentlich schlechter als solche, die man aus superovulierten nachpubertären Tieren gewinnt. Das gilt auch für die Weiterentwicklung zu transgenen oder nicht-transgenen Tieren nach der Mikroinjektion der Eizellen [22, 23]. Andere Studien [24] konnten diese Effekte nicht feststellen. Martin und Pinkert [28] vermuten als Ursache die verschiedenen genetischen Hintergründe der als Embryonenspender verwendete Schweine.

Scheinträchtigkeit kann durch Gabe synthetischer Hormone induziert werden. Durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Gabe erreicht man wieder die Rückkehr von der Scheinträchtigkeit zu einem normalen Zyklus.

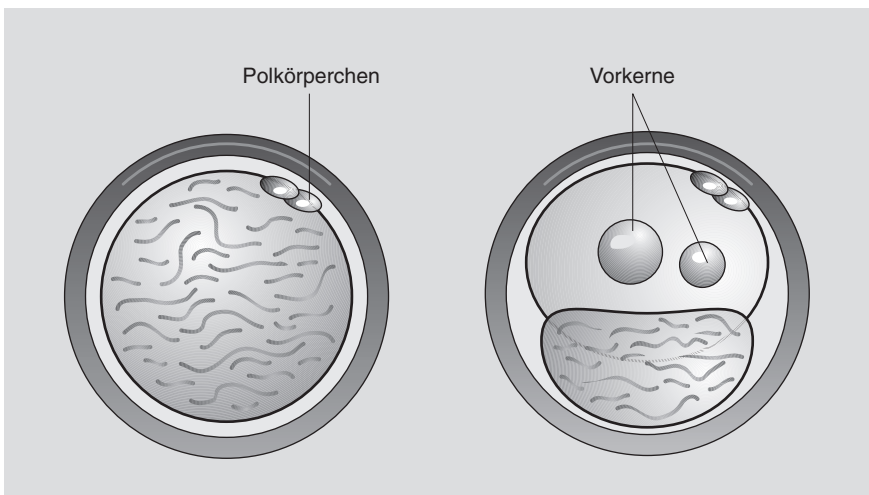
Es ist wichtig, daß die Befruchtung der Eizellen zum richtigen Zeitpunkt stattfindet. Deshalb müssen kurz vor Beginn der Ovulation Samenzellen im reproduktiven Trakt des entsprechenden weiblichen Tiers vorhanden sein. Wird dieser Zeitpunkt nicht genau eingehalten, ist die Fertilität wesentlich geringer [25]. Alternativ gibt es die Möglichkeit der künstlichen Befruchtung. Weibchen sollten mit mindestens 3 Millionen lebenden Spermien befruchtet werden, das heißt

ein typisches Ejakulat reicht für die Befruchtung von sechs bis acht weiblichen Tieren aus [26].

Die Embryonenspender müssen zur Entnahme der ein- und zweizelligen befruchteten Eizellen, die etwa 60 bis 66 Stunden nach der hCG-Gabe operativ erfolgt, anästhesiert werden [5, 21, 22]. Durch eine mitvendrale Laparotomie wird der reproduktive Trakt herausgenommen, und die Eizellen werden aus dem Ovidukt gespült. Dazu wird in das Ostium des Ovidukts eine Glaskanüle eingeführt; die Eizellen werden mit Hilfe einer Spritze von der uterotubalen Verbindung in Richtung Infundibulum ausgespült und dann bei 37 °C mit 5% CO₂ kultiviert.

Da die Pronuclei in den befruchteten Eizellen des Schweins im Einzellstadium nicht sichtbar sind (Abb. 15.1), beschreiben Wall et al. [21], daß die Pronuclei des Schweins durch eine Zentrifugation bei 15 000 g für drei bis acht Minuten sichtbar gemacht werden können. Die Ausbeute ist allerdings nicht sehr hoch [21, 24]. Ein Teil der Eizellen bleibt in der bisherigen Form, also ohne sichtbare Vorkerne. Durch eine Kultivierung von ein bis vier Stunden und einer erneuten Zentrifugation erhält man weitere Eizellen, deren Vorkerne sichtbar sind [27].

Die Mikroinjektion erfolgt wie bei befruchteten Eizellen der Maus. Werden zweizellige Embryonen mikroinjiziert, so sollte in die Kerne



15.1 Undurchsichtiger Embryo des Schweins im Einzellstadium. Sichtbar sind nur die Polkörperchen, aber keine Vorkerne (linkes Bild). Rechtes Bild: der links gezeigte Embryo nach der Zentrifugation. Die Vorkerne werden sichtbar.

beider Zellen die DNA mikroinjiziert werden. Man erhält dann einen höheren Anteil an transgenen Tieren [29]. Allerdings entstehen bei einer Mikroinjektion in einen Zweizeller erwartungsgemäß sehr oft nur Tiere, die das Transgen als Mosaik, also nicht in allen Zellen, tragen.

Die Kultivierung der befruchteten Eizellen von Schweinen ist schwierig. *In vitro* ist es kaum möglich, mehr als ein bis zwei Zellteilungen zu erreichen. Die Kultivierung der Eizellen erfolgt ähnlich wie bei der Maus in Tropfenkultur unter Silikonöl in einem CO₂-begasten Brutschrank.

Alternativmethoden wie die Mikroinjektion des Genkonstrukts in das Cytoplasma befruchteter Eizellen waren erwartungsgemäß erfolglos. Wurde dieses Genkonstrukt jedoch in die Vorkerne zentrifugierter Eizellen mikroinjiziert, so fand man einen Anteil von etwa 10% transgenen Tieren im Gesamtwurf, also deutlich weniger als bei Nagern. Etwa 6 bis 12% der transferierten mikroinjizierten Eizellen entwickeln sich zu Ferkeln [12]. Wichtige Faktoren sind dabei: das Entwicklungsstadium der Eizelle bei der Injektion; die Dauer der *in vitro*-Kultivierung; die Synchronisierung von Embryonenspendern und -empfängern; die Zahl der transferierten Eizellen sowie das Alter des Embryonenspenders [22, 24].

Man kann die Embryonenspender auch als Rezipienten für die mikroinjizierten Eizellen heranziehen [28]. Diese Methode scheint sehr effizient zu sein und spart zudem die Erzeugung von Scheinträchtigkeiten.

Bei Schweinen, die als Transgen das Gen für ein exogenes Wachstumshormon tragen, findet man eine Expression des Proteins in etwa 70% der erhaltenen Foundertiere [28]. Die Stärke der Expression variiert von Tier zu Tier unabhängig vom Konstrukt, was nach den Erfahrungen bei der Maus zu erwarten ist.

15.4 Transgene Schafe und Ziegen

Transgene Schafe und Ziegen werden wie Mäuse durch Mikroinjektion in den Vorkern von befruchteten Eizellen erzeugt [30]. Die Zahl der transgenen Wiederkäuer ist im Vergleich zu Mäusen relativ gering, da die Effektivität der Produktion bei diesen Tieren sehr niedrig ist. Das Transgen wird zum Teil bei weniger als 1% der mikroinjizier-

ten Eizellen in das Genom integriert [31]. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Tatsache, daß weniger als 50% der transgenen Tiere das Transgen exprimieren. Hinzu kommt, daß die Würfe bei diesen Tieren lediglich ein bis drei Junge umfassen. Dennoch ist das Interesse an diesen Tieren relativ groß, weil sie zur Produktion großer Proteinmengen und für die Landwirtschaft nützlich sein können.

Die meisten kleinen transgenen Wiederkäuer sind Schafe [5], es wurden aber auch Ziegen beschrieben. Diese Tiere dienen vorwiegend als Bioreaktoren zur Produktion transgenabhängiger Proteine in der Milch. Ihre Generationszeit ist relativ kurz, so daß man eine Laktationsphase nach ein bis zwei Jahren erreichen kann. Wegen der geringen Zahl von Nachkommen und des niedrigen Anteils an transgenen Tieren muß man mit mehreren parallelen Gruppen von Embryonenspendern und -rezipienten arbeiten. Es wurden Experimente mit bis zu 150 Schafen beschrieben. Damit ergibt sich das Problem, daß diese Tiere synchronisiert sein müssen.

Schafe lassen sich mit PMSG oder FSH superovulieren; für die Synchronisation verwendet man am besten sogenannte Progestin-Pessare, mit denen eine Synchronisierung von fast 100% der behandelten Tiere erreicht wird. Dabei ist lediglich ein einziger Eingriff erforderlich, nämlich das Einsetzen des Pessars, was den Tieren keine Probleme bereitet [30].

Nach Feststellung des Östrus müssen die weiblichen Tiere befruchtet werden. Dies kann entweder auf natürlichem Wege oder auch durch künstliche Befruchtung geschehen. Die intrauterine, künstliche Befruchtung wird entweder durch eine Laparoskopie oder durch midventrale Laparotomie durchgeführt. Der Samen wird in jedes Uterushorn transferiert. Die Befruchtung erfolgt 44 bis 60 Stunden nach der Pessarentfernung, das heißt 80 bis 96 Stunden nach der FSH- oder PMSG-Behandlung.

Die Embryonen werden etwa 64 Stunden nach der Pessar-Entfernung isoliert. In Abhängigkeit vom Zyklus befinden sie sich dann im Einzellstadium. Die Embryonen werden wiederum durch mitventrale Laparotomie unter Narkose aus dem Ovidukt isoliert. Im allgemeinen reicht dazu eine einmalige Spülung des Ovidukts aus, bei den folgenden Spülungen wurden nur noch wenige Embryonen gefunden.

Die Embryonen von Schafen werden bei Raumtemperatur kultiviert; die Pronuclei sind sichtbar, so daß eine Zentrifugation nicht nötig ist [5]. Es gibt verschiedene Methoden der Mikroinjektion, da ein nicht unerheblicher Teil der Eizellen nach der Mikroinjektion lysiert.

Die mikroinjizierten Embryonen werden dann sofort in die Empfängertiere transferiert, und zwar je Empfänger etwa zwei bis fünf Embryonen, von denen sich 30 bis 50% entwickeln. Die Empfängertiere müssen mit den Spendertieren synchronisiert sein. Vasektomierte Widder werden zweimal täglich dazu verwendet, um festzustellen, ob die weiblichen Tiere im Zyklus sind. Die Embryonen werden unter Narkose in den Eileiter des Rezipienten transferiert.

Alternativ zum sofortigen Transfer lassen sich Schafembryonen auch bis zu fünf Tage lang kultivieren. Als Medium wird im allgemeinen synthetische Oviduktflüssigkeit mit humanem Serum [30] verwendet.

Es werden auch Methoden beschrieben, in denen eine Kokultur mit Oviduktzellen durchgeführt wird. Etwa 50% der nicht mikroinjizierten Embryonen entwickeln sich dann nach fünf Tagen in Kultur zu späten Morulae oder Blastocysten [32]. Diese Embryonen werden sich erfolgreich zu Jungtieren entwickeln, wenn sie am fünften Tag das Blastocystenstadium erreicht haben. Sie werden dann in Rezipienten implantiert, die einen Tag später im Zyklus sind als die Embryonendonoren. Damit berücksichtigt man die langsamere Entwicklung der Embryonen *in vitro*.

15.5 Transgene Kühe

Die Herstellung transgener Kühe hat hauptsächlich einen kommerziellen Hintergrund. Mit Hilfe des *Gene Pharming* will man Milchkühe zur Expression eines zusätzlichen Proteins in ihrer Milch bringen.

Da es schwierig ist, aus Hefe-, Pilz- oder Zellkulturen in quantitativen Mengen Proteine zu isolieren, die komplizierte posttranskriptionelle Modifikationen erfahren, will man zum Beispiel den humanen Serumfaktor VIII, Plasminogenaktivator, TPA und andere in der Milch exprimieren. Einfachere Proteine, wie beispielsweise Insulin, Wachstumshormone oder Cytokine können auch aus Zellkulturen in quantitativer Menge gewonnen werden.

Biomedizinisch wichtige Proteine wurden schon in verschiedenen transgenen Tieren synthetisiert und durch die Milch sekretiert, zum Beispiel in Mäusen, Kaninchen, Schafen und Ziegen [30]. Dabei wurden zum Teil hohe Expressionsraten gefunden, beispielsweise 7–25 mg/ml α 1-Antitrypsin in der Maus und im Schaf [33] oder 3 mg/ml Plasminogenaktivator in Ziegen [34].

Unter diesen Voraussetzungen erscheint es zumindest prüfenswert, ob nicht Milchvieh zur Produktion solcher Proteine herangezogen werden kann. Eine einzige Kuh kann im Jahr mehr als 10000 Liter Milch produzieren. Darin könnten dann 300 kg des gewünschten Proteins mitexprimiert werden. Vergleicht man diese Menge mit der von Schafen oder Ziegen produzierten Milch pro Jahr, so ergibt sich eine Einsparung an Tieren (Faktor 20 bis 30), die sonst gehalten und versorgt werden müßten.

Es ist jedoch auch mit ganz erheblichem Aufwand verbunden, transgene Kühe herzustellen. Um diese Problematik deutlich zu machen, ist in Tabelle 15.1 [35] gezeigt, wie lange die Herstellung eines

Tabelle 15.1: Von verschiedenen Tieren produzierte Milch- und Transgenproduktmengen (nach [36])

	Maus	Kaninchen	Schwein	Ziege	Schaf	Kuh
Liter Milch/Jahr	0,02	50	250	400	500	10 000
Tiere für 100 kg Protein erforderlich	5.8×10^6	2 000	400	250	200	10
Zeit zwischen Vorkerninjektion und erster Milch	14 Wochen	17 Wochen	12 Monate	12–18 Monate	12–18 Monate	19–29 Monate

transgenen Tiers der wichtigsten Tierarten dauert und nach welcher Zeit man welche Mengen an Protein beziehungsweise Milch erhalten kann.

Es gibt Bestrebungen, durch die Produktion komplizierter humaner Proteine in der Milch von Kühen die Isolierung dieser Proteine aus Humanplasma zu ersetzen. Der Vorteil liegt hierbei auf der Hand. Man denke an die HI-Virus-kontaminierten humanen Serumfaktor VIII-Proben. Tabelle 15.2 [35] nennt die wichtigsten Proteine, die so gewonnen werden könnte und die Mengen an humanem Plasma, die zum gleichen Zweck benötigt würden. In Tabelle 15.3 [35] wird gezeigt, welche transgenen Proteine bisher in Säugern exprimiert wurden. Somit kann sich ein eigener Industriezweig entwickeln, der mit Hilfe transgener Tiere – vor allem transgener Kühe – große Mengen eines hochgereinigten und sicher nicht mit humanen Erregern kontaminierten Proteins produzieren kann. Wegen der langwierigen Herstellung ist ein entsprechender finanzieller Rahmen erforderlich.

Tabelle 15.2: Geschätzter jährlicher Bedarf an humanen Proteinen für den US-Markt (nach [36])

Protein	Benötigte Tiere (10 000l Milch/Jahr)	Äquivalentes Volumen humanes Plasma (Liter)
Faktor VIII 120 g	1,2	1,2 × 10 ⁶
Protein C 100 kg	100	20 × 10 ⁶
Fibrinogen 200 kg	20	0,5 × 10 ⁶
AT III 800 kg	80	4 × 10 ⁶
Albumin 100 000 kg	5 000	2 × 10 ⁶

Tabelle 15.3: Expressionssysteme zur Herstellung biomedizinischer Proteine in Milch (nach [36])

Promotor	Gen exprimiert	Expressionsmenge	Tier
WAP	tPA (cDNA)	0–50 mg/l	Ziege
WAP	CD4 (cDNA)	1–2 mg/l	Maus
WAP	Protein C (genomisch)	1 000 mg/l	Maus
WAP	Protein C (cDNA)	1 000 mg/l	Schwein
BLG Ltd.	FIX (cDNA)	0.02 mg/l	Schaf
BLG Ltd.	AAT (genomisch)	35 000 mg/l	Schaf
BLG Ltd.	AAT (genomisch)	50–8 000 mg/l	Maus
BLG	humanes BSA	10 000 mg/l	Maus
β -Casein (Kaninchen)	IL-2 (cDNA)	0.3 mg/l	Kaninchen
β -Casein (Ratte)	FSH (cDNA)	10 mg/l	Maus
β -Casein (Ziege)	tPA (cDNA)	3 000 mg/l	Ziege
β -Casein (Ziege)	CFTR (cDNA)	1 mg/l	Maus
aS1-Casein (Rind)	Urokinase (genomisch)	2 000 mg/l	Maus
aS1-Casein (Rind)	hLF (cDNA)	2 000 mg/l	Maus
aS1-Casein (Rind)	hLF (genomisch)	30 000 mg/l	Maus
aS1-Casein (Rind)	IGF-1 (cDNA)	10 000 mg/l	Kaninchen

Ganz entscheidend für einen Erfolg dieser Vorhaben ist eine hohe Ausbeute an transgenen Tieren, da nach einer Trächtigkeitzeit von knapp einem Jahr nur ein bis drei Tiere geboren werden und die Integrationsrate des Transgens wesentlich geringer ist als zum Beispiel bei Mäusen. Zudem ist eine starke Expression des Transgens in der Milch erforderlich, damit diese Milch, wie beispielsweise im Fall von Lactoferrin, dem jeweiligen Empfänger ohne weitere Anreicherung des transgenabhängigen Proteins verabreicht werden kann.

Hinzu kommt die Möglichkeit, verschiedene Proteine mit der Milch oral zu verabreichen. Einem Menschen schmeckt Kuhmilch von allen verfügbaren Milchsorten am besten und wird somit am leichtesten verzehrt.

Eine niederländische Firma erzeugte transgenes Vieh, zunächst eine Lactoferrin-produzierenden Kuh. Lactoferrin ist eines der wichtigeren, eisenbindenden Proteine in der Milch der meisten Säuger [36]. Humanes Lactoferrin hat vor allem die Aufgabe, in der Brust der stillenden Mutter und im Gastrointestinaltrakt des saugenden Kindes die Entwicklung verschiedener pathogener Bakterien zu hemmen. Generell hat das humane Lactoferrin entzündungshemmende Eigenschaften und kann somit potentiell zu vielen Zwecken eingesetzt werden.

Lactoferrin ist ein relativ komplexes Protein, das nach der Translation modifiziert werden muß. So bot es sich an, dieses Protein in einer transgenen Kuh zu produzieren; dies weckte das Interesse verschiedener Kindernahrungsmittelhersteller, die Fertignahrung mit humanem Lactoferrin auf den Markt bringen wollten. Das ist besonders dann wichtig, wenn eine Mutter überhaupt nicht stillt.

Die entsprechenden Konstrukte wurden unter Kontrolle verschiedener humaner Casein-Promotoren nach einer Mikroinjektion in Vorkerne von Mäusen [37] exprimiert. Nach Bestimmung der Menge des erhaltenen Transgenproduktes in Abhängigkeit von verschiedenen Promotoren, sowie der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des erhaltenen Proteins, wurde das am stärksten exprimierende Genkonstrukt zur Generierung transgener Kühe herangezogen [36, 37].

Die Isolierung von befruchteten Einzellembrionen aus lebendigen Kühen ist schwierig und teuer. Sie können nur operativ gewonnen werden. Grundsätzlich lassen sich Kühe jedoch auch mit PMSG oder FSH superovulieren. Die wesentlich erfolgreichere Technik zur Produktion großer Mengen an synchronisierten Embryonen im Einzellstadium ist jedoch die *in vitro*-Befruchtung von Oocyten, die aus geschlachteten Tieren gewonnen werden [37]. Hierzu gibt es mehrere Protokolle, in [37] wurden insgesamt 2500 Eizellen durch Aspiration von Follikeln der Ovarien, die von lokalen Schlachthöfen bezogen werden, isoliert. Die Zahl der isolierten Oocyten schwankte stark; maximal wurden 150 Oocyten pro Tag isoliert. Reifung und Befruchtung wurden dann nach cytologischen Kriterien beurteilt. Als reif wurden die Eizellen bezeichnet, bei denen die Kernmembranen zusammengebrochen war, sich das erste Polkörperchen ausgebildet hatte und eine Metaphasenplatte zu sehen war. Für die Befruchtung wurde Sperma von verschiedenen Bullen verwendet, die alle bereits mehrfach für *in vitro*-Befruchtungen herangezogen worden waren. Die Eizellen wurden als befruchtet definiert, wenn zwei Vorkerne und ein Spermenschwanz sichtbar waren, was bei 50 bis 70% der ursprünglich eingesetzten Eizellen der Fall war.

Die Pronuclei der befruchteten Eizellen von Kühen sind nicht sichtbar; man muß sie wie bei Schweinen abzentrifugieren, wobei wiederum die Methode von Wall et al. [21] verwendet wird. Die Ausbeuten, die von Krimpenfort et al. erreicht wurden, sind in Tabelle 15.4 gezeigt. Hill [38] benötigte 19336 Oocyten, von denen in 11 206 mikroinjiziert wurden, um 93 geborene Kälber zu erhalten, von denen vier transgen wa-

Tabelle 15.4: Ausbeuten bei der Herstellung transgener Rinder (nach [38])

Schritt	Gesamtzahl	Ausbeute
Eizellen	2 470	100%
reife Eizellen	2 297	93%
befruchtete Eizellen	1 358	55%
injizierte Eizellen	1 154	47%
die Injektion überlebende Eizellen	981	40%
injizierte Zellen, die sich teilen	687	28%
transferierte Blastocysten	129	5%
Embryonen, aus denen eine Trächtigkeit resultierte	21	(0.85%)
erhaltene Tiere	16	0.65%
transgene Nachkommen	2	0.08%
Nachkommen, die das Transgen komplett integriert haben	1	0.04%

ren. Bei Krimpenfort et al. hatte von den zwei erhaltenen transgenen Kälbern nur eines die komplette Transgen-DNA integriert.

Die injizierten Eizellen müssen nach der Mikroinjektion kultiviert werden, damit man feststellen kann, ob sie sich weiterentwickeln. Hierfür werden die Embryonen neun Tage lang in Mikrotropfenkulturen, deren Medium mit rinderepithelialen Oviduktzellen konditioniert wird, gehalten. Diese Zellen entwickeln sich langsamer als die Kontrollzellen, viele erreichen jedoch das Blastocystenstadium. Alternativ werden die Rinderembryonen im Ovidukt von Kaninchen zwischenkultiviert. Diese Ovidukte müssen dann am Ende verschlossen werden. Nach sieben bis neun Tagen werden die Embryonen dann wieder herausgespült und endgültig transferiert. Die Ausbeute ist bei beiden Techniken gering. Wegen des enormen Aufwands beim Embryotransfer ist es jedoch sinnvoll, nur die mikroinjizierten Zellen, die sich weiterentwickeln können, zu transferieren.

Die Rezipienten der Embryonen werden so synchronisiert, daß die Embryonen in ihrer Entwicklung den Rezipienten einen Tag voraus

sind. Damit ergeben sich wesentlich bessere Ergebnisse als mit Rezipienten, die auf den gleichen Tag wie die Embryonen synchronisiert sind. Das ist auch verständlich, da sich die Embryonen *in vitro* langsamer entwickeln als *in vivo*. Krimpenfort et al. [37] transferierten ein bis zwei Embryonen pro Rezipient, wobei sich jeweils nur ein Kalb entwickelte. 21% der Rezipienten, wesentlich weniger ist als bei der Verwendung nicht-mikroinjizierter Eizellen, wurden trächtig. Die Scheinträchtigkeit der Rezipienten wird hormonell induziert. Die Trächtigkeit kann 40–60 Tage nach dem Transfer durch rektale Palpierung festgestellt werden. Alternativ bieten sich die Analyse von Milch oder Blut auf die Konzentration von Progesteron oder Ultraschalluntersuchungen an.

15.6 Transgenes Geflügel

Transgenes Geflügel wird hauptsächlich aus ökonomischen Gründen hergestellt. Geflügelzüchter, vor allem in USA und Australien, sind daran interessiert, Tiere zu züchten, die möglichst groß werden und resistent gegen Krankheitserreger sind. Infolgedessen entwickelte man transgenes Geflügel, dessen Transgene Wachstumshormone und deren Rezeptoren sowie Resistenzen gegen Krankheiten wie Influenza oder Bakterien sowie Immunmodulatoren codieren. Allerdings sind weder Eier noch Fleisch von transgenem Geflügel auf dem Markt. Dies mag auch daran liegen, daß zumindest im Vergleich mit Säugern relativ wenig transgenes Geflügel generiert wurde [39, 40].

Da es technisch unmöglich ist, rekombinante DNA in die Vorkerne von embryonalen Zellen des Geflügels zu injizieren, ist es die Methode der Wahl, mit Hilfe von Retroviren fremde DNA in die Rezipienten einzubringen. Dabei ist problematisch, daß Geflügelretroviren im allgemeinen pathogen für diese Tiere sind. Man kann jedoch auch rekombinante DNA in die Zellen des Blastodermstadiums einbringen oder einen spermaabhängigen Gentransfer durchführen.

Meistens wird ein Genkonstrukt mit Hilfe von replikationskompetenten Retroviren (Rous-Sarcomavirus RSV oder dessen Modifikation Schmidt-Ruppin A) oder, was zu bevorzugen ist, von replikationsdefekten Retroviren (eine Modifikation des Reticuloendotheliosevirus REV in Verbindung mit einem modifizierten Helfervirus, das vom Spleen Necrosis Virus SNV abstammt) in Keimbahnzel-

len von Geflügel eingebracht. Der Gebrauch von replikationsdefekten Viren hat den Vorteil, daß die Gefahr einer Infektion des Empfängertiers reduziert, allerdings nicht beseitigt ist.

Wird die klonierte DNA in das Cytoplasma befruchteter Eizellen injiziert, so erhält man lediglich transiente Transfektanten, also keine Keimbahntransmission. Letztere konnte zumindest bisher nicht nachgewiesen werden.

Alternativ zu der Behandlung der Hühnchenfollikel können auch Blastoderme des Legetags transfiziert werden. Diese befruchteten Eier, die aus etwa 60000 Zellen bestehen, werden sofort nach dem Legen eingesammelt und bei 15 °C gelagert. Die Schale wird auf kleiner Fläche geöffnet, ohne daß dabei die Membran beschädigt wird. Mit Hilfe einer Nadel oder einer Glaskapillare werden etwa 1 bis 100 µg der Transgen-DNA in das Blastoderm injiziert. Nach diesem Eingriff wird die Schale wieder verschlossen. Die Eier werden bei 38 °C bis zum Schlüpfen gehalten. Dieser Eingriff beeinflußt die Fähigkeit zu schlüpfen nicht. Sollte man transgene Tiere erhalten, so tragen diese das Transgen in Mosaikform, also nicht in allen Zellen.

In den meisten Modellen, die replikationsdefekte Geflügelretroviren benutzen, wurde der Nachweis eines erfolgreichen Gentransfers dadurch erbracht, daß mit Hilfe von Wirtsgenen die nötigen Verpackungspoteine des Virus produziert werden konnten, da diese Gene auch im rekombinatnten Virus vorhanden sind.

Es können auch Hennen mit transgenen Spermien befruchtet werden. Diese Hennen legen dann transgene Eier. Dabei ist eine relativ hohe Ausbeute von 30% bis 60% erreicht worden [39, 40].

15.7 Transgene Fische

Transgene Techniken sind für die Fischereiwirtschaft von Bedeutung, da sie durch den Einsatz verschiedener Wachstumshormongene zu einer erheblichen Steigerung des Wachstums der kommerziell nutzbaren Fische führen. Dabei stellt es ohne Zweifel eine Gefahr dar, daß solche Tiere in die freie Wildbahn entkommen können. So versucht man Methoden zu entwickeln, um sterile transgene Fische zu produzieren.

Ein weiterer wichtiger Ansatz besteht in der Herstellung kälteresistenter transgener Fische. Dafür wurden die Antifreezegene transfe-

riert und in Regenbogenforellen, Lachsen und anderen Fischen exprimiert [41]. Zum anderen wurden auch verschiedene Fischmodelle – vor allem der Zebrafisch – in der Embryologie als Modell herangezogen. Es gibt mehrere Zebrafischmodelle, die Reportergene wie *lacZ*, Luciferase oder CAT tragen.

Der Zebrafisch gewinnt auch als Modell der humanen Entwicklung an Bedeutung. So wurde zum Beispiel die Regulation des Säugerproteins GAP43, eines der größten Kontrollelemente für das neuronale Wachstum, im Zebrafisch charakterisiert. Andererseits stellte man Vergleiche zu anderen Modellen wie *Drosophila* und anderen an [39].

Zur Herstellung transgener Fische ist eine optimale Haltung dieser Tiere erforderlich. Diese Haltungsbedingungen wurden zunächst für den Zebrafisch [39] entwickelt. Männliche und weibliche Tiere sollten separat gehalten werden. Das optimale Alter zur Gewinnung von Eizellen beträgt 7 bis 18 Monate. Die Tiere sollten zweimal täglich gefüttert und in einem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten werden. Ein bis zwei Stunden vor dem Nachtzyklus sollten die männlichen zu den weiblichen Fischen gegeben werden, in einem Verhältnis von einem Männchen zu zwei Weibchen. Mit dem nachfolgenden Lichtzyklus werden die Fische stimuliert, ihre Eier beziehungsweise Spermien abzugeben. Etwas später können dann die Eier am Boden des Aquariums eingesammelt werden. Das geschieht im allgemeinen durch Ablassen des Wassers. Man kann Fische auch mit hCG superovulieren [42].

Da beim Fisch die Pronuclei befruchteter Eizellen nicht sichtbar gemacht werden können, ist eine klassische Mikroinjektion in den Vorkern nicht möglich. Es wurden mehrere Methoden zur Herstellung transgener Fische beschrieben. Die gängigsten Verfahren sind Mikroinjektion ins Cytoplasma, Elektroporation und ein Gentransfer über die Spermien.

Die Fischeizellen sind von einem Chorion umgeben, das vor der Mikroinjektion enzymatisch oder mechanisch entfernt werden muß [42]. Verschiedene Autoren beschreiben die Mikroinjektion in den Mikropilus. Dafür ist aber eine klare Sichtbarmachung dieses Zellfortsatzes erforderlich.

Die DNA zur Mikroinjektion wird ähnlich wie bei den anderen beschriebenen Objekten vorbereitet. Die Mikroinjektion erfolgt dann vor der ersten Teilung in befruchtete Eizellen. Da zwei bis drei Mikroliter DNA-Lösung mikroinjiziert werden, kann man davon ausgehen, daß bei richtiger Handhabung genügend DNA um die Pronuclei herum vorliegt. Fischembryonen überstehen die Mikroinjektion we-

sentlich besser als die Embryonen von Säugern [43]. Die Jungen schlüpfen nach drei Tagen.

Da die Mikroinjektion von Eizellen ineffektiv ist, wurden Methoden entwickelt, mit denen große Mengen von Eizellen transfiziert werden können. Zunächst bietet sich dabei die Elektroporation an [43]. Die Ausbeute lag bei 62%, und mehr als 100 Kopien der fremden DNA wurden in das Genom der Empfängertiere integriert.

Da Samenzellen in der Lage sind, DNA zu binden und in die Eizellen einzubringen, lassen sich auch so transgene Tiere generieren [44]. Es werden auch Transfektionen von ES-Zell-ähnlichen Zellen beschrieben [39].

15.8 Transgene Insekten

Insekten, insbesondere die Taufliege *Drosophila*, gehören zu den ältesten eukaryotischen Modellen für Regulation und Entwicklung. Unser heutiges Wissen über Regulation und Entwicklung stammt zum großen Teil aus Untersuchungen an *Drosophila*. Insofern ist *Drosophila* eines der wichtigsten Objekte der Molekularbiologie, und man versuchte schon früh, transgene Tiere zu entwickeln. Eine gängige Methode zur Herstellung transgener Fliegen ist die von Spradling und Rubin [45] beschriebene P-Element-Transformation.

Für den Gentransfer macht man sich dabei besondere Vektoren zunutze, die sogenannten transponierbaren Elemente. Das sind DNA-Segmente, die ihre Position als Einheit innerhalb eines Genoms einer Zelle verändern können. In Bakterien können diese Elemente extrachromosomale DNA, wie beispielsweise Plasmide in das bakterielle Genom einbringen. Die Idee war, in solche transponierbaren Elemente exogene DNA zu klonieren und sie dann mit großer Effizienz in das Wirtsgenom einzubringen. Für die Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden mehrere transponierbare Elemente beschrieben [46], von denen sich eines, das sogenannte P-Element [45], als möglicher Vektor für einen Gentransfer eignet, wenn gewisse genetische Kriterien erfüllt sind; dieses Element kann in embryonale Zellen eingebracht werden.

Da nur ein Teil der Nachkommen dieses Embryos dann das P-Element tragen wird, ist es erforderlich, die einzelnen Nachkommen zu testen. Da dies sehr schnell sehr viele Tiere sein können, empfiehlt es

sich, die P-Element-tragenden Tiere möglichst durch einen Phänotyp, zum Beispiel die Form der Flügel oder die Augenfarbe zu unterscheiden.

Zweifellos stellt *Drosophila* das wichtigste Insektenmodell für transgene Tiere dar. Es wurden aber auch mit anderen Insekten transgene Experimente gemacht, beispielsweise mit *Anopheles* [47] und *Aedes* [48, 49].

15.9 Transgene Nematoden

Ein weiteres wichtiges Modellobjekt für die Embryologie, besonders für die Muskelentwicklung von Vertebraten, ist der Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*).

C. elegans dient als Modell für viele experimentelle Ansätze, zum Beispiel für die Muskelregulation [50], ein Modell für Apoptose [51], Genstruktur [52] und Regulation [53], um nur einige zu nennen.

Bei Nematoden wird die Plasmid-DNA in die Gonaden erwachsener Hermaphroditen injiziert [54]. Bis zu 50 Nachkommen können von einem infizierten Tier erhalten werden. Man läßt die transformierten Tiere sich selbst befruchten und untersucht anschließend den Phänotyp der Nachkommen. Man erhält dann transiente Tiere, die im allgemeinen keinen mutierten Phänotyp zeigen, oder Tiere, die das Transgen extrachromosomal tragen, sowie sehr wenige transformierte Linien, die das Transgen integriert haben.

15.10 Transgene Frösche

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein beliebtes Objekt, um die Entwicklung von Vertebraten zu untersuchen, da er leicht manipuliert werden kann. Sehr viele Studien beruhten darauf, daß in befruchtete Eizellen DNA oder RNA transient injiziert wurde, die dann sofort translatiert und anschließend häufig abgebaut wird.

Die Transgenese wird erreicht, indem man in befruchtete Eizellen Plasmid-DNA mikroinjiziert, sich diese Embryonen zu erwachsenen

Tieren entwickeln läßt und auf die Transgenität hin untersucht. Wegen der langen Generationszeit von *Xenopus* (mindestens 8 Monate) ist dieses Unterfangen sehr zeitraubend, da man nur Tiere erhält, die das Transgen als Mosaik tragen.

Als Alternative hierzu transfizierten Kroll und Gerhard [55] kultivierte *Xenopus*-Zellen mit einem Transgen, wählten die Zelllinien, die das Transgen stabil integriert haben, und verwendeten diese Zellen als Kerndonoren, die dann in unbefruchtete Eizellen transplantiert wurden. So kann man Embryonen erhalten, die das Transgen stabil tragen.

Literatur

- [1] Greenwald, R.A.; Diamond, H.S. (eds.), (1988) *Handbook of Animal Models for the Rheumatic Diseases*, 1 CRC-Press, Boca Raton, FL
- [2] Taurog, J.D.; Lowen, L.; Forman, J.; Hammer, R.E. (1988) *J. Immunol.*, **141**, 4020
- [3] Hammer, R.E.; Malka, S.D.; Richardson, J.A.; Tang, J.-P.; Taurog, J.D. (1990) *Cell*, **63**, 1099
- [4] Robl, J.M.; Heideman, J.K. (1994) in *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook* (Pinkert, C.A. ed.), Academic Press Inc., San Diego, CA
- [5] Hammer, R.E.; Pursel, V.G.; Rexroad, C.E. Jr.; Wall, R.J.; Bolt, D.J.; Ebert, K.M.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. (1985) *Nature*, **315**, 680
- [6] Brem, G.; Brenig, B.; Goodman, H.M.; Selden, R.C.; Graf, F.; Kruff, B.; Springman, K.; Hondele, J.; Meyer, J.; Winnacker, E.L.; Krausslich, H. (1985) *Zuchthygiene*, 20, 251
- [7] Gazaryan, K.G.; Andreeva, L.E.; Serova, I.A.; Tarantul, V.Z.; Kuznetsova, E.D.; Khaidarova, N.V.; Gening, L.V.; Kuznetsov, Yu.M.; Gazaryan, T.G. (1988) *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.*, **10**, 23
- [8] Enikolopov, G.N.; Zakharchenko, V.I.; Grashchuk, M.A.; Suraeva; N.N.; Georgiev, G.P.; Tinyaeva; E.A.; Rubtsov, P.M.; Skryabin, K.G.; Baev, A.A.; Ernst, L.K. (1988) *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **299**, 1246

- [9] Perevozchikov, A.P.; Vaisman, B.L.; Dozortsev, D.I.; Sorokin, A.V.; Denisenko, A.D.; Dyban, A.P.; Klimov, A.N. (1990) *Biopolim. Kletka*, **6**, 17
- [10] Hagen, K.W. (1974) in *The Biology of the Laboratory Rabbit* (Weisbroth, S.H.; Flatt, R.E.; Kraus, A.L. eds.), Academic Press, New York, NY
- [11] Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Hammer, R.E.; Trumbauer, M.E.; Rosenfeld, M.G.; Birnberg, N.C.; Evans, R.M. (1982) *Nature*, **300**, 611
- [12] Pursel, V.G.; Pinkert, C.A.; Miller, K.F.; Bolt, D.J.; Campbell, R.G.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Hammer, R.E. (1989) *Science*, **244**, 1281
- [13] Pinkert, C.A.; Manz, J.; Linton, P.J.; Klinman, N.R.; Storb, U. (1989) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **23**, 321
- [14] Lo, D.; Pursel, V.; Linton, P.J.; Sandgren, E.; Behringer, R.; Rexroad, E.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. (1991) *Eur. J. Immunol.*, **21**, 1001
- [15] Weidle, U.H.; Lenz, H.; Brem, G. (1991) *Gene*, **98**, 185
- [16] Clark, A.J.; Simons, P.; Wilmut, I.; Lathe, R. (1987) *Trends Biotechnol.*, **5**, 20
- [17] Swanson, M.E.; Martin, M.J.; O'Donnel, J.K.; Hoover, K.; Lago, W.; Huntress, V.; Parsons, C.T.; Pinkert, C.A.; Pilder, S.; Logan, J.S. (1992) *Bio/Technol.*, **10**, 557
- [18] Van Brunt, J. (1988) *Bio/Technol.*, **10**, 557
- [19] Vize, P.D.; Michalska, A.E.; Ashman, R.; Lloyd, B.; Stone, B.A.; Quinn, P.; Wells, J.R.E.; Seamark, R.F. (1988) *J. Cell Sci.*, **90**, 295
- [20] Wall, R.J.; Pursel, V.G.; Shamay, A.; McKnight, R.A.; Pettius, C.W.; Henninghausen, L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1696
- [21] Wall, R.J.; Pursel, V.G.; Hammer, R.E.; Brinster, R.L. (1985) *Biol. Reprod.*, **32**, 645
- [22] Pinkert, C.A.; Kooyman, D.L.; Baumgartner, A.; Keisler, D.H. (1989) *J. Reprod. Fertil.*, **87**, 63
- [23] French, A.J.; Zviedrans, P.; Ashman, R.J.; Heap, P.A.; Seamark, R.F. (1991) *Theriogenol.*, **35**, 202
- [24] Brem, G.; Springmann, K.; Meier, E.; Krausslich, H.; Brenig, B.; Muller, M.; Winnacker, E.-L. (1989) in *Transgenic Models in Medicine and Agriculture* (Church, R.B. ed.), Wiley-Liss, New York, NY
- [25] Boender, J. (1966) *World Rev. Anim. Prod.*, **2**, 29

- [26] Diehl, J.R.; Day, B.N.; Stevermer, E.J.; Pursel, V.; Holden, K. (1979) *Artificial insemination in swine. Iowa State Univ. Pork Ind. Handb.* **64**
- [27] Martin, M.J.; Merriman, C.; Freeman, B.; Merriman, J.; Kearns, J. (1992) *J. Anim. Sci.*, **70**, 266
- [28] Martin, M.J.; Pinkert, C.A. (1994) in *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook* (Pinkert, C.A. ed.), Academic Press Inc., San Diego, CA
- [29] Rexroad, C.E. Jr.; Pursel, V.G.; Hammer, R.E.; Bolt, D.J.; Miller, K.F.; Mayo, K.E.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. (1988) in *Biomechanisms Regulating Growth and Development* (Steffens, G.L.; Rumsey, T.S. eds.), Kluwer, Dodrecht, The Netherlands
- [30] Rexroad, C.E. Jr.; Hawk, H.W. (1994) in *Transgenic Animal Technology, A Laboratory Handbook* (Pinkert, C.A. ed.), Academic Press Inc., San Diego, CA [31]. Rexroad, C.E. Jr. (1992) *Anim. Biotechnol.*, **3**, 1
- [32] Rexroad, C.E. Jr.; Powell, A.M. (1991) *J. Anim. Sci.*, **69**, 2066
- [33] Archibald, A.L.; McClenaghan, M.; Hornsey, V.; Simons, J.P.; Clark, A.J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5178
- [34] Ebert, K.M.; Selgrath, J.P.; DiTullio, P.; Denman, J.; Smith, T.E.; Memon, M.A.; Schindler, J.E.; Monastersky, G.M.; Vitale, J.A.; Gordon, K. (1991) *Bio/Technol.*, **9**, 835
- [35] De Boer, H.A. (1993) *Mitteilungen der Fa. Gene Pharming Europe B.V.* Leiden, The Netherlands
- [36] Strijker, R.; Platenburg, G.; Nuyens, J.; Pieper, F.; Krimpenfort, P.; Eyestone, W.; Rademakers, A.; Kootwijk, E.; Kooiman, P.; van Veen, H.; de Boer, H. (1992) *ACS Conference Proceedings*, The American Chemical Society
- [37] Krimpenfort, P.; Rademakers, A.; Eyestone, W. van der Schans, A.; Van den Broek, S.; Kooiman, P.; Kootwijk, E.; Plantenburg, G.; Pieper, F.; Strijker, R.; de Boer, H. (1991) *Bio/Technol.*, **9**, 844
- [38] Hill, K.G.; Curry, J.; DeMayo, F.J.; Jones-Diller, K.; Slapak, J.R.; Bandioli, K.R. (1992) *Theriogenol.*, **37**, 222
- [39] Cioffi, L.C.; Kopchik, J.J.; Chen, H.Y. (1994) in *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook* (Pinkert, C.A. ed.), Academic Press Inc., San Diego, CA
- [40] Perry, M.M.; Sang, H.M. (1993) *Transgen. Res.*, **2**, 125
- [41] Huang, R.C.C.; Price, J.L.; Gourlie, B. (1990) in *Transgenic Models in Medicine and Agriculture: UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology* (Church, R.B. ed.), Wiley-Liss, New York, NY

- [42] Zhu, Z.; Xu, K.; Li, G.; Xie, Y.; He, L. (1986) *Kexue Tongbao Acad. Sin. (Engl. Transl.)*, **31**, 988
- [43] Chen, T.T.; Powers, D.A. (1990) *Tib. Tech.*, **8**, 209
- [44] Cloud, J.G. (1990) *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **41**, 107
- [45] Spradling, A.C.; Rubin, G.M. (1982) *Science*, **218**, 341
- [46] Rubin, G.M.; Spradling, A.C. (1982) *Science*, **218**, 348
- [47] Salazar, C.E.; Hamm, D.M.; Wesson, D.M.; Beard, C.B.; Kumar, V.; Collins, F.H. (1994) *Insect Mol. Biol.*, **3**, 1
- [48] Hernandez, V.P.; Geranday, A.; Fallon, A.M. (1994) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 440
- [49] Shotkoski, F.A.; Fallon, A.M. (1994) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**, 433
- [50] Okkema, P.G.; Fire, A. (1994) *Development*, **120**, 2175
- [51] Hengartner, M.O.; Horvitz, H.R. (1994) *Cell*, **76**, 665
- [52] MacMorris, M.; Spieth, J.; Madej, C.; Lea, K.; Blumenthal, T. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 484
- [53] Land, M.; Islas-Trejo, A.; Freedman, J.H.; Rubin, C.S. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 9234
- [54] Mello, C.C.; Kramer, J.M.; Stinchcomb, D.; Ambros, V. (1991) *EMBO J.*, **10**, 3959
- [55] Kroll, K.L.; Gerhart, J.C. (1994) *Science*, **266**, 650