

*Hübsenberger
Gespräche
2000*

18. Hülsenberger Gespräche 2000
der H. Wilhelm Schaumann Stiftung

*Krüsenberger
Gespräche
2000*

»BIOTECHNOLOGIE IN DEN NUTZTIERWISSENSCHAFTEN«

Inhaltsverzeichnis

Begrüßung	J. JENSEN	7
Grußansprache des Landwirtschaftsministers	V. SKLENAR	9
Über die drei Herausforderungen moderner Biotechnologie	E.-L. WINNACKER	12
I. Analyse von Nutztier-Genomen und -Genen sowie gendiagnostische Verfahren		
Analyse und Kartierung von Nutztiergenomen	B. BREINIG	22
Struktur und Funktion von Kandidatengenomen beim Nutztier	M. SCHWERIN	28
DNA-Variationen – Polymorphismus – Genetische Variation	R. FRIES	35
Somatischer Gentransfer	H. GELDERMANN	44
Diskussion	G. BREM	52
II. Reproduktionsbiologische Verfahren		
Biotechnologie der Reproduktion an der Schwelle des neuen Jahrtausends	H. NIEMANN	54
In vitro Produktion von Embryonen	K. SCHELLANDER	67
Keimbahn-Gentransfer	U. BESENFELDER	76
Klonierung	G. BREM	86
Embryo-Sexen und Spermatrennung	E. WOLF	98
Diskussion	H. KARG	105

III. Anwendungen biotechnologischer Verfahren

Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern	G. ERHARDT	110
Möglichkeiten und Grenzen der Marker-gestützten Selektion	E. KALM	119
Optimierung der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen durch gezielte Genomveränderungen	H. KRÄUßLICH	127
Verbesserung der Tiergesundheit und neue Nutzungsmöglichkeiten von Tieren durch Gentransfer	M. MÜLLER	136
Konstruktion und Einsatzmöglichkeiten von rekombinanten Impfstoffen und der Gentherapie in der Tiermedizin	T. SCHLAPP	145
Wirkungsweise mikrobieller Enzyme als Futterzusatzstoffe	O. SIMON	148
Diskussion	E. PFEFFER	158

IV. Konsequenzen (mögliche Folgen) der Anwendung im Nutztierbereich

Mögliche Auswirkungen der Biotechnologie in Naturwissenschaften auf die weltweite Tierproduktion und die menschliche Ernährung	S. JUTZI	170
Konsequenzen der DNA-Aufnahme im Tier	W. DOERFLER	178
Zur Frage der ethischen Bewertung der Anwendung von Biotechnologien bei Nutztieren	J. P. BECKMANN	188
Rechtliche Fragen und EU-Harmonisierung der Anwendung biotechnologischer Verfahren bei Tieren	H.-L. SCHREIBER	193
Diskussion	H. STEINHART	199
Zusammenfassung	D. SMIDT	207
Schlußwort	H. O. GRAVERT	214
Teilnehmer der HÜLSENBERGER GESPRÄCHE 2000		215

Begrüßung zu den »18. Hülsenberger Gesprächen 2000«



Sehr geehrter Herr Minister Dr. Sklenar, sehr geehrter Herr Prof. Winnacker, meine sehr geehrten Damen und Herren,

»**Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften**« lautet das Thema der diesjährigen Hülsenberger Gespräche, ein Thema, das an Aktualität kaum übertroffen werden kann, das aber auch Emotionen hervorruft, die auf der einen Seite auf sachliche Argumente, aber auf der anderen Seite auf politisch, populistische Zielsetzung zurückgehen, also ein Thema, das es lohnt, diskutiert zu werden.

Meine sehr geehrten Damen und Herren,

ich begrüße Sie im Namen der H. Wilhelm Schaumann Stiftung zur Förderung der Agrarwissenschaften ganz herzlich hier in Weimar zu den 18. Hülsenberger Gesprächen. Wir, die Veranstalter, freuen uns, dass nahezu alle Eingeladenen zugesagt haben, an diesen Gesprächen teilzunehmen und nun hier sind, ist das doch ein Beweis dafür, dass wir offensichtlich mit dem Thema dieser Tagung und dem Tagungsort die richtige Wahl getroffen haben.

Der Gründer der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Herr H. Wilhelm Schaumann, hatte bei der Gründung der Stiftung vor über 30 Jahren unter anderem das Ziel, dass in einer Zeit der immer weiter fortschreitenden Spezialisierung in den einzelnen Bereichen alle an einem Thema interessierten Fachleute an einen Tisch zu bringen sind, um

- spezielle Erfahrungen
- neue Erkenntnisse
- unterschiedliche Meinungen

von Fachleuten aus verschiedenen Disziplinen diskutieren zu lassen.

Gerade die Biotechnologie, die vom Ursprung her nicht eine »Landwirtschaftliche Disziplin« ist, heute aber großen Einfluß auf die Landwirtschaft und speziell die Nutztierwissenschaften hat, ist ein Thema, das eine solche Behandlung in einem disziplinübergreifenden Gremien einfach erfordert. Die Landwirtschaft kann und will auf die Möglichkeiten der Biotechnologie nicht verzichten. Ihr Einsatz muß aber durch Diskussion überprüft, womöglich begrenzt, grundsätzlich aber ermöglicht und gefördert werden.

In diesem Sinne führen wir damit heute den Auftrag des Stifters weiter!

An dieser Stelle ist es mir ein besonderes Anliegen, den heutigen Stiftern, nämlich der Familie Seiller, zu danken, dass sie auch in diesem Sinne das Erbe von Herrn Schaumann angetreten haben und weiterführen. Auf diese Art wird die Fortsetzung der Aktivitäten der Stiftung erst ermöglicht, und zwar sowohl durch persönliches wie auch vor allen Dingen finanzielles Engagement.

Deshalb begrüße ich ganz herzlich die Herren Marcel und Olivier Seiller.

Wir freuen uns, dass wir für alle Teilthemen hervorragende Referenten gefunden haben, die bereit sind, ihre eigenen Erfahrungen und Meinungen vorzutragen und zur Diskussion zu stellen. Dafür danke ich den Referenten bereits an dieser Stelle.

Die auf das Thema hinführenden Worte und Gedanken hat Herr Prof. Dr. Winnacker übernommen. Herr Prof. Winnacker ist Präsident der Deutschen Forschungsgemeinschaft und daher prädestiniert, den Einführungsvortrag zu übernehmen. Herr Professor haben Sie recht herzlichen Dank.

Bevor wir aber zu den einzelnen Referaten kommen, begrüße ich ganz herzlich Herrn Minister Dr. Sklenar, Landwirtschaftsminister des Landes Thüringen, der es als Vertreter der Landesregierung übernommen hat, uns im Namen des Landes Thüringen zu begrüßen. Herr Minister Dr. Sklenar, für uns ist Ihre Anwesenheit ein Beweis, dass man

diese Veranstaltung hier zur Kenntnis nimmt und ihr auch eine entsprechende Bedeutung zumißt.

Bevor wir nun mit unserer Tagung beginnen, möchte ich noch ganz ausdrücklich die anderen, die normalen Teilnehmer dieser Veranstaltung begrüßen. Sie, meine Damen und Herren sind das Salz in der Veranstaltung. Sie sollen durch ihre Aktivität in der Diskussion zum Gelingen der Veranstaltung beitragen. Ohne Sie findet das interdisziplinäre Gespräch nicht statt, d. h. der Erfolg der Veranstaltung hängt im großen Maße von Ihrer Aktivität ab.

Deshalb sagen Sie Ihre Meinung und streiten Sie mit den Kollegen!

In diesem Sinne wünschen wir allen Teilnehmern einen guten Verlauf dieser Veranstaltung und erklären die 18. Hülseberger Gespräche für eröffnet.

Ich darf nun Herrn Minister Dr. Sklenar auf das Podium bitten.

Grußansprache des Thüringer Ministers für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt, Herrn Dr. Volker Sklenar



Erstmals finden in diesem Jahr die »**Hülensberger Gespräche**« außerhalb von Schleswig-Holstein statt und ich freue mich ganz besonders, dass für diese 18. Fachtagung ihre Wahl auf Thüringen gefallen ist und namhafte Wissenschaftler aus dem In- und Ausland sich hier in Weimar mit dem hochinteressanten Thema der »**Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften**« auseinander setzen werden.

Erst Mitte März hat die Ernährungs- und Landwirtschafts-organisation der Vereinten Nationen (FAO) auf einer Tagung in Chiba, Japan, erstmals zur Biotechnologie Stellung bezogen und festgestellt, dass sie bedeutend für die Ernährung einer wachsenden Weltbevölkerung ist und bei der umweltgerechten Entwicklung der Land-, Forst- und Fischereiwirtschaft eine entscheidende Rolle spielen wird.

Auch der so genannte »**Delphi-Report**« – die größte Expertenbefragung zur Zukunft von Wissenschaft und Technik in Deutschland- geht davon aus, dass Innovationen der Bio- und Gentechnologie die künftige Entwicklung von Landwirtschaft und Ernährung stark prägen werden.

Andere Umfragen umreißen dieses Spannungsfeld, in dem sich die Gentechnik bewegt. Belegt wird dies zum Beispiel durch eine **Umfrage des Food Marketing Institutes** (Hoban 1997), die ergab, dass:

- in Deutschland und Österreich zwar fast 90 % der Konsumenten mehr oder weniger über Gentechnik informiert sind und damit weltweit eine

Spitzenstellung einnehmen, jedoch nur unter 30 % willens sind, gentechnisch veränderte Produkte zu kaufen,

- fast 60 % der Deutschen glauben, dass die Gentechnik eine ernst zu nehmende Gefahr ist,
- ganz anders sehen dagegen die Verhältnisse in den USA aus – hier ergab die Umfrage, dass nur knapp 70 % entsprechend informiert sind, jedoch über 70 % diese Produkte erwerben würden.

Diese unbefriedigende Akzeptanz – auch gerade in Deutschland hat sicher vielfältige Ursachen.

Tatsache ist, durch Entwicklungen in der Bio- und Gentechnik werden bei vielen unserer Zeitgenossen Ängste ausgelöst. Diese Ängste gehen m.E. meist mit einer erstaunlichen Unkenntnis über die zugrunde liegenden naturwissenschaftlichen Zusammenhänge einher. Oder anders ausgedrückt, könnte man auch sagen, dass viele Diskussionen von zu wenig Sachkenntnis geprägt sind.

Neben diesen ungewissen Ängsten vor einer Fremdbestimmung sehe ich weitere Gründe, die alle ihren Teil dazu beisteuern, wie z. B. ein Gefühl der »Überrumpelung« durch US-Konzerne bis hin zu regelrechten falschen Informationen über die neuen Technologien durch die Medien.

Aber – interessant ist auch, dass die öffentliche Meinung sehr deutlich differenziert. Werden einerseits Themenfelder der »Grünen Gentechnik« sehr kritisch betrachtet, finden dagegen einzelne

Bereiche der so genannten »Roten Gentechnik« breite Zustimmung. Hier scheint zu gelten, solange die Forschung medizinische Hintergründe aufweist und in der Öffentlichkeit damit Hoffnungen im Bereich der Heilung von Krankheiten usw. verbunden werden, wird die Entwicklung zumeist wohlwollend betrachtet.

Ich meine, dies zeigt, dass insbesondere auch das Nicht-Erkennen persönlicher Vorteile bei der derzeitigen ausreichenden Nahrungsmittelversorgung und eine ungenügende Vermittlung der strategischen Bedeutung, z. B. für den Ressourcenschutz in den anderen Bereichen der Roten und Grünen Gentechnik, Ursachen für die insgesamt doch breite Ablehnung der Bio- und Gentechnologie darstellen.

Die Thematik gentechnisch veränderter Organismen/Einsatz der Biotechnologie ist außerordentlich vielschichtig und beschäftigt neben der Wissenschaft insbesondere auch die breite Öffentlichkeit, die Parlamente und die verschiedensten Institutionen bis hin zur Wirtschaft.

Insbesondere im deutschsprachigen Raum stehen die Verbraucher dieser Entwicklung skeptisch gegenüber. Diese Skepsis zeigt uns, dass allein die Tatsache, dass Genmanipulation ein in der Natur zu beobachtender Vorgang ist, noch kein brauchbares Argument zur generellen Rechtfertigung der Anwendung dieser Technik darstellt.

Allen Beteiligten sollte daher klar sein, in allen Bereichen der Anwendung bedürfen die Ziele einer gründlichen Reflexion und Begründung. Unser Wissen um mögliche Folgen bei Eingriffen in hochkomplexe Zusammenhänge ist jedoch beschränkt und angesichts der Komplexität des Themenfeldes moderner Bio- und Gentechnologie ist es auch bei bester Absicht bisher nicht gelungen, befriedigende Leitlinien zu formulieren, die für alle an der Diskussion Beteiligten akzeptabel sind.

Es stellt sich daher die Frage: **Ob man die Anwendung von Gentechnik oder auch das Klonen so lange verbieten sollte, bis die Konsequenzen klarer sind?**

Ich glaube nicht – weil, diese Forderung wäre auch irgendwo illusionär. Ich sage dies, denn all unser Handeln, auch das Unterlassen von Handlungen ist risikobehaftet. Wir werden die Folgen unseres Tuns immer nur begrenzt abschätzen können und wenn wir erst handeln wollten, wenn wir alles wüssten, wären wir wohl zum Nichtstun verdammt. Im Übrigen wir müssten uns dann auch fragen:

Können wir es verantworten, vorhandene technische Möglichkeiten, wie z. B. bei der Herstellung von Medikamenten oder im Bereich des Umweltschutzes, deshalb nicht anzuwenden?

Ich will diese Frage so im Raum stehen lassen.

Trotz der auch in der Thüringer Bevölkerung vorhandenen Skepsis gegenüber den Entwicklungen auf den Gebieten von **Bio- und Gentechnik** – sind wir als Freistaat Thüringen sicher, dass dies **Schlüsseltechnologien der Zukunft** sein werden. Beide werden durch Optimierung von Landwirtschaft, Gesundheitsvorsorge und Umweltschutz einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Lebensumstände weltweit leisten.

Mehr denn je sind wir gefordert, in den wichtigen Fragen, die uns berühren, uns auch international – wie auch diese Tagung einmal mehr beweist – damit auseinander zu setzen.

Dementsprechend gilt in Thüringen unsere Unterstützung allen Aktivitäten in Forschung, Wirtschaft und Gesellschaft, die uns in dieser Entwicklung voranbringen können.

Inzwischen hat Thüringen auf diesem Gebiet auch einiges aufzuweisen. Insbesondere dem **Standort Jena** kommt dabei eine Schlüsselrolle zu:

- Angefangen mit der **Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft** – die 1999 mit dem Aufbau eines Labors zum Nachweis gentechnisch veränderter landwirtschaftlicher Primärprodukte sowie zur Anwendung der Gendiagnostik bei gentechnisch unveränderten landwirtschaftlichen Produkten und Produktionsmitteln begonnen hat oder

- auch die dortige **Einrichtung des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)**, mit Ihrer Mitarbeit bei der Erstellung von analytischen Nachweismethoden für gentechnisch veränderte Organismen in Deutschland bis hin
- zur **Friedrich-Schiller-Universität Jena** mit ihrem Institut für Ernährung und Umwelt, welches insbesondere aktiv bei Lehre und Forschung ist, um aufgeworfene Fragen wie: Wie wirken sich die Gene aus den gentechnisch veränderten Pflanzen in der Nahrungsmittelkette bis hin zum Menschen aus? Welche Einflüsse haben sie auf die Umwelt insgesamt?
zu klären. Fragen, die auch gerade im Hinblick auf die Folgenabschätzung und damit für die Akzeptanz der neuen Technologien von größter Bedeutung sind.
- Erwähnen will ich an dieser Stelle auch, dass Thüringen mit zu den ersten Bundesländern gehörte, die das **Freisetzen von gentechnisch veränderten Pflanzen** genehmigte, sei es für frühen Mais in der Altenburger Region oder Raps und Zuckerrübe auf den Versuchsflächen von Friemar.
- Und nicht zuletzt zeigt sich die positive Entwicklung in Thüringen auch dadurch, dass wir mit Jena als einziges der neuen Bundesländer einen Standort aufweisen, der im 1998 vom Bund ausgeschriebenem **Wettbewerb »Bio-Regio«** den 4. Platz oder anders ausgedrückt – ein Sondervotum – erzielen konnte.

Ich denke, all diese Beispiele, die keinesfalls vollständig sein können, belegen, dass wir als Freistaat durchaus großes Interesse an einer Weiterentwicklung von Biotechnologie wie auch der Gentechnik haben.

Grundsätzlich, das möchte ich an dieser Stelle aber noch einmal betonen, muss hinter all diesen Aktivitäten ein verantwortungsvoller Umgang mit den neuen Technologien stehen und vor allem auch dem Schutz der Verbraucher Rechnung getragen werden. Diese sollten z. B. selbst entscheiden

können, ob sie gentechnisch veränderte Produkte kaufen wollen oder nicht. Hierbei und auch bei der notwendigen Verbesserung der Akzeptanz gegenüber der Biotechnologie sind neben Ihnen als Wissenschaftler, die Gesellschaft an sich, die Medien als Instrument, dass die öffentliche Meinung maßgeblich beeinflusst, und besonders auch der Gesetzgeber gefragt.

Ich denke auch dieses Forum wird dazu beitragen, entsprechende Impulse für unsere zukünftige Arbeit zu geben.

Was die Zukunft der Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften betrifft, möchte ich Sie abschließend auf eine Äußerung von Nossal und Coppel von 1992 hinweisen, die da feststellten, dass:

»So groß die Herausforderungen und so bedeutend die wirtschaftlichen Perspektiven (der Gentechnik) im medizinisch/pharmazeutischen Bereich auch sein mögen – nach Ansicht vieler Forscher könnten sie mit der Zeit von den Anwendungsmöglichkeiten gentechnisch veränderter Organismen auf allen Ebenen von Landwirtschaft und Nahrungsmittelindustrie noch in den Schatten gestellt werden«.

In diesem Sinne wünsche ich mir, dass von den **18. Hülseberger Gesprächen** hier in Thüringen viele, vielleicht sogar wegweisende Impulse ausgehen mögen und Sie, für Ihre weitere Arbeit, neue Inspirationen mit nach Hause nehmen können.

Ich hoffe, dass Ihnen am Rande dieser Veranstaltung auch Zeit verbleibt, um sich im schönen Thüringen, dem Grünen Herzen Deutschlands, mit seinen vielfältigen landschaftlichen Reizen und sehenswerten historischen Plätzen, ein wenig umzusehen. Und natürlich sollten Sie das insbesondere hier in Weimar, der Kulturhauptstadt Europas von 1999 tun. Ich kann Ihnen versichern, dass sie auch im Jahre 2000 viel Sehenswertes zu bieten hat.

Ich wünsche Ihnen einen angenehmen und schöpferischen Aufenthalt in Thüringen und natürlich verbinde ich damit auch ein wenig die Hoffnung, dass dies vielleicht nicht die letzten »Hülseberger Gespräche« bei uns sein werden.

Die drei Herausforderungen der Biotechnologie

Der Autor ist Professor für Biochemie an der Ludwig-Maximilians Universität München und derzeit auch Präsident der Deutschen Forschungsgemeinschaft.



Etwa jeder zehnte Brief, der mich am Genzentrum München erreichen, trägt als Adresse nicht Gen-, sondern Gnomzentrum. In der Tat wecken die Wortähnlichkeiten zwischen den Begriffen Gene, Genome oder Gnome Assoziation, die den schaurig-schönen Vorstellungen des Publikums über das, was Gentechniker tun, durchaus entsprechen mögen. Hier die tarnkappentragenden Fabelwesen, die in den Tiefen des Rheins den verborgenen Schatz der Nibelungen bewachen, dort die modernen Hexenmeister des Erbmaterials, die in den Tiefen lebender Zellen nach den Genen suchen, ihnen den Inhalt ihrer geheimen Schrift entlocken und zubarer Münze zu machen versuchen. Das Heben der Rheinwie das der Genschätze führt zu Kontroversen, die im einen Fall Stoff für große Opern abgeben, im anderen Fall die öffentliche Meinung aber auch die Wissenschaft selbst nicht unerheblich herausfordern. Drei der Herausforderungen moderner Biotechnologie möchte ich in diesem Vortrag ansprechen, die genomische, die ökonomische und die moralische.

Beginnen wir mit der genomischen Herausforderung. Das Genom ist das Erbgut eines jeden Organismus. Es besteht im wesentlichen aus Abschnitten, die Information für die Bildung eines Eiweißbestandteils tragen. Eiweißbestandteile sind das Keratin der Fingernägel, das Hormon Insulin, das den Blutzuckerspiegel reguliert genauso wie der Farbstoff im Blut, das Hämoglobin, das den Sauerstoff transportiert. Für jedes dieser Tausende und

Abertausende von Eiweißbestandteilen gibt es ein Gen. Die Suche nach den Genen ist Ausdruck eines wissenschaftstheoretischen Ansatzes, des Reduktionismus, der sich in der Entwicklung der Naturwissenschaften als äußerst erfolgreich erwiesen hat. In diesem Sinne folgten den schon von den Griechen postulierten Atomen der Physik, aus denen alle Materie aufgebaut ist, die Atome der Chemie, die chemischen Elemente und später, im beginnenden 20. Jahrhundert, die Atome der Biologie, die Gene. Der Begriff des Gens wurde zu Anfang des vergangenen Jahrhunderts vom dänischen Botaniker Johannsen geprägt. Sein Interesse an diesem Thema beruhte jedoch auf Vorarbeiten, die auf Mendel und Darwin zurückreichen, im Grunde aber auf weitaus ältere Erfahrungen in der Tier- und Pflanzenwelt gründen. Schon Herder sprach von der »genetischen Kraft als der Mutter aller Bildungen auf der Erde«, während Mendel zur Erklärung der von ihm entdeckten Gesetzmäßigkeiten bei der Erzeugung von Pflanzenhybriden von »Faktoren« oder »Elementen« sprach, die auf ihm noch unbekanntem Wege von den Eltern auf ihre Nachkommen übertragen werden. Mit Mendel wird das Bemühen um eine Antwort auf die zentrale Frage der Genetik, nämlich die nach dem Verhältnis zwischen Genen und dem äußeren Aussehen eines Organismus, zwischen Genotyp und Phänotyp, zu einer Wissenschaft.

Auch der Mensch selbst ist immer wieder in diese Betrachtungen einbezogen worden. Der alte Traum von der biologischen Machbarkeit des Menschen

gründet sich auf der Annahme, der Mensch müsse züchterisch letztlich genauso in den Griff zu bekommen sein, wie Nutztiere und Nutzpflanzen. Daß es so einfach nicht sein kann, hatte schon der preußische Soldatenkönig erfahren müssen, als es ihm nicht gelang, seine »langen Kerls« durch Züchtung zwischen Partnern großer Statur zu erhalten, und er sie statt dessen für teures Geld in Dänemark kaufen mußte, was diesem Geizkragen durchaus nicht in den Kram paßte. Francis Galton, Darwins ebenso brillanter wie schillernder Vetter, hat dem Konzept der Menschenzüchtung mit dem Begriff der Eugenik dann einen Namen gegeben. Im Namen der Eugenik ist in der Folge viel Unheil angerichtet worden. Man denke nur an die strengen Einwanderungsgesetze der USA in den 20iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts, die eine Blutvermischung zwischen gutem nordischen und schlechtem südosteuropäischen Blut zu verhindern suchten, oder an die verbrecherischen Rassengesetze der Nationalsozialisten, mit der die Ermordung von Millionen von Menschen zu rechtfertigen versucht wurde. Begründet wurden diese Exzesse mit vielfältigen Beobachtungen aus den Jahrzehnten nach Mendel, wonach auch menschliche Merkmale durchaus den Mendel'schen Regeln folgen können. So hatten beispielsweise der Zürcher Kinderarzt Johann Friedrich Horner sowie der englische Arzt Archibald Garrod entsprechende Gesetzmäßigkeiten bei der Vererbung der Rot-Grün-Blindheit bzw. einer Reihe von Stoffwechselstörungen beobachtet. Seit Garrod spricht die anglo-amerikanische Literatur von »Mendelian diseases«. Gerade die Garrod'schen Schlußfolgerungen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Genen und Krankheiten wurden in der Folge auch zur Triebfeder der Genomforschung.

Die Anfänge der Genomforschung gehen auf das Jahr 1986 zurück. Damals war die Suche nach Genen, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind, letztlich zum Stillstand gekommen. Man hatte solche Gene zwar in Viren gefunden, merkte aber sehr schnell, daß die von viralen Genomen instruierten Onkogene letztlich aus dem Erbgut ihrer

Wirtszellen stammten, so daß im Grunde in dieser Frage nur weiter zu kommen war, wenn man das Erbgut insgesamt anschaute. Der bekannte Krebsforscher und Nobelpreisträger Renato Dulbecco schlug daher vor, zunächst einmal alle Gene des Menschen zu identifizieren, also das gesamte menschliche Genom. Darin würden sich dann unter den vielen anderen Genen die Krebsgene schon finden lassen. »Und da es sich um den menschlichen Krebs handelt«, so schrieb er damals, »muß es das menschliche Genom sein«. Heute, 14 Jahre später, steht diese »Mondlandung der Biologie« kurz vor dem Abschluß. Auf dem Wege zu dieser Landung waren einige Meilensteinen zu passieren, die Genome nämlich einer Reihe von weniger komplexen Organismen, wie die von Bakterien, der Bäckerhefe, einem Wurm und der Taufliege *Drosophila*. Dies erwies sich aus technischen Gründen als notwendig, waren doch die Voraussetzungen und Konzepte zur Sequenzierung großer Genome damals noch nicht geschaffen. Zwei Resultate aus diesen Untersuchungen möchte ich erwähnen, weil sie die Richtung andeuten, in die sich das Feld in der Zukunft weiterentwickeln könnte:

1. Der Verwandtschaftsgrad einzelner Gene zwischen evolutionär auch weit voneinander entfernten Organismen kann überraschend groß sein. Dazu einige Beispiele: 25% aller Gene, die in menschlichen Krankheiten verändert vorliegen, kommen bereits in der Bäckerhefe vor, darunter auch krebs-erregende Gene. Dies mag merkwürdig anmuten, da die Hefe als Einzeller nicht wirklich Krebs bekommen kann, – sie wächst natürlicherweise durch ständige Zellteilung –, aber natürlich kann der Ausfall von Genen zu schweren Wachstumsstörungen führen. In einem anderen Einzeller, dem Pantoffeltierchen *Paramecium*, wurde kürzlich die Variante eines sogenannten Ionenkanals entdeckt, deren Ausfall bei uns zu einer schweren Stoffwechselstörung, der Mucoviszidose führt. Auch hier sind die Genverwandtschaften mit dem menschlichen Erbgut frappant, was sie natürlich immer schon vermutet haben, von wegen des »Pantoffelhendens«.

Ein letztes Beispiel: Einige der Gene, die für die Alzheimer'sche Krankheit veranlagten, finden sich auch im Genom des Wurms *Caenorhabditis elegans*, dessen Sequenz Ende Dezember 1998 abgeschlossen wurde. Ihr Ausfall führt im Wurm zu einem Verlust der Fähigkeit, seine Eier zu legen. Dieser Mangel kann entweder durch die Rückführung der eigenen Gene in das Wurmgenom kompensiert werden, was nicht überrascht, aber auch durch die entsprechenden menschlichen Varianten. Deren Produkte sind also Genom des Wurms voll funktionstüchtig. Dies muß überraschen, sind es doch 200 Millionen Jahre her, daß Wurm und Mensch einen gemeinsamen Vorfahren hatten. In diesem Zeitraum, in dem die Dinosaurier gekommen und gegangen sind, hätte viel passieren können. Bestimmte Gene aber, die die Natur einmal als wichtig erachtet hatte, mochte sie nicht wieder entdecken und hat sie einfach immer wieder verwendet. Praktisch bedeutet dies, daß es durchaus sinnvoll sein kann, Anti-Alzheimer Medikamente auf ihre Wirksamkeit im Wurm zu testen, bevor sie beim Menschen zum klinischen Einsatz kommen. Es bedeutet aber auch, daß wir als *Homo sapiens* viel mehr ein Teil der uns umgebenden Natur sind, als wir denken mögen.

In Organismen, die dem Menschen evolutionär noch näher verwandt sind, als der Wurm, läßt sich dieses Konzept noch weiter treiben. In der Maus beispielsweise können durch gezielte Handhabung einzelner Gene genetisch-bedingte Krankheiten des Menschen nachgestellt und dann als Modelle für menschliche Krankheiten in der vorklinischen Forschung eingesetzt werden. Eines von vielen in der Medizin noch ungelösten Rätsel sind die durch sogenannte Glutaminrepetitionen verursachten neurologischen Krankheiten des Menschen, darunter Huntington's Chorea, der sogenannte Veitstanz. Die entsprechenden Genvarianten wurden kürzlich im Genom der Taufliede gefunden, so daß sich ihre Eigenschaft nun in der Fliege werden studieren lassen. Dies zu den Genverwandtschaften!

2. Viele Gene kommen in Familien vor. Ein aktueller Fall sind die Gene für Geschmacksrezeptoren.

Es gibt fünf Primärgeschmackstypen, salzig, sauer, bitter, süß und umami, der Geschmack der Aminosäure Glutamin. Die Gene für den Typ »bitter« waren bislang nicht bekannt. Auf der Grundlage einer in einer kanadischen Familie aufgetretenen genetischen Variation, die den betroffenen Personen ihre Sensibilität für »bitter« verlieren läßt, wurde zunächst ein erstes dieser Gene gefunden. Durch Suchen in entsprechenden Datenbanken mit menschlichen Genen wurden kürzlich weitere 19 Gene gefunden, deren Produkte es uns erlauben, bittere Substanzen zu schmecken. Da derzeit aber nur 14% des menschlichen Genoms in Datenbanken zugänglich sind, kann man davon ausgehen, daß es noch viel mehr sein werden. In der Tat sind manche Genfamilien noch sehr viel größer als diese Familie mit zunächst nur 19 Mitgliedern. Zählt man in einem Genom diese Genfamilien jeweils nur als ein einziges Gen, dann resultiert aus dieser Rechnung das sogenannte Kerngenom. Bei den Vielzellern Wurm und Fliege ist dieses Kerngenom mit 8.000 bzw. 9.500 Genen nicht nur vergleichbar groß; beide sind auch gerade nur doppelt so groß wie das Kerngenom der Hefe. Vom menschlichen Genom wissen wir heute schon, daß es ebenfalls viele Genfamilien zählt. Sein Kerngenom wird daher nur unwesentlich größer sein, als das des Wurmes oder der Fliege. Die zusätzliche Komplexität eines Organismus wie dem des Menschen ergibt sich daher nicht etwa aus einer größeren Anzahl von Genen, sondern auf Grund einer komplexen Organisationsstruktur. Durch geringfügige Veränderungen entstehen leicht abgewandelte Eiweißbestandteile und damit auch neue Eiweißverbände, die überdies in ihrer Entstehung nicht nur räumlich, sondern auch zeitlich gesteuert sind. Es wird also in Zukunft nicht nur darauf ankommen, die Proteine zu identifizieren, die in den unterschiedlichen Zelltypen aktiv sind, sondern auch darauf, sie in ihrer ganzen Dynamik zu verstehen.

Mit der Verfügbarkeit der Genome ist die Biologie von einer datenarmen zu einer datenreichen Wissenschaft geworden. Der Umgang mit diesen Daten

wird die treibende Kraft ihrer weiteren Entwicklung sein. Zu diesem Zweck ist bereits ein neuer Wissenschaftszweig, die Bioinformatik entstanden, die Methoden entwickelt und verwendet, aus der Plethora von Texten, wie sie die Genomprojekte liefern, sinnvolles Wissen über die Eigenschaften von Eiweißbestandteilen in unseren Zellen zu generieren. Dieses Wissen wird uns erlauben, in der Biologie völlig neue Fragen zu stellen. Noch bis vor wenigen Jahren habe ich meinen Studenten erzählt, daß die Eiweißbestandteile im Innern einer Zelle einfach herumschwimmen, wie Menschen in einem Swimmingpool. Inzwischen ist klar, daß dem keineswegs so ist, daß die Eiweißbestandteile in Netzwerken organisiert sind, in denen jedes seine ihm charakteristischen Nachbarn hat. Es gibt inzwischen technische Ansätze, intrazelluläre Netzwerke oder Signalketten von Proteinen durch die Analyse von Nachbarschaftsbeziehungen aufzubauen und zu formulieren. Vom Zellinnern geht es dann weiter zu Zellen, zu Organen und schließlich ganzen Organismus. Diese immer steigende Komplexität mussten wir bislang ignorieren. In dem wir mit dem Wissen um das Genom nunmehr alle Gene gewissermaßen gleichzeitig anschauen können, sind nun die Grundlagen geschaffen, den Weg des Reduktionismus zu verlassen und uns wieder größeren Einheiten zuzuwenden. Dies bedarf des Aufbaus neuer wissenschaftlicher Methodiken und Werkzeuge, weswegen es weltweit zahlreiche Initiativen zur Gründung von multidisziplinären Instituten gibt, die die Biologie wieder mit den anderen Naturwissenschaften verknüpfen. Da es bei uns in dieser Hinsicht noch mangelt, überlegt die DFG, hierfür entsprechende Förderinstrumente zu entwickeln.

Nun zu der **ökonomischen** Herausforderung: Eine wesentliche Triebfeder des Fortschritts in der Gen- bzw. Genomforschung, zum Guten wie zum Schlechten hin, waren und sind die Aussichten auf eine Kommerzialisierung der aus ihr gewonnenen Erkenntnisse. Wie nie zuvor im Umfeld der Biologie, vielleicht sogar der Naturwissenschaften insgesamt, waren es vor allem die Wissenschaftler

selbst, die sich an die Spitze dieser Entwicklung stellten. Verzweifelt über das Zögern und die Unfähigkeit von klassischen Pharmafirmen, diese neuen Chancen aufzugreifen, nahmen sie mit der Unterstützung potenter Investoren die Dinge selbst in die Hand. In Deutschland wurde diese Entwicklung erst in der Mitte der 90er Jahre aufgegriffen. Ende 1999 gab es bei uns ca. 250 neue Biotech-Firmen, in Europa etwa 1.350. Einige dieser Firmen sind bereits an der Börse, wo sie beachtliche Kapitalisierungen erzielt haben. Nach einem langsamen Start hat die deutsche Biotech-Industrie dank der Genomforschung eine neue Chance erhalten. Es wird beachtlicher Anstrengungen bedürfen, diese Entwicklung fort- und zu weiteren Erfolgen zu führen.

In der Genomforschung verlief die Entwicklung ebenfalls außerhalb der klassischen Pharmaindustrie, und größtenteils auch außerhalb der traditionellen Domänen der Forschungsförderung. Als Renato Dulbecco 1986 zur Sequenzierung des menschlichen Genoms aufrief, wurde er von der Mehrzahl der Genetiker nicht wirklich ernst genommen. Man sah das Genom als das eher nebensächliche Endziel des Bemühens, einzelne Gene zu analysieren und in ihrer Funktion zu verstehen. Daß der Weg über die Genome dies alles sehr viel leichter und schneller ermöglichen könnte, ja daß in vielen Fällen überhaupt kein anderer Weg offen steht, dies konnten sich viele nicht vorstellen. Einige jedoch besaßen die nötige Weitsicht, wie beispielsweise J. Craig Venter von Celera Genomics in den USA. Den Namen Celera, von lat. »schneller«, legte er sich allerdings erst zu, als er explizit in den Wettbewerb um das menschliche Genom einstieg. Er wählte einen durchaus innovativen um nicht zu sagen waghalsigen Ansatz für seine Arbeit. Dieser bestand darin, die Bausteine der Genome nicht einfach der Reihe nach zu lesen, sondern in einer Art Schrottschußmethode zu bestimmen. Danach werden die Genome zunächst wahllos in kurze Stücke zerlegt, diese sequenziert und anschließend über Methoden der Bioinformatik wie bei einem Puzzle in-silico zusammengesetzt. Der Ansatz hatte sich zwar

bereits bei der Analyse von einigen zehntausend Bausteinen bewährt; aber würde er auch bei Millionen oder gar Milliarden von Buchstaben funktionieren? Er funktionierte. Schon 1994 veröffentlichte Venter die allererste Genomsequenz eines ganzen Organismus, nämlich die eines Bakteriums namens *Haemophilus influenzae*. Mit gut 1,8 Millionen Bausteinen überstieg sie bei weitem alles das, was bis dahin möglich erschien. Es folgten, von einem europäischen Consortium, die Bäckerhefe, auf Dezember 1998 die 97 Millionen Bausteine des Wurmgenoms und nun, im Februar 2000, die 120 Millionen Bausteine des Fliegengenoms. Celera trat vor zwei Jahren in den Wettbewerb um das menschliche Genom ein, und wird diesen aller Wahrscheinlichkeit nach auch gewinnen. Seine Konkurrenten, die mit öffentlichen Mitteln geförderten Zentren in den USA, Deutschland, Japan und in England (genannt HUGO, für Human Genome Organisation), sind Venter zwar auf der Spur, aber in ihrem Fahrplan wohl doch ein wenig zurückgefallen.

In diesem Zusammenhang stellt sich sofort die Frage nach dem sogenannten geistigen Eigentum, die Frage also, wem denn am Ende das menschliche Genom gehört, den Investoren der Celera und anderer Firmen dieser Art oder eben der Öffentlichkeit. Die Rechtslage ist im Prinzip klar. Gene oder Genome sind keine Erfindungen, sondern Entdeckungen, und können daher nicht patentiert werden. Dennoch erteilen die Patentämter, an der Spitze das US Patent Office, derzeit noch Patente auf einzelne Gene, und zwar auch dann, wenn die Beteiligten gar nicht wissen, welche Funktion diese in ihren Schrottschußansätzen sequenzierten Gene eigentlich aufweisen.

Auf diese Problematik haben am 15. März diesen Jahres Tony Blair und Bill Clinton aufmerksam gemacht. Sie stellten im Rahmen einer Pressekonferenz fest, daß das menschliche Genom nicht patentrechtlich geschützt werden könnte. Darauf stürzten die Aktienkurse zunächst der gesamten Biotech-industrie, später nur derjenigen Firmen, die sich als Genomics-Firmen auf Patente stützen, die im

Grunde nicht haltbar sein werden. Blair und Clinton haben nichts Neues gesagt, sondern nur Bekanntes wiederholt. Gene als solche können nicht patentiert werden, sondern nur, wenn mit ihrer Hilfe erfindische Leistungen erbracht werden. Dies aber ist nur möglich, wenn man weiß, für welche biologische Aufgabe ein Gen gut ist.

Inzwischen, nachdem die Welt der Investoren diese subtilen Unterschiede verstanden hat, haben sich die Börsenkurse aus ihrem freien Fall wieder erholt. Unklar ist allerdings weiterhin, wie schnell und wann die kommerziellen Anbieter mit ihren Sequenzdaten über das menschliche Genom an die Öffentlichkeit gehen werden. Wenn es bei den zwölf Wochen bleibt, von denen Venter am 6. April im Ausschuß des Repräsentantenhauses sprach, um ein noch verbleibendes Drittel des Puzzles zusammenzusetzen, dann wird die Wissenschaft durch diese Verzögerung kaum beeinträchtigt werden. Ich kann mir dies allerdings nicht vorstellen. Am Ende werden sicherlich Wege gefunden werden, um die Daten von Venter und HUGO zusammen zu führen, aber hoffentlich unter den Bedingungen der mit öffentlichen Mitteln geförderten Projekte. Denn eines ist klar: Für die Lebenswissenschaften ist die Veröffentlichung der Daten aus dem menschlichen Genomprojekt angesichts der beschriebenen Aussichten für Grundlagenforschung und Anwendung unverzichtbar.

Wo genau hier die Schwierigkeiten liegen erkennt man an einem aktuellen Beispiel. Eine amerikanische Biotechfirma, Human Genome Sciences, hatte vor fünf Jahren ein Gen zum Patent angemeldet, von dem es auf Grund seiner allgemeinen Struktur nur wußte, daß es für einen Rezeptor instruieren mußte; einen Rezeptor wofür, dies war seinerzeit nicht bekannt. Das Patent wurde dennoch im Februar diesen Jahres erteilt. Andere Wissenschaftler hatten inzwischen heraus gefunden, daß es sich um einen sogenannten Korezeptor für das HI-Virus handelt und damit um ein sowohl wissenschaftlich wie kommerziell hochinteressantes Protein. Mit dem Wissen um diesen Rezeptor läßt sich nämlich der genaue

Eindringmechanismus dieses Virus untersuchen und damit vielleicht ein neuer Ansatz für die Bekämpfung von AIDS entwickeln. Die betroffene Firma »Human Genome Sciences« beilte sich mitzuteilen, daß sie ihr Wissen um das Gen sowie die zugehörigen Daten und Reagenzien der Wissenschaft ohne Einschränkung zur Verfügung stellen wird. An der kommerziellen Auswertung aber werden diejenigen, die sich die mühevoll Arbeit mit der Aufklärung der tatsächlichen Funktion dieses Proteins gemacht haben, nicht beteiligt.

Die starke Kommerzialisierung der Genomforschung ist in vieler Hinsicht ambivalent. Zum einen hat das Humangenomprojekt durch die Beteiligung von Celera Genomics sicherlich eine wünschenswerte Beschleunigung erfahren, zum anderen aber wirft sie ungeklärte Fragen im Umfeld der Offenlegung der für die Wissenschaft so unverzichtbaren Daten auf. Die Präsidenten der amerikanischen Akademie der Wissenschaften und der Royal Society haben sich kürzlich in dieser Frage ganz eindeutig für deren unverzügliche Offenlegung ausgesprochen. Ich selbst habe mich wiederholt öffentlich im gleichen Sinne geäußert. Kürzlich war zu lesen (Nature 405, 721 (2000), Ausgabe vom 15. Juni), daß sich die beiden Kontrahenten getroffen und eine künftige Zusammenarbeit in Aussicht gestellt haben. Die Frage der Patentierung war in diesem Bericht nicht angesprochen.

Und nun zu meiner dritten, der vielleicht größten Herausforderung moderner Biotechnologie, der Frage nämlich, was die Entschlüsselung des Genoms für den Menschen selbst bedeutet. Neben den vielen Chancen, über die ich gesprochen habe, müssen auch die Risiken dieses Unternehmens betrachtet werden. Ich will in diesem Zusammenhang auf zwei Punkte eingehen, auf die Gendiagnostik oder Genomanalyse und auf den Umgang mit embryonalen Stammzellen. Genomanalyse ist ein Verfahren, das es erlaubt, einzelnen Personen gegenüber Aussagen über den Status von Genen zu machen, die sie in ihrer biologischen Existenz gefährden könnten. Auf den ersten Blick erscheint

ein solches Verfahren als äußerst segensreich. Denn was könnte beruhigender sein als die durch Genomanalyse neu gewonnene Gewißheit, daß der bei Vater oder Mutter diagnostizierte Defekt in einem Gen, das für Dickdarmkrebs veranlagt, nicht weiter vererbt wurde. Auf der anderen Seite kann sich eine solche Diagnose als durchaus ambivalent erweisen, und zwar aus mehreren Gründen:

Erstens: Unsere therapeutischen Möglichkeiten hinken gegenwärtig hinter den neugewonnenen diagnostischen Fähigkeiten noch stark hinterher. Dieser Zustand wird sich bessern, aber nur langsam. In der Zwischenzeit sind wir mit der Situation konfrontiert, Krankheiten zu diagnostizieren, die wir nicht heilen können. Ein Musterbeispiel hierfür ist der schon erwähnte Veitstanz, dessen genomanalytische Diagnose Patienten die 100prozentige Gewißheit gibt, vorzeitig sterben zu müssen. Eine Therapie gibt es derzeit nicht.

Zweitens: Da defekte Gene oft nur zu Krankheiten veranlassen, sie aber nicht unbedingt auslösen müssen, kann dies zu lebenslangen Ungewißheiten führen. Wenn beispielsweise in einem Patienten schon vier der sechs Darmkrebsgene defekt sind, dann erhöht sich dadurch die Wahrscheinlichkeit, an Dickdarmkrebs zu erkranken, gegenüber einem Menschen, dessen sechs Gene noch intakt sind, ganz beträchtlich. Eine konkrete Aussage über den Krankheitsseintritt kann jedoch nicht gemacht werden.

Drittens: Wegen des Automatismus des genetischen Generationenvertrags kann die Genomanalyse Rückschlüsse auf die genetische Konstitution oder den Gesundheitszustand nicht nur eines einzelnen Individuums, sondern ganzer Familien zulassen. Eine Diagnose auf Brustkrebs muß daher nicht nur die betroffene Frau, sondern alle anderen weiblichen Familienmitglieder ebenfalls auf den Plan rufen.

Und Viertens: Am genetischen Wissen könnten auch Dritte interessiert sein, wie Lebensversicherer, Arbeitgeber, die Rentenversicherer, der Staat. Bis-

lang hat sich die Solidargemeinschaft der Versicherten den Trägern defekter Gene nicht verweigert. Die Forderungen nach Risikozuschlägen für Raucher und Motorradfahrer zeigt jedoch, daß diese Gemeinschaft so solidarisch längst nicht mehr ist.

Welche Schlußfolgerungen sind aus diesen Einsichten zu ziehen? Vor allem diejenige, daß vor dem Hintergrund unerträglicher Entscheidungszwänge oder schwer zu akzeptierender Alternativen, wie dem Schwangerschaftsabbruch, ein Verzicht auf genetisches Wissen möglich sein sollte und respektiert werden muß. Auf der anderen Seite sollten aber diejenigen, die es wissen wollen, es auch wissen dürfen. Und noch mehr: Ihr Wissen darf Ihnen über die individuellen Erfahrungen hinaus, die leidvoll genug sein können, auf keinen Fall zum Nachteil gereichen. Die Sicherung der Freiwilligkeit der Genomanalyse und der Schutz der Vertraulichkeit des genetischen Wissens müssen daher absoluten Vorrang vor Interessen Dritter genießen. Eine genetische Klassengesellschaft darf es nicht geben. Die Wissenschaft hat in der Vergangenheit beachtliche Selbstregulierungskräfte aufgebracht, wie das Gentechnik-, das Embryonenschutz- oder das Tierschutzgesetz. Wir sollten alle daran arbeiten, daß auch die anderen Ergebnisse der Genomforschung in eine Medizin münden, deren Einsatz auf breite Akzeptanz rechnen kann. In einem Umfeld, in dem die biologische Verfassung des Menschen zur Disposition steht, bedarf dies im Umgang mit der Öffentlichkeit sehr viel mehr als »business as usual«.

Dies gilt ganz besonders in einem weiteren aktuellen Gebiet nämlich dem Klonen, und damit verbunden, dem Einsatz sogenannter Stammzellen. Vor drei Jahren wurde es erstmals möglich, erbgleiche Organismen auch aus Zellen erwachsener Organismen herzustellen. Klone sind an sich keine Seltenheit in der Natur. Die schwierige Examensfrage, ob es beim Menschen ungeschlechtliche Vererbung gibt, muß mit einem klaren Ja beantwortet werden. Alles andere würden sich die ca. 6 Millionen eineiiger Zwillinge auf dieser Welt verbieten lassen. Neu an der erstmals mit der Erzeugung des Schafs

»Dolly« entwickelten Technologie war die Transplantation eines Zellkerns aus einer ausdifferenzierten Zelle in eine Embryozelle, die von ihrem eigenen Zellkern befreit war. In dieser Umgebung ließ sich der aus der erwachsenen Zelle stammende Zellkern aus seinem hochspezialisierten Zustand in einen Zustand reprogrammieren, der die Bildung eines ganzen Organismus erlaubte. Dies war eine wissenschaftliche Sensation, weil wir alle bis dahin der Meinung waren, die Differenzierung von Zellen verlief immer nur in eine Richtung, vom Embryo zum erwachsenen Zelltyp, und niemals umgekehrt. Mit »Dolly« wurde dies anders. Mit »Dolly« wurde es auch möglich, Klone zu einem Zeitpunkt herzustellen, an dem, anders als auf der Ebene des Embryos, die zu vervielfältigenden Eigenschaften bereits bekannt sind. Die Versuche zum Klonen per Kerntransplantation sind inzwischen bei Mäusen und Rindern wiederholt worden, so daß an dieser Technologie keine Zweifel mehr bestehen. Obwohl mehrfach angekündigt, ist sie bislang beim Menschen nicht eingesetzt worden, auch wenn der bloße Gedanke an einen solchen Einsatz immer wieder die Gemüter erregt. Hintergrund dieser Besorgnis ist wohl nicht der Klon an sich, der uns ja als eineiiger Zwilling immer wieder entgegentritt, ohne daß dies besorgniserregend ist, sondern die Tatsache, daß die menschlichen Klone à la Dolly nicht mit dem Ziel ihrer selbst, sondern durch Bestimmung eines Dritten hergestellt würden. Es ist dieses gezielte Aussetzen des genetischen Schüttelprozesses, der den Einsatz dieses Verfahrens beim Menschen als verwerflich erscheinen läßt.

Als sinnvolle Alternative zum organismischen Klonen, also dem Klonen ganzer Organismen, wird vor allem im Hinblick auf den Menschen das therapeutische Klonen gesehen. Dazu werden embryonale Stammzellen benötigt. Sie entstehen immer dann, wenn Embryos, also befruchtete Eizellen, außerhalb ihres normalen Habitats gehalten werden. Solche Zellen, deren Herstellung beim Menschen bis vor kurzem nicht möglich war, haben die Eigenschaft, sich in alle ca. 300 Zelltypen ausdifferen-

zieren zu können, aus denen ein Säugerorganismus besteht, dies aber nicht alleine, sondern immer nur im Kontext eines heranwachsenden Embryos. Sie sind daher nicht toti- sondern nur pluripotent. Sie können also nicht direkt zur Herstellung intakter, erbgleicher Organismus, sogenannter Klone verwendet werden, sondern nur über den Umweg aufwendiger Rückkreuzungen. Statt dessen ist daran gedacht, diese Zellen, insbesondere in Kombination mit dem »Dolly«-Verfahren, zum sogenannten therapeutischen Klonen einzusetzen. Die Zellen würden zu diesem Zweck mit einem Cocktail von spezifischen Wachstumsfaktoren in bestimmte Zelltypen und Organe umgewandelt, die dann in den Organismus, aus dem der Zellkern stammte, zurück verpflanzt werden. Bislang allerdings sind diese Cocktails kaum in Sicht, und bislang ist auch nicht klar, ob die Herstellung von Organen aus Embryozellen vielleicht nur im Kontext eines wachsenden Organismus möglich ist.

Dennoch wird dieser Technologie ein großes Anwendungspotential zugeschrieben, und zwar insbesondere dann, wenn es gelänge, nicht den Umweg über embryonale Stammzellen gehen zu müssen, sondern über sogenannte adulte (erwachsene) Stammzellen. Schon lange war bekannt, daß das blutbildende System eine eigene Klasse von Stammzellen besitzt, die nicht die breite Potenz der embryonalen Stammzellen aufweisen, sondern als Vorläufer allein für die Zellen des Immunsystems dienen. Solche Zellen spielen heute bereits eine große Rolle in der Knochenmarkstransplantation, die als Folge von schweren Blutkrebserkrankungen durchgeführt werden. Sie werden nach der Abtötung des krebserkrankten Knochenmarks den Patienten wieder zurückgegeben, und dienen als Quelle des Aufbaus eines neuen Immunsystems. Seit einiger Zeit wird bekannt, daß adulte Stammzellen auch in vielen anderen Organen zu finden, selbst im Gehirn. Noch bis vor gut einem Jahr haben wir alle gedacht, daß wir bezüglich unseres Gehirns aus der Substanz leben, daß sich unsere Gehirnzellen niemals teilen und erneuern. Nach der kürzlich erfolgten Ent-

deckung von Stammzellen des Gehirns ist dies nun nicht mehr wahr. Es gibt derartige Stammzellen, wenngleich vorerst offen bleiben muß, was dort ihre genaue biologische Funktion sein könnte. Man kann sich aber durchaus vorstellen, daß solche Stammzellen in einer wenn auch weit entfernten Zukunft einmal zur Behandlung etwa der Parkinson'schen Krankheit eingesetzt werden. Es gibt inzwischen Stammzellen für die Leber, für die Inselzellen der Bauchspeicheldrüse und für viele andere Organe mehr. Sie könnten in der Zukunft große therapeutische Bedeutung gewinnen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat sich kürzlich in einer Denkschrift (www.dfg.de) mit der Frage des Einsatzes menschlicher embryonaler Stammzellen auseinandergesetzt. Nach geltendem Recht ist ihre Herstellung aus menschlichen Blastozysten verboten. Das deutsche Embryonenschutzgesetz erlaubt nur solche Manipulationen, die der Erhaltung des Embryos dienen, was hier offensichtlich nicht der Fall ist. Obwohl der Verwendung solcher Stammzellen große wissenschaftliche und medizinische Bedeutung beigemessen wird, und obwohl Wissenschaftler in Deutschland damit gegenüber ihren Kollegen in Übersee benachteiligt sind, hat die von mir eingesetzte Arbeitsgruppe dennoch eine Änderung des Embryonenschutzgesetzes nicht verlangt. Sie hat vielmehr argumentiert, daß

a) viele der Experimente zur Reprogrammierung von Genomen mit tierischen Zellen möglich sind und daß

b) adulte Stammzellen möglicherweise den Umweg über toti- und pluripotente Zellen vermeiden lassen. Die wissenschaftliche Entwicklung des vergangenen Jahres, in dem es immer wieder zur Beschreibung von adulten Stammzellen in den verschiedensten Organen kam, scheint dieser Ansicht Recht zu geben. Ein Schnellschuß des Gesetzgebers könnte sich daher selbst erledigen, was seinem Ansehen wie auch dem Rechtsempfinden der Bevölkerung kaum förderlich wäre.

Die Diskussion um das Embryonenschutzgesetz ist vor allem deshalb so schwierig, weil sie

nicht oder kaum von der Frage des Schwangerschaftsabbruchs gelöst betrachtet werden kann. Denken wir nur an das Thema der Präimplantationsdiagnostik, also die Analyse einzelner Zellen aus einem Embryo im 200-Zell Stadium auf ihre genetische Konstitution. Die zuständige Gesundheitsministerin will die Präimplantationsdiagnostik an noch nicht eingesteten Embryonen nicht erlauben. Damit versagt sie Paaren, die sich dem aufwendigen und legalen Verfahren der in-vitro Fertilisation unterziehen, einen Test auf die Unversehrtheit des Embryos, und zwingt sie, diesen Embryo zunächst einzupflanzen, um ihn dann gegebenenfalls ganz legal abtreiben zu lassen. Der Rubikon im Umgang mit menschlichen Embryonen wurde 1978 mit der Geburt von Louise Brown überschritten. Jetzt muß diese Praxis, die über 8.000 Babys pro Jahr allein in Deutschland in die Welt setzt, in unser Denken einbezogen und es darf nicht so getan werden, als gäbe es sie nicht. Auf der anderen Seite wird von Proponenten des Einsatzes menschlicher embryonaler Stammzellen die Möglichkeit von Alternativen zu wenig beachtet. Wenn derzeit immer deutlicher wird, daß auch sogenannte adulte Stammzellen, die ethisch weniger belast sind, als embryonale Stammzellen, für die Herstellung menschlichen Gewebes geeignet sind, dann muß dies ernsthaft diskutiert werden. Sowohl der Grundsatz der Verhältnismäßigkeit als auch die Beachtung von Alternativen sind ethische Prinzipien, die mir in der Hitze des derzeitigen Gefechts um eine neues Embryonenschutzgesetz in Vergessenheit zu geraten scheinen.

Dennoch muß natürlich die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß therapeutisches Klonen nicht via die erwähnten Alternativen, sondern nur über embryonale Stammzellen erreichbar ist. Der Senat der DFG hat kürzlich ein Schwerpunktprogramm genehmigt, das derartige Fragestellungen zum thematisieren erlaubt. Wir gehen davon aus, daß entsprechende Anträge eingereicht werden. Sie werden, wie bei der DFG üblich, auf ihre wissenschaftliche Bonität geprüft werden. Wenn diese festgestellt ist, muß der Hauptausschuß entscheiden.

Ich habe einen ethischen Beirat eingesetzt, der ihn in diesen Entscheidungen beraten wird. Und selbstverständlich wird die DFG darauf achten, daß ihre Bewilligungen nicht gegen geltendes Recht verstoßen. Nach allem, was bislang bekannt geworden ist, ist der Import dieser Zelllinien nicht verboten, so daß von dieser Seite her keinerlei Anlaß bestünde, einen solchen Antrag nicht zu genehmigen. Es bliebe allerdings der fade Nachgeschmack der Doppelmoral zurück. Die nicht unbeträchtlichen Forschungsrisiken zur Herstellung dieser Zellen werden Dritten aufgebürdet, in diesem Fall einer Arbeitsgruppe in den USA, um dann, nachdem diese gemeistert sind, nur noch von den Wohltaten zu profitieren. Es wäre nicht das erste Mal, das wir uns diesbezüglich verhalten. Bei der in-vitro Befruchtung oder der Präimplantationsdiagnostik geschieht nichts anderes. Es gibt nun zwei alternative Handlungsmöglichkeiten: Entweder man akzeptiert diese Widersprüche und steckt weiter den Kopf in den Sand, oder man schaut der Wirklichkeit ins Gesicht und versucht, den Umgang mit menschlichen Embryonen angemessen zu regeln. In diesem Zusammenhang hat es schon nachdenklich gestimmt, daß gemäß einer kürzlich erfolgten Umfrage, 85 % der Ehepaare, die sich der Prozedur einer in-vitro Fertilisation unterziehen, nach fünf Jahren von »ihren« Embryonen nichts mehr wissen wollen. Ich habe Verständnis für die berechtigte Frage von Wissenschaftlern, warum solche Zellen, wenn sich schon niemand mehr dafür interessiert, denn dann nicht für die Zwecke der Wissenschaft verwendet werden dürfen. Da das Embryonenschutzgesetz dieser Verwendung im Wege steht, wird der Wissenschaft hier nichts anderes übrigbleiben, als die Gesellschaft und den Gesetzgeber zu überzeugen. Dazu wird es nötig sein, Alternativen überprüft und gezeigt zu haben, daß die medizinischen Chancen für den Einsatz dieser Zellen in der Tat so groß sind, wie vermutet.

Im Interesse aller Beteiligten kann ich nur hoffen, daß am Ende ein Weg gefunden werden kann, der den Interessen der Wissenschaft und denen der Gesellschaft gleichermaßen dient.

I.

Analyse von Nutztier-Genomen und -Genen
sowie gendiagnostische Verfahren

Analyse und Kartierung von Nutztiergenomen



1 Einleitung

Faßt man den Begriff der Genomanalyse entsprechend weit, so kann die Domestikation als Anfang der Genomanalyse unserer Haustiere gewertet werden. Denn mit der Domestikation der Haustiere hat der Mensch durch die geplante Anpaarung von Tieren begonnen, sowohl deren Genome nachhaltig zu beeinflussen als auch die genetischen Eigenschaften gezielt zur Leistungsverbesserung zu nutzen. Aber erst mit Gregor Mendel beginnt die Genomanalyse im engeren Sinn, bei der es um die systematische Erforschung des molekularen Aufbaus sowie der Funktion und Organisation des Genoms eines Organismus geht. Wenngleich die von Mendel aufgestellten Regeln weiterhin Gültigkeit besitzen, konnte er mit den ihm zur Verfügung stehenden Methoden keine genauere Analyse der Lage und Wechselbeziehungen der Gene innerhalb eines Genoms vornehmen. Eine systematische Erforschung der Wechselwirkungen von Genen und deren damit verbundene genetische Distanz im Genom unternahm der amerikanische Zoologe Thomas H. Morgan bei *Drosophila melanogaster* und leitete damit zu Beginn des 20. Jahrhunderts eine neue Ära der Genomanalyse ein. Mit der Aufklärung der molekularen Struktur der DNA durch James D. Watson und Francis H. Crick, kam es ungefähr 40 Jahre später zur Entwicklung von Techniken, die es dann auch tatsächlich erlaubten Genome nicht nur genetisch sondern auch physikalisch zu analysieren und kartieren. Während die Genomanalyse zu Be-

ginn in der Regel vom Protein und dessen Funktion zum Gen gelangte, wird heute der weitaus effizientere Ansatz vom Gen zur Funktion (bottom-up) bevorzugt. Der Beginn der Genomanalyse im engsten Sinn muß deshalb in die Mitte der 70er Jahre datiert werden, als der britische Biochemiker Frederick Sanger die enzymatische Strangabbruchmethode zur DNA-Sequenzierung entwickelte. Erst mit dieser Technik, die bis heute nahezu unverändert eingesetzt wird, wurde es möglich die Entschlüsselung ganzer Säugetiergenome in Angriff zu nehmen. Die teilweise bereits vollständige Aufklärung des menschlichen und Hefe Genoms als auch einer Vielzahl von Genomen verschiedener Pathogene, hat in den letzten Jahren zur einer überwältigenden Fülle von DNA Sequenzdaten geführt. Hinzu kommen eine unzählige Menge an cDNAs aus unterschiedlichen Geweben und Zelltypen, die inzwischen bei weitem die Gesamtzahl der geschätzten Gene eines eukaryontischen Genoms überschreiten. Obwohl zwischen den Chromosomen, Genomen und Genen der Säugetiere eine hoher Grad an Homologie besteht, der die Genomanalyse auch über die Artgrenzen hinaus vereinfacht, kann der momentane Stand der Genomanalyse bei unseren Haussäugetieren eher noch als *in statu nascendi* bezeichnet werden. Diese Situation ist jedoch nicht verwunderlich, da es bei der Genomanalyse unserer Haussäugetiere nie um die komplette Sequenzierung aller ökonomisch wichtigen Spezies ging. Betrachtet man die Entwicklung der

Genomanalyse bei unseren Haussäugetiere so fällt außerdem auf, daß es nicht zu einem exponentiellen Anstieg der Sequenzdaten gekommen ist wie dies z. B. beim Mensch der Fall ist. Die Analyse und Kartierung komplexer Genome wird auch weiterhin ein nicht triviales Unterfangen bleiben, daß ein hohes Maß an Automatisierung und Logistik voraussetzt.

2 Strategien der Genomanalyse

Die Analyse komplexer Genome erfolgt im wesentlichen in zwei Schritten, der genetischen und der physikalische Kartierung. Bei der physikalischen Kartierung können noch neben der direkten DNA-Sequenzierung die cytogenetische Kartierung sowie die Kartierung mit Hilfe von somatischen Hybridzelllinien oder sog. Radiation-Hybridzelllinien unterschieden werden. Die einzelnen Stufen der Kartierung können aber auch in ganz unterschiedlicher Weise zur Analyse anderer Fragestellungen eingesetzt werden. Die Genomanalyse kann sowohl als »bottom up« oder auch »top down« Vorgang durchgeführt werden, indem zunächst eine grobe und anschließend immer feinere Kartierung oder unmittelbar eine DNA-Sequenzierung mit anschließender Contig-Erzeugung vorgenommen wird. Die hoch- und mittelauflösenden Karten sind dabei aber nur ein Zwischenstadium auf dem Weg zur Bestimmung der vollständigen DNA-Sequenz eines Genoms, welche die tatsächliche Distanz in Basenpaaren zwischen verschiedenen Markern oder Genen wiedergibt. Die einzelnen Schritte der Kartierung sollen im Folgenden in der Reihenfolge ihrer Auflösungsgenauigkeit kurz dargestellt werden.

2.1 Genetische Kartierung

Genetische Karten werden auf der Basis der Vererbung gekoppelter oder unabhängiger Loci erstellt. Falls zwei Gene oder Marker sehr weit voneinander entfernt liegen, ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombinationen zwischen ihnen deutlich höher als wenn sie sehr dicht gelegen sind. Der Abstand zwischen solchen loci wird dabei in centiMorgan gemessen (cM), was ein Maß für die Häufigkeit einer Rekombination während der Meiose darstellt.

Als Marker werden üblicherweise hochpolymorphe repetitive DNA-Bereiche (Mikrosatelliten, STR) verwendet, die im Fall von Dinucleotid-Mikrosatelliten in Abständen von ungefähr 50.000 Basenpaaren im Genom vorkommen. Aber auch andere Loci können verwendet werden, solange sie polymorph sind und somit bei einer Meiose Informationen über eine eventuelle Kopplung geben. Im Rahmen der internationalen Genomanalyseprojekte bei den landwirtschaftlichen Nutztieren konnten inzwischen relativ dichte genetische Karten erzeugt werden, die eine Abdeckung der entsprechende Genome im Bereich einiger cM beinhalten (Abb. 1).

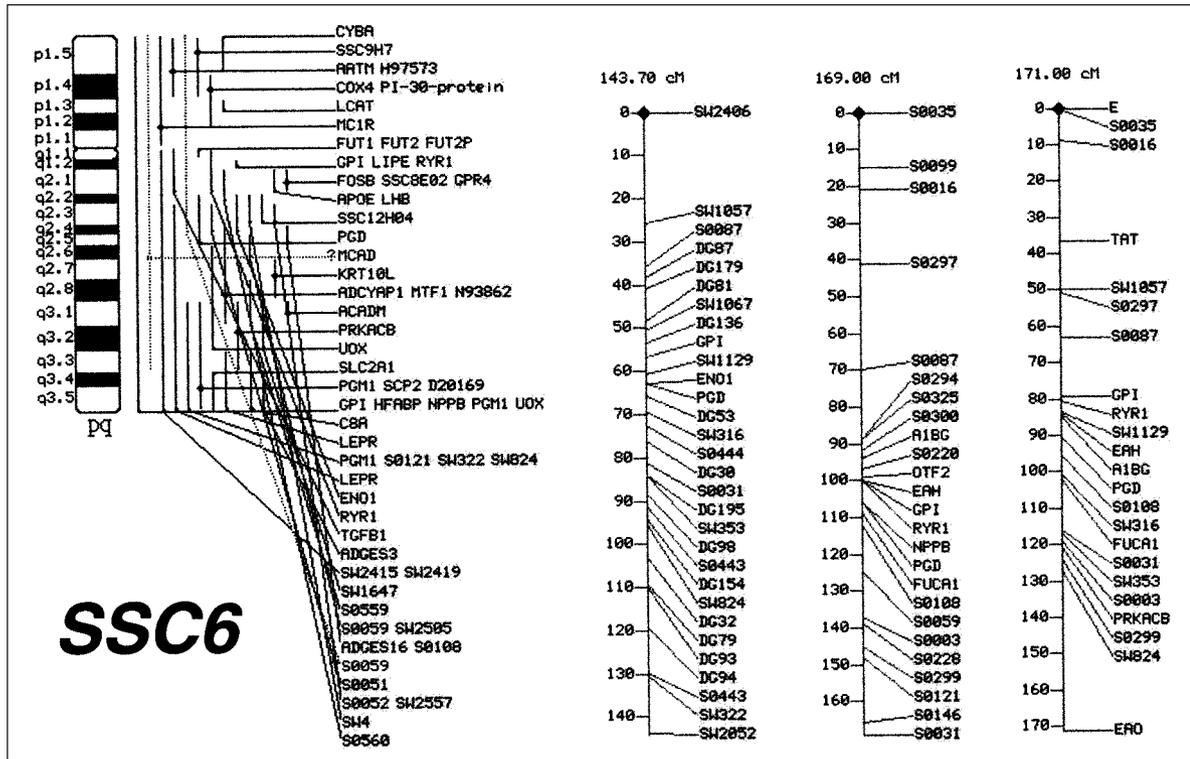
2.2 Cytogenetische Kartierung

Bei der cytogenetischen Kartierung werden DNA-Fragmente in ihrer Lage auf einem Chromosom ermittelt (Abb. 2). Hierbei werden bildgebende Verfahren eingesetzt, die auch die gleichzeitige Analyse mehrerer Fragmente erlaubt (chromosome painting). Eine cytogenetische Karte kann eine bereits sehr hohe Auflösung im Bereich weniger Kilobasenpaare ergeben. Besondere Techniken wie die Fiber-FISH Analyse erlauben heute eine sehr detaillierte Positionierung von DNA-Fragmenten entlang eines Chromosoms (Abb. 3).

2.3 Physikalische Kartierung

Die physikalische Kartierung führt letztendlich zur kompletten Aufklärung der Basenabfolge der Chromosomen bzw. des gesamten Genoms und ist damit die genaueste und sicherste wenngleich aber auch die kostenaufwendigste Form der Genomanalyse. Zur physikalischen Kartierung wird das Genom zunächst in definierte Fragmente geteilt, die sich unabhängig in Mikroorganismen (Bakterien, Hefe) vermehren lassen. Dabei haben sich die künstlichen Bakterienchromosomen (BAC) oder P1-abgeleiteten künstlichen Chromosomen (PAC), die eine Klonierungskapazität von ungefähr 300.000 Basenpaaren haben, als Systeme der Wahl herausgestellt. Eine zunächst zufällige Ansammlung solcher künstlicher Chromosomen innerhalb einer Genbank wird nun schrittweise in eine geordnete Reihenfolge

Abbildung 1: Genetische und cytogenetische Karten des porcinen Chromosoms 6

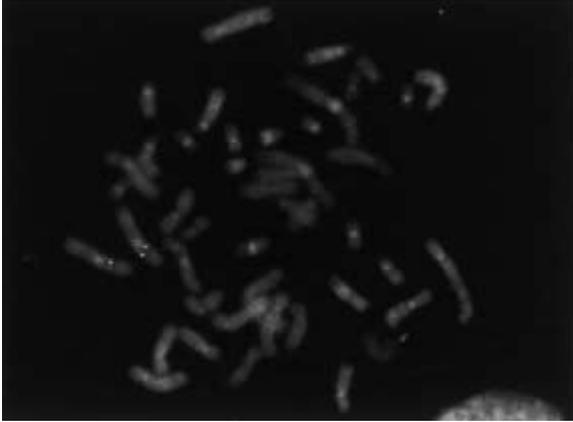


(contig) gebracht, die der ursprünglichen Anordnung im Genom entspricht. Die Erzeugung vollständiger contigs ist dabei nur möglich, da die eingangs erwähnte Fragmentierung des Genoms zwar in einem ausgewählten Größenbereich aber dennoch zufällig erfolgt und so das gesamte Genom im besten Fall mehrfach in der Genbank vertreten ist. Eine zunächst grobe Bestimmung der relativen und absoluten Lage der einzelnen Fragmente zueinander wird in der Regel durch partielle Sequenzierung, Restriktionsspaltung (digest-mapping) und Analyse mit polymorphen Markern vorgenommen. Die dabei erzeugten Informationen werden mittels geeigneter Algorithmen (Multiple-Alignment-Algo-

rithmen) in mögliche Anordnungen der Fragmente assembliert (Abb. 4). Ein Problem stellen repetitive DNA-Bereiche dar, wodurch eine teilweise zu hohe Überdeckung eines bestimmten Bereichs entsteht. Nur mit Hilfe von heuristischen Methoden kann dieses Problem zumindest teilweise gelöst werden, wobei versucht wird die verschiedenen Vorkommen der wiederholten Teilsequenzen zu separieren.

Nach der ersten groben Assemblierung erfolgt die vollständige Sequenzierung der einzelnen Fragmente, in dem diese erneut in kleinere sequenzierbare Subfragmente zerlegt werden. Hierbei wird in der Regel nicht mehr gerichtet, sondern zufällig vorgegangen, wobei jedoch darauf geachtet wird, daß

Abbildung 2: Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) zur Lokalisierung eines DNA-Fragments



die Gesamtlänge aller Subfragmente einen Faktor k ($k > 20$) mal größer ist als die experimentell abschätzbare Länge des zu sequenzierenden Moleküls. Die ursprüngliche DNA-Sequenz wird nun mit Hilfe der sequenzierten Subfragmente rekonstruiert.

Mit dem Vorhandensein der vollständigen DNA-Sequenz eines Genoms ist die Genomanalyse jedoch noch nicht abgeschlossen, denn es gilt nun die funktionellen Bereiche (Gene und regulatorische Regionen) zu identifizieren (integrated gene identification). Auch ohne vorherige Kenntnis der Lage und Anordnung von Genen innerhalb eines contigs, läßt sich mit Hilfe von Programmen, die wahrscheinlichste Lokalisation ermitteln. Grundlage dieser Analysen ist u. a. die Kenntnis des allgemeinen Aufbaus von Genen in kodierende und nicht-kodierende Bereiche, der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt), Intron/Exon-Grenzen sowie Intron/Exon-Längen (Abb. 5).

3 Stand der Genomanalyse bei Nutztieren

Das Interesse an der Genomanalyse der Nutztiere hat im Wesentlichen drei Gründe. Zum einen ist durch die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge und Funktionen der Gene ein deutlicher Wissenszugewinn für die praktische Tierzucht nicht nur

weiterhin zu erwarten, sondern auch bereits in einigen Bereichen wirtschaftlich nutzbar. Die Tierzucht wird auch in Zukunft ganz erheblich von der Genomanalyse profitieren, ganz unabhängig davon ob sie gezielt zur Aufklärung der genetischen Potentiale unserer Nutztiere durchgeführt wird oder als »Nebenprodukt« molekularbiologischer Grundlagenforschung in anderen Bereichen anfällt. Die Kenntnis über Wechselwirkungen komplexer Merkmale sowie die Aufklärung der wichtigen molekular-genetischen Grundlage von Leistungseigenschaften unserer Haustiere, ist Voraussetzung für eine leistungsstarke und wettbewerbsfähige zukünftige Tierzucht. Dabei ist auch die Wirtschaft gefordert, sich verstärkt an der Förderung genomanalytischer Projekte zu beteiligen.

Auf der anderen Seite liefert die molekulare Grundlagenforschung bei Nutztieren neue Erkenntnisse für die biomedizinische Forschung und Entwicklung. Nutztiere können u. a. als Modellorganismen zur Erprobung neuer Medikamente eingesetzt oder als Organspender im Bereich der Xenotransplantation verwendet werden. Bereits heute werden verschiedene Pharmazeutika aus transgenen Nutztieren gewonnen. Schließlich muß natürlich auch die reine, anwendungsfreie molekularbiologische Grundlagenforschung erwähnt werden, bei der es zunächst nur um die Erforschung molekularer Mechanismen geht, die zu einem besseren Verständnis zellulärer und biologischer Vorgänge führen.

Betrachtet man auf diesem Hintergrund die Entwicklung der Genomanalyse bei den Nutztieren, so ist zu erkennen, daß das Schwein gerade in den letzten Jahren in allen drei Schwerpunktsbereichen eine besondere Rolle spielt. Abgesehen von der aufgrund der ähnlichen Physiologie und vergleichbaren Anatomie schon lange bestehenden Bedeutung des Schweins für die medizinische Forschung, haben sich inzwischen auch eine Vielzahl molekulargenetischer Ähnlichkeiten zwischen dem Menschen und Schwein herausgestellt. So ist es nicht verwunderlich, daß in der von der NCBI geführten internationalen Statistik über Einträge in der DNA-Sequenz-

Abbildung 3: Hochauflösende Fiber-FISH Analyse

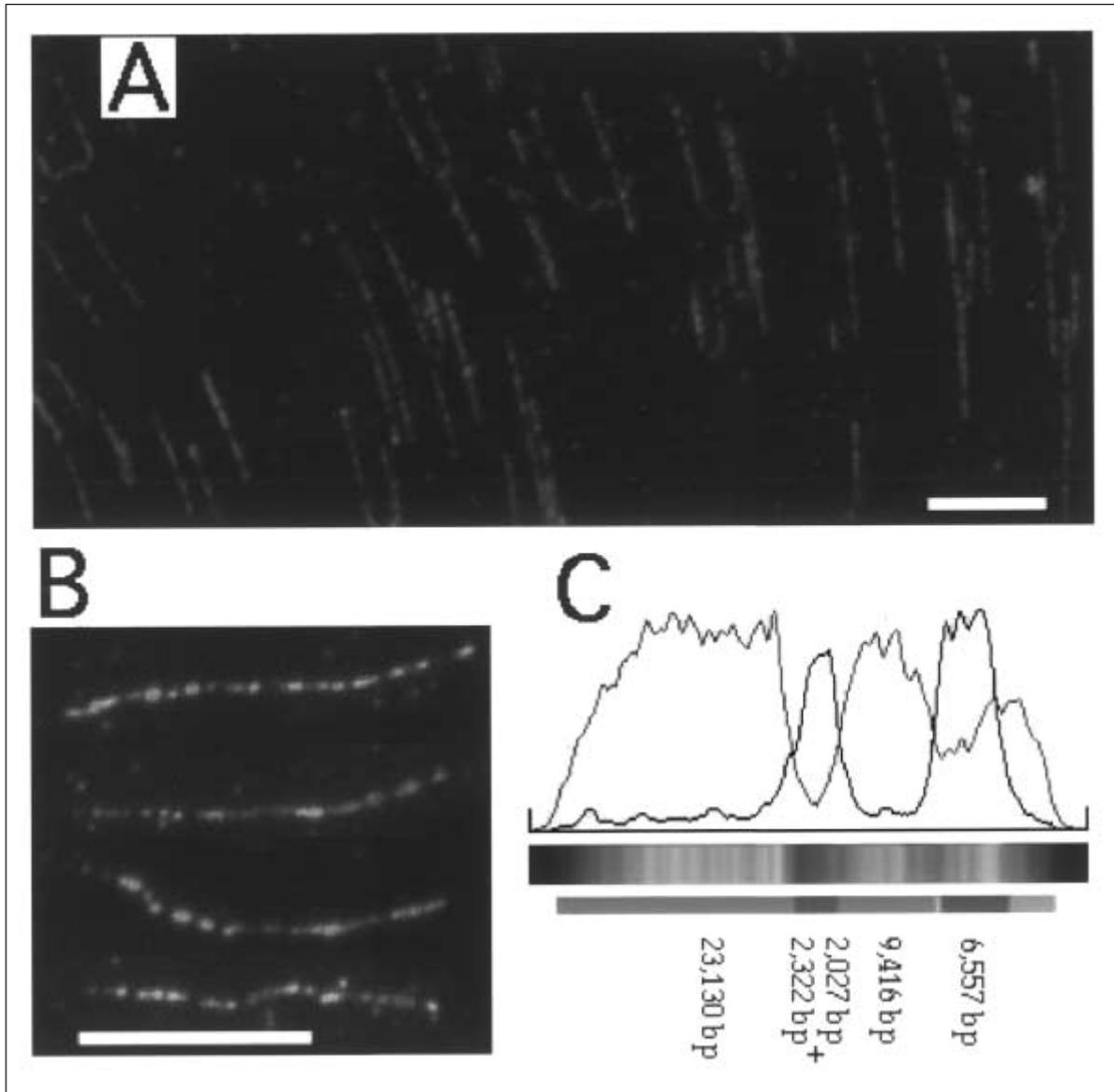
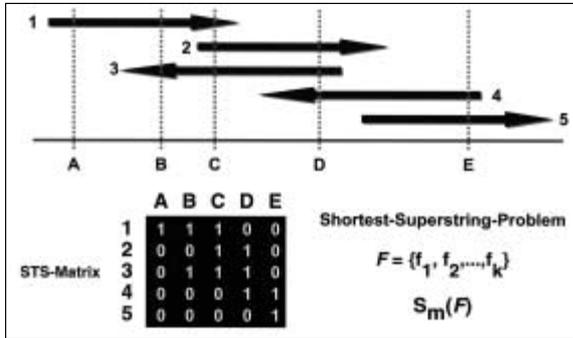


Abbildung 4: Das »shortest-superstring« Problem bei der Erzeugung eines contigs



datenbank nach dem Menschen z. Z. das Schwein den zweiten Platz einnimmt (Abb. 6). Gleichzeitig muß erwähnt werden, daß einer der wirtschaftlich bedeutendsten genetischen Defekte, das porcine Stress-Syndrom, beispielhaft beim Schwein molekulargenetisch aufgeklärt werden konnte. Dies wird seit kurzem durch die Aufklärung der genetischen Ursache des Hampshire-Faktors ergänzt.

Die Erforschung der Genome der anderen Nutztiere, Rind, Schaf und Ziege ist dagegen weit mehr

Abbildung 5: Verfahren zur Identifikation kodierender Bereiche innerhalb eines DNA-Fragments (integrated gene identification)

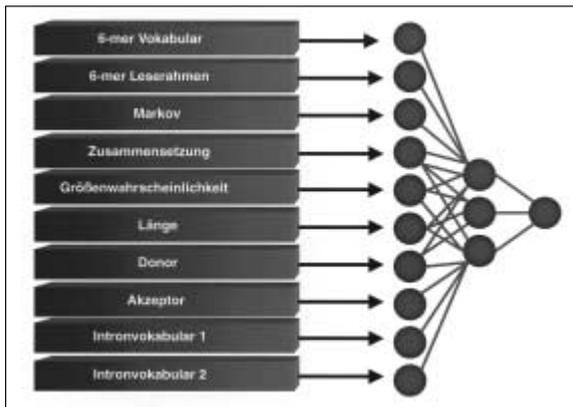
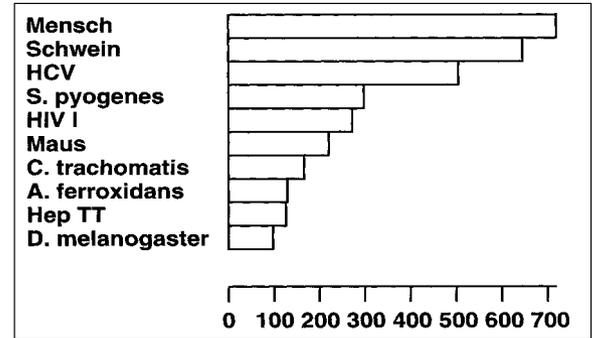
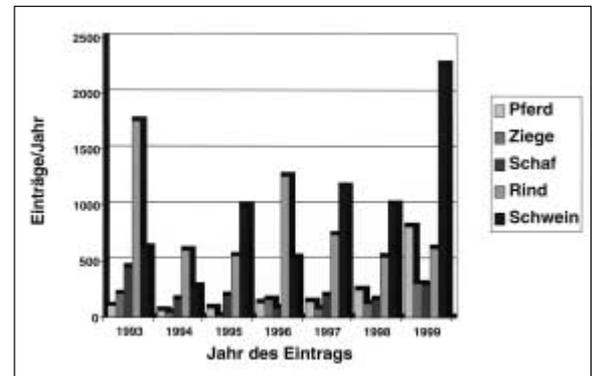


Abbildung 6: Vergleichender Stand der Datenbankeinträge im April 2000 (NCBI)



durch das wirtschaftliche Interesse des Menschen im Bereich der Tierproduktion geprägt. So findet man hier auch weitaus seltener Arbeiten von Gruppen, die in anderen Bereichen als der Tierzucht tätig sind. Innerhalb dieser Species nimmt das Rind was den Stand der Genomanalyse angeht, eine führende Position ein (Abb. 7). Durch die bei den wichtigsten landwirtschaftlichen Nutztieren inzwischen existierenden relativ dichten Markerkarten, können auch Genomscans effizient durchgeführt und damit Leistungsmerkmale molekulargenetisch eingegrenzt werden.

Abbildung 7: Stand der Genomanalyse bei verschiedenen Haussäugetieren (Stand Juni 2000)



Struktur und Funktion von Genen beim Nutztier



Was ist ein »Gen«?

Der Genbegriff, erstmals 1909 vom dänischen Biologen Wilhelm Johannsen definiert, ist in den vergangenen Jahren stetig »schwammiger« geworden. In Abhängigkeit von der Person, der diese Frage gestellt wird, werden die Antworten entsprechend unterschiedlich ausfallen und könnten wie folgt sein (nach Fischer, 1995):

- Klassischer Genetiker:
»Ein Gen ist die Einheit, die entsprechend der Mendelgesetze vererbt wird.«
- Biochemiker:
»Ein Gen stellt die genetische Information, um ein Protein zu erzeugen.«
- Molekularbiologe:
»Ein Gen ist der Chromosomenabschnitt, der transkribiert werden kann.«

Die Ursachen für diese unterschiedlich verwendeten Gendefinitionen liegen insbesondere in dem ständig zunehmenden Wissen über den molekularen Aufbau des Genoms, das zu einer notwendigen ständigen Aktualisierung des Genbegriffes führt.

So unterstreichen Befunde, daß

- ein und derselbe DNA zu mehreren Proteinen führt (Alberts et al., 1983)
- ein Transkript zu mehreren Proteinen führt (Watson et al., 1992)
- ein und dasselbe Gen zu mehreren Phänotypen führt (Heyningen, 1994)

- sich mehrere Transkripteinheiten einander überlappen können
- in Intronbereichen bekannter Gene neue Gene beschrieben wurden usw.

die Schwierigkeit einer klaren Definition des »Genbegriffes«. Bereits 1941 formulierten G. Beadle und E. Tatum die Antwort, die lange als die verbindliche galt, nämlich: Ein Gen ist eine Sequenz in der genomischen DNA, die für ein Protein kodiert (»Die Ein-Gen – Ein-Enzym-Hypothese«). Diese Definition ist nicht falsch, aber die bedarf mehrerer Ergänzungen, und sie gilt nicht für alle Gene.

Die erste Ergänzung ist: Zu einem Gen gehören auch solche Sequenzen, die als »Signale« seine Transkription (Expression) regulieren. Solche Signale können weit vom Gen entfernt liegen. Ein exprimiertes Gen wird zwar als »aktiv« bezeichnet, es transkribiert aber nicht selbst, es wird vielmehr transkribiert. Ferner enthält jedes Gen an beiden Enden Sequenzen, die zwar in mRNA überschrieben, aber später nicht in ein Protein übersetzt werden. Solche Sequenzen können ebenfalls regulative Funktionen haben.

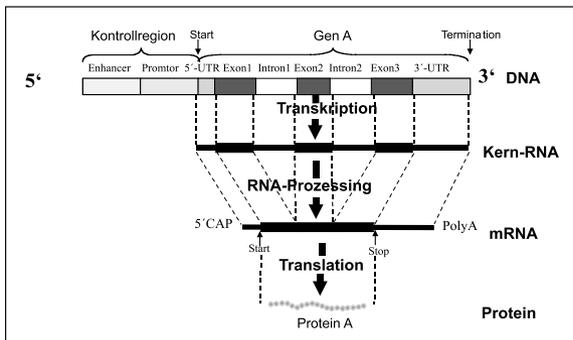
Eine zweite Ergänzung ist: Gene höherer Organismen bestehen mit wenigen Ausnahmen aus einem mosaikartigen Muster von kodierenden und nichtkodierenden Sequenzen, die als Exons (kodierend) und Introns (nichtkodierend) bezeichnet werden. Introns gehören zum Gen, kodieren aber nicht. Sie werden zwar zunächst in RNA übersetzt, aber dann aus dieser in einem Prozessierungsschritt

(»splicing«) wieder entfernt. In ganz seltenen Fällen hat ein Intron in sich eine eigene Information für ein separates Protein, ist also ein Gen im Gen. Nicht so selten ist, daß Gene differentiell prozessiert werden. Dabei werden aus Primärtranskripten mit den Introns auch einzelne Exons selektiv entfernt, so daß die dabei entstehenden mRNA-Moleküle wechselnde Exonkombinationen enthalten (»differential splicing«). Das kann in Abhängigkeit von Einflüssen geschehen, die sich während der Entwicklung eines Organismus geltend machen, oder in Anpassung an wechselnde Erfordernisse, auf die ein bestimmtes Organ antworten muß. Damit entsteht Variabilität auf der Ebene der Genprodukte: Ein Gen kodiert für mehr als ein Protein.

Im vorliegenden Beitrag wird im Interesse der Vereinfachung und der Klarheit unter einem Gen der Abschnitt auf dem DNA-Strang verstanden, der für die Bildung der primären Transkripteinheit essentiell ist. Dazu gehören der nichttranskribierte 5'-Promotorbereich, die transkribierten, aber nicht translatierten 5'- und 3'- Bereiche (UTR) und der eigentliche transkribierte Strukturgenbereich, der aus den translatierten Exon- und den nicht-translatierten Intron-Regionen besteht (siehe Abbildung 1).

Insgesamt unterscheiden wir im tierischen ähnlich des menschlichen Genoms vier verschiedene

Abbildung 1: Strukturschema eines eukaryotischen Gens und seiner Expressionsprodukte



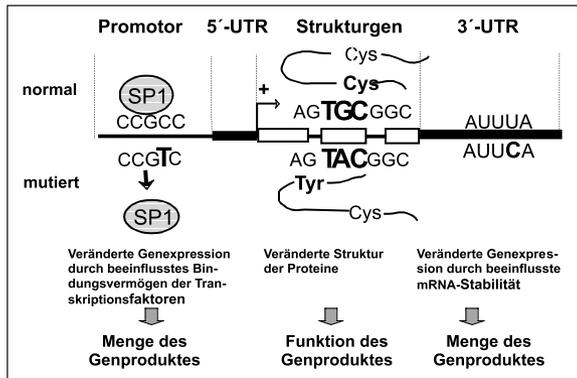
Formen von Genen. Am einfachsten sind die Gene strukturiert, die keine Introns haben. Sie sind selten. Die für Chromosomenstrukturen wichtigen Histonogene oder einige der Hitzeschockproteingene gehören dazu. Die zweite Gruppe bilden die von Introns unterbrochenen Gene, die für jeweils ein einziges Protein kodieren. Diese Gene sind häufig. Ein typisches Beispiel sind die Hämoglobingene. Die dritte Gruppe bilden die Gene, die Introns haben und deren RNA alternativ prozessiert werden kann. Diese ebenfalls relativ häufig vorkommenden Gene veranlassen die Bildung von mehr als einem Protein. Ein Beispiel sind die Troponin-T-Gene (Troponin T hat eine Kontrollfunktion bei der Kontraktion des Muskels). Die vierte Gruppe schließlich enthält Antikörper- und T-Zell-Rezeptorgene, die erst im Verlauf der somatischen Reifung von Lymphozyten in ihrer endgültigen Form entstehen. Die Gene der ersten drei Gruppen werden in der Form vererbt, in der sie gebraucht werden. Die Gene der vierten Gruppe werden mit ihren nicht exprimierbaren Genfragmenten vererbt und erst später in ihre endgültige Form umgewandelt.

Die Funktion der Gene ist eng an ihre Struktur gebunden

Grundsätzlich sind alle Organismen im physikalischen Sinne »offene« Systeme, da sie sowohl in einem Stoff- und Energieaustausch mit ihrer Umgebung stehen. Und es sind die Gene, in der Erbsubstanz DNA, die in der Sequenz ihrer Bausteine die Informationen für Proteine tragen und damit für den Stoffwechsel von Zellen und Geweben verantwortlich sind. Varianten in allen Genabschnitten können die Menge und die Funktion des Genproduktes Formen von Genen. Am einfachsten sind die Gene signifikant beeinflussen (siehe Abbildung 2).

Im Promotor, der funktionell als eine DNA-Sequenz oberhalb eines Strukturgens definiert werden kann, führen cis-dominante Mutationen über den direkten Einfluß auf die Interaktion zwischen RNA-Polymerase und Promotor zur Verände-

Abbildung 2: Die Funktion der Gene ist eng an ihre Struktur gebunden. Varianten in allen Genabschnitten können die Menge und die Funktion des Genproduktes signifikant beeinflussen



Die Expression der Expressionsrate des Gens. Nonsense- oder Fehlsinnmutationen im Strukturgenbereich selbst können zu Genprodukten mit veränderten biologischen Eigenschaften bzw. unvollständigen biologisch inaktiven Genprodukten führen. Wechselwirkungen zwischen den beiden Enden der mRNA (5'-UTR, 3'-UTR) sind in die Translation und den mRNA-Umsatz integriert. Varianten in den regulatorischen Elementen der UTR beeinflussen diese Wechselwirkung signifikant.

Strukturgenvarianten – Molekulare Ursache vieler Erbkrankheiten oder monogen vererbter Merkmale

Auch wenn z.B. weder »Krankheits-« noch »Gesundheitsgene« klar definiert werden können, bieten die neuen gentechnischen Verfahren der Genomanalyse die Möglichkeit des eindeutigen Nachweises von Genvarianten, die mit phänotypischen Merkmalen signifikant assoziiert sind.

Beispiel hierfür sind beim Rind Befunde, daß Varianten im Argininsuccinatsynthetase (ASS)-Gen zum perinatalen Tod von Kälbern (Erbdefekt Citrullinämie), im Uridinmonophosphat-synthase-Gen zum fetalen Tod (Erbdefekt Defizienz der Uridino-

monophosphatsynthase, DUMPS) oder im (2-Integrin-Gen zu chronischen Infektionen oder Kümertum (Erbdefekt Bovine Lymphozytenadhäsionsdefizienz, BLAD) führen. Allen genannten Erbdefekten ist gemein, daß Einzelbasenpaarpolymorphismen im Bereich der jeweiligen Strukturgene zu veränderten Aminosäurezusammensetzungen (BLAD) bzw. zu STOP-Signalen (DUMPS, Citrullinämie) führen und dadurch eine verminderte biologische Aktivität bzw. die Synthese unvollständiger Genprodukte mit dramatischen physiologischen Auswirkungen verursachen.

Eine Deletion im Myostatingen, die zur Synthese eines unvollständigen inaktiven Proteins führt, stellt die kausale Mutation der Muskelhypertrophie beim Weißblauen Belgischem Rind dar.

Beim Schwein wurde eine Variante im Ryanodinrezeptorgen als die molekulare Ursache des Maligne-Hyperthermie-Syndroms mit den bekannten negativen Effekten in Hinsicht auf Tierverluste und Fleischbeschaffenheit identifiziert. Ein Aminosäureaustausch in diesem Gen bewirkt ein unkontrolliertes Ausströmen von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma. Durch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und die gleichzeitige Aktivierung der Proteinkinase C wird eine natürliche Reizung der Zelle vorgetäuscht.

Promotorvarianten beeinflussen signifikant das DNA-Protein-Bindungsvermögen und die Genexpression

Die dramatisch gesteigerte Biosynthese von Hitzeschockproteinen bei Stresseinfluß ist ein charakteristisches Merkmal der zellulären Stressantwort. Während diese Proteine im ungestreßten Organismus die Faltung und Zusammenlagerung von neu synthetisierten Proteinen unterstützen, fördern sie im gestreßten Organismus die Rückfaltung und Renaturierung von Proteinen, die infolge Streß denaturiert sind. Die Promotorregion dieser Gene ist von besonderem Interesse, da die Genexpression insbesondere unter transkriptioneller Kontrolle

steht. Die Promotoregion des porcinen hitzeinduzierbaren hsp70.2-Genes wurde analysiert, um DNA-Polymorphismen in potentiellen Transkriptionskontrolelementen zu identifizieren. Zwei Polymorphismen – eine (-45) C/A-Tranversion in einer invertierten GC-Box and eine (-6) G/A Transition in einer potentiellen Initiatorregion (InR) –, bewirkten eine signifikante Abnahme des DNA-Protein-Bindungsvermögens dieser Promotorbereiche und beeinflussten signifikant die hitzeinduzierte Expression des hsp70.2-Genes (Schwerin et al., 2000). Dabei wirkt das in GC-Box bindende Protein transkriptionsfördernd, während das in der potentiellen Initiatorregion bindende Protein einen transkriptionshemmenden Effekt zeigt. So führte das im »electrophoretic mobility shift assay« nachgewiesene verminderte Proteinbindungsvermögen der mutierten Proteinbindungsstellen bei der GC-Box-Mutation zu einer Abnahme der und bei der InR-Mutation zu einer Zunahme der Expression.

3'-UTR-Varianten beeinflussen die Stabilität der mRNA-

Das zytoplasmatische Leben einer mRNA dreht sich um die Regulation ihrer Lokalisation, Translation und Stabilität. Wechselwirkungen zwischen beiden Enden der mRNA (5'-UTR, 3'-UTR) beeinflussen Translation und mRNA-»turnover« (Wikens et al., 1997). Regulatorische Elemente in der Region zwischen dem Terminationskodon und dem poly (A)-Schwanz – die 3'untranslatierte Region – die in einer Vielzahl mRNAs identifiziert wurden, spielen eine Schlüsselrolle by der Degradation der mRNA. In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine 3'-UTR-Variante im porcinen hsp70.2-Gen zu einer Verdopplung der Lebensdauer der mRNA führte.

Wie am Beispiel der Stressproteingene gezeigt: In allen Abschnitten von Genen können Varianten mit signifikantem Einfluß auf die Expression bzw. auf die Qualität der Genprodukte auftreten. Und: Diese Effekte der Varianten in den einzelnen Genab-

schnitten können sich einander kompensieren! Dieses mögliche Auftreten von einander kompensierenden funktionellen Varianten innerhalb eines Gens weist auf die Grenzen von Kandidatengenexperimenten hin, in denen oft nur ein Polymorphismus in seiner Beziehung zum interessierenden Merkmal untersucht wird. Die häufig berichteten widersprüchlichen Ergebnisse von Kandidatengenuntersuchungen in verschiedenen Populationen oder Familien könnten zumindest teilweise auf dieses Phänomen zurückzuführen sein. Derartige widersprüchliche Ergebnisse schließen solche Gene nicht als Kandidatenlocus aus.

Nachweis und Nutzung von merkmalsassoziierten Genvarianten

Die genetische Diagnostik gehört zu den innovativsten Bereichen der modernen Medizintechnik. Die Besonderheit der gendiagnostischen Testverfahren besteht nicht nur darin, daß die ihnen zugrunde liegenden technischen Verfahren neu sind, sondern daß sie Prognosen über künftige Eigenschaften oder Krankheiten des betreffenden Individuums erlauben. Zur Entwicklung gendiagnostischer Testverfahren müssen die Gene identifiziert werden, welche die Ausprägung des entsprechenden Merkmals beeinflussen. Gegenwärtig ist die Zahl von Genen, die Kandidaten für die Beeinflussung tierischer Leistungen und damit die Basis für die Entwicklung gendiagnostischer Tests bilden können, noch sehr begrenzt.

Im Zusammenhang mit der Genomanalyse werden zwei Kategorien von Kandidatengen unterschieden: die funktionellen und die positionellen Kandidatengene. Positionelle Kandidatengene stellen solche Gene dar, die physisch im Bereich kartierter QTL-Regionen lokalisiert sind, während unter funktionellen Kandidatengen solche Gene darstellen, deren Genprodukte signifikant an der Merkmalsausprägung beteiligt sind. Damit sind die begrifflichen Voraussetzungen gegeben, Relevanz und Bedeutung von Genvarianten für die Merkmalsausprägung einzuschätzen.

Intergene Wechselwirkungen – Signifikante Komponente der Merkmalsausprägung

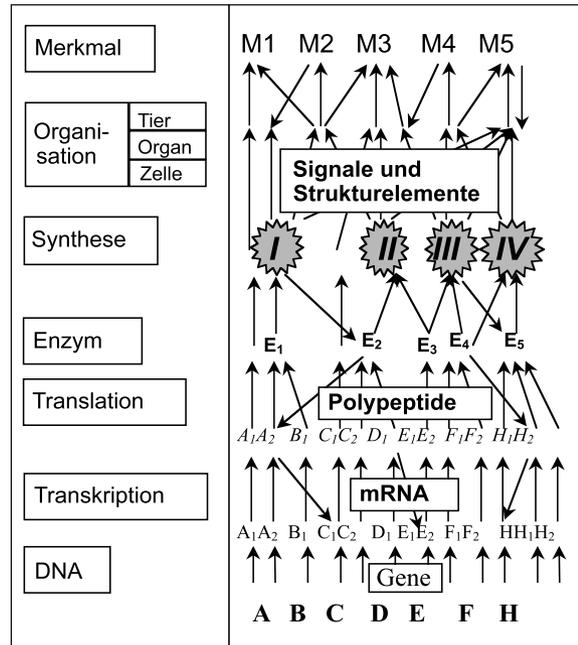
Die Merkmalsausprägung ist kein »starrer« Prozeß. Einerseits unterliegt die DNA selbst ständig sequenzverändernden Einflüssen. Durch z. B. Fehler in der Replikation oder Rekombination von DNA oder Einwirkungen von Schadstoffen können Mutationen entstehen, von denen einige in der Lage sind die Expression und die Funktion des betroffenen Proteins zu verändern. Andererseits können innere und äußere Faktoren auf allen Stufen der primären und sekundären Genwirkung (siehe Abbildung 3) sowohl Struktur als auch Funktion und Wechselwirkung der biologisch wirksamen Moleküle des Organismus und damit die Merkmalsausprägung beeinflussen. Gene und Genvarianten sind nur eine, wenn auch grundlegende Komponente der Merkmalsausprägung und -differenzierung. Die Berücksichtigung der intergenen Wechselwirkung stellt eine wesentliche Voraussetzung für das Verständnis der genetischen Ursachen der Merkmalsausprägung dar.

In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Organismus wird, beeinflusst von den jeweiligen genetischen und den Umweltfaktoren, gewebespezifisch nur ein spezifischer Teil des Genoms exprimiert (beim Säuger werden von den angenommenen 60.000 bis 150.000 Genen etwa 5.000 bis 15.000 Gene je Zelle gleichzeitig exprimiert, Liang and Pardee, 1992).

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Bedeutung intergener Wechselwirkungen bei der Merkmalsausprägung ist die Bestimmung der Expressionsmuster, d. h. der exprimierten Moleküle, in den Erfolgsorganen, die mit einer gewünschten Leistungsausprägung und hohen Tiergesundheit einhergehen.

Durch die Entwicklung moderner Verfahren der Molekularbiologie und der Bioinformatik sind die methodischen und technischen Grundlagen geschaffen, derartige Informationen zu gewinnen,

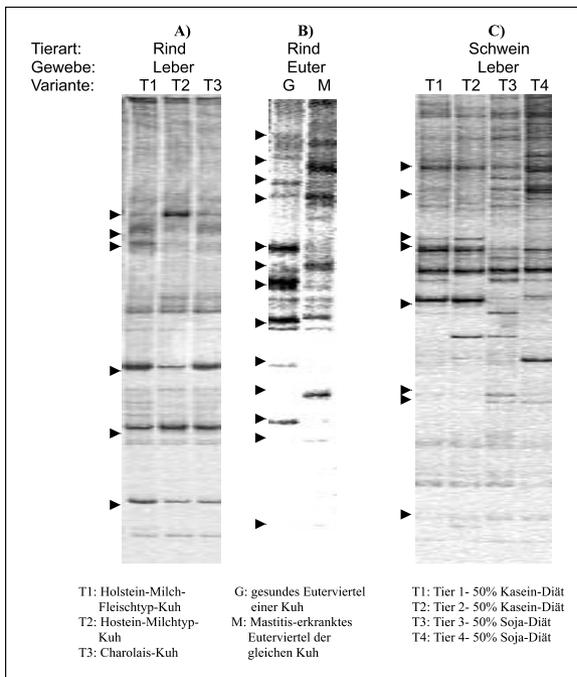
Abbildung 3: Stufen der primären und sekundären Genwirkung



wie z. B. das Verfahren des »mRNA differential display« und die »cDNA array«-Technik.

Das Verfahren des »mRNA differential display« (nach Liang und Pardee, 1992), das die vergleichende elektrophoretische Darstellung transkribierter Moleküle nach RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) umfaßt, erlaubt die Identifizierung von mRNAs, die zwischen unterschiedlichen Geweben eines Tieres, in gleichen Geweben bei verschiedenen Tieren unterschiedlicher Entwicklungsabschnitte oder unterschiedlichen Stoffwechselformen bzw. in gleichen Geweben von Tieren verschiedener Umwelten, different exprimiert werden. Durch den Einsatz spezifischer DNA-Primer (5'-3': »arbitrary«-Primer; 3'-5': Poly-dT-Primer) in der RT-PCR wird erreicht, daß in Abhängigkeit von der spezifischen

Abbildung 4: Vergleichende elektrophoretische Darstellung von cDNA-Bandenmustern nach »mRNA differential display« in ausgewählten Geweben von Rind und Schwein bei Tieren unterschiedlichen Stoffwechselftyps, mit und ohne Entzündung des Euters bzw. bei Fütterung verschiedener Protein-Diäten (different zwischen den Vergleichsvarianten exprimierte Banden sind mit Pfeilen markiert)



Basenabfolge der jeweiligen mRNA bzw. cDNA unterschiedlich lange PCR-Produkte erzeugt werden. Ein PCR-Produkt spezifischer Länge definiert ein spezifisches cDNA-Molekül. In der Abbildung 4 sind exemplarisch Expressionsmuster ausgewählter Gewebe bei Rind und Schwein von Tieren verschiedenen Stoffwechselftyps, unter dem Einfluß einer bakteriellen Entzündung des Organs bzw. bei Verfütterung verschiedener Diäten dargestellt. Die Pfeile markieren cDNA-Banden, welche zwischen

den Vergleichsgruppen, -tieren bzw. -gewebeproben unterschiedlich ausgeprägt sind. Der hohe Anteil different exprimierter mRNAs zwischen den jeweiligen elektrophoretischen Vergleichsspuren veranschaulicht, daß sowohl genetische aber auch und insbesondere Umweltfaktoren signifikant die Expression in den Zielgeweben beeinflussen.

Die »microarray«-Technik, die die Isolierung zellulärer mRNA, die Erzeugung von entsprechenden cDNA-Bibliotheken und die Erstellung von cDNA-Mikroarrays, die den Großteil der exprimierten Moleküle (ESTs) einer Zelle enthalten, umfaßt, hilft ein neues Zeitalter der Biologie zu eröffnen, wo Tausende von Molekülen gleichzeitig analysiert werden können (Marra et al., 1998). Die Kombination ESTs-basierender Technologien mit neuen Instrumenten der Bioinformatik ermöglichen die Bearbeitung und Interpretation dieser Informationsfülle und erlauben nicht nur die Identifizierung der Gene, welche in den jeweiligen Zellen in der konkreten Situation exprimiert werden, sondern auch die Definition komplexer phänotypischer Merkmale durch ein komplexes epigenetisches Netzwerk von interagierenden Genen, Proteinen und Umweltfaktoren (Zweiger und Scott, 1997). Der Zugang und die Verknüpfung dieser vielfältigen Informationen über Genom, Stoffwechsel und Umweltfaktoren läßt auch einen wesentlichen Beitrag für die Ermittlung und Gestaltung tiergerechter Haltungsbedingungen erwarten.

Schlußfolgerungen

Die Aufklärung der Struktur und Funktion von Genen wird Beiträge zur sicheren Erkennung von Anlagenträger für Erbkrankheiten und damit für die Verhinderung ihrer Ausbreitung und das Vermeiden von Schmerz und Leiden bei den Merkmalsträgern liefern. Die Kenntnis kausaler merkmalsbeeinflussender Genvarianten bildet eine wichtige Grundlage für ihre effiziente Nutzung im Rahmen der Marker-gestützten Selektion (wirtschaftlicher Gewinn, höherer Zuchtfortschritt, flexiblere Reaktion auf

Verbraucherwünsche). Darüber hinaus wird die Analyse komplexer merkmals- und umweltassoziierter Expressionsprofile eine sichere Erkennung tierspezifischer Anforderungen und damit die Erarbeitung objektiver Kriterien für tiergerechte Haltungsbedingungen ermöglichen.

Die Aufklärung der genetischen und physiologischen Grundlagen quantitativer Merkmale erfordert komplexe Untersuchungen auf allen Stufen der Merkmalsausprägung unter Einbeziehung aller Ansätze, wie des Kandidatengenansatzes, des QTL-Kartierungsansatzes und der ESTs-Technologie.

Literatur:

- ALBERTS, B. et al., 1992: Molecular Biology of the Cell. New York.
- FISCHER, E. P., 1988: Gene sind anders. Hamburg.
- GOFFEAU, A., 1994: Genes in Search of a Funktion. Nature, 369, 101.
- HEYNINGEN, V., 1994: One Gene – Four Syndromes. Nature, 367, 319.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B., 1992: Science 257, 967.
- MARRA, M. A. et al., 1998: Expressed sequence tags – ESTablishing bridges between genomes. Elsevier Science Ltd., 4.
- SCHWERIN, M. et al., 1999: J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr. 81, 113.
- WATSON, J. D. et al., 1987 (4th ed.): Molecular Biology of the Gene. Menlo Park.
- WATSON, J. D. et al., 1992 (2nd ed.): Recombinant DNA. New York.
- ZWEIGER, G. & SCOTT, R. W., 1997: Biotechnology 8, 684.

DNA-Variation – Polymorphismus – Genetische Variation



Genetische Variation – das Substrat der Tierzucht

Das Phänomen der genetischen Variation oder Variabilität wird genetisch-statistisch als **genetische Varianz** festgehalten. Ohne genetische Variation gibt es keinen Zuchtfortschritt. Der Zuchtfortschritt (R) hängt folgendermaßen von der Quadratwurzel der Heritabilität (h), der Selektionsintensität (i) und der (additiv-) genetischen Standardabweichung ($\sigma_a = \text{Quadratwurzel der additiv-genetischen Varianz}$) ab: $R = i h \sigma_a$.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die genetische Variation ein Hauptthema der Tierzuchtfor- schung darstellt. Folgende Fragestellungen stehen dabei im Vordergrund:

- Ist genetische Variation eine unerschöpfliche Ressource?
- Welches ist die molekulare Grundlage der genetischen Variation?

Zur ersten Fragestellung ist in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts intensiv geforscht worden. Der sogenannte **Bulmer Effekt** beschreibt, wie Selektion zu einer Verminderung der genetischen Variation (und damit der Heritabilität) führt. Die konkrete Frage lautet: In welchem Ausmaß wird der Rückgang der genetischen Variation durch Mutation kompensiert? Dazu wurden Langzeitselektionsversuche bei Mäusen und *Drosophila* angestellt. In all diesen Experimenten wurde das Selektionsplateau nach 20–30 Generationen erreicht. Mutation vermag also den Rückgang der genetischen Variation inner-

halb einer beschränkten Anzahl von Generationen in geschlossenen experimentellen Populationen nicht zu kompensieren. Die in diesen Experimenten erzielten Zuchtfortschritte sind jedoch nicht besonders spektakulär, wenn man sich die Erfolge der Nutztierzucht vor Augen hält. So waren nach etwa 20 Generationen bei Selektion auf hohes und niedriges 6-Wochengewicht die schweren Mäuse 2,5 mal schwerer als die leichten Mäuse. Im Gegensatz dazu sind die schwersten Hunderassen 100 mal schwerer als die leichtesten Rassen. Falconer and Mackay (1996, Seiten 217/218) haben dazu folgende Erklärung: »Die Tierzüchter werfen ihre Netze viel weiter aus auf der Suche nach vorteilhaften Genen und können dadurch Mutationen (einige davon mit besonders großen Effekten) nutzen, die in anderen Populationen stattgefunden haben«. Das sogenannte Booroola-Gen des Schafes oder das Muskelhypertrophie-Gen des Rindes sind bekannte Beispiele für solche Mutationen. Der Tierzüchter hat also Zugriff auf die gesamte genetische Variation innerhalb einer Art. Genetische Variation ist deshalb im tierzüchterischen Kontext praktisch eine unerschöpfliche Ressource. Voraussetzung ist allerdings, dass die genetische Variation oder genetische Diversität in der Form der Rassevielfalt der einzelnen Nutztierarten mindestens auf dem jetzigen Niveau erhalten bleibt.

Seit der Mitte des zu Ende gehenden Jahrhunderts sind die molekularen Grundlagen der Vererbung bekannt. Das entsprechende Methodenreper-

toire hat sich bis hin zur Möglichkeit der Feststellung der Basenabfolge ganzer Genome entwickelt. Im Zuge dieser Entwicklungen etablierte sich innerhalb der Tierzuchtforschung in den letzten 20 Jahren eine Richtung, welche sich mit der »**molekularen Kehrseite**« der genetischen Variation befasst. Im Vordergrund steht dabei Variation, die durch Mutationen mit überdurchschnittlichen Effekten verursacht wird.

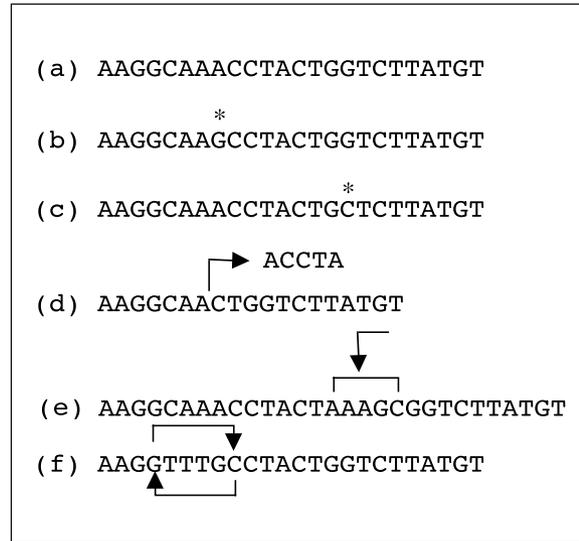
DNA-Variation

Wenn aus einer Population zufällig zwei homologe Chromosomen herausgegriffen werden und die Basenabfolge dieser Chromosomen verglichen wird, kann man eine ganze Reihe von Unterschieden feststellen. Diese **Variation auf DNA-Ebene** ist letztlich die Grundlage des Phänomens, das wir als genetische Variation beobachten. Wenn einzelne DNA-Varianten in einer Frequenz auftreten, welche deren Entdeckung in einer zufälligen Stichprobe von 100 Chromosomen möglich macht, spricht man von **Polymorphismus**. DNA-Variation basiert grundsätzlich auf folgenden Mutationstypen: **Basenaustausch** (Transition, Transversion), **Insertion/Deletion** und **Inversion** (Abbildung 1).

Die beste Methode zur Darstellung von DNA-Variation ist die Bestimmung der Basenabfolge. Es ist zur Zeit jedoch noch nicht praktikabel, diese Abfolge bei einer großen Anzahl von Individuen zu bestimmen. Historisch gesehen war die Darstellung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) der erste Ansatz zur Darstellung von DNA-Variation im großen Rahmen (Botstein et al. 1980). Der Nachteil dieser Methodik ist, dass damit nur Basenaustausche dargestellt werden können, die eine Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym betreffen. Trotz dieser Limitation konnten beim Menschen genomweite DNA-Markerkarten auf dieser Basis erarbeitet werden.

Ein häufiger Typ von DNA-Variation beruht auf der unterschiedlichen Anzahl von repetitiven DNA-Elementen, die auf Insertions-/Deletionsereignisse

Abbildung 1: Mutationstypen. (a) Ursprüngliche Sequenz; (b) Transition von A zu G; (c) Transversion von G zu C; (d) Deletion der Sequenz ACCTA; (e) Insertion der Sequenz AAAGC; (f) Inversion von 5'-GCAAAC-3' zu 5'-GTTTGC-3'



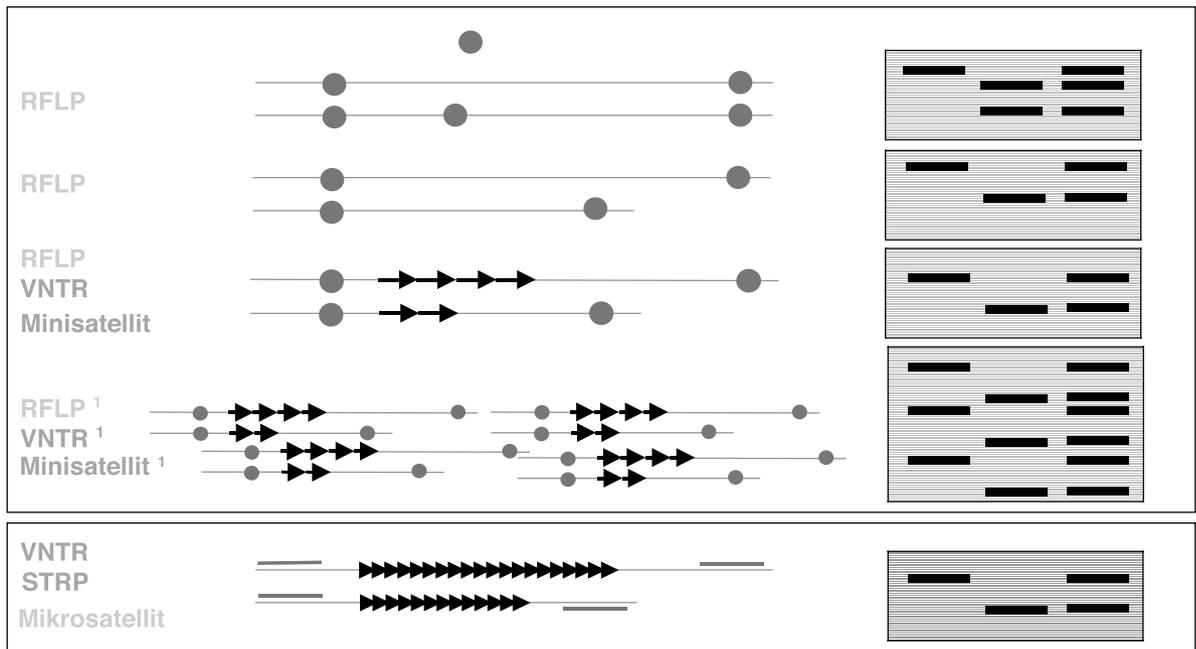
zurückzuführen ist. Man spricht deshalb von Variable Number of Tandem Repeats (VNTR). Wenn die repetitiven Blöcke aus Einheiten von 1 bis 5 Nukleotiden bestehen, spricht man von **Mikrosatelliten** (Litt and Luty 1989; Weber and May 1989). Blöcke mit Einheiten, die zwischen 5 und 100 Nukleotide umfassen, nennt man **Minisatelliten** (Jeffreys et al. 1985). **Satelliten** schließlich können sich bis über 5 Millionen Nukleotide erstrecken. (Der Name »Satellit« geht übrigens auf dem Befund zurück, dass diese DNA-Einheiten nach der Zentrifugierung der Gesamt-DNA in einem Dichtegradienten als separate Fraktionen, als sogenannte Satelliten sichtbar werden. Die Bezeichnungen »Mini«- bzw. »Mikrosatellit« sind von »Satellit« abgeleitet. Mini- und Mikrosatelliten können nicht mittels Zentrifugation in Dichtegradienten separiert werden.)

Mikrosatellitenpolymorphismen werden auch als Short Tandem Repeat Polymorphisms (STRP) bezeichnet. Während RFLPs allgemein und Minisatellitenpolymorphismen speziell mittels der Southern-Blot-Methode dargestellt werden, erfolgt die Visualisierung von Mikrosatellitenpolymorphismen über die Polymerase Chain Reaction (PCR). In Abbildung 2 findet sich eine Übersicht über die verschiedenen Typen von DNA-Variation und deren Darstellung.

Das häufigste Mikrosatellitenmotiv ist das Dinukleotid Cytosin - Adenin (CA) bzw. Thymin - Guanin (GT). Beim Rind wird das Vorkommen von

Mikrosatelliten, die auf diesem Motiv beruhen, auf 44'000 geschätzt. Davon dürften sich aber weniger als zehntausend als Marker eignen. Bei den Nutztierarten Rind, Schwein und Huhn liegen inzwischen Markerkarten mit je ein- bis zweitausend Einträgen vor. Diese Karten werden über die Kopplungsanalyse zur Kartierung von sogenannten QTL (Quantitative Trait Loci) eingesetzt. Dabei wird DNA-Variation systematisch dazu genutzt, die Ausgangspunkte genetischer Variation mehr oder weniger genau auf der Genomkarte festzuhalten. Der Erfolg von Kartierungsexperimenten hängt vom Ausmaß der genetischen Variation, die durch die zu kartierenden

Abbildung 2: Die verschiedenen Arten von DNA-Variation und deren Darstellung. Die Linien symbolisieren die DNA-Sequenz. Die gefüllten Kreise stellen das jeweilige Restriktionsenzym, die Pfeile bzw. die Pfeilspitzen die repetitiven Einheiten dar. Die kürzeren Linien in »VNTR-STRP-Mikrosatellit« symbolisieren die PCR-Primer. Auf der rechten Seite wird das Resultat der Gelelektrophorese jeweils für die beiden homozygoten Zustände (links und Mitte) und den heterozygoten Zustand (rechts) schematisch dargestellt



¹ Gleichzeitige Darstellung von RFLPs an verschiedenen Loci durch die Verwendung von Sonden aus der repetitiven Sequenz.

Genorte erklärt wird, vom Polymorphismusgrad der Marker und der Dichte der Markerkarte ab. Mikrosatelliten eignen sich aus folgenden Gründen besonders gut für die Erstellung von Markerkarten:

- Mikrosatelliten kommen im Genom relativ häufig vor und ermöglichen somit ein Markernetz mit einer »Maschenweite« bis zu einem Centimorgan.
- Mikrosatelliten weisen jeweils mehr als zwei Allele auf und sind damit meistens hochpolymorph.

Bei Rind, Schwein und Huhn sind eine ganze Reihe von QTL kartiert worden. Georges et al. (1995) haben zum ersten Mal beim Rind in einem größeren Rahmen QTL kartiert. Die entsprechenden Mikrosatelliten-Markerkarten weisen eine »Maschenweite« von ungefähr 20 Centimorgan auf.

Mikrosatellitenmarker werden auch für die **Abstammungskontrolle** und Individualidentifikation verwendet. Der hohe Polymorphismusgrad der einzelnen Marker führt dazu, dass bei der Abstammungskontrolle schon mit 10 Markern hohe Abschlusswahrscheinlichkeiten erzielt werden können. Wenige Loci reichen aus, um einen unverwechselbaren »DNA-Fingerabdruck« eines Individuums zu erzeugen. Beim Pferd basiert die Abstammungskontrolle schon weitgehend auf Mikrosatellitentypisierung. Bei Schwein und Rind werden Mikrosatelliten komplementär zur Blutgruppen- und Serumproteinuntersuchung verwendet. Bevor jedoch vor allem beim Rind die Abstammungskontrolle und die Individualidentifikation ausschließlich auf Mikrosatellitenbasis durchgeführt wird, sollten folgende Problempunkte von Mikrosatelliten bedacht werden:

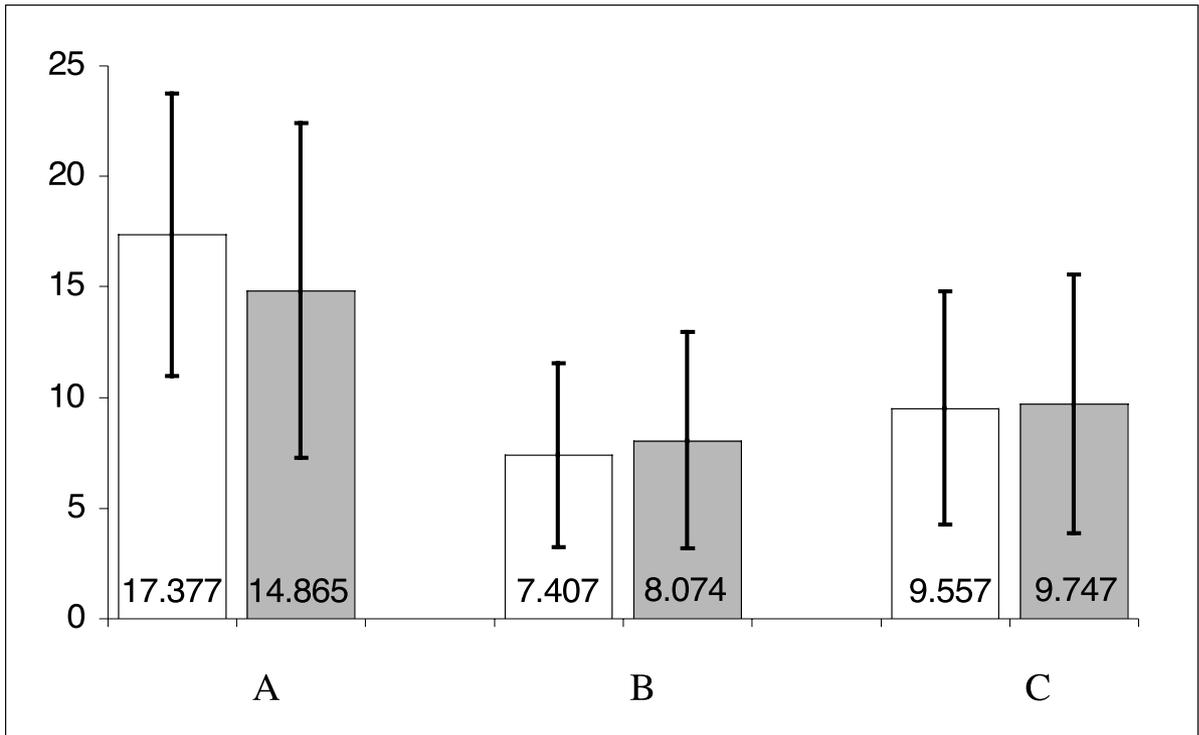
- Die Mutationsrate (Insertion oder Deletion von einer oder mehreren repetitiven Einheiten) ist mit 10^{-3} je Locus und Gamet relativ hoch. Das bedeutet, dass in der Abstammungskontrolle mit dem Auftreten neuer Allele gerechnet werden muss und somit der Ausschluss einer Elternchaft immer auf mindestens zwei Mikrosatellitenloci basieren sollte.

- Das Ansprechen eines Mikrosatellitenallels basiert auf der elektrophoretischen Mobilität des entsprechenden PCR-Produktes. PCR Produkte mit gleicher Mobilität weisen nicht notwendigerweise auf abstammungsidentische Allele hin, da unterschiedliche Mutationen sowie Rückmutationen zu Allelen mit gleicher Anzahl Nukleotide führen können.
- Die Genotypisierung von Mikrosatelliten läßt sich kaum standardisieren. Die Mobilität eines PCR-Produktes hängt nicht nur von der molekularen Masse des DNA-Fragmentes ab, sondern auch von den Elektrophoresebedingungen. Das führt dazu, dass in der Praxis alle Individuen eines Elternschaftsfalles im gleichen Gel analysiert werden müssen. Bereits vorhandene Typisierungsergebnisse können also nicht verwendet werden.

Diese Problematik der Mikrosatelliten sowie neue technologische Möglichkeiten haben dazu geführt, dass man sich in den letzten zwei bis drei Jahren auf die am häufigsten vorkommende Form von DNA-Variation, die Einzelnukleotidaustausche zurückbesann. Die Überlegung, dass es diese Art von Mutation ist, die in den meisten Fällen genetische Variation verursacht, war eine weitere Motivation, sich mit Einzelnukleotidaustauschen zu beschäftigen. Die auf Einzelbasenaustauschen basierenden Polymorphismen werden als Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) bezeichnet. Dieser Typ von Polymorphismus ist im Prinzip oben schon unter den RFLPs besprochen worden, die auf Einzelnukleotidaustausche in Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zurückzuführen sind.

Die zuverlässigste Methode für das Auffinden SNPs ist die Bestimmung der Sequenzabfolge bei Tieren, die eine Stichprobe der Population darstellen. Sequenzierautomaten und spezielle Software zur Interpretation der Elektropherogramme im Hinblick auf Polymorphismen ermöglichen einen hohen Durchsatz. Wir haben in einem Pilotexperiment 18'330 Nukleotide an 36 Loci sequenziert und

Abbildung 3: Schätzungen inkl. Standardfehler des Nukleotidpolymorphismus (weiße Balken) und der Nukleotiddiversität (graue Balken) auf Grund der Sequenzierung von drei Tieren der Fleckviehrasse, drei Tieren der Holsteinrasse und je einem Tier der Rassen Kerr, Angus, Hariana (*Bos indicus*) und Sahival (*Bos indicus*) (A), der drei Fleckviehtiere (B) und der drei Holsteintiere (C). Die Schätzwerte sind mit dem Wert 10'000 multipliziert. Die Berechnung der Schätzwerte basiert auf Hartl and Clark (1997)

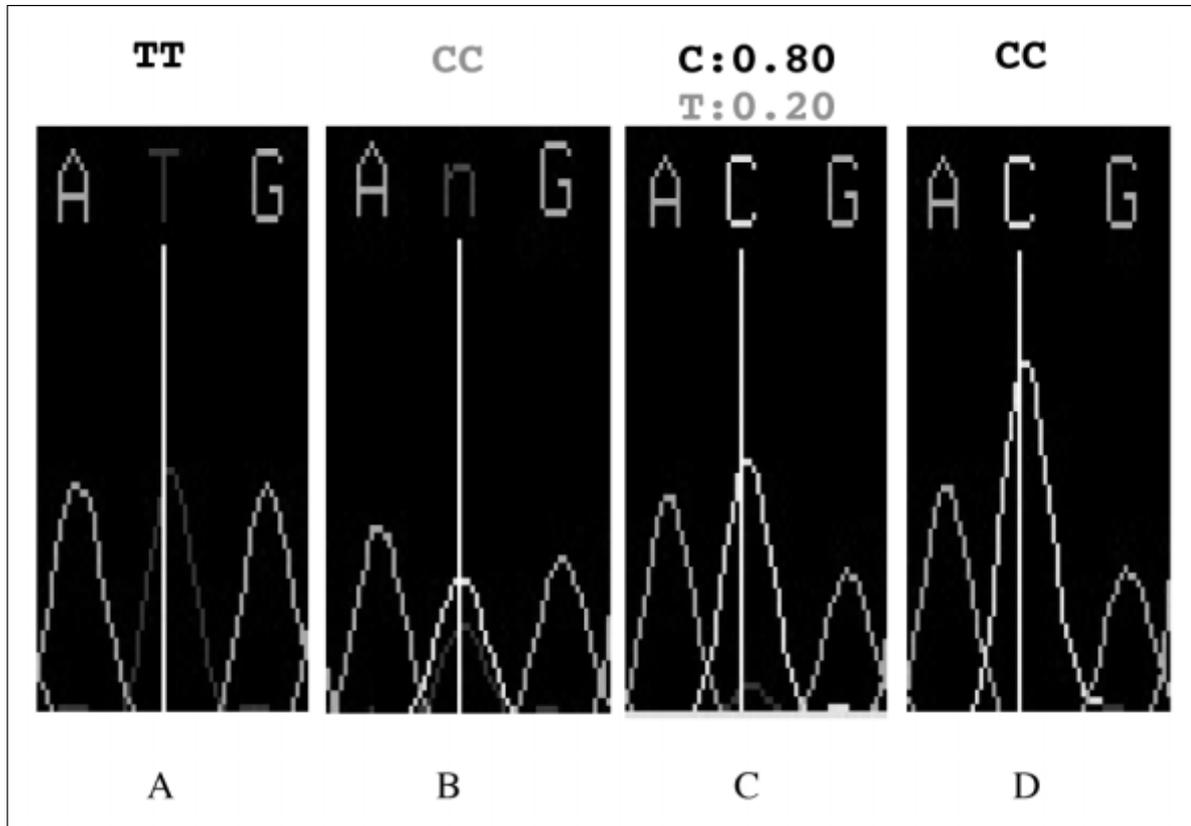


dabei 113 SNPs identifiziert. In Abbildung 3 sind die beiden Parameter **Nukleotidpolymorphismus** und **Nukleotiddiversität** aufgeführt, die normalerweise für die Charakterisierung der DNA-Variabilität verwendet werden. Aus diesen Werten läßt sich ableiten, dass man in 10'000 Nukleotiden beim Fleckvieh durchschnittlich 7.4 SNPs und bei der Rasse Holstein Friesian (HF) 9.5 SNPs findet. Weil die Stichprobe jeweils nur drei Tiere umfasste, ist der Standardfehler dieser Schätzungen natürlich sehr hoch. Ähnliche Werte findet man auch beim

Menschen. Die Frequenz der Allele in der HF-Population wurde durch die Sequenzierung eines DNA-Pools aus 10 Einzelproben auf Grund der Elektropherogramme vorgeschätzt (Abbildung 4). Diese Schätzungen stimmen sehr gut mit den Frequenzen überein, wie sie nachher durch die individuelle Typisierung von 35 Tieren festgestellt wurden.

Wenn von den SNPs, die wir bisher gefunden haben, die besten 14 (d. h. SNPs mit einer Frequenzverteilung möglichst nahe bei 0.5:0.5) hergenommen werden, ergibt sich für den Ausschluss

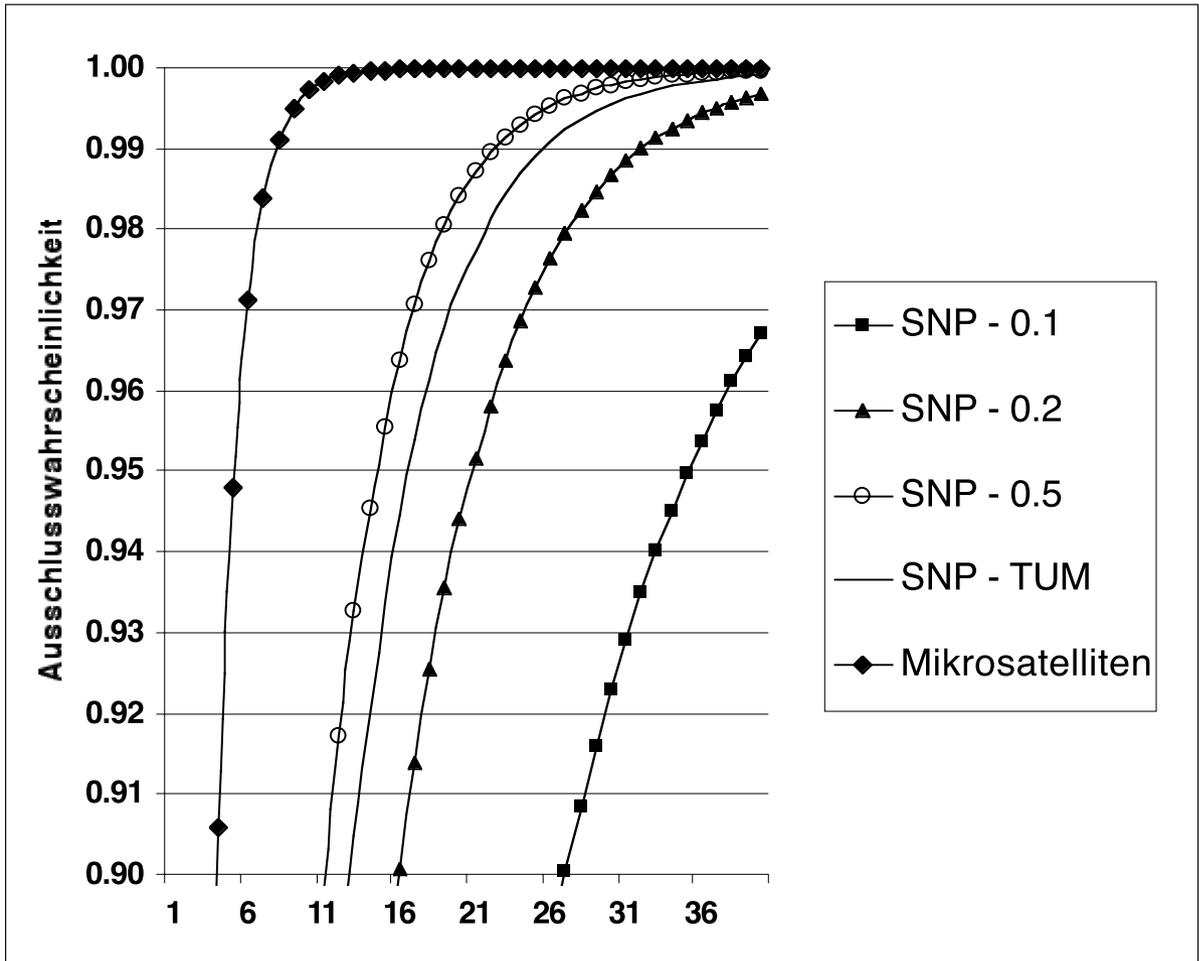
Abbildung 4: Schätzung der Allelfrequenz eines SNP mittels Direktsequenzierung von zwei Einzeltieren (A, B, D) und eines Pools aus zehn Einzelproben (C)



eines falschen Elternteils, wenn der andere feststeht, eine Wahrscheinlichkeit von 0.9212. Dieser Wert liegt zwar unter der entsprechenden Ausschlusswahrscheinlichkeit von 0.9996, die mit 11 Mikrosatelliten eines von der Firma Perkin Elmer vertriebenen Sets erreicht wird. Da die Mutationsrate, welche Einzelnukleotidaustauschen zu Grunde liegt, bedeutend kleiner ist als diejenige von Mikrosatelliten (Einzelnukleotidaustausch: 10^{-5} bis 10^{-6} , Mikrosatellit: 10^{-3}), reicht bei Verwendung von SNPs

der Ausschluss an einem Locus für einen definitiven Elternschaftsausschluss aus. SNPs weisen naturgemäß nur zwei Allele auf. Der Polymorphismusgrad liegt deshalb meistens unter demjenigen von Mikrosatelliten. Der Nachteil des niedrigeren Polymorphismusgrades der SNPs kann aber grundsätzlich durch den Einbezug von zusätzlichen Loci kompensiert werden. Um mit SNPs einer Qualität der oben genannten 14 eine Ausschlusswahrscheinlichkeit von 0.999 zur erreichen,

Abbildung 5: Ausschlusswahrscheinlichkeit für einen Elter, wenn der andere feststeht, berechnet nach Weir (1996). SNP -0.1, etc. beziehen sich auf die Frequenz des einen Allels. SNP-TUM basiert auf einem vom Lehrstuhl für Tierzucht und Molekulare Genetik der Techn. Univ. München entwickelten SNP-Set. Die Ausschlusswahrscheinlichkeit der Mikrosatellitenloci wurde auf Grund eines von Heyen et al. (1997) entwickelten Sets von Mikrosatelliten berechnet



müßten mindestens 35 Loci typisiert werden (Abbildung 5).

Der große Vorteil der SNPs liegt in ihrer Standardisierbarkeit. Die Sequenz, die einen SNP flankiert,

ist ein inhärenter, tierartspezifischer Standard. Mit den verschiedensten Methoden kann abgefragt werden, welches von zwei alternativen Nukleotiden an der variablen Position vorliegt. Die Antwort

kann digital als 10 (homozygot für das erste Allel) 11 (heterozygot) und 01 (homozygot für das zweite Allel) dargestellt werden. Wenn die Abfragen mehrere Loci kombiniert werden, ergibt sich, was wir als »digitale DNA-Signatur« eines Tieres bezeichnen. Solche Signaturen eignen sich nicht nur für die Abstammungskontrolle, sondern auch für die Individualidentifikation im Zusammenhang mit dem Herkunftsnachweis von tierischen Produkten. Eine Signatur aus 40 Loci (Allelfrequenz: 0.3 : 0.7) ist in hohem Maße individualspezifisch, d. h. die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen mit der gleichen Signatur auftreten ist $1 : 10^6$.

Wir haben die Initiative für den Aufbau einer Datenbank ergriffen, in die für eine gewisse Zeit Information zu SNPs bei den verschiedenen Nutztierarten einfließen soll (www.snpzoo.de). Nach dieser Zeit soll dann ein optimales Set von Loci in einer Internetabstimmung als jeweils tierart-spezifischer Standard bestimmt werden. Ein solcher Standard hat den großen Vorteil, dass Genotypisierungsdaten ausgetauscht werden können. Der Vergleich von Signaturen erfordert nicht die gleichzeitige Typisierung der Tiere wie es bei den Mikrosatelliten-Analysen faktisch notwendig ist. Wie schon angedeutet, ist es nicht von Bedeutung, welche Methodik zur Abfrage der variablen Positionen verwendet wird. Zur Zeit wird sehr viel in die Entwicklung effizienter Typisierungsmethoden investiert. Chip-basierte Ansätze sollen dabei einen sehr hohen Durchsatz ermöglichen und damit die Kosten zur Ermittlung einer einzelnen Signaturposition auf wenige Pfennige reduzieren. Wir verwenden zur Zeit einen Ansatz, der auf der hohen Alleldiskriminierungskapazität der Oligonukleotid-Ligase basiert. Die resultierenden Produkte der Ligationsreaktionen werden elektrophoretisch aufgetrennt, wobei für das Ansprechen der einzelnen Allele das Vorhanden- oder Nichtvorhandensein eines Fragmentes an einer bestimmten Position ausschlaggebend ist.

Die Korrelation von DNA-Variation mit genetischer Variation

Die große Herausforderung für die Tierzuchtforschung besteht nun darin, DNA-Variation mit genetischer Variation in Verbindung zu bringen. Die Kopplungsanalyse, wie sie oben im Zusammenhang mit Mikrosatellitenpolymorphismen kurz beschrieben wurde, stellt einen Ansatz dar, DNA-Variation mit genetischer zu korrelieren. Erste Resultate werden bereits in die Praxis umgesetzt. Das große Problem ist jedoch die Tatsache, dass die meisten Kartierungsexperimente relativ unpräzise Ergebnisse liefern, d. h. die kausale DNA-Variation ist in einem relativ großen Intervall zu suchen. Zur Zeit wird intensiv darüber nachgedacht, wie die Feinkartierung am besten zu bewerkstelligen ist. Wir gehen davon aus, dass SNPs in jedem Fall eine entscheidende Rolle spielen werden:

- SNPs erlauben die Markerabdeckung einer bestimmten Genomregion, von der genetische Variation ausgeht, bis zu einer Auflösung von einem Marker pro 1'000 Nukleotide. Die maximale Auflösung von Mikrosatellitenmarkern liegt bei einem Marker pro 340'000 Nukleotide. Alle Feinkartierungsstrategien setzen regionale Markerkarten mit einer Maschenweite von 0.1 Centimorgan (100'000 Nukleotide) voraus.
- SNPs eignen sich zur systematischen Erstellung von Signaturen der Allele positioneller und / oder physiologischer Kandidatengene, d. h. von Genen, in denen auf Grund ihrer chromosomalen Position und/oder physiologischen Bedeutung der Genprodukte die kausale Variation angesiedelt sein könnte. Die kausale DNA-Variante müsste im Falle der Kandidatengenbestätigung in einer der Allelsignaturen eingebettet sein.

Die initiale Kartierung eines Genortes mittels Kopplungsanalyse findet innerhalb von Familien statt. Aus diesem Grund wird zunächst nur ein kleiner Teil der gesamten allelischen Variation in einer Population berücksichtigt. Es wird in Zukunft wichtig sein, ganze Populationen in die Unter-

suchungen einzubeziehen. Es werden sicher schon bald Methoden zur Verfügung stehen, welche die SNP-Typisierung von Millionen von Tieren als realistische Option aufzeigen. Oft wird die Typisierung der extremsten Tiere von beiden Seiten der Verteilung der Merkmalsausprägung genügen. Es zeichnet sich jetzt schon ab, dass nicht so sehr die Genotypisierung sondern die systematische Beschaffung von Gewebeproben als Quelle für die DNA-Isolierung das größere Problem darstellen wird. Optimal wäre die Gewinnung einer Gewebeprobe im Rahmen der obligatorischen Tierkennzeichnung. Die DNA würde in einem Zentrallabor isoliert und platzsparend gelagert. In jedem Fall könnte eine standardisierte Signatur für die Individualidentifizierung und Abstammungskontrolle erstellt werden. Wenn sich später Tiere auf Grund der Leistungskontrolle oder der Exterieurbeurteilung als besonders interessant herausstellen, könnten die entsprechenden DNA-Proben angefordert und genotypisiert werden.

Ich bin mir bewusst, dass die systematische Korrelation von genetischer Variation mit DNA-Variation eine der ganz großen Herausforderungen der modernen Biologie darstellt. Mir ist auch bewusst, dass sich die polygene Variation des quantitativ-genetischen Modells, die auf theoretisch unendlich vielen Genorten beruht, immer der molekularen Charakterisierung entziehen wird. Es ist aber andererseits klar, dass dieses Infinitesimalmodell nicht fundamentalistisch aufgefasst werden sollte, und dass ein bedeutender Teil der genetischen Variation durch Genorte mit einem maßgeblichen Einfluss auf die gesamte genetische Variation bedingt ist. Ich habe versucht aufzuzeigen, wie man eine Brücke zwischen DNA-Variation und genetischer Variation schlagen könnte. Man hat aber sicher auch gespürt, dass ich der Gefahr ausgesetzt bin, der Faszination des Phänomens »DNA-Variation« zu erliegen und

die Untersuchung dieses Phänomens als »l'art pour l'art« zu betreiben. Ich hoffe aber, dass man mitbekommen hat, dass ich mich der intellektuellen Herausforderung stellen will, DNA-Variation in einen tierzüchterischen Kontext zu stellen. Ich möchte darauf aufmerksam machen, dass ich in meinen Ausführungen auf eine ganz wichtige Dimension von genetischer Variation, der Variation auf der Proteinebene überhaupt nicht eingegangen bin. Hier eröffnen sich spannende Perspektiven: Die Lösung des Faltungsproblems wird zur Konsequenz haben, dass zuverlässige Voraussagen zur Auswirkung von DNA-Variation auf die Struktur von Proteinen und damit der Funktion möglich werden!

Literatur

- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Falconer, D. S., Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*, Longman Group Ltd, Edinburgh, England.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A. T., Sargent, L. S., Sorensen, A., Steele, M. R., Zaho, A., Womack, J. E., Hoeschele, I. 1995. Mapping of quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Heyen, D. W., Beever, J. E., Da, Y., Evert, R. E., Green, C., Bates, S. R., Ziegler, J. S., Lewin, H. A. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Animal Genetics* 28: 21-27.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. 1985. Hypervariable »minisatellite« regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Litt, M., Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Weber, J. L. May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II. Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Somatischer Gentransfer



Als **somatischen Gentransfer** bezeichnet man die Einführung *in vitro* hergestellter DNA in somatische Zellen. Bei den Rezipientenzellen kann es sich um solche eines bestimmten Gewebes, mehrerer Gewebe oder um kultivierte Zellen handeln. Dabei können Gene in die Zellen eines Gewebes übertragen werden, während ihre Produkte in anderen Geweben wirken. Beispielsweise weisen die Kerne (Myonuclei) der Muskelfasern eine lange Lebensdauer auf. Transgene Myoblasten sichern daher eine potentiell lang andauernde Expression des eingeführten Gens. Dessen Produkt kann sezerniert werden, in die Blutbahn gelangen und z. B. als Hormon zur Regulation des Stoffwechsels in anderen Geweben beitragen. Zum somatischen Gentransfer gehört auch die **Gentherapie**, die auf therapeutische oder präventive Zwecke ausgerichtet ist.

Damit wird bereits die Frage nach den **Zielen** eines Gentransfers in Körperzellen aufgeworfen. Diese können sehr verschiedene sein: Genregulatorisch wirksame DNA-Bereiche sollen lokalisiert und charakterisiert werden. Merkmalswerte werden verändert, z. B. kann eine Veränderung des Wachstums erreicht werden. Die Reaktionsfähigkeit des Organismus kann modifiziert werden, z. B. wenn das Produkt der Transgen-Expression eine Antikörperreaktion auslöst. Bestimmte Zellklone im Organismus sollen eliminiert werden, z. B. bei der Abtötung von Krebszellen. Außerdem kann man in transgenen Zellen zusätzliche, wirtschaftlich nutzbare Peptide

erzeugen. Selbstverständlich sind auch die **Grenzen** beim somatischen Gentransfer zu bedenken: So wird nur +/- kleiner Anteil der Körperzellen/kultivierten Zellen transgen. Das Transgen wird nicht auf nächste Generation des betreffenden Individuums vererbt. Und die angestrebten Werte werden nicht immer erreicht.

Trotz dieser Grenzen wird der somatische Gentransfer in starkem Maße in die Forschungen einbezogen. In der wissenschaftlichen Literatur taucht ab etwa 1970 der Begriff Gentransfer auf. Erst ab etwa 1990 steigt die Zahl der Publikationen zum Thema Gentransfer stark an, wobei davon in letzten Jahren ca. 75 % der Publikationen den somatischen Gentransfer bzw. die Gentherapie betrachten. Fast alle Verfahren zum Gentransfer in somatische Zellen wurden bei der Maus entwickelt, mit dem Ziel einer späteren Nutzung in der Humanmedizin. Daneben gibt es aber auch eigenständige Verfahrensentwicklungen und Anwendungen in der Tiermedizin und -züchtung. Insbesondere hierauf bezogen werden nachfolgend die Arbeitsansätze und Anwendungsmöglichkeiten des somatischen Gentransfers dargestellt.

1 Einschleusen der DNA-Konstrukte in die Target-Zellen

Für die Zwecke der Transfektion von DNA-Konstrukten in Körperzellen haben sich vielfältige Verfahren entwickelt. Das zu wählende Transfekt-

tionsverfahren hängt im wesentlichen vom Transgen, vom Vektor und von den Eigenschaften des Zielgewebes ab. Hierbei spielt eine Rolle, ob der Transfer in kultivierte Zellen oder in Zellen innerhalb eines Organismus vorgenommen werden soll. Beim ***In-vivo*-Gentransfer (direkte Methode des Gentransfers)** wird das genetische Material direkt in ein oder mehrere Gewebe des betreffenden Individuums eingebracht. Der *In-vivo*-Gentransfer ist das einzig mögliche Verfahren, wenn die betreffenden Zellen *ex vivo* nicht ausreichend zu kultivieren sind oder wenn die kultivierten Zellen nicht erfolgreich in das betreffende Individuum zurückimplantiert werden können. Nachteile des *In-vivo*-Gentransfers sind die meist geringe Effizienz und die variable Zahl der nach einem Versuchsansatz erreichbaren transgenen Zellen. Ein Nachteil ist auch, dass nach *In-vivo*-Gentransfer keine Selektion von Zellen, die die eingeführten Gene enthalten und exprimieren, erfolgen kann. Daher hängt der Erfolg des *In-vivo*-Ansatzes wesentlich von der Effizienz des Gentransfers und der Stärke der Genexpression ab. Verbesserungen sind mit dem ***Ex-vivo*-Gentransfer (indirekte Methode des Gentransfers)** möglich. Hierbei werden die Körperzellen zuvor dem Organismus entnommen und dann kultiviert. *Ex vivo* wird dann das genetische Material in die Zellen eingeführt. Häufig werden in der Kultur diejenigen Zellen selektiert, die transgen sind und eine Expression des Transgens aufweisen, bevor eine Rückinfusion in das Individuum vorgenommen wird. Um eine Abstoßung der eingeführten Zellen durch das Immunsystem zu vermeiden, werden normalerweise autologe Zellen verwendet. Ein *Ex-vivo*-Ansatz ist nur bei Geweben realisierbar, von denen Zellen entnommen werden können, die sich *ex vivo* kultivieren und die nach Rücküberführung langfristig überleben, wie z. B. hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark. In vielen Fällen sind die transgenen kultivierten Zellen bereits das Ziel des Experiments.

Wichtig ist nach der Transfektion der Verbleib des Transgens. Die transferierten DNA-Segmente können in ein Chromosom integriert werden, so

dass ihre Expression nach Chromosomenreplikation und Zellteilung in beiden Tochterzellen sowie in den weiteren Zellteilungsgenerationen erhalten bleibt. Damit dauert potentiell die Expression in dem betreffenden Gewebe solange an, wie der Zellklon, der das Transgen enthält, im Körper verbleibt. Man spricht dann von **stabiler Expression des Transgens**. In Geweben, deren Zellen beständig aus sich teilenden, noch undifferenzierten Stammzellen erneuert werden, ist eine stabile Integration der transferierten DNA in Stammzellen erwünscht. Viele Verfahren des Gentransfer bezwecken aber das Einbringen der Transgene lediglich als extrachromosomale Elemente im Zytoplasma oder Zellkern, wo sie stark exprimiert werden sollen. Wenn sich die Zellen allerdings teilen, wird das eingeführte extrachromosomale Gen nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, und die durchschnittliche Zahl der Transgene pro Zelle nimmt ab. Daher sinkt die Genexpression von Zellgeneration zu Zellgeneration (**transiente Expression des Transgens**). Manche Anwendungsziele, wie beispielsweise die Eliminierung eines Zellklons bei der Krebstherapie, basieren jedoch auf einer kurzzeitigen Expression von Genen in Krebszellen, die dadurch abgetötet werden sollen. Sobald dieses Ziel erfüllt ist, wird das eingeführte Gen nicht mehr benötigt, so dass eine transiente Expression ausreicht. In kultivierten Zellen gibt es zudem Möglichkeiten, Zellen mit dem Transgen zu selektieren und somit die Expression aufrechtzuerhalten. Auch können episomale Vektoren verwendet werden, die sich in den Rezipientenzellen anhaltend replizieren und auch extrachromosomal für eine in etwa permanente Expression sorgen.

Eine starke Entwicklung haben die Gentransfermethoden erfahren – entweder vektorfrei oder mit verschiedenen Vektoren. **Vektorfreie, d. h. »direkte«** oder **physikalische, Gentransfermethoden** überwinden die elektrochemische Barriere zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der gleichfalls negativ geladenen DNA, ohne dass besondere Moleküle für den Transport, d. h. Vektoren, verwendet werden. Die vektorfreien Techniken wurden für ver-

schiedene Gewebe sehr erfolgreich eingesetzt – so u. a. Mikroinjektion, DNA-Präzipitation mit Ca-Phosphat oder DEAE-Dextran, Hineinschleudern von DNA durch Druckluft oder Partikelbeschuss sowie die Öffnung der Zellwand durch Laserstrahlpulse oder Elektroporation. Die Techniken erreichen jedoch nur eine geringe Effizienz beim Gentransfer, und eine stabile Integration des Transgens wird nur selten beobachtet. Und mehrere der vektorfreien Gentransfermethoden, wie Ca-Phosphat oder Mikroinjektion, sind nur *ex vivo* einsetzbar.

Der Transfer von DNA in Zellen kann durch Molekülteile oder zusätzliche Moleküle unterstützt werden. Solche transferunterstützenden Elemente werden als **Vektoren** bezeichnet. Der ideale Vektor für den somatischen Gentransfer sollte möglichst große Transgene transportieren, er sollte stabil, einfach zu produzieren und hoch konzentriert herstellbar sein. Es ist günstig, wenn das Transgen an definierter Chromosomenstelle eingebaut werden kann, eine effiziente Genexpression bewirkt, spezifisch ist sowie eine korrekte, regulierbare Genexpression bewirkt. Die Vektoren sollten überdies nicht immunogen, biologisch sicher und nicht pathogen sein. Als Vektoren spielen Liposomen, Rezeptorkonjugate und Viren eine große Rolle für die Transfektion in somatische Zellen.

Liposomen werden seit 1971 für die Übertragung von Substanzen in Zellen benutzt. Bei den Liposomen handelt es sich um Vesikel, die aus synthetischen Lipid-Doppelmembranen (Bilayer) bestehen und ein wässriges Milieu umgeben; sie entsprechen der Struktur biologischer Membranen. Sobald sich die Lipidhülle an Zellen bindet, wird sie oder die darin eingeschlossene Substanz in die Zellen gebracht. **Kationische Liposomen** sind positiv geladen und binden die negativ geladene DNA relativ stabil an ihren Oberflächen. Eine Begrenzung für die Größen der DNA-Moleküle ist somit – zu mindestens theoretisch – nicht gegeben. Von den verschiedenen kationischen Lipiden, die kommerziell verfügbar sind, wird z. B. Lipofectin häufig

verwendet. **Anionische, pH-sensitive** oder **negativ geladene Liposomen** schließen die DNA in ein wässriges Milieu ein, ohne dass ein Komplex gebildet wird. Sie setzen die DNA nach Fusion mit der Zellmembran im Zytoplasma frei. Dort gelangt die DNA durch Diffusion auch in den Zellkern. Potentiell sollten sich anionische Liposomen besser für den *In-vivo*-Gentransfer eignen als kationischen, da sie weniger toxisch sind und nur in geringem Maße Wechselwirkungen mit Serumproteinen eingehen.

Statt Liposomen werden auch nicht-liposomale Polykationen als **Rezeptorkonjugate** verwendet, z. B. in Form linearer Polymere, wie Poly-L-Lysin. Aufgrund ihrer hohen positiven Oberflächenladung binden sie DNA elektrostatisch und bauen dabei eine histonähnliche Struktur auf. Diese Struktur inhibiert lysosomale Nucleasen und schützt so die transfizierte DNA vor Degradation. Die Polykationen werden zur Unterstützung des Transfers an ein Molekül gekoppelt, welches sich an spezifische Zelloberflächenrezeptoren bindet, wie z. B. an Transferrin – einem Serumprotein, für das sich Rezeptoren auf verschiedenen Gewebezellen befinden. Die Rezeptorbindung induziert Endozytose, wodurch die DNA in die Zelle gelangt. Man spricht dann von **rezeptor- oder ligandenvermitteltem Gentransfer**. Mit der rezeptorvermittelten Transfektion kann eine hohe Effizienz und Spezifität beim Gentransfer erreicht werden.

Besonders stark verwendet werden für den somatischen Gentransfer jedoch **virale Vektoren**, da diese einen sehr effizienten Gentransfer in Körperzellen erreichen. Die für den Gentransfer bislang eingesetzten Virusvektoren basieren vor allem auf bestimmte Retro-, Adeno- und Herpes-Simplex-Viren (HSV). Für den Gentransfer werden aus Sicherheitsgründen üblicherweise diejenigen Gene deletiert, die eine virale Replikation gestatten. Beispielsweise können Adenoviren eine Vielzahl an Zellarten infizieren, unabhängig von deren Teilungsaktivität. Ein Adenovirus gelangt durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle. Dort wird die mitgeführte DNA, die das Transgen enthält, freigesetzt

und gelangt ggf. in den Zellkern. Eine Integration in die Chromosomen wird jedoch nicht unterstützt, so dass mehr oder weniger ausschließlich eine transiente Expression erreichbar ist. Adenovirus-Vektoren weisen mehrere Vorteile auf, wie eine günstige Insertgröße, hohe Virustiter, ein breites Wirtszellspektrum, einschließlich proliferierender und terminal differenzierter Zellen, hohe Transduktionseffizienz sowie langjährige positive Erfahrungen mit Adenoviren als Impfstoffe. Nachteile bestehen darin, dass eine transiente Expression Mehrfachbehandlungen erfordert, die das Immunsystem sensibilisieren. Große Teile der Tierpopulationen tragen Antikörper gegen Adenoviren, die evtl. neutralisierend wirken. Außerdem werden potentiell pathogene Nachkommenviren bei Rekombination des Transgens mit genomischen Fragmenten aus einer akuten Adenovirus-Infektion der Zielzelle befürchtet. Der letztere Punkt betrifft die biologische Sicherheit der Adenovirus-Vektoren. Sicherheitsgründe werden auch bei anderen Virusvektoren geltend gemacht. Sie werden daher nach Möglichkeit durch andere Methoden des Gentransfers ersetzt sowie weiterentwickelt.

2 Strategien beim Gentransfer in Körperzellen

Je nach verfügbaren Hilfsmitteln und der Fragestellung werden beim Gentransfer in Körperzellen verschiedene Strategien verfolgt. Einige Strategien entsprechen denen für den Gentransfer in Keimbahnzellen. Einerseits technische Begrenzungen und andererseits zusätzliche Möglichkeiten und Fragestellungen führen bei somatischen Zellen jedoch zu speziellen Ansätzen.

Bei der **Genaddition** wird durch Hinzufügen von Kopien des Ausgangsgens oder eines neuen, erwünschten Gens eine zusätzliche Expression von Genprodukten erreicht, durch die ein angestrebter Phänotyp entsteht. Die Genaddition ist besonders bei Genen erfolgreich, deren Wirkung reversibel ist und bei denen eine verstärkte Expression durch das eingeführte Gen eine verbesserte Merkmalsausbildung erzielt.

Bei der **gezielten Eliminierung spezifischer Zellen** sollen die für den Transfer benutzten Gene nur von spezifischen Zellen (Target-Zellen) aufgenommen bzw. exprimiert werden und dadurch zum Tod der Zellen führen. Eine Eliminierung von Zellen wird beispielsweise erreicht, indem das eingeführte Gen (»Suizid«-Gen) zur Expression eines Toxins führt, das die betreffende Zelle abtötet. Dabei werden auch Gene (»Prodrug«-Gene) eingesetzt, die ihre Eigenschaften erst durch ein nachfolgend verwendetes Medikament entwickeln. Zu einer indirekten Eliminierung können auch immunstimulierende Gene führen, die eine Immunreaktion gegen die Target-Zellen bewirken, sobald sie exprimiert werden. Die Ansätze zur Eliminierung spezifischer Zellen werden im wesentlichen bei Krebstherapien verfolgt. In einigen Fällen werden aber auch andere Ziele angestrebt. So wurde eine gegen Fettzellen gerichtete Gentherapie entwickelt, um Fettdepots zu reduzieren.

Die **Inhibierung der Expression eines bestimmten Gens** lässt sich durch verschiedene Strategien erreichen. Bei diploiden somatischen Zellen werden durchweg entweder Antisense-Gene oder Oligonucleotide mit Antisense-Sequenzen verwendet oder Proteinfunktionen verändert. Zum Schutz vor Exonucleasen werden die 3'- und 5'-Enden der Oligonucleotide chemisch modifiziert. Die Inhibierung einer Genexpression ist auf DNA-, RNA- oder Protein-Ebene möglich. Auf DNA-Niveau werden **Triple-Helix bildende Oligonucleotide** für eine selektive Inhibierung der Genexpression angewendet. Triple-Helix bildende Oligonucleotide können sich an bestimmte Sequenzen der regulatorischen Zielgen-Region lagern und die Bindung entsprechender Transkriptionsfaktoren und damit die Transkription genspezifisch verhindern. Für eine Inhibierung der RNA werden Antisense-Oligonucleotide benutzt. **Antisense-Oligonucleotide** können sich sequenzspezifisch an passende mRNA-Moleküle lagern und dadurch deren Beteiligung an der Translation verhindern. Einige RNA-Moleküle können die Aktivierungsenergie für bestimmte biochemische

Reaktionen absenken und so als Enzyme wirken. Solche sogenannten **Ribozyme** tragen abgesehen von der Antisense-Sequenz noch eine katalytische Komponente, die die angedockte Target-RNA spaltet. Für die Gentherapie eingesetzte Ribozyme sind darauf gerichtet, nachteilig wirkende RNA-Moleküle zu zerstören. Die Genexpression läßt sich ebenfalls beeinflussen, indem die Proteinfunktion blockiert wird. Auch hierbei können Oligonucleotide als sogenannte **Adaptomere (Aptamere)** helfen. Diese binden sich an bestimmte Polypeptide und verhindern so deren Funktion. Die Kodierung zusätzlicher Proteine mit Hilfe des Transgens ist eine weitere Möglichkeit, um die Genexpression zu beeinflussen. Kodiert werden beispielsweise **intrazelluläre Antikörper (Intrabodies)**, die auf spezifische Strukturen innerhalb der Zellen gerichtet sind. Solche Antikörper können z. B. Viren oder nachteilige Proteine binden und dadurch blockieren. Ein weiterer Ansatzpunkt der Gentherapie ist die Kodierung eines zusätzlichen **mutierten Proteins**, welches sich spezifisch an ein Target-Protein bindet und dadurch die Funktion des Wildtyp-Proteins freigibt.

Bei der Strategie der **Gen substitution** soll der Gendefekt durch eine neue DNA-Sequenz ersetzt werden. Dies stellt besonders hohe technische Anforderungen und kann auf verschiedenem Niveau durchgeführt werden. Die experimentelle Korrektur einer nachteiligen Mutation erfordert auf **Geniveau** ein gezieltes Auffinden des Gens (Gene Targeting) und eine homologe Rekombination. Hierdurch tritt das insertierte fremde Genmaterial an die Stelle des defekten, endogenen Gens (Gene Replacement) und wird ähnlich wie dieses reguliert. Auf dem Wege wird die mutierte Sequenz nicht unbedingt zur Wildtypsituation zurückgebracht, sondern zu einer Form geführt, die die erwünschte Funktion erlaubt. Der Ansatz repräsentiert ohne Zweifel die potentiell beste Methode für die Gentherapie. Aufgrund der bislang sehr geringen Effizienz der Methode und der Notwendigkeit, den Defekt bei vielen Zellen *in vivo* zu korrigieren, sind vor einem Einsatz der Gen substitution bei somatischen Zellen

noch erhebliche Verfahrensentwicklungen notwendig. Ein praktikabler Ansatz der Gen substitution ist jedoch die Reparatur des genetischen Defektes auf **RNA-Niveau**. Dazu können Ribozyme eingesetzt werden, die sich an ein RNA-Moleküle bindet und dieses sowohl schneiden als auch splicen können und dabei trans wirken. Für ein Transkript, das eine Mutation aufweist, kann beispielsweise ein Ribozym konstruiert werden, welches die RNA upstream der Mutation schneidet und dann zu einem korrekten Transkript verbindet.

Oftmals ist erwünscht und notwendig, dass neu in Körperzellen eingebrachte Gene auch reguliert werden können. An ein solches **regulierbares System** werden folgende Anforderungen gestellt: Es soll spezifisch sein, d. h. nur die Expression des eingeführten Gens sollte beeinflusst werden, nicht die der anderen Gene. Eine Induzierbarkeit ist erwünscht. Das Transgen sollte also eine niedrige basale Aktivität und eine hohe Induzierbarkeit aufweisen. Die Induktion der Genexpression sollte reversibel sein. Angestrebt wird eine Regulierbarkeit: Dabei sollte das Transgen mit einem exogenen Signal zu beeinflussen sein – vorzugsweise einem Molekül, welches klein ist, leicht verabreicht werden kann und sich rasch im Körper verteilt. Schließlich sollte das exogene Signalmolekül biologisch sicher und möglichst oral applizierbar sein. In den letzten Jahren wurden verschiedene Systeme für die Regulierung der Genexpression entwickelt. Beispielsweise beschrieben Wang et al. (1994) ein solches System für den *In-vivo*-Einsatz. Das System besteht aus zwei Transgenen: einem Transregulatorgen und einem Targetgen. Das Transregulatorgen kodiert eine Hormonbindungsdomäne (HBD), die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL 4 und einen Bereich für das Herpes Simplex-Virus-Protein (VP16). Die Hormonbindungsdomäne ist mutiert und bindet nicht mehr Progesteron, sondern bevorzugt dessen Antagonisten RU 486 (Mifpriston). Die drei Proteine bilden einen Komplex, der erst nach Anbindung von RU 486 an die Hormonbindungsdomäne (HBD) die aktive Konformation einnimmt.

Daraufhin bindet der aktivierte Proteinkomplex mit der GAL 4-Domäne an eine spezifische multi-mere DNA-Sequenz im 5'-flankierenden Genbereich des Targetgens. Die VP 16-Domäne aktiviert nun die Transkription des Targetgens. Die Genexpression hält an, solange RU 486 gebunden bleibt. Auf diese Weise kann das Targetgen durch RU 486 gesteuert werden. RU 486 ist ein kleines synthetisches Molekül, welches sich oral applizieren lässt.

3 Ausrichtung des Gentransfers auf bestimmte Zellen/Gewebe

Für den somatischen Gentransfer ist eine Ausrichtung auf spezielle Zellen oder Gewebe wichtig, aber gegenwärtig technisch noch nicht befriedigend gelöst. Die Ausrichtung wird durch selektive Applikation des Transgens in das Target-Gewebe, selektive Aufnahme des Transgens durch die Target-Zellen sowie selektive Expression des Transgens in Target-Zellen erreicht. Entscheidend hierfür ist vor allem die Konstruktion des Vektors sowie des Promotors im Transgen.

4 Barrieren und Kinetik beim Gentransfer

Ein ebenfalls technisch spannender Untersuchungsbereich beim Gentransfer in somatische Zellen sind die intra- und extrazelluläre Barrieren. Intrazelluläre Barrieren sind die Plasma- und Zellkernmembran sowie die Abbauprozesse in Lysosomen und durch zytoplasmatische Nucleasen. Bei In-vivo-Gentransfer müssen zudem extrazelluläre Barrieren beachtet werden, wie u. a. das Immunsystem. Die Auswirkungen der Barrieren hängen vom Vektorsystem und dem Target-Gewebe ab. Die verschiedenen Barrieren führen zu spezifischen Wirkungsgraden und Zeitverläufen in den Mengen der nach Gentransfer erzeugten Endprodukte bzw. Zellleistungen. Sie bestimmen wesentlich die Wirkungskinetik beim somatischen Gentransfer, die im Prinzip nicht verschieden von der nach Verabreichung konventioneller Medizin ist.

5 Anwendungsbereiche für den Gentransfer in Körperzellen

Der Gentransfer in somatische Zellen erlaubt nur eine zeitlich befristete Einflussnahme, die durch die Lebensdauer der gentechnisch modifizierten Zellen begrenzt wird. Dies reicht aber für wichtige Anwendungsziele aus, und oft genügt bereits eine transiente Expression der Fremdgene. Die meisten Anwendungsbeispiele der somatischen Gentherapie zielen darauf ab, beim Menschen Erbkrankheiten heilen oder kompensieren zu können sowie neue Strategien zur Bekämpfung von Krebs und Infektionskrankheiten zu entwickeln. Die grundlegenden Experimente hierzu werden aber an Tieren durchgeführt. Darüber hinaus lassen sich selbständige Einsatzgebiete für den somatischen Gentransfer bei Tieren erkennen.

Die **Beeinflussung von Einzelgenwirkungen** ist eine erste Anwendungsmöglichkeit des somatischen Gentransfers. Allele eines Gens, die zur deutlichen Beeinträchtigung in der Merkmalsausbildung eines Individuums führen, sind mögliche Kandidaten für eine Beeinflussung. Je nach ihren Eigenschaften eignen sich bestimmte Allele bzw. Genloci besser für eine Gentherapie als andere. Günstig sind Allele mit einer rezessiven Vererbung, gering aktive Mutantenallele, leicht erreichbare Target-Zellen sowie kleine Transkripte, deren Expression gering kontrolliert wird. Weltweit existieren inzwischen mehr als 150 klinisch erprobte Anwendungsverfahren für die Gentherapie beim Menschen. Aber auch bei Nutztieren gibt es erste Beispiele. Mit Blick auf Nutzt- und Labortiere kann ein vorhandenes, wirksames Gen durch somatischen Gentransfer in der Expression verbessert werden, indem zusätzliche Kopien des betreffenden Gens oder neue Gene eingeführt werden. Beispielsweise verwendeten Draghia-Akli et al. (1999) für den somatischen Gentransfer beim Schwein einen rekombinanten Plasmidvektor mit einem Gen für ein Serumprotease resistentes Growth-Hormon-Releasing-Hormon (GHRH). Als Negativkontrolle diente das gleiche Plasmid mit einem β gal-Insert. Diese Transgene wurden ein-

malig intramuskulär an drei Wochen alte Ferkel injiziert. Hierdurch verstärkte sich die GHRH-Sekretion bis zum etwa 60. Tag nach der Transgenapplikation gegenüber der Negativkontroll-Gruppe um mehr als das Doppelte. Beim Insulin-Like Growth Factor I (IGF-1) lag die Serumkonzentration um 200–300 % höher, und nach 62 Tagen war das Körpergewicht um ca. 35 % schwerer als bei den Kontrolltieren. Denkmodelle weiterer Kandidatengene für einen somatischen Gentransfer liegen nahe. Dazu gehört auch die Erzeugung heterologer Genprodukte, die nachfolgend industriell verwendbar sind. Eine solche Verwendung entspricht dem Gene-Farming auf der Basis eines Gentransfers in die Keimbahn. Der Gentransfer in Körperzellen bietet dabei die Vorteile der großen Flexibilität und raschen experimentellen Arbeit.

Experimentelle Ansätze, um die **Proliferation bestimmter Zellklone im Organismus zu modifizieren**, betreffen vor allem Therapiestrategien gegen Carcinome. Die enormen technischen Erfahrungen bei der Beeinflussung der Proliferation bestimmter Zellklone im Organismus lassen sich auch auf Gebieten nutzen, die unmittelbar für Tiere relevant sind. So gibt es im Zusammenhang mit der Infektionsabwehr beispielsweise Ansatzpunkte zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort, der spezifische Tötung von infizierten Zellen sowie der Beeinflussung des Lebenszyklus von infizierten Zellen oder infektiösen Agentien (**Immunological Purging**).

Dies leitet über zu einem nächsten Anwendungsbereich des somatischen Gentransfers, der DNA-Vakzinierung. Bei der **DNA-Vakzinierung (genetische Vakzinierung)** werden nach DNA-Transfer in einigen Zellen des Rezipientenorganismus Genprodukte gebildet, die als Antigene wirken und zur Immunantwort führen. Die dafür verwendete DNA enthält mehr oder weniger viele kodierende Gene für Proteine der pathogenen Organismen sowie starke Promotoren. Die DNA wird *in vivo* transferiert, durch Injektion (meist intramuskulär, jedoch auch subkutan), Inhalation, Aufsprühen von DNA-Lösungen oder Partikelbeschuss (»Gene-Gun«-Methoden).

Zur Steigerung der Effizienz des Gentransfers werden Vektoren verwendet (z. B. Liposomen) oder toxische Agenzien co-injiziert, die lokale Nekrosen verursachen und dadurch den Gentransfer in die Zellen verbessern. Die Effizienz der DNA-Vakzinierung hängt insbesondere vom verwendeten Transgen (vor allem der Stärke des Promotors), den Vektoren und dem Verfahren der Applikation (Art der Applikation, Injektionsort, DNA-Menge, Häufigkeit der Applikationen) ab. In neueren Arbeiten wird auch über die Entwicklung von Impfstoffen aus RNA berichtet. Zellen, die das Fremdprotein exprimieren und nachfolgend auf der Oberfläche präsentieren, führen zu einer humoralen sowie zu einer zellvermittelten Immunantwort. Auf diese Weise wurde z. T. ein lang andauernder Impfschutz erreicht. Die DNA-Vakzinierung bietet viele Vorteile, wie einfache und spezifische Präparation, geringe Substanzmengen, Reinheit und Stabilität der applizierten DNA, andauernder Immunschutz durch humorale wie auch zelluläre Immunantwort, sehr flexible Mischbarkeit verschiedener DNA-Konstrukte (z. B. für verschiedene Proteine eines pathogenen Organismus oder für verschiedene pathogene Stämme) sowie die Anpassung beim Einsatz gegen Viren, die rasch mutieren (wie z. B. Influenzaviren). Entsprechend wird die DNA-Vakzinierung in der Forschung stark berücksichtigt. Eine DNA-Vakzinierung erfolgte erstmals 1962 durch subkutane Injektion von Virus-DNA beim Hamster und begann in größerem Umfang etwa ab 1990. Seitdem liegen zur DNA-Vakzinierung zahlreiche wissenschaftliche Publikationen für Tiere vor.

Die **Analyse der Genfunktion in transgenen Zellkulturen** ist ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich. Die Wirkung von DNA-Sequenzmotiven und Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression und Merkmalsdifferenzierung kann in transgenen Zellkulturen oder transgenen Tieren geprüft werden. Statt in aufwendigen Versuchen mit transgenen Tieren kann in Zellkulturen die Auswirkung einer geänderten Genausstattung untersucht werden, da Zellen unter geeigneten Kulturbedin-

gungen Ähnlichkeiten mit den Zellen des Gewebes zeigen, aus dem sie entnommen wurden. Sie bieten daher die Möglichkeit, Stoffwechselprozesse und die Mechanismen der Zelldifferenzierung außerhalb von Organismen zu untersuchen. In vielen Fällen können dadurch Tierversuche ersetzt oder Experimente durchgeführt werden, die beim Tier nicht möglich sind.

Transgene tierische Zellen werden auch für die **Produktion von wirtschaftlich nutzbaren Substanzen** eingesetzt. Nach Gentransfer wird dann eine Biosynthese des betreffenden Proteins angestrebt. Rekombinante Zellen, die für die Proteinproduktion verwendet werden sollen, müssen mehreren Anforderungen genügen: stabiler transgener Genotyp, effiziente und regulierbare Expression des Transgens (Transkription, Processing, Proteinbiosynthese und -sekretion) ohne permanente Zufuhr von induzierenden Wirkstoffen, korrekte posttranslationale Modifikation (Faltung, Glykosylierung, Acylierung und/oder Phosphorylierung des transgenen Proteins), biologische Sicherheit (frei von kontaminierenden pathogenen Viren und Mykoplasmen) sowie einfache Kultivierungsbedingungen (Serum, Wachstumsfaktoren, stabilisierende Proteine). Gewünscht sind günstige Fermentationseigenschaften (hohe Zelldichte, Stabilität gegen Scherkräfte, keine Eigenproduktion toxischer Substanzen wie z. B. Milchsäure) und zelldichteabhängige Proliferationsregulation. Nur wenige Zelllinien erfüllen alle genannten Kriterien. Derzeit werden die meisten rekombinanten Proteine in CHO-Zelllinien (Chinese Hamster Ovary) produziert. Die Zellen werden mittels Gentransfer metabolisch modifiziert, so dass sie spezifische neue Eigenschaften entwickeln (**Metabolic Design**) und diese auf das rekombinante Protein übertragen. 1988 wurde das erste in Hamsterzellen (Zelllinie CHO) gentechnisch hergestellte Produkt (Tissue Plasminogen Activator, tPA) für die Anwendung beim Menschen lizenziert. Es folgten Interleukin-2, verschiedene Colony Stimulating Factors, Erythropoietin, das menschliche Wachstumshormon und der Blutgerinnungsfaktoren VIII.

Erhöhte Sicherheit, verbesserte Immunogenität, geringere Nebenwirkungen und verringerte Produktionskosten gegenüber bisherigen Verfahren lassen auch Vorteile bei der Herstellung von Impfstoffen mittels gentechnisch modifizierter Zellkulturen erwarten. Ein rekombinanter Impfstoff gegen Hepatitis B wird bereits in transgenen Zellkulturen produziert. Eine weitere Anwendung für gentechnisch modifizierte Zelllinien ist deren Einsatz in Cytotoxizitätstests. Die dafür verwendeten transgenen Zellen exprimieren ein toxinsensitives Markergen, dessen Genprodukt nach Toxinzugabe im Test quantifiziert werden kann. Ein Vorteil gegenüber der Verwendung nicht-transgenen Zellen ist die höhere Spezifität der Toxinwirkung.

Zusammenfassung

Beim somatischen Gentransfer handelt es sich um komplexe, sich rasch entwickelnde Arbeitsbereiche. Wichtige Verfahrensentwicklungen betreffen die Herstellung von speziellen Transgenen, die Transfektion, Strategien der genetischen Beeinflussung von Target-Zellen, die Ausrichtung der Transfektion auf bestimmte Zellen sowie die Berücksichtigung der Barrieren und Kinetik. Weitreichende Anwendungsziele in Bezug auf Tiere betreffen die Beeinflussung von Einzelgenwirkungen, eine Beeinflussung der Proliferation bestimmter Zellklone im Organismus, die DNA-Vakzinierung, eine Analyse der Genfunktion in transgenen Zellkulturen sowie die Produktion wirtschaftlich nutzbarer Substanzen mit transgenen tierischen Zellen. Umfangreiche Aktivitäten spiegeln sich in der großen und zunehmenden Zahl wissenschaftlichen Publikationen wider. Etwa 75 % der Publikationen zum Thema Gentransfer behandeln den somatischen Gentransfer.

Literatur:

- Geldermann, H., et al. Tier-Biotechnologie. Textbuch, Springer-Verlag. In Vorbereitung.
- Draghia-Akli, R., M. L. Fiorotto, L. A. Hill, P. B. Malone, D. R. Deaver u. J. Schwartz. (1999): Nat. Biotechnology, Vol 17, 1179-1183.
- Wang, Y., B. W. O. O'Malley jr., S.Y. Tsay u. B. W. O. O'Malley (1994): Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 8180-8184.

Die Diskussionsbeiträge zum Thema I »Analyse von Nutztier-Genomen und -Genen sowie gendiagnostische Verfahren« wurde wegen technischer Probleme mit der hoteleigenen Tonbandanlage leider nicht aufgezeichnet.

II.

Reproduktionsbiologische Verfahren

Die Reproduktionsbiotechnologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend



1. Entwicklung von Tierzucht und Biotechnologie

Die Züchtung von Nutztieren hat in der Menschheitsgeschichte eine lange Tradition, die mit der Domestikation begann, indem der Mensch Tiere an seine Nähe gewöhnte. Mit den ihm jeweils zur Verfügung stehenden Möglichkeiten hat der Mensch ihm »nützliche Populationen« vermehrt; dabei erfolgte die Auslese meist nach dem Exterieur (äußeren Erscheinungsbild) oder aufgrund spezieller Eigenschaften. Eine wissenschaftlich begründete Tierzucht existiert erst seit etwa 50 Jahren auf der Basis der Erkenntnisse der Populationsgenetik und Statistik. Dabei sind bereits recht frühzeitig biotechnologische Verfahren mit einbezogen worden. Herausragendes Beispiel ist die künstliche Besamung, die heute in Ländern mit einer entwickelten Tierzucht über 90 % aller geschlechtsreifen weiblichen Rinder erfaßt und auch in der Schweinezucht stark im Zunehmen begriffen ist. Damit konnte das genetische Potential wertvoller Vätertiere wirksam in einer Population verbreitet werden. Aus einem Bullenejakulat lassen sich durchschnittlich etwa 200–300 tiefgefrierfähige Besamungsportionen herstellen; beim Eber sind es nur 10–20 Portionen, die zudem meist frisch zur Insemination verwendet werden. In den 80er Jahren ist dann der Embryotransfer in die züchterische Praxis überführt worden. Damit konnte erstmals auch das genetische Potential weiblicher Zuchttiere besser ausgenutzt werden. Die bisherige züchterische Arbeit mit dem Einsatz von künstlicher Besamung und Embryotransfer oder

anderen biotechnologischen Verfahren haben zu den bekannten beachtlichen Leistungssteigerungen bei unseren Nutztieren geführt. Drei wesentliche Nachteile sind jedoch zu berücksichtigen:

1. Der genetische Fortschritt ist mit 1–3 % pro Jahr relativ langsam.
2. Es ist nicht möglich, gewünschte Eigenschaften von unerwünschten Merkmalen zu trennen, und
3. ein gezielter Transfer genetischer Informationen zwischen verschiedenen Spezies ist nicht möglich.

Die in der Entwicklung begriffenen neuen biotechnologischen Verfahren lassen es möglich erscheinen, diese Begrenzungen der bisherigen züchterischen Arbeit zu überwinden. Unter dem Überbegriff »Biotechnologie bei Nutztieren« werden heute im wesentlichen reproduktionsbiologische und molekularbiologische Verfahren zusammengefaßt. Im Bereich der Reproduktionsbiologie werden dazu gezählt:

1. Künstliche Besamung (KB)
2. Brunstsynchronisation
3. Geburtssteuerung
4. Embryotransfer (ET)
5. Kryokonservierung von Gameten und Embryonen
6. In-vitro-Produktion von Embryonen
7. Erstellung identischer Mehrlinge (Embryosplitting und Kerntransfer)
8. Geschlechtsbestimmung (Sexing)
9. Gentransfer

Auf molekularbiologischer Seite sind zu nennen:

1. Genomanalyse
 - Genkartierung
 - Einzelgenanalyse,
 - Interaktionen zwischen Genen
2. Anwendung rekombinanter Substanzen (bovines und porcines Somatotropin, Phytase, u. a.)
3. Molekularbiologische Diagnostik zur Aufdeckung von Erbfehlern, Nachweis von Abstammung und Identitätssicherung, oder zur Aufklärung von Infektionen, etc.
4. Gentransfer

Die Biotechnologie bei landwirtschaftlichen Nutztieren weist einen ausgeprägten interdisziplinären Charakter auf, indem sie u. a. Elemente der Anatomie, der Gynäkologie und Geburtshilfe, Endokrinologie und Physiologie, Andrologie, Ultraschalltechnologie, Biochemie, Zellbiologie und Molekularbiologie beinhaltet. In der konsequenten Weiterentwicklung der Bio- und Gentechnologie mit dem Ziel eines Einsatzes in der züchterischen Praxis wird ein wichtiges Hilfsmittel gesehen, um den Herausforderungen an die Nutztierhaltung in der Zukunft zu begegnen.

Im folgenden werden der Entwicklungsstand und Anwendungsperspektiven einiger reproduktionsbiologisch dominierter biotechnologischer Verfahren einschließlich des Gentransfers näher erläutert:

2. Embryotransfer

Der Begriff »Embryotransfer« umfaßt bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren die folgende Sequenz von Vorgängen:

1. Auswahl der Spendertiere
2. Auslösung der Superovulation
3. Gewinnung der Embryonen
4. Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit der Embryonen
5. Auswahl und Vorbereitung von Empfängertieren
6. Transfer der Embryonen

Übersicht 1: Auswirkungen eines dominanten Follikels zum Zeitpunkt der Gonadotropinbehandlung auf das Superovulationsergebnis beim Rind

	Dominanter Follikel	
	+	-
Anzahl der Tiere	12	14
Anzahl Corpora lutea (Ovulationen)	4,5 ± 1,4	15,5 ± 2,5
Anzahl Eizellen und Embryonen	1,2 ± 0,4	12,9 ± 2,8
Anzahl befruchtete Eizellen	0,5 ± 0,2	8,3 ± 2,5
Anzahl transfertaugliche Embryonen	0,3 ± 0,2	7,8 ± 2,5
Transfertaugliche Embryonen/Gesamtanzahl Eizellen und Embryonen (%)	28,6	60,2

aus Bungartz und Niemann 1994, J. Reprod. Fert. **101**, 583–591.
Die Spendertiere wurden mit 28 mg FSH behandelt und die Anwesenheit eines dominanten Follikels (>9 mm) wurde mit Hilfe von Ultraschalluntersuchungen festgestellt.

Die Superovulation mit PMSG oder FSH stellt trotz intensiver Forschungsarbeiten in den letzten 25 Jahren immer noch den limitierenden Faktor bei der Anwendung des Embryotransfers dar. Dies wird deutlich in einer starken individuellen Variabilität auf die standardisierte Behandlung sowie einem stark variierenden Anteil in der Befruchtung und in der Qualität der Embryonen. Es wurde eine Vielzahl von Einflußfaktoren identifiziert; besonders bedeutsam scheint die An- oder Abwesenheit eines dominanten Follikels zu sein (Übersicht 1).

Gewinnung und Transfer von Embryonen erfolgen beim Rind heute unblutig mit Hilfe spezifischer Katheter, die unter rektaler Kontrolle bis in die Gebärmutterhornspitze vorgeschoben werden. Bei den kleinen Wiederkäuern und beim Schwein kommen überwiegend noch chirurgische und/oder laparoskopische Verfahren zur Anwendung. Bei optimalem Transferverlauf kann beim Rind mit einer Trächtigkeitsrate von etwa 55% bis 65% gerechnet werden, was in etwa den Erfolgsquoten nach einmaliger künstlicher Besamung entspricht. Statistisch betrachtet, können also pro erfolgreiche Spülung beim Rind etwa 2,5 bis 3,0 Kälber erzeugt werden. Beim Schwein können die Trächtigkeitsraten, bezogen auf die Anzahl Empfänger, über 80%

hoch sein; die durchschnittliche embryonale Entwicklungsrate ist aufgrund der hohen embryonalen Sterblichkeit mit unter 50 % im Vergleich zu Bedeckung oder Besamung reduziert.

Der Embryotransfer beim Rind ist heute in die züchterische Praxis fest integriert und weltweit sind im letzten Jahr etwa 500.000 Embryonen übertragen worden, davon die Hälfte nach Tiefgefrieren und Auftauen. Der Schwerpunkt der Anwendung liegt in Nordamerika (45 %) und Europa (27 %). Innerhalb von Europa werden in Frankreich, Niederlande und Deutschland die meisten Embryotransfers durchgeführt. Bei den anderen Spezies ist die Anwendung deutlich geringer. Die Vorteile des Embryotransfers liegen in der verbesserten Ausnutzung des weiblichen Keimzellpotentials, der Möglichkeit mehr Nachkommen von wertvollen Spendertieren zu erhalten, Nachkommen auch von »unfruchtbaren« Spendern zu erstellen, im Bereich der Hygiene, da die intakte Zona pellucida eine besonders wirksame Barriere gegenüber Krankheitserregern verschiedenster Art ist, der wesentlichen Erleichterung des internationalen Austausches von Zuchtmaterial, der Verkürzung des Generationsintervalls, sowie die in der Möglichkeit der Genkonservierung und der Forschung an Oozyten und Embryonen. Der Embryotransfer ist dementsprechend eine Basistechnologie für viele der anderen Biotechnologien.

3. Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen

Durch intensive Forschungsarbeiten sind heute verschiedene methodische Ansätze unter Praxisbedingungen zum erfolgreichen Gefrieren von Embryonen, insbesondere beim Rind, verfügbar. Rinderembryonen können insbesondere mit kontrollierten Tiefgefrierverfahren oder durch Vitrifikation erfolgreich kryokonserviert werden. Letzteres beinhaltet eine kurzzeitige Äquilibration in hohen Konzentrationen an penetrierenden und nichtpenetrierenden Gefrierschutzmitteln (3–8 molar = M) und Makromolekülen, was bei direkter Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C) zur Ausbildung einer glasähnlichen Struktur ohne Eiskristalle führt.

Die Embryonen müssen dann auch schnell aufgetaut werden, beispielsweise durch Überführung in warmes Wasser oder in Luft. Im Gegensatz zur Vitrifikation werden beim ultraschnellen Tiefgefrieren Eiskristalle gebildet. Dabei werden penetrierende (2–3,5 M) und nichtpenetrierende (0,25–0,5 M) Kryoprotektiva verwendet. Dieses Verfahren ist vorwiegend bei Mäuseembryonen erfolgreich angewandt worden.

Ein gebräuchliches, kontrolliertes Gefrier- und Auftauverfahren beinhaltet die Zugabe des Gefrierschutzmittels, das Verpacken der Embryonen in Gefrierbehälter (feine Paletten), deren Überführung in eine Gefriermaschine (meistens ein Alkoholbad), die Auslösung der Kristallisation (= Seeding), gefolgt von einer langsamen Kühlungsphase mit $0,3^{\circ}/\text{Min.}$ bis -30° bis -40°C , Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C), das Auftauen der Proben und die Entfernung des Kryoprotektivums. Aufgrund seiner geringen Toxizität und schnellen Penetrationsfähigkeit wird heute vielfach Ethylenglykol in einer Konzentration von etwa 1,5–2,0 M als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Dies erlaubt es auch, die Embryonen direkt nach dem Auftauen zu übertragen, wobei das Gefrierschutzmittel in der Gebärmutter des Empfängertieres ausverdünt wird. Bei anderen Gefrierschutzmitteln (Glycerin, DMSO, u. a.) ist aufgrund der erheblichen osmotischen Belastungen eine Entfernung des Kryoprotektivums vor Übertragung im Labor erforderlich, was den Einsatz unter Feldbedingungen komplizieren kann. Die durchschnittlichen Überlebensraten, basierend auf morphologischer Beurteilung, liegen zwischen 80 % und 100 % bei Rinderembryonen im Morula- und Blastozystenstadium; nach Transfer solcher Embryonen können Trächtigkeitsraten zwischen 50 % und 60 % erreicht werden. Nach Vitrifikation liegen die Überlebensraten noch etwa 10–15 % niedriger. Interessanterweise scheinen sich insbesondere in vitro produzierte Rinderembryonen mit diesem Verfahren besser einzufrieren zu lassen als mit dem kontrollierten Gefrierverfahren. Ähnliche Erfolgsquoten sind für Embryonen von kleinen Wieder-

käuern berichtet worden, während sich beim Schwein die Tiefgefrierkonservierung noch in einem experimentellen Stadium befindet und die Überlebensraten tiefgefrorener/aufgetauter Embryonen niedrig sind. Auch weibliche Keimzellen (Oozyten) lassen sich heute noch bei keiner landwirtschaftlichen Nutztierspezies mit ausreichend hohen Erfolgsquoten einfrieren.

4. In-vitro-Produktion von Embryonen

Die In-vitro-Produktion (IVP) beinhaltet die In-vitro-Reifung, Befruchtung und Kultivierung bis zu transfertauglichen Entwicklungsstadien. Dieses Verfahren ist insbesondere beim Rind sehr weit entwickelt und findet bereits Anwendung in der Praxis. Im Jahre 1998 wurden ca. 32.000 Übertragungen mit in vitro produzierten Rinderembryonen unter Feldbedingungen registriert. Die Oozyten können entweder aus Schlachthofovarien oder durch ultraschallgeleitete Follikelpunktion (OPU) sogar wiederholt von individuellen Spendertieren gewonnen werden. Bedingt durch das kontinuierlich stattfindende Follikelwachstum sind zu jedem Zeitpunkt Follikel in ausreichender Größe (>2 mm) zur Punktion vorhanden. Für das OPU werden ein Schallkopf intravaginal eingesetzt, die Ovarien manuell von rektal aus direkt vor den Schallkopf gehalten, die Punktionsnadel durch die Vaginalwand nacheinander in alle sichtbaren Follikel vorgeführt und die Flüssigkeit mit der Oozyte abgesaugt. Die Oozyten werden anschließend morphologisch beurteilt und als intakt eingestufte Oozyten zur In-vitro-Reifung gegeben. Das OPU kann über längere Zeiträume wiederholt bei einem Tier durchgeführt werden, ohne daß Gesundheit und Reproduktionsgeschehen beeinträchtigt werden. Diese Technologie kann erfolgreich bei juvenilen Tieren (mit noch etwas geringeren Erfolgsquoten), Tieren im ersten Drittel der Trächtigkeit, trockenstehenden und laktierenden (sogar in der Puerperalphase) sowie infertilen Kühen eingesetzt werden. Die Effizienz kann bereits höher sein als in konventionellen Superovulations-/Embryotransferprogrammen.

Die Oozyten sind im Follikel und bis kurz nach der Befruchtung von einem dichten Mantel an Cumuluszellen umgeben und werden deshalb auch als Cumulus-Oozyten-Complexe bezeichnet (COK). Die COK werden dann unter geeigneten Kulturbedingungen bis zur Befruchtungsreife kultiviert (24 Std.), danach erfolgt für 15–18 Std. eine Koinkubation mit kapazitierten Spermien, bevor wiederum unter geeigneten Kulturbedingungen die Weiterentwicklung bis zur Blastozyste erfolgen kann. Am Ende der In-vitro-Reifungsphase erreichen die Oozyten den befruchtungsbereiten Zustand. In der Eizelle laufen während dieser Phase umfangreiche metabolische und strukturelle Veränderungen ab, die mit der Ausschleusung des 1. Polkörperchens und der Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte abschließen. Außerdem zeigen die Cumuluszellen eine starke Expansion. Die Spermien müssen auch in vitro die Phasen der Kapazitation und der Akrosomenreaktion durchlaufen, um eine Eizelle regulär befruchten zu können. Während es sich bei der Kapazitation um im wesentlichen biochemische Veränderungen handelt, stellt die Akrosomenreaktion eine umfangreiche morphologische Umstrukturierung des Spermienkopfes dar. Durch Zugabe von Heparin kann die Akrosomenreaktion bei Bullenspermien in vitro induziert und der Anteil befruchtungsfähiger Spermien wesentlich erhöht werden. Nach der Kokultivierung von Oozyten und Spermien werden die Cumuluszellen entfernt und die Eizellen bis zum gewünschten Entwicklungsstadium im geeigneten Medium kultiviert (Abb. 1). Die Gesamtphase kann 8–12 Tage dauern. Die durchschnittlichen Erfolgsquoten liegen bei über 90 % für die In-vitro-Reifung, 70 %–85 % für die In-vitro-Befruchtung und 30 %–40 % für die Entwicklung bis zur Blastozyste. Die in vitro produzierten Embryonen können in etwa 40 %–60 % der Fälle zur Trächtigkeit führen.

Zwischen in vivo und in vitro erzeugten Embryonen bestehen bei vielen Eigenschaften erhebliche Unterschiede. In vitro produzierte Embryonen können sich von den entsprechenden in



Zygote



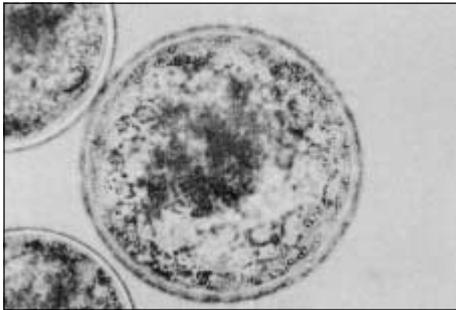
4-Zeller



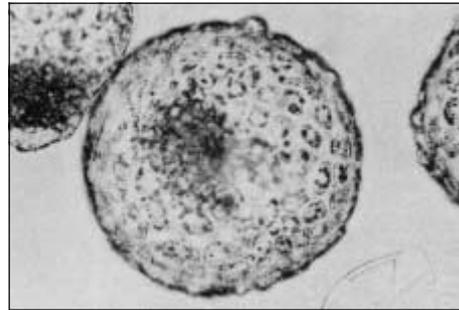
8-Zeller



Morula



Blastozyste



Geschlüpfte Blastozyste

vivo generierten Rinderembryonen in Bezug auf die Morphologie (Farbe, Zellzahl, Zellgröße), den zeitlichen Ablauf der Entwicklung (schneller oder langsamer), die Empfindlichkeit gegenüber Kühlung oder Gefrieren, die Stabilität der Zona pellucida oder Eigenschaften des embryonalen Metabolismus unterscheiden. Nach Transfer von IVP-Embryonen ist die anfängliche Trächtigkeitsrate ähnlich wie mit in vivo gewonnenen Embryonen. Es wird jedoch ein erhöhter Anteil embryonaler Mortalität beobachtet, und etwa ein Drittel der Nachkommen zeigt Symptome des »Large Calf Syndroms«. Kennzeichnend dafür sind eine verlängerte Trächtigkeitsdauer, sowie teilweise erhebliche Übergröße, verbunden mit einer Lebensschwäche der geborenen Jungtiere. Als Hauptursache werden Veränderungen im Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene in frühen Entwicklungsphasen des Embryos angesehen. Wir haben inzwischen mehrere Gene identifiziert, die differentiell zwischen in vivo und in vitro generierten Embryonen exprimiert werden.

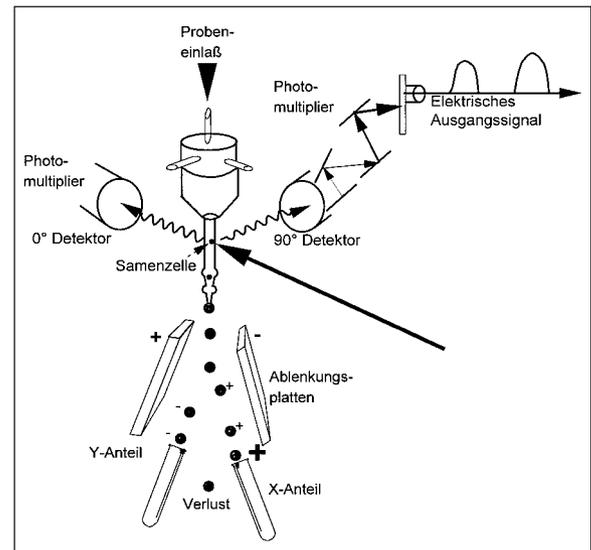
Ein limitierender Faktor für die praktische Anwendung ist ferner die starke Variabilität in der Eignung einzelner Bullen oder auch von einzelnen Ejakulaten einzelner Bullen für den Vorgang der In-vitro-Fertilisation. Dies macht eine sorgfältige Anpassung an die jeweiligen Kulturbedingungen erforderlich. Mit Hilfe der In-vitro-Produktion können größere Mengen an Embryonen für die Grundlagenforschung bereitgestellt werden; daneben besteht die Möglichkeit zur kostengünstigen Produktion von Fleischkälbern aus Milchviehrossen, sowie bei Verwendung geschlechtstrennter Spermien die gezielte Erstellung männlicher oder weiblicher Nachkommen.

5. Geschlechtsbestimmung (Sexing)

Das Geschlecht eines Nachkommens wird dadurch bestimmt, ob ein X- oder Y-Chromosomtragendes Spermium die X-Chromosomtragende Oozyte befruchtet. Da das X-Chromosom etwas größer als das Y-Chromosom ist, besitzen X-Chromosomtragende Spermien geringfügig mehr

(3%–5%) DNA als Y-Chromosomtragende Spermien. Dieser Unterschied kann in der Durchflußzytometrie zur Trennung von männlichen und weiblichen Spermien ausgenutzt werden. Dazu werden die einzelnen Spermien mit einem DNA-spezifischen Farbstoff gefärbt, einzeln in kleinen Tropfen durch das Durchflußzytometer geschickt, mit einem Laserstrahl angeregt und die abgegebene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur DNA-Menge berechnet. Anschließend werden die Spermien je nach Geschlecht unterschiedlich elektrisch aufgeladen und dann getrennt (Abb. 2). Dieses Verfahren erlaubt eine geschlechtsspezifische Trennung mit Erfolgsquoten von über 90%. Es ist erfolgreich bei Rind, Schwein, Schaf und Kaninchen eingesetzt worden. Dabei wurden die jeweiligen Spermienpopulationen (X- oder Y-spezifisch) entweder in der In-vitro-Fertilisation, in Form einer chirurgischen Besamung in die Eileiter oder durch tiefe intraute-

Abbildung 2: Selektion von X- und Y-Chromosomtragenden Spermien durch Flowzytometrie (mod. nach Johnson 1995)



rine Übertragung verwendet. Hauptnachteile dieses Verfahrens sind die noch zu geringe Kapazität des Durchflußzytometers, was zur Folge hat, daß nicht genügend Spermien pro Zeiteinheit getrennt werden können, so daß die Zahlen für die künstliche Besamung nicht ausreichend sind, der hohe Preis des Trenngerätes sowie die eingeschränkte Vitalität der Spermien durch Inkubation mit dem DNA-Farbstoff.

Auch an Embryonen kann das Geschlecht bestimmt werden. Dazu wird eine Biopsie entnommen, die DNA extrahiert und mit Hilfe einer DNA-Sonde auf das Vorhandensein Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen untersucht. Auf diese Weise können männliche und weibliche Embryonen voneinander unterschieden werden. Die Y-Chromosom-spezifischen Sequenzen werden in der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert und können dann in einer Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Eine effektive Trennung X- und Y-Chromosomen-tragender Spermien hat große Bedeutung für die Tierzucht, beispielsweise indem eine erhöhte Fleischerzeugung aus Milchviehpopulationen möglich wird, eine verbesserte Selektionsintensität erreicht werden kann und Fleisch- und Milchgebrauchskreuzungen besser ausgenutzt werden können. Auch Embryotransfer- und Nukleusprogramme können wesentlich effizienter gestaltet werden.

6. Erstellung genetisch identischer Nachkommen

6.1 Mikrochirurgische Embryonenteilung

Durch mikrochirurgische Teilung von Embryonalstadien können identische Zwillinge erstellt werden, die den kleinsten möglichen Klon darstellen. Mit den heutigen Verfahren können Morula- und Blastozystenstadien mikrochirurgisch so geteilt werden, daß sich beide Hälften mit gleich großen Chancen weiterentwickeln können. Dazu werden die Embryonen mit Hilfe eines geeigneten Mikromessers, einer Glasnadel oder eines anderen Schneidegerätes unter 100- bis 200-facher mikroskopischer Vergröße-

rung exakt in der Mitte durchgeteilt. Bei der Blastozyste ist darauf zu achten, daß die Innere Zellmasse, aus der sich der Fetus entwickelt, in zwei möglichst gleich große Hälften geteilt wird. Beim Rind ist das Verfahren besonders effektiv; aus der Teilung von 50 Embryonen können 100 Hälften entstehen, die nach Transfer wiederum 50–55 Trächtigkeiten ergeben können. Darunter kann ein Anteil von 25%–35% monozygoter Zwillinge sein. Durch die mikrochirurgische Teilung kann also eine deutliche Effizienzsteigerung gegenüber dem Transfer nicht-mikrochirurgisch geteilter Embryonen erreicht werden. Ähnliche Erfolgsraten werden für die kleinen Wiederkäuer berichtet, während beim Schwein die Entwicklungsfähigkeit der Embryonenhälften nach mikrochirurgischer Teilung deutlich reduziert ist, und auch der Anteil monozygoter Zwillinge ähnlich wie bei Kaninchen und Maus nur bei 1%–2% liegt. Die Identifizierung der monozygoten Zwillinge ist beim Rind bei korrekter Versuchsanstellung relativ einfach, während beim Schwein Blutgruppenanalysen oder DNA-Fingerprinting zur positiven Identifizierung monozygoter Zwillinge eingesetzt werden müssen.

6.2 Kerntransfer

Größere Anzahlen identischer Nachkommen können nur mit Hilfe des Kerntransferverfahrens erstellt werden. Dabei wird eine Spenderzelle in eine vorher entkernte Oozyte übertragen. Beide Anteile werden durch kurzzeitige elektrische Impulse miteinander verschmolzen; der übertragene Kern wird zurückprogrammiert und kann dann eine neue Entwicklung beginnen. Dieses Verfahren wurde bereits 1986 erstmalig beim Schaf mit embryonalen Zellen erfolgreich eingesetzt. In den folgenden Jahren hat es umfangreiche Untersuchungen beim Rind gegeben, so daß mehrere tausend Kälber nach Kerntransfer mit embryonalen Zellen geboren wurden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß ähnlich wie bei der IVP bei etwa 25%–30% der geborenen Kälber verlängerte Trächtigkeiten, ver-

bunden mit einer Übergröße der Nachkommen («Large calf syndrome») auftreten können, was zu erheblichen Geburtskomplikationen führen kann.

Der erfolgreiche Kerntransfer unter Verwendung somatischer Spenderzellen (Euterepithelzelle) wurde erstmals 1997 berichtet (Schaf »Dolly«). Bis heute ist eine Vielzahl somatischer Zellen (z. B. Haut-, Muskel-, Cumulus-, Granulosazellen, Leukozyten) als Spenderzellen eingesetzt worden; d. h. mit der Geburt normaler Nachkommen. Die gereifte Metaphase-II-Oozyte bietet nach derzeitigem Erkenntnisstand die beste Umgebung zur Rückprogrammierung differenzierter somatischer Zellen. Besondere Bedeutung haben Fibroblasten als Spenderzellen erlangt, die in der In-vitro-Kultur über längere Zeiträume gehalten werden können und durch Transfektion genetisch veränderbar sind. Mit genetisch modifizierten fetalen Fibroblasten als Spenderzellen sind bei Rind und Schaf transgene Nachkommen erstellt worden. Kürzlich (März 2000) wurde auch erstmals die Geburt geklonter Ferkel bekannt. Das Kerntransferverfahren würde die Erstellung größerer Gruppen identischer Nachkommen für spezifische Produktionszwecke erlauben. Aufgrund der noch geringen Effizienz scheint es aber zur Zeit vor allem für den Einsatz zur Verbesserung des Gentransfers besonders geeignet. Weitere, biomedizinisch interessante Anwendungsmöglichkeiten könnten im Tissue Engineering (Gewebe-Ersatz aus somatischen Zellen) und in der Xenotransplantation liegen.

7. Transgene Nutztiere

Das Säugergenom besteht aus etwa 3 Mrd. Basenpaaren, die ca. 100.000–140.000 Gene beinhalten. Beim Menschen wird im »Human Genome Project« (HUGO) angestrebt, das gesamte Genom bis zum Ende des Jahres 2003 vollständig zu sequenzieren. Bei einer Reihe von Organismen (Bakterien, Hefe, Würmern, Drosophila, etc.) mit wesentlich kleinerem Genom ist dies bereits gelungen. Im Gegensatz dazu ist bei Nutztieren nur von wenigen Genen

(ca. 300–500) die Sequenz bekannt. Da zwischen dem Genom von Säugern, aber auch von anderen Organismen, teilweise ausgedehnte Homologien bestehen, wird die Identifizierung von neuen Gensequenzen bei Nutztieren durch die Fortschritte im humanen Genomprojekt erheblich erleichtert. Bisher sind aber die genomanalytischen Kenntnisse bei landwirtschaftlichen Nutztieren noch bruchstückhaft und erlauben nur eine begrenzte praktische Anwendung für landwirtschaftlich relevante Merkmale im engeren Sinne.

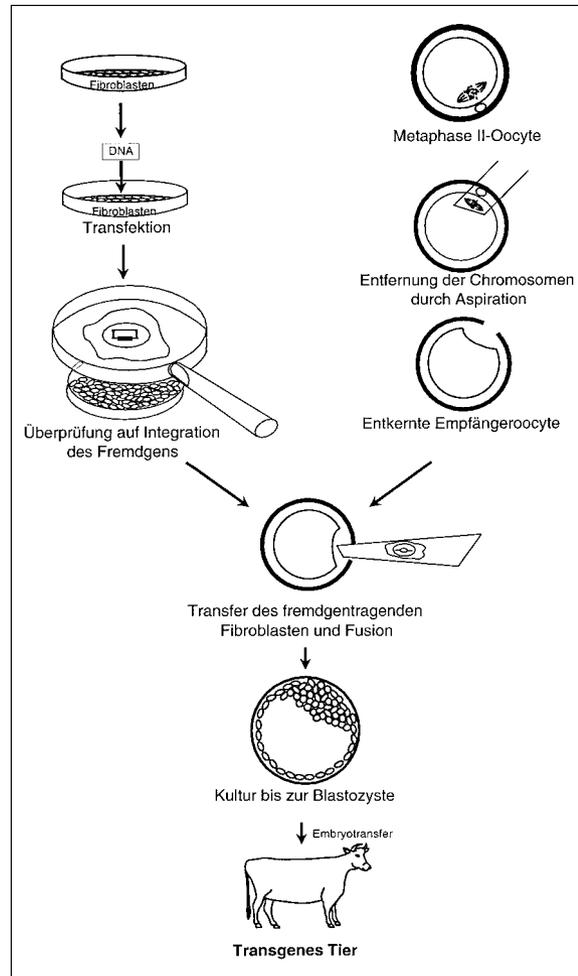
Unter »Gentransfer« wird die Übertragung fremder Protein-kodierender DNA-Abschnitte in das Genom von Empfängerzellen mit dem Ziel einer aktiven Beteiligung des Fremdgens an der Proteinsynthese der jeweiligen Empfängerzellen verstanden. Tiere mit Integration des Fremdgens nach Gentransfer in das eigene Genom werden als »transgen« bezeichnet. Für den Gentransfer werden Genkonstrukte verwendet, wobei es sich um natürlich oder künstlich gebildete Kombinationen von regulatorischen (Promotoren, Enhancer) und proteinkodierenden (= Strukturgenen) DNA-Abschnitten handelt. Der Einbau von Fremd-DNA in das Genom einer Empfängerzelle wird »Integration« genannt, die Umsetzung des spezifischen genetischen Codes wird als »Genexpression« bezeichnet, die sowohl auf mRNA- als auch auf der Proteinebene bestimmt werden kann. Die Erstellung transgener Tiere ist bis vor kurzem ausschließlich über Mikroinjektion in den Vorkern von Zygoten möglich gewesen. Dabei wird die DNA-Lösung mit etwa 3.000–5.000 Kopien in einen Vorkern mikroinjiziert. Die Zygoten werden aus den Eileitern kurz nach der Befruchtung gewonnen; die beiden Vorkerne sind noch voneinander getrennt. Im nachfolgenden Vorgang der Syngamie erfolgt die Rekombination des maternalen und paternalen genetischen Materials. Zu diesem Zeitpunkt besteht somit eine erhöhte Chance des Einbaus der mikroinjizierten DNA-Sequenzen. Die Vorkerne müssen bei Rind und Schwein durch kurzzeitige Zentrifugation der Zygoten sichtbar gemacht werden, da sie durch ein dichtes Plasma verdeckt

sind, während beim Schaf dafür eine Interferenzphasenkontrast-Mikroskopieeinrichtung erforderlich ist. Der gesamte Vorgang ist ineffizient und lediglich <5 % der geborenen Jungtiere werden als »positiv transgen« identifiziert. Der Nachweis der Integration des Transgens wird meist aus einer Gewebe- oder Blutprobe mit Hilfe einer PCR oder Southern Blot geführt. Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit des Transgens werden jedoch meist erst möglich, wenn die transgenen Tiere herangewachsen sind. Die Untersuchungen werden im allgemeinen auf der Ebene der mRNA (RT-PCR, Northern Blot) und des Proteins (Western Blot, spezifische Tests) durchgeführt. Tiere, die das Transgen fest integriert haben, vererben diese Eigenschaft nach den Mendel'schen Regeln an ihre Nachkommen, so daß transgene Linien erstellt werden können. Bei diesen Verfahren des Gentransfers erfolgt der Einbau zufällig und die Expression des Gens ist von Positionseffekten abhängig, d. h. wird durch das umgebende Wirtsgenom beeinflusst. Das lange Generationsintervall macht die Erstellung transgener Nutztiere zu einem sehr langwierigen Unterfangen.

Die allermeisten Nutztiere sind bisher noch mit Hilfe der Mikroinjektion erstellt worden. Mit Hilfe des Kerntransfers können vorhandene Tiere mit transgenen Eigenschaften gezielt vermehrt werden. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, daß die transgene Eigenschaft in identischer Form bei den geklonten Nachkommen vorhanden ist und nicht durch die Neukombination des genetischen Materials, wie sie während Meiose und/oder Befruchtung erfolgt, modifiziert wird. Das Klonen erlaubt die direkte Verwendung geprüfter transgener Foundertiere, die meist noch hemizygot für das jeweilige Transgen sind. Dadurch würde eine zeitaufwendige Rückkreuzung zur Erstellung transgener Linien überflüssig werden.

Die Verfügbarkeit geeigneter Zellen oder Zelllinien und deren Verwendung im Kerntransfer kann die Erstellung transgener Tiere signifikant verbessern. In der In-vitro-Kultur gehaltene Zellen können durch Elektroporation oder andere Verfahren gene-

Abbildung 3: Erstellung transgener Tiere mit Hilfe des Kerntransfers

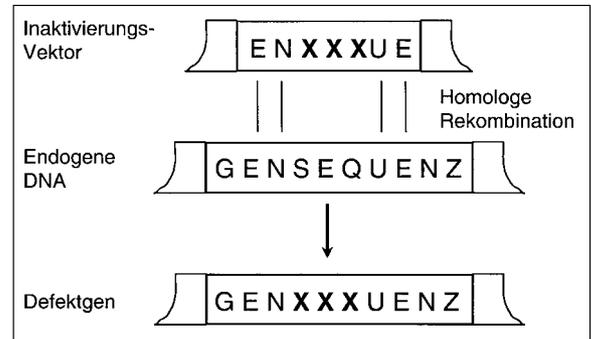


tisch verändert werden. Anschließend kann in vitro der Erfolg des DNA-Transfers geprüft, so daß nur Zellen mit korrekter Integration und maximaler Expression des Transgens für den Kerntransfer verwendet werden, und alle Nachkommen transgen sind (Abb. 3). Auch wenn bei der Transfektion die

Integration des Transgens wie bei der Mikroinjektion zufällig erfolgt, kann ein wesentlicher Teil der Prüfphase statt wie bisher beim Tier im Labor erfolgen. Die Validität dieses Konzepts ist durch der Erstellung transgener Lämmer und Kälber vor kurzem gezeigt worden. Insbesondere fetale Fibroblasten haben sich für die Transfektion als geeignet erwiesen. Die Vorteile dieses methodischen Ansatzes gegenüber der Mikroinjektion liegen in einer deutlichen Zeit- und Kostenersparnis bei der Generierung transgener Nutztiere.

Weitere qualitative Verbesserungen sind durch die Anwendung homologer Rekombinationstechniken zu erzielen. Zahlreiche Studien bei der Maus haben gezeigt, daß totipotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) genetisch über Techniken der homologen Rekombination gezielt verändert werden können. Wenn die Ausschaltung eines Gens beabsichtigt ist, wird ein homologer Targeting-Vektor verwendet, der entweder ein Neomycingen oder ein anderes Antibiotikumgen trägt, das die Basensequenz des endogenen Gens unterbricht. Das Konstrukt trägt die Sequenz für das gewünschte Strukturgen, wenn die Expression eines zusätzlichen Proteins angestrebt wird. Der Vektor wird gegen das endogene Gen ausgetauscht, was zu sogenannten »Knock-out-Tieren« (Ausschaltung eines Gens) oder transgenen (Knock-in) Tieren führt (Abb. 4). Dabei wird gezielt ein bestimmter Genort angesteuert, da das Targeting-Konstrukt nur die homologen Sequenzen erkennt und mit ihnen rekombiniert. Die Zellen können *in vitro* auf korrekte Integration geprüft und anschließend in eine entkernte Oozyte übertragen werden. Bei Nutztieren sind trotz vielfältiger Bemühungen geeignete ES-Zelllinien für homologe Rekombination nicht verfügbar. Kürzlich wurde jedoch erstmals bekannt, daß auch fetale Fibroblasten über homologe Rekombination gezielt genetisch verändert werden können und nach Verwendung im Kerntransfer transgene Nachkommen (Lämmer) ergeben. Auch über die Geburt von transgenen Nachkommen beim Rind wurde berichtet, die von »Stammzell-ähnlichen« Zellen abstammten. Da

Abbildung 4: Schematische Darstellung der homologen Rekombination



homologe Rekombinationsereignisse immer nur in einem sehr geringen Anteil der Zellen oder einer Zelllinie auftreten, müssen für einen solchen Vorgang große Zahlen an geeigneten Zellen verfügbar sein, aus denen die positiven Zellen herausselektiert werden können. Die Effizienz des Gentransfers kann durch die Verwendung genetisch modifizierter Zellen im Kerntransferverfahren wesentlich verbessert, so daß präzise und genau kontrollierte genetische Veränderungen möglich werden. Dies wird die angestrebte Diversifizierung in vielen Produktionsbereichen erlauben und zudem Effizienzsteigerungen erreichbar machen, die mit konventionellen Zuchtverfahren nicht möglich sind. Die erstellten Produkte werden gut charakterisiert und für den Verbraucher sicher sein.

Da viele echte landwirtschaftlich relevante Merkmale durch das Zusammenspiel mehrerer Gene beeinflusst werden, sind bisher kaum transgene Tiere mit im engeren Sinne landwirtschaftlichen transgenen Merkmalen erstellt worden. Bekannt geworden sind wachstumshormon-transgene Schweine, die in ökonomisch relevanten Parametern deutliche Verbesserungen aufwiesen. Nach Verbesserung der eingesetzten Genkonstrukte treten heute auch die anfänglich beobachteten pathologischen Nebenerscheinungen nicht mehr auf. Weitere

Anwendungsbereiche betreffen die Wollproduktion beim Schaf oder die Steigerung der Krankheitsresistenz. Besondere Bedeutung haben transgene Tiere im biomedizinischen Bereich, insbesondere für die Erzeugung rekombinanter pharmazeutischer Proteine aus der Milchdrüse sowie transgene Schweine für die Xenotransplantation. Heute existieren bereits transgene Tiere, die größere Mengen pharmazeutischer Proteine in der Milchdrüse produzieren. Wesentliche Voraussetzung dafür ist, daß das jeweilige Strukturprotein unter die Kontrolle eines milchdrüsen-spezifischen Regulationselements gestellt wird. Dadurch wird die Expression des jeweiligen Strukturgens in die Milchdrüse dirigiert. Die Substanzen müssen dann in ausreichendem Maße aus der Milch aufgereinigt werden. Die Blutproteine (α -Antritypsin, Antithrombin III oder Tissue Plasminogen Activator (TPA), produziert in der Milchdrüse transgener Ziegen oder Schafe, befinden sich bereits in der fortgeschrittenen klinischen Prüfung. Bei deren erfolgreichen Ausgang wird mit einer Verfügbarkeit auf dem Arzneimittelmarkt in den nächsten 2–3 Jahren gerechnet. Bei der Xenotransplantation werden humane Komplementregulatoren in transgenen Schweinen überexprimiert mit dem Ziel, die Komplementattacke, die bei der Übertragung von Xenotransplantaten auftritt und eine hyperakute Abstoßungsreaktion auslöst, auszuschalten. Erste Versuche mit der Übertragung solcher transgener Schweineherzen in Primaten haben gezeigt, daß die Strategie erfolgreich sein kann, da die Empfängertiere zwischen 40 und 70 Tagen überlebten. Bei weiteren Verbesserungen und Sicherstellung, daß durch die Übertragung porciner Organe pathogene Erreger (insbesondere Retroviren) nicht mit übertragen werden, ist in den nächsten 5–10 Jahren mit der klinischen Bereitstellung porciner Xenotransplantate zu rechnen.

8. Abschließende Betrachtungen

Angesichts der sich dramatisch verschärfenden weltweiten Ressourcen- und Umweltproblematik machen die geschilderten vielfältigen positiven

Übersicht 2: Aktueller Entwicklungsstand der Reproduktionsbiotechnologie bei Nutztieren

Biotechnologisches Verfahren	Schwein	Rind	Schaf/Ziege
Künstliche Besamung (KB)	++ (+)	+++	++
Embryotransfer (ET)	++	+++	++
Embryo-Kryokonservierung	+	+++	+++
Sexing	+	++	+
In-vitro-Produktion	+	++ (+)	+
Embryonenteilung	++	+++	++ (+)
Kerntransfer	+	++	+
Transgene Tiere (Mikroinjektion)	++	++	++

+ = Exp. Stadium, erste Nachkommen
 ++ = Praxisanwendung möglich
 +++ = Praxisanwendung verbreitet

Anwendungsbereiche der Bio- und Gentechnologie eine intensive Forschung erforderlich. Bei Forschung und Anwendung biotechnologischer Verfahren sind Aspekte des Tierschutzes und der Ethik zu beachten. Tiere müssen eine tierschutzgerechte Behandlung durch den Menschen erfahren. Im Rahmen der geltenden Tierschutzgesetze ist dies gewährleistet. Ethische Hauptkriterien sind, daß die neuen Biotechnologien zur Produktion besserer und spezifischerer Nutztiere (Diversifikation) eingesetzt werden und damit im Prinzip sich nicht von den bisherigen Zielsetzungen der Tierzucht unterscheiden; daß jedes mit Hilfe von Bio- oder Gentechnologie produzierte Tier an sich intakt ist; eine tierechte Haltung und Betreuung erfolgt und die Erhaltung einer ausreichenden genetischen Vielfalt gewährleistet ist. Die potentiellen Auswirkungen der Biotechnologie auf die sozialen und ökonomischen Verhältnisse sind rechtzeitig zu diskutieren. Auch die Folgen, die bei Nichtwahrnehmung der Chancen der Bio- und Gentechnologie entstehen, sind angesichts der großen zukünftigen Herausforderungen kritisch zu betrachten.

Mit dem Eintritt ins 21. Jahrhundert ist zumindest beim Rind (Übersicht 2) ein umfangreiches Arsenal praxisreifer reproduktions-biotechnologischer Verfahren vorhanden, während bei den anderen landwirtschaftlichen Nutztieren teilweise noch erheb-

licher Entwicklungsbedarf besteht. In Kombination mit den sich rasant weiterentwickelnden molekular-genetischen Erkenntnissen und Methodenspektrum steht somit in allernächster Zukunft ein wichtiges Instrumentarium zur Bewältigung zukünftiger Herausforderungen in Tierzucht und Tierproduktion zur Verfügung.

Ausgewählte Literatur

Adams, C. E. (Editor) (1981): Mammalian Egg Transfer. CRC Press, Boca Raton, USA.

Armstrong, D. T. (1993): Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* **39**, 7-24.

Armstrong, D. T. and Leung, P. C. K. (1990): The physiological basis of superovulation: Seminars in Reproductive Endocrinology **8**, 219-231.

Bavister, B. D. (1995): Culture of preimplantation embryos: Facts and Artifacts. *Human Reprod. Update* **1**, 91-148.

Bondioli, K. R., Westhusin, M. E. and Looney, C. R. (1990): Production of identical offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* **33**, 165-174.

Brackett, B. G. and Zuelke, K. A. (1993): Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* **39**, 43-64.

Brem, G. (1986): Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

Broadbent, P. J., Stewart, M. and Dolman, D. F. (1991): Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* **35**, 125-139.

Bungartz, L. and Niemann, H. (1994): Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.* **101**, 583-591.

Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. (1995): Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* **43**, 667-675.

Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. and Wilmut, I. (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64-66.

Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Léon, F. A. and Robl, J. M. (1998): Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem cell like cells. *Nature Biotechnology* **16**, 642-646.

Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Léon, F. A. and Robl, J. M. (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* **280**, 1256-1258.

Clark, A. J., Simons, P., Wilmut, I. and Lathe, R. (1987): Pharmaceuticals from transgenic livestock. *Tibtech* **5**, 20-24.

Cran, D. G., Johnson, L. A., Miller, N. G. A., Cochrane, D. and Polge, C. (1993): Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization. *Vet. Rec.* **132**, 40-41.

Espanion, G. und Niemann, H. (1996): Methodik der Erstellung und Anwendungsperspektiven transgener Nutztiere. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **103**, 320-328.

Falge, R., Ehling, Ch. und Niemann, H. (1996): Erhaltung genetischer Vielfalt bei Nutztieren durch biotechnologische Verfahren. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **103**, 336-340.

Hahn, J., Marquardt, O. W. und Niemann, H. (1996): Biotechnologie der Fortpflanzung bei Haustieren. In: *Bio- und Gentechnologie in der Tierzucht - Ethische Grund- und Grenzfragen in interdisziplinärem Dialog*, Hrsg. B. Sill, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, ISBN: 3-8001-4121-3, S. 9-36.

Hammer, R. E., Palmiter, R. D., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., Brinster, R. L. and Palmiter, R. E. (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**, 680-683.

Johnson, L. A. (1992): Advances in sex predetermination using flow cytometrically sorted X- and Y-corhomosomal sperm. *Embryo Transfer Newsletter* **10**, 5-11.

Johnson, L. A. (1996): Gender preselection in mammals: An overview. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **103**, 288-291.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J. Y., Daguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. (1999): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* **282**, 2095-2098.

Leibo, S. P. (1986): Cryobiology: Preservation of mammalian embryos. In: *J. W. Evans and A. Hollaneder (eds.). Genetic Engineering of Animals*, Plenum Publishing Corp., New York, USA, pp. 251-272.

Lucas-Hahn, A. und Eckert, J. (1996): Entwicklungsstand und Anwendungsbereiche der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **103**, 306-311.

Mazur, P. (1970): The freezing of biological systems. *Science* **168**, 939-949.

Niemann, H. (1991): Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* **35**, 109-124.

Niemann, H. (1995): Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. In: *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*, eds. G. Enne, G. F. Greppi, A. Lauria, Elsevier, Biofutur pp. 117-128.

Niemann, H. und Kues, W. (2000): Transgenic livestock: Premises and promises. *Anim. Reprod. Sci.* (im Druck)

Niemann, H. und Wrenzycki, C. (2000): Alteration of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* **53**, 21-34.

Niemann, H. und Meinecke, B. (1993): Embryo Transfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ISBN 3432 254717.

Niemann, H., Halter, R., Carnwath, J. W., Herrmann, D., Lemme, E. and Paul, D. (1999): Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.* **8**, 237-247.

Pavlok, A., Lucas-Hahn, A. und Niemann, H. (1992): Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* **31**, 63-67.

Prather, R. S. and First, N. L. (1990): Nuclear transfer in mammalian embryos. *Intern. Rev. of Cytol.* **120**, 169-190.

Pursel, V. G., Pinkert, C. A., Miller, K. F., Bolt, D. J., Campbell, R. G., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. and Hammer, R. E. (1989): Genetic engineering of livestock. *Science* **244**, 1281-1288.

- Rath, D., Johnson, L. A., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R. and Niemann, H. (1997): Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* **47**, 795-800.
- Reichelt, B. and Niemann, H. (1994): Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fertil.* **100**, 163-172.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, C., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, J., Colman, A. and Campbell, K. H. S. (1997): Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **278**, 2130-2133.
- Seidel, G. E., Jr. (1981): Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* **211**, 351-358.
- Tao, T., Reichelt, B. and Niemann, H. (1995): Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi- and intact porcine embryos. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 251-258.
- Van Vliet, R. A., Verrinder-Gibbins, A. M. and Walton, J. S. (1989): Livestock Embryo Sexing: A review of current methods with emphasis on Y-specific DNA-probes. *Theriogenology* **32**, 421-438.
- Willadsen, S. M. (1979): A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* **277**, 298-300.
- Willadsen, S. M. (1986): Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**, 64-65.
- Williams, T. J., Elsdon, R. P. and Seidel, G. E., Jr. (194): Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* **22**, 521-531.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., Mc Whir, J., Kind, A. J. and Campbell, K. H. S. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.
- Wrenzycki, C. and Carnwath, J. W. (1996): Molekularbiologische Aspekte in der Tierproduktion. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **103**, 316-320.



In vitro Produktion von Embryonen

1. Anwendung und Entwicklung

Die Entwicklung der in vitro Produktion von Embryonen (IVP) war eng mit der Entwicklung des Embryotransfers verbunden. Zunächst wurden Ende der sechziger Jahre bei Kaninchen und Maus die ersten Nachkommen von in vitro fertilisierten (IVF) Embryonen erzeugt (Chang, 1968). Voraussetzung für diese Erfolge war die Entdeckung der Spermienkapazitation von Austin (1951) und Chang (1951) in den frühen fünfziger Jahren. 1981 wurde das erste Kalb nach IVF geboren (Brackett et al., 1981). Im Zeitraum zwischen 1980 und 1990 wurde diese Biotechnologie methodisch intensiv weiterentwickelt. Meilensteine dazu waren die Umstellung der Inkubationstemperatur auf 39 °C, die Nutzung von Heparin zur Spermienkapazitation und vor allem die Entwicklung von in vitro Kulturverfahren für fertilisierte Eizellen sowie die minimalinvasive Gewinnung primärer Eizellen von lebenden Zucht-

Tabelle 1: Anwendung der in vitro Produktion von Embryonen

Produktion	Biotechnologie	Grundlagenforschung
Gebrauchskreuzung	Klonierung	Entwicklung
Kälberproduktion steriler Donoren	Transgenie	Differenzierung
Kälbererzeugung von <ul style="list-style-type: none"> ■ genetisch wertvollen Tieren ■ präpuberalen Tiere ■ Zuchtprogramme ■ Genetische Ressourcen 	Embryonale Stammzellen	Genregulation

Tabelle 2: OPU-IVP: Effiziente Alternative zu konventionellen ET

	OPU-IVP	Konventioneller ET
Sitzungen	4	1
Eizellen/Embryonen	38 (9.5)	7,3 (7.3)
Übertragbare Embryonen	18,8 (4.7)	4,3 (4.3)
weibliche Embryonen	7,05 (37,5 %)	2,05 (47,7 %)
Trächtigkeiten (D 30)	4,2 (59,1 %)	1,3 (61,0 %)
Trächtigkeiten (D 60)	3,8 (53,4 %)	1,2 (59,4 %)

nach Bousquet et al. 1999

tieren (Gordon, 1994). Heute ist die IVP ein zentraler Bestandteil vieler Biotechnologien und aus Forschung und Praxis nicht mehr wegzudenken. Eine Übersicht über die Anwendung der IVP gibt Tabelle 1.

Die größte Bedeutung hat die IVP beim Rind. Die weiteren Ausführungen werden sich daher hauptsächlich auf diese Spezies konzentrieren. Auch für die tierzüchterische Praxis stellt die IVP eine effiziente Alternative zum konventionellen Embryotransfer dar (Bousquet et al., 1999). In Kombination mit der in vivo Eizellgewinnung (ovum pick up, OPU) wurde gezeigt, dass mit 4 OPU-IVP-Sitzungen dreimal mehr weibliche Kälber erzeugt werden können als mit einem konventionellen ET-Programm (Tabelle 2).

Die Trächtigkeits- und Geburtsverläufe nach IVP sind immer noch gekennzeichnet durch eine verlängerte Trächtigkeitsdauer, erhöhte Geburtsgewichte

Tabelle 3: IVP, ET und AI: Trächtigkeits- und Geburtsparameter

Technik	Anzahl der Kälber	Trächtigkeitsd.	Geburtsgewicht	Geburtsverlauf	Sectio	Perinatal. Tod (%)
AI	1160	281 ± 0,2	42,8 ± 0,2	2,44 ± 0,04	0,9	6,1 ± 0,6
ET	45	283,5 ± 0,8	42,7 ± 0,8	2,74 ± 0,2		6,6 ± 0,6
IVP	251	283,9 ± 0,4	46,2 ± 0,5	3,05 ± 0,11	13,0	14,4 ± 2,3

Kruip, 1997

und eine erhöhte perinatale Todesrate. Tabelle 3 (Kruip und Daas, 1997) zeigt einen Vergleich zwischen Kälbern aus künstlicher Besamung (AI), Embryotransfer (ET) und IVP. Die züchterische Anwendung der IVP liegt im wesentlichen auf der Bullenmutterseite. Durch Erhöhung der Anzahl der Nachkommen können Voll- und Halbgeschwistergruppen gebildet werden (Verbesserung der Zuchtwertschätzung) und die Selektionsintensität auf der Mutterseite erhöht werden. Ein weiterer Beitrag zur Steigerung des Zuchtfortschrittes wird durch die Verkürzung des Generationsintervalls erreicht.

2. Das Verfahren

Gewinnung der Eizellen

Für die IVP werden primäre Oocyten aus antralen Follikeln mit einem Durchmesser von 2–8 mm gewonnen. Diese Follikelpopulation befindet sich an der Oberfläche der Eierstöcke sowohl von trächtigen als auch nicht trächtigen Tieren. Auch sehr junge Färsen besitzen antrale Follikel an der Oberfläche ihrer Ovarien. Allerdings herrscht eine hohe Dynamik an Follikelwachstum und Follikelatresie, so dass vor allem bei Follikeln ab 2 mm ein großer Teil sich in Atresie befindet (Abbildung 1). Die gewonnenen Eizellen stellen daher immer eine heterogene Population hinsichtlich ihrer biologischen Vitalität dar. Gekennzeichnet ist dies durch die unterschiedliche Qualität der die Eizelle umgebenden Kumuluszellen. (Abbildung 1, links gute Qualität, Mitte und rechts schlechte Qualität). Einen wichtigen Beitrag für die züchterische Nutzung der IVP brachte die minimalinvasive Follikelpunktion.

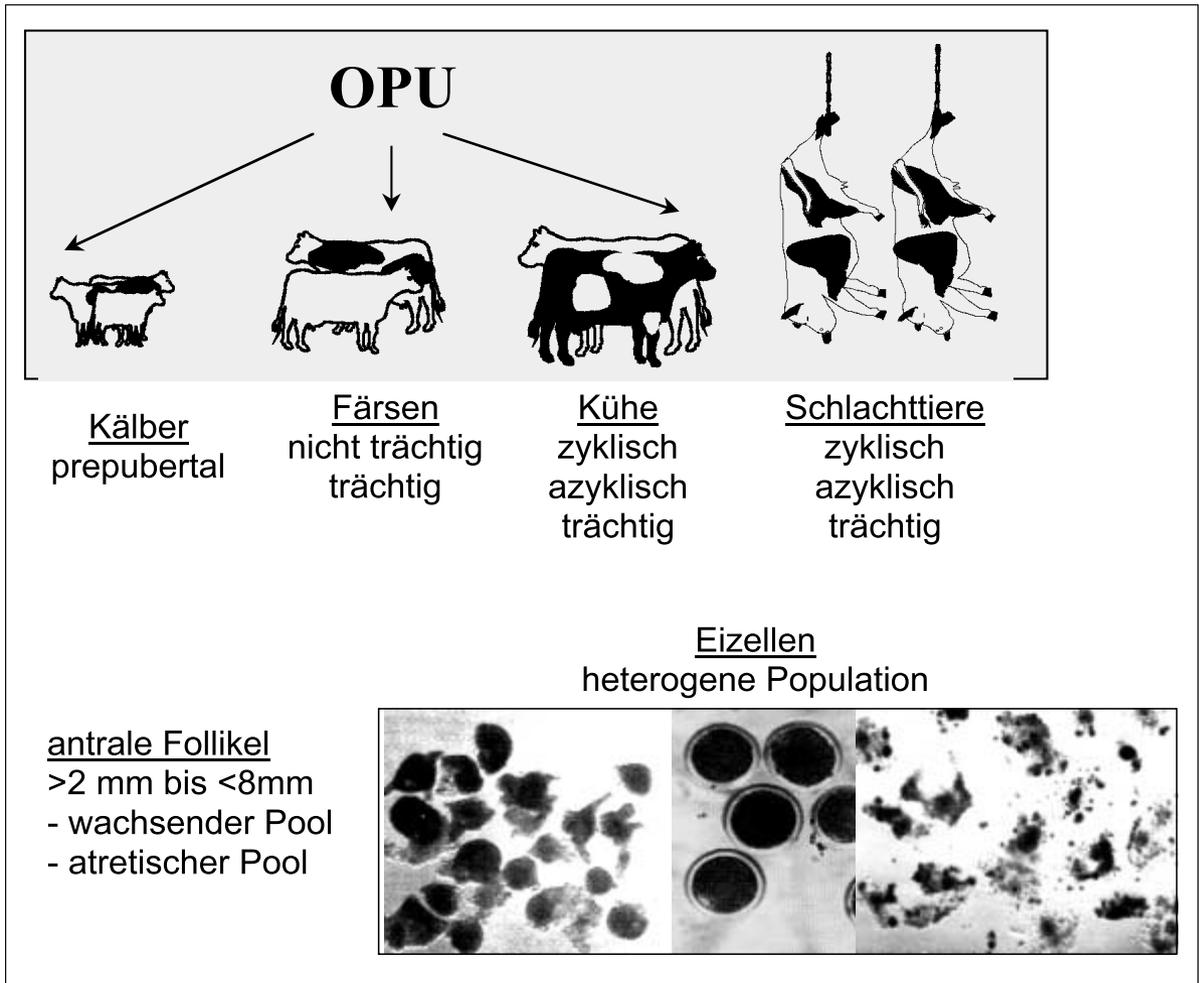
Dabei wird mit einem in der Vagina deponierten Ultraschallkopf der Eierstock mit seinen Follikeln dargestellt und diese mit einer im Schallkopf integrierten Aspirationsnadel nach Penetration der Vaginalwand abgesaugt. Dieses Verfahren lässt sich bei einer Vielzahl von weiblichen Rindern unterschiedlicher Altersstufen unabhängig von Zyklus und Trächtigkeitsstand (bis 5 Mo) sehr gut anwenden, wobei Aspirations Sitzungen ein- bis zweimal wöchentlich durchgeführt werden können. Hormonelle Behandlungen können zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen, sind aber nicht Voraussetzung.

Die so gewonnenen Eizellen sind primäre Eizellen, d. h. sie befinden sich im Diplotän-stadium, sind aber von ihrer Größe her ausgewachsen. Zur Produktion von Embryonen müssen sie in vitro maturiert, fertilisiert und kultiviert werden.

In vitro Maturation (IVM)

Sie bezweckt die Erzeugung einer befruchtungs-fähigen Eizelle. Voraussetzung dazu ist die Reifung des Kernes und des Zytoplasmas. Die Kernreifung beinhaltet die Entwicklung des Ruhekernes (Diplotän, I. meiotische Reifeteilung) zur Metaphase der II. meiotischen Reifeteilung. Sichtbar wird dies durch die Bildung eines Polkörperchens und des haploiden Chromosomensatzes (Abbildung 2, b, c). Die Reifung des Zytoplasmas ist durch Umstrukturierung der Zellorganellen gekennzeichnet. Die kortikalen Granula wandern unter das Oolemm, Lipidgranula und Mitochondrien wandern in Richtung Zentrum und hinterlassen eine organellfreie Zone

Abbildung 1: Eizellgewinnung



mit Klustern von endoplasmatischem Retikulum, fast kein Golgi-Apparat.

Als Maturationsmedien werden einfach oder komplex zusammengesetzte Gewebekulturmedien verwendet. In dem undefinierten System wird

Serum zugesetzt, bei den definierten Medien wird kein Serum eingesetzt.

Beispiel: undefiniertes, komplexes System: Parker's Medium 199 mit Earle's Salzen; 33,9 mMNaHCO₃; 4,43 mMHepes, 2,0 mM Na-Pyruvat;

Abbildung 2: In vitro Maturation

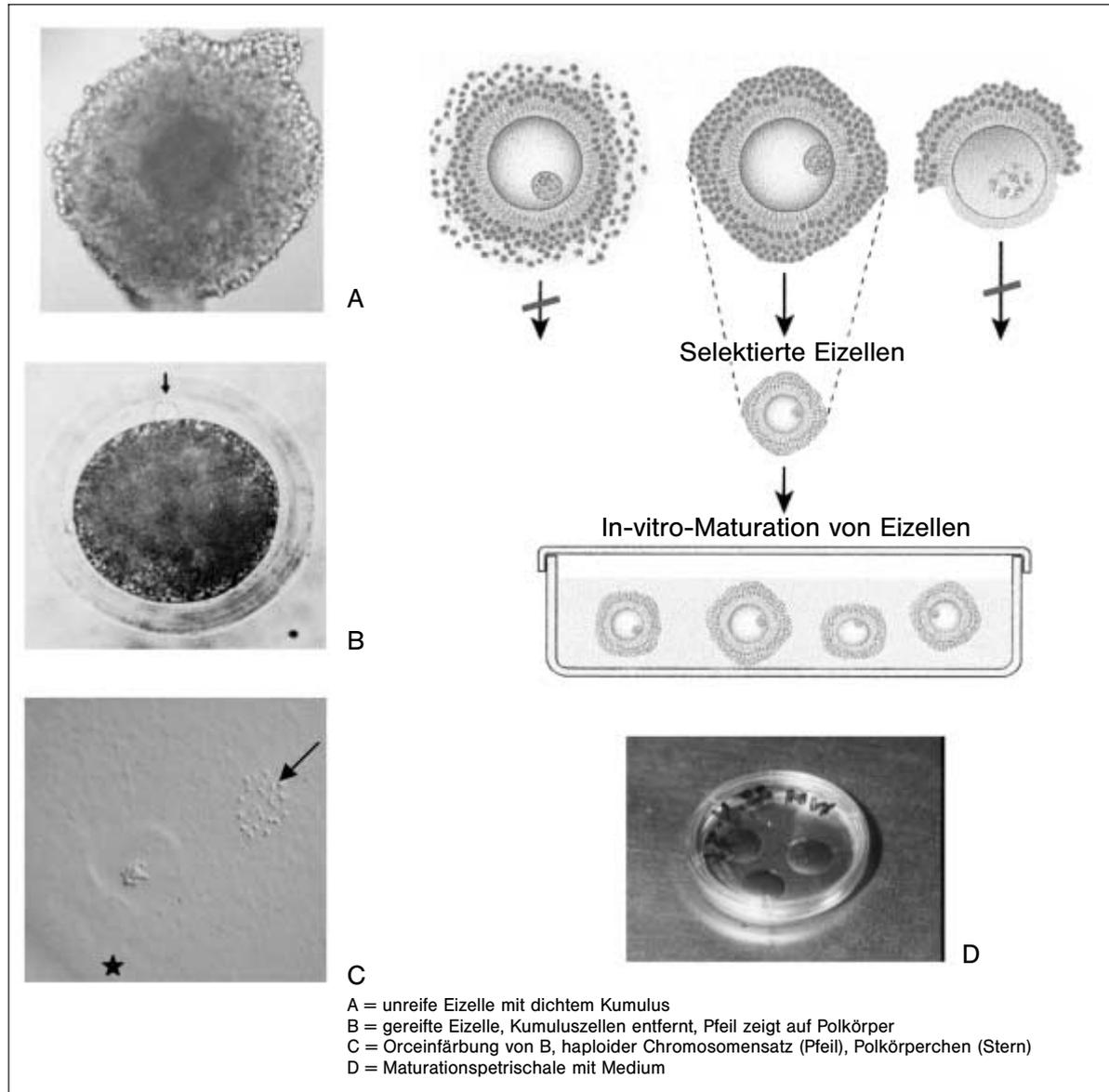
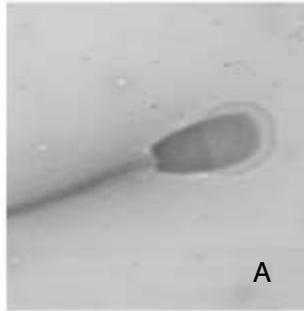
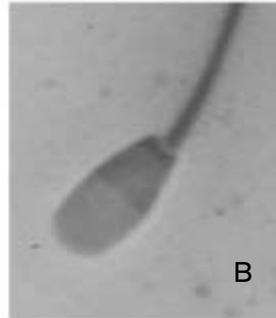


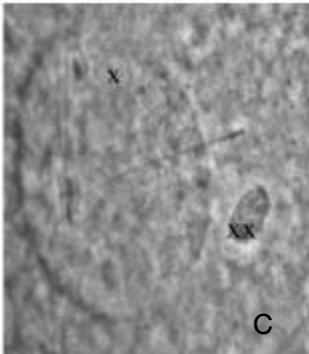
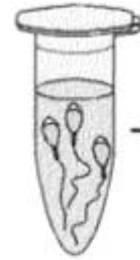
Abbildung 3: In vitro Fertilisation



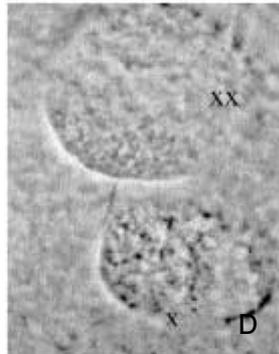
A



B

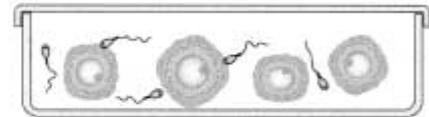


C

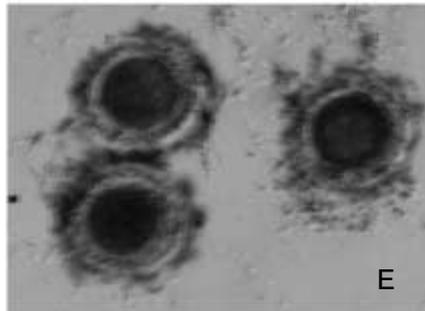


D

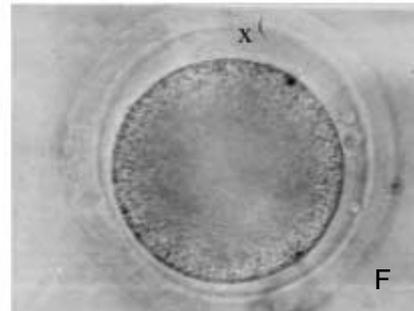
A, B: Spermien vor (A) und nach (B) der Akrosomreaktion
C: Eizelle, mit decondensierendem Spermienkopf (xx) und weiblichem Vorkern (x)



D: Befruchtete Eizelle mit männlichen (xx) und weiblichem Vorkern (x)



E



F

E: Eizellen nach 16 Stunden Kokultur mit Spermien, Spermien haften an Zona Pellucida

F: Fertilisierte Eizelle mit 2 Polkörperchen

2,92 mM Ca-Laktat; 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin, 10 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH; 1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ Östradiol. Der pH-Wert liegt bei 7,3–7,4 und die Osmolarität bei 290 mOsm/kg. Häufig werden 10–20 Eizellen à 50–100 (μl Medium bei einer Temperatur von 39 °C für 24 Stunden unter einer 5% CO_2 Atmosphäre maturiert.

In vitro Fertilisation (IVF)

Voraussetzung für die Fertilisierung in vitro sind vollständig maturierte Eizellen und kapazitierte Spermien. Die Spermienkapazitation erfolgt unter Heparineinwirkung entweder während der Kokultur mit den Eizellen oder während des Waschvorganges der Spermien vor der Koinkubation mit den Eizellen. Die Koinkubation erfolgt in der Regel in einer modifizierten Tyrodelösung für 16–20 Stunden bei einer Spermienkonzentration von 10^6 Spermien/ml. Hinzuweisen ist hier, dass sich zwischen Bullen, die eine normale NRR in vivo zeigen, oft beträchtliche Unterschiede in ihrer in vitro Fertilisationsfähigkeit zeigen. Die Abbildung 3 zeigt den Fertilisationsvorgang.

In vitro Kultur (IVK)

Hier wird die Zygote bis zur späten Morula oder frühen Blastozyste kultiviert. Dann kann sie entweder eingefroren oder transferiert werden. Ursprünglich wurden dazu Kokulturverfahren entwickelt, wobei somatische Zellen gemeinsam mit den Zygoten kultiviert wurden. Dazu wurden einfache oder auch komplexe Medien verwendet. Eine Vielzahl von Kokulturzellen wie Granulosazellen, Eileiterepithelzellen, Buffalo-Red-Liverzellen usw. unterstützen die frühembryonale in vitro Entwicklung. Alle Kokultursysteme enthalten Serumzusätze. IVP-Embryonen aus solchen Systemen entwickeln sich in vivo zu einem Teil in schwergewichtige Kälber (siehe weiter unten). Durch Entwicklung serum- und zellfreier Kultursysteme (Synthetic-Oviduct-Fluid Medien) konnte der Anteil der Fehlentwicklungen reduziert werden. Die Abbildung 4 zeigt in vitro kultivierte Embryos vom Einzell-

Stadium bis zur expandierten Blastozyste. Die Effizienz der Kultursysteme liegt zwischen 20 und 30% (gemessen an der Entwicklung von Blastozysten). Generell zeigen IVP-Embryonen eine schnellere Entwicklung, schlechtere Kompaktierung und mehr Lipideinschlüsse als in vivo gewonnene Embryonen.

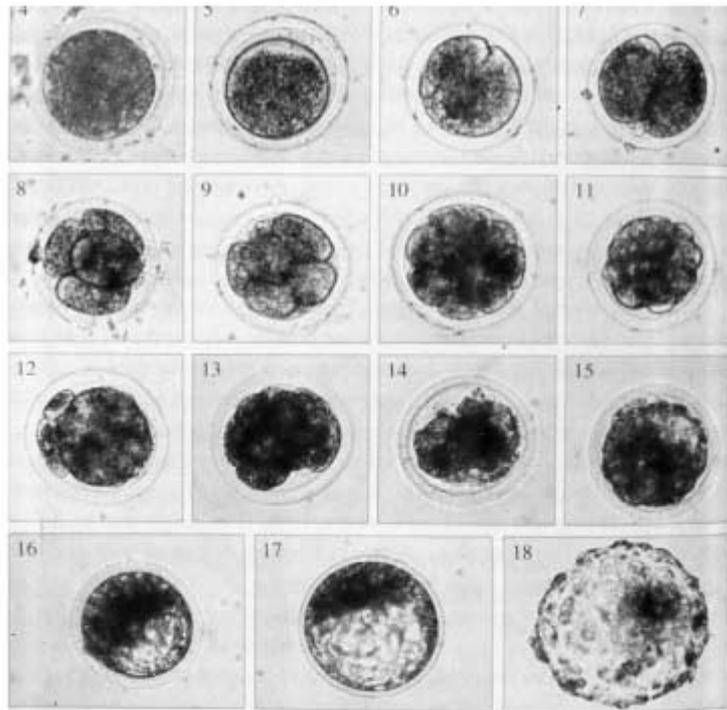
Evaluierung der IVP-Embryonen

Zur Qualitätsbeurteilung von IVP-Embryonen werden der Entwicklungszustand, die Zellanordnungen und Fragmentierung und Zellgröße sowie Größe und Farbe der Embryonen mikroskopisch beurteilt. Allerdings erbringen auch die qualitativ besten IVP-Embryonen keine höhere Trächtigkeitsrate als 50–60%. Die in vitro Entwicklungskompetenz (Entwicklung bis zum schlupffähigen Embryo) ist ebenfalls kein zuverlässiges Kriterium für die in vitro Entwicklungsfähigkeit, obwohl der Durchmesser am Tag 7 eng mit der Schlupfwahrscheinlichkeit am Tag 9 korreliert ist. Weiter ist die in vivo Entwicklung von Tag-7-Blastozysten nicht von deren Zellzahl abhängig. So erscheinen die in vitro erfassten Merkmale zwar in sich schlüssig, sind jedoch als Qualitätskriterium für die Entwicklungskompetenz in vivo als kritisch zu betrachten. Als eine Ursache werden unterschiedliche Genexpressionsprofile in den IVP-Embryonen diskutiert. Analysiert man die Profile von IVP-Embryonen unterschiedlicher Qualität oder unterschiedlichen Entwicklungsstandes, so kommen deutliche Differenzen des generellen Expressionsmusters zu Tage (Abbildung 5).

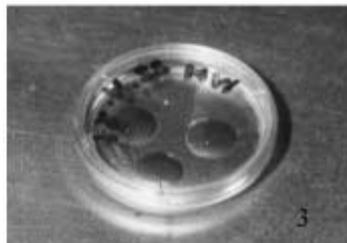
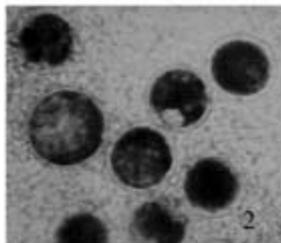
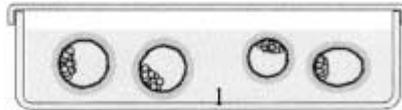
3. IVP-Embryonen: Trächtigkeit, Geburt und perinatale Entwicklung

Im Vergleich zur künstlichen Besamung zeigt die IVP einen höheren Anteil mit unregelmäßigen Umrindern, erhöhtes Geburtsgewicht, verlängerte Trächtigkeit, höhere perinatale Mortalität, mehr Abnormalitäten, erhöhte Abortrate, mehr Bullenkälber und Eihautwassersucht. Diese Symptomatik

Abbildung 4: In vitro Kultur von Embryonen



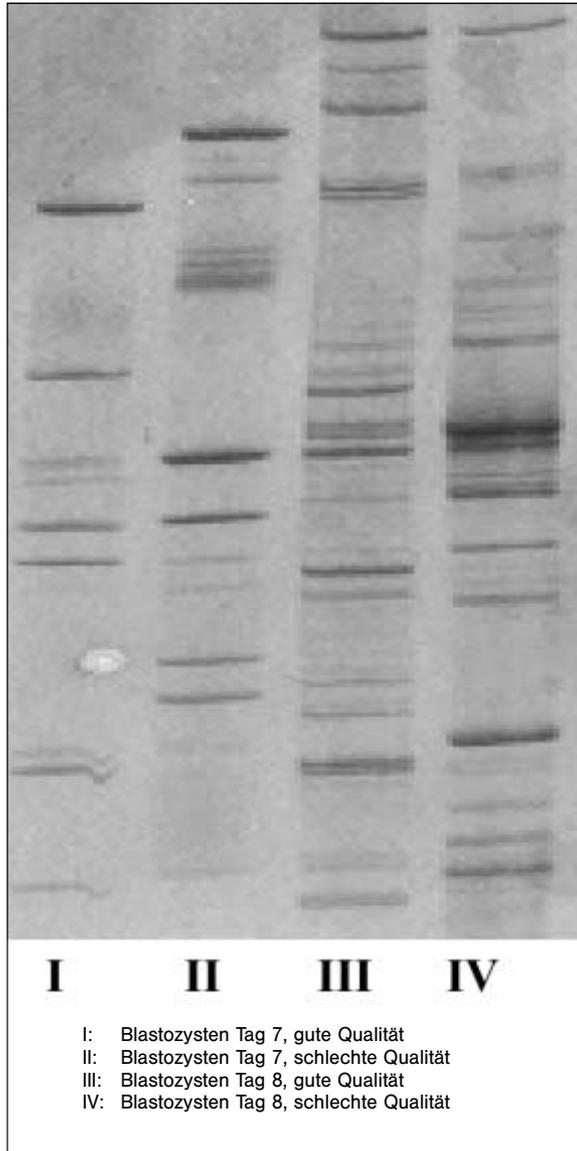
- 4– 7: Ein- und Zweizeller
- 8–10: Vier-, Acht- und Sechzehnzeller
- 11–14: Kompaktierte Morulae
- 15: frühe Blastozyste
- 16: mittlere Blastozyste
- 17: expandierte Blastozyste
- 18: geschlüpfte Blastozyste



- 2: Blastozysten und Morulae in Kokultur
- 3: Kulturschale

nach van Soom, 1995

Abbildung 5: Differentielle Genexpressionsprofile von IVP Blastozysten



wird als Large-Calf-Syndrom (LOS) bezeichnet. Trächtigkeitsdauer und Geburtsgewichte sind häufig erhöht (Abbildung 6). Die Untersuchung von Wag-tendonk et al. gibt nähere Aufschlüsse über die zahlenmäßige Verteilung von Aborten und Missbildungen und Geburtsverlauf (Tabelle 4). Hier zeigt sich klar, dass LOS verstärkt in nicht definierten Kultursystemen auftritt. Tendenziell wird das Geburtsgewicht reduziert, wenn serumfreie Systeme verwendet werden. Die Ursachen für LOS werden nicht nur im Kultursystem alleine vermutet. Ein höherer Anteil der Eizellen stammt aus atretischen Follikeln. In solchen Eizellen kann es zu chromosomalen Abberationen und DNA-Schädigungen kommen. Weiter wird vermutet, dass die epigenetische paternal allelspezifische Methylation bestimmter DNA-Abschnitte während der embryonalen Zellprogrammierung durch die in vitro Bedingungen gestört wird. Auch suboptimale Kulturbedingungen (z. B. Serum, Sauerstoffspannung) könnten zu einer Schädigung der Mitochondrien führen.

4. Ausblick

Die IVP-Technologieforschung wird sich in den nächsten Jahren mit den Bedingungen, die zu einer normalen embryonal, fetal und perinatal Entwicklung führen, verstärkt auseinandersetzen. Die Ursachen für die abnormale Entwicklung werden vermehrt in frühembryonalen, preimplantiven Entwicklungen zu suchen sein, wobei vor allem die genetischen und epigenetischen Effekte der in vitro Bedingungen untersucht werden müssen.

Literatur:

Austin, C. R., 1951: Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Australian Journal of Scientific Research 4, 581-596.

Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G. and Durocher, J., 1999 : In vitro embryo production in the cow : an effective alternative to the conventional embryo production approach. Theriogenology 51, 59-70.

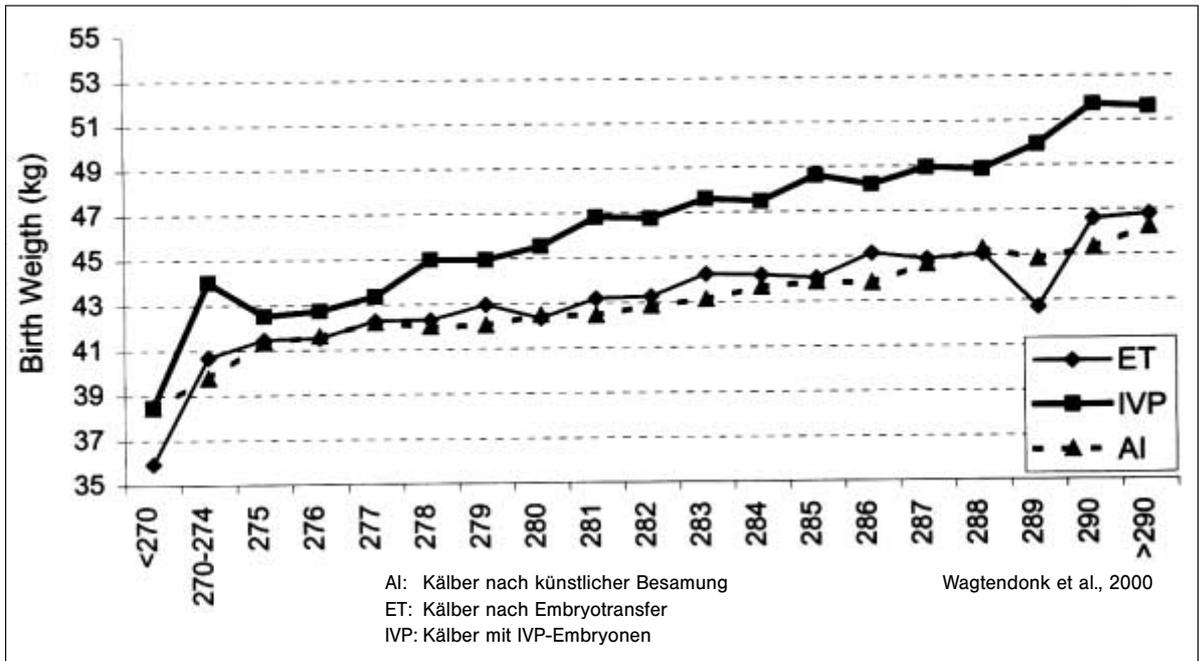
Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. and Dressel, M. A., 1982: Normal development following in vitro fertilisation in the cow. Biology of Reproduction 27, 147-158.

Tabelle 4: Aborte und Missbildungen nach IVP

Parameter	Untersuchung 1			Untersuchung 2		
	AI	MOET	IVP-Kokultur	AI	IVP-Kokultur	IVP-SOF
% Aborte	1,3 (5,353) ^a	1,1 (2,242) ^a	2,6 (1,452) ^b	0,5 (1,764) ^a	0 (110) ^a	1,3 (152) ^a
% Angeborene Missbildungen	0,8 (5,353) ^a	1,5 (1,089) ^b	3,7 (1,1129) ^c	0,6 (1,764) ^a	3,7 (81) ^b	1,0 (97) ^{ab}
% Kaiserschnitt	1,5 (3,313) ^a	8,4 (1,107) ^b	11,2 (1,179) ^c	0,7 (1,764) ^a	3,8 (80) ^b	8,3 (96) ^b
% männlich	49,8 (5,353) ^a	53,7 (2,194) ^b	52,9 (1,415) ^b	52,8 (1,764) ^a	56,1 (110) ^a	54,9 (152) ^a

Wagtendonk et al., 2000

Abbildung 6: Trächtigkeitsdauer und Geburtsgewicht



Chang, M. C., 1951: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature* 168, 697-698.

Chang, M. C., 1968: In vitro fertilisation of mammalian eggs. *Journal of Animal Science* 27, 15-22.

Gordon, J., 1994: Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, UK.

Kruip, T. A. M. and Daas, J. H. G., 1997: In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47, 43-52.

Wagtendonk, A. M., Mullaart, E., Roos, A. P. W., Merton, J. S., Daas, J. H. G., Kemp, B. and Ruigh, L., 2000: Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53, 575-594.

Keimbahn-Gentransfer



1. Einleitung

Ein Organismus, der ein »fremdes«, in vitro rekombiniertes Gen oder Nukleinsäurefragmente trägt, wird als Transgen (Gordon und Ruddle, 1981) bezeichnet. Erfolgt der Transfer des Genkonstruktes in die Keimzellen, kann die Weitergabe an die Nachkommen erfolgen und man spricht vom Keimbahn-Gentransfer. Je nachdem, in welchem Entwicklungsstadium der Empfängerzelle(n) das Gen integriert wird, kann der Organismus das Gen in allen aber auch nur in einzelnen Organen, Geweben oder Zellen tragen (Mosaik). Gegenüber dem somatischen Gentransfer, bei dem nur somatische Zellen verändert werden, zielt der Keimbahn-Gentransfer auf eine züchterische Nutzung über Generationen hinweg ab, d. h. die Erstellung und Züchtung von transgenen Tierlinien über mehrere Generationen hinweg aus dem ursprünglichen keimtransgenen Tier (Founder). Die ersten Säugetiere, bei denen die Keimbahnintegration gelang, waren Mäuse (Gordon und Ruddle, 1981). Dem folgten wenige Jahre später erste Berichte zur Erstellung Keimbahn-transgener Nutztiere wie Kaninchen, Schafe und Schweine (Hammer et al., 1985, Brem et al., 1985). Dennoch liegt nach weiteren 15 Jahren ein Hauptaugenmerk immer noch auf der Suche nach einer effizienten und verlässlichen Technik zur Erzeugung transgener Tiere. Die klassische Methode der Mikroinjektion von Genen in die Vorkerne von Zygoten unterliegt erheblichen Schwankungen, die sich in der Effizienz und damit im Gesamtaufwand bemerkbar macht.

Während bei Labortieren die Verwendung der Mikroinjektion zu akzeptablen Ergebnissen führt, unterliegt die Produktion und der Einsatz transgener landwirtschaftlicher Nutztiere zahlreichen Hindernissen, die es gilt effektiv zu überwinden. Wege zu neuen Gentransfer-Techniken auf diesem Gebiet hingegen sind vielversprechend entwickelt und bereits eingesetzt worden. Eine besondere Rolle bei der Erzeugung genetisch modifizierter Organismen vor allem im Bereich landwirtschaftlicher Nutztiere spielen innovative Techniken zur Gewinnung/Erzeugung sowie zum Transfer früher Embryonalstadien.

2. Anwendungsgebiete und Techniken des Gentransfers

Die Erzeugung von transgenen landwirtschaftlichen Nutztieren eröffnet zahlreiche Perspektiven, die in drei wesentliche Bereiche gegliedert werden können (Tabelle 1; siehe Kapitel Verbesserung der Tiergesundheit und neue Nutzungsmöglichkeiten von Tieren durch Gentransfer).

Trotz intensiver Bemühungen zur Erstellung Keimbahn-transgener Nutztiere werden in nur wenigen Bereichen Tierlinien zur erfolgreichen Anwendung etabliert. Hauptgründe sind z. B.

1. reproduktionsphysiologische Barrieren (längeres Generationsintervall, längere Zyklusdauer, limitierte Verfügung über Eizellen und Embryonen) von landwirtschaftlichen Nutztieren gegenüber Labortieren,

Tabelle 1: Anwendung transgener landwirtschaftlicher Nutztiere

➔	Im Bereich der Grundlagenforschung zum Studium der Funktion von Genen und in biomedizinischen und pharmazeutischen Studien (Tiermodelle)
➔	im Bereich der »klassischen« landwirtschaftlichen Zucht- und Leistungsziele (Fleisch, Milch, Wolle etc., Gesundheit, Reproduktion)
➔	im Bereich der neuen Biotechnologie zur Gewinnung rekombinanter Proteine (Bioreaktoren, Gene Farming), zur Produktion neuartiger Nahrungsmittel (Nutraceuticals) und im Bereich der Transplantationsmedizin (Xenotransplantation).

2. geringe Integrationsraten und vor allem
3. die zufällige Integration des Transgens im Wirtsgenom bei Mikroinjektion mit der Folge von eventuell ungünstigen chromosomalen Positionseffekten bei der Genexpression.

Neuere Techniken versuchen diese Nachteile zu umgehen. In Tabelle 2 sind die derzeitigen Techniken zur Erstellung transgener landwirtschaftlicher Nutztiere aufgelistet:

Tabelle 2: Methoden zur Erstellung transgener landwirtschaftlicher Nutztiere

Gentransfermethode	Zur Übersicht
Mikroinjektion	Brem und Müller, 1994
Spermien vermittelter Gentransfer	Schellander und Brem 1997; Gandolfi, 2000
Retrovirale Vektoren	Haskell und Bowen, 1995; Chan et al., 1998
Kerntransfer/Klonierung	Cibelli et al., 1998

2.1. Mikroinjektion

Die Verwendung der Mikroinjektion einer Genlösung erfordert technische Voraussetzungen und entsprechende Erfahrungen im Umgang mit Embryonen. Besonders auffällig sind die unterschiedlichen Integrationsraten bei verschiedenen Spezies (Wall et al., 1997). Als Maßzahl kann die

Anzahl zu injizierender Embryonen gewertet werden, die zur Erstellung eines transgenen Tieres notwendig ist. Bei der Maus, beim Schwein, bei Schaf und Ziege und beim Rind liegt das Verhältnis bei 1 : 40, 1 : 100, 1 : 110 und 1 : 90 bzw. bei 1 : 1600 (Wall et al., 1997). Es fällt auf, daß unter Berücksichtigung der produzierten Eizellen bzw. Zygoten, der mikroinjizierten und schließlich transferierten Embryonen die Gesamteffizienz besonders größerer Nutztiere deutlich schlechter ausfällt (Eystone et al., 1998; Echelard et al., 2000). Insgesamt stellt diese Technik aber trotzdem ein verlässliches und sicheres Verfahren mit relativ Spezies-spezifisch konstanten Integrationsraten dar. Charakteristisch sind ebenfalls relative hohe Raten an Mosaiken (Tiere, die nicht in allen Körper-/Keimzellen das Transgen integriert haben), die Integration von mehreren Kopien sowie die Möglichkeit, Gene verschiedener Fragmentlängen zu injizieren. Eine optimale Konzentration der Genlösung erhöht die Integrationswahrscheinlichkeit (Besenfelder et al., 1998; Brem et al., 1996; Roschlau et al., 1989).

2.2. Spermien-vermittelter Gentransfer

Der Spermien-vermittelte Gentransfer stellt eine nicht invasive Methode dar, um während des Befruchtungsvorganges das Transgen in die Oozyten zu transferieren. Besonders dazu geeignet ist die *in vitro*-Fertilisation (Schellander und Brem, 1997; Gandolfi, 2000). Eine Zeit von 10 bis 40 Minuten wird vorausgesetzt, um das Spermium an der Oberfläche mit DNA zu beladen, wobei bestimmte Regionen (Äquatorialebene, postakrosomale Region) auf dem Spermium eine DNA-Bindungsaffinität aufweisen (Gandolfi et al., 1989; Lauria und Gandolfi, 1993). Bislang konnten transgene Mäuse (Maione et al., 1998), Schweine (Gandolfi et al., 1989), Fische (Khoo et al., 1992) und Rinder (Schellander et al., 1995) auf diesem Weg produziert werden. Allerdings muß festgehalten werden, daß einzelne Schritte des Spermien-vermittelten Gentransfers ungeklärt sind, uneinheitliche Integra-

tions- und relativ hohe Mosaikraten aufweisen und der Erfolg limitiert ist. Es ist aber zu erwarten, daß unter der Entwicklung verbesserter Methoden, die auf der Verwendung von Liposomen (Bachiller et al., 1991), der Injektion von Genlösung in die Nebenhoden (Huguet und Esponda, 1998) oder der Elektroporation (Gagne et al., 1991) beruhen, ein deutlicher Fortschritt beim Spermien-vermittelten Gentransfer zu erwarten ist.

2.3. Retrovirale Vektoren

Bei retroviralen Vektoren wird deren generelle Fähigkeit, mittels eines eigenen reversen Transkriptionsmechanismus im Wirtsgenom zu integrieren, genutzt. Da endogene Retroviren bereits im Säuger-genom vorkommen, werden sie als chromosomale Elemente bezeichnet (Taruscio und Mantovani, 1998; Temin, 1989). Die Verwendung retroviraler Vektoren stellt ein sehr effizientes System zur Produktion transgener Tiere dar, aber aus Gründen der Biosicherheit und der Spezies-spezifischen Einsetzbarkeit kamen Retroviren nur vermindert zum Einsatz. Es wurden defekte retrovirale Vektoren entwickelt, die zwar ihre Replikationsfähigkeit verloren haben, aber dennoch im Rahmen des Gentransfers als wesentlich sicherer und effizienter gelten (Shimotohno und Temin, 1981). Nach der Erzeugung von transgenen Mäusen und Hühnern wurden 1993 (Kim et al.) erstmals Rinderembryonen transfiziert bzw. transgene Feten (Haskell und Bowen, 1995) erhalten. Diese Techniken führen zu sehr hohen Integrationsraten von Einzelkopien der Genkonstrukte und stellen damit ein sehr effektives System dar, das aber häufig zu Insertionsmutationen führt, deren Folge wiederum embryonale Entwicklungsstörungen sind. Da die Integrationsprozesse retroviraler Vektoren an den Zellzyklus gebunden sind und nur in sich teilenden Zellen erfolgen, sind beispielsweise Metaphase II Oozyten gut dafür geeignet. In diesem Oozytenstadium besitzen die Vorkerne noch keine Membrane. Chan et al. (1998) konnten zeigen, daß aus Oozyteninfektion Nachkommen geboren wurden, die alle das Transgen trugen. Der Einsatz

retroviraler Vektoren konzentriert sich bislang auf das Versuchsstadium. Es ist dennoch zu erwarten, daß diese Vektoren auch im Bereich des somatischen Gentransfers in Zukunft von besonderem Interesse für die Transgenindustrie sein werden.

2.4. Kerntransfer/Klonierung

Die Besonderheit der Klonierung liegt in der Erzeugung genetisch identischer Tiere (siehe Kapitel zur *Klonierung*). Für die Erstellung transgener Tiere liegt der entscheidende Vorteil darin, daß die Transformation auf der Ebene embryonaler, primordialer Keimzell- und fetaler sowie adulter Zelllinien durchgeführt werden kann. Ein breites Spektrum an chemisch-physikalischen Gentransfermethoden und *in vitro*-Selektionsmaßnahmen ermöglicht die Etablierung von Zelllinien, bei denen ein additiver Gentransfer (Insertion) oder rekombinanter Gentransfer (*Knock out*: Ausschalten von Genen; *Knock in*: Einfügen eines Genes) durchgeführt wurde. Bei erfolgreicher Klonierung tragen alle geborenen Jungtiere das Transgen in allen Zellen. Obwohl beim Rind, Schaf und Ziege die Klonierung nun routinemäßig durchgeführt wird und beim Schwein Einzelerfolge bekannt sind, sind in den Teilbereichen der Eukleation von Eizellen, der Fusion von Spender- und Empfängerzellen, der Aktivierung und der Weiterentwicklung Verbesserungen anzustreben, um die Klonierung zur Erzeugung transgener Nutztiere effizient einsetzen zu können.

3. Bereitstellung frühembryonaler Stadien für den Gentransfer

Generell zielen alle Techniken zur Generierung transgener Tiere darauf ab, das Transgen im frühembryonalen Stadium zu transferieren, um eine Integration in möglichst allen Geweben und Organen zu erreichen. Das bedeutet, daß außer den unmittelbaren Gentransfertechniken grundlegende Vorarbeiten zur Bereitstellung qualitativ hochwertiger Eizellen und Embryonen sowie deren Transfer in geeignete Empfängertiere den Erfolg des Keimbahn-

Gentransfers maßgeblich beeinflussen. Da die Mikroinjektionstechnik die bislang am häufigsten durchgeführte Methode ist und die Genmodifikation im frühen Embryonalstadium stattfindet, konzentrieren sich die weiteren Ausführungen zur Erzeugung Keimbahn-transgener Nutztiere (Kaninchen, Schwein, Schaf, Ziege und Rind) im Zusammenhang mit der Gewinnung und Übertragung manipulierter Embryonen auf diese Technik. Ergänzend zu der nun folgenden Beschreibung werden auf die Kapitel der *in vitro*-Produktion, der hormonellen Steuerung der Reproduktion, der geschlechtsspezifischen Trennung von Samen und der Klonierung verwiesen.

Gewinnung früher Embryonalstadien

Um vergleichbar gute Ergebnisse aus der Gewinnung von Embryonen im Zygotenstadium erzielen zu können, müssen die teilweise großen reproduktionsbiologischen Unterschiede verschiedener Nutztierspezies berücksichtigt werden. Die Beeinflussung des Reproduktionsgeschehens bei den einzelnen Nutztierarten ist erheblichen Spezies-spezifischen Modifikationen unterworfen. Von entscheidender Bedeutung sind die Synchronisations- und Superovulationsprotokolle unter Berücksichtigung der Teilungsaktivität der Embryonen verschiedener Spezies (Tabelle 3 und 4). Während beim Kaninchen die Ovulation erst nach hormoneller Induktion oder Anpaarung erfolgt, erfordert die Synchronisation

größerer Nutztiere gezielte Aktionen. Beim Schwein bestehen neben der hormonellen Vorbereitung weitere Möglichkeiten zur optimalen Zyklussynchronisation wie die Verwendung von präpuberalen Jungsaunen unmittelbar vor dem ersten Ovarzyklus (Tiere mit einem Körpergewicht von 80–90 kg) sowie Sauen 5–8 Tage nach dem Absetzen der Ferkel. Bei Rind, Schaf und Ziege beschränkt sich die Synchronisation auf die Verlängerung (Gestagene) oder die Verkürzung (Prostaglandine) des Diöstrus.

Zur Gewinnung der Embryonen im Zygotenstadium wird die Brunst der Spender- und Empfänger-tiere auf den Vortag der Embryogewinnung, -manipulation und des Transfers gelegt. An diesem Vorbereitungstag erfolgt morgens und abends eine Besamung. Eine Besonderheit stellt dabei das Kaninchen und das Schaf dar. Das Zygotenstadium tritt beim Kaninchen nahezu exakt 19–21 Stunden nach hormoneller Ovulationsinduktion und Besamung ein, d. h. es erfolgt i. d. R. eine einmalige Besamung um die Mittagszeit, wenn die Embryogewinnung am nächsten Tag bereits um 7.00 Uhr erfolgen kann. Beim Schaf wird routinemäßig eine einmalige endoskopische Besamung durchgeführt, da die zervikale Besamung sowie der Samentransport zu den Eileitern v. a. bei superovulierten Tieren erheblich beeinträchtigt zu sein scheint. Bei superovulierten Rindern ist eine zweimalige Besamung ausreichend, wobei Mischsperma von mehreren Bullen bzw. Nativsperma zur einmaligen Besamung vorzuziehen ist.

Tabelle 3: Entwicklungsstadien präimplantativer Embryonen bei Nutztieren

Zeit nach Fertilisation	Kaninchen	Schwein	Schaf/Ziege	Rind
Ø Anzahl Ovulationen	25–50	25–45	10–15	15
1. Zellteilungszyklus	14–20 Std.	20–24 Std.	20–24 Std.	20–24 Std.
2. Zellteilungszyklus	20–27 Std.	24–28 Std.	26–30 Std.	32–36 Std.
Embryonale RNA-Synthese	2–16	4	8–16	4–8
	Zell-Stadium	Zell-Stadium	Zell-Stadium	Zell-Stadium
Uterotubaler Übergang	Tag 3	Tag 2–3	Tag 3	Tag 4–5
Morulastadium	60 Std.	Tag 5	Tag 5–6	Tag 5–6
Blastozystenstadium	72 Std.	> Tag 5	Tag 6	Tag 7

Tabelle 4: Möglichkeiten zur Synchronisation und Superovulation für die Gewinnung von Zygoten zur Mikroinjektion

	Synchronisation der Spender und Empfänger	Superovulation der Spender
Kaninchen	Induzierte Ovulation, Einzelhaltung HCG oder GnRH	PMSG FSH
Schwein	Jungsauen + Umstallen + hCG Spontanrausche Gestagen + hCG Nach dem Absetzen + hCG	PMSG
Schaf/Ziege	Gestagene oder PG Spontanbrunst	PMSG oder FSH
Rind	Gestagene oder PG Spontanbrunst	PMSG oder FSH

PMSG oder FSH

PMSG: Pregnant Mare's Gonadotropin

FSH: Follikel Stimulierendes Hormon (porcines oder ovines FSH)

PG: Prostaglandine

HCG: Humanes Chorion Gonadotropin

GnRH: Gonadotropes Releasing Hormon

Die Gewinnung von Embryonen im Eileiterstadium erfolgt mittels den klassischen Methoden der Schlachtung bzw. nach chirurgischem Eingriff. Beide Gewinnungsverfahren sind besonders bei größeren Nutztieren sehr aufwendig und teuer. Der Vorteil der Schlachtung liegt in der Bereitstellung von Embryonen in relativ kurzer Zeit. Die Eileiter werden im Labor freipräpariert, so daß sie in langgestreckter Form über einem Auffanggefäß gespült und die Embryonen sofort beurteilt werden können. Die chirurgische Gewinnung erfordert sedative bzw. anästhetische Maßnahmen am Tier. Der Zugang erfolgt von der Flanke oder der ventralen Bauchdecke aus, über den die Reproduktionsorgane extrakorporal verlagert werden müssen. Da der Eileiter nicht wie bei der Schlachtspülung behandelt werden kann, werden die Embryonen über das Infundibulum (Auffangtrichter) und die Ampulle des Eileiters in Richtung Gebärmutter gespült, wo sie nahe der Einmündungsstelle des Eileiters in der eröffneten Gebärmutter über einen Synthetikschauch oder ein Glasröhrchen aufgefangen werden. Unmittelbar nach der chirurgischen Gewinnung müssen

die Wundränder genäht sowie eine Wundversorgung und notwendige Nachbetreuungsmaßnahmen des Tieres durchgeführt werden. Sowohl die Manipulation als auch das nicht immer zu vermeidende Auftreten von (Nach-) Blutungen, Infektionen und Hernien bergen bei diesen Tieren die Gefahr von postoperativen Komplikationen in sich, die die Wiederverwendbarkeit erheblich beeinträchtigen.

An unserem Institut wurden endoskopische Techniken für die Erstellung transgener Nutztiere entwickelt. In ihrer Gesamtheit werden sie für folgende Zwecke eingesetzt:

- Eizellgewinnung
- Künstliche Besamung
- Embryogewinnung
- Embryotransfer

Die Verwendung der Endoskopie bringt grundlegende Vorteile mit sich, die sie zu einem wertvollen Instrumentarium auf diesem Gebiet gemacht haben:

1. Punktförmiger minimal invasiver Zugang zur Bauch- und Beckenhöhle
2. Direkte Einsichtnahme auf die Reproduktions- und umliegenden Organe
3. *In situ* Manipulation: besonders schonend, da das Endoskop zu den Organen hin geführt wird, keine Organtraktionen notwendig
4. Endoskopischer Zugang ist optimal dazu geeignet, Samenzellen, Eizellen sowie Embryonen (Größenordnung <300–4.000 µm) zu gewinnen bzw. zu transferieren.

Die Vorbereitung der endoskopischen Gewinnung variiert je nach Spezies und ist in Tabelle 5 zusammengestellt.

Beim Kaninchen, Schwein, Schaf und Ziege wird für den Spülprozeß ein flexibler Spülkatheter via Infundibulum im Eileiter plziert und mit einer atraumatischen Faßzange fixiert. Beim Rind wurde dafür speziell ein gebogener Metallkatheter entwickelt, der sich nach Insertion in den Eileiter durch den Spülldruck selbständig fixiert (siehe Abbildung 1).

Tabelle 5: Endoskopische Embryogewinnung Spezies

Spezies	Behandlung	Besonderheit	Sammeltechnik
Kaninchen	Narkose	Liegend, Kopf nach unten	Vaginal, Embryospülkatheter Rind
Schwein	Narkose	Rückenlage	Transuterin
Schaf	Sedation, Lokalanästhesie	Rückenlage	Transuterin
Ziege	Narkose	Rückenlage	Transuterin
Rind	Epiduralanästhesie	Stehend	Embryospülkatheter, intrauterin

Während beim Schwein, Schaf und Ziege ein Katheter durch die Gebärmutterwand im Uteruslumen nahe der Eileitermündung das Spülmedium auffängt, wird beim Rind, analog der konventionellen Embryospülung am Tag 7, ein Embryospülkatheter verwendet. Beim Kaninchen kann mangels des zervikalen Verschlusses die Spülflüssigkeit intravaginal mit Hilfe eines Embryospülkatheters für Rinder gesammelt werden.

Die Metallkapillare (14 cm x 2,5 mm) ist am vorderen Ende um ca. 90° gekrümmt und geht unmittelbar danach in eine Verdickung (Olive) über. Zahlreiche seitliche Bohrungen werden von einem Latexschlauch überzogen, der sich bei entsprechendem Spüldruck ausdehnt, die Metallkapillare im Eileiter fixiert und den Spülrückfluß verhindert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß diese Spülungen die vollständige Gewinnung der Embryonen wie bei einer Schlachtung erlaubt. Darüber hinaus konnten diese Spültechniken bereits bei Tieren mehrfach wiederholt werden. Beim Schwein ließ die einseitige Spülung superovulierter Spender und die Geburt von Ferkeln der nicht gespülten Seite auf den besonders schonenden Einsatz dieser Technik schließen.

4. Mikroinjektion von Zygoten

Die zu erwartende Anzahl von Embryonen nach Superovulation liegt beim Kaninchen bei 30, beim Schwein bei ca. 25, bei Schaf/Ziege zwischen 4 und 9 und beim Rind bei ungefähr 10 bis 15 Embryonen pro Tier. Während Kaninchenembryonen ein relativ

Abbildung 1: Metallkapillare zur Gewinnung tubaler Stadien beim Rind

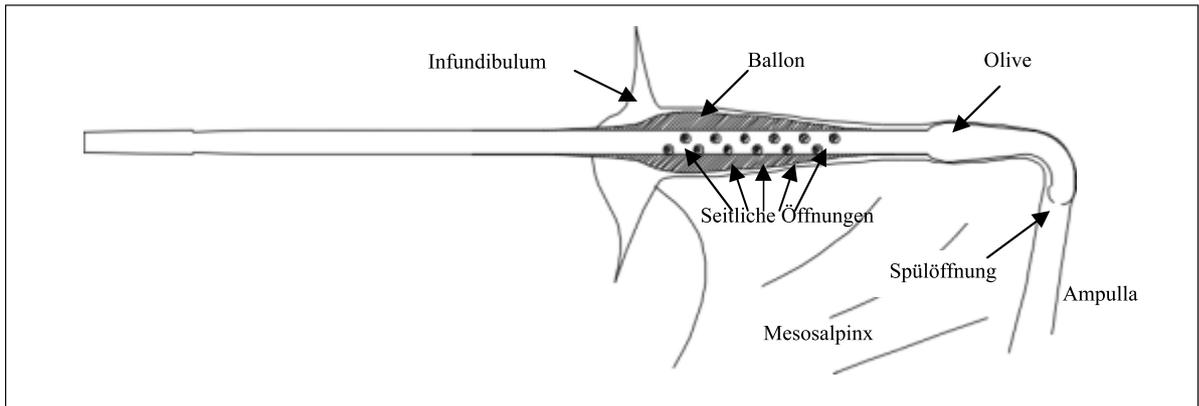
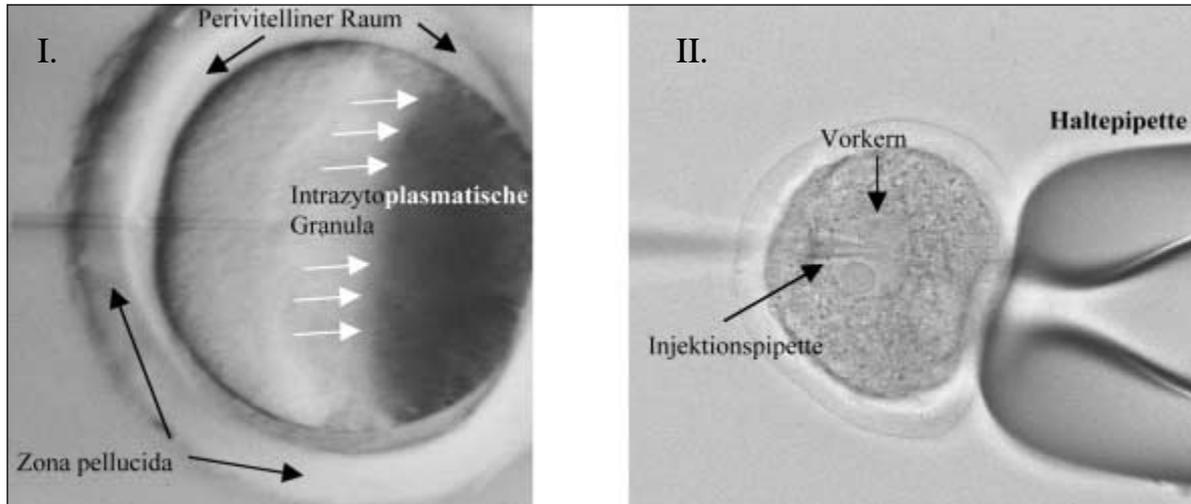


Abbildung 2: Mikroinjektion: Nach der Zentrifugation einer Rinderzygote verschiebt sich die intrazytoplasmatische Granula (Bild I). Die Zygote wird von der rechten Seite mittels einer Haltepipette (Bild II) fixiert und von der gegenüberliegenden Seite werden mit einer Injektionspipette ($\varnothing 1 \text{ mm}$) 1-2 pl der Genlösung in einen Vorkern injiziert



helles Zytoplasma haben und die Vorkerne sichtbar sind, bedarf es zur Sichtbarmachung der Vorkerne von Schwein und Wiederkäuer einer Behandlung. Vorkerne von Schafembryonen sind im Interferenzkontrastfeld sichtbar, Schweine und Rinderembryonen müssen zentrifugiert werden. Durch Zentrifugation bei 14.000 G für 4–5 Minuten ergibt sich eine polare Verschiebung der zytoplasmatischen Granula und vorhandene Vorkerne kommen zum Vorschein.

Die eigentliche Mikroinjektion der Genlösung erfolgt unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Zur Fixierung der Embryonen wird eine Haltepipette mit einem Außendurchmesser von 150–200 μm und einem Innendurchmesser von ca. 50 μm verwendet (Abbildung 2).

5. Transfer manipulierter Embryonen

Unmittelbar nach der Mikroinjektion schließt sich eine Kulturphase an, deren Dauer sowohl von der Spezies als auch von den Übertragungsmöglich-

keiten abhängt. Beim Kaninchen ist die Eileiterphase durch eine typische Muzinbildung um den Embryo charakterisiert. Diese ist essentiell für das Implantationsgeschehen. Eine Kultur bis zum Morula- bzw. Blastozystenstadium würde den Implantationserfolg massiv reduzieren. Schweine-, Schaf/Ziegen- und Rinderembryonen lassen eine *in vitro*-Kultur bis zum uterinen Stadium zu, wobei auf die Schwierigkeit und Besonderheit der verschiedenen Kulturbedingungen hingewiesen werden muß. Aus praktischen Gründen werden Schweineembryonen und Embryonen von Schaf und Ziege unmittelbar nach Injektion in den Eileiter übertragen, Rinderembryonen meist am Tag 7 oder 8 unblutig in den Uterus. Die Techniken, die insgesamt zum Transfer der Embryonen zur Verfügung stehen, sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Da beim Rind die chirurgische Gewinnung von Zygoten aus dem Eileiter besonders aufwendig ist, stellt die *in vitro*-Produktion (siehe Kapitel *In vitro*-Produktion) eine zusätzliche Möglichkeit dar, in

Tabelle 6: Techniken zum Transfer von mikroinjizierter Nutztierembryonen

Spezies	Behandlung	Ort/Stadium	Autoren
Kaninchen	Chirurgisch	Eileiter	Besenfelder, 1991
	Endoskopisch	Eileiter	Besenfelder und Brem, 1993, Haas, 1999
Schwein	Chirurgisch	Eileiter (Uterus)	Springman und Brem, 1989
	Transzervikal	Uterus	Reichenbach et al., 1993; Hazeleger, 1999
	Endoskopisch	Eileiter (Uterus)	Besenfelder et al., 1997, Müller 1997
Schaf/Ziege	Chirurgisch	Eileiter (Uterus)	Armstrong et al., 1983
	Transzervikal	Uterus	Kraemer, 1989; Lewalski et al., 1991
	Endoskopisch	Eileiter (Uterus)	Besenfelder et al., 1994, Kühholzer, 1996
Rind	Chirurgisch	Eileiter (Uterus)	Greve et al., 1989
	Transzervikal	Uterus	Echelard et al., 2000
	Endoskopisch	Eileiter (Uterus)	Besenfelder und Brem, 1998

größerer Anzahl Embryonen für den Gentransfer bereitzustellen. Dennoch ist festzustellen, daß die Entwicklung von Eizellen/Embryonen außerhalb des Tierkörpers als vermindert einzustufen ist. Der endoskopische Zugang zum Eileiter beim Rind wird bislang nur am Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien und der Abteilung Biotechnologie in der Tierproduktion (IFA-Tulln) durchgeführt. Es gibt zahlreiche anderweitige Arbeiten, in denen diese Embryonen zur weiteren Kultivierung vorübergehend in Eileiter von Kaninchen, Schafen oder Rindern transferiert wurden. Nach der *in vivo*-Kultur wurden diese Embryonen erneut gewonnen, beurteilt und auf einen endgültigen Empfänger übertragen (Biery et al., 1988; Ellington et al., 1990; Greve et al., 1989; Sirard und Lambert, 1986; Hawk et al., 1989).

Der Spermien-vermittelte Gentransfer ist im Hinblick auf die zu erreichenden Ergebnisse noch relativ unsicher. Die Verwendung von retroviralen Vek-

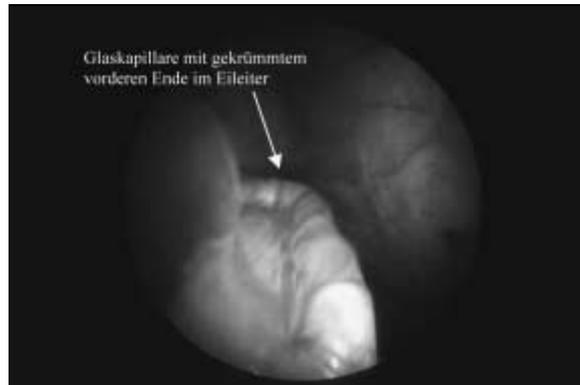
toren bzw. der Klonierung (bis zu 100% transgene Nachkommen zu erhalten) ist gegenwärtig durch die unzureichende Effizienz in der Routineanwendung limitiert. Da zur Erstellung transgener Nutztiere bis heute nur Datenmaterial in erheblichem Umfang aus der Mikroinjektion vorliegt, gibt Tabelle 7 eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Mikroinjektion von Embryonen zur Erzeugung transgener Nutztiere. Die dieser Tabelle zugrunde liegenden Zahlen weisen Integrations- und Embryoüberlebensraten auf, wie sie bei diesen Spezies bis vor wenigen Jahren als verlässlich und charakteristisch einzustufen waren. Unter Berücksichtigung der Genkonzentration und der Lösungsmittel werden beispielsweise beim Kaninchen vereinzelt bereits Integrationsraten zwischen 20 und 30% erreicht. Als schwierig und aufwendig gilt nach wie vor besonders die Erstellung transgener Rinder. Einzelbeispiele zeigen, welcher Aufwand zur Generierung transgener Founder notwendig ist: Von ca 50.000 IVP-

Tabelle 7: Gentransfer bei Nutztieren mittels DNA-Mikroinjektion

	Kaninchen	Schwein	Schaf	Ziege	Rind
Geborene Tiere/injizierte und transferierte Embryonen	10–15 %	5–10 %	10–15 %	15 %	10–15 %
Transgene Tiere/geborene Jungtiere	10–12 %	10–15 %	5–15 %	7 %	2–5 %
Transgene Tiere/injizierte Embryonen	1–2 %	0,5–1 %	1–2 %	1 %	0,2 %

Brem, 1993, Brem und Müller, 1994, Wall, 1996

Abbildung 3: Endoskopischer Transfer von Embryonen in den Eileiter



Zygoten konnten Eystone et al. (1998) 50 % mikroinjizieren. Davon entwickelten sich 1.282 (5 %) bis zum Tag 7/8 und 978 (4 %) wurden, auf 830 Empfänger verteilt, transferiert. Bei einer Trächtigkeitsrate von 26 % wurden 134 Kälber (75 % Kaiserschnitt) geboren, darunter wurden 9 Kälber als transgen identifiziert (0,04 %).

In Vorarbeiten zur Erstellung transgener Rinder konnte gezeigt werden, daß von 88 Embryonen 2 Feten produziert wurden, die positive Signale in der molekulargenetischen Analyse zeigten. Alle 88 Zygoten wurden ex vivo gewonnen, mikroinjiziert und am folgenden Tag in die Eileiter transferiert (siehe Abbildung 3).

Nach der Integrationsbestimmung werden diese Tiere nach deren Geschlechts- und Zuchtreihe angepaart, um deren Keimbahnintegration über deren Nachkommen zu bestimmen. Je nach verwendetem Genkonstrukt wird die Transkription (RNA-Synthese), die Expression und Expressionshöhe untersucht. Die Weiterzucht, v. a. beim kleinen Nutztier (Kaninchen), erlaubt die Erstellung homozygoter Tiere zu etwaigen Untersuchungen auf Insertionsmutagenese bzw. Expressionsveränderungen.

6. Schlußbetrachtung

Die Erstellung Keimbahn-transgener Nutztiere ist zu einem der interessantesten wissenschaftlichen Arbeitsgebiete v. a. in den Bereichen der Grundlagenforschung, Medizin, Tiermedizin und Ernährung geworden. Für den zukünftigen Einsatz bzw. Nutzen dieser Transgentechnologie ist das Zusammenspiel von Molekulargenetik, Zellbiologie sowie Reproduktionsbiologie von entscheidender Bedeutung, zumal innovative Methoden in jedem dieser Bereiche erheblich zur Optimierung beiträgt.

Referenzen:

- Armstrong, D. T., Pfizner A. P., Warnes G. M., Seamark R. F. 1983: Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J Reprod Ferti* 63, 403-410.
- Bachiller D., Schellander K., Peli J., Ruther U. 1991: Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev* 30, 194-200.
- Besenfelder U., Brem G., 1993: Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 53-56.
- Besenfelder U., Brem G. 1998: Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long-term exposure of in vitro produced embryos. *Theriogenology* 50, 739-745.
- Besenfelder U., Müller M., Brem G. 1998: Transgenics and modern reproductive technologies. In: *The GENETICS OF THE PIGS* (eds: M. F. Rothschild, A. Ruvinsky), CAB, International, United Kingdom, 345-374.
- Besenfelder U., Zinovieva N., Dietrich E., Sohnrey B., Holtz W., Brem G. 1994: Tubal transfer of goat embryos using endoscopy. *Veterinary Record* 135, 480-481.
- Besenfelder U., Mödl J., Müller M., Brem G. 1997: Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology* 47, 1051-1060.
- Besenfelder U. 1991: Untersuchungen zum Einfluß von β -Carotin auf Fertilitätsparameter in Embryotransferprogrammen beim Kaninchen. Doktorarbeit aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Biery K. A., Bondioli K. R., De Mayo F. J. 1988: Gene transfer by pronuclear injection in the bovine. *Theriogenology* 29, 224 (Abstr.).
- Brem G., Müller M. 1994: Large transgenic mammals. In: *Animals with novel genes* (ed: N. McLean), Cambridge University Press, Cambridge, 179-245.
- Brem G. 1993: Transgenic animals. In: *Biotechnology*, (eds) H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, VCH, Weinheim, pp 745-832.
- Brem G., Besenfelder U., Aigner B., Müller M., Liebl I., Schütz G., Montoliu L. 1996: YAC transgenesis in farm animals: rescue of albinism in rabbits. *Mol Reprod Dev* 44, 55-62.

- Brem G., Brenig B., Goodman H. M., Selden R. C., Graf F., Kruff B., Springmann K., Hondele J., Meyer J., Winnacker E. L., Käuslich H. 1985: Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 20, 251-252.
- Chan A. W. S., Homan E. J., Ballou L. U., Burns J. C., Bremel R. D. 1998: Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 95, 14028-14033.
- Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. F., Jerry J., Blackwell F., Ponce de Leon F., Roble J. M. 1998: Cloned transgenic calves produced from non-quiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- Echelard Y., Groen W., Destrepes M. M., Ohlrichs C., Williams J. L., Ziomek C. A., Faber D., Meade H. M., Behboodi E. 2000: Transgenic cow production from microinjection into in vivo-derived embryos. *Theriogenology*, 53, 513.
- Ellington J. E., Farrell P. B., Simkin M. E., Foote R. H., Goldman E. E., McGrath A. B. 1990: Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2-cells to morulae or blastocyst in rabbit oviducts or in a simple medium with bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod fertil* 89, 293-300.
- Eyestone W. H., Gowallis M., Monohan J., Sink T., Ball S. F., Cooper J. D. 1998: Production of transgenic cattle expressing human α -lactalbumin in milk. *Theriogenology* 49, 386. Gagne et al., 1991.
- Gagne M. B., Pothier F., Sirard M. A. 1991: Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev* 29, 6-15.
- Gandolfi F., Lavitrano M., Camaiono A., Spadafora C., Siracusa G., Laura A. 1989: The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J Reprod Fertil* 4, 10 (Abstr.).
- Gandolfi F. 2000: Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53, 127-137.
- Gordon J. W., Ruddle F. H. 1981: Integration and stable germ line transmission of genes integrated into mouse pronuclei. *Science* 214, 1244-1246.
- Greve T., X. U. K. P., Callesen H., Hyttel P. 1989: Calves resulting from in vitro fertilization of oocytes. *Zuchthygiene* 24, 79-83.
- Haas C. 1999: Gewinnung, Kryokonservierung und Transfer verschiedener Embryonalstadien beim Kaninchen. Doktorarbeit am Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.
- Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., Wall R. J., Palmiter R. D., Brinster R. L. 1985: Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680-683.
- Haskell R. E., Bowen R. A. 1995: Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol Reprod Dev* 40, 386-390.
- Hawk H. W., Wall R. J., Conley H. H. 1989: Survival of DNA-injected cow embryos temporarily cultured in rabbit oviducts. *Theriogenology* 32, 243-254.
- Hazeleger W. 1999: Non-surgical embryo transfer in pigs. Ph.D. Thesis, Wageningen University, Department of Animal Sciences, Netherlands.
- Huguet E., Esponda P. 1998: Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 51, 42-52.
- Khoo H. W., Ang L. H., Lim H. B., Wong K. Y. 1992: Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 107, 1-19.
- Kim T., Leibfried-Rutledge M. L., First N. L. 1993: Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon ape leukemia virus envelope. *Mol Reprod Dev* 35, 105-113.
- Kraemer D. C. 1989: Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 31, 141-148.
- Kühholzer B. 1996: Endoskopische Embryotransferverfahren beim Schaf. Doktorarbeit aus dem Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.
- Lauria A., Gandolfi F. 1993: Recent advances in sperm cell mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 36, 255-257.
- Lewalski H., Sonnen A., Meinecke-Tillmann S., Meinecke B. 1991: Transcervical intrauterine embryo transfer in sheep - Preliminary results. *Reprod Dom Anim* 26, 209-210.
- Maione B., Lavitrano M., Spadafora C., Kiessling A. A. 1998: Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Dev* 50, 406-409.
- Müller S. 1997: Endoskopische Embryotransferverfahren beim Schwein. Doktorarbeit aus dem Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.
- Reichenbach H. D., Mödl J., Brem G. 1993: Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *Veterinary Record* 133, 36-39.
- Roschlau K., Rommel P., Andreeva L., Zackel M., Roschlau D., Zackel B., Schwerin M., Huhn R., Gazarjan K. G. 1989: Gene transfer experiments in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 38, 153-160.
- Schellander K., Brem G. 1997: The direct gene transfer through mammal spermatozoa. In. *TRANSGENIC ANIMALS: Generation and use* (ed: LM Houdebine), Harwood Academic Publishers, Netherlands, 41-44.
- Schellander K., Peli J., Schmol F., Brem G. 1995: Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Anim Biotechnol* 6, 41-50.
- Shimotohno K., Temin H. M. 1981: Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into the DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26, 66-77.
- Sirard M. A., Lambert R. D. 1986: Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Veterinary Record* 119, 167-169.
- Springman K., Brem G. 1989: embryotransfer beim Schwein im Rahmen von Gentransferprogrammen. *Tierärztliche Praxis Suppl* 4, 21-25.
- Taruscio D., Mantovani A. 1998: Human endogenous retroviral sequences: possible roles in reproductive physiopathology. *Biol Reprod* 59, 713-724.
- Temin H. M. 1989: Retrovirus variation and evolution. *Genome* 31, 17-22.
- Wall R. J. 1996: Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45, 57-68.
- Wall R. J., Kerr D. E., Bondioli K. R. 1997: Transgenic dairy cattle: Genetic engineering on large scale. *J Dairy Sci* 80, 2213-2224.

Klonierung



1. Einleitung

Ein Klon ist eine ungeschlechtlich aus einem Mutterorganismus entstandene erbgleiche Nachkommenschaft. In der Mikro- und Zellbiologie versteht man darunter genetisch einheitliche Mikroorganismen oder Zellen, in der Gentechnik die Herstellung einer grossen Zahl von Kopien des gleichen Gens. Bei Pflanzen sind Klone durchaus verbreitete Phänomene, man denke nur an Kartoffeln, die in aller Regel Klonpopulationen sind. Im zoologischen Bereich finden sich natürlicherweise Klone, als genetisch identische Individuen wie z. B. monozygote Zwillinge, Drillinge etc. Klone entstehen bei vielzelligen Organismen durch vegetative Vermehrung, also durch Knospung, Sprossung oder durch Regeneration aus Teilstücken und können durch mikrochirurgische Teilung von frühen Embryonalstadien und anschliessenden Transfer erzeugt werden (siehe Brem, 1986).

Weil die fortgesetzte Teilung von Embryonen aus biologischen Gründen nicht funktioniert, muss zur artifiziellen Erstellung einer grösseren Anzahl genetisch identischer Tiere ein technisch völlig anderer Ansatz gewählt werden, der Kerntransfer. Bei diesem Verfahren, das schon in den dreissiger Jahren von Spemann vorgeschlagen worden war, werden Kerne von Zellen in das Zytoplasma von entkernten Empfängerzellen übertragen. 1952 haben Briggs und King berichtet, dass sich nach Transfer von Zellkernen aus Embryonalzellen in Froscheier Kaulquappen entwickelten. Aus einzelnen somati-

schen Froschzellen entstanden durch Klonierung Nachkommen (Gurdon 1962). Klonierungsversuche mit Körperzellen von adulten Krallenfröschen (Haut-, Blutzellen) führten bis zum Kaulquappenstadium.

2. Verfahren zur Erstellung von Klonen

Bei Säugetieren subsummiert man unter »Klonieren« in der Reproduktion die Erstellung von Embryonen mit identischem Genotyp durch folgende Verfahren:

- **Klonierung durch Chimärenbildung:**
Durch mechanische Isolation von Zellen frühembryonaler Entwicklungsstadien (bis zur Morula) oder mikrochirurgische Teilung (bis zur Blastozyste) und mikromanipulatorische asynchrone Kombination mit Blastomeren jüngerer Embryonalstadien kann erreicht werden, dass sich die ICM (Inner Cell Mass) und später der Fetus aus den älteren Zellen weiterentwickelt und die jüngeren Zellen den Trophoblast und die Eihüllen bilden (Willadsen, 1991). Die entstehenden Tiere sind sowohl chromosomal als auch hinsichtlich des mitochondrialen Genotyps herkunftsidetisch, wenn sichergestellt ist, dass sich die Helferzellen nicht an der Bildung des Somas und der Keimbahn beteiligt haben.
- **Klonierung durch Kerntransfer:**
Klonierung durch Kerntransfer ist die Übertragung von Kernen bzw. kernhaltigen Zellen ver-

schiedenen Ursprungs in enukleierte Eizellen zur Erstellung einer grösseren Anzahl von Embryonen und Individuen mit identischem chromosomalem Genotyp, die theoretisch nahezu unbegrenzt oft durchgeführt werden kann. Die entstehenden Tiere unterscheiden sich hinsichtlich ihres mitochondrialen Genotyps (Steinborn et al. 1998 a und b, Hiendleder et al. 1999) und weisen auch eine mitochondriale Heteroplasmie auf, ausser wenn bei der Klonierung bei Zellen und Zytoplasma herkunftsgleiche Mutterlinien verwendet werden. Erstmals berichteten Illmensee und Hoppe (1981) über Kerntransfer von Kernen aus präimplantativen Embryonen in befruchtete und enukleierte Mäuseeizellen. Diese Experimente konnten nicht erfolgreich wiederholt werden. McGrath und Solter (1983) haben mittels einer neu entwickelten Technik gezeigt, dass zwar der Austausch von Vorkernen zwischen Embryonen zur Weiterentwicklung führt, aber rekonstituierte Embryonen mit »älteren« Kernen, die mit dem gleichen Verfahren transferiert worden waren, sich nicht weiterentwickelten (McGrath und Solter 1984). Das Dogma der Unmöglichkeit des Klonierens mit differenzierten Zellen bei Säugern wurde dadurch bestärkt.

Eine nur theoretisch angedachte Möglichkeit ist die parthenogenetische Aktivierung von Oozyten und die Zucht und Verpaarung homozygoter Elterntiere. Solche Verfahren sind beim Nutztier noch nicht erfolgreich umgesetzt worden. Die entstehenden Tiere wären sowohl chromosomal als auch hinsichtlich des mitochondrialen Genotyps herkunftsidetisch, aber sie würden kein schon vorhandenes Individuum repräsentieren, sondern als Klon eine neue Kombination darstellen.

3. Technik der Klonierung durch Kerntransfer

Für einen erfolgreichen Kerntransfer soll die Eizelle das Metaphasestadium der 2. Reifeteilung (Metaphase II) vollendet haben. Zu diesem Zeitpunkt liegt in den Eizellen eine hohe MPF

(M-Phase-Förderfaktor) Aktivität vor. Das aktive MPF-Dimer aus katalytischer Komponente p34^{cdc2} und regulatorischer Untereinheit Cyclin B wird durch CSF (Cytostatischer Faktor) stabilisiert. CSF wird normalerweise durch die Befruchtung inaktiviert, was zur Dissoziation des MPF-Dimers führt.

In aller Regel werden für die Klonierung *in-vitro* gereifte, unbefruchtete Eizellen verwendet, die von den sie umgebenden Cumuluszellen befreit werden. Die eizelleigene nukleäre DNA wird – üblicherweise nach einer Behandlung mit Cytochalasin B – durch Absaugen (E nukleation) entfernt, es entsteht ein Zytoplast. Bei geschicktem Vorgehen gelingt dies in über 90 % der Fälle, obwohl die Eizell-DNA nicht sichtbar ist und nur wegen ihrer Lokalisation in der Nähe des Polkörperchens gefunden werden kann. Zur Kontrolle einer erfolgreichen E nukleation sind *in-vivo*-Färbeverfahren verfügbar.

Bei der Embryoklonierung wird zur Gewinnung von Blastomeren der für die Klonierung vorgesehene Embryo (frühe Embryonalstadien bis hin zur Blastozyste) entweder nach dem Entfernen der Zona pellucida disaggregiert, so dass die Zellen einzeln aufgenommen werden können, oder die Zellen werden mit Hilfe einer Transferpipette einzeln aus dem Embryo abgesaugt. Jeweils eine Blastomere wird dann mittels Transferpipette unter die Zona pellucida der enukleierten Eizelle geschoben und dort abgesetzt. Fetale oder adulte Zellen werden in ähnlicher Weise aus Zellkulturschalen aufgenommen und transferiert.

Zur Integration des Zellkerns der transferierten Zelle in das Zellplasma der Eizelle müssen die trennenden Zellmembranen in der Kontaktfläche von Karyoplast und Zytoplast durch Fusion aufgelöst werden. Am gebräuchlichsten ist dafür die sog. Elektrofusion, bei der durch kurzzeitige Gleichstrompulse Poren induziert werden, die ein Zusammenfliessen des Zytoplasmas ermöglichen. Die elektrischen Pulse führen ausserdem zur Aktivierung der Eizelle und damit u. a. zur Destabilisierung des CSF. Die Aktivierung von Eizellen kann auch chemisch erfolgen.

Entscheidend für den Erfolg des Kerntransfers ist das Zellzyklusstadium des übertragenen Kerns und des Zytoplasten. In einem Zytoplasten mit hoher MPF-Aktivität kommt es zur Auflösung der Kernmembran (nuclear envelope breakdown) und zur Kondensation des Chromatins (premature chromatin condensation). Wird die Eizelle aktiviert, resultiert daraus die Dekondensation des Chromatins und die Bildung einer Kernmembran. Befindet sich der übertragene Kern in der G₀ oder G₁-Phase, entstehen nach Replikation der chromosomalen DNA zwei diploide Tochterzellen. Bei embryonalen Zellen, die sich wegen der starken Proliferation zu einem hohen Anteil in der S-Phase des Teilungszyklus befinden, führt die hohe MPF-Aktivität wegen der daraus resultierenden Kondensation des Chromatins zu massiven Schädigungen. Eine Weiterentwicklung ist nicht möglich. Um dies zu vermeiden, wird für embryonale Zellen die Aktivierung der Eizelle bereits mehr als 20 Stunden vor der Kernübertragung eingeleitet, weil dann die MPF-Aktivität schon weit genug gesunken ist.

Damit es zu einer Entwicklung der rekonstruierten Zellen (Fusionskomplexe) kommen kann, muss die übertragene Kern-DNA durch Reprogrammierung in einen Zustand versetzt werden, der es ihr ermöglicht, das Teilungsschema des Embryos wieder beim Stadium der Zygote zu starten. Ein wichtiger Unterschied der DNA in frühembryonalen und differenzierten Zellen besteht in der Transkriptionsaktivität. Die DNA im frühen Embryo wird nicht transkribiert, die ersten Teilungen werden von RNA- und Protein-Molekülen gesteuert, die aus der Eizelle stammen und damit als Starthilfe quasi noch vom mütterlichen Organismus bereitgestellt wurden. Erst nach tierartlich unterschiedlich vielen Teilungen wird auch das embryonale Genom aktiviert und damit spezifisch transkribiert.

Bei Kernen, die sich im Expressionsstadium befinden, wird durch Kondensation des Chromatins, wie sie in noch nicht aktivierten Zytoplasten durch die MPF-Aktivität erfolgt, die Transkription gestoppt, vorhandene mRNA wird degradiert und

Translationsvorgänge werden herunterreguliert. Befinden sich die transferierten Zellkerne bereits vor der Übertragung in einem transkriptionsarmen Zustand, wie dies bei ruhenden Zellen der Fall ist, erleichtert dies die Reprogrammierung. Deshalb sind »gehungerte« Zellen, die sozusagen auf Notprogramm laufen und deshalb Teilungs- und Transkriptionsaktivität stark nach unten reguliert haben, für den Kerntransfer besonders geeignet.

Nach der erfolgten Fusion werden die Karyoplast/Zytoplast/Komplexe solange kultiviert, bis sie ein Stadium erreichen, welches in den Uterus transferiert werden kann. Während früher dazu eine *in-vivo*-Kultur im Zwischenempfänger nötig schien, stehen mittlerweile immer besser funktionierende *in-vitro*-Systeme für die Kultur dieser Fusionskomplexe zur Verfügung. Durch Reklonierung, also die Verwendung von Embryonen aus Klonierung als Kernquelle für weitere Klonierungsrunden, kann nicht nur die Zahl der klonierten Embryonen weiter erhöht sondern auch die Entwicklungsrate gesteigert werden (Zakhartchenko et al. 1999 b).

Zellen können *in-vitro* transformiert werden, d. h. man kann den additiven und wohl auch rekombinativen Gentransfer im Labor durchführen. Dazu werden z. B. fetale Zellen durch Elektroporation oder andere Verfahren mit Genkonstrukten und Markern behandelt und die positiven Zellen selektiert. Durch Verwendung solcher Zellen beim Kerntransfer können dann transgene Tiere erstellt werden. Die Vorteile liegen auf der Hand:

- alle geborenen Tiere sind transgen und haben das gewünschte Geschlecht,
- es können exzellente Genotypen als Grundlage für die Transgenität verwendet werden,
- es entstehen keine Mosaik, d. h. alle Tiere werden das Transgen vererben,
- man kann funktionelle Knock-outs generieren,
- die Zeitabläufe werden verkürzt und
- die Aussichten auf optimierte Expression verbessert.

Die Klonierung wird, wenn die patentrechtlichen Probleme gelöst sein werden, die Methode der Wahl für die Generierung transgener Nutztiere sein, weil sie nicht nur besser, sondern auf lange Sicht auch kostengünstiger ist. Insofern ist Klonierung und Gentransfer zu einem Methodenspektrum zusammengewachsen, das für die Zukunft der Tierzucht enorm wichtig werden wird.

4. Klonierung bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Die ersten Klontiere durch Kerntransfer entstanden aus Embryoklonierung. Nach Übertragung von Zellkernen mehrzelliger Schaf-Embryonen in Eizellen und anschließende Teilung dieser Eizellen in zwei Teile, von denen einer den Kern enthielt, entstanden genetisch identische Embryonen und Lämmer (Willadsen, 1986).

Die ersten Kerntransferexperimente beim Rind stammen aus dem Jahr 1987 (Prather et al. 1987, Robl et al. 1987). Später wurde auch über die Produktion von Kälbern aus dem Transfer von Kernen aus Inner Cell Mass Zellen berichtet (Sims und First, 1993). Bei diesen Experimenten wurde mit *ex-vivo*-gewonnenen Rinderembryonen als Kernspender und mit *in-vivo*-Zwischenkultur in Schafeileitern gearbeitet. Erst in den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass das Embryonalklonen beim Rind auch rein *in vitro*, also unter Verwendung *in-vitro*-produzierter Embryonen und *in-vitro*-gereifter Eizellen, erfolgreich durchgeführt werden kann (Clement-Sengewald et al. 1990).

In einem grossangelegten Klonierungsexperiment mit *ex-vivo*-gereiften Eizellen und *ex-vivo*-gespülten Spenderembryonen erzielte Granada Genetics beim Transfer von 463 Embryonen aus Klonierung eine Graviditätsrate von 22% und eine Kalberate von 20%. Bei tiefgefrorenen/aufgetauten Spenderembryonen lag die Graviditätsrate bei 16% (Bondioli et al. 1990). Willadsen berichtete bei 302 Empfängertieren über eine Graviditätsrate am Tag 35 von 42% und am Tag 90 von 38%. Damit lag bei diesen Embryoklonierungsprogrammen die Erfolgsrate

deutlich unter den bei konventionellem Transfer erreichbaren Prozentsätzen. Die Abkalberate betrug 33%, wobei auffiel, dass häufig Geburtshilfe erforderlich war und Schweregeburten durch ein hohes Geburtsgewicht der Kälber zu verzeichnen waren (Willadsen et al. 1991).

Auch Kälber aus verschiedenen Reklonierungszyklen wurden geboren, wobei jedoch nach der 4. Reklonierung keine Geburten mehr erreicht werden konnten. Der bislang grösste Klon, der auf diesem Weg generiert werden konnte, bestand dem Vernehmen nach aus 11 Kälbern.

Mehr als zehn Jahre nach der Publikation von Klonnachkommen aus Schafembryonen wurde gezeigt, dass auch Zellen aus einer embryonalen Schaf-Zelllinie geeignet sind, als Kernspender verwendet zu werden (Campbell et al. 1996). Diese Zellen stammten aus einem 9 Tage alten Schafembryo, hatten *in vitro* bis zu 13 Passagen hinter sich und waren vor dem Transfer in enukleierte Oozyten durch Serumentzug in ein Ruhestadium versetzt worden. Es wurden 5 Lämmer geboren.

Die folgende Entwicklung hat dann überraschenderweise gezeigt, dass Zellen selbst dann noch als Kerndonoren verwendet werden können, wenn sie sich bereits wesentlich weiter entwickelt haben. Aus 26 Tage alten Feten und aus dem Eutergewebe eines sechs Jahre alten Schafes wurden Zellen kultiviert und nach einigen Passagen in der Kultur zur Klonierung verwendet. Kerne dieser Zellen führten in einigen Fällen zur Geburt von Lämmern. Bei einem geborenen Lamm war der Spender des Kernes eine Euterzelle von einem adulten Schaf (Wilmot et al. 1997). Nach der ersten Publikation einer erfolgreichen Adultklonierung der Arbeitsgruppe am Roslin-Institut in Edinburgh wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass nicht nur embryonale, sondern auch fetale Zellen und Zellen aus verschiedenen Geweben von adulten Individuen erfolgreich als Kernspender verwendet werden konnten und in Nachkommen resultierten. Mit der Klonierung von Säugetieren aus fetalen und adulten Zellen ist zum

Ende des Jahrhunderts ein biologisches Dogma aufgehoben worden, das schon fast hundert Jahre bestanden hatte.

Beim Rind wurde 1998 publiziert, dass aus fetalen Zellen (Cibelli et al. 1998) und primordialen Keimzellen (Zakhartchenko et al. 1998 a) via Kerntransfer Kälber entstehen können. Bei den primordialen Keimzellen lag die Blastozystenrate in Abhängigkeit vom Alter des Fetus zwischen 35 % (50–57 Tage alter Fetus) und 20 % (95–105 Tage alter Fetus) (Zakhartchenko et al. 1998 a). Dabei konnte auch in unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass die Überführung der (fetal differenzierten) Zellen in die G 0-Phase, also das Ruhestadium im Zellzyklus, zwar mitunter Vorteile im Sinne etwas höherer Effizienzen haben kann, aber keineswegs essentiell für eine erfolgreiche Klonierung ist (Zakhartchenko et al. 1998 b). Bei der Reklonierung mit Morulae, die aus Klonierung mit nicht gehungerten und gehungerten Fibroblasten stammten, war die Blastozystenrate mit 55 % und 52 % fast gleich hoch.

Die Adultklonierung aus Euterzellen beim Rind konnten wir in eigenen Untersuchungen erstmals bestätigen (Zakhartchenko et al. 1999 a). Eine japanische Arbeitsgruppe hat publiziert, dass es ihr gelungen ist, aus Eileiter- und Cumuluszellen vom Rind via Klonierung mit guter Effizienz Nachkommen zu erhalten (Kato et al. 1998). Auch die Verwendung anderer Zellen adulter Tiere zur Klonierung funktioniert. So konnten Wells et al. (1999) aus Kerntransfer mit Granuloszellen nach Übertragung von 100 Blastozysten auf Empfängertiere einen Klon von 10 Tieren erreichen.

Zusammenfassend kann zweifelsfrei festgestellt werden, dass aus Zellen von adulten Rindern und anderen Nutztieren (Schafe, Ziegen, Schweine) via Klonierung Nachkommen erstellt werden können, die den chromosomalen Genotyp der Spendertiere repräsentieren.

5. Entwicklung von Klontieren

Die erfolgreiche Adult-Klonierung war und ist, ohne Zweifel, ein völlig unerwartetes und auch par-

tiell noch immer unerklärtes Ergebnis. So ist bekannt und hinlänglich gezeigt, dass in somatischen Zellen zahlreiche Mutationen entstehen, die sich während des Lebens anhäufen. Die durchschnittliche Mutationsrate führt bei jeder Zellteilung pro hunderttausend Basenpaare zu einer Mutation. Dabei ist sicherlich zu berücksichtigen, dass die meisten dieser Mutationen weder für die betroffenen Zellen noch den Organismus Konsequenzen haben oder hätten. Das gilt insbesondere für Mutationen, die in einem Bereich der DNA stattfinden, der keine Funktion hat oder weil sich durch die Mutation die Aminosäuresequenz nicht ändert bzw. die Änderung keine Auswirkungen auf die Funktion des Proteins hat. Soweit diese Mutationen nicht in der Keimbahn auftreten und Gameten betreffen, haben sie im Normalfall der Reproduktion keine nachteiligen Folgen für die nächsten Generationen. Die hohe Ausfallrate beim Klonieren mit adulten Zellen ist aber vielleicht eine Konsequenz von Mutationen, die sich zufällig in den betroffenen Zellen ereignet haben und die die Entwicklung unterbinden.

Im Hinblick auf den Kerntransfer mit somatischen Zellen ist von Bedeutung, dass es bei jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Telomeren-Regionen, also an den Enden der Chromosomen, kommt. Diesem erstmals von Hayflick beschriebenen »Alterungsprozess« der Chromosomen unterliegen alle somatischen Zellen. Noch ist nicht klar, wie sich dies auf die Lebenserwartung der aus der Klonierung entstandenen Individuen auswirkt. Aus subcutanen Gewebezellen eines greisen Brahman-Bullen (21 Jahre) konnten erfolgreich Nachkommen kloniert werden (Hill et al. 2000). Es scheint, dass die Telomerenverkürzung unter bestimmten Umständen umkehrbar bzw. aufhaltbar ist, d. h. durch Repairmechanismen die ursprüngliche Länge wieder hergestellt bzw. sogar eine Verlängerung beobachtet werden kann (Lanza et al. 2000). Dies wird aber nicht heftig diskutiert (Glaser 2000, Wilmut, Clark und Harley, 2000) und es ist tatsächlich noch nicht klar, inwieweit Klonabkömmlinge tatsächlich eine un-

veränderte Entwicklungs- und Alterungskapazität haben werden.

Klongeschwister unterscheiden sich im Normalfall dadurch, dass sie in der Regel neben der Empfängermutter, die den Embryo austrägt, aber genetisch nicht beteiligt ist, zwei genetische Mütter haben. Von einer genetischen Mutter stammt die Kern-DNA und von einer zweiten, die über die Eizelle Zytoplasma beisteuert, die mitochondriale DNA. In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Klonnachkommen eine mitochondriale Heteroplasmie aufweisen, die als mitochondrialer Chimärismus verstanden werden kann (Steinborn et al. 1998). Der Anteil der mitochondrialen DNA der Spenderzelle im Vergleich zur Empfängerzelle ist umso geringer, je weiter die Spenderzelle sich bereits entwickelt hatte. Im Prinzip kann deshalb in fast allen Fällen anhand dieser mitochondrialen Heteroplasmie gezeigt werden, dass bzw. ob ein Tier tatsächlich das Produkt eines Klonierungsprozesses ist (Steinborn et al. 2000).

Daraus ergibt sich, dass Klongeschwister aus Kerntransfer sowohl untereinander wie auch im Vergleich zum Adult-Individuum im Normalfall weder phänotypisch noch genetisch vollständig identisch sind. Neben den angedeuteten genetischen Unterschieden (verschiedene genetische Veränderungen in den einzelnen Kernspender-Zellen vor der Klonierung und in den einzelnen klonierten Embryonen, Heteroplasmie der mitochondrialen DNA) wirken sich insbesondere auch diverse intrauterine und postnatale Umweltfaktoren auf die phänotypische Ausprägung der Klongeschwister modifizierend aus.

In Klonierungsprogrammen treten häufiger als üblich Aborte auf. Auffallend ist weiterhin, dass Feten aus klonierten Embryonen insbesondere auch in der zweiten Hälfte der Gravidität verloren gehen. Dabei werden signifikant mehr Fälle von Eihautwassersucht beobachtet. Die Gründe für diese Probleme während der Gravidität sind noch nicht bekannt, aber es könnte sich um Störungen der Kommuni-

kation zwischen fetalen und maternalen Plazentaanteilen handeln. Bekannt ist, dass die einwöchige Kultur im serumhaltigen Medium eine Bedeutung für das Auftreten der höheren Geburtsgewichte hat.

Die aus Embryo-Klonierung geborenen Kälber weisen in einzelnen Fällen deutlich höhere Geburtsgewichte auf (Willadsen et al. 1991). Diese Beobachtung wird auch bei Kälbern aus der *in-vitro*-Produktion gemacht. Neben den schon genannten Problemen und einer in einzelnen Fällen zu beobachtenden gestörten Vorbereitung und Einleitung der Geburt kann es bei Klonkälbern auch post partum mitunter zu Schwierigkeiten in der Entwicklung und zu Immunschwächen kommen, wie internationale Publikationen und eigene Beobachtungen zeigen.

6. Mögliche Anwendungen der Klonierung in der Biotechnologie

In der Biotechnologie liegt die vorrangige Anwendung der Klonierung in der effizienteren Generierung geklonter transgener Rinder. Beim konventionellen Gentransfer in Nutztiere wird das DNA-Konstrukt in befruchtete Eizellen injiziert (Brem et al. 1985, Hammer et al. 1985). Weniger als 10 % der geborenen Jungtiere sind transgen, bis zur kommerziellen Nutzung dieser Tiere vergehen in aller Regel zwei Generationen. Bei Anwendung der Klonierung kann dagegen die Veränderung des Genoms bereits in der Zelllinie durchgeführt werden. Nach Testung der Integration und eventuell sogar der Expression des Genkonstrukts wird via Kerntransfer bereits in einer Generation ein Klon von transgenen Tieren erstellt werden. Für die Produktion rekombinanter (pharmazeutischer) Proteine ist zum einen der Zeitvorteil von enormer Bedeutung und zum anderen haben Klongeschwister als Produzenten den Vorteil, dass das Expressionsmuster durch den Genotyp nicht modifiziert wird und deshalb bei allen Tieren, zumindest was die genetischen Wirkungen betrifft, Art und Höhe der Expression weitgehend einheitlich sein sollten.

Auch auf dem Gebiet der Xenotransplantation diskutiert man Anwendungen dieser Technik. Die dafür notwendigen genetischen Veränderungen durch Gentransfer können in einer Zelllinie wesentlich effizienter durchgeführt werden. Ausserdem ist es bei Zellen auch möglich, Gene gezielt funktionell auszuschalten und damit ihre Expression zu unterbinden. Wenn eine Zelllinie etabliert wird, die die notwendigen Veränderungen aufweist, könnten anschliessend durch Klonierung aus dieser Zelllinie z. B. transgene Schweine erstellt werden.

Es wurde auch gezeigt, daß genetisch veränderte bovine Zellen nach Kerntransfer zu Feten führten, von denen fetale Zellen gewonnen werden konnten, die ein humanes Protein exprimierten, das nach Übertragung in ein Tierversuchsmodell dort die erwarteten positiven Wirkungen auslöste (Zawada et al. 1998). Von besonderer Bedeutung für Forschung und Anwendung ist es, nicht nur Gene additiv in das Genom von Zellen zu integrieren, um damit transgene Tiere zu generieren, sondern Gene auch funktionell zu deletieren. Aus dem *in-situ*-Ersatz von endogenen Strukturgenen oder regulatorischen Elementen durch andere Sequenzen würde eine völlig neue Dimension der gewünschten Veränderung des Genoms resultieren.

7. Züchterische Aspekte der Klonierung

In der Tierzuchtforschung und der tierischen Produktion kommen folgende Einsatzmöglichkeiten der Klonierung in Frage:

- Einsparung von Test- und Versuchstieren durch grössere statistische Aussagekraft. Kloneschwister können bei Versuchen in der Ethologie, Fütterung, Prüfung von Medikamenten etc. auf die verschiedenen Gruppen verteilt werden. Dadurch lassen sich die Behandlungs-Effekte direkt studieren, ohne von unterschiedlichen genetischen Effekten maskiert zu werden.
- Detaillierte Untersuchungen von Genotyp-Umwelt-Interaktionen. Durch Verteilung von Kloneschwistern auf verschiedene Umwelten

können ihre Leistungen in der Produktion, Gesundheit, Fruchtbarkeit und Langlebigkeit direkt untersucht werden.

- Erhaltung genetischer Ressourcen. Durch Klonierung der letzten verfügbaren Individuen von in ihrem Fortbestand gefährdeten Rassen oder Linien könnten diese direkt ohne Tiefgefrier-Konservierung erhalten werden.
- Einschränkung der genetischen Vielfalt, die bei bestimmten Anlässen gewünscht wird. So wäre für die Produktion in vielen Fällen erstrebenswert, bekannte Genotypen verwenden zu können, also z. B. auch nur Tiere mit dem gleichen Geschlecht zu erhalten.
- Beschleunigung des Zuchtfortschrittes. Durch Klonierung der genetisch besten weiblichen Tiere, die dann mit verschiedenen herausragenden Vatertieren belegt werden, können durch Neukombination der Erbanlagen schneller optimierte Genotypen erhalten werden.
- Intensivere Nutzung herausragender Zuchttiere. Sowohl auf der männlichen wie auch auf der weiblichen Seite kann durch Klonierung die Ausnutzung des genetischen Potentials massiv gesteigert werden.

Bei der Beurteilung der züchterischen Konsequenzen von Klonierungsprogrammen ist zwischen dem allgemeinen Zuchtwert und dem Klonwert zu unterscheiden. Der allgemeine Zuchtwert, der in den gängigen Besamungszuchtprogrammen der Selektion von Bullen und Kühen zugrundeliegt, ist die Summe der additiven Genwirkungen, die ein Tier bei Anpaarung an zufällig ausgewählte Tiere einer Population an seine Nachkommen weitergibt. Im Gegensatz dazu ist der Klonwert die Summe aller Genwirkungen (additiv, dominant, epistatisch), die folglich bei gleicher Umwelt zu weitgehend gleichen Kloneschwisterleistungen führen müsste.

Auch beim Einsatz der Embryoklonierung kann neben der genetischen Selektion, die den Zuchtfortschritt bedingt, die klonale Selektion genutzt

werden. Aus dem Vergleich von Klonwert und Zuchtwert ergibt sich, dass die Klonierung von Embryonen nicht von vorneherein eine anhaltende Verbesserung des Zuchtfortschrittes bewirkt. Erst die Kombination von genetischer und klonaler Selektion mit optimaler Nutzung der Prüfkapazitäten wird zu einem kumulativen Erfolg führen. Es ist deshalb sinnvoll, die Prüfkapazitäten gleichzeitig für die klonale Selektion und die genetische Selektion zu nutzen.

Der züchterische Erfolg der beiden Selektionsmassnahmen ist in erster Linie von der Genauigkeit der Zucht- bzw. Klonwertschätzung und der Selektionsintensität abhängig. Das Generationsintervall kann bei Geschwisterprüfung nach dem Muster des adulten MOET-Programmes kurz gestaltet werden. Bei grosser Ähnlichkeit zwischen Klongeschwistern reichen 1 bis 2 Prüftiere aus, um die besten Klone herauszufinden. Eine andere Situation ergibt sich bei der Bestimmung der Zuchtwerte der Klone. Mit zunehmender Differenz zwischen Heritabilität und Ähnlichkeit der Klongeschwister nimmt die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung ab.

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden in einem Modellversuch in Bayern identische Zwillinge aus Embryoteilung verwendet (Distl et al. 1990). Erwartungsgemäss ergab die Analyse, dass die Ähnlichkeit zwischen den monozygoten Zwillingen in der Mastleistung sehr hoch war. Die Ähnlichkeit zwischen den Zwillingebullen lag in der Mastleistung zwischen 65 und 80%, was bedeutet, dass der Test eines Zwillingpartners bereits gute Aussagen über die genetische Veranlagung des anderen Zwillingspaars auch der Klongeschwister zulässt. Die Unterschiede zwischen den Nachkommengruppen (männlich und weiblich) der jeweiligen Zwillingspaare waren in der Mast- und Schlachtleistung äusserst gering. Der statistische Test ergab, dass diese Unterschiede zwischen den Nachkommengruppen der jeweiligen Zwillingspaare nur zufallsbedingt sind und durch die Stichprobenvariation erklärt werden können. Dementsprechend hoch

sind die Beziehungen zwischen den Nachkommen der jeweiligen Zwillingspaare.

Wie erwartet spielt es natürlich keine Rolle, welcher Zwilling für die Zucht verwendet wird, da die Zuchtwerte aus der Nachkommenprüfung für Zwillinge die selben Resultate erbringen müssen, auch wenn das nicht immer der Fall ist. Sehr hoch sind die Korrelationen zwischen der Eigenleistungsprüfung der Zwillinge und den Ergebnissen der Nachkommenprüfung. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass der additiv-genetische Zuchtwert der Bullen aus der Eigenleistungsprüfung von Zwillingspartnern oder Klongeschwistern relativ gut vorausgesagt werden kann. Dadurch können vorhandene Prüfkapazitäten zur Stationsprüfung auf Mast- und Schlachtleistung durch den Einsatz des Embryotransfers und der Klonierung wesentlich besser genutzt werden als in konventionellen Verfahren.

Nach frühen Modellrechnungen von Teepker und Smith (1989) kann die zu erwartende Leistungssteigerung bei der Embryoklonierung im Vergleich zur genetischen Selektion in einer Selektionsrunde zu einem Leistungssprung von 1,8 Standardabweichungen führen. Dies würde etwa 1.500 kg Milch bei der Laktationsleistung entsprechen, so dass die Leistung der Tiere aus den besten Klonen wesentlich über den Leistungen der Zuchttiere der Population läge. Dabei darf aber nicht vergessen werden, dass die Ergebnisse der Klonselktion wahrscheinlich nicht wie die konventionellen Zuchtfortschritte über lange Zeiträume kumuliert werden können. Der jährliche Zuchtfortschritt liegt in gängigen Besamungszuchtprogrammen bei etwa 1% und bei Programmen mit guter Effizienz bei bis zu 1,5%. MOET-Programme bei Bullenmüttern oder in Nukleuszuchtprogrammen können zu Zuchtfortschritten von 2 bis 2,4% führen. Im Gegensatz dazu würde eine Klonselktion einen Zuchtfortschritt von 20 bis 25% ermöglichen.

Eine der ersten Modellkalkulationen für den jährlichen genetischen Fortschritt durch Einsatz von Embryoklonierung haben Nicholas und Smith

(1983) vorgelegt. Sie vergleichen dabei den genetischen Erfolg bei der Erstellung grosser Klone mit dem in Besamungszuchtprogrammen erreichbaren Erfolg. Durch die Selektion der Eltern der Klone kann ein anfänglicher genetischer Sprung von 4 Jahren (gemessen am jährlichen theoretischen Zuchtfortschritt in Nachkommenprüfprogrammen) im Vergleich zu den Eltern von Bullen in Besamungszuchtprogrammen erreicht werden. Nach 3 Jahren liegen die Leistungen der Klone vor und die besten Klone können für den Einsatz in der Population selektiert werden. Die im darauffolgenden Jahr geborenen Nachkommen würden dann 13 bis 17 Zuchtjahre vor der Besamungszuchtpopulation liegen. Im selben Jahr werden die besten Klone miteinander verpaart, um eine neue Klonierungsrunde im Jahr 8 zur Verfügung zu haben. Nach 16 Jahren würde die Differenz zwischen der Benutzung von Klonen und dem Nachkommenprüfungssystem mehr als 30 Jahre betragen.

Die züchterischen Vorteile von Klonierungsprogrammen sind bei männlichen und weiblichen Klonen unterschiedlich. Männliche Klone ermöglichen eine sicherere und effizientere Zuchtwertschätzung auf Mast- und Schlachtleistung bei Zweinutzungs- und Fleischrassen und eine bessere und längere Nutzung von Spitzenbullern, wenn identische Embryonen erstellt und tiefgefroren wurden. Wenn praxisrelevante Testmethoden der Testung von Krankheitsresistenz bzw. -anfälligkeit entwickelt werden, können diese Ergebnisse direkt berücksichtigt werden.

Bei weiblichen Tieren ermöglicht die Erzeugung von Klongruppen die Bildung von Herden, die unter definierten Umweltbedingungen in der Leistung um mehrere Standardeinheiten über dem Durchschnitt liegen werden. Dies würde z. B. für Holstein-Friesian bedeuten, dass eine Leistungsgarantie um 11.000 kg Milch erreicht werden könnte. Beim Fleckvieh würde dies eine Milchleistung von 9.000 kg bei guter Bemuskelung ermöglichen. In Hinkunft könnte die geschickte Kombination genetischer und

klonaler Selektion zu einer deutlichen Beschleunigung des Zuchtfortschritts führen.

Die für die Embryoklonierung aufgezeigten Aspekte gelten sinngemäss auch für die Klonierung mit Zellen fetalen Ursprungs. Dagegen erweitert die Adult-Klonierung das Spektrum aber noch um eine sehr wesentliche Möglichkeit. Durch die Klonierung adulter Tiere könnte an die Stelle der genetischen Selektion eine Selektion auf phänotypischer Basis treten. Bei der Klonierung bleiben alle Effekte von Genkombinationen erhalten, d.h. nicht nur die additiven Geneffekte können genutzt werden. Bei ähnlicher Umwelt, wie sie in aller Regel in Betrieben mit gutem Management erwartet werden kann, sollte die Leistung von Klonen sich nur im Rahmen der verbleibenden Effekte der Umwelt und der mitochondrialen genetischen Varianz unterscheiden. Damit wäre innerhalb einer Herde in nur einer Generation mit allen Tieren eine Produktion auf dem Niveau des besten bzw. optimalen Tieres einer Herde möglich. Von besonderer Attraktivität könnte sein, Tiere mit hoher Lebensleistung auszuwählen.

Ein weiterer sehr wichtiger Vorteil der Klonierung ergibt sich aus der möglichen Unterstützung der weltweiten Anstrengungen, die seit einigen Jahren in Richtung markergestützter Selektion unternommen werden. Sobald geeignete molekulargenetische Marker identifiziert werden, die eine Optimierung der genetischen Selektion erlauben, können diese Effekte durch die Klonierung noch verstärkt werden. Würden in absehbarer Zeit etwa ein Dutzend Marker zur Verfügung stehen, die möglicherweise simultan genutzt werden sollen, kann nach Identifikation der wenigen Tiere, die für alle Marker positiv sind, durch Klonierung eine effiziente Nutzung dieser Tiere erreicht werden.

Bei Embryonen, von denen nach Blastomerenentnahme mittels PCR eine Markerbestimmung durchgeführt worden ist, kann durch Klonierung sichergestellt werden, dass aus diesen Embryonen via Generierung von geklonten Embryonen tatsächlich zumindest einige Tiere entstehen und somit der selektierte Genotyp nicht verloren geht.

Die genannten Anwendungen der Klonierung sind nur ein kleiner Auszug aus dem Potential, das diese neue Technik bietet. Es muss an dieser Stelle aber auch betont werden, dass noch nicht sicher ist, ob die Klonierung in absehbarer Zeit so perfektioniert werden kann, dass der Aufwand für die Technik in einem angemessenen Verhältnis zum möglichen Nutzen steht.

Ein anderer wichtiger Punkt ist die rechtliche Seite. Auch bei den Klonierungs-Patenten ist jetzt ein gerichtlicher Streit um Claims entflammt, der sicher nicht schnell beendet sein wird. Wie dem »Nature«-heft vom 8. Juni unter dem Titel »Cloning's owners go to war« (Aldhouse, 2000) zu entnehmen ist, wird heftig um die Rechte an dem Verfahren gekämpft. Auch wenn im Moment noch die biotechnologischen Anwendungen im Vordergrund stehen, wird auch die züchterische Nutzung der Klonierung einschliesslich der Möglichkeit der Erstellung transgener Tiere wohl nicht lizenzfrei zur Verfügung stehen.

8. Ethische Bewertung der Klonierung und Schlussbemerkung

Die Ethik-Kommission der Europäischen Union (GAEIB) hat in einer Stellungnahme zu den ethischen Aspekten der Klonierung vom 28. 5. 1997 unter anderem festgestellt, dass die Anwendung der Klonierung beim Tier ethisch akzeptabel ist, wenn sie unter Berücksichtigung tierschützerischer Vorgaben erfolgt.

Ein grosses Problem ist die Frage der Klonierung mit menschlichen Zellen inklusive dem therapeutischen Klonen (auch hier entsteht bei einigen der derzeit diskutierten Konzepte als Zwischenprodukt ein entwicklungsfähiger Embryo). Provozierend wird von interessierten Kreisen die Frage gestellt »Wieso sollte das Klonen bei Tieren erlaubt sein, nicht aber beim Menschen?« Zweifelsohne ist das technische Vorgehen weitgehend das gleiche und so kommt eine utilitaristische Sichtweise hier wohl in bestimmten naheliegenden Anwendungsbereichen

zu einer gleichen Aussage bei Mensch und Tier. Selbstverständlich werden sehr nachvollziehbare und scheinbar nützliche oder doch hilfreiche Gründe ins Feld geführt, grosse therapeutische Erfolge in Aussicht gestellt.

Aber es muss hier in aller Schärfe die Frage gestellt werden: Dürfen wir, was wir können? – Müssen wir, was wir dürfen? – Wollen wir, was wir müssen? und – Können wir, was wir wollen? Heiligt der Zweck die Mittel? Die Antwort muss m. E. klar und eindeutig »Nein« sein. Der Zweck darf hier nicht die Mittel heiligen!

Die reproduktive Klonierung eines Menschen wäre ein Vorgang, der zutiefst das Grundrecht des Erhalts der Menschenwürde verletzen würde. Auch ein Klon würde selbstverständlich eine eigene Persönlichkeit, ein »Ich«-Empfinden und Würde haben. Wie würde er mit der Tatsache, dass er ungefragt als Klonierungsprodukt entstanden ist, als Kopie oder Ersatz eines anderen Menschen, fertig werden. Wenn wir die Würde eines existierenden Menschen vor Verletzung oder Zerstörung schützen wollen und müssen – und darauf haben wir uns verständigt, dass wir das tun müssen – dann dürfen wir einem Verfahren, das einen Schaden der Würde des entstehenden Klon per se zur Folge hätte, niemals zustimmen.

Leider scheint es so zu sein, dass die Ablehnung der Klonierung keineswegs so umfassend ist, wie man dies hätte erwarten wollen, im Gegenteil, sie weckt bei gar nicht so wenigen Leuten wohlwollendes Interesse nach dem Motto: »Warum eigentlich nicht, wäre doch chic, ein Klon von mir!« Wie weit dieser Ego-Wahn reicht, kam bei einer – natürlich nicht repräsentativen – Umfrage eines Radiosenders nach dem Bekanntwerden von Dolly und der Möglichkeit des Adultklonierens zutage. Fast die Hälfte der Anrufer bekundete, dass sie sich gut vorstellen könnten, sich klonieren zu lassen.

Nur noch zwei Argumente zur Frage: »Wieso Klonen bei Tieren, nicht aber beim Menschen?« Ein Tier kann nicht erkennen, dass ein anderes Tier ein

Klon von ihm ist, und kann demzufolge auch nicht darunter leiden. Ein Mensch kann und würde sehr wohl unter diesem Umstand leiden.

Nur der Mensch hat die Fähigkeit der Einsicht seiner Herkunft und Zukunft, also ein Bewusstsein und die Voraussicht des eigenen Todes. Tiere können, darüber besteht weitestgehende Übereinkunft, zwar Schmerzen und Leiden empfinden und sie können wohl auch Furcht oder ähnliche Gefühle wie Angst entwickeln bzw. haben. Tieren ist es aber nicht möglich, den eigenen, bevorstehenden Tod als etwas unausweichliches, zwar zeitlich und örtlich unbestimmtes, aber sicher eintretendes Ereignis zu erkennen, bzw. zu begreifen. Wären sie dazu in der Lage, würde dies weitreichende Konsequenzen für ihr Verhalten und für unseren Umgang mit ihnen haben müssen. Ein sicheres Zeichen dafür, dass Tiere den eigenen Tod nicht begreifen ist, dass sie sich nicht selbst töten.

Ich gestehe, dass ich nicht optimistisch bin, was die Unterbindung der Ausdehnung der Klonierungstechnik auf den Menschen betrifft. Nur wenn wirklich sichergestellt wäre, dass ein Verzicht auf die Klonierung beim Tier einen zuverlässigen Schutz vor allen Anwendungen beim Menschen gewährleisten würde, wäre ich, wie wohl viele meiner Kollegen – sofort dazu bereit. Aber ohne so ein Junktim darf man nicht so unvernünftig sein, den Nutzen, den man indirekt für die Menschheit aus der direkten Anwendung der Klonierung bei Tieren ziehen kann, zu unterbinden.

Goethe lässt Faust sagen:

»Was man nicht nützt ist eine schwere Last.

Nur was der Augenblick erschafft,
das kann er nützen.«

Literaturverzeichnis

Aldhous, P. (2000) Cloning—s owners go to war. *Nature* 405, 610–612.
Brem, G., B. Brenig, H. M. Goodman, R. C. Selden, F. Graf, B. Kruff, K. Springmann, J. Hondele, J. Meyer, E.-L. Winnacker and H. Kräusslich (1985). Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Reprod. Dom. Anim.* 20: 251–252.

Brem G. (1986) Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht. Enke Verlag, Stuttgart, 211 S. ???

Bondioli K. R., Westhusin M. E. und Looney C. R. (1990) Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33, 165–174.

Briggs R. und King T. J. (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs—eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 445–463.

Cambell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A. und Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64–66.

Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Abel Ponce de Leon F. und Robl J. M. (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256–1258.

Clement-Sengewald A., Palma G. A., Berg U. und Brem G. (1992). Comparison between in vitro produced and in vivo flushed donor embryos for cloning experiments in cattle. *Theriogenology* 37, 196.

Distl O., Brem G., Gottschalk A. und Kräusslich H. (1990). Embryo-Splitting: erster Schritt zur klonalen Selektion. *Der Tierzüchter* 42, 474–475.

Glaser, V. (2000) Cloned cows turn back the cellular clock. *Nat. Biotechnology* 18, 594.

Gurdon J. B. (1962) Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cell. *Dev. Biol.* 4, 256–273.

Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad Jr., C. E., Wall, R. J., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1985) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680–683.

Hiendleder, S., Schmutz, S. M., Erhardt, G., Green, R. D., and Plante, Y. (1999) Transmitchondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 54, 24–31.

Hill J. R., Winger, Q. A., Long, C. R., Looney, C. R., Thompson, J. A., Westhusin, M. E. (2000) Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62, 1135–1140.

Illmensee K. und Hoppe P. C. (1981) Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential from nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23, 9–18.

Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kao J., Doguchi H., Yasue H. und Tsunoda Y. (1998) Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. *Science* 282, 2095–2098.

Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristafalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., and West, M. D. (2000) Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665–669.

McGrath, J. and Solter, D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300–1302.

McGrath, J. and Solter, D. (1984) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317–1319.

Nicholas F. W. und Smith C. (1983) Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod.* 36, 341–353.

Prather, R. S., Barnes, F. L., Sims, M. M., Robl, J. M., Eyestone, W. H. and First, N. L. (1987) Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37, 859–866.

- Robl J. M., Prather R. S., Barnes F., Eyestone W., Northey D., Gilligan B. and First N. L. (1987) Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64, 642-647.
- Sims M. und First N. L. (1993) Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6143-6147.
- Steinborn R., Zakhartchenko V., Jelyazkov J., Klein D., Wolf E., Müller M. und Brem G. (1998a) Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 426, 352-356.
- Steinborn R., Zakhartchenko V., Wolf E., Müller M. und Brem G. (1998b) Nonbalanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion. *FEBS Lett.* 426, 357-361.
- Steinborn, R., Müller, M., and Brem, G. (1998c). Genetic variation in functionally important domains of the bovine mtDNA control region. *Biochim. Biophys. Acta* 1397, 295-304.
- Steinborn, R., Schinogl, P., Zakhartchenko, V., Achmann, R., Scherthaner, W., Stojkovic, M., Wolf, E., Müller, M., and Brem, G. (2000) Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genetics* in press.
- Teepker G. und Smith C. (1989) Combining clonal response and genetic response in dairy cattle improvement. *Anim. Prod.* 49, 163-169.
- Wells, D.N., Misica, P.M., and Tervit H.R. (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60, 996-1005.
- Willadsen S.M. (1981) Micromanipulation of embryos of the large domestic species. In: *Mammalian Egg Transfer*, Florida, CRC Press, 185-210.
- Willadsen S. M. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 277, 298-300.
- Willadsen S. M., Janzen R. E., McAlister R.J., Shea B.F., Hamilton G. und Mc Dermad D. (1991) The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35, 161-170.
- Wilmot, I, Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature* 385, 810-813.
- Wilmot, I., Clark, J., and Harley C. B. (2000) Laying hold on eternal life? *Nat. Biotechnology* 18, 599-600.
- Wolf, E., Zakhartchenko, V., and Brem, G. (1998). Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *J. Biotechnol.* 65, 99-110.
- Zakhartchenko, V., Alberio, R., Stojkovic, M., Prelle, K., Scherthaner, W., Stojkovic, P., Wenigerkind, H., Wanke, R., Döchler, M., Steinborn, R., Müller, M., Brem, G. and Wolf, E. (1999a). Adult cloning in Cattle: Potential of Nuclei from a Permanent Cell Line and from Primary Cultures. *Mol. Reprod. Dev.* 54, 264-272.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Scherthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Müller, M., Brem, G., and Wolf, E. (1999b). Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fertil.* 115, 325-331.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Scherthaner, W., Stojkovic, M., Reichenbach, H.-D., Müller, S., Prelle, K., Steinborn, R., Müller, M., Wolf, E., and Brem, G. (1999c). Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 421-426.
- Zawada W. M., Cibelli J. B., Choi P. K., Clarkson E. D., Golueke P. J., Witta S. E., Bell K. P., Kane J., Abel Ponce de Leon F., Jerry J. D., Robl J. M., Freed C. R. and Stice S. L. (1998) Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinson rats. *Nature Medicine* 4, 569-574.

Geschlechtsbestimmung bei Embryonen und Spermien



Einleitung

Der Einsatz von Bio- und Gentechnologie in der Tierzucht kann über verschiedene Faktoren den Zuchtfortschritt beschleunigen (Abbildung 1; Übersichten: [1, 2]). Durch die Genomanalyse und die darauf basierende Entwicklung gendiagnostischer Tests wird eine präzisere Auswahl der besten Zucht-tiere möglich. Die Zuchtwertschätzung wird zumindest partiell durch eine Zuchtwertdiagnose abgelöst werden. Zudem ist die Genomanalyse die Basis für eine verlässliche Beschreibung genetischer Variation in Nutztierpopulationen und damit die Voraussetzung für effiziente Strategien zur Konservierung genetischen Materials.

Biotechniken der Fortpflanzung, begonnen bei der künstlichen Besamung über den Embryotransfer bis hin zu neueren Techniken, wie der *Ex-vivo*-Gewinnung von Eizellen, der *In-vitro*-Produktion von Embryonen und der Klonierung durch Embryo-Splitting oder durch Kernttransfer ermöglichen es, die Zahl der Nachkommen wertvoller Zuchttiere zu erhöhen und damit die Selektionsintensität zu steigern. In diesen Komplex fallen auch die Geschlechtsbestimmung von Embryonen sowie die Trennung von Spermien in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen.

Dieser Beitrag skizziert verfügbare Methoden für das Embryo-Sexing und die Spermientrennung sowie deren Bedeutung für die Rinderzucht. Zudem werden Möglichkeiten der Entwicklung neuer

Trennverfahren für Spermien sowie Ansätze zur genetischen Modifikation von Nutztieren, die zu einer erhöhten Befruchtungschance X- bzw. Y-Chromosom-tragender Spermien führen können, aufgezeigt.

Geschlechtsbestimmung bei Embryonen

Für die Geschlechtsbestimmung von Embryonen steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Diese basieren auf dem Nachweis Geschlechts-chromosomen-spezifischer Sequenzen in Biopsien, die von Morulae (Absaugen von Blastomeren) oder Blastozysten (Biopsie des Trophektoderms) gewonnen werden.

Die nachzuweisenden Zielsequenzen können entweder Abschnitte von Genen (z. B. ZFX/ZFY [3], Amelogenin [4]) oder aber repetitive Sequenzen sein [5]. In beiden Fällen erfolgt der Nachweis nach Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Anfärbung mit einem DNA-Farbstoff (z. B. Ethidiumbromid) entweder nach Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarosegel (Abbildung 1) oder direkt im Reaktionsgefäß (Übersicht in [6]).

Obwohl die Geschlechtsbestimmung von Embryonen technisch gelöst ist, hat sie in der Praxis – entgegen der anfänglichen Euphorien – keine große Bedeutung erlangt. Hauptgründe dafür sind die hohen Kosten und die Tatsache, daß im Durchschnitt bei 4 Embryonen die Geschlechtsbestim-

Abbildung 1: Bedeutung von Genomanalyse und Biotechniken der Fortpflanzung in der Rinderzucht

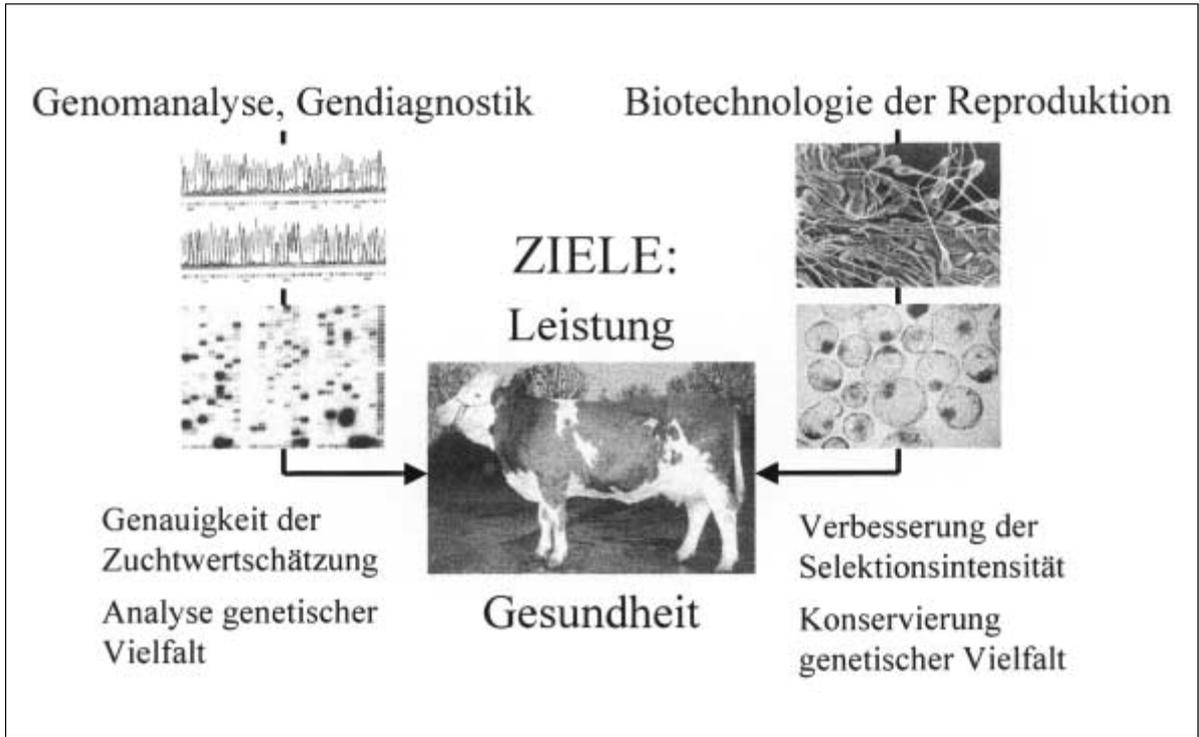
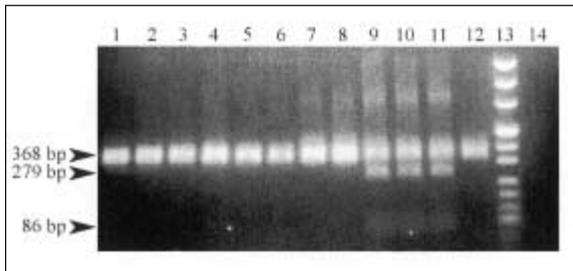


Abbildung 2: Geschlechtsbestimmung von Embryonen durch PCR-Amplifikation ZFX/ZFY-spezifischer Sequenzen mit nachfolgender *Pst*RFLP-Analyse. Die Embryonen 9, 10 und 11 sind männliche, die übrigen weiblich



mung durchgeführt werden muß, um ein Kalb des gewünschten Geschlechts zu erhalten. Der Kostenfaktor relativiert sich, wenn neben dem Geschlecht weitere Marker in die Diagnostik einbezogen werden. Allerdings gehen, wenn die Geschlechtsauswahl erst nach der Befruchtung erfolgt, 50% der Eizellen wertvoller Spendertiere verloren.

Wird das Verfahren unter Praxisbedingung durchgeführt, besteht eine erhöhte Kontaminationsgefahr und damit das Risiko falscher Ergebnisse. Zudem wird bei der Embryobiopsie die *Zona pellucida* verletzt, woraus sich Probleme hinsichtlich der Exportbestimmungen für Embryonen ergeben.

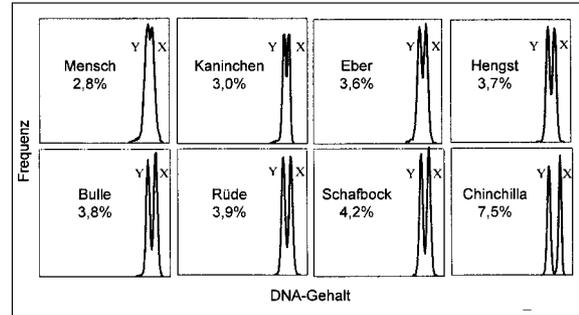
Spermientrennung in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen

Viele der o. g. Probleme der Geschlechtsbestimmung von Embryonen können vermieden werden, wenn die Auswahl des gewünschten Geschlechts bereits vor der Befruchtung erfolgt. Die dafür erforderliche Trennung von Spermien in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen wird dadurch erschwert, daß beide Spermienpopulationen sich nur marginal unterscheiden. Dies ist die Konsequenz verschiedener Mechanismen, die zu einer für die meisten Spezies unter natürlichen Bedingungen sinnvollen Befruchtungschance von 50 : 50 für X- und Y-Chromosom-tragende Spermien führen (Übersicht in [6]). Zu diesen Mechanismen gehören:

- die fast über den gesamten Verlauf der Spermatogenese bestehende Verbindung zwischen den Keimzellen über Zytoplasmabrücken
- die transkriptionelle Inaktivierung der Geschlechtschromosomen während der Meiose und der Spermatogenese
- die Reduktion der Genexpression insgesamt während der späten Phasen der Spermatogenese
- der relativ einheitliche Überzug der Spermien mit Makromolekülen während und nach der Spermatogenese (z. B. Proteine aus dem Seminalplasma [7]).

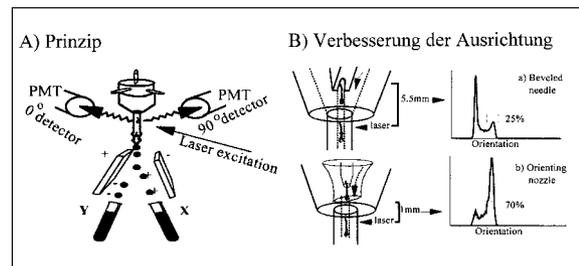
In der Literatur finden sich Berichte über Unterschiede im DNA-Gehalt, im Volumen der Spermienköpfe, in der Motilität, in der Oberflächenladung wie auch in der Oberflächenantigenität, wobei bislang nur der Unterschied im DNA-Gehalt eine solide Basis für die Trennung darstellt (Übersicht in [6, 8]). Die Tatsache, daß das Y-Chromosom kleiner als das X-Chromosom ist, macht bei verschiedenen Spezies einen Unterschied des DNA-Gehalts der jeweiligen Spermien in der Größenordnung von 2,8% (Mensch) bis 7,5% (Chinchilla) aus (Abbildung 3; [8]). Dieser Unterschied kann nach Anfärbung der DNA mit einem penetrierenden Fluorochrom (Bisbenzimid; Hoechst 33342), das präferentiell an A-T reiche Sequenzen bindet, dar-

Abbildung 3: Unterschied im DNA-Gehalt von X- und Y-Chromosomen-tragenden Spermien bei verschiedenen Spezies



gestellt und als Trennkriterium für eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung verwendet werden. Aufgrund der unregelmäßigen Form der Spermien (Paddelform bei Rinderspermien) ist allerdings eine besondere Modifikation der Zellsorter erforderlich, indem vor der eigentlichen Sortierung nach DNA-Gehalt über einen zweiten, vorgeschalteten Laser die Ausrichtung der Spermien bestimmt wird. Der Anteil der korrekt für die Sortierung ausgerichteten Spermien liegt bei neueren Geräten in der Größenordnung von 70% [8]. Die Spermien passieren in individuellen Flüssigkeitströpfchen, die je nach DNA-Gehalt des Spermiums positiv oder negativ geladen werden, einen Sortierkanal und werden durch Kondensatorplatten in entsprechende Auf-

Abbildung 4: Prinzip der Spermientrennung durch Flow-Cytometrie



fanggefäße abgelenkt (Abbildung 4). Durch technische Weiterentwicklungen ermöglichen High-Speed-Sorter heute einen Durchsatz von 10 Millionen getrennten Spermien pro Stunde mit einer Genauigkeit von 95% [8]. Inzwischen liegen auch erste Besamungsergebnisse vor, wonach mit niedrigen Dosen von sortierten Spermien ($1-3 \times 10^6$ in das *Corpus uteri* oder tief intrauterin) bei Färsen Trächtigkeitsraten von bis über 50% erzielt wurden [9]. Allerdings bleibt abzuwarten, inwieweit sich diese Ergebnisse mit Sperma von Bullen durchschnittlicher Fertilität bestätigen lassen. Wesentliche Nachteile der Spermientrennung durch Flow-Cytometrie sind die hohen Investitionskosten (Größenordnung mehrere 100.000 DM), die Notwendigkeit von speziell ausgebildetem Personal sowie die Tatsache, daß das Verfahren patentiert und die Lizenzvergabepolitik unklar ist. Diese Punkte erfordern dringend die Entwicklung alternativer Verfahren.

Eine Möglichkeit ist die sog. Free-Flow-Elektrophorese (FFE), die bereits erfolgreich zur Trennung einer Vielzahl von Biopartikeln eingesetzt wurde (z. B. [10]). Das Prinzip dieses Verfahrens ist, daß die zu trennenden Partikel sich in einem Strom von Trennmedium zwischen zwei Glasplatten bewegen können, wobei senkrecht zur Fließrichtung ein

Abbildung 5: Prinzip und Bewertung der Free-Flow-Elektrophorese (FFE)

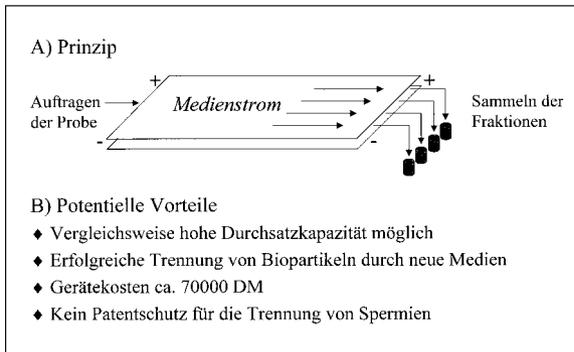


Abbildung 6: Bedeutung der Spermientrennung für die Rinderzucht

Bedeutung der Spermientrennung für die Rinderzucht

Nutzung für OPU/IVP

- ◆ Gezielte Erstellung von weiblichen Nachkommen für die Zucht
- ◆ Gezielte Erzeugung von männlichen Kälbern genetisch überragender Eltern für die nächste Bullengeneration
- ◆ Steigerung der Effizienz einer Marker-gestützten Selektion

Nutzung für die künstliche Besamung

- ◆ Besamung züchterisch wertvoller Kühe mit weiblich determinierten Spermaportionen → Erhöhung des Zuchtfortschritts
- ◆ Besamung weniger wertvoller Tiere mit Y-Chromosom-tragenden Spermien → Senkung der Produktionskosten für Fleischrinder
- ◆ Vermeidung der Zwickelbildung bei Zwillingsträchtigkeiten

elektrisches Feld angelegt wird (Abbildung 5). Im Rahmen eines Verbundprojekts, das vom Bayerischen Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie GmbH & Co KG koordiniert und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung teilfinanziert wird, arbeiten wir an der Weiterentwicklung des Verfahrens, um damit Spermien in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen trennen zu können. Bereits im ersten Halbjahr seit Projektbeginn ist es gelungen, Spermaportionen mit nur minimalen Einbußen an Motilität und Vitalität der Spermien zu fraktionieren, wobei allerdings nach ersten Untersuchungen die erhaltenen Fraktionen bislang noch nicht aufgrund des Gehalts eines X- bzw. Y-Chromosoms entstanden sind. Die FFE bietet aber eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten zur Modifikation des Trennverfahrens, wodurch auch eine Trennung in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen möglich werden sollte.

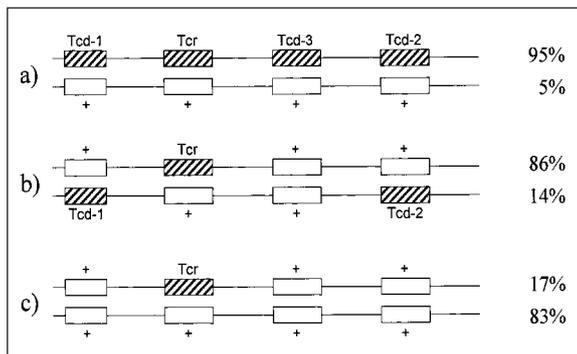
Die Bedeutung von getrenntem Sperma für die *In-vitro*-Befruchtung vor allem von *ex-vivo*-gewonnenen Eizellen wie auch für den Einsatz in der künstlichen Besamung ist in Abbildung 6 dargestellt.

Genetische Kontrolle der Spermienmotilität

Im Vergleich zur Separation X- bzw. Y-Chromosom-tragender Spermien wäre es noch effizienter, Zuchtbullen zur Verfügung zu haben, die entweder überhaupt nur Spermien mit dem gewünschten Geschlechtschromosom produzieren, oder bei denen Spermien mit dem gewünschten Geschlechtschromosom eine erhöhte Befruchtungschance haben.

In der Tat sind aus Untersuchungen bei Modellorganismen genetische Faktoren bekannt, die zu einer präferentiellen Weitergabe bestimmter Chromosomen an die Nachkommen führen. Das bekannteste Beispiel ist der sog. *t*-Komplex bei der Maus [11]. Es handelt sich dabei um einen Bereich von etwa 12 cM proximal auf Chromosom 17, der mehrere 100 Gene enthält. In diesem Bereich befinden sich einige Elemente, die bei homozygoten Böcken zur Sterilität, bei heterozygoten aber zu einer Verschiebung der Transmissionsrate zugunsten von Chromosom 17-Varianten mit dem vollständigen *t*-Komplex vs. Wildtyp-Chromosom 17 führen (Abbildung 7). Diese Elemente werden in sog. *Distorter* (*Tcd*) und in einen *Responder* (*Tcr*) eingeteilt. Ihre Lage im Bereich des *t*-Komplexes ist durch mehrere Inversionen, die eine Rekombination mit dem

Abbildung 7: Verschiebung der Transmissionsrate von Chromosomen 17-Varianten mit vollständigen bzw. partiellen *t*-Haplotypen

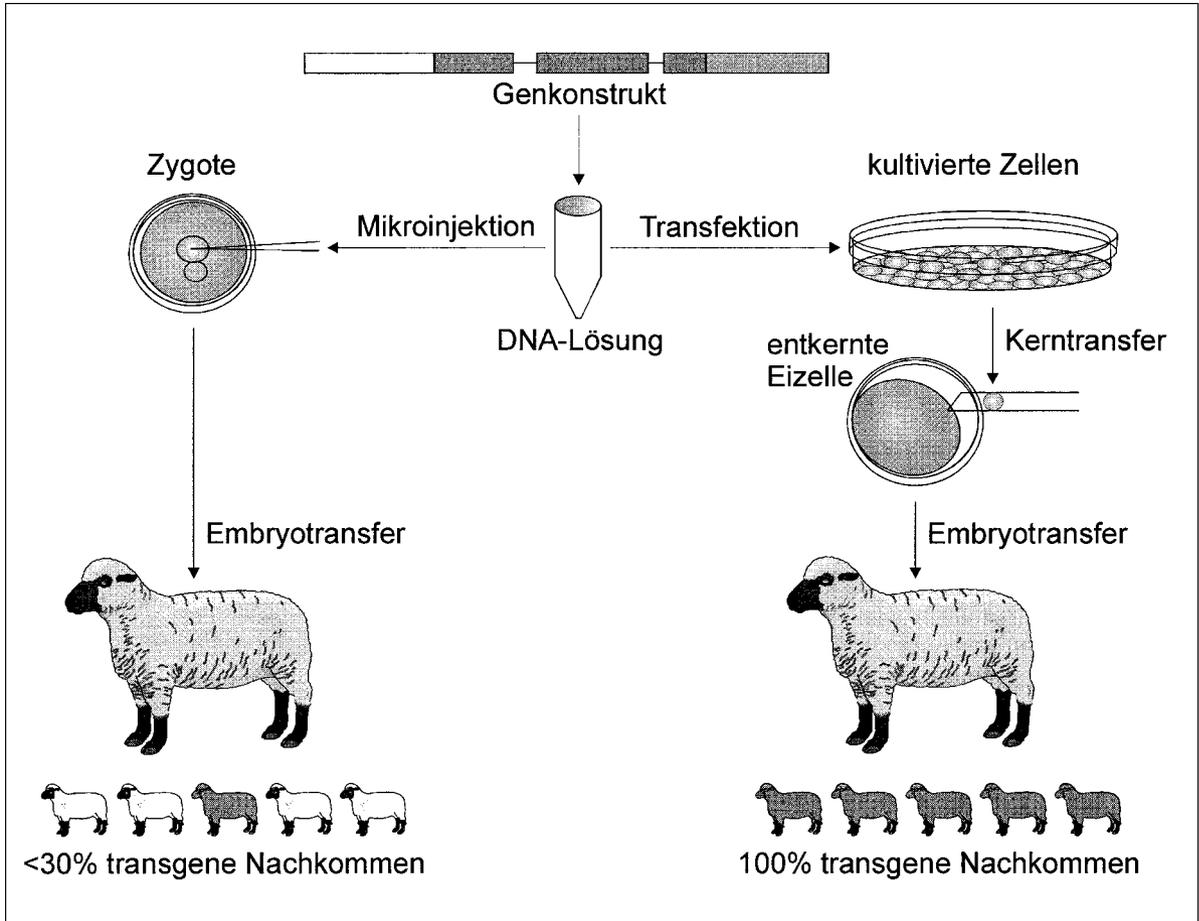


Wildtyp-Chromosom minimieren, balanciert. Nichtsdestoweniger kommen partielle *t*-Haplotypen vor, wodurch eine funktionelle Analyse der einzelnen Elemente möglich war. Entsprechend einem von Mary Lyon etablierten Modell [11] wirken die *Tcd* Elemente negativ auf die Vorwärtsbewegung der Spermien (sowohl der *t*-Komplex-tragenden wie auch der Wildtyp-Spermien). Haben Spermien jedoch den *Tcr*, so wird der negative Effekt der *Tcd* abgeschwächt, so daß die Spermien gegenüber den Wildtyp-Spermien einen Selektionsvorteil im Sinne einer signifikant erhöhten Befruchtungsrate haben (Abb. 7 a). Dieser Effekt zeigt sich auch, wenn sich die *Tcd* Elemente und der *Tcr* nicht auf dem gleichen Chromosom befinden (Abb. 7 b). *Tcr* funktioniert also auch in *trans*. In Abwesenheit der *Tcd* Elemente ist *Tcr* hingegen ein negativer Selektionsfaktor (Abb. 7 c).

Im Herbst letzten Jahres gelang es der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Herrmann am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg, das *Tcr*-Gen zu klonieren [12]. Es handelt sich dabei um ein Mitglied einer neuen Familie von Proteinkinasen (*smok* = sperm motility kinase), das durch ein Rearrangement zwischen 2 Genen entstanden ist und ausschließlich im Hoden spät während der Spermatogenese exprimiert wird. Um die Bedeutung dieses Faktors für die Spermienmotilität weiter zu charakterisieren, wurden Expressionsvektoren mit Hodenspezifischen Promotoren hergestellt und damit transgene Mäuse erzeugt. In einem Fall kam es zu einer Integration auf dem Y-Chromosom, was – in Anwesenheit von 2 *Tcd* Elementen auf dem Chromosom 17 – dazu führte, daß das Y-Chromosom präferentiell (66%) an die Nachkommen weitergegeben wurde.

Dies eröffnet die Perspektive, über einen Gentransfer des *Tcr* auf das Y-Chromosom bei Nutztierartes männliche Zuchttiere zu erhalten, deren Spermien mit X-Chromosom eine erhöhte Befruchtungschance haben. Aufgrund der zufälligen Integration und der insgesamt geringen Effizienz des Gentransfers über DNA-Mikroinjektion ist ein

Abbildung 8: Erzeugung transgener Tiere durch DNA-Mikroinjektion bzw. durch Kerntransfer unter Verwendung transfizierter Kernspenderzellen



gezielter Gentransfer eines *Tcr*-Expressionsvektors auf das Y-Chromosom mit diesem Verfahren nicht realistisch. Die Möglichkeit des Kerntransfers unter Verwendung transfizierter Zellen öffnet hier aber einen neuen Weg (Abb. 8). So wird bei diesem Verfahren der Gentransfer nicht direkt in den Embryo, sondern in kultivierte Zellen, durchgeführt, die auf

eine Integration im Bereich des Y-Chromosoms selektiert bzw. gescreent werden können. Geeignete Kernspenderzellen werden dann mit enukleierten Eizellen fusioniert, um aus transfizierten Zellen direkt transgene Tiere zu erzeugen. Der Kerntransfer beim Rind ist mittlerweile für verschiedenste Kernspenderzellen etabliert (z. B. [13–15]).

Schlussfolgerungen

- Die Geschlechtsbestimmung bei Embryonen ist technisch gelöst, hat allerdings aufgrund der hohen Kosten keine breite praktische Anwendung gefunden.
- Für die Spermientrennung in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen ist die Flow-Cytometrie das bislang einzige funktionierende Verfahren.
- Der geringe Durchsatz dieser Methode sowie patentrechtliche Gegebenheiten erfordern die Entwicklung alternativer Verfahren.
- Versuche zur Erzeugung von Zuchtbullen mit einer veränderten Transmissionsrate im Bezug auf die Geschlechtschromosomen sind überaus attraktiv.

Danksagung

Unsere Projekte im Bereich Biotechnologie der Fortpflanzung wurden bzw. werden dankenswerter Weise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (WO 685/2-1; WO 685/3-1), die Bayerische Forschungsförderung (76/93), das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BEO32/0312301) sowie das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (A/99/8) gefördert.

Literatur

1. Förster M., Wolf E. (1998) Grundlagenforschung in der Tierzucht. *Naturwissenschaftliche Rundschau* **51**, 314–320.
2. Wolf E. (2000) Neue Strategien in der Tierzucht und Reproduktionsbiotechnologie. *Nova Acta Leopoldina* **82**, 59–73.
3. Aasen E., Medrano J. F. (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technology* **8**, 1279–1281.

4. Chen C. M., Hu C. L., Wang C. H., Hung C. M., Wu H. K., Choo K. B., Cheng W. T. (1999) Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Molecular Reproduction and Development* **54**, 209–214.
5. Bredbacka P., Kankaapaa A., Peippo J. (1995) PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology* **49**, 167–176.
6. Seidel G. E. Jr (1999) Sexing mammalian spermatozoa and embryos – state of the art. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **54**, 477–487.
7. Hoefflich A., Reichenbach R.-D., Schwartz J., Grupp T., Weber M. M., Föll J., Wolf E. (1999) Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. *Domestic Animal Endocrinology* **17**, 39–51.
8. Johnson L. A., Welch G. R. (1999) Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* **52**, 1323–1341.
9. Seidel G. E. Jr, Schenk J. L., Herickhoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G. (1999) Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* **52**, 1407–1420.
10. Voelkl A., Mohr H., Weber G., Fahimi H. D. (1997) Isolation of rat hepatic peroxisomes by means of immune free flow electrophoresis. *Electrophoresis* **18**, 774–780.
11. Lyon M. F. (1986) Male sterility of the mouse t-complex is due to homozygosity of the distorter genes. *Cell* **44**, 357–363.
12. Herrmann B. G., Koschorz B., Wertz K., McLaughlin K. J., Kispert A. (1999) A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature* **402**, 141–146.
13. Zakhartchenko V., Durcova-Hills G., Schernthaler W., Stojkovic M., Reichenbach H.-D., Müller S., Prella K., Steinborn R., Müller M., Wolf E., Brem G. (1999) Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Molecular Reproduction and Development* **52**, 421–426.
14. Zakhartchenko V., Durcova-Hills G., Stojkovic M., Schernthaler W., Prella K., Steinborn R., Müller M., Brem G., Wolf E. (1999) Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *Journal of Reproduction and Fertility* **115**, 325–331.
15. Zakhartchenko V., Alberio R., Stojkovic M., Prella K., Schernthaler W., Stojkovic P., Wenigerkind H., Wanke R., Döchler M., Steinborn R., Müller M., Brem G., Wolf E. (1999) Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Molecular Reproduction and Development* **54**, 264–272.

Diskussion



KARG

Lassen Sie mich diese Sitzung mit einem Hinweis auf einen Genius loci unseres diesjährigen Tagungsortes eröffnen:

Gestern hat uns Herr Brenig in Erinnerung gebracht, daß Gregor Mendel seine berühmten Versuche in Brünn in den Jahren 1861–1865 durchgeführt hat. Hier im Weimar der Nachklassik hat Franz Liszt 1861 den Allgemeinen Deutschen Musikverein gegründet. Dessen Jahrestagung zur 75-Jahrfeier 1936 fand wieder einmal in Weimar, auch Mitte Juni, statt. In den Regularien für dieses Programm fand ich weitere Analogien zu unserer Veranstaltung der Schaumann Stiftung: Es durften nur Werke »lebender und ringender« Schaffender zum Vortrag gelangen, und die Mitwirkenden übten ihre Tätigkeit ehrenamtlich aus, wobei ihnen die Kosten für Reise und Aufenthalt erstattet wurden.

Beginnen wir mit Fragen zum Vortrag von Prof. Niemann:

BREVES

Wie lange nach der Schlachtung sind die gewonnenen Eizellen noch verwendbar?

NIEMANN

Ca. 12 Stunden.

SCHUH

In wieweit besteht die Gefahr der Übertragbarkeit von Viren?

NIEMANN

Die bekannten Viren sind kontrollierbar, problematisch sind endogene Retroviren.

Jüngste Arbeiten haben allerdings gezeigt, daß das Risiko einer Übertragung wohl nur sehr gering, wenn überhaupt vorhanden ist.

MEYER

Bei der Euphorie bezüglich Xenotransplantation sollte man bedenken, daß letztendlich fast alle Proteine eines Organs zwischen einzelnen Spezies gewisse Unterschiede aufweisen. Neben den endokrinen Faktoren (beispielsweise Erythropoetin von der Niere), gelangen auch die parakrinen Faktoren und zahlreiche weitere Enzyme kontinuierlich in die Zirkulation. Die Provokation von Autoimmunkrankheiten wird dadurch programmiert, auch wenn das Organ einer fremden Spezies nur kurzfristig eingesetzt wird. Mit der Inaktivierung der Gewebeabstoßung wird einem nur kurzfristig geholfen sein – es bleibt unerlässlich, die gesamte Physiologie zu berücksichtigen.

NIEMANN

Bezüglich der physiologischen Kompatibilität gibt es noch viel Unbekanntes, doch sind Teilfunktionen inzwischen nachgewiesen worden, insbesondere für Niere und Herz.

SCHUH

Wie versteht man die Immunologie der Abstoßungsreaktionen?

NIEMANN

Es erfolgt eine Überreaktion des humanen Komplementsystems (Hyperakute Abstoßungsreaktion), ausgelöst durch Überexpression humaner Komplementregulatoren im transgenen Schwein. Die anderen Formen der Abstoßung müssen durch Behandlung mit Immunsuppressiva kontrolliert werden.

GELDERMANN

Kann wegen nachhaltiger und starker Abwehrreaktionen des Empfängerorganismus die Xenotransplantation eine langfristig erfolgversprechende Perspektive sein? Alternativ wären wohl Untersuchungen an differenzierungsfähigen Zellen aus der betreffenden Spezies oder sogar aus dem betreffenden Organismus der lohnendere Forschungsansatz!

NIEMANN

Die Xenotransplantation ist vornehmlich bei soliden Organen und Zellverbänden nach heutigem Erkenntnisstand ohne Alternative. Für einzelne Zelltypen und kleinere Gewebeverbände ist auch die Generierung aus Stammzellen realistisch.

GELDERMANN

Im Anwendungsbereich beim Gen-Farming interessiert, wie von der ökonomischen Seite her die Bewertungskriterien zwischen Keimbahn-transgenen Tieren und transgenen Zellkulturen ausfallen. Betrachtet man die gegenwärtig als Pharmaka weltweit umsatzstärksten Proteine / Peptide, so sind unter den 20 wichtigsten wohl einige in tierischen transgenen Zellkulturen hergestellte, aber keine, die in transgenen Tieren hergestellt werden. Wie werden von den Experten für die Zukunft die besonderen Beiträge des Gen-Farming mit transgenen Tieren beurteilt?

NIEMANN

Beim Gen-farming gewonnene Präparate sind derzeit in klinischer Prüfung, die in 2-3 Jahren

marktfähig sein können. Solche Präparate sind das AAT (Antitrypsin, Antithrombin), aber auch der Tissue Plasminogen Aktivator, die sich im fortgeschrittenen Stadium der klinischen Prüfung befinden.

BREVES

Sie erwähnten, daß für die in vitro Kapazitation Heparin verwendet wird. Was weiß man über den Wirkungsmechanismus von Heparin in vitro?

SCHELLANDER

Glykosaminoglukane kommen in vivo im Genitaltrakt vor und sind für die Kapazitation wichtig. Ob in vitro andere Wirkungsmechanismen als in vivo zur Kapazitation beitragen, ist nicht gut untersucht.

STÖVE-SCHIMMELPFENNIG

Sie haben angesprochen, daß der Bulle selbst einen Einfluss auf die Fertilisationsrate hat. Weiß man über die biologischen Hintergründe dieses Phänomens Bescheid?

SCHELLANDER

Manche Bullen bringen kontinuierlich sehr hohe IVF-Ergebnisse, andere wieder kontinuierlich geringe Fertilisationsraten. Ein Faktor scheint die in vitro Kapazitationsfähigkeit des Samens zu sein, da die Fertilisationsrate durch Austestung der Heparinkonzentration optimiert werden kann.

TENHUMBERG

Wie kann dem Large-Calf-Syndrom entgegen gewirkt werden?

SCHELLANDER

Ein Faktor, der zu diesem Syndrom führt, sind serumhaltige Kulturmedien. Durch die Nutzung sogenannter definierter Kultursysteme (ohne Serum und Zellkokultur) ist eine Entwicklung eingeleitet worden, die eine normalere Embryonal- und Fetalentwicklung ermöglichen könnte.

SCHWERIN

Wenn man die Arbeiten an transgenen Nutztieren seit 15 Jahren verfolgt, so überrascht doch, daß der Erfolg der Vorkern - Mikroinjektionstechnik, gemessen an Integrations- und Expressionsrate, sich kaum weiter entwickelt hat. Warum?

BESENFELDER

Bei der Effizienz vom Gentransfer sind 2 Komponenten ausschlaggebend:

Bei Embryogewinnung und -transfer sind doch große Fortschritte erzielt worden.

Tatsächlich blieb aber die Integrationsrate der Gen-Konstrukte unbefriedigend, die zufälligen Integrationsorte ließen keine Voraussage über die Genexpression zu. Vielleicht gibt es aber neue Perspektiven durch Techniken, wie sie Herr Brem zur Klonierung vorgestellt hat.

BREVES

Ist Ihnen etwas zur Physiologie der mitochondrialen DNA bekannt?

BREM

Nein.

STRANZINGER

Gibt es neue Erkenntnisse über isogametische Individuen mit der Anwendung von Zytocalasin zur Erzeugung von homozygoten Nutztieren, um z.B. Tiere frei von rezessiven Erbfehlern zu machen? Hätte das Bedeutung für die experimentelle Phase der Klonierung?

BREM

Mir sind dazu keine neuen Ergebnisse bekannt und wegen der sog. »Letalbürde« ist nicht zu erwarten, dass solche Verfahren in absehbarer Zeit eine Bedeutung bei Nutztieren erlangen könnten.

SCHWERIN

Als Vorteil der Klonierung wird eine größere genetische Variabilität postuliert. Führt nicht die

Nutzung ein und desselben Tieres zur Verringerung der Variabilität und auch zum Verlust von Zuchtfortschritt?

BREM

Wie wir aus Untersuchungen über die geringen Inzuchtauswirkungen der künstlichen Besamung wissen, wird im Vergleich dazu die Nutzung der Klonierung nicht zu einer nennenswerten Verringerung der genetischen Variabilität führen, selbst wenn sie in Zukunft intensiver zur Erstellung von Zucht- und Produktionstieren genutzt werden sollte. Um einen über den direkten Klonierungsschritt (also die Erstellung genetisch weit überlegener Zuchttiere) hinausgehenden Zuchtfortschritt zu erreichen, muss eine Neukombination von Erbanlagen, also eine Verpaarung (von möglicherweise klonierten) Tieren erfolgen.

KANITZ

Wir haben auf dieser Tagung wiederholt etwas über das sogenannte »large calf syndrom« gehört und dabei erfahren, dass Embryonen, die in vitro erzeugt wurden oder aus dem Kerntransferv erfahren hervorgingen, sich auf Transkriptionsebene von in vivo erzeugten Embryonen unterscheiden können.

Wir wissen darüber hinaus, daß es zwischen in vitro und in vivo erzeugten Embryonen Unterschiede auf der Ebene der Proteinbiosynthese gibt und in Rinderfeten, die aus dem Transfer in vitro erzeugter Embryonen resultierten, das IGF-System vergleichsweise anders reguliert sein kann. Darüber hinaus gibt es weitere Unterschiede, deren Zusammenhänge noch nicht aufgeklärt sind. Was sollte deshalb getan werden, um die Ursachen des »large calf syndroms« möglichst schnell aufzuklären und zu beseitigen?

WOLF

Zur Aufklärung der Ursachen des »large-calf-Syndroms« stehen heute effiziente Methoden zum systematischen Vergleich von Genexpression auf RNA- und Proteinebene zur Verfügung. Man sollte

sie in den veränderten Geweben (z. B. Skelettmuskulatur) durchführen und könnte dadurch sicher aussichtsreiche Kandidatengene identifizieren. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Etablierung eines wirklich quantitativen Verfahrens zur Untersuchung von Genexpression in frühen Rinderembryonen.

STRANZINGER

Der Sedimentschattenfaktor bei Spermien verschiedener Mausinzuchtlinien variiert zwischen den Linien sehr stark, ist aber innerhalb Inzuchtlinien sehr einheitlich. Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse auf Nutztiere ohne Inzuchtlinien ist daher eine große Variation in den Sedimentschattenfaktoren zu erwarten. Kann dies die Trennung beeinflussen und wie gut ist das Mausmodell für die Übertragung auf Nutztiere?

WOLF

Die Maus ist sicher kein besonders gutes Modell, um Verfahren für die Spermientrennung in X- und Y-tragende Fraktionen bei Nutztieren zu etablieren. Ich habe die Maus nur genannt, da es bei dieser Spezies zum erstenmal gelungen ist, einen Faktor zu identifizieren (den T-Komplex Responder), der zu einer signifikanten Verschiebung der Transmissionsrate von Spermien führt, die diesen Faktor tragen.

GELDERMANN

Im Nachgang zum gestrigen Einführungsreferat von Prof. Winnacker noch eine allgemeine Frage an Herrn Brem.

Biotechnologische Arbeiten entwickeln sich in starkem Maße. Wenn man den Informationsquellen vertraut, sollte dies auch für die Anwendungsorientierung auf den Agrar- und Ernährungsbereich in Forschung, staatlichen Untersuchungsämtern und der Industrie gelten.

Wie wird von Ihnen die zukünftige Nachfrage nach universitär ausgebildeten Biotechnologen/innen eingeschätzt?

Wie hoch ist für auf diese Verfahren ausgebildete Experten das Risiko, arbeitslos zu werden? Oder ergibt sich in Zukunft möglicherweise in Deutschland für Biotechnologen eine ähnliche Sachlage wie derzeit bei den Informatikern?

BREM

Wir sind bereits jetzt in der Situation, dass es zunehmend schwieriger wird, hochqualifizierte Mitarbeiter/innen zu gewinnen.

Die Situation bei Dissertanden/innen ist noch dramatischer. Obwohl mittlerweile praktisch alle Studierenden in diesem Bereich während der Promotionszeit eine finanzielle Unterstützung erhalten, gelingt es nicht mehr, ausreichend viele engagierte junge Kollegen/Kolleginnen anzuwerben.

Diese Problematik wird sich in Zukunft auf Grund der prosperierenden Forschung und Anwendung auf dem Gebiet der Biotechnologie noch weiter verschärfen.

III.

Anwendungen biotechnologischer Verfahren

Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern



Einleitung

Die molekulare Gendiagnostik eröffnet für die Tierzucht ein breites Spektrum an Nutzungsmöglichkeiten. Mit dem Erkenntnisfortschritt im Rahmen der Genomanalyse nicht nur bei den landwirtschaftlichen Nutztieren, sondern auch in Verbindung mit der weiteren Entschlüsselung des menschlichen Genoms unter Nutzung weiterer Biotechniken werden weitere züchterisch wichtige Gene/Genregionen näher charakterisiert und können zukünftig neben den klassischen Methoden der Tierzüchtung eingesetzt werden.

Das Ziel der ersten molekularen Testverfahren, die vor ca. 10 Jahren entwickelt wurden, lag dabei in einer zeitlich früheren Erfassung von Genotypen im Rahmen von Zuchtprogrammen. Dabei waren z. B. in den Milchproteingenen die entsprechenden Varianten mittels biochemischer Verfahren bereits charakterisiert, eine direkte Diagnose des Genotyps war jedoch nur über die Milch möglich. Molekulare Gentests erlauben heute, unabhängig von Alter, Geschlecht und Laktation eine sichere Typisierung durchzuführen und somit aufwendige Nachkommenprüfungen mit dem langwierigen Umweg unter Erfassung der phänotypischen Merkmalsausprägung zu ersetzen.

Bei der molekularen Gendiagnose wird zwischen direkten und indirekten Verfahren unterschieden. Bei den direkten Gentests ist das Gen identifiziert und charakterisiert und die vorhandenen Allele

können durch molekulargenetische Verfahren auf DNA-Ebene dargestellt werden. Da bei der direkten Gendiagnose die spezifische Mutation direkt dargestellt wird, ist die Aussagesicherheit 100%ig, wenn im Rahmen des Verfahrens und bei der Probenziehung keine Fehler gemacht werden. Bei den indirekten Gentests ist das züchterisch interessante Gen noch nicht molekulargenetisch charakterisiert und die ursächlich für die genetisch bedingte Merkmalsvariation verantwortlichen Allele sind unbekannt. Bekannt sind in diesem Fall entweder die chromosomale Lokalisation des Gens und/oder die Segregation mit einem Marker. Die Sicherheit in der Aussage beim indirekten Gentest stellt also ein Wahrscheinlichkeitsergebnis dar, das umso genauer ist, je mehr eng gekoppelte möglichst flankierende DNA-Marker verfügbar und deren Kopplungsphase bekannt ist. Derzeit sind bereits eine Vielzahl an molekularen gendiagnostischen Testverfahren für qualitative Merkmale und Erbfehler bei landwirtschaftlichen Nutztieren verfügbar (Übersicht 1 a, 1 b, 1 c, 1 d).

Gendiagnostik für qualitative Merkmale Milchproteinvarianten

Die Milchproteingenvarianten beim Rind, die einem autosomal kodominanten Erbgang unterliegen, stehen im Zusammenhang mit züchterisch interessanten Merkmalen und wurden deshalb bereits in den ersten gendiagnostischen Tests auf der

Übersicht 1a: Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern beim Rind

Qualitative Merkmale	Erbfehler
Hornlosigkeit	Bovine Leukozyten Adhäsions Defizienz (BLAD)
Rotfaktor	Defizienz der Uridin-Monophosphat-Synthetase (DUMPS)
Milchproteinvarianten	Bovine progressive degenerative Myeloencephalopathie (Weaver) Kongenitale Muskelhypertrophie (Doppellender) Zitrullinämie White Heifer Disease Generalisierte Glycogenose (Glycogenspeicherkrankheit) Maple Syrup Urine Disease Kongenitale Hypothyreose (Kropf) α -Mannosidose β -Mannosidose Spherocytose Syndactylie Chondrodysplasie

Basis Southern-Blot-RFLP zur Differenzierung von κ -Kasein A und B einbezogen. Diese wurden Ende der 90iger Jahre durch Verfahren unter Einsatz von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) abgelöst. Dabei kam es im Zusammenhang mit der molekularen Darstellung von κ -Kasein-Varianten zunächst zu Fehlinterpretationen insbesondere dann, wenn in den zu untersuchenden Populationen neben κ -Kasein A und B weitere Allele vorkamen. Dies war besonders wichtig vor allem im Zusammenhang mit der Berücksichtigung des κ -Kasein-Genotyps in Zuchtprogrammen und beim Nachweis von seltenen Allelen in in ihrem Bestand bedrohten Nutztier-rassen (Prinzenberg et al. 1999). So konnte nachgewiesen werden, dass κ -Kasein E in Ayrshire zunächst als κ -Kasein A typisiert wurde, obwohl die Frequenz mit $q_e = 0.36$ sehr hoch ist (Ikonen et al. 1996). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass

Übersicht 1b: Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern beim Schwein

Qualitative Merkmale	Erbfehler
Fleischqualität	Maligne Hyperthermie Syndrom (MHS)
● Hampshire Faktor	Oedemkrankheit/Ferkeldiarrhoe
● intramuskulärer Fettgehalt	Tremor – Cambus Syndrom
Hautfarbe	Hypercholesterolämie
● weiße / schwarze Hautfarbe	Kryptorchismus
● Sattel	Kongenitale progressive Ataxie
Fruchtbarkeit	Vitamin C-Mangel
● Wurfgröße	

Übersicht 1c: Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern beim Pferd

Qualitative Merkmale	Erbfehler
Tobiano	Lethal White Foal Syndrom (LWS)
Rotfaktor	Hyperkaliämische periodische Paralyse (HYPP) Schwere kombinierte Immundefizienz beim Pferd (SCID)

Übersicht 1d: Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern beim Schaf

Qualitative Merkmale	Erbfehler
Fruchtbarkeit (Fec ^B) Muskelhypertrophie (Callipyge)	Spider Lamb Syndrome

hinsichtlich der Verfestigungszeit im Zusammenhang mit der Herstellung von Käse signifikante Unterschiede zwischen κ -Kaseingenotypen mit und ohne Beteiligung von κ -Kasein G bestehen (Erhardt et al. 1998). Hinsichtlich der praktischen Anwendung der molekularen Diagnose an den Milchproteinvarianten spielen vor allem die geschlechtsunabhängige Typisierung von Bullen (71%) im κ -Kasein und β -Laktoglobulin im Vergleich zu Kühen (25%),

Kälber (30%) und Embryonen (>1%) die größte Rolle. Im Rahmen einer internationalen Umfrage (Schlee 1993), an der sich 21 Länder beteiligten, wurden in 22 Labors DNA-Tests durchgeführt, wobei durchschnittlich 230 Proben je Labor anfielen. Mittlerweile stehen für alle auf Proteinebene bekannten Varianten der Milch beim Rind molekulare Testverfahren zur Verfügung (Prinzenberg 1998).

Bei der Ziege steht die molekulare Typisierung der α_{S1} -Kaseinvarianten im Vordergrund des Interesses, da die einzelnen Varianten mit quantitativen Veränderungen im α_{S1} -Kaseingehalt in Verbindung stehen. Diesbezüglich spielt insbesondere α_{S1} -Kasein F und O eine große Rolle, da diese Allele mit einem deutlich reduzierten α_{S1} -Kaseingehalt in der Milch einhergehen. In Frankreich wurde 1996 in der Ziegenzucht die Berücksichtigung von α_{S1} -Kasein auf der Basis eines Gentests eingeführt, wobei insbesondere die Nichtträger der bevorzugten Allele von der Weiterzucht ausgeschlossen werden (Manfredi et al. 1998). Auch in den bundesdeutschen Ziegenrassen (Tab. 1) kommen Genvarianten dieser Allele in unterschiedlicher Frequenz vor, wobei eine Berücksichtigung in der Zucht noch nicht erfolgt.

Hörner und Hornlosigkeit

Durch die zunehmende Bedeutung der Laufstall- sowie Freilandhaltung von Rindern spielt der Hornstatus eine besondere Rolle. Aufgrund der mit der Enthornung von Rindern verbundenen Schmerzen, Leiden, Leistungseinbußen sowie Kosten wird im vermehrten Umfang versucht, die Hornlosigkeit in behorrte Rinderrassen durch Kreuzungsverfahren einzubringen. Während bei der Anpaarung eines homozygot hornlosen Bullen an gehörnte Rinder alle Nachkommen heterozygot hornlos sind, kann bei heterozygoten Anpaarungen bei den daraus auch auftretenden hornlosen Nachkommen nicht auf den tatsächlichen Genotyp geschlossen werden. Bullen können diesbezüglich im Rahmen einer zeitaufwendigen Nachkommenprüfung charakterisiert werden

Tabell 1: Allelfrequenzen im α_{S1} -Kasein in bundesdeutschen Ziegenrassen. Die Varianten α_{S1} -Kasein F und O gehen mit einem verringerten Eiweißgehalt einher

	WDE ¹⁾	BDE ²⁾	Toggenburger	Thüringer Waldziege
	n	n	n	n
α_{S1} -Kasein	102	42	35	57
A	0,181	0,071	0,200	0,211
B/E	0,496	0,417	0,086	0,491
F	0,098	0,417	0,057	0,105
O	0,225	0,095	0,657	0,193

¹⁾ WDE = Weiße Deutsche Edelziege

²⁾ BDE = Bunte Deutsche Edelziege

(Kräußlich u. Röhrmoser 1995). Dabei gehen die bisherigen genetischen Modelle von vier Genorten mit Einfluss auf die Hornbildung aus, wobei in europäischen Rinderrassen (*Bos taurus taurus*) nur die Genorte *Polled* (hornlos) und *Scurs* (Wackelhorn) eine Rolle spielen. Bei den beiden anderen Genorten ist jeweils ein Allel fixiert. Das Allel P für die Hornlosigkeit ist dominant über p (gehört) und am Genort *Scurs* führt das Allel Sc im homo- und heterozygoter Form bei Bullen zur Ausprägung von Wackelhörnern, während es bei weiblichen Tieren nur in homozygoter Form epistatisch zu P ist und zu Wackelhörnern führt. Da die ursächliche Mutation für den *Polled*-Genort noch nicht bekannt ist, jedoch seine Lage auf dem proximalen Abschnitt von BTA 1 werden derzeit indirekte Gentests für die Hornlosigkeit eingesetzt, um bei hornlosen Nachkommen heterozygot hornloser Eltern, deren Hornstatus zu erfassen. Dabei zeichnet sich ab, dass einzelne Marker in Abhängigkeit von der Rasse und Familie informativ sind und für eine frühzeitige Erkennung und Differenzierung von hornlosen Tieren geeignet sind (Harlizius et al. 1997, Brockmann et al. 2000). Für diesen indirekten Gentest sind jedoch zur Ableitung der Kopplungsphase in der Familie auch noch Proben von Verwandten notwendig, womit letztendlich auch höhere Kosten verbunden sind.

Farbe

In Abhängigkeit von der Tierart und innerhalb der Tierart bei einzelnen Rassen ist die wirtschaftliche Bedeutung der Haar-/Fellfarbe unterschiedlich. Insbesondere in der Holstein Friesian Population erlangte der molekularbiologische Nachweis des Rotfaktors, der einem rezessiven Erbgang unterliegt, eine große Bedeutung. Dabei gelang es einen direkten Gentest auf der Basis einer Variation im Rezeptor des Melanocyten-stimulierenden Hormons zu entwickeln (Klungland et al. 1995). Dieser Test wurde umfassend genutzt zur Erkennung von Anlageträgern in der Holstein Friesian Population um darauf aufbauend, unter Verwendung von Superovulation und Embryotransfer gezielt rotbunte Tiere zu erstellen. Diese wurden zur Verdrängungskreuzung in der Dt. Rotbunten Population eingesetzt, die in der Zwischenzeit eine Farbrichtung innerhalb Dt. Holsteins darstellt. Aufgrund dessen ist die Nutzung des Tests in der Rinderzucht zurückgegangen.

Auch in der Pferdezucht ist es möglich, diesen Test zur Identifikation von Fuchsgenträger zu nutzen. Bei Rindern sind derzeit drei, beim Schwein vier Rezeptorvarianten bekannt, wodurch bei Bedarf für zahlreiche Farbvariationen direkte und indirekte Gentests zur Verfügung stehen. Der Farbgenort Roan ist beim Rind insbesondere von Interesse, da er bei Shorthorn und Weiß-Blaue Belgier eine enge Beziehung zur White Heifer Disease aufweist.

Fruchtbarkeit

Da in der Lämmermast die Wirtschaftlichkeit von der Fruchtbarkeit des Mutterschafes und der Wachstumsrate und der Schlachtkörperqualität der Nachkommen bestimmt wird, wurde unter diesem Gesichtspunkt durch Introgression unter Verwendung einer systematischen Rückkreuzung das Fec^B-Gen in verschiedene Rassen eingekreuzt. Der Effekt des Fec^B-Gens auf Reproduktionsparameter zeigt, dass in heterozygoten/homozygoten Tieren die Ovulationsrate um 1,3–1,6 / 2,7–3,0 Follikel und

die Wurfgröße 0,9–1,2 / 1,1–1,7 Lämmer ansteigt (Nieuwhof et al. 1998). Im Zusammenhang mit der Einführung von Haplotypen in Populationen ist es notwendig, im Rahmen der fortgesetzten Rückkreuzung Fec^B-Genträger zu identifizieren. Dieses erfordert eine umfangreiche Nachkommenprüfung von Böcken oder die Erfassung der Ovulation von Mutterschafen durch Laparoskopie über 3–5 Zyklen. Beide Verfahren verlängern das Generationsintervall und sind zeit- und arbeitsaufwendig.

Der Fec^B-Locus ist auf Chromosom 6 des Schafes kartiert, das Gen und die ursächlich verantwortliche Mutation sind noch nicht identifiziert. Anhand der vergleichenden Genkarten wurden die Mikrosatelliten BM1329 (Rind) und OarAE101 (Schaf) für die Entwicklung eines indirekten Gentestes (Leyhe et al. 1998) verwendet und durch die Typisierung verschiedener Schafpopulationen das Vorkommen und die Frequenz der informativen Allele überprüft (Tab. 2).

Die informativen Allele kommen, wenn auch in niedriger Frequenz, z. B. beim Merinolandschaf vor. Im Rahmen von Segregationsanalysen wurde eine genetische Distanz zwischen diesen beiden Markern von 19,5 cM auf der weiblichen und 13,5 cM auf der männlichen Seite geschätzt. Die Genauigkeit des indirekten Gentests wird vermindert durch die Möglichkeit des Auftretens der Rekombination und dem Auftreten der bevorzugten Haplotypen auch in Rassen, in die das Fec^B-Gen eingebracht werden soll.

Tabelle 2: Informativ Allele der Mikrosatelliten BM1329 und OarAE101 im Zusammenhang mit der Einkreuzung des Fec^B-Gens und deren Vorkommen in Schafassen

	Merinolandschaf	Romanov	Bergschaf	Ostfries. Milchschaaf
BM1329				
A	0,10	0,03	0,21	0,26
OarAE101				
A	0,07	0,72	0,35	0,10

Beim Schwein sind mittlerweile verschiedene Varianten in Genen im Zusammenhang mit der Wurfgröße beschrieben (Rothschild et al. 1996, Short et al. 1997, Rothschild et al. 2000). In Anbetracht der internationalen Ausrichtung der Zuchtprogramme, dem Einsatz unterschiedlicher Rassen in Verbindung mit dem mittelfristigen Ziel einer Erhöhung der Wurfgröße ist davon auszugehen, dass die Zuchtunternehmen intern die entsprechenden Gentests einsetzen.

Fleischqualität; Hampshire-Faktor beim Schwein

Bei der Rasse Hampshire konnte ein Gen identifiziert werden, das im Zusammenhang mit der Fleischqualität steht. Dabei kommt es bei Trägern des dominanten RN-Allels aufgrund eines hohen Glykogengehaltes in der Skelettmuskulatur zu einem niedrigen End-pH-Wert 24 h post mortem sowie damit einhergehend mit einer verminderten Wasserbindungskapazität und einer verringerten Ausbeute bei der Herstellung von Kochschinken.

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine γ -Untereinheit der Adenosin-Monophosphat aktivierte Proteinkinase (*PRKAG3*) für diesen Fehler verantwortlich ist (Milan et al. 2000). Dies ermöglicht in Verbindung mit einem direkten Gentest die sichere Erkennung von Anlageträgern zur Optimierung von Zuchtprogrammen, da die bisherige RN-Phänotypisierung unter Einbeziehung von Parametern des Glykogen-Stoffwechsels nicht 100% sicher ist und die darauf aufbauende Haplotyp-Analyse mit eng gekoppelten Markern dann vereinzelt zu Fehldiagnosen führen kann.

Gendiagnostik für Erbfehler

Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD)

Bei der bovinen Leukozyten-Adhäsions-Defizienz handelt es sich um einen autosomal rezessiv vererbten Erbfehler, der zu Störungen in der Infektionsabwehr führt. Die Folge davon ist eine reduzierte Expression des CD-18 Proteins und infolgedessen von β -2 Integrin, einem essentiellen Adhäsionsmolekül der neutrophilen Granulozyten.

Merkmalsträger zeigen häufig unspezifische rezidivierende Infektionen mit reduziertem Wachstum und Tod innerhalb des ersten Lebensjahres.

Die Punktmutation wird verwendet für einen direkten molekulargenetischen Test, den die Zucht- und Besamungsorganisationen seit 1991 weltweit zur Identifizierung von Anlageträgern nutzen. Die Frequenz für Anlageträger, die zu Beginn bei 10–15% in der Holstein-Friesian Besamungsbullenpopulation lag und bei ungefähr 6% bei Milchkühen ist nach Nutzung der Gendiagnose deutlich zurückgegangen.

In Verbindung mit dem Gentest ist es auch möglich, Anlageträger in der Zucht einzusetzen ohne dabei Merkmalsträger zu erzeugen. Dies kann im Sinne des Erhalts der genetischen Variabilität züchterisch erwünscht sein. Die Häufigkeit des Auftretens von Anlageträgern in verschiedenen Erbfehlern in Australien und die sich daraus ergebenden ökonomischen Auswirkungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Kongenitale Muskelhypertrophie

Für die insbesondere bei der Fleischrasse Weiß-Blau-Belgier, jedoch auch bei anderen Rassen z. B. Piemonteser deutlich ausgeprägte kongenitale Muskelhypertrophie (Doppellender), die mit einer hohen Schlachtausbeute und sehr guten Mastleistungsparametern, aber auch mit Abkalbschwierigkeiten und einer herabgesetzten Fertilität einhergeht, konnte eine Deletion/Mutation am Myostatin Gen nachgewiesen werden, die verantwortlich für den hypertrophen Phänotyp ist (Grobet et al. 1998). Der Einsatz eines direkten Gentests (Fahrenkrug et al. 1999) bietet hier die Möglichkeit, heterozygote Tiere zu identifizieren, die teilweise noch die positiven Eigenschaften, jedoch nicht die Kalbschwierigkeiten zeigen. Gleichzeitig kann damit die Erstellung von homozygoten Tieren vermieden werden.

Beim Schaf ist das Callipyge Gen bekannt (George u. Cockett 1996), das zu einer deutlichen Muskelhypertrophie insbesondere an den Keulen führt, wobei die Merkmalsausprägung zum Zeitpunkt der

Tabelle 3: Häufigkeit des Auftretens von Anlageträgern in verschiedenen Erbfehlern in Australien und die daraus sich ergebenden ökonomischen Auswirkungen

Erbfehler	Rasse	Auftreten von Heterozygoten	Kälber mit Krankheitsrisiko	Jährlicher nationaler Verlust AUD \$
α-Mannosidose	Angus	5,4 %	400	100.000
Glykogen-Speicherkrankheit (Pompe's Disease)	Brahman	13,0 %	4.000	600.000
Zitrullinämie	Holstein Friesian (KB-Bullen)	13,3 %	4.000	300.000
Bovine Leukozytäre Adhäsionsdefizienz	Holstein Friesian (KB-Bullen)	13,0 %	4.000	300.000

nach Healy, 1995

Geburt noch nicht sichtbar ist, sondern sich erst ab der dritten Lebenswoche entwickelt. Von daher treten keine vermehrten Geburtsschwierigkeiten auf und diese Genvariante kann durch züchterische Maßnahmen in Rassen eingebracht werden. Da bei der Ausprägung des Genotyps parentales Imprinting beteiligt ist, werden im Rahmen von Zuchtprogrammen zur Identifizierung von Anlageträgern derzeit indirekte Gentests begleitend eingesetzt, um umfangreiche Nachkommentests zu ersparen.

Maligne Hyperthermie Syndrom beim Schwein

Beim Schwein war der Halothantest über Jahrzehnte hinweg die einzige Möglichkeit am lebenden Tier den Status hinsichtlich der Streßempfindlichkeit und die damit in Verbindung stehende Fleischqualität zu bestimmen. Dabei hat der Halothantest den Nachteil, daß z.T. Schwierigkeiten in der Beurteilung der Reaktion auftreten und lediglich zwei Phänotypen erkannt werden können. Die z.T. verwendete Haplotypisierung mit biochemischen Markern (Blutgruppenfaktoren; Serumproteine) aus der Halothan-Kopplungsgruppe ist zeit- und arbeitsaufwendig und in verschiedenen Populationen nicht immer aussagekräftig, vor allem bei Einkreuzung von Rassen mit ungleichen Kopplungsbeziehungen. Der molekulare Nachweis einer Mutation im Ryanodinrezeptor 1 (*RYR-1*), die für die Ausprägung des Malignen Hyperthermie Syndroms (MHS) beim

Schwein verantwortlich ist, eröffnete gleichzeitig die Möglichkeit der sicheren molekularen Typisierung (Fujii et al. 1991).

Die Herdbuchzucht nutzt seit 1992 den MHS-Gentest als Hilfsmittel zum Aufbau streßstabiler DL-Sauenlinien und versucht seit einigen Jahren auch reinerbig streßresistente Pietrainlinien zur Verbesserung der Fleischqualität aufzubauen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Frequenz des unerwünschten Allels für *RYR-1* bei Pietrain >0.95 ist. Am Beispiel des MHS-Gentestes, der patentiert ist, hat sich bereits gezeigt, dass die Schweinezucht molekulare Testverfahren trotz Lizenzgebühren für die Realisierung von Zuchtprogrammen nutzt. Daher ist davon auszugehen, dass auch zukünftig, unter Abschätzung der Wirtschaftlichkeit, molekulare Testverfahren in größerem Umfang Eingang in Zuchtprogramme finden werden.

Oedemkrankheit beim Schwein

Bei der Entstehung der Oedemkrankheit (*E.coli*-Enterotoxemie) und des Durchfalls beim Absetzen (enterale Colibazillose) ist es entscheidend, ob die toxinbildenden *E.coli*-Bakterien mit den an ihrer Oberfläche lokalisierten Fimbrien mit einem Rezeptor auf der Dünndarmschleimhaut eine Verbindung eingehen können. Ist der entsprechende Rezeptor nicht vorhanden, so haben die *E.coli*-

Keime keine Möglichkeit sich anzuhängen und ihre pathogene Wirkung zu entfalten. Das bedeutet, dass das Schwein gegenüber *E.coli*-Infektion mit dem betreffenden Fimbrientyp genetisch resistent ist. Die bisherige Typisierung der Fimbrienrezeptoren war nur möglich anhand von Dünndarmproben von geschlachteten Schweinen. Von daher eignete sich dieser Test nur eingeschränkt für eine züchterische Selektion, da nur anhand der Nachkommen letztendlich auf den Genotyp des Vaters oder der Mutter geschlossen werden konnte.

Die Entwicklung eines direkten molekulargenetischen Testes für den F-18-Rezeptor erlaubt jetzt eine direkte Erfassung des Genotyps am lebenden Tier (Vögeli et al. 1998). Dabei zeigen bisherige Untersuchungen beim Edelschwein und der Schweizer Landrasse, dass 11 bzw. 1% der Tiere dieser Rassen homozygot resistent sind (Bertschinger u. Vögeli 1998). Es ist davon auszugehen, dass zukünftig in größeren Zuchtorganisationen resistente Linien aufgebaut werden, wobei darauf zu achten ist, dass bei stressempfindlichen Rassen auch der MHS-Test durchgeführt wird, da eine Kopplung der Gene für Stressempfindlichkeit und für die Resistenz gegenüber F18 *E.coli*-Besiedlung besteht.

Lethal-White-Foal-Syndrom (LWF-Syndrom)

Das LWF-Syndrom kommt in Pferderassen vor, in denen eine weiße Scheckung des Felles auftritt. Dabei führt die Anpaarung von gescheckten Pferden teilweise zu Nachkommen, die im Gegensatz zu ihren Eltern ein weißes oder fast vollständig weißes Fell haben und die innerhalb des ersten Lebensjahres sterben. Durch molekulargenetische Untersuchungen konnte am Endothelin Rezeptorgen (*EDNRP*) die Mutation nachgewiesen und eine allelspezifische PCR zur Identifizierung entwickelt werden (Metallinos et al. 1998). Durch den molekulargenetischen Test konnten auch Anlageträger identifiziert werden, die phänotypisch keine Overzeichnung erkennen ließen. Bei weißen Fohlen, die von Paint-Eltern abstammen und diese Mutation nicht

Tabelle 4: Allele am Prion-Protein Gen, Prion-Protein Genotypen und Empfänglichkeit für Scrapie

136	154	171	Aminosäureposition
— Val (V) —	— Arg (R) —	— Arg (R) —	
↓	↓	↓	
Ala (A)	His (H)	Glut (Q)	
Genotypen	Empfänglichkeit		
VRQ/VRQ	sehr hohe Empfänglichkeit (Cheviot)		
VRQ/ARQ	sehr hohe Empfänglichkeit (Cheviot)		
ARQ/ARQ	Hohe Empfänglichkeit (Suffolk) Resistent (Cheviot)		
VRQ/ARR	Gelegentliche Fälle (Suffolk, Cheviot)		
ARQ/ARR	(in D bei allen Scrapie Fällen ARQ beteiligt)		
ARQ/ARR	Resistent (Suffolk, Cheviot)		
ARR/ARR	Resistent (Suffolk, Cheviot)		

Mod. nach EU, 1999

tragen, kann der Gentest verhindern, dass es zur Fehldiagnose LWF-Syndrom kommt.

Scrapie-Resistenz beim Schaf

Bei Scrapie handelt es sich um eine weltweit verbreitete (Ausnahme Neuseeland, Australien) Erkrankung bei Schafen, die zur Gruppe der »Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie« (TSE) zugeordnet wird, wobei eine Beteiligung an der Entstehung von BSE diskutiert wird. Die Inzidenz für

Tabelle 5: Prion Protein Genotypen (%) in Schafrassen der BR Deutschland

	VRQ/ VRQ/ ARQ ARR	ARQ/ ARQ/	ARQ/ ARH ARR/ AHQ	ARR/ ARR
Merinolandschaf	1	41	51	5%
Schwarzköpfiges Fleischschaf	3	9	45	43%
Texel	23	17	46	3%
Suffolk	1	6	45	48%
Ostfriesisches Milchschaf	–	30	70	–

Mod. n. Junghans et al., 1998

Scrapie in Deutschland ist sehr niedrig. Im Zusammenhang mit Scrapie werden Zusammenhänge zwischen verschiedenen Allelen am Prion-Proteingen und einer Empfänglichkeit diskutiert (Tab. 4). Dabei zeigt sich jedoch auch, dass in Abhängigkeit von der Rasse verschiedene Genotypen zu einer hohen Empfänglichkeit oder Resistenz führen. In der Bundesrepublik Deutschland (Tab. 5) bestehen große Unterschiede im Vorkommen und in der Frequenz sowohl der Genotypen, die mit einer hohen Empfänglichkeit als auch von Genotypen, die mit einer Resistenz einhergehen sollen (Junghans et al. 1998). Aufgrund umfangreicher molekularer Typisierungen von Schafen in Großbritannien, Frankreich, Niederlande ergibt sich auch für die bundesdeutsche Schafzucht die Frage, inwieweit die Genotypisierung auch bei hiesigen Schafrassen umgesetzt werden soll, wobei die züchterischen Konsequenzen sowie die Bedeutung der resistenten Tiere mit einer möglicherweise verlängerten Inkubationszeit noch nicht endgültig geklärt sind.

Schlussfolgerungen

Insgesamt betrachtet führt die molekulare Gendiagnostik im Zusammenhang mit qualitativen Merkmalen zu einem weitgehenden Verzicht auf kostenintensive, tierbelastende und arbeitsintensive Untersuchungen. Sie erlaubt eine sichere alters- und geschlechtsunabhängige Erfassung des Genotyps und wird von den an der Zucht beteiligten Organisationen bei gegebener Wirtschaftlichkeit unmittelbar genutzt. Unter diesem Gesichtspunkt sind auch die verschiedenen Patente für Gentests zu sehen. Im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Erbfehlern ist die molekulare Gendiagnose insbesondere bei rezessiven Erbfehlern im Zusammenhang mit international ausgerichteten Zuchtprogrammen von großer Bedeutung. Sie erlaubt eine Erkennung von Anlageträgern ohne umfangreiche Testanpaarungen, wodurch eine Verkürzung des Generationsintervalls möglich ist. Unter Tierschutzgesichtspunkten kann bei Einbeziehung der molekularen Gendiagnostik die Anpaarung von Anlageträgern

Übersicht 2: Voraussetzungen für die weitere Entwicklung der molekularen Gendiagnose

- Merkmalerfassung in der Praxis
 - Ausprägung, Frequenz, Rasse
- Informatives Familienmaterial
 - Anlage von DNA Banken
- Auffinden des Gens → vergleichende Genkarten
 - Nachweis von segregierenden Allelvarianten
 - direkter Gentest
- Identifikation von kosegregierenden Markern
 - indirekter Gentest
- ökonomische Bewertung
- Einbindung in Zuchtprogramme

untereinander und des daraus resultierenden Risikos für das Auftreten von Merkmalsträgern vermieden werden. Andererseits erlaubt die Verwendung von Gentests den kontrollierten Zuchteinsatz von Anlageträgern und ist damit auch ein wertvolles Hilfsmittel bei der Erhaltung der in ihrem Bestand gefährdeten Nutzierrassen. Für die weitere Entwicklung der molekularen Gendiagnose (Übersicht 2) ist es jedoch nicht nur notwendig, weitere Erkenntnisse aus den nationalen und internationalen Genomanalyseprojekten zu nutzen, sondern gleichzeitig auch durch die Zucht- und Besamungsorganisationen eine weitergehende Merkmalerfassung zu betreiben und informatives Familienmaterial durch die Anlage von DNA-Banken zur Verfügung zu stellen. Nur so wird es möglich sein, weitere direkte und indirekte Gentests für die Nutzung im Rahmen von tierzüchterischen Fragestellungen zur Verfügung zu haben.

Literatur

- Bertschinger, H. U.; Vögeli, P. (1998): Ödemkrankheit und Colidurchfall züchterisch begegnen. *SUS* 5, 12-14.
- Brockmann, G. A.; Martin, J.; Teuscher, F.; Schwerin, M. (2000): Marker controlled inheritance of the polled locus in Simmental cattle. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 43, 207-212.
- Erhardt, G.; Prinzenberg, E.-M.; Buchberger, J.; Krick-Saleck, H.; Krause, I.; Müller, M. (1997): Bovine (-casein G): detection, occurrence, molecular genetic characterisation, genotyping and coagulation properties. *Proc. IDF Seminar Milk Protein Polymorphism Palmerston North, New Zealand, 1997*, pp 328-329.

- Fahrenkrug, S. C.; Casas, E.; Keele, J. W.; Smith, T. P. L. (1999): Technical Note: Direct Genotyping of the Double-Muscling Locus (*mh*) in Piedmontese and Belgian Blue Cattle by Fluorescent PCR. *J. Anim. Sci.* **77**, 2028–2030.
- Fujii, J. K.; Otsu, S.; de Zorzato, L.; Khanna, V. K.; Weiler, J. E.; O'Brien, P. J.; MacLennan, D. H. (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**, 448–451.
- Georges, M.; Cockett, N. (1996): The ovine *callipyge* locus: a paradigm illustrating the importance of non-Mendelian genetics in livestock. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**, 651–657.
- Grobet, L.; Poncelet, D.; Royo, L. J.; Brouwers, B.; Pirottin, D.; Michaux, C.; Ménéssier, F.; Zanotti, M.; Dunner, S.; Georges, M. (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostation function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome* **9**, 210–213.
- Harlizius, B.; Tammen, I.; Eichler, K.; Eggen, A.; Hetzel, D. J. (1997): New marker on bovine Chromosome I are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle. *Mammalian Genome* **8**, 255–7.
- Healy, P. J. (1996): Testing for Undesirable Traits in Cattle: An Australian Perspective. *J. Anim. Sci.* **74**, 917–922.
- Ikonen, T.; Ruottinen, O.; Erhardt, G.; Ojala, M. (1996): Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new κ -casein variant. *Animal Genetics* **27**, 179–181.
- Junghans, F.; Teufel, B.; Buschmann, A.; Steng, G.; Groschup, M. H. (1998): Genotyping of German sheep with respect to scrapie susceptibility. *Veterinary Record* **143**, 340–341.
- Klungland, H.; Vage, D.; Gomez-Raya, L.; Adalsteinsson, S.; Lien, S. (1995): The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat colour determination. *Mammalian Genome* **9**, 636–639.
- Kräußlich, H.; Röhrmoser, G. (1995): Zucht einer genetisch hornlosen Linie beim Deutschen Fleckvieh. *Züchtungskunde* **67**, 15–24.
- Leyhe-Horn, B.; Koch, D.; Gaulty, M. (1998): Suitability of microsatellites BM 1329 and OarAE 101 as markers for the introgression of the *Fec^B* locus into different sheep breeds. 49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Session SB 1.15, am 24.–27. 8. 98 in Warschau/Polen.
- Manfredi, E.; Leroux, C.; Piacé, A.; Martin, P.; Elsen, J. M.; Grosclaude, F. (1998): Use of a major gene in a dairy goat selection scheme. 49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Session SA, 1.3, am 24.–27. 8. 98 in Warschau/Polen.
- Metallinos, D. L.; Bowling, A. T.; Rine, J. (1998): A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mammalian Genome* **9**, 426–431.
- Milan, D.; Jeon, J.-T.; Looft, C.; Amarger, V.; Robic, A.; Thelander, M.; Rogel-Gaillard, C.; Paul, S.; Iannuccelli, N.; Rask, L.; Ronne, H.; Lundström, K.; Reinsch, N.; Gellin, J.; Kalm, E.; Le Roy, P.; Chardon, P.; Andersson, L. (2000): A Mutation in *PRKAG3* Associated with Excess Glycogen Content in Pig Skeletal Muscle. *Science* **288**, 1248–1250.
- Prinzenberg, E.-M. (1998): Entwicklung von Gendiagnoseverfahren für seltene Milchproteinvarianten beim Rind unter Berücksichtigung des Vorkommens bei vom Aussterben bedrohten Rassen. Fachverlag Köhler, Gießen.
- Nieuwhof, G. J.; Visscher, A. H.; Engel, B.; van der Werf, J. H. J.; de Jong, F. H.; Dijkstra, M. (1998): Identification of early predictors of carriers of the Booroola gene in sheep using a mixed inheritance model. *Animal Science* **67**, 317–325.
- Prinzenberg, E.-M.; Krause, I.; Erhardt, G. (1999): SSCP analysis at the bovine *CSN3* locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (*A, B, C, E, F, G*) and three new DNA Polymorphisms (*H, I, A₁*). *Animal Biotechnology* **10**, 49–62.
- Rothschild, M.; Jacobson, C.; Vaske, D.; Tuggle, C.; Wang, L.; Short, T.; Eckardt, G.; Sasaki, S.; Vincent, A.; McLaren, D.; Southwood, O.; van der Stehen, H.; Mileham, A.; Plastow, G. (1996): The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 201–205.
- Rothschild, M. F.; Messer, L.; Day, A.; Wales, R.; Short, T.; Southwood, O.; Plastow, G. (2000): Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mammalian Genome* **11**, 75–77.
- Short, T. H.; Rothschild, M. F.; Southwood, O. I.; McLaren, D. G.; de Vries, A.; van der Stehen, H.; Eckardt, G. R.; Tuggle, C. K.; Helm, J.; Vaske, D. A.; Mileham, A. J.; Plastow, G. S. (1997): Effect of the Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Production Traits in Four Commercial Pig Lines. *J. Anim. Sci.* **75**, 3138–3142.
- Vögeli, P.; Meijerink, E.; Fries, R.; Neuenschwander, S.; Vorländer, N.; Stranzinger, G.; Bertschinger, H. U. (1997): A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors: a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **139**, 479–484.

Möglichkeiten und Grenzen der marker-gestützten Selektion



Einleitung

Mit Hilfe von populationsgenetischen Methoden konnten in den letzten 50 Jahren die Leistungen unserer Nutztiere deutlich verbessert werden. Dabei nutzen die traditionellen Selektionsverfahren vornehmlich die additiv genetischen Effekte, und die Selektionsentscheide basieren auf der Grundlage erfaßter phänotypischer Information der Eigen- oder Verwandtenleistungen. Grenzen der bisherigen Selektionsverfahren zeigen sich bei Merkmalen mit niedriger Heritabilität, bei später Ausprägung der Merkmale oder bei negativ korrelierten Merkmalen (Merkmalsantagonismen). Diese Probleme können möglicherweise durch Nutzung molekulargenetischer Informationen überwunden werden.

Die Entdeckung der genetischen Variabilität direkt auf der Ebene der DNA durch molekulargenetische Marker, hauptsächlich in Form von Mikrosatelliten eröffnen neue Möglichkeiten. Sie sind in großer Zahl auf dem Genom vorhanden und können einfach genotypisiert und bei Betrachtung mehrerer Generationen, relativ einfach kartiert werden. Mit der Kartierung und Identifizierung wirtschaftlich bedeutsamer Merkmalsloci (»Quantitative trait loci«, QTL) und der Nutzung dieser Informationen im Rahmen der marker-gestützten Selektion kann eine weitere Steigerung des Zuchtfortschrittes erreicht werden.

Obwohl der Einfluß der Molekulargenetik auf die Zuchtprogramme bei den Nutztieren noch gering

ist, ist der Forschungsaufwand beträchtlich. Auf internationaler Ebene laufen gegenwärtig umfangreiche Projekte, um QTL (Quantitative Trait Loci) in den Nutztierpopulationen genetisch zu kartieren und die Effizienz der tierischen Produktion zu beeinflussen. Sowohl die Ergebnisse beim Schwein (ANDERSSON et. al., 1994, ROTHSCILD et. al. 1999) und beim Rind (GEORGES et. al., 1995), sowie die Vielzahl der in den vergangenen Jahren publizierten Kartierungsergebnisse (z. B. ASHWELL et. al., 1996; RON et. al., 1996, 1998; SPELMAN et. al., 1996; VILKKI et. al., 1996; KÜHN et. al., 1996; MÄKI-TANILA et. al., 1998; ARRANZ et. al., 1998; DAVIS, et. al., 1998, GOMEZ-RAYA et. al., 1998; ZANG et. al., 1998) als auch die im Rahmen des laufenden ADR/BMBF-Forschungsprojektes »Genomanalyse Rind« kartierten QTL's (THOMSEN et. al. 1998) zeigen, daß dieser Ansatz erfolgreich sein kann und in Kürze eine größere Anzahl eng eingegrenzte, QTL-tragende Genomregionen zur Verfügung stehen. Tabelle 1 zeigt die in der Literatur beschriebenen QTL-Projekte, die für die Milchrinderzucht bearbeitet werden. Der Schwerpunkt der betrachteten Leistungsmerkmale liegt bei der Milchleistung. In Deutschland, USA und Frankreich wird zusätzlich die Zellzahl bearbeitet, während Finnland, Norwegen und Schweden auch Daten zur Gesundheit berücksichtigen.

Ausgewählte Ergebnisse des deutschen ADR-Genomanalyseprojektes (Tabelle 2) zeigen, daß auf verschiedenen Chromosomen QTL für die unter-

Table 1: QTL-Projekte nach dem Grand-Daughter-Design in der Milchrinderzucht

Land	Organisationen	Rasse	Familien	Söhne	Marker	Merkmale
USA	Wirtschaft und Uni Illinois	Holstein	8	1.068	174	Milchleistung Zellzahl, Exterieur
Kanada	Uni Guelph	Holstein	7	450		Milchleistung
Holland	Wirtschaft und Uni Liège	Holstein MRI ¹⁾	29	1.158	215	Milchleistung
Frankreich	INRA und Wirtschaft	Holstein	9	1.154	169	Milchleistung Zellzahl Fruchtbarkeit
		Normande	3	214		
		Montb. ²⁾	2	180		
Deutschland	ADR und Wissenschaft	Holstein	16	1.100	265	Milchleistung Zellzahl Fruchtbarkeit
		Fleckvieh	3			
		Braunvieh	1			
Finnland	Forschungs-Einrichtung	Ayrshire	11		453	Milchleistung Gesundheit
Norwegen	Wirtschaft und Uni Ås	Norweg. Rotvieh	6	285	288	Milchleistung Gesundheit
Schweden	Wirtschaft und Uni Uppsala	Schw. Rote und Weiße	13	515		Milchleistung Gesundheit

¹⁾ MRI = Maas-Rhein-Ijssel Rind

²⁾ Montbéliard

Quelle: Heyen et. al., (1999); Coopeters et. al. (1998); Vilkki et. al. (1997); Vage et. al. (2000), Boichard (2000)

suchten Merkmale der Milchleistung und Zellzahl festgestellt wurden.

Für die potentiellen, ökonomisch bedeutsamen Genomregionen, wie z. B. auf Chromosom 14 und 18, erfolgt derzeit vor der praktischen Nutzenanwendung eine sogenannte Bestätigungsstudie, d. h. von den gleichen Großvätern werden entweder andere Söhne (Testbullen) oder Töchter der Bullen selbst typisiert. Nach der Bestätigung können die QTL für die Selektionsentscheidungen genutzt werden. Allgemein kann festgehalten werden, daß der jetzige Stand der Genomkarte des Rindes mit über 1.500 Mikrosatelliten Markern und etwa 800 Genen (GELLIN et. al., 2000) den Einstieg in die markergestützte Selektion eröffnet.

2. Marker-gestützte Selektion (MAS)

Die marker-gestützte Selektion beruht auf der Kopplung von Leistungsgenen mit sogenannten genetischen Markern wie z. B. Mikrosatelliten und

Table 2: QTL aus der Analyse der Familien im ADR-Genomanalyseprojekt (Signifikanzgrenze, Zuchtwerte 1. Laktation)

Chromosomen	Zellzahl	Eiweißmenge	Fettmenge	Milchmenge
1			2 %	
2	10 %	3 %	5 %	1 %
5			1 %	1 %
6			6 %	6 %
7	5 %			
10		5 %		3 %
14		1 % ¹⁾	1 % ¹⁾	1 % ²⁾
16		3 %	8 %	6 %
17	11 %	5 %		1 %
18	1 %	5 %	10 %	5 %
19			6 %	
22				11 %
23		4 %		5 %
27	8 %			
29			11 %	
XY				7 %

¹⁾ 1 % experimentweise

²⁾ 10 % experimentweise, sonst chromosomenweise

Blutgruppen. Marker sind dabei als Markierungspunkte auf den Chromosomen zu verstehen, denen selbst keine Funktionen zugeordnet sind.

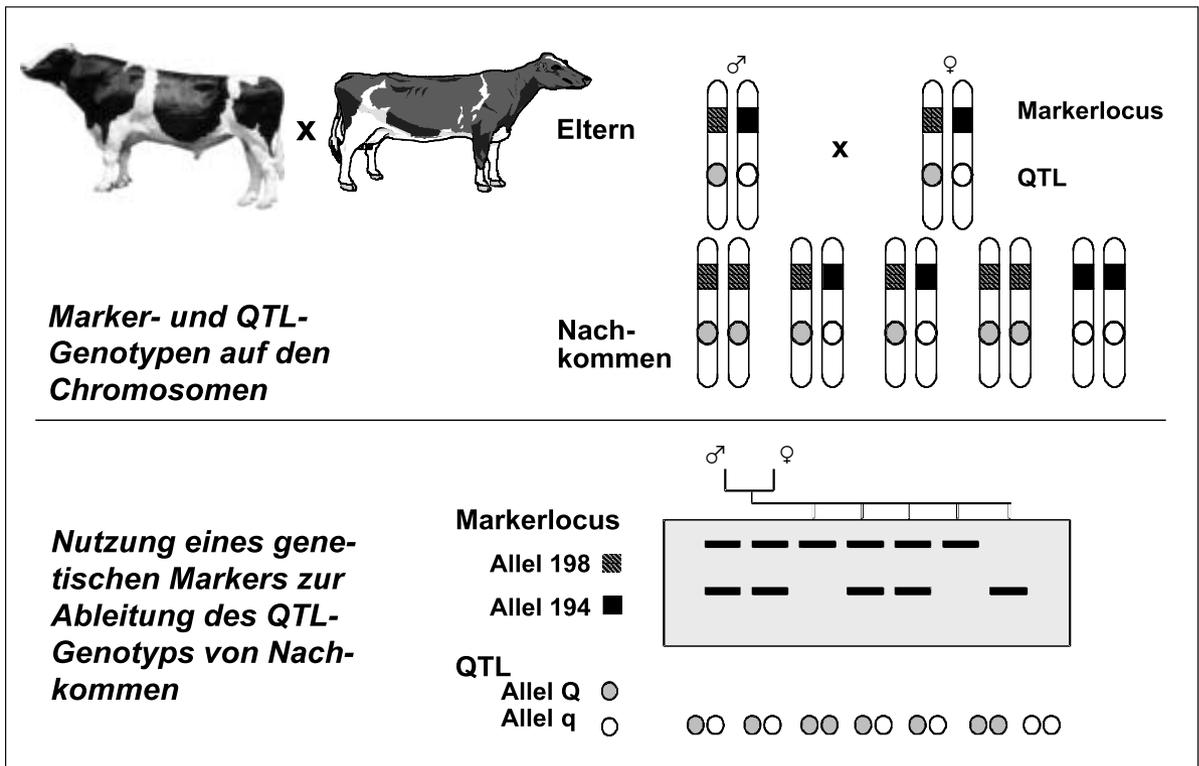
Wird ein Chromosomenabschnitt mit einem Marker gemeinsam vererbt, liegt eine Kopplung vor, so daß die Möglichkeit besteht, nach diesem Abschnitt, der mit den Markern gekoppelt ist, zu selektieren.

Abbildung 1 zeigt das Grundprinzip für die marker-gestützte Selektion. Folgende Einsatzmöglichkeiten werden bereits angewendet bzw. stehen in der Umsetzungsphase.

2.1 Marker-gestützte Selektion für rezessive Erbdefekte

Im Rahmen des ADR-Projektes wurde von der Arbeitsgruppe FÖRSTER und MEDUGORAC der Erbdefekt Weaver intensiv bearbeitet. Die Krankheit wurde 1973 erstmalig für die Rasse Brown-Swiss in den USA beschrieben und trat nach Einkreuzungsprogrammen auch beim Deutschen Braunvieh auf. Der Begriff »Weaver« bezeichnet die bovine progressive, degenerative Myeloenzephalopathie, eine Rückenmarks- und Gehirnerkrankung, die sich auf degenerative Prozesse in der weißen Substanz des Rückenmarkes zurückzuführen läßt. Die klinischen

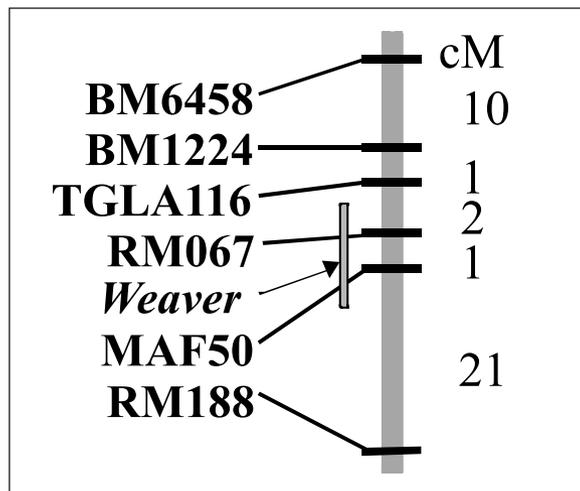
Abbildung 1: Grundprinzip der marker-gestützten Selektion



Symptome äußern sich im Alter von etwa 18 Monaten als Ataxie der Hintergliedmaßen (schwanzendes Stehen, plötzliches Einknicken beim Gehen, Festliegen im Endstadium).

In der Nähe des Weavergens, das noch nicht kartiert wurde, befindet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein QTL für Milchleistung (MEDUGORAC et al., 2000). Dies wirkte sich insbesondere auf die Verbreitung der Krankheit aus. GEORGES et al. (1993) konnten auf Chromosom 4 am Markergenort TGLA116 eine relativ enge Kopplungsbeziehung zwischen Marker- und Krankheitslocus mit 5% Rekombination nachweisen. Doch der geringe Polymorphismus schränkt eine zuverlässige Aussage ein. Umfangreiches Datenmaterial aus Bayern ermöglichte, daß 6 neue Mikrosatelliten Marker Loci einbezogen werden konnten und dadurch eine verbesserte Weaver-Diagnose möglich wurde. Die wahrscheinlichste Position des Weaver-Locus liegt in einem Bereich von etwa 3 cM zwischen TGLA 116 und RM 188 (Abbildung 2).

Abbildung 2: Ergebnis der Kopplungsanalyse für Weaver auf Chromosom 4



Quelle: Medugorac et al. 2000

Das Prinzip des Tests beruht darauf anhand der Markergenotypen eine Aussage zum Weaverstatus des Probanden zu treffen. Zu diesem Zweck wird, nachdem die Markergenotypen für den Proband und die verfügbaren Verwandten bestimmt worden sind, eine Risikoanalyse durchgeführt. Voraussetzung ist, daß ein Anlageträger im Pedigree an mindestens einem Genort heterozygot und die Kopplungsphase bekannt ist. Unter der Annahme eines rezessiven Erbganges mit vollständiger Penetranz können Genauigkeiten von etwa 85-99% für den diagnostizierten Weaverstatus ermittelt werden. Ergebnisse unterhalb der Schwelle von 85 % werden nicht berücksichtigt.

Nach MEDUGORAC et al. (2000) sollten bei der marker-gestützten Selektion gegen ungünstige oder für günstige Haplotypen mehr als 2 Marker verwendet werden. Die Erfahrungen sprechen für den Einsatz von 4 bis 6 Markern je Krankheitslocus oder QTL.

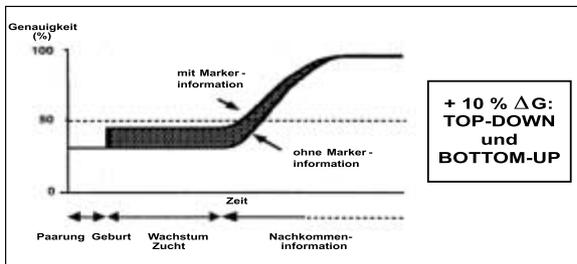
2.2 Marker-gestützte Selektion innerhalb Familien für QTL

Die Verbesserungsmöglichkeiten der Selektion durch Einbeziehung von Markern sind:

1. Verkürzung des Generationsintervalls, durch mögliche Selektion an Tieren vor deren Merkmalsausprägung z. B. Embryonen, Kälber
2. Erhöhung der Selektionsgenauigkeit durch Einbeziehung der Genominformationen, z. B. Zellzahl auf Chromosom 18
3. Erhöhung der Selektionsintensität. Durch Einbeziehung einer größeren Zahl an Tieren in die Selektion, z. B. weil die Markertypisierung je Tier wesentlich einfacher ist oder weil zwischen Tieren - Voll- oder Halbgeschwister - differenziert werden kann, die sonst alle die gleiche Information zum Selektionszeitpunkt aufweisen.

Die folgende Abbildung 3 verdeutlicht die Vorteile der Einbeziehung von Markern und deren Auswirkungen auf die Genauigkeit der Zuchtwert-

Abbildung 3: Genauigkeit der Zuchtwertschätzung unter Einbeziehung von Markern



Quelle: Denthine (1992)

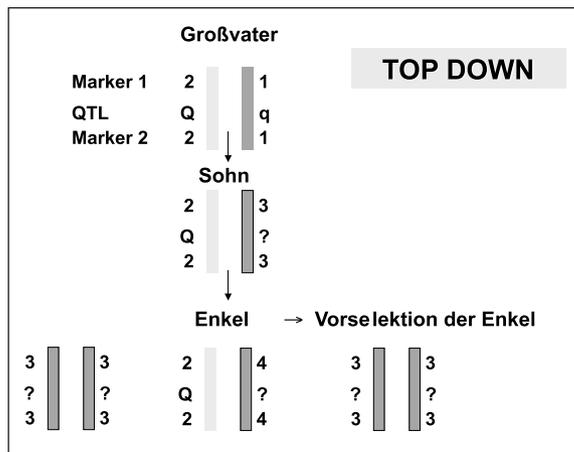
schätzung (DENTHINE, 1992). In Simulationsstudien von KASHI et.al. (1990) und MEUWISSEN und GODDARD (1996) wurde gezeigt, daß die Einbeziehung von Markerinformationen in die Selektionsentscheidung den genetischen Fortschritt nachhaltig beschleunigen kann. Für die praktische Umsetzung kommen derzeit der Top-down oder der Bottom-up-Ansatz in Frage.

Top-Down-Ansatz

Dieser Ansatz wurde von KASHI et. al. (1990) und MACHINNON und GEORGES (1998) vorgeschlagen. Mit dieser Methode kann eine Vorselektion von potentiellen Testbullen innerhalb Familien unter Nutzung von QTL-Markern und zurückliegender Generationen der Familie erfolgen. Ausgangspunkt sind Großväter (Abbildung 4) für die durch Untersuchung von Söhnen nachgewiesen wurde, daß sie an mindestens einem QTL heterozygot sind. Dabei muß im ersten Schritt überprüft werden, ob der entsprechende QTL-Bereich auch innerhalb der aktuellen Generation segregiert.

In einem zweiten Schritt können dann die männlichen Nachkommen der Söhne (die Testbullen) direkt nach der Geburt an den entsprechenden Markerloci typisiert werden. Die Testbullen, die den günstigen Markerhaplotyp aufweisen, können identifiziert und für die Weiterzucht selektiert werden. Die Selektionsintensität kann auf diesem Pfad

Abbildung 4: Ablaufschema für TOP DOWN



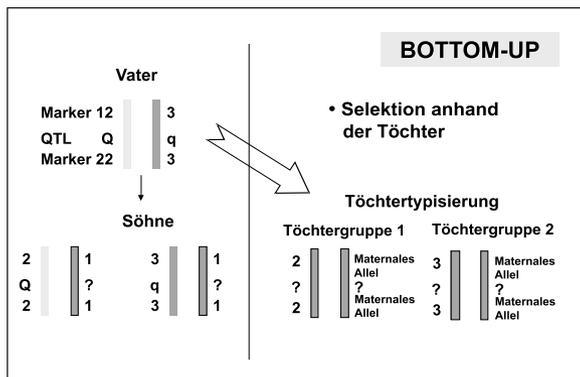
deutlich gesteigert werden, wenn ausreichend große Voll- und Halbgeschwistergruppen von Testbullen vorhanden sind.

Bottom-up-Ansatz

Im Gegensatz zum Top-Down-Ansatz, wo die Großväter den Ausgangspunkt bilden, liegt beim Bottom-up der Ausgangspunkt bei den Vätern, für die durch Untersuchung der Töchter nachgewiesen wurde, daß sie an mindestens einem QTL heterozygot sind (Abbildung 5). Gegenüber Top-Down hat diese Methode den Vorteil, daß die Überprüfung der Heterozygotie an Tieren erfolgt, die aus der aktuellen Generation kommen.

Für den Einstieg in die marker-gestützte Selektion sind die beiden Ansätze Top-down und Bottom-up geeignet. Top-Down hat eine höhere Power, und außerdem ist die Einbeziehung von Fremdbullen möglich. Für kleine Populationen wie Angler, Braunvieh und Gelbvieh ist Top Down nicht geeignet, da pro Bullenvater häufig zu wenig Söhne zur Verfügung stehen, so daß hier Bottom-up in Betracht kommen kann. Beide Methoden können je nach Ausgangslage zur Anwendung kommen.

Abbildung 5: Ablaufschema für Bottom-up-Ansatz



2.3 Zuchtwertschätzung

Das Testtags-Tiermodell wurde vor einiger Zeit für die Milchleistungsmerkmale und für die Zellzahl beim VIT in Verden eingeführt, wobei die Zuchtwerte anhand von linearen Modellen aus den Leistungs- und Abstammungsinformationen eines Tieres und seiner Verwandten als beste, lineare, unverzerrte Schätzer (BLUP-Tiermodell) ermittelt werden. Bei dem Vorliegen der Markerinformationen gilt es jetzt, die Marker als zusätzliche Informationen in BLUP-Modellen zu berücksichtigen. Dabei werden die linearen Modelle mit der Information über den markierten QTL- oder Chromosomenbereich erweitert. Entsprechende Vorschläge für die Erweiterung der Modelle in Richtung MA-BLUP (FERNANDO et. al., 1989) liegen bereits vor. Für Deutschland müssen derartige Modelle jetzt entwickelt werden. Die Modellerweiterung des jetzigen Mehrlaktations-Testtags-Tiermodells (MTDAM) könnte u. a. wie folgt aussehen:

$$Y_{ijklmno} = \text{HKT}_{im} + a_{jmt} + p_{ejm} + q_{tlo} + \text{KASRZ}_{km} + b (\text{Laktationstage/Konstante}) + e_{ijklmno}$$

Das bisherige Modell berücksichtigt HKT_{im} als fixen Herde * Kontrolltag-Effekt, a_{jmt} als zufälligen Tiereffekt (Zuchtwert), p_{ejm} den permanenten Umwelteffekt, und jetzt erfolgt die Erweiterung um

den oder die zufälligen qtl-Effekte. Die aufgeführten fixen Effekte Kalbealter * Kalbesaison * Region * Zwischenkalbezeit und die Schätzung der Laktationskurvenverläufen bleiben bestehen. Durch die Einbeziehung der genetischen Informationen der Marker werden die Modelle der Zuchtwertschätzung so verfeinert, daß sie die genetischen Grundlagen der Leistungseigenschaften besser erfassen. Dies führt zu genaueren Zuchtwerten und fördert eine verbesserte und sichere Auswahl der Anpaarungspartner für die gezielte Paarung.

Die Nutzung und Anwendung der Ergebnisse aus der Genomanalyse erfordert den Aufbau einer geeigneten Informationsstruktur. Sämtliche Informationen der Tiere, d. h. sowohl die phänotypischen Informationen als auch die molekulargenetischen, müssen für die marker-gestützte Selektion und für die Zuchtwertschätzung vorliegen, d. h. neben der bisherigen Datenbank für die phänotypischen Merkmale ist der Aufbau einer Markerdatenbank erforderlich.

3 Weiterentwicklung

Wie bereits dargestellt, werden z. Zt. in der zweiten Phase des ADR-Genomanalyse Projektes ausgewählte Chromosomenbereiche bestätigt, und die marker-gestützte Selektion wird eingeführt. Probleme bei der Umsetzung ergeben sich dadurch, daß seit Beginn des 1. Projektes 1996 weitere Bullengenerationen und auch Bullenväter/Großväter in den Zuchtprogrammen der beteiligten Organisationen vorhanden sind, von denen keine Typisierungsergebnisse vorliegen. Voraussetzung für eine Anwendung der MAS ist jedoch, daß die aufgetretenen Lücken und evtl. noch weitere wichtige Großväter für die in Betracht kommenden QTL-Regionen nachtypisiert werden müssen. Um langfristig diese Probleme zu minimieren, ist es notwendig, daß von allen Bullenvätern, Bullenmüttern und Testbullen eine Gewebe- bzw. DNA-Bank vorhanden ist.

In Frankreich konnte eine derartige Bank gerade erfolgreich für die schnelle Kartierung eines Erb-

fehlers (Bulldog-Kälber) genutzt werden. Innerhalb von drei Monaten konnte der Genort gefunden und die Selektion von Testbullen erfolgen. Der Aufbau einer Markerdatenbank analog zu den phänotypischen Leistungsmerkmalen ist unerlässlich und sollte bei den zuständigen Zuchtwertschätzstellen z. B. VIT-Verden und Grub sichergestellt werden.

Um den Aufbau einer derartigen Markerdatenbank zu forcieren, wäre es mit Sicherheit nützlich, wenn neben der Abstammungskontrolle von Bullenvätern, Fremdbullen, Bullenmüttern und Testbullen mit ca. 10 Markern noch weitere Marker (Pflichtmarker) für QTL-Regionen z. B. auf Chromosom 14 und 6 einvernehmlich vorgeschrieben würde. Die zusätzlichen Kosten für diese sogenannten Pflichtmarker sind vergleichsweise niedrig, was günstige Auswirkungen auf die Einführung und Nutzung der markergestützten Selektion haben kann. Dadurch wird die für den TOP-DOWN Ansatz notwendige Struktur automatisch aufgebaut, und gerade für häufig eingesetzte Bullen mit großem Einfluß auf die Population z. B. bei den Holsteins »Leadman« oder »Blackstar« ergibt sich eine hohe Power. Familienlücken werden vermieden, so daß ein vollständig verknüpftes Verwandtschaftsnetz einschließlich Fremdbullen aufgebaut wird. Gleichzeitig werden damit Voraussetzungen für die Einführung einer markergestützten Zuchtwertschätzung geschaffen.

Durch die Abstammungskontrolle mit Mikrosatelliten und den Pflichtmarkern können Abstammungsfehler frühzeitig erkannt und Beeinträchtigungen im Zuchtprogramm reduziert werden. Bei erfolgreicher Einführung eines sogenannten Standardmarkersatzes können mit der verfügbaren DNA bei neuen QTL auch schnell neue Marker genutzt werden, so daß eine zügige flexible Anpassung ermöglicht wird.

4 **Schlußfolgerung**

Die Genomanalyseprojekte bei den Nutztieren führten zu positiven Ergebnissen. Für die Milchrinderzucht stehen ökonomisch wichtige Chromo-

somenbereiche für die züchterische Nutzung zur Verfügung. Nach Bestätigung dieser Ergebnisse lassen sich diese für die marker-gestützte Selektion und Weiterentwicklung der Zuchtwertschätzung nutzen. Damit verbunden ist eine Erweiterung der Infrastruktur für die Nutzung der Ergebnisse aus den Genomanalyseprojekten. Die jeweiligen Rechenzentren sind dabei, die neuen Informationen in das Datenbanksystem zu integrieren. Um die Probleme bei der Umsetzung und Weiterentwicklung lösen zu können, ist eine enge Zusammenarbeit zwischen Forschung und Nutzenwendern notwendig.

Literatur

- Anderson, L., C. S. Heley, H. Ellegren, S. A. Knott, M. Johansson et al. (1994): Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs *Science* **263**, 1771-1774.
- Ashwell, M. S., C. E. Rexroad jr., R. H. Miller und P. M. van Raden (1996): Mapping economic trait loci for somatic cell score in Holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. *Animal Genetics* **27** (4), 235-242.
- Arranz, J. J., W. Coppieters, P. Bezi, N. Cambizano, B. Grisart, L. Karim, J. Riquet, P. Simon, P. Vannanshoven und M. Georges (1998): Confirmation of a QTL affect milk production in bovine chromosome 20. *Proc. 6. WGLAP*, Vol. **26**, 285-288.
- Boichard, D. (2000): persönliche Mitteilungen.
- Coppieters, W. A., Kvasi, J., J. Arranz, B. Grisart, J. Riquet et al. (1998): The grand²-daughter design: a simple strategy to increase the power of the grand-daughter design (submitted).
- Davis, G. P., D. J. C. Hetzel, N. J. Corbet, S. Scacheri, S. Lowden, J. Renaud, C. Mayne, R. Stevenson, S. S. Moore K. Byrne (1998): The mapping of quantitative trait loci for birth weight in tropical beef herd. *Proc. 6. WGLAP*, Vol. **26**, 441-444.
- Denthine, M. R. (1992) Marker-Assisted-Selection in cattle. *Anim. Biotechnology* **3**, 81-93.
- Fernando, R. L., M. Grossmann (1989): Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Gent. Sel. Evol.* **21**, 467-477.
- Gellin, J., S. Brown, J. A. Marshall Graves, M. Rothschild, L. Schook, J. Womack, M. Yerie (2000): Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animal. *Mammalian Genome* **11**, 140-144.
- Georges, M. D., M. Nielsen, A. Mackinnon, A. Mishra, R. Ohemoter et al. (1995): Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* **139**, 907-920.
- Georges, M., A. B. Dietz, A. Mishra, D. Nielsen, L. S. Sargeant, A. Sorensen, M. R. Steele, X. Zhao, H. Leipold, J. E. Womack, M. Latrop (1993): Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. **90**, 1058-1062.

- Gomez-Raya, L., H. Klungland D. I. Vage, I. Olsaker, E. Fimland, G. Klemsdal, K. Rønningen, S. Lien (1998): Mapping QTL for milk production traits in Norwegian Cattle. *Proc. 6. WCGGLAP*, Vol. **26**, 429–432.
- Heyen, D. W., J. I. Weller, M. Ron, M. Band, J. E. Beever, E. Feldmesser, Y. Da, G. R. Wiggans, P. M. Vanrhaden, H. A. Lewin (1999): A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics* **1**, 165–175.
- Kashi, Y., E. Hallermann, M. Soller (1990): Marker assisted selection of candidate bulls for progeny testing programmes. *Animal Production* **51**, 63–74.
- Kühn, Ch., R. Weikard, T. Goldammer, S. Grupe, I. Olsaker, M. Schwerin (1996): Isolation and application of Chromosom 6 specific mikrosatellite markers for detection of QTL for milk production traits in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* **113**, 355–362.
- Mäki-Tanila, A., D. J. de Koning, K. Elo, S. Moisiv, R. Velmala, J. Vilkki (1998): Mapping of multiple quantitative trait loci by regression in half-sib designs. *Proc. 6. WCGGLAP*, Vol. **26**, 269–272.
- Mackinnon, M. J., M. A. J. Georges (1998): Marker-assisted preselection of young dairy sires prior to progeny-testing. *Livestock production Science* **54**, 227–248.
- Medjugorac, I., H. Thomsen (2000): Systematische Erstellung einer informativen Datenstruktur. Anwenderseminar »Genomanalyse« am 2. und 3. Mai 2000 in Kassel.
- Meuwissen, T. H. E., M. E. Goddard (1996): The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet. Sel. Evol.* **28**, 161–176.
- Rothschild, M. F., G. S. Plastow (1999): Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*, **1**, 1–7.
- Ron, M., D. W. Heyen, J. I. Weller, M. Band, E. Feldmesser, H. Pasternak, Y. Da, G. R. Wiggans, P. M. Vanraden, E. Ezra, H. A. Lewin (1998): Detection and analysis of a locus effecting milk concentration in the U.S. and Israeli dairy cattle population. *Proc. 6. WCGGLAP*, Vol. **26**, 422–428.
- Spelman, R. J., H. Bovenhuis (1998): Moving from QTL experimental results to the utilisation of QTL in Breeding Programmes. *Animal Genetics* **29**, 77–84.
- Thomsen, H., N. Xu, N. Reinsch, C. Looft, E. Kalm, S. Grupe, C. Kühn, G. A. Brockmann, M. Schwerin, B. Leyhe, S. Hiendleder, G. Erhardt, I. Medjugorac, I. Russ, U. Förster, B. Brenig, F. Reinhardt, R. Reents, G. Averdunk, S. Blümel (1998): Kartierung von QTL für Milchleistungsmerkmale im ADR-Genomanalyseprojekt. Vortragstagung der DGfZ und GfT, 23./24. September 1998, Berlin-Charlottenburg
- Vage, D. I., I. Olsaker, H. Klungland, L. Gomez-Raya, S. Lien (2000): A male genetic linkage map designed for quantitative trait loci mapping in Norwegian cattle. *Acta Agriculture Scandinavica Animal Science* **50**, 56–63.
- Vilkki, J., K. Elo, R. Velmala, M. Hinkatukia, Mäki-Tanila (1996): Multiple marker mapping of QTL on six chromosomes in dairy cattle. 47th EAA, Lillehammer, Norway, Genetic Session III.
- Zhang, Q., D. Boichard, I. Hoeschele, C. Ernst, A. Eggen, B. Murkve, M. Pfister-Genskow, L. A. Witte, F. E. Grignola., P. Uimari, G. Tallar, M. D. Bishop (1998): Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbreed pedigree. *Genetics* **149**, 1959–1973.

Optimierung der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen durch Genomveränderung



1 Einleitung

Wie bereits die ersten Gentransferversuche beim Nutztier zeigten, ist ohne hinreichende Kenntnis der genetischen Grundlagen der Zielmerkmale keine effiziente Optimierung durch Genommanipulation möglich. Die Methode »Versuch und Irrtum« ist beim Nutztier zu aufwendig. Es werden keine neuen Daten präsentiert und diskutiert, sondern alte und neue Konzeptionen und Strategien.

»Finding Wood among Trees

Part of the trouble is, that excitement of the chase (of molecular causes) leaves little time for reflection. And there are grants for producing data, but hardly any for standing back in contemplation.«

Maddox, 1988

2 Tier- und Pflanzenzucht als Basis grundlegender Konzeptionen der Biologie

Mendel's Kreuzungsexperimente basieren auf den Kenntnissen und Erfahrungen der Pflanzenzüchter seiner Zeit. Seine Versuchsplanung beweist, daß ihm die genetischen Prinzipien von Reinzucht und Kreuzung von vorne herein klar waren. Die Biotechnik künstliche Befruchtung ermöglichte eine exakte Versuchsdurchführung.

Darwin war von den Zuchterfolgen der englischen Tierzüchter beeindruckt. Er folgerte von der künstlichen Evolution auf die natürliche Evolution.

Da die Selektionserfolge in Tier- und Pflanzenzucht ausschließlich auf der vertikalen Übertragung

von Genen beruhen, schloß Darwin, daß die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen allen lebenden und ausgestorbenen Organismen, die je die Erde besiedelten, in einem einzigen Stammbaum dargestellt werden können. Woese (1998) verwendete die RNA der Ribosomen als Meßlatte für evolutive Distanzen. Dies ermöglichte es, die Darwin'sche Hypothese zu testen. Woese kam zu dem Ergebnis, daß diese Hypothese zu einfach ist. Der vor allem im unteren Bereich des Stammbaumes des Lebens verbreitete horizontale Genaustausch ergibt einen molekularen Stammbaum mit einem ausgedehnten Netzwerk von Verbindungen zwischen den Ästen, das eher an ein Pilzgeflecht als an einen Baum erinnert. Der molekulare »Stammbaum« wurzelt nicht in einer einzigen Urzelle, aus der die drei großen Urreiche des Lebens hervorgehen, sondern hat mehrere Wurzeln (Doolittle, 2000). Die molekulare Phylogenie macht es auch verständlich, warum trotz der über 10.000jährigen Geschichte der Tierzucht keine neue Arten entstanden.

3 Leistungszucht und die Folgen

3.1 Zum Zuchtfortschritt

Für Zuchtzielmerkmale mit hoher und mittlerer Heritabilität werden befriedigende Zuchtfortschritte erzielt. Dies ist nicht der Fall für Merkmale mit niedriger Heritabilität sowie für Merkmale, die über Leistungsprüfungen nicht bzw. nicht genau genug oder nur mit sehr hohem Aufwand erfaßt werden können. Dies gilt in gewisser Hinsicht auch für geschlechts-

begrenzte Merkmale. Die genetische Korrelation zwischen den Zuchtzielmerkmalen und den oben genannten »schwierigen« Merkmalen sind entweder nicht bekannt oder sehr ungenau. Dies hat zur Folge, daß unerwünschte Nebenwirkungen der Selektion unvermeidbar sind. Die Ergebnisse von Rauw et al. (1998) zeigen, daß je einseitiger und effizienter die Selektion ist, desto schwerer sind die unerwünschten Nebenwirkungen. Ein extremes Beispiel ist die Selektion auf Wachstumsrate und Bemuskelung bei Masthähnchen. Sie wurde im Vergleich zu Hähnchen aus Legelinien vervierfacht; die Ausfälle aufgrund von Skelettanomalien, Asziten, Herzversagen stiegen entsprechend an (Rauw et al., 1998).

Luiting (1993) befürchtet, daß sich diese Entwicklung noch beschleunigen wird: »Speeding up genetic increase, e. g. with application of modern DNA-technology in a biological system that is not well understood is very likely to lead to unfavourable and improperly understood effects, if not disorders.« Aus der Sicht des Autors gehört es derzeit zu den wichtigsten Aufgaben der Tierzuchtwissenschaft, diesen circulus vitiosus zu durchbrechen.

3.2 Zum Selektionsplateau

Das nach der Theorie der Quantitativen Genetik bei intensiver Langzeitselektion zu erwartende Selektionsplateau (Falconer, 1960) ist bisher in der Nutztierzucht nicht erreicht worden. Flock (1999) berichtet, daß die HNL-Legelinien über mehr als 50 Generationen ohne Zufuhr genetischer Varianz durch Einkreuzung als geschlossene Populationen selektiert wurden. Die genetische Varianz innerhalb Linien ist aber keineswegs erschöpft.

Wright (1941): »Evolution selects not single genes but genetic interactions.«

3.3 Zur Anpassungsfähigkeit von Hochleistungstieren an schwankende Umweltbedingungen

Das Problem ist alt und ungelöst, wie schon die verschiedenen Begriffe zeigen, mit denen es be-

zeichnet wurde bzw. wird: Konstitution, Fitness, Homeostasis, Pufferkapazität etc. Preisinger und Kühne (1999) planen Legehennenlinien mit hohem bzw. sehr hohem Leistungsniveau auf Anpassungsfähigkeit an verschiedene Fütterungs-, Haltungs- und Managementsysteme zu prüfen und anschließend zu selektieren. Bateman (1971) selektierte Mäuse, die mit verschiedenen Futterrationen getestet wurden auf hohes Wachstum. Die Selektionslinie, die mit einer Futterration getestet wurde, die das Wachstum stimuliert, war wesentlich empfindlicher gegen Umweltschwankungen als die Linie in einer Testumwelt, die das Wachstum verzögert. Da in der Tierzucht die erstgenannte Strategie in Stationsprüfungen und in Hochzuchtbetrieben üblich ist, ist es notwendig, diese Frage mit molekularen Analysen zu klären.

4 Molekulare Analyse der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen

4.1 Beziehungen zwischen Genotypen und Merkmalen

Das Ziel der molekularen Analysen sollte sein, die Beziehungen zwischen Genotypen und Leistungsmerkmalen unter Berücksichtigung unerwünschter Nebenwirkungen besser vorauszusagen als dies mit populationsgenetischen Parametern, die auf Heritabilitätsschätzungen basieren, möglich ist. Wenn dies gelingt, steigt die Selektionsgenauigkeit und wird eine gezielte und effiziente Genommanipulation (genetic engineering) möglich.

Die klassische Analyse der genetischen Grundlagen von Merkmalen schließt von Phänotyp auf den Genotyp. Die Kenntnis aller Sequenzen eines Genoms ermöglicht den Schluß vom Genotyp auf den Phänotyp. Die in Genomanalyseprogrammen entdeckten »open reading frames«, das sind die DNA-Sequenzen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Proteine kodieren, ermöglichen es, Aminosäuresequenzen bisher unbekannter Proteine vorauszusagen. Über die Klonierung codierender Sequenzen in Expressionsvektoren können ausreichende

Mengen der relevanten Proteine für analytische Zwecke erzeugt werden. Darüber hinaus können natürliche und induzierte Mutationen in Modellorganismen studiert werden.

Proteine sind die Arbeitspferde biologischer Systeme. Sie sind deshalb von entscheidender Bedeutung für die Analyse der Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp. Aber auch die vollständige Kenntnis der DNA-Sequenzen eines Organismus ermöglicht es nicht herauszufinden, wo und wie lange eine codierende Sequenz an- oder abgeschaltet wird. Letzteres ist für Evolutions- und Züchtungsforschung von entscheidender Bedeutung, da in der Regel durch evolutive bzw. züchterische Veränderungen nicht in erster Linie das Inventar an Proteinen vergrößert, sondern die Expression der Gene moduliert wird. Die Kluft zwischen Phänotyp und Genotyp kann deshalb nur dann überbrückt werden, wenn hinreichende Kenntnisse über die Funktionen der Proteine auf der Ebene der Zelle und über die Funktionen der Zellen auf der Ebene des Organismus vorhanden sind (Brenner, 2000).

4.2 Die Bedeutung der Redundanz

Der Befund, daß bei etwa 40% der Gene, die experimentell ausgeschaltet wurden (Ablation, knockout), keine phänotypische Veränderung gefunden wird, ist eine der größten Überraschungen der Genomforschung (Wolfe, 2000). Nach der Theorie der klassischen Genetik wird die Funktion des ablatierten Gens von einem Suppressorgen übernommen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, daß keines der Gene notwendig ist (alle beteiligten Gene sind lediglich hinreichend), solange ein Gen aktiv ist (Redundanz).

4.3 Zu den Methoden und Konzeptionen der Funktionellen Genetik

In der Funktionellen Genetik wurde neben dem klassischen Gen-zu-Gen-Ansatz ein ganzheitlicher Ansatz auf der Basis von »micro-arrays« bzw. »gene chips« etabliert (Übersicht 1). Das zugrunde liegende Konzept geht davon aus, daß der Beitrag von

Übersicht 1: Ebenen der Analyse genetischer Grundlagen tierischer Leistungen

Ebene	Ziel	Literatur
DNA Genom	Markerkarten Typ I, Typ II Typ III (QTL) (QTN)	Tanksley, 1993 Boguski, 1999
m RNA Transkription	m RNA-Expressions- karten Differenzielle Expressionsanalyse	Brown und Botstein, 1999 Schalkwyk et al., 1999 Oliver, 2000
Protein Proteom	Protein Expressions- karten Zell-Kartierung- Proteomics (Protein-Protein- Wechselwirkungen)	Blackstock und Weir, 1999 Uetz et al., 2000 Emilii und Cagney, 2000
Biochemie Metabolom	Analyse komplexer metabolischer Netzwerke	Schuster et al., 2000
Zellbiologie Module	– Reduktion bio- logischer Phänomene auf das Verhalten von Molekülen – Modul = diskrete Einheit, die getrennt von anderen Modulen analysierbar ist – Interaktionen zwischen Modulen	Hartwell et al., 1999

Genprodukten zur Merkmalsbildung nicht aus der Summierung linearer Abfolgen ermittelt werden kann, da Interaktionen zwischen mehreren biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen. Das »array format« (chip) ermöglicht es Interaktionen zu erkennen. Auf dem »chip« wird die Identität einer großen Zahl von individuellen Elementen (mRNAs, Proteine bzw. Proteinteile) in einem Durchlauf identifiziert. Endziel ist es, alle Gene eines Organismus auf einem »chip« zu positionieren. Diese Analysen ermöglichen eine ganzheitliche Analyse der Genexpression in spezifischen Zellen. Für die Expression einzelner Gene wird aber nicht die Präzision erreicht wie bei den klassischen Methoden (»libraries«).

4.4 Der Schluß vom Modelltier zum Nutztier: Möglichkeiten und Grenzen

J. Monod: »What is true for escherichia (coli), that is true for the elephant.« Dies gilt für alle fundamentalen biologischen Prozesse. Für tierzüchterisch relevante Prozesse, wie z. B. die Milchbildung und ihre Variation, gilt der Aphorismus von H. Karg: »Die Kuh ist keine gehörnte Ratte.« Deshalb wird die Experimentelle Tierzucht am Nutztier trotz der Bedeutung des vergleichenden Ansatzes nicht überflüssig, sondern viel wichtiger als in der von der Populationsgenetik geprägten Tierzucht.

5 Züchterische Strategien für molekulare Analysen beim Nutztier

5.1 Strategien bei der Maus

Die Maus ist für die Tierzucht nicht nur ein wichtiges Modell bei der vergleichenden Genkartierung, sondern auch für züchterische Strategien (Übersicht 2). Der grundlegende Unterschied ist, daß in der Mäusegenetik die genetische Variation zwischen isogenen Linien genutzt wird, in der Tierzucht aber die genetische Variation zwischen und innerhalb Herdbuchpopulationen. Die Ergebnisse beim Modelltier Maus zeigen, wie wichtig bei der molekularen Analyse die Berücksichtigung des »genetic background« ist. Zudem ist die Genauigkeit der Messung der Phänotypen von entscheidender Bedeutung für das Auflösungsvermögen molekularer Analysen, was in der Tierzucht noch unterschätzt wird.

5.2 Potentielle Strategien beim Milchrind

5.2.1 Grenzen der Populationsanalyse

Die Detektion von QTLs erfolgt beim Rind im Gegensatz zum Schwein über Populationsanalysen, meist nach dem »Granddaughter design« (GDD). Nach Boichard (2000) liegen die Konfidenz-Intervalle der QTL-Lokationen in der Regel zwischen 30–40 cM und immer über 20 cM. Erfolgreiche Feinkartierungen werden deshalb auch in den nächsten Jahren Ausnahmen bleiben. Alternative Strategien

Übersicht 2: Züchterische Strategien für molekulare Analysen (Modelltier Maus)

Founderpopulationen:	F1 aus ausgewählten isogenen Linien: Alle Linien beginnen mit F1 Tieren
Kopplungsstudien in »gefrorener« F2:	Recombinant inbred strain (RIS): 20 Generationen Inzucht
Feinkartierung:	Recombinant Congenic strain (RCS): Spezifisches Segment der Donorlinie im »genetic background« der Rezipientenlinie; über 10 Generationen markergestützte Rückkreuzung mit der Rezipientenlinie
Feinkartierung: Analyse additiver und epistatischer QTL-Effekte	Chromosome Substitution Strain (CSS): Markergestützte Rückkreuzung wie für RCS, aber vollständiges Chromosom der Donorlinie im »genetic background« der Rezipientenlinie
Funktionelle Studien: Effekt eines Kandidatengens in konstantem »genetic background«	Coisogenic Strain: Horizontaler Transfer von Kandidatengenen in coisogene bzw. isogene Linien

wie »Identity by Descent« (IBD) und »Linkage Disequilibrium« werden diskutiert. Populationsanalysen haben grundsätzliche Probleme, weil die Merkmale in der Regel nicht mit ausreichender Präzision gemessen werden können und die Umweltbedingungen zu stark variieren. Die Erfahrungen in der Mausgenetik zeigen, daß es eine Illusion ist zu glauben, die genetischen Grundlagen quantitativer Merkmale ohne präzise Charakterisierung und Messung der Phänotypen aufklären zu können. Bisher wurden in der Tierzucht nur QTL-Marker für Merkmale mit hoher Heritabilität – in der Milchleistung wird dies über große Töchtergruppen möglich – gefunden. Für Merkmale mit hoher bis mittlerer Heritabilität werden aber in den klassischen Zuchtprogrammen bereits befriedigende Zuchterfolge erzielt. Die Gefahr ist zudem, daß eine weitere Steigerung die unerwünschten Nebenwirkungen erhöht (Luiting, 1993). Der Versuch, für das Merkmal »longevity« QTLs zu entdecken, scheiterte (Zhang et al., 1998), da dieses Merkmal zu allgemein und zu ungenau definiert wird (Boichard, 2000). Freyer und Erhardt (2000) fanden in einer Simulationsstudie keine signifikanten Differenzen bezüglich der

Lebensdauermerkmale, die durch Selektion auf den reinen Zuchtwert bzw. durch markergestützte Selektion (Casein-Locus) verursacht werden.

5.2.2 Strategien mit Expressionsstudien

Potentielle Methoden sind u. a. mRNA »Differential Displays«, substraktive DNA-Banken, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). Diesen Expressionsstudien liegt die Annahme zugrunde, daß Gene, die am gleichen biologischen Prozeß wirken, ähnliche Expressionsprofile bzw. -muster zeigen. So ist z. B. zu erwarten, daß Gene, die für die Milchsekretion wichtig sind, in der Hochlaktation besonders hoch reguliert werden. Über »Differential Displays« können Unterschiede zwischen Expressionsraten unter verschiedenen Bedingungen festgestellt werden, wie z. B. verschiedene physiologische Zustände, verschiedene Umweltbedingungen (z. B. Futterrationen), verschiedene genetische Herkünfte. Die Kenntnis der Gene, die jeweils auf- bzw. ab-reguliert werden, ermöglicht Rückschlüsse auf die genetischen Grundlagen der untersuchten Merkmale.

5.2.3 Strategien mit identischen Zwillingen

Brem (1986) entwickelte und diskutierte Modelle zur Nutzung von Embryotransfer-Mikrochirurgie (ET-MC) für tierzüchterische Analysen, insbesondere auf der Ebene von Varianzkomponenten. Auf der molekularen Ebene sind diese Modelle von noch wesentlich größerer Bedeutung. Ein entscheidender Vorteil von ET-MC ist, daß die Bereitstellung identischer Zwillingspaare sowohl zahlenmäßig als auch zeitlich im voraus geplant und termingerecht durchgeführt werden kann. Neben identischen Zwillingen können auch Vollgeschwister und mütterliche Halbgeschwister planmäßig erstellt werden. Die Bedeutung isogener Tiere für molekulare Analysen wurde bereits am Beispiel Mäusegenetik diskutiert. McGregor (2000) betont die Bedeutung humaner identischer Zwillinge für molekulare Analysen. Die Möglichkeiten in der Tierzucht sind um ein Vielfaches höher als in der Humangenetik und werden trotzdem kaum genutzt.

5.2.4 Fluktuierende Asymmetrie

Nach Parsons (1992) ist fluktuierende Asymmetrie ein Monitor für umweltbedingten und biologischen Streß und damit für die Pufferkapazität des Organismus. Waddington (1957) und Leamy (1984) zeigten, daß erhöhte fluktuierende Asymmetrie ein Zeichen für erniedrigte Homeostasis ist. Die Kriterien für das Monitoring sind Unterschiede zwischen Meßwerten auf der rechten und linken Seite eines bilateralen symmetrischen Organismus. Yang und Siegel (1998) verglichen in Reinzuchtlinien und deren reziproken Kreuzungen der Rasse Weiße Leghorn die Schenkellänge am Tag 39 sowie Länge und Gewicht der Primärflügel Federn. Bei den Kreuzungen waren die Summen bilateraler Asymmetrien niedriger als bei Reinzuchtlinie, woraus auf negative Heterosis und damit höhere Fitness geschlossen werden kann. Milborrow (1998) schlägt einen molekularen Mechanismus für Heterosiseffekte bei Wachstum vor. Danach wird die Regulation des Wachstums verbessert, wenn Hybriden zwei verschiedene Allele für Wachstumsfaktoren tragen.

5.2.5 Futteraufnahme und Energiebilanz in der Hochlaktation

Die Deckung des durch den Zuchtfortschritt in der Laktationsleistung verursachten erhöhten Energiebedarfes erfolgt nach Veerkamp (2000) im Durchschnitt zu 50 % durch erhöhte Futteraufnahme und zu 50 % durch Mobilisation von Körperreserven. Es gilt: Je höher der Anteil der Futteraufnahme ist, desto geringer sind die Probleme durch Stoffwechselerkrankungen (robustere Kuh).

Truckenbrodt et al. (2000) untersuchten in 5 Kibutz-Herden (770 Kühe) mit einer Durchschnittsleistung von 11.000 kg die Interaktion zwischen Ernährung und Genotyp. Für die Abnahme der Körperkondition (festgestellt durch Body Scoring) schätzten sie Heritabilitäten zwischen 26 % und 32 % und für die Zunahme zwischen 13 % und 19 %. Diese Heritabilitäten ermöglichen die Berücksichtigung der Abnahme der Körperkondition im Selektionsindex. Die Umsetzung in die Praxis scheidet meist

an der objektiven und genauen Durchführung von »Body Scoring« in den Betrieben und den schwankenden Futterrationen innerhalb und zwischen Betrieben.

Zusätzlich ist eine ausgewogene Energieverteilung im Körper von wesentlicher Bedeutung. Panicke et al. (2000) fanden für den Glukosetoleranztest (Reaktion von Insulin) Heritabilitäten zwischen 16 % und 28 % bei Jungbullen. Im 3. Jahr wurden mittlere Korrelationskoeffizienten (um 0,5) zwischen Nachkommen-Milchwerten und Glukose-Toleranz-Test-Parametern gefunden.

5.2.6 Interaktion zwischen Ernährung und Genexpression (Modell Maus)

Lee et al. (1999) untersuchten den Einfluß der Alterung auf die Genexpression, sowie die Veränderung dieses Einflusses bei kalorischer Restriktion der Futteraufnahme. Die Probeentnahmen erfolgten im musculus gastrocnemius im Alter von 5 Monaten (adult) und 30 Monaten (alt). In der Versuchsgruppe wurde die kalorische Futteraufnahme ab einem Alter von 2 Monaten auf 76 % der »Normalgruppe« reduziert. Die Expressionsprofile wurden mit »high density oligonucleotide arrays«, die 6347 Gene repräsentieren, erstellt. In Übersicht 3 werden unter »Aging« nur die Veränderungen aufgeführt, die bei erhöhter (†) bzw. erniedrigter (‡) Expressionsrate mindestens den zweifachen Wert der adulten Gruppe erreichen. Für die Gruppe »Caloric Restriction« liegen die entsprechenden Grenzwerte beim 1,8fachen bzw. 1,6fachen Wert der adulten Vergleichsgruppe. Die Autoren gehen davon aus, daß der hormonale Auslöser für diese ernährungsbedingten Erhöhungen bzw. Senkungen der Expressionsraten Veränderungen im »insulin signaling pathway« sind, die durch erhöhte Expression von Genen, die die Insulinempfindlichkeit regulieren, entstehen.

Hart et al. (1978) fanden bei Hochleistungskühen signifikant niedrigere Insulin-konzentrationen im Plasma als bei Kühen mit niedriger Leistung. Die

Übersicht 3: Alters- und fütterungsbedingte Veränderungen der Genexpression (Modelltier Maus)

Aging	Caloric restriction
† Stress response Induction of: Heat shock response DNA damage-inducible genes Oxidative stress-inducible genes	† Protein metabolism Increased synthesis Increased turnover † Energy metabolism Up-regulation of gluconeogenesis, and the pentose phosphate shunt
‡ Energy metabolism Reduced glycolysis Mitochondrial dysfunction	† Biosynthesis Fatty acid synthesis Nucleotide precursors
† Neuronal injury Reinnervation Neurite extension and sprouting	‡ Macromolecular damage Suppression of Inducible heat shock factors Inducible deoxification systems Inducible DNA repair systems

Lee et al., 1999

Folge ist, daß bei der Hochleistungskuh die Glukoseaufnahme in Leber, Muskulatur und Fettgewebe erniedrigt wird, was die Glukoseverfügbarkeit für die Milchbildung erhöht. Die »Differentielle Expressionsanalyse« eröffnet Möglichkeiten, um diese Zusammenhänge aufzuklären und Schlußfolgerungen für die Selektion bzw. Genommanipulation zu ziehen.

6 Genommanipulation (Genetic Engineering)

6.1 Definition von »genetic engineering« Pflanzenzucht (Chris und Shauna, Somerville, 1999)

»Knowledge of the function of all plant genes, in conjunction with further development of tools for modifying and interrogating genomes, will lead to development of a robust genetic engineering discipline in which rational changes can be designed and modeled from first principles.«

6.2 Genommanipulation in der Nutztierzucht

6.2.1 Perspektiven

Nach Brem (1999) ist es wenig aussichtsreich, klassische quantitative Merkmale wie Milchleistung,

Mast und Schlachtleistung etc. via Gentransfer zu ändern, da hier bereits die klassische Tierzucht befriedigende Zuchtfortschritte erzielt. Sobald transgene bzw. transchromosomale Nutztiere effizient und routinemäßig erzeugt werden können (Brem, 1993), wird die Optimierung von Lebensmitteln tierischer Herkunft für spezifische Ernährungsbedürfnisse des Menschen (vom Kleinkind bis zum Greis) möglich. Übersicht 4 enthält einige Perspektiven für funktionelle Lebensmittel aus der Milch transgener Populationen (Schrezenmeier, 1998).

Grundvoraussetzung für den effizienten, routinemäßigen Einsatz der Genommanipulation beim Nutztier sind hinreichende Kenntnisse der zugrunde liegenden biologischen Prozesse. Die Prüfung relevanter Gen- bzw. Chromosomen-konstrukte (Genkassetten) erfolgt zuerst in der Maus. Ein interessantes Beispiel ist die Ablation des α -Laktalbumins in der Maus (zitiert nach Bawden und Nicholas, 1999). In der Milch der Mäuse mit deletiertem α -Laktalbumin-Gen war keine Laktose nachzuweisen, die Viskosität der Milch stieg jedoch so stark an, daß nur noch geringe Milchmengen gewonnen werden konnten. Das Experiment war somit eine eindrucksvolle Bestätigung der Bedeutung der Laktose für die Regulation der Milchmenge im Euter. Nach Schrezenmeier (1998) ist die Deletion folgender bekannter allergenen Sequenzen technisch

denkbar: α S1-Casein (Peptid CN-2), β -Lactoglobulin (β -LG (f97-108)) und von α -Lactalbumin (α -LA (f17-58), (f109-123)). Bei β -Lactoglobulin dürfte die Elimination des gesamten Proteins möglich sein. Es fehlt in der Milch der Frau und ist für die Milchsekretion in der Kuh nicht notwendig.

6.2.2 Nutritional Genomics

Die aussichtsreichsten Anwendungsmöglichkeiten der Genommanipulation dürften im Bereich »Nutritional Genomics« liegen. Bei Nutzpflanzen ist dies bereits ein Schwerpunkt in Forschung und Entwicklung. Wenn sich diese Entwicklung im grünen Bereich durchsetzt und auch vom Konsumenten akzeptiert wird, ist zu erwarten, daß sie im roten Bereich weitergeht. Da Forschung und Entwicklung beim Nutztier wesentlich mehr Zeit benötigt als bei der Pflanze und auch Patente eine große Rolle spielen werden, wird nur der Erfolg haben, der rechtzeitig beginnt.

6.2.3 Erhöhung des Anteils wertvoller Milchbestandteile

Das australische Projekt zur Erhöhung des Kaseingehaltes der Milch via Transgenese (Zuelke, 2000) wird wie folgt begründet: Transgenese lohnt sich für Merkmale, die den Wert der Rohmilch signifikant erhöhen und der milchverarbeitenden Industrie einen höheren Gewinn sichern; Australien exportiert z. Zt. Milchprodukte im Wert von 1,58 Mrd. Dollar, das entspricht 2/3 der jährlichen Milchproduktion; Kasein ist der wertvollste Milchbestandteil und zugleich der wichtigste Bestandteil der Exportprodukte. Ziel des Projektes ist, den Anteil des Gesamtkaseins in der Milch zu erhöhen, bei Erhaltung der natürlichen Anteile der Kaseinkomponenten.

6.2.4 Anwendung in der Experimentellen Tierzucht

Kurz- und mittelfristig wird die Genommanipulation in der Experimentellen Tierzucht die größte Bedeutung haben. Über das konditionale »gene targeting« können auch beim Nutztier wählbare und

Übersicht 4: Perspektiven der Produktion funktioneller Lebensmittel aus der Milch transgener Rinder

Reduktion/Eliminierung von Inhaltsstoffen	Funktionelle Verstärkung
- Laktosegehalt	- Proteinwertigkeit
- Phenylalaningehalt	- antimikrobielle
- Diabetogene Substanzen (evtl. Teilsequenzen)	- immunmodulierende
- Fett (Gesamtfett, gesättigte Fette)	- Darmreifung induzierende
	- Blutdruck regulierende
	- Calciumaufnahme fördernde

Schrezenmeier, 1988

- Experimentelle Tierzucht
Klassisches und konditionales »gene targeting« zur kausalen Analyse der Wirkungen von Kandidatengenen.
- Leistungsmerkmale
Erhöhung des Kaseingehaltes der Milch durch Transgeneseis. Australisches Projekt (Zuelke, 2000)
- Nutritional Genomics
Grundlagen: Biochemie, Genomics, Humanernährung
- Molekularbiologisches Modell der Tierzucht:
Ersetzt in der Zukunft das populationsgenetische Modell
- Neue Vermarktungsstrukturen
Notwendig, wenn »Nutritional Genomics« beim Nutztier akzeptiert wird. Vertikale Integration vom Produktionsbetrieb bis zum Ladentisch.

gezielte genetische Veränderungen in allen Entwicklungsstadien des Organismus erfolgen. Die ganzheitliche Analyse, die über Expressionsstudien erfolgen wird, bedarf der Ergänzung durch kausale Analysen, da nur dann die notwendige Sicherheit erreicht wird (Übersicht 5).

7 Schlussfolgerungen

- Die Analyse der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen kann nicht auf die Biosynthese beschränkt werden. Das hinreichende Anpassungsvermögen von Hochleistungstieren an schwankende Umweltverhältnisse ist unverzichtbar (Pufferkapazität)
- Die Analyse der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen kann nicht ausschließlich mit Modelltieren erfolgen. Die Bedeutung der Experimentellen Tierzucht wird erheblich zunehmen.
- Die Erzeugung funktioneller Lebensmittel tierischer Herkunft erfordert Genommanipulation.
- Das ganzheitliche populationsgenetische Modell der Tierzucht wird von einem ganzheitlichen molekularbiologischen Modell abgelöst werden.

8 Zusammenfassung

Ausgehend von den Zuchtfortschritten in den Leistungsmerkmalen und von den unerwünschten Nebenwirkungen der Selektion auf hohe Leistungen werden Möglichkeiten und Grenzen der molekularen Analyse genetischer Grundlagen tierischer Leistungen diskutiert. Erfahrungen beim Modell-säugetier Maus lehren, daß für effiziente Analysen auf molekularer Ebene spezifische züchterische Strategien notwendig sind. Am Beispiel Milchrind werden potentielle Strategien in der »Experimentellen Tierzucht« diskutiert. Hinreichende Kenntnisse der genetischen Grundlagen der Zielmerkmale sind Grundvoraussetzung für effiziente Genommanipulation (genetic engineering). Für die Erzeugung funktioneller Lebensmittel (z. B. Milch und Milchprodukte) wird »genetic engineering« notwendig werden.

Literatur

- BATEMAN, N. (1971): Selection of mice for growth on a constant and changing maize-milk diets. *Anim. Prod.* **13**, 425-440.
- BAWDEN, W. S. and K. R. NICHOLAS (1999): The alteration of milk composition via transgenesis. In: Fries, R. and A. Ruvinsky (editors): *The Genetics of Cattle*. CABI Publishing, Wallingford, New York, 561-563.
- BLACKSTOCK, W. P. and M. P. WEIR (1999): Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *TIB TECH* **17**, 121-127.
- BOGUSKI, M. S. (1999): Biosequence Exegesis. *Science* **286**, 453-455.
- BOICHARD, D. (2000): Genetic Markers Relevant to Dairy Cattle Breeding. *10th World Holstein-Friesian Conference Proceedings*, 161-172.
- BREM, G. (1986): Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 57-86.
- BREM, G. (1993): Transgenic Animals in Rehms, H.-J. and G. Reed (editors). *Biotechnology*, VCH, Weinheim.
- BREM, G. (1999): Transgene Tiere als potentielle Quelle von Lebensmitteln. Bayerische Akademie der Wissenschaften, Rundgespräche der Kommission für Ökologie; *Lebensmittel und Gentechnik* (16). Verlag Dr. Friedrich Pfeil, 25-31.
- BRENNER, S. (2000): The end of the beginning. *Science* **287**, 2173-2174.
- BROWN, P. O. and D. BOTSTEIN (1999): Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature genetics, Supplement* **21**, 33-37.
- DOOLITTLE, W. F. (2000): Stammbaum des Lebens. *Spektr. d. Wissenschaft.* **4/2000**, 52-57.

- EMILII, A. Q. and G. CAGNEY (2000): Large scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nature Biotechnology* **18**, 393-397.
- FALCONER, D. S. (1960): *Introduction to Quantitative Genetics* (1st edition). Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh and London.
- FLOCK, D. K. (1999): Entwicklung der »reziproken rekurrenten Selektion« in der LTZ-Lege-hennenzucht (1959-1999). *Lohmann Informationen* **4/99**, 3-7.
- FREYER, F. and G. ERHARDT (2000): First Results of a MAS Study in Dairy Cattle with Respect to Longevity. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, **43**, 241-247.
- HART, I. D., BINES, J. A., MORANT, S. V. and J. L. RIDLEY (1978): Endocrine control of energy metabolism: comparison of the levels of hormones (prolactin, growth hormones, insuline and thyroxine) and metabolites in the plasma of high-and-low-yielding cattle at various stages of lactation. *J. Endocr.* **77**, 333-345:
- HARTWELL, L. H., HOPFIELD, J. J., LEIBLER, S. and W. MURRAY (1999): From molecular to modular cell biology. *Nature* **402** (Suppl.), C 47-C52.
- LEAMY, L. (1984): Morphometric Studies in Inbred and Hybrid House Mice. V. Directional and Fluctuating Asymmetry. *Am. Nat.* **123**, 579-593.
- LEE, C. K., KLOPP, R. G., WEINDRUCK, R. and T. A. PROLLA (1999): Gene Expression Profile and Its Retardation by Caloric Restriction. *Science* **285**, 1390-1393.
- LUITING, P. (1993): The biological nature of genetic variation in net feed efficiency. 44th Annual Meeting of the EAAP, Aarhus, Denmark.
- MADDOX, J. (1988): Finding wood among the trees. *Nature*, **333**, 11.
- MCGREGOR, A. J., SNIEDER, H., SCHORL, N. J., SPECTOR, T. D. (2000): Twins: novel uses to study complex traits and genetic diseases. *TIG* **16**, 131-134.
- MILBORROW (1998): A biochemical mechanism for hybrid vigor. *J. Experim. Botany* **49**, 1063-1071.
- OLIVER, S. (2000): Guilt-by-association goes global. *Nature* **403**, 601-603.
- PANICKE, L., STAUFENBIEL, R., BURKERT, O., FISCHER, E. UND F. REINHARD (2000): Zusammenhang zwischen den Parametern des Glukosetoleranztestes bei Jungbullen und deren Nachkommenwert. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, **43**, 231-239.
- PARSONS, P. A. (1992): Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* **68**, 361-364.
- PREISINGER, R. und W. KÜHNE (1999): Legehennenzucht an der Schwelle zum nächsten Jahrtausend. Fakten und Visionen. *Lohmann Informationen* **4/99**, 9-12.
- RAUW, W. M., KANIS, E., NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N., GROMMERS, F. J. (1998): Undesirable side effects of selection for high production efficiency. A review. *Livest. Prod. Sci.*, **56**, 15-33.
- SCHALKWYK, L. C., HIMMELBAUER, H. and H. LEHRACH (1999): Toward the mammalian transcript map. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, **42**, 67-73.
- SCHREZENMEIER, J. (1998): Nutzungsmöglichkeiten transgener Rinder in funktionellen Lebensmitteln, in Gentechnik im Interesse der Neuentwicklung und Verbesserung funktioneller Milcherzeugnisse. *DGfZ-Schriftenreihe*, Heft **14**, 49-51.
- SCHUSTER, S., FELL, D. A. and T. D. DANDEKAR (2000): A general definition of metabolic pathways useful for systematic organisation and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology* **18**, 326-332.
- SOMERVILLE, Ch. and Sh. SOMERVILLE (1999): Plant Functional Genomics. *Science* **285**, 380-383.
- TANKSLEY, S. D. (1993): Mapping Polygenes. *Amer. Rev. Genet.* **27**, 205-233.
- TRUCKENBRODT, CH., FRANCO, G., EZRA, E. und O. DISTL (2000): Körperkondition bei Israeli-Holstein Kühen zur Erfassung der Interaktionen zwischen Ernährung und Genotyp. *Züchtungskunde* **72**, 172-182.
- UETZ, P. et al. (19) (2000): A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- VEERKAMP, R. F. (2000): Condition Score and Energy Balance Whilst Selecting for Milk Yield. 10th World Holstein-Friesian Conference Proceedings, 123-128.
- WADDINGTON, C. H. (1957): *The Strategy of the Genes*. Georg Allen and Unwin Ltd.
- WOESE, C. (1998): The Universal Ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6854-6859.
- WOLFE, K. (2000): Robustness - it's not where you think it is. *Nature genetics* **25**, 3-4.
- WRIGHT, S. (1941): The physiology of the gene. *Physiological Review* **21**, 487-527.
- YANG, A. and P. B. SIEGEL (1998): Asymmetries and heterosis of bilateral traits in parental lines of chickens and their F1 crosses. *J. Anim. Breed. Genet.* **115**, 105-111.
- ZHANG, Q. et al. (11) (1998): Mapping Quantitative Trait Loci for Milk Production and Health of Dairy Cattle in a Large Outbred Pedigree. *Genetics* **149**, 1959-1973.
- ZUELKE, K. A. (2000): Genetic Modification of Milk Composition for Value-Added-Processing. 10th World Holstein-Friesian Conference Proceedings, 157-160.

Verbesserung der Tiergesundheit und neue Nutzungsmöglichkeiten von Tieren durch Gentransfer



Bei landwirtschaftlichen Nutz- und Zuchttieren eröffnet der Gentransfer völlig neue Möglichkeiten. Die klassische Tierzucht beruht auf der gezielten Anpaarung von Nutztieren und anschließender Auswahl der Nachkommen mit der gewünschten Merkmalsverbesserung, d. h. komplexe Genotypen werden nach bestimmten Kriterien (Milch-/Fleischleistung, Fruchtbarkeit u. a.) selektioniert. Dabei gehen oft andere positive Eigenschaften verloren (z. B. Gesundheit). Mittels Gentransfer können gezielt bestimmte Eigenschaften im Empfängerorganismus beeinflusst oder neu eingeführt werden, ohne dabei andere positive Merkmale zu beeinträchtigen. Der Zuchtfortschritt bzw. das Zuchtziel ist innerhalb weniger Generationen feststellbar. Stabil in das Genom des Empfängers integrierte Genkonstrukte werden gemäss der Mendel'schen Vererbungslehre an die Nachkommen weitergegeben. Aus tierzüchterischer Sicht stellt Keimbahn-Gentransfer daher eine »gezielte, punktuelle« Erhöhung der genetischen Variabilität dar.

Bei der Erstellung von transgenen Tieren für Produktionszwecke müssen selbstverständlich die Kriterien der nationalen und internationalen Gentechnikgesetze, der Tierversuchs- und Tierschutzgesetze, sowie falls zutreffend des Lebensmittelrechts und des Konsumentenschutzes eingehalten werden. Bei der Erstellung transgener Tiere wird von Fall zu Fall je nach Spezies, Methode des Gentransfers, Natur des übertragenen Gens, Verwendung und Transport, sowie Rückholbarkeit des transgenen

Tieres die Biosicherheit/Biorisiken evaluiert. Zusätzlich werden transgene Nutztiere einer tierzüchterischen Prüfung unterzogen, d. h. die stabile Integration und Transmission des Transgens wird durch den Aufbau transgener Linien geprüft. Die veterinärmedizinisch-klinische, -pathologische und toxikologische Prüfung untersucht alle gewünschten und unerwünschten Effekte der Transgenexpression und der Transgenintegration (Houdebine, 1997; Miller and Matheson, 1997).

Dieser Übersichtsartikel konzentriert sich auf die Nutzung des Gentransfers zur Steigerung der Krankheitsresistenz, den Einsatz transgener Nutztiere im Nahrungsmittelbereich und sowie die Erschliessung neuer Produktionsformen durch Transgenität.

1. Verbesserung der Tiergesundheit durch Gentransfer

Seit den ersten Berichten über Gentransfer in landwirtschaftliche Nutztiere werden auch die Möglichkeiten zur Steigerung der Krankheitsresistenz durch diese Technologie untersucht. Unter Krankheitsresistenz wird eine vererbte, d. h. genetisch determinierte Unempfindlichkeit von Arten, Rassen oder Familien gegenüber bestimmten infektiösen Agentien, Toxinen und nicht-infektiösen Krankheitsursachen verstanden. Krankheitsresistenz ist einerseits meist multigenetisch bedingt und wird andererseits von endogenen und exogenen Faktoren

massgeblich beeinflusst. Die konventionelle Zucht auf allgemeine Krankheitsresistenz bzw. gesteigerte generelle Fitness ist bisher nicht gelungen. Selektionsexperimente haben gezeigt, dass auf erhöhte Resistenz selektiert werden kann, diese sich aber nicht unbedingt auf alle Pathogene erstreckt. Spezifische Resistenzen gegen bestimmte Pathogene werden zum Teil von einem Hauptgen kontrolliert und sind daher für züchterische Zwecke leichter zugänglich.

Die gezielte Steigerung der Krankheitsresistenz landwirtschaftlicher Nutztiere kann durch additiven (»gain of function«), deletiven (»loss of function«, »knockout«) oder Allele-ersetzenden (»replacement«, »exchange of function«) Gentransfer erreicht werden. Im Fall des additiven Gentransfers werden Genkonstrukte, die die Resistenz erhöhen, übertragen; beim deletiven Gentransfer werden Loci, die Krankheitsanfälligkeiten bedingen, durch homologe Rekombination ausgeschaltet; beim »Replacement«-Gentransfer wird ein Anfälligkeitsallel gezielt durch ein Resistenzallel ersetzt (zur Übersicht siehe Müller und Brem, 1998).

Gentransfer-Experimente zur Beeinflussung der Krankheitsresistenz scheiterten bislang an der unzureichenden Kenntnis der Pathogen-Wirt-Interaktionen und dem Mangel an identifizierten Hauptgenen oder -loci für Resistenzmechanismen. Kandidaten für Gentransferexperimente sind alle Gene, die die unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes beeinflussen. Die entsprechenden Genkonstrukte können z. B. Zytokine und Wachstumsfaktoren, Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), T-Zell-Rezeptoren oder spezifische Resistenzproteine kodieren. Darüber hinaus können die Genkonstrukte »natürlich« vorkommende Resistenzgene enthalten oder in vitro modellierte, d. h. künstliche, Produkte kodieren (z. B. antisense RNAs, DNA-Vakzine). Die verschiedenen additiven Gentransfer-Strategien werden mit Rücksicht auf die Wirkung des Transgens und den Ort der Aktivität »intrazelluläre«, »extrazelluläre«, »genetische« und »genitale« Immunisierung

benannt (siehe Tabelle 1). Im Hinblick auf die Anzahl der transgenen Zellen im Organismus und den möglichen Einsatz des transgenen Tieres in der Zucht, ist es wichtig, zwischen somatischem und Keimbahn-Gentransfer zu unterscheiden.

Genetische Immunisierung (DNA Vakzinierung)

Bei der genetischen Immunisierung handelt es sich um somatischen Gentransfer. Im Gegensatz zu den klassischen Impfungen werden nicht die Pathogene selbst – ganz oder teilweise, attenuiert bzw. inaktiviert oder rekombinant – verabreicht, sondern Genkonstrukte, die ein oder mehrere antigene Epitope kodieren. Die Verwendung von reiner Plasmid-DNA als Impfstoff wurde erstmals 1990 vorgeschlagen (Wolff et al., 1990). Die Stimulierung einer humoralen Immunantwort durch einfache Verabreichung von partikel-gebundenen Expressionsplasmiden in Mäuse wurde 1992 demonstriert. Die Autoren schlugen den Begriff »genetische Immunisierung« für den somatischen Gentransfer von Antigen-kodierenden Genkonstrukten zur Impfung vor (Tang et al., 1992). DNA Vakzine haben einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Impfstoffen. Sie bergen nicht das Risiko bei der Kultivierung infektiöser Agentien und der Möglichkeit der Rückmutation eines attenuierten Impfstammes in eine virulente Form. Die Produktionskosten von Plasmid-DNA sind niedrig im Vergleich zu den Kosten der Herstellung herkömmlicher bzw. rekombinanter Impfstoffe. Darüberhinaus kann DNA ohne besondere Vorkehrungen kostengünstig transportiert und gelagert werden. Genetische Immunisierung wurde mit bereits mit Erfolgen in landwirtschaftlichen Nutztieren getestet (zur Übersicht siehe Beard and Mason, 1998; Raychaudhuri and Rock, 1998).

Die übrigen Gentransfer-Strategien beruhen auf der Keimbahn-Integration der Genkonstrukte.

Deletive oder »Replacement«-Gentransferexperimente zur Steigerung der Krankheitsresistenz wurden in landwirtschaftlichen Nutztieren bislang nicht durchgeführt. Dies liegt daran, dass (i) die not-

Tabelle 1: Transgen-Strategien zur Steigerung der Krankheitsresistenz

Ziel der Transgen-Wirkung	Immunisierungsstrategie	Beispiele für Transgenprodukte
Initiale Pathogen-Wirtsinteraktion	<ul style="list-style-type: none"> • Extrazelluläre Immunisierung • Intrazelluläre Immunisierung • Kongenitale Immunisierung • Genetische Immunisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • lösliche Pathogen-Rezeptoren, Zytokine • Stoffe, die das Eindringen des Pathogens verhindern • Antikörper • Antigene, Zytokine
Replikation und Verbreitung des Pathogens	<ul style="list-style-type: none"> • Intrazelluläre Immunisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • antisense Nukleinsäuren bzw. Ribozyme; Intrabodies; Replikations-Inhibitoren
Latenz oder Ausbreiten des Pathogens im Organismus	<ul style="list-style-type: none"> • Extrazelluläre Immunisierung • Kongenitale Immunisierung • Genetische Immunisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • antimikrobielle Agentien • Antikörper • Antigene
Abwehrsystem des Wirtes	<ul style="list-style-type: none"> • Extrazelluläre Immunisierung • Intrazelluläre Immunisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Zytokine • Intrazelluläre Effektoren der Zytokinwirkung; MHC; T-Zell-Rezeptoren
Krankheits-/Anfälligkeitgene des Wirtes	<ul style="list-style-type: none"> • ‘Gene Targeting’ (Knockout oder ‘Replacement’) 	<ul style="list-style-type: none"> • Genkonstrukte für homologe Rekombination

wendigen pluripotenten embryonalen Stammzellen bzw. Kerntransfer- und somatischen Zellklonierungstechniken erst seit kurzem zur Verfügung stehen und bislang kein Knockout-Experiment in diesen Spezies gelungen ist, (ii) die (patho-) physiologischen Auswirkungen eines Knockouts in einem in Leistung stehenden Nutztier schwerer absehbar sind als in einem Versuchstier und (iii) sehr wenige in Frage kommende Krankheitsanfälligkeitsloci bekannt sind. Es ist jedoch absehbar, dass die Technik des Klonierens mittels Transfer genetisch modifizierter Kerne in naher Zukunft zu den ersten wissenschaftlichen Berichten von homologer Genrekombination in landwirtschaftlichen Nutztieren führen wird.

Congenitale Immunisierung

Dieser Begriff umschreibt die Expression von Genkonstrukten, die für spezifische Immunglobuline kodieren. Das transgene Tier zeigt daher Immunität gegenüber einem bestimmten Pathogen, ohne vorherigem Kontakt mit dem Erreger, d. h. das Tier ist »angeboren immun« (Müller et al., 1997). Eine interessante Möglichkeit, durch Gentransfer neonatale Tiere passiv zu immunisieren, ist die Expression von monoklonalen Antikörpern in der Milch. Ein Genkonstrukt, das einen pan-neutralisierender anti-TGEV-Antikörper kodiert, wurde erfolgreich in der Milch von transgenen Mäusen exprimiert (Castilla et al., 1998). TGEV (transmissibles Gastroenteritis Virus) verursacht in neugeborenen Schweinen signifikante Morbidität und Mortalität. Da gegenwärtig kein probates Mittel existiert, um die Ferkel zu schützen, liegt es nahe, dieses Gentransfer-Experiment in Schweinen zu wiederholen.

Intrazelluläre Immunisierung

Unter »intrazellulärer Immunisierung« wurde ursprünglich die Überexpression von mutierten Virus-Proteinen verstanden, die in der Lage sind, das Eindringen des Virus in den Wirt oder die Vermehrung bzw. Ausbreitung des Virus zu verhindern (Bal-

timore, 1988). Diese Definition wurde erweitert auf alle Ansätze, innerhalb der Zellen Transgenprodukte zu erzeugen, die die Vervielfältigung von Pathogenen im Wirtsorganismus verhindern (siehe Tabelle 1).

Durch rekombinante Antikörper-Technologien kann die Expression von Antikörper-kodierenden Genkonstrukten in intrazelluläre Kompartimente dirigiert werden. Dies wird durch Mutation oder Deletion der Domäne, die für die Sekretion der Antikörper verantwortlich ist, erreicht. Zusätzlich kann durch Hinzufügen entsprechender Lokalisations-signale die subzelluläre Anhäufung gesteuert werden. Diese intrazellulären Antikörper (oder Intrabodies) sollen Pathogen-Proteine binden und inaktivieren (Marasco, 1997).

Eine weitere Strategie nutzt antisense Nukleinsäuren bzw. Ribozyme. Antisense Nukleinsäuren bestehen aus kurzen synthetischen Oligonukleotiden oder aus längerern RNA-Sequenzen, die entweder *in vitro* oder *in vivo* transkribiert werden und durch Bindung an die Boten-RNA (mRNA) die Expression von Zielgenen inhibieren. Ribozyme binden ebenfalls komplementäre Zielsequenzen; zusätzlich haben sie katalytische Aktivität und hydrolysieren die Ziel-RNA. Beide molekulare Werkzeuge werden im Hinblick auf ihre Anwendung in der Gentherapie intensiv untersucht. Antisense- und Ribozyme-Genkonstrukte gerichtet gegen virale RNAs sind in transgenen Tieren getestet worden (Sokol and Murray, 1996).

Es sind nur sehr wenige einzelne Genloci bekannt, deren Produkt eine Resistenz gegenüber einem bestimmten Erreger bewirkt. Zwei gut untersuchte intrazelluläre spezifische Resistenzproteine sind das Mx-System und Nramp1 (natural resistance-associated macrophage protein). Die Mx Proteine wurden ursprünglich in Mäusen charakterisiert und sind in der Lage die Multiplikation verschiedener Negativ-Strang-RNA Viren zu blocken. Das dominante Mx1 Allel schützt Mäuse hoch effektiv vor klinischen Symptomen nach Infektion mit

Influenza A Viren. Influenza-anfällige Mausstämme zeigen eine Mutation im Mx1 Gen. Der Gentransfer eines funktionellen Mx1-Transgens in Mx1-defiziente Mäuse zeigte, dass die Influenza-Resistenz allein von Mx1 bedingt wird (Arnheiter et al., 1996). Der Versuch Influenza-Resistenz in Schweinen durch Transfer des eines murinen Mx1 Genkonstruktes zu erzeugen, war nicht erfolgreich. Die existierenden Daten sprechen dafür, dass der Grund dafür in der suboptimalen Funktion der murinen regulatorischen Sequenzen im Schwein ist (Müller et al., 1992). Das murine Nramp1 Gene kontrolliert die Anfälligkeit von Inzuchtstämmen gegenüber verschiedenen intrazellulären Parasiten. Der Resistenzmechanismus ist abhängig von einem einzigen Aminosäureaustausch im Protein. Gentransfer des nicht-mutierten Nramp1 Gens in anfällige Mäuse resultierte in erhöhter Resistenz gegenüber *Mycobacterium bovis* und *Salmonella typhimurium* (Govoni et al., 1996). In landwirtschaftlichen Nutztieren ist der Nramp1 Locus ebenfalls mit intrazellulärer Resistenz assoziiert (Feng et al., 1996; Hu et al., 1997).

Extrazelluläre Immunisierung

In Anlehnung in die obigen Definitionen werden unter diesem Begriff alle Transgen-Strategien zusammengefasst, bei denen die antipathogene Wirkung nach Sekretion der Genprodukte aus transgenen Zellen eintritt (Müller and Brem, 1998). Elegante Beispiele mit Transgen-Experimenten wurden mit antimikrobiellen Peptiden durchgeführt. Die antimikrobiellen Abwehrmechanismen durch kleine lytische Peptide (Magainine, Defensine, Melittine und Cecropine) sind im Tier- und Pflanzenbereich weit verbreitet. In transgenen Mausstudien wurden lytische Peptide im Blut, der Lymphe und der Milch mit antimikrobieller Aktivität exprimiert (Reed et al., 1997; Yarus et al., 1996). Die Akut-Phasen-Proteine sind eine Klasse von Molekülen, die nach Infektion oder physikalischem Schaden von Geweben im Plasma angehäuft werden und dort u. a. antimikrobiell wirksam werden. Die Überexpression

des Akut-Phasen-Proteins CRP (C-reactive protein) in transgenen Mäusen resultierte in einem erhöhten Schutz der Tiere gegen septischen Schock verursacht durch bakterielle Endotoxine und Infektion mit bestimmten Bakterien (Szalai et al., 1995; Xia and Samols, 1997). Lactoferrin ist ein Eisen-bindendes Glykoprotein, dessen spezifische Funktionen noch nicht in allen Details geklärt sind. Es wird diskutiert, dass Lactoferrin eine Rolle bei der Eisenaufnahme in der Darm-Mukosa spielt und dort als Bakteriostatikum gegen Eisen-abhängige Bakterien wirkt. Ein gesäuge-spezifisches Lactoferrin-Genkonstrukt wurde in einem Gentransfer-Programm in Rinder verwendet. Ein transgener Bulle wurde produziert, von dem allerdings keine Transmissions- bzw. Expressionsdaten vorliegen (Krimpenfort et al., 1991).

Im Gegensatz zur Situation beim Einsatz des Gentransfers in der Pflanzenzucht, ist es in der Tierzucht nicht möglich, mit wenigen transgenen Tieren die gesamte Nutztierpopulation schnell zu ersetzen. Es ist daher abzusehen, dass die Anwendungen des Keimbahn-Gentransfers zur Steigerung der Krankheitsresistenz in der Nutztierproduktion sich auf hoch spezialisierte Populationen beschränken wird. Jedes Gentransferexperiment zur Steigerung der Krankheitsresistenz muss zusätzlich zu den Studien im Rahmen der Biosicherheit die Möglichkeit der Schaffung bzw. der Anreicherung von pathogenen Agentien, die in der Lage sind, dem Transgen-Resistenzmechanismus zu entkommen, in Betracht ziehen. Darüber hinaus ist unbestritten, dass weder die Transgentechnologie, noch konventionelle prophylaktische oder therapeutische Massnahmen die Notwendigkeit für optimale Tierhaltung und Bestandsbetreuung ersetzen können.

2. Transgene Tiere im Nahrungsmittelbereich

Eine Vielzahl von frühen Transgenexperimenten in landwirtschaftliche Nutztiere zielte auf verbesserte Wachstumsleistung und Schlachtkörperzusammensetzung ab (zur Übersicht siehe Müller and

Tabelle 2: Beispiele möglicher Expression von »Nutraceuticals« in der Milchdrüse von transgenen Nutztieren

Nutraceutical	Funktion / Ziel
Lactoferrin	antibakteriell, Eisentransport
α -Lactalbumin	verbesserte Aminosäure-Balance
Modifiziertes (Phe-freies) α -Lactalbumin	Phenylketonurie
Lysozyme	antibakteriell
β -Lactoglobulin-Defizienz	hypoallergen
Kollagen	orale Toleranz
Antigene	aktive Immunität
Antikörper	passive Immunität

Brem, 1996). Dies liegt zum einen in den »klassischen« Zuchtzielen der Tierproduktion begründet, zum anderen waren wesentliche Faktoren der Wachstums- und Fleischleistung – die Wachstumshormone – in ihrer genetischen Struktur bekannt. Die Anwendung von Wachstumshormonen bei Nutztieren wurde in der Tierproduktion vor allem seit der Verfügbarkeit rekombinant produzierter Hormone intensiv untersucht. Die Gentransfer-Experimente wurden vor allem beim Schwein durchgeführt. Es konnten zwar erwünschte Effekte bei der Schlachtkörperzusammensetzung erreicht werden, insgesamt zeigte sich jedoch, dass die zusätzlichen Wachstumsstimuli in den transgenen Tieren auch zu unerwünschten pathologischen Nebeneffekten führten. Abgesehen von diesen wissenschaftlich lösbaren Problemen ist die Akzeptanz für weitere Leistungssteigerung beim landwirtschaftlichen Nutztier und für gentechnisch verän-

derte Lebensmittel im Allgemeinen sehr gering. Daher werden gegenwärtig auf diesem Gebiet keine grossen Anstrengungen unternommen.

Trotzdem spielt Gentransfer bei der Diskussion um die Verbesserung von Nahrungsmitteln tierischer Herkunft eine wichtige Rolle. »Functional Food« oder »Nutraceuticals« (NUTRition, Ernährung; pharmACEUTICAL, Pharmazeutikum) sind für den menschlichen Verzehr bestimmte Nahrungsmittel, die neben dem normalen Nährgehalt Stoffe mit Arzneimittelwirkung (prophylaktisch oder therapeutisch) enthalten (Tabelle 2). Beispiele sind die Produktion von Antikörpern oder spezifischen Antigenen in Nahrungsmitteln zur Erzeugung einer passiven oder aktiven Immunität oder die Produktion von antibakteriellen Komponenten (Lysozym, Lactoferrin).

Die Modifikation der Zusammensetzung der Milch durch Gentransfer steht bei Functional Food

im tierischen Bereich derzeit im Mittelpunkt. Im Folgenden soll kurz auf die Ansätze eingegangen werden, die Milchezusammensetzung oder die Primärstruktur der Milchproteine zu ändern. Dadurch sollen die physiochemischen, ernährungsphysiologischen oder technischen Eigenschaften von Milch oder Milchprodukten positiv beeinflusst werden (zur Übersicht siehe Murray, 1999).

(i) Expression von zusätzlichen Wildtyp- oder modifizierten Milchprotein-kodierenden Genen.

Dabei wird angestrebt die Kuhmilch durch die Anreicherung mit humanem Lysozym und Lactoferrin zu »humanisieren« und die Abwehr gastrointestinaler Infektionen zu verstärken bzw. den Eisen-transport im Verdauungstrakt zu erhöhen. Die Veränderung der Kasein-Zusammensetzung der Milch soll zum einen die biologische Wertigkeit der Milchproteine und zum anderen die Mizellen-Stabilität erhöhen.

(ii) Expression von Genkonstrukten, die die Milchproteine oder -zusammensetzung verändern.

Genkonstrukte, die darauf abzielen die in der Milch natürlicherweise vorkommenden Proteasen (Plasmin, Plasminogen) zu inhibieren sind für die Milchverarbeitende Industrie von grossem Interesse. Da ein Grossteil der Bevölkerung Asiens und Afrikas Lactose-intolerant ist, werden Möglichkeiten untersucht, den Lactose-Gehalt der Milch zu erniedrigen. Dies kann z. B. durch die Expression von β -Galactosidase, die Lactose in Glucose und Galactose spaltet, erreicht werden.

β -Lactoglobulin ist das hauptsächliche hitze-labile Molkeprotein der Wiederkäuer und kommt in humaner Milch nicht vor. Es hat ein gut charakterisiertes allergenes Potential. Ansätze zur Produktion von »humanisierter« Milch zielen deshalb auf die Erzeugung β -Lactoglobulin-freier Milch ab. Ein naheliegende Strategie wäre die systematische Suche nach Individuen, die Null-Allele des β -Lactoglobulin-Locus tragen. Transgen-Technologie könnte Ribozyme verwenden, die gegen die β -Lactoglobulin-mRNA gerichtet sind. Ein Erfolg dieses

Ansatzes erscheint bei der Syntheseleistung von 0,2% β -Lactoglobulin in Wiederkäuern eher unwahrscheinlich. Die Methode der Wahl ist offensichtlich der »Knockout« des β -Lactoglobulin-Gens. Obwohl noch keine totipotenten embryonalen Stammzellen von Wiederkäuern verfügbar sind, ermöglicht die Technik der Klonierung durch Nukleus-Transfer aus fetalen Zelllinien diese Experimente.

3 Transgene Produkte in Biomedizin und Biotechnologie

Die Erzeugung transgener Nutztiere zielt vorwiegend auf die Produktion von Pharmazeutika (Gene Farming) sowie auf die genetische Modifikation von Schweinen zur Bereitstellung von Organen bzw. Geweben für die Xenotransplantation ab. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Einführung neuer Stoffwechselwege durch Gentransfer, um bestimmte Substrate für tierische Syntheseleistungen (z. B. Wolle) optimal bereitzustellen (zur Übersicht siehe Ward, 2000).

Der Bioreaktor »transgener Säuger« wird für Stoffe verwendet, die in anderen Produktionssystemen (Bakterien, Hefen, Zellkultursystemen) überhaupt nicht oder nicht in ausreichender Menge bzw. Reinheit hergestellt werden können. Die Milchdrüse landwirtschaftlicher Nutztiere eignet sich sehr gut für die Produktion der benötigten Stoffe (zur Übersicht siehe Dalrymple and Garner, 1998; Ziomek, 1998): das Organ hat eine sehr hohe Syntheseleistung, es besitzt die Fähigkeit biologisch aktive Proteine zu produzieren (Durchführung der notwendigen post-translatorischen Modifikationen), der Hygienestatus ist in der Regel sehr hoch, die Gewinnung der Milch ist sehr einfach und die Reinigung des rekombinanten Stoffes aus der Milch ist technisch durchführbar. Die Säugetierspezies für das Gene Farming richtet sich nach dem Bedarf des rekombinanten Proteins auf dem Markt. Für geringe Mengen werden Kaninchen genutzt, für grössere Mengen Ziege, Schaf oder Rind (siehe Tabelle 3). Weitere leicht zugängliche Flüssigkeiten, die für die

Tabelle 3: Nutzung des Bioreaktors Milchdrüse in verschiedenen Spezies

Spezies	Trächtigkeit (Monate)	Geschlechtsreife (Monate)	Milchmenge pro Laktation (Liter)
Kaninchen	1	5-6	3-4
Schaf	5	6-8	200-400
Ziege	5	6-8	600-800
Kuh	9	15	6000-10000

Expression hochwertiger Proteine in transgenen Nutztieren erfolgreich getestet wurden, sind Blut (Weidle et al., 1991), Urin (Kerr et al., 1998) und Seminalflüssigkeit (Dyck et al., 1999).

Xenotransplantation

Das Schwein wird wegen der anatomisch-physiologischen Ähnlichkeit seiner Organe, der Einfachheit seiner Züchtung und der Möglichkeit des Gentransfers als ideale Organquelle für die Xenotransplantation angesehen. Mittels Expression von Transgenen wurde bereits erreicht, dass die Schweineorgane nach Transplantation auf Primaten nicht mehr der hyperakuten Abstoßungsreaktion unterworfen sind. Dies gelang zum einen durch Inhibition des Komplementsystems des Organempfängers und zum anderen durch die Verringerung der immunogen wirkenden Epitope auf der Oberfläche der Schweineorgane (zur Übersicht siehe Wolf et al., 1999). Neben der Unterdrückung der Immunreaktion im Empfängerorganismus, muss vor der Testung der Xenotransplantation in klinischen Untersuchungen das Problem der möglichen Übertragung von Schweine-Pathogenen auf den Menschen untersucht werden (zur Übersicht siehe Günzburg and Salmons, 2000). Insgesamt erfordert die Nutzung von Organen für die Xenotransplanta-

tion komplexe Modifikationen der Spendertiere durch Gentransfer und entsprechende Auswahl der Schweinelinien, die sowohl die Aspekte der Abstoßungsreaktion, als auch die Probleme der Xenozoonosen und der speziesspezifischen Physiologie und Morphologie der Organe umfassen.

Zusammenfassung

Der große Nutzen transgener Tiere in der Biomedizin als Modell für Humanerkrankungen und Therapiekonzepte sowie im Rahmen des Gene Farmings ist unumstritten. Es besteht die Hoffnung, dass die Barrieren der Xenotransplantation überwunden werden können und zumindest einzelne Gewebe bzw. einfache Organe über die Speziesgrenzen hinweg transplantiert werden können. Bei dem Einsatz der Transgentechnologie im Rahmen der Lebensmittel- und/oder Tierproduktion spielt die Akzeptanz in der Bevölkerung eine entscheidende Rolle. Gegenwärtig sind in Europa keine transgenen Säugetiere für den Nahrungsmittelbereich zu erwarten. Für zukünftigen Einsatz transgener landwirtschaftlicher Nutztiere zur Lebensmittelherstellung muss von Fall zu Fall beurteilt werden. Bei getesteten positiven oder neutralen biologischen Wirkungen des Transgens auf Konsumenten und Tier geht von der stabil in das Genom integrierten zusätz-

lichen genetischen Information keine grössere Gefahr aus als bei der Neurekombination des Genoms bei der natürlichen Anpaarung. Die Erschliessung der Genome landwirtschaftlicher Nutztiere sowie die Weiterentwicklung der Methoden des Gentransfers werden mit Sicherheit in Zukunft neue Möglichkeiten zur Weiterentwicklung der Tierzucht bieten (zur Übersicht siehe Bulfield, 2000).

Literatur

- Arnheiter, H., Frese, M., Kambador, R., Meier, E., and Haller, O. (1996). Mx transgenic mice – animal models of health. In *Transgenic models of human viral and immunological disease*, F. V. Chisari and M. B. A. Oldstone, eds. (Berlin: Springer), pp. 119–147.
- Baltimore, D. (1988). Intracellular immunization. *Nature* **335**, 395–396.
- Beard, C. W., and Mason, P. W. (1998). Out on the farm with DNA vaccines. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1325–1328.
- Bulfield, G. (2000). Farm animal biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18**, 10–13.
- Castilla, J., Pintado, B., Sola, I., Sánchez-Morgado, J. M., and Enjuanes, L. (1998). Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. *Nat. Biotechnol.* **16**, 349–354.
- Dalrymple, M. A., and Garner, I. (1998). Genetically modified livestock for the production of human proteins in milk. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **15**, 33–49.
- Dyck, M. K., Gagné, D., Quillet, M., Sénéchal, J.-F., Bélanger, E., Lacroix, D., Sirard, M.-A., and Pothier, F. (1999). Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1087–1090.
- Feng, J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams, G. L., and Templeton, J. W. (1996). Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.* **6**, 956–964.
- Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D., and Gros, P. (1996). The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 (Gly169) allele. *Infection and Immunity* **64**, 2923–2929.
- Günzburg, W. H., and Salmoms, B. (2000). Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought? *Mol. Med. Today* **6**, 199–208.
- Houdebine, L. M. (1997). The biosafety problems of transgenic animals. In *Transgenic animals – Generation and use*, L. M. Houdebine, ed. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers), pp. 559–562.
- Hu, J., Bumstead, N., Barrow, P., Sebastiani, G., Olien, L., Morgan, K., and Malo, D. (1997). Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to Nramp1 and TNC. *Genome Res.* **7**, 693–704.
- Kerr, D. E., Liang, F., Bondioli, K. R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R. J., and Sun, T. T. (1998). The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat. Biotechnol.* **16**, 75–79.
- Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R., and de Boer, H. (1991). Generation of transgenic dairy cattle using »in vitro« embryo production. *Bio/Technology* **9**, 844–847.
- Marasco, W. A. (1997). Intrabodies: turning the humoral immune system outside in for intracellular immunization. *Gene Therapy* **4**, 11–15.
- Miller, M. A., Matheson, J. C. I. (1997) Food safety evaluation of transgenic animals. In L.M. Houdebine, (ed.) *Transgenic animals – Generation and use*, Amsterdam, Harwood Academic Publishers, pp 563–568.
- Müller, M., and Brem, G. (1996) Approaches to influence growth promotion of farm animals by transgenic means. In Office for Official Publications of the EC (ed.) *Scientific conference on growth promotion in meat production*, Brussels, European Commission Directorate-General IV Agriculture, pp 213–232.
- Müller, M., and Brem, G. (1998). Transgenic approaches to the increase of disease resistance in farm animals. *Rev. sci. tech. OIE* **17**, 365–378.
- Müller, M., Brenig, B., Winnacker, E. L., and Brem, G. (1992). Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene* **121**, 263–270.
- Müller, M., Weidle, U. H., and Brem, G. (1997). Antibody encoding transgenes – their potential use in congenital and intracellular immunization. In *Transgenic animals – Generation and use*, L.-M. Houdebine, ed. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers), pp. 495–499.
- Murray, J. D. (1999). Genetic modification of animals in the next century. *Theriogenology* **51**, 149–159.
- Raychaudhuri, S., and Rock, K. L. (1998). Fully mobilizing host defence: building better vaccines. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1025–1031.
- Reed, W. A., Elzer, P. H., Enright, F. M., Jaynes, J. M., Morrey, J. D., and White, K. L. (1997). Interleukin 2 promoter/enhancer controlled expression of a synthetic cecropin-class lytic peptide in transgenic mice and subsequent resistance to *Brucella abortus*. *Transgenic Res.* **6**, 337–347.
- Sokol, D. L., and Murray, J. D. (1996). Antisense and ribozyme constructs in transgenic animals. *Transgenic Res.* **5**, 363–371.
- Szalai, A. J., Briles, D. E., and Volanakis, J. E. (1995). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J. Immunol.* **155**, 2557–2563.
- Tang, D., DeVit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152–154.
- Ward, K. A. (2000). Transgene-mediated modifications to animal biochemistry. *Trends Biotechnol.* **18**, 99–102.
- Weidle, U. H., Lenz, H., and Brem, G. (1991). Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene* **98**, 185–191.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465–1468.
- Xia, D., and Samols, D. (1997). Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2575–2580.
- Yarus, S., Rosen, J. M., Cole, A. M., and Diamond, G. (1996). Production of active bovine tracheal antimicrobial peptide in milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14118–14121.
- Ziomek, C. A. (1998). Commercialization of proteins in the mammary gland. *Theriogenology* **49**, 139–144.

Konstruktion und Einsatzmöglichkeiten von rekombinanten Impfstoffen und der Gentherapie in der Tiermedizin



Die Gentechnologie wird entsprechend ihrer Anwendungsgebiete in drei verschiedene Bereiche unterteilt. Man unterscheidet die »rote Gentechnologie« (Herstellung von Arzneimitteln), die »grüne Gentechnologie« (Herstellung von Nahrungsmitteln) und die »graue Gentechnologie« (Herstellung von Substanzen zur diagnostischen Anwendung). Das vorliegende Referat beschäftigt sich mit der Anwendung der Gentechnologie bei der Herstellung von Arzneimitteln. Hierbei kann unterschieden werden zwischen dem Einsatz der Gentechnologie zur Aufklärung und Identifizierung neuer Arzneimittel und der Synthese rekombinanter Arzneimittel.

BAYER Tiergesundheit beschäftigt sich auf dem Gebiet der Synthese rekombinanter Arzneimittel mit der Entwicklung von Impfstoffen gegen bakterielle, virale und parasitäre Erreger und mit geeigneten Systemen zur Gentherapie verschiedener Krankheiten. Hierbei finden gentechnische Methoden Anwendung bei der Identifizierung protektiver Erregerkomponenten zur Entwicklung von Impfstoffen, bei der Entwicklung neuer Darreichungsformen bioreaktiver Substanzen, bei der Identifikation therapeutisch wirksamer Proteine und letztlich bei der Herstellung rekombinanter Produkte.

Impfstoff-Entwicklung

Konventionelle Impfstoffe werden in inaktivierte und lebend-attenuierte Impfstoffe unterteilt. Inakti-

vierte Impfstoffe zeichnen sich durch eine hohe Verträglichkeit aus, da durch die Inaktivierung des als Impfstoff eingesetzten Erregers dessen pathogenes Potential verloren geht. Dies geht jedoch oft zu Lasten der Wirksamkeit des Impfstoffes. Potentiell immunprotektive Komponenten der Virus/Bakterienhülle können durch die Inaktivierungsmethode in einem Maße geschädigt werden, daß ihre Wirksamkeit verloren geht bzw. ganz erheblich reduziert wird. Alternativ werden lebend attenuierte Impfstoffe eingesetzt. Hierbei handelt es sich um durch Mutationen abgeschwächte, aber noch vermehrungsfähige Erreger (z. B. Polio). Ein hohes Wirkungspotential geht hier oft zu Lasten der Verträglichkeit bzw. Sicherheit, da diese Erreger ein pathogenes Restpotential besitzen (abgeschwächter Krankheitsverlauf) bzw. zu virulenten Varianten zurückmutieren können.

Gentechnologische Methoden werden eingesetzt um Impfstoffe zu entwickeln, die hohe Wirksamkeit mit hoher Verträglichkeit verbinden. Man unterscheidet hierbei Subunit-Vakzinen (Proteine aus gentechnischen Expressionssystemen), Vektor-Vakzinen (avirulente Erreger mit gentechnisch inserierten Fremdgenen als Lebendvakzinen) und Nukleinsäure-Vakzinen (Applikation reiner DNA-Moleküle).

Bei der Herstellung von Subunit-Vakzinen wird zunächst das Genom pathogener Erreger nach Genen untersucht, deren Genprodukte immunprotektiv wirken. Oft stellen bei Bakterien Proteine der

äußeren Membran (z.B. Adhärenzfaktoren oder Eisen-bindende Rezeptoren) aussichtsreiche Impfstoff-Kandidaten dar, da diese dem Immunsystem des Wirts leicht zugänglich sind. Bei Viren werden aus dem gleichen Grund bevorzugt Glykoproteine als Impfstoffe eingesetzt. Nach Identifikation eines immunproduktiven Gens wird dieses in ein geeignetes Expressionssystem kloniert. Als Expressionssysteme stehen Bakterien, Hefen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen zur Verfügung, wobei die Art des zu exprimierenden Proteins (glykosyliert oder nicht) die Auswahl des Expressionssystems bedingt. Ein Beispiel für eine rekombinante Subunit-Vakzine ist das im Baculovirus exprimierte Glykoprotein E2 des Klassischen Schweinepestvirus. Um die Wirksamkeit der Subunit-Vakzine zu erhöhen – es handelt sich bei dieser Art der Impfstoffe ja weiterhin um inaktivierte Impfstoffe – werden diese mit Adjuvantien formuliert. Außer altergebrachten Adjuvantien wie Ölemulsionen und Bakterien-Zellwandkomponenten kommen hierbei immer häufiger Polymere, Nanopartikel, Enterotoxin-Untereinheiten und rekombinante Zytokine zum Einsatz. Dabei sollen die Adjuvantien Antigene nicht nur vor biologischem Abbau schützen bzw. einen Depoteffekt bewirken, sondern diese zu spezifischen Organen/Zellen dirigieren und das Immunsystem durch Zytokin-Induktion, Hochregulation von MHC I- und II-Molekülen und Stimulation der Lymphozyten-Proliferation spezifisch regulieren.

Abgesehen von ihrer guten Verträglichkeit und hohen Sicherheit bei verbesserter Wirksamkeit (auf den Inaktivierungsschritt kann verzichtet werden) bieten Subunit-Vakzinen einen weiteren Vorteil gegenüber konventionellen inaktivierten Vakzinen, der besonders bei der Eradikation von Tierseuchen von Bedeutung ist. Sie sind als Markerimpfstoffe verwendbar. Im Gegensatz zu herkömmlichen Impfstoffen, nach deren Einsatz geimpfte von infizierten Tieren serologisch nicht zu unterscheiden sind, bieten Subunit-Vakzinen die Möglichkeit, diese voneinander abzugrenzen. Während bei einer Feldinfektion Antikörper gegen verschiedene Strukturen

des Erregers gebildet werden, induziert die Impfung mit einer Subunit-Vakzine lediglich Antikörper gegen eine ausgewählte Komponente. Der serologische Status eines geimpften Tieres kann also vom Status eines infizierten Tieres unterschieden werden. Ein aktuelles Beispiel für einen von BAYER entwickelten Marker-Impfstoff auf Basis einer Subunit-Vakzine ist der Schweinepest-Marker-Impfstoff, der derzeit kurz vor der Einreichung zur Zulassung steht. Bisher werden beim Ausbruch von Schweinepest in einem Betrieb auch die Schweinebestände im Umkreis des betroffenen Betriebes gekeult, um eine Ausbreitung der Seuche zu verhindern. Dadurch verlieren, zusätzlich zum ökonomischen, oft existenzgefährdenden Verlust des Landwirtes, Tausende gesunder Tiere ihr Leben. Impfungen waren bisher nicht vorgesehen, da nur Impfstoffe zur Verfügung standen, die eine Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren nicht ermöglichen. Durch die Entwicklung des Schweinepest-Markerimpfstoffes von BAYER scheint es möglich zu werden, die Ausbreitung der Seuche durch gezielte Ring-Impfungen zu verhindern. Bei der Schweinepest-Vakzine handelt es sich um das Glykoprotein E2 des Europäischen Schweinepest-Virus, das mittels Baculo-Virus-System exprimiert wird. Die einmalige i.m. Applikation des Impfstoffes schützt Tiere für mindestens 6 Monate gegen das Schweinepest-Virus.

Eine weitere Form gentechnisch hergestellter Impfstoffe stellen die Vektor-Vakzinen dar. Bei ihrer Konstruktion wird ein Strukturgen ohne pathogenes Potential eines virulenten Feldvirus in das Genom eines apathogenen Impfvirus inseriert, das dieses Protein dann zusätzlich zu seinen eigenen exprimiert. Durch die Infektion des Zieltieres mit lebenden Impfstoffviren wird eine natürliche Infektion simuliert, wodurch sich Vektor-Vakzinen durch eine hohe Wirksamkeit auszeichnen. Durch die Kenntnis des Genoms des Vektors können gezielt sicherheitsrelevante Mutationen in den Vektor-Impfstoff eingeführt werden, die seine Sicherheit und Verträglichkeit im Vergleich zu konventionell

attenuierten Lebend-Impfstoffen um ein Vielfaches erhöhen können. Als Vektoren werden Bakterienstämme (wie z. B. Mycobakterium und Salmonella) und Viren (z. B. Adeno-, Herpes-, Picorna- und Pockenviren) verwendet.

Nukleinsäure-Vakzinen repräsentieren den derzeit letzten Entwicklungsstand gentechnisch hergestellter Impfstoffkandidaten. Hierbei wird ein immunprotektives Gen eines pathogenen Erregers hinter ein Regulationselement kloniert, das die Expression des Gens in Zellen des Zieltieres erlaubt. Derartige Plasmide werden dem Zieltier als reine DNA appliziert, wobei einige sicherheitsrelevante Fragen derzeit noch offen sind. Endgültig abzuklären bleibt, wie lange einmal applizierte DNA im Zieltier aktiv ist, wie wahrscheinlich Rekombinationsereignisse zwischen der genomischen DNA der Zieltierzelle und der applizierten DNA auftreten und ob allergische Reaktionen des Zieltieres gegenüber der Fremd-DNA auftreten können. Publiizierte DNA-Vakzinen richten sich gegen das Aujeszki-Virus beim Schwein, das Bovine Herpesvirus und das Bovine Respiratorische Syncytial Virus.

Ein zusammenfassender Überblick über die verschiedenen in der Tiermedizin eingesetzten Impfstoffarten wird im Folienanhang gegeben. Dabei wird konstatiert, welche Vakzinen sich bereits als Produkte auf dem Markt und welche sich noch in der Forschungs- bzw. Entwicklungsphase befinden.

Gentherapie

Zunehmend an Bedeutung auf der F&E Ebene gewinnen Methoden zur Gentherapie. Hierbei

werden Gene mittels spezifischer Carrier/Delivery-Systeme in Zielgeweben bzw. -organen zur Expression gebracht, um einen Gendefekt auszugleichen (z. B. den Blutgerinnungsfaktor VIII) bzw. ein therapeutisches Protein zu synthetisieren (z. B. IL 4RA zur Therapie von Asthma). Unterschieden werden die Ex vivo- und die In vivo-Gentherapie. Bei der Ex vivo-Gentherapie werden Patienten Zellen entnommen und von diesen Zellen wenn möglich eine etablierte Zell-Linie angelegt. Durch Infektion mit einem Gentherapie-Vektor und nachfolgender Selektion auf Expression des gewünschten therapeutischen Proteins werden positive Zellpopulationen selektiert, die dem Patienten retransplantiert werden können. Hingegen wird bei der In vivo-Gentherapie der Gentherapie-Vektor dem Patienten direkt appliziert. Als Gentherapie-Vektoren differenziert man zwischen viralen Delivery-Systemen (Adenoviren, Retroviren, Adeno-associated Viren und Herpesviren) und nicht-viralen Systemen (DNA-Expressionsplasmide formuliert mit Liposomen, Polymeren oder Nanopartikeln). Angestrebt wird eine langfristige Expression des gewünschten Proteins in therapeutisch wirksamen Mengen. Das größte Problem stellt hierbei die Antigenität des eingesetzten Gentherapie-Vektors dar. Um dies zu umgehen, werden Vektoren geschaffen, die in das Genom der Wirtszellen integrieren bzw. von deren Oberfläche alle nicht-essentiellen Virusproteine deletiert werden (degutting). Beispiele für Einsatzgebiete, in denen die Gentherapie künftig an Bedeutung gewinnen wird bzw. neue Behandlungsmethoden eröffnet, sind Asthma, Krebs, Osteoarthritis, Herz-/Kreislaufkrankungen und Hämophilie.

Wirkungsweise mikrobieller Enzyme als Futterzusatzstoffe



1. Einleitung

Im Futtermittelbereich werden verschiedene Produkte verwendet, die mit biotechnologischen Verfahren hergestellt werden, wobei unter Biotechnologie die Nutzung biologischer Systeme zur Stoffumwandlung verstanden wird. Diese Definition trifft bereits auf den Prozess der Silierung zu. Biotechnologische Verfahren, werden aber auch bei der Herstellung einer ganzen Reihe von Futterzusatzstoffen angewendet, wie beispielsweise Aminosäuren, Vitamine, Carotinoide, Antibiotika, Coccidiostatika, Probiotika und Enzyme. In vielen Fällen werden dabei gentechnische Methoden angewendet, wie es bei der Herstellung von Threonin, Tryptophan, Biotin, den Vitaminen B₂ und B₁₂ sowie einigen Enzympräparaten der Fall ist (Schwarz und Meyer, 1996).

Bei den Enzymen handelt es sich um eine Kategorie von Futterzusatzstoffen, die insbesondere während der letzten zwei Jahrzehnte untersucht, entwickelt und marktfähig gemacht wurden. Nach Auskunft der AWT (Stand Juni 2000) besitzen in der EU 48 Enzympräparate eine vorläufige Zulassung. Bei Zuordnung dieser Präparate nach enzymatischen Hauptaktivitäten lassen sie sich im wesentlichen den Gruppen der Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP)-hydrolysierenden Enzyme und den Phytasen zuordnen. Die Zulassungen beziehen sich auf verschiedene Kategorien der Tierarten Schwein und Hühnergeflügel.

Obwohl der Nachweis der Wirksamkeit derartiger Präparate in vielen Untersuchungen gelungen ist, sind die Wirkmechanismen nur teilweise erforscht. Anliegen dieses Beitrages ist es, den Wissensstand dazu unter Einbeziehung der Forschungsergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe darzustellen und mögliche Entwicklungstendenzen bei den Enzymen als Futterzusatzstoffe aufzuzeigen.

2. Herstellung von Enzym-Futterzusatzstoffen

Prinzipiell ist die Herstellung von Enzympräparaten aus allen lebenden Zellen mikrobiellen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs möglich. Allerdings wird bei einer derartigen Vorgehensweise die Ausbeute der gewünschten Enzyme gering sein und die Gewinnung weitgehend reiner Enzymfraktionen wäre mit erheblichem Aufwand verbunden. Dennoch wurde und wird nach dieser Technik beispielsweise Lab aus Kälbermägen oder Pankreatin aus Bauchspeicheldrüsen gewonnen. Bei den Enzymen, die als Futterzusatzstoffe eingesetzt werden, handelt es sich allerdings ausschließlich um mikrobielle Enzyme, die in Emers- oder Submersfermentationsverfahren hergestellt werden. Die Ausbeute der gewünschten Enzyme wird dabei sowohl durch konventionelle Techniken als auch durch molekularbiologische Methoden verbessert. Als konventionelle Techniken sind ein breit angelegtes Screening verschiedener Mikroorganismengattungen und -arten, Selektion auf gewünschte

Eigenschaften sowie Optimierung spezifischer Medien und Fermentationsbedingungen zu betrachten.

Molekularbiologische Methoden können sich sowohl auf die Verbesserung der Enzymausbeute beziehen als auch auf die Modifizierung der Enzymeigenschaften durch gezielte Eingriffe in die Molekülstruktur. Einige dieser Möglichkeiten sind nachfolgend aufgeführt:

- Möglichkeiten der Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Verbesserung der Ausbeute mikrobieller Enzyme bzw. zu deren »Optimierung«
- Erhöhung der Gendosis (Amplifikation des Strukturgens)
- Erhöhung der Expression eines Strukturgens durch Insertion eines geeigneten Promotors
- Übertragung eines Strukturgens in die Zellen eines effektiven Produktionsstammes (Transformation)
- Veränderung der Molekülstruktur und der biochemischen Eigenschaften
 - Konstruktion von Hybridenzymen
 - Deletion einzelner Domänen eines Gens
 - Ortsgerichtete Mutagenese (gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz)
 - Molekulare Evolution durch »error prone PCR« und »DNA shuffling« (Methoden zur Erzeugung einer Vielzahl neuer Strukturgene nach dem Zufallsprinzip)

Zunächst interessiert die Frage, welche dieser Methoden bei den gegenwärtig zugelassenen Enzympräparaten bereits angewendet werden. In Tabelle 1 sind einige mikrobielle Phytasen mit Angabe der Herkunft des Strukturgens und des Produktionsorganismus aufgeführt. All diese Phytasepräparate werden unter Anwendung gentechnischer Methoden hergestellt. Bei den Phytasen »Aspergillus A« und »Aspergillus T« handelt es sich um zugelassene Präparate, die mit einem transformierten Produktionsstamm und unter Verwendung geeigneter Promotoren hergestellt werden. Die gleichen molekularbiologischen Verfahren werden bei der Herstellung der *Peniophora*-Phytase angewendet

Tabelle 1: Charakterisierung einiger Phytasepräparate

Name der Phytase ¹⁾	Produktionsstamm/-organismus	Herkunft des Phytasegens	Aktivität [FTU/g] ²⁾
<i>Aspergillus A</i> ³⁾	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ficuum</i>	5171
<i>Aspergillus R</i> ³⁾	<i>Brassica napus</i>	<i>Aspergillus ficuum</i>	106
<i>Peniophora</i> ³⁾	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Peniophora lycii</i>	2662
<i>Aspergillus T</i> ³⁾	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	5017
<i>E. coli</i> ⁴⁾	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2035

¹⁾ Name der Phytase (intern)

²⁾ Aktivität nach eigenen Messungen

³⁾ Industrielle Herstellung

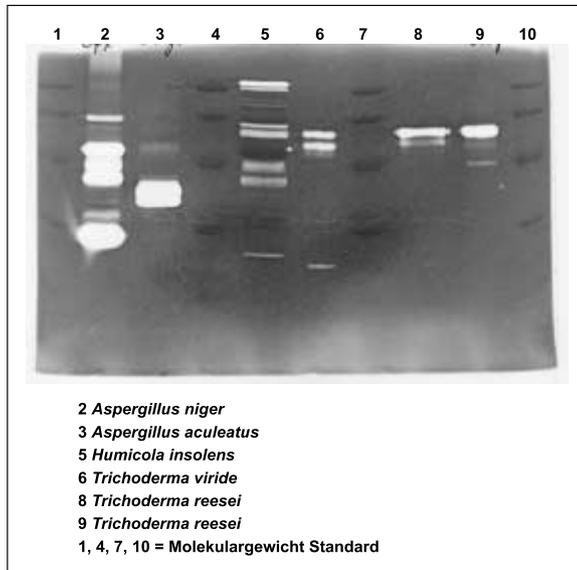
⁴⁾ Herstellung im Pilotmaßstab (Dr. Miksch, Universität Bielefeld)

(das Präparat befindet sich im Zulassungsverfahren). Bei »Aspergillus R« (Entwicklungsprodukt) handelt es sich um transgenen Raps, der eine *Aspergillus ficuum*-Phytase exprimiert. Die Samen dieses Rapses enthalten immerhin 100 IU Phytaseaktivität pro Gramm, demnach könnte ein üblicher Phytasezusatz von 500 Einheiten durch Einbeziehung von 5 g dieses Rapses pro kg Futter realisiert werden. Die *E. coli*-Phytase wurde im Pilotmaßstab hergestellt. Damit sie ins Medium abgegeben wird, musste in die *E. coli*-Zellen ein Sekretionssystem eingefügt werden (Miksch et al., 1997).

Auch bei der Herstellung von NSP-hydrolysierenden Enzymen wird in einigen Fällen mit transformierten Produktionsstämmen gearbeitet. Bei Anfertigung von Zymogrammen sind derartige gentechnisch hergestellte Produkte in der Regel durch die starke Dominanz einer aktiven Bande zu erkennen (Abbildung 1). Die hellen Flecken in den Zymogrammen weisen in diesem Falle Enzyme mit β -Glucanaseaktivität nach und die Höhe der Bande resultiert aus den unterschiedlichen Molekulargewichten. Es ist deutlich zu erkennen, dass in einigen Enzympräparaten eine Vielzahl von Isoenzymen mit β -Glucanaseaktivität vorkommen, während in anderen lediglich eine Bande nach SDS-PAGE-Trennung nachweisbar ist.

Abschließend zu diesem Abschnitt kann festgestellt werden, dass bei der Herstellung von Enzymen, die als Futterzusatzstoffe eingesetzt

Abbildung 1: Zymogramm – SDS/PAGE Gel mit Lichenin als Substrat



werden, gentechnische Methoden bereits angewendet werden. Bei der Konfektionierung der Handelsprodukte werden aber Aufreinigungsschritte einbezogen, die garantieren, dass die Produkte frei vom Produktionsorganismus sind. Bei einem zukünftig möglichen Einsatz von Samen transgener Pflanzen als Enzymquelle wird zwar dafür seitens der Hersteller gesorgt werden, dass keine Keimfähigkeit mehr vorliegt, das modifizierte Genom wäre dann aber Bestandteil des Futters.

Meines Kenntnistandes nach sind bei keinem der zur Zeit zugelassenen Enzyme Veränderungen an der Molekülstruktur vorgenommen worden, d. h. auch bei Anwendung gentechnischer Methoden bei der Herstellung handelt es sich stets um Enzyme, die in der gleichen molekularen Struktur in der Natur vorkommen. Auf Möglichkeiten der gezielten Modifikation von Enzymen wird im letzten Abschnitt eingegangen.

3. Wirkungsweise NSP-hydrolysierender Enzyme

Diese Enzyme werden in Rationen für Ferkel und Küken eingesetzt und katalysieren die partielle Hydrolyse von Polysacchariden, die durch körpereigene Enzyme nicht gespalten werden können. In Getreidekörnern sind die drei Hauptfraktionen der NSP die Cellulose, die (1–3, 1–4)- β -Glucane (weiterhin nur als » β -Glucane« bezeichnet) und die Pentosane in Form von Arabinoxylanen enthalten. Allen gemeinsam ist, dass sie nur mikrobiell abgebaut werden können und daher energetisch vom monogastrischen Tier nur zu dem Anteil genutzt werden können, der in Form kurzkettiger Fettsäuren im Dickdarm resorbiert wird. Darüber hinaus können lösliche β -Glucane und Pentosane auf Grund ihrer viskositätserhöhenden Eigenschaften in wässrigen Lösungen antinutritive Eigenschaften entfalten. Aus diesem Grunde enthalten sogenannte »NSP-Enzympräparate« Enzymaktivitäten, welche entweder die β -Glucane (β -Glucanasen) oder Arabinoxylane (Xylanasen) partiell hydrolysieren bzw. sie enthalten Enzyme beider Kategorien. Ein Modell dazu ist in Abbildung 2 dargestellt. Diese Enzymaktivitäten kommen in vielen Präparaten kombiniert vor; es gibt aber auch Präparate, die ausschließlich oder mit starker Dominanz eine der genannten Akti-

Abbildung 2: Modell zur Wirkungsweise einiger NSP-hydrolysierender Enzyme

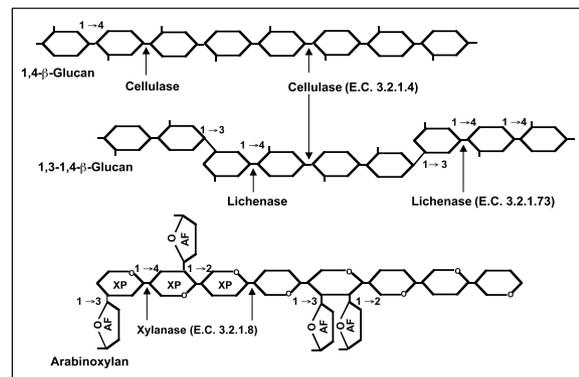
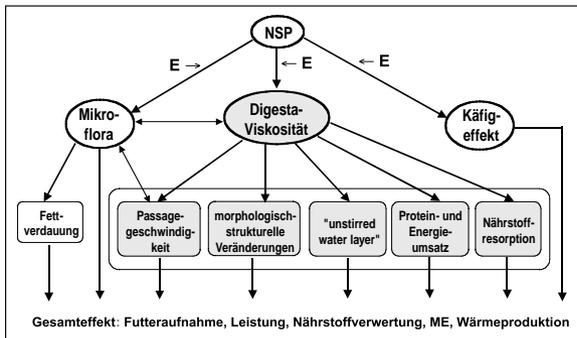


Abbildung 3: Mögliche Wirkungsebenen von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und NSP-hydrolysierenden Enzymen (E)



vitäten enthält. Die Hauptaktivität richtet sich nach Art der Ration, die supplementiert wird, da die Zielsubstrate in Roggen, Triticale und Weizen primär Arabinoxylane und in Gerste und Hafer insbesondere β -Glucane sind.

Der Zusatz von Enzympräparaten dieser Art kann besonders bei Mastküken zu Verbesserungen von Leistungsparametern (Lebendmassezunahme, Futtermittelverbrauch) und zu einer Anhebung der umsetzbaren Energie der Gesamtration führen. Die Mechanismen, die zum Gesamteffekt führen können, sind in Abbildung 3 dargestellt. Sie sind teils belegt, teils hypothetisch und noch Gegenstand der Forschung.

Die Basis der Wirkung NSP-hydrolysierender Enzyme ist die partielle Hydrolyse der Substrate, wobei ein Abbau bis zu resorptionsfähigen Verbindungen nicht erfolgt, da es sich um Endoenzyme handelt. Dies trifft sowohl für die Fraktion der unlöslichen als auch der löslichen NSP zu. Der Abbau unlöslicher NSP wurde tierexperimentell sowohl bei Broilern (Pettersson und Aman, 1989) als auch bei Ferkeln (Haberer, 1997) und auch in einem *in-vitro*-Modell (Aulrich und Flachowsky, 2000) nachgewiesen. Da unlösliche NSP stabilisierende Strukturen der Pflanzenzellwände bilden, wird davon ausgegangen, dass deren Solubilisierung die Zu-

gänglichkeit der Zellinhaltsstoffe für alle Verdauungsenzyme fördert und dadurch die präcaecale Nährstoffverdaulichkeit erhöht wird. Dieser Teilbeitrag an der Gesamtwirkung ist unbestritten, kann aber kaum quantifiziert werden. Er wird häufig als das Aufweichen eines »Käfigeffektes« beschrieben.

Der Abbau löslicher NSP, der mit einer Viskositätssenkung im Lumen des vorderen Verdauungstraktes verbunden ist, scheint allerdings von größerer Bedeutung zu sein. Sowohl bei Broilerküken als auch bei Ferkeln ist der viskositätssenkende Effekt entsprechender Enzymzusätze nachweisbar, wobei eine Viskositätssteigerung im vorderen Verdauungstrakt durch NSP und damit die Möglichkeit, diese durch Enzymzusätze zu senken, bei Broilerküken wesentlich mehr ausgeprägt ist als bei Ferkeln.

Mit einer Viskositätssenkung im Dünndarmbereich wurde in zahlreichen Untersuchungen eine Verbesserung der präcaecalen Nährstoffverdaulichkeit beobachtet. Im Gegensatz zur Wirkung über den Käfigeffekt hat die Viskositätssenkung nicht nur eine Wirkung auf die Zellinhaltsstoffe des Getreides, sondern auf alle Nährstoffe der Ration. Dies ist besonders deshalb von Bedeutung, weil bei erhöhter Digestiviskosität die Fettresorption am stärksten gesenkt wird (Dänicke et al., 1997, 1999) und Fettzusätze von 8 bis 10% in Broilerrationen üblich sind. Die übrigen in der Abbildung 3 dargestellten Mechanismen, über die eine Viskositätssenkung wirken könnte, sind noch wenig belegt. Morphologische und histologische Veränderungen im Dünndarm durch viskositätsbildende NSP in der Diät wurden für Ratten beschrieben (Ikegami et al., 1990). Beobachtet wurden vor allen Dingen erhöhte relative Organmassen von Dünndarm, Caecum und Pankreas und eine stimulierte Pankreassekretion. Eine Erhöhung der relativen Masse der Gewebe des Verdauungstraktes bei unverändertem Proteingehalt durch Erhöhung der Digestiviskosität wurde auch bei Broilern beobachtet (z. B. Van der Klis und Van Voorst, 1993; Veldman und Vahl, 1994). Da diese

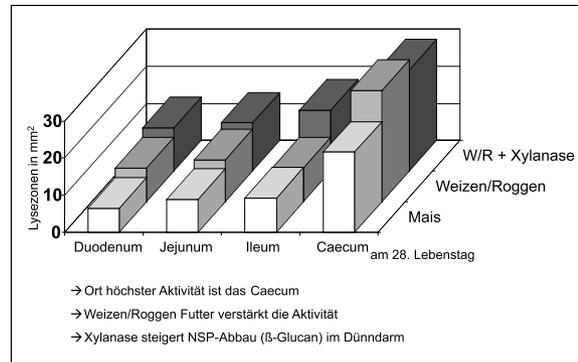
Gewebe einen sehr hohen Proteinumsatz haben (20 bis 30 % der gesamten Proteinsynthese des Organismus), ist zu vermuten, dass mit einer erhöhten relativen Masse dieser Organe auch der Energieumsatz und die Wärmeproduktion erhöht werden. Anhand einer Modellrechnung (Simon, 1998) wird bei einer Erhöhung der relativen Masse des Verdauungstraktes beim Broiler von 30 % mit einer Steigerung der Wärmeproduktion von 5 % gerechnet. Bei dieser Modellrechnung wurde eine unveränderte fraktionelle Proteinsyntheserate unterstellt. Es gibt aber Hinweise, dass sowohl die Proliferationsrate der Mucosazellen als auch die fraktionelle Proteinsyntheserate unter ähnlichen Bedingungen bei Ratten erhöht sind (Southon et al., 1985), so dass der Einfluss auf den Energieumsatz noch größer sein könnte. Entsprechende Messungen an Broilern haben ergeben, dass bei einer Digestaviskosität der Jejunumdigesta von 206 mPas die Proteinsynthese des Jejunumgewebes 3,28 g pro Tag und kg Lebendmasse betrug und dass die Senkung der Viskosität durch Xylanasezusatz auf 91 mPas eine signifikante Reduzierung der Syntheserate auf einen Wert von 1,98 bewirkte (Dänicke et al., 2000).

Ein weiterer Effekt von NSP in der Ration bzw. von NSP-hydrolysierenden Enzymen wird über die Beeinflussung der Intestinalflora vermutet. Nach theoretischen Erwägungen könnte das durchaus der Fall sein. Folgende Zusammenhänge sind denkbar:

Durch Viskositätssenkung

- Beschleunigung der Digestapassage: → ungünstige Entwicklungsbedingungen für Keime mit langen Generationszeiten
- Verbesserte praecaecale Verdaulichkeit: → vermindertes Nährstoffangebot zum Dünndarmende hin
- Reduzierte Darmlänge: → reduzierter Besiedlungsraum
- Veränderte Assoziations- und Anheftungsbedingungen an der Darmwand (auch durch Beeinflussung der Mucinbildung möglich).

Abbildung 4: Bakterielle Aktivität von β -Glucanasen (nach HÜBENER et al., 1999)



Aber auch unabhängig von der Beeinflussung der Viskosität sind Einflüsse auf die Darmflora denkbar. Durch Solubilisierung unlöslicher und Bildung kleinerer NSP-Bruchstücke könnte eine auf NSP-Abbau spezialisierte Mikroorganismenpopulation im Dünndarmbereich »aufrücken« und insgesamt zu einer Verschiebung des Artenspektrums führen. Diese Hypothese wird durch Untersuchungsergebnisse an Broilern gestützt. Bei Zusatz einer reinen Xylanase zu einer Weizen/Roggen basierten Ration wurde eine Erhöhung der β -Glucanaseaktivität im Dünndarmbereich beobachtet (Hübener et al., 1999; Abbildung 4). Da diese spezifische Enzymaktivität nur von Mikroorganismen im Darm exprimiert werden kann, ist auf eine Verschiebung des Artenspektrums zu schließen. Dass durch Zusätze von NSP-hydrolysierenden Enzymen die Keimzahl einiger Bakteriengruppen beeinflusst werden kann, ist mit konventionellen Methoden nachgewiesen (Vahjen et al., 1998). Bei zukünftigen Untersuchungen müssen aber insbesondere Fragen der physiologischen Leistungen der Intestinalflora, einschließlich Toxinbildung sowie Pathogenität im Vordergrund stehen, um Verschiebungen der Mikroorganismenpopulation in ihrer Konsequenz für das Tier besser einschätzen zu können.

4. Wirkungsweise von Phytasen

Phytasen sind als Futterzusatzstoff in Deutschland schon seit 1992 zugelassen und sind vor allen Dingen Bestandteil von Rationen für Schweine. Sie sind aber auch bei Geflügel gleichermaßen wirksam. Es handelt sich ebenfalls um Enzyme, die vom tierischen Organismus nicht gebildet werden, wohl aber von Pflanzen und Mikroorganismen. Die Wirkung der Phytasen basiert auf der Abspaltung von Phosphorsäureresten der Phytinsäure. Da in pflanzlichen Futtermitteln 50 bis 80 % des Phosphors als Phytin-P vorliegen, kann durch Einsatz mikrobieller Phytasen die Phytin-P-Verdaulichkeit bei Schweinen und Geflügel wesentlich erhöht werden. Wenn gleichzeitig mit dem Zusatz der Phytasen die Phosphorzufuhr mit der Mineralstoffmischung reduziert wird, kann die Phosphorausscheidung dieser Tierarten unter praktischen Bedingungen um 25 bis 40 % vermindert werden, was in Regionen mit hohem Tierbesatz von großer ökologischer Relevanz ist. Ein Beispiel zur Wirksamkeit eines Phytasezusatzes ist in Abbildung 5 dargestellt. Da Phytinsäure mit zweiwertigen Kationen schwerlösliche Komplexe bildet (Phytat), ist bei Phytaseinsatz gleichzeitig eine Erhöhung der Verwertbarkeit von Calcium, Magnesium und Zink zu beobachten (Pallauf und Rimbach, 1997).

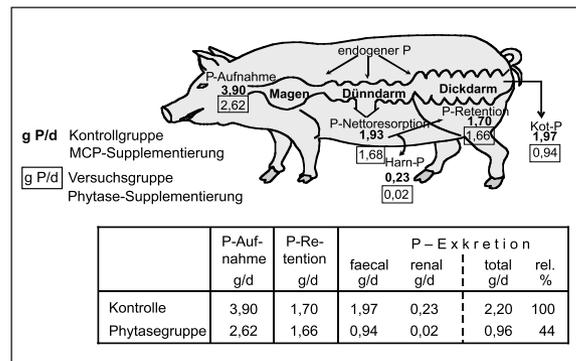
Da über die Wirkung von Phytasen ein umfangreiches Schrifttum vorliegt, wird auf weitere Ausführungen hierzu an dieser Stelle verzichtet. Auf einige Besonderheiten und mögliche Entwicklungen bezüglich der Phytasen wird aber im nächsten Abschnitt eingegangen.

5. Mögliche Entwicklungstendenzen bei den Enzymen als Futterzusatzstoffe

Obwohl die Anzahl als Futterzusatzstoffe zugelassener Enzyme bereits groß ist, wird es auf diesem Gebiet entscheidende Weiterentwicklungen geben. Nachfolgend werden einige Beispiele dargestellt.

Zunächst soll diskutiert werden, ob die heute verfügbaren Phytasepräparate verbessert werden

Abbildung 5: P-Bilanz von Ferkeln (15 kg Lebendmasse) bei Verabreichung einer Mais/Soja-Ration mit P-Zusatz in Form von Monocalciumphosphat (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 1000 U/kg Phytase (Versuchsgruppe) (nach PALLAUF und RIMBACH, 1997)

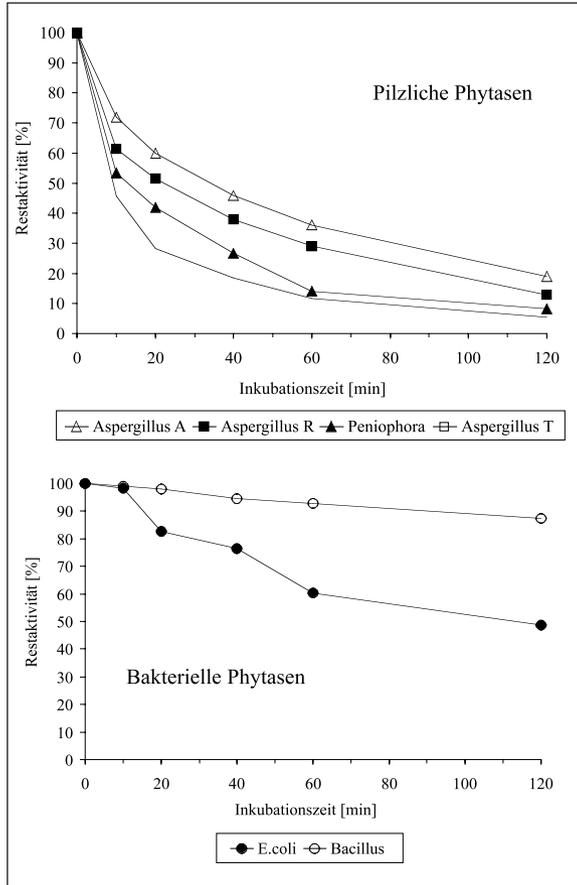


könnten. Dazu ist es erforderlich, die Anforderungen an Futterzusatz-Enzyme den Eigenschaften der Enzyme gegenüberzustellen. Da diese Enzyme Mischfutterkomponenten sind und diese meist pelletiert werden, sollten die Enzyme unter Pelletierbedingungen nicht inaktiviert werden. Des Weiteren ist der Wirkungsort der Enzyme der Verdauungstrakt. Demnach besteht als eine weitere Anforderung an die Enzyme, dass sie bei der Passage durch den Verdauungstrakt nicht einer sehr schnellen Inaktivierung unterliegen, sondern intakt die Hauptwirkungsorte erreichen.

In unserem Institut wurden einige Untersuchungen zur thermischen und proteolytischen Stabilität von Phytasen durchgeführt. Dabei wurden neben industriell hergestellten pilzlichen Phytasen auch bakterielle Phytasen, die aus der universitären Forschung stammen, geprüft. Die *E. coli*-Phytase wurde von Dr. Miksch (Universität Bielefeld) und die *Bacillus*-Phytase von Dr. Farouk und Prof. Borriß (Humboldt-Universität Berlin) bereitgestellt.

Zunächst wurde die Temperaturstabilität der Enzyme in wässrigem Medium jeweils im pH-

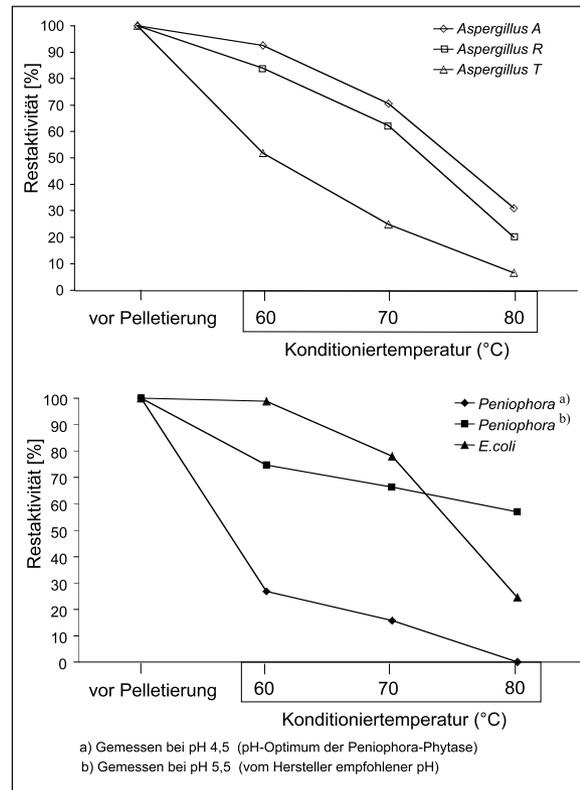
Abbildung 6: Hitzeinaktivierung verschiedener Phytasen in wässrigen Medien bei 60°C (IGBASAN et al., 2000)



Optimum der Enzyme gemessen (Beispiel 60°C: Abbildung 6). Es ist zu erkennen, dass bei den pilzlichen Phytasen hinsichtlich der Temperaturstabilität erhebliche Unterschiede bestehen, die sowohl von der Herkunft der Strukturgenen als auch von dem Expressionssystem beeinflusst werden. Ferner wird deutlich, dass die Bacillus-Phytase in dieser Hinsicht

allen anderen Phytasen überlegen ist. Eine wichtige Frage ist, inwiefern derartige Messungen auch aussagefähig hinsichtlich der Stabilität während des Pelletierens sind. Daher wurden unter kontrollierten Temperaturbedingungen im Konditioneur mit den gleichen Enzymen Pelletierversuche durchgeführt. Das *Bacillus*-Enzym stand allerdings dafür nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Für die *Aspergillus*-Phytasen (Abbildung 7) ergibt sich bei den Inaktivierungskurven die gleiche Reihenfolge,

Abbildung 7: Restaktivität [%] verschiedener Phytasen nach dem Pelletieren in Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur (nach IGBASAN et al., 2000)



wie bei den Messungen in wässrigem Medium. Darüber hinaus werden die Unterschiede zwischen den Enzymen und die insgesamt noch nicht ausreichende Temperaturstabilität deutlich. Die *Peniophora*-Phytase wurde im pH-Optimum (4,5) und beim pH gemäß VDLUFA-Methoden (5,5) gemessen. Die unter diesen beiden Bedingungen gemessenen Verläufe unterscheiden sich extrem und legen die Vermutung nahe, dass mindestens zwei Phytasen mit unterschiedlichem pH-Optimum und unterschiedlicher Stabilität im Präparat vorliegen.

Um die Stabilität der Phytasen im Verdauungstrakt abzuschätzen, wurden sie mit Digesta aus Magen bzw. Dünndarm inkubiert und die Restaktivität nach 60 Minuten gemessen (Tabelle 2). Nach den Ergebnissen hat die *E. coli*-Phytase die höchste Stabilität unter den Bedingungen des Magens, so dass eine langsamere Inaktivierung im Magen und damit eine höhere Wirksamkeit bei der Magenpassage zu erwarten ist.

Diese Untersuchungen am Beispiel der Phytasen verdeutlichen, dass selbst bei der Suche nach weiteren natürlich vorkommenden Enzymen solche mit besseren Eigenschaften im Sinne der Anforderungen an Futterzusatzstoffe gefunden werden und dass zukünftig auch bakterielle Phytasen als Futterzusatzstoffe eine Rolle spielen könnten.

Eine weitere Frage, die für die Einschätzung zukünftiger Entwicklungen von Bedeutung ist, betrifft die Erwartungen, die an gezielte Veränderungen der Moleküle durch molekularbiologische Methoden gestellt werden können. Arbeiten dieser Art sind schon vor längerer Zeit mit β -Glucanasen durchgeführt worden, allerdings für andere potentielle Anwendungsgebiete, nämlich das Brauwesen. β -Glucanasen wurden in einigen Ländern im Maischprozess eingesetzt, um einen Teil des Malzes durch Gerstenrohfrucht ersetzen zu können, ohne einen Viskositätsanstieg in Kauf nehmen zu müssen. Erhöhte Viskositäten erschweren das Abtrennen der Würze und das Filtrieren des Bieres. Da beim Maischen ein abgestuftes Aufheizen statt-

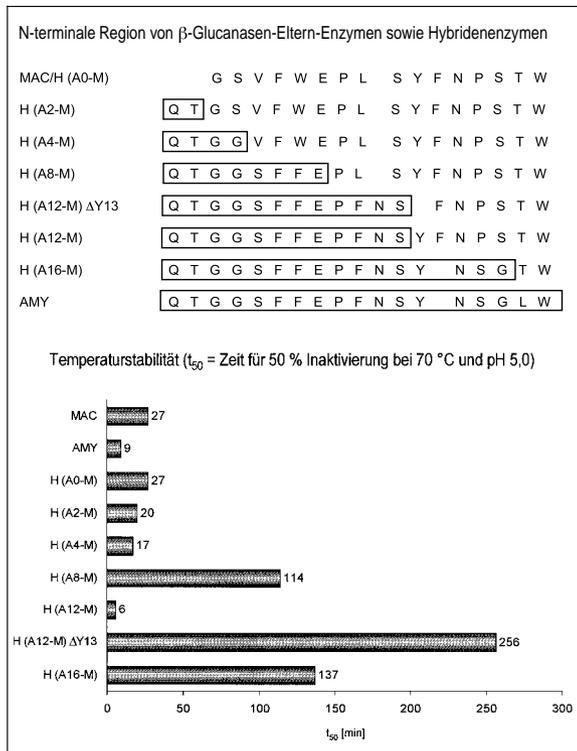
Tabelle 2: Restaktivität [%] mikrobieller Phytasen nach 60 min Inkubation mit Digesta aus Magen und Dünndarm von Hühnern

Name der Phytase ¹⁾	Magen	Jejunum
<i>Aspergillus A</i>	60,4	60,2
<i>Aspergillus R</i>	67,8	90,0
<i>Peniophora</i>	59,2	91,1
<i>Aspergillus T</i>	56,8	42,9
<i>E. coli</i>	92,8	86,7
<i>Bacillus</i>	70,8	91,5

findet, war die Suche nach thermostabilen β -Glucanasen eine wesentliche Zielstellung. Eine Methode zur Gewinnung von Enzymen mit diesen Eigenschaften bestand in der Konstruktion von sogenannten Hybridenzymen. Eine ganze Reihe von Hybrid- β -Glucanasen entstand durch Kombination unterschiedlicher Anteile der β -Glucanase-Strukturgene von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Dabei stellte sich heraus, dass Hybridenzyme mit der N-terminalen Aminosäuresequenz von 16 oder 36 Aminosäuren von *B. amyloliquifaciens* und dem Restmolekül von *B. macerans* wesentlich temperaturstabiler waren als die Elternenzyme (Olsen et al., 1991).

In Fortführung dieser Arbeiten wurde eine große Anzahl weiterer Hybrid- β -Glucanasen konstruiert, wovon einige durch ortsgerichtete Mutagenese weiter modifiziert wurden (Politz et al., 1993; Abbildung 8). In der Abbildung sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Elternenzyme (MAC und AMY) sowie von Hybrid-Konstrukten im Einbuchstaben-Code für Aminosäuren angegeben. Bei den Bezeichnungen für die Hybridenzyme stehen »H« für Hybridenzym, »A« + Zahl für die Anzahl N-terminaler Aminosäuren nach der Aminosäuresequenz der *B. amyloliquefaciens*- β -Glucanase und »M« für die Restsequenz bis zum C-Terminus entsprechend der β -Glucanase von *B. macerans*. Im unteren Teil der Abbildung ist zunächst die bereits vorhin erwähnte Temperaturstabilitätssteigerung bei H(A16-M) gegenüber den Elternenzymen zu er-

Abbildung 8: Hybridenzyme und deren Temperaturstabilität (nach POLITZ et al., 1993)



kennen. Es wird aber auch deutlich, in welcher extremen Weise die Temperaturstabilität eines Enzyms durch Veränderung einer einzigen Aminosäureposition im Molekül bewirkt werden kann. Das Hybridenzym H (A12-M) erwies sich als sehr temperaturempfindlich. Allein durch Entfernen einer Aminosäure (Tyrosin in Position 13; H (A12-M) δ Y13) konnte die Temperaturstabilität von 6 Minuten (50%-Inaktivierung bei 70 °C) auf 256 Minuten erhöht werden. Die Deletion von Y13 ist nicht zufällig erfolgt, sondern in Auswertung des Strukturmodells der *Bacillus*- β -Glucanase, das zu

dem Zeitpunkt bereits vorlag (Keitel et al., 1993). Insofern kann man in diesem Falle bereits von einem »protein engineering« sprechen.

Die Beispiele zu den Möglichkeiten, durch breites Screening oder durch Anwendung molekularbiologischer Methoden neue Enzyme für den Einsatz als Futterzusatzstoffe zu finden oder zu konstruieren, verdeutlichen, dass wir mit dieser Art von Produkten vermutlich erst am Anfang einer Entwicklung stehen.

Literaturverzeichnis

- Aulrich, K. and Flachowsky, G. (2000) Studies on the mode of action of non-starch-polysaccharides (NSP)-degrading enzymes *in vitro*. 2. Effects on nutrient release and hydration properties. *Archives of Animal Nutrition*, **53** (in press).
- Dänicke, S., Simon, O., Jeroch, H. and Bedford, M. R. (1997 b) Interactions between dietary fat type and xylanase supplementation when rye-based diets are fed to broiler chickens. 2. Performance, nutrient digestibility and the fat-soluble vitamin status in livers. *British Poultry Science*, **38**, 546-556.
- Dänicke, S., Jeroch, H., Simon, O. and Bedford, M. R. (1999 a) Interactions between dietary fat type and exogenous enzyme supplementation of broiler diets based on maize, wheat, triticale or barley. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **8**, 467-483.
- Dänicke, S., Jeroch, H., Böttcher, W., Bedford, M. R. and Simon, O. (1999 b) Effects of dietary fat type, pentosan level and xylanases on digestibility of fatty acids, liver lipids and vitamin E in broilers. *Fett/Lipid*, **101**, 90-100.
- Dänicke, S., Böttcher, W., Jeroch, H., Thielebein, J. and Simon, O. (2000) Replacement of soybean oil with tallow in rye-based diets without xylanase increases protein synthesis in small intestine of broilers. *American Society for Nutritional Sciences*, accepted.
- Haberer, B. (1997) Untersuchungen zur Wirkung eines Zusatzes Nicht-Stärke-Polysaccharid (NSP)-spaltender Enzyme auf Fraktionen der NSP und weitere Nährstoffe im Verdauungstrakt von Schweinen. Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation.
- Hübener, K., Vahjen, W. and Simon, O. (1999) Einflüsse eines Xylanasezusatzes auf die Mikroflora des Intestinaltraktes beim Broiler. 5. Tagung - Schweine- und Geflügelernährung, Wittenberg. Proceedings, S. 142-146.
- Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H., Tsuchihashi, N., Nishide, E. and Innami, S. (1990) Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. *Journal of Nutrition*, **120**, 353-360.
- Keitel, T., Simon, O., Borriss, R. and Heinemann, U. (1993) Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 5287-5291.
- Miksch, G., Fiedler, E., Dobrowolski, P. and Friehs, K. (1997) The *kil* gene of the Col E1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth-phase-dependent promoter mediates the secretion of a heterologous periplasmic protein during the stationary phase. *Archives of Microbiology*, **167**, 143-150.

- Olsen, O., Borriss, R., Simon, O. and Thomsen, K.K. (1991) Hybrid Bacillus (1-3, 1-4)- β -glucanases: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Molecular and General Genetics*, **225**, 177-185.
- Pallauf, J. and Rimbach, G. (1997) Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition*, **50**, 301-319.
- Pettersson, D. and Åman, P. (1989) Enzyme supplementation of a poultry diet containing rye and wheat. *British Journal of Nutrition*, **62**, 139-149.
- Politz, O., Simon, O., Olsen, O. and Borriss, R. (1993) Determinants for the enhanced thermostability of hybrid (1-3, 1-4)- β -glucanases. *European Journal of Biochemistry*, **216**, 829-834.
- Schwarz, G. and Meyer, J. (1996) Bio- und gentechnisch gewonnene Produkte in der Landwirtschaft. Sonderdruck aus *Kraftfutter*, 2-15.
- Simon, O. (1998) The mode of action of NSP hydrolyzing enzymes in the gastrointestinal tract. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **7**, 115-123.
- Southon, S., Livesey, G., Gee, J. M. and Johnson, I.T. (1985) Differences in intestinal protein synthesis and cellular proliferation in well-nourished rats consuming conventional laboratory diets. *British Journal of Nutrition*, **53**, 87-95.
- Vahjen, W., Gläser, K., Schäfer, K. and Simon, O. (1998) Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *Journal of Agricultural Science*, **130**, 489-500.
- Van der Klis, J.D. and Van Voorst, A. (1993) The effect of carboxymethylcellulose (a soluble polysaccharide) on the rate of marker excretion from the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*, **72**, 503-512.
- Veldman, A. and Vahl, H. A. (1994) Xylanase in broiler diets with differences in characteristics and content of wheat. *British Poultry Science*, **35**, 537-550.

Diskussion



KLOSTERMEYER

Verstehen Biologen nicht mehr die Funktion der Niere? Dieses Organ arbeitet, um den osmotischen Druck in allen Körperzellen gleich einzustellen. Wie sauber das Organ arbeitet, sehen wir am Gefrierpunkt der Milch, der als konstanteste Größe für uns eine Messgröße des osmotischen Drucks ist. Er stammt in der Milch zu $\frac{3}{5}$ aus Lactose, $\frac{1}{5}$ Chlorid plus Gegen-Ion. Die Beseitigung der Lactose müsste den Chloridgehalt auf das Vierfache erhöhen, was für die Niere unmöglich ist.

Nun zum β -Lactoglobulin. Echte Milchallergiker sind bisher noch nicht gefunden. Am Biederstein in München, in einer der größten allergologischen Kliniken, haben wir seit Jahren keine Blutsera von echten Milchallergikern gefunden, an denen z. B. die Fa. Nestlé ihre antiallergische Babynahrung testen kann. Bisher werden nur die Proteine so weit zerkleinert, dass allergische Reaktionen ausgeschlossen werden können. Vor 10 bis 12 Jahren waren unter 16.000 kontrollierten Allergikern 12 Milchproteinallergiker gefunden worden. Wir haben inzwischen 30 Seren, von denen leider eines HIV-positiv ist. Das Problem liegt offensichtlich nicht darin, dass man echter Milchallergiker wird, sondern darin, dass Leute eine Art Allergie durchlaufen und später Allergiker gegen alles andere werden. Diesen frühen Mechanismus, der zur Allergie führt, sollte man studieren, bevor man das β -Lactoglobulin aus der Milch entfernt. Es sei daran erinnert, dass das β -Lactoglobulin in der Milch von Wiederkäuern ist,

weil diese eine Pansenphysiologie haben und Substanzen mit Doppelbindungen vor der Hydrogenierung schützen müssen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob ein Kalb mit Milch ohne β -Lactoglobulin aufgezogen werden kann.

KRÄUBLICH

Zum β -Lactalbumin hat Schrezenmeir vorgeschlagen, dass man die allergenen Sequenzen in diesem Gen, also nicht das ganze Gen, knocked. Dies ist meines Wissens nur ein Vorschlag, ein entsprechendes Experiment habe ich noch nicht gesehen.

MÜLLER

Die Münchener Studien kenne ich nicht, ich kenne nur eine Liste der WHO mit β -Lactoglobulin als Nummer 1. Mein Hauptpunkt ist, dass wir versuchen sollten, die wunderschönen österreichischen Almen der österreichischen Farmer dazu herzunehmen, um Nutraceuticals mit dem positiv besetzten Begriff des Biobauerntum zu verbinden. Es muss ja nicht β -Lactoglobulin sein, mit der Milchdrüse kann man auch andere wunderschöne Nutraceuticals erzeugen.

STÖVE-SCHIMMELPFENNIG

Sicherlich erscheint es sinnvoll, Bullen als Anlageträger mit Erbfehlern in kleinen, geschlossenen und vom Aussterben bedrohten Populationen zu halten.

Ist das aber nicht eine risikoreiche Zuchtstrategie in großen Populationen mit weltweit viel Varianz, wie Schwarzbunten, – wenn man Bullen mit Erbfehlern, insbesondere mit Letalfaktoren hält? Dies impliziert für die Zukunft, dass wir erstens abhängig werden von gentechnologischen Tests, und zweitens dann irgendwann die gesamte weibliche Basis testen müssen. Dies wird ein enormer ökonomischer Faktor für die praktische Tierzucht sein. Impliziert dies nicht drittens, dass massive Probleme erst nach der eigenen Pensionierung auftreten?

ERHARDT

Ihre Gendiagnose kann Variabilität erhalten in Populationen, die vom Aussterben bedroht sind. Es ist umstritten, ob es notwendig ist, in großen Populationen HF Anlageträger zu belassen. Wenn wir nur wenige Fehler kennen, können wir die Träger dieser Anlagen leicht von der Fortpflanzung ausschließen. Wenn wir jedoch eine Vielzahl von Erbdefekten kennen, wird die Frage nach der Reaktion auf diese Kenntnis schwieriger.

BREM

Wenn man Anlageträger in der Zucht belässt, bedeutet es nicht, dass sie flächendeckend eingesetzt werden. In einer kleinen Population, wie dem Braun-Vieh kann man es sich einfach nicht leisten, auf Vaterlinien die Anlageträger sind, ganz zu verzichten. Man behält also diese Tiere unter kontrolliertem Einsatz, d. h. man produziert eine Gruppe von Nachkommen im Prüfeinsatz, von denen die weiblichen Tiere nicht zur Zucht verwendet werden. Alle männlichen Tiere werden getestet, und die Hälfte der Söhne ist frei von diesem Anlageträger. Mit diesen Tieren kann weitergearbeitet werden, während die anderen geschlachtet werden. Damit wird das genetische Potential dieser Linie erhalten und der Erbfehler ist beseitigt.

STÖVE-SCHIMMELPFENNIG

Ich wende mich nur dagegen, dass in großen Populationen wie HF oder Schwarzbunte Träger von

Anlagen für Letalfaktoren zwar markiert, aber trotzdem eingesetzt werden. Bei Gesprächen mit Praktikern habe ich durchaus das Gefühl, dass nicht jeder begriffen hat, welche Konsequenzen der Einsatz eines solchen Bullen hat.

STEINHART

Alle Projekte, die in den vergangenen zwei Jahren zum Thema Gentechnik und Tiere beim Bundesforschungsministerium im Rahmen der Leitprojekte eingereicht worden sind, sind abgelehnt worden. Entwicklungen in den Bereichen Novel Food oder Medical Food oder Nutraceuticals sind derzeit also politisch nicht durchsetzbar. Der Begriff der Nutraceuticals wurde einfach aus dem chinesisch-japanischen Kulturkreis übernommen, zunächst bei den Amerikanern und dann bei uns als Functional Food. Lebensmittelproduzierende Firmen verwenden diese Ausdrücke allerdings bewußt nicht, sie reden von »Lebensmittel mit einem Zusatznutzen«. Nutraceuticals wird es weder in 3 noch in 20 oder in 50 Jahren in der EU geben. Alle, die auf dem Gebiet der Lebensmittel arbeiten, scheinen sich dahingehend einig, dass Lebensmittel keine Arzneimittel sein sollen. Eine Definition der Lebensmittel gibt es nicht in der EG, wohl aber im deutschen Lebensmittelbedarfsgegenstände-Gesetz. Danach wären Nutraceuticals nicht möglich. Möglich wären »Lebensmittel mit einem Zusatznutzen«, aber der schon zitierte Antrag von Herrn Schrezenmeir ist auch nicht durchgekommen. Entsprechenden Erfolgen steht seit zwei Jahren die Novel-Food-Verordnung entgegen. Hiernach muss bei jedem neuartigen Lebensmittel, das sich substantiell von einem anderen Lebensmittel unterscheidet, erstens die toxikologische Unbedenklichkeit nachgewiesen werden. Zweitens muss die Funktionalität nachgewiesen werden, und bei beiden weiß man noch nicht genau, wie dies funktionieren soll. Bis in den wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss hinein ist kürzlich über Phytosterine diskutiert worden. Hier ging es um die Frage, ob Phytosterol-Ester möglicherweise toxikologisch relevant sind, obwohl Phytosterole es

selbst nicht sind. Obwohl wir im Körper Esterasen zur Spaltung praktisch jeden Esthers haben, wurde diese Frage erst nach großem Aufwand beantwortet. Den Gedanken von Herrn Klostermeyer zu den Allergenen schließe ich mich an. Das Problem ist nicht einfach durch einige Manipulationen an einem Protein zu erledigen. Weder vom Lactoglobulin noch vom Kasein noch von irgendeinem anderen weltweit beschriebenen Allergen gibt es ein Epitop. Voraussetzung für die Änderung an einem Allergen ist allerdings die Kenntnis des Epitops. Die völlige Entfernung aus dem Stoffwechsel bedeutet einen so tiefgehenden Eingriff, dass die Folgen kaum vorhersehbar sind. Über Kreuzreaktion können Sequenzen von Allergenen identifiziert werden. Wir unterscheiden Sequenzallergene und Konfirmationsallergene und allein schon durch die Veränderung der Struktur eines Proteins können neue Allergene entstehen. Die Probleme Allergenität einerseits und Gentechnologie andererseits sollten im jetzigen Diskussionsstand nicht miteinander kombiniert werden.

SEELAND

Herr Kräußlich, Sie haben darauf hingewiesen, dass trotz intensiver Selektion bei den landwirtschaftlichen Nutztieren kein genetisches Plateau eingetreten ist, und dies heißt, dass die genetische Varianz nicht erschöpft ist. Nach den mathematisch-statistischen Gesetzen ist aber zu erwarten, dass die Varianz abnimmt. Kann es einen biologischen Mechanismus geben, der die Varianzen nun nicht so stark abnehmen lässt, wie eigentlich erwartet? Herr Fries meinte gestern, es gäbe Arbeiten bei *Drosophila* und bei Mäusen, in denen diese Abnahme nachgewiesen werde. Eine Rolle spielt vielleicht auch, dass der Mittelwert im Rahmen der Selektion angehoben wird, und dass die Varianzen ja auch vom Mittelwert abhängig sind und deshalb nicht so stark abnehmen.

KRÄÜBLICH

Ich habe die Arbeit von Flock zitiert, es gibt entsprechende weitere Arbeiten. Es gibt also Fälle, in

denen die Variation erschöpft ist, aber bei einer ganzen Reihe von Fällen hat sich die genetische Variation erweitert. Rutherford and Lindquist haben über die stummen Gene publiziert. Wie schon länger für *Drosophila* und auch für Silberfische bekannt, gibt es einen Mechanismus, der vor allen Dingen unter Stressbedingungen die Gene wieder aktiviert. Dies gilt in erster Linie für Erbfehler, aber nach der Embryologin Mac Larren gibt es auch in der Tierzucht Prozesse, die die genetische Variation erweitern. Dies muss nicht zu Erbfehlern führen, bewiesen ist nur, dass diese stummen Gene aktiviert werden können. Der Stress der Domestikation führt möglicherweise zur Aktivierung der stummen Gene. In der Farbvariation konnte der weiße Fleck auf der Stirn nicht durch Mutation verursacht sein, weil die Frequenz viel zu schnell anwuchs. Über dieses spannende Gebiet wird ein Übersichtsartikel von mir in einer der nächsten Ausgaben des *Journal of Animal Breeding and Genetics* erscheinen.

GELDERMANN

Herr Erhardt und Herr Kalm, Sie wissen, dass Milchproteine evolutionär sehr jung sind und dass in den exprimierten Regionen nur sehr wenige Regionen funktionell gebunden sind. Daraus folgt, dass in den milchproteinkodierenden Genen sehr viele Varianten stecken. Sie wissen, dass auf DNA-Ebene etwa 1 Prozent der Nucleotidposition variabel sind und das bedeutet für so ein eukariontisches Gen von 10 KB etwa 100 Varianten pro Genlocus. Wenn wir sehen, dass in den Rinderpopulationen so viele Polymorphismen schon auf Proteinniveau gefunden werden können, und dass in den lange Zeit auf hohe Milchleistungen gezüchteten Rassen immer noch Allele und Haplo-Typen vertreten sind, die bei individuellem Test eine unerwünschte Beziehung haben zur Milchproteinleistung und zur Milchzusammensetzung, stellt sich ja die Frage, ob man nicht zunächst nach kausalen Positionen suchen muss, bevor man gleich aus solchen QTL-Profilen Schlüsse auf die Anwendung in der Züch-

tung zieht. Welche populationsbiologischen Untersuchungen empfehlen Sie vor einer Entfernung von aus Ihrer Sicht unerwünschter Variabilität? Es ist sehr gefährlich, wenn man hier Variabilität beseitigt, ohne sie zu kennen in ihrer Wirkung in den Populationen auf die Fitness der Tiere. Noch eine 2. Frage an Herrn Kalm. In der Pflanzengenetik hat sich gezeigt, dass die QTL-Analyse in der Anwendung sehr wohl dazu dienen kann, bisher kryptische Gene und genetische Variabilität zu entdecken. Beim Schwein ist es uns sowohl in unserem Programm in Stuttgart als auch in dem europäischen Projekt gelungen, neue Gene beizutragen, die man vorher nicht kannte. Gilt das auch für Sie in dem Rinderprojekt?

KALM

Mit 1% Wahrscheinlichkeit können wir sagen, dass QTL in einer bestimmten Region liegen, auf Chromosom 14 z. B. und unser Marker KI E 8 soll angeblich relativ sehr eng gekoppelt sein, wie schon bestätigt worden ist. Die Züchter sollen die Bullen nutzen, bei denen diese Regionen vorhanden sind. Das ist nur eine zusätzliche Entscheidungshilfe. Auf diese Weise können Sie Negativ-Varianten bei Vollgeschwisterbullen eliminieren. Varianten für bestimmte Milchproteingene haben wir noch nicht untersucht. Bisher haben wir schwerpunktmäßig HF-Gene analysiert. In einem Daugther-Design haben wir an Anglern untersucht, wo die Fettprozentage sitzen und wie die Zusammensetzung der Milchproteine ist. Zunächst können wir nur die Nutzenanwendung für diese beiden Chromosomen an die Hand geben. Das verlangen die Züchter auch. Wenn einige Millionen DM in ein Projekt gesteckt werden, dann fragt man hinterher nach dem Nutzen. Wenn Sie dann nicht eine kleine Chance für eine Nutzenanwendung haben, ziehen die sofort den Kopf aus der Schlinge und empfehlen Forschung für die nächsten 5 Jahre, womit die Nutzenanwendung ebenso lange hinausgeschoben wird. Parallel dazu läuft nun aber an bestimmten Bereichen auf Chromosom 14

oder 18 die Feinkartierung, so dass wir da weiterkommen und die Funktionsanalyse eingeleitet ist.

ERHARDT

Zur Berücksichtigung von Milchproteinvarianten in der Zucht. Bei der Ziege ist offensichtlich, dass wir dort eben Deletionen haben, die mit dem verminderten Eiweißgehalt einhergehen. Bei jeder Selektion mit einer bestimmten Variante müssen Kopplungsbeziehungen untersucht werden, in diesem Fall besteht offensichtlich ein direkter Zusammenhang. Bei der Berücksichtigung von Varianten beim Rind kann man die Varianten, die jetzt mit funktionellen Eigenschaften zusammenhängen, wie z. B. Aminosäureaustausche in der Nähe des Angriffspunktes von Chymosin, letztendlich vertreten. Natürlich muss bei jeder Selektionsentscheidung abgeklärt werden, ob Kopplungsbeziehungen bestehen.

STRANZINGER

Herr Müller, Sie haben bei den Prion-Knock-out-Mäusen von »normalen oder funktionellen Eigenschaften« gesprochen. Man weiss aber, dass diese Knock-out-Mäuse ein verändertes Verhalten haben. In den 2 Tagen wurde überhaupt nicht über Verhalten bei Tieren gesprochen. Zur Gesamtheit der Betrachtung gehört, dass wir auch solche Dinge untersuchen.

MÜLLER

Deswegen empfehle ich auch nicht einen Prion-Protein-Gen-Knock-out in landwirtschaftlichen Nutztieren, um BSE bzw. Scrapie zu vermeiden. In einem zusätzlichen Modell ist zu klären, ob die Beobachtungen von Mäusen übertragen werden können. Die Verhaltensdinge sind davon abhängig, ob ich das erste riesige Intron mit out-knocke oder nicht. Das landwirtschaftliche Nutztier als Modelltier – nicht als Produktionstier – kann einen zusätzlichen, sehr validen Beitrag zum Verständnis leisten.

Bei allen Produktionszwecken von landwirtschaftlichen Nutztieren zur Herstellung von Pharmazeutika und sonstigen Dingen muss man schauen, ob die Insertion des Transgens irgendwelche positiven und negativen Folgen für das Tier hat. Nur wenn ich ein gesundes »glückliches Tier« habe, habe ich optimale Produktionsvoraussetzungen und nur dann lohnt sich letztendlich der Riesenaufwand.

KRÄUBLICH

Herr Stranzinger, ich gebe Ihnen Recht mit dem Verhalten. Wir haben immer mehr Kandidatengene fürs Verhalten, aber die Phänotypen fehlen uns in der Tierzucht.

BROCKMANN

Mit den Ergebnissen des ADR-Projektes haben wir wesentliche QTL lokalisiert, die die Milcheigenschaften bestimmen, und gegenwärtig werden diese Ergebnisse umgesetzt in den Zuchtorganisationen. Es erfolgt also eine Selektion auf die positiven QTL. Damit bewirken wir eine Fixierung dieser QTL-Allele. Sehen Sie jetzt noch Notwendigkeiten, weitere QTL und Kandidaten-Gene zu suchen?

Die eine Frage ist, was passiert mit den QTL-Effekten, die nicht signifikant waren? In der Regel sind sie nicht signifikant, weil es kleine Effekte sind, aber dennoch ist dies sehr wertvolle Information, die gegenwärtig in den Zuchtorganisationen nicht umgesetzt wird.

KALM

Wenn ich Zuchtorganisation wäre und hätte so wie bei Chromosom 14 relativ eng begrenzten Markerraum, so wie das beim Weaver-Gen auch der Fall ist, dann würde mich in der 1. Runde das Gen direkt gar nicht interessieren. Aus ökonomischen Gründen würde ich das erst mal nutzen. Die Kenntnis des Gen-Ortes ist zunächst für die Wissenschaft interessant, die es in »Science« oder »Nature« publiziert. Zum 2. Punkt ist zu fragen, wie weit die Kopplung

verschiedener Gene zur Genauigkeit bei der Milchleistung beitragen könnte.

WOLFFRAM

Herr Müller, die von Ihnen erwähnten Viren weisen per se eine hohe Mutationsrate auf und sind dadurch problematische Viren. Lohnt der Aufwand, wenn solche Viren mit einer hohen Mutationsrate am Werk sind?

MÜLLER

Genau das ist das Problem. Wenn ich einen panneutralisierenden Antikörper habe, dann lohnt es sich natürlich auch nicht für die Population, weil es genauso wenig wie bei den transgenen Pflanzen Sinn macht, die gesamte Fläche deckend mit einem resistenten Tier oder einer resistenten Pflanze zu bevölkern. Das Virus produziert dann neue Varianten. Für den amerikanischen Markt ist die Nische eindeutig da, und deshalb wird auch wieder an der Erschaffung von transgenen Schweinen gearbeitet. Für den Verbraucher ist von großer Bedeutung, sagen zu können, dass dieses Schwein nie krank war. Die Schaffung transgener Tiere darf aber nie als Ausgleich für suboptimale Haltungs- und Managementbedingungen herhalten.

TRAPPMANN

Herr Kalm, Sie haben bemängelt, dass die Zuchtorganisationen so geringes Interesse an der marker-gestützten Selektion haben. Frage: Ist dies nicht eventuell darauf zurückzuführen, dass die Ergebnisse der QTL-Analyse bezüglich der Leistungsmerkmale doch etwas enttäuschend waren?

KALM

Enttäuschend war es nicht. Sie hatten sich natürlich große Wunder versprochen: Sie glaubten, mit einmaliger Untersuchung hinreichende Information zu haben. Dass hier Haplo-Analysen notwendig sind

und die Generationsfolge beachtet werden muss, war nicht bedacht worden.

Ich möchte noch eine Frage an Herrn Müller richten. Warum besinnen sich eigentlich die Kollegen der Resistenzzüchtung nicht auf die natürlichen Abwehrmechanismen.

MÜLLER

Hierdurch würden Leistungsmerkmale beseitigt.

MEYER

Zytokine und Chemokine sind Verbindungen, die extrem sprunghaft auf Infektionen reagieren. Logs in der Milchdrüse werden um den Faktor 1000 erhöht und das ist doch deren Aufgabe, dass sie im Falle einer Infektion sprunghaft reagieren können. Wenn man hier also eine kontinuierliche Expression fordert, macht das keinen Sinn. Man muss erst verstehen, wie solche Infektion- oder solche Immunreaktionen überhaupt ablaufen, damit man förderlich einwirken kann.

MÜLLER

Wir wissen aus Transgen-Experimenten, dass eine temporäre Überexpression das Gleichgewicht der Zytokine völlig durcheinanderbringen kann. Rekombinante Zytokine, also »in vitro-designte« Zytokine, die entweder über die Rezeptorinteraktion oder über Internalisierung ganz spezifische Signalkonstruktionswege anschalten, haben antivirale Aktivitäten. Andere kombinante Interferone, die die antiproliferative Aktion nicht mehr haben, sind schon gut charakterisiert, weil alle Rezeptorketten charakterisiert sind. Wir brauchen Proteomix und In-vitro-design von Zytokinen, um dann gegebenenfalls in Transgen-Experimenten in den Gesamtorganismus eingreifen zu können.

MEYER

Herr Kalm hat von QTLs für Zellzahl gesprochen. Die Zellen sind da, um Infektionen abzuwehren.

Wäre es also nicht viel sinnvoller, doch auch bei solchen QTLs das Gesamtbild der Eutergesundheit als Ganzes zu betrachten?

KALM

Die Leistungsprüfungen in Deutschland nehmen als Hilfsgröße für Mastitis den Gehalt der Milch an Zellzahlen. Für eine systematische Erfassung von Krankheiten brauchen wir ein ganz anderes System der Leistungsprüfung. Ein solches Modell läuft in drei Großbetrieben mit 3000 Kühen in den neuen Bundesländern, wo systematisch die Erkrankungen der Tiere erhoben werden. Wir haben dabei auch den genauen Verwandtschaftsgrad der Tiere. Mit einem solchen Design könnten wir ihren Wünschen eher gerecht werden als mit der bisherigen Hilfskrücke Zellzahl.

KRÄUBLICH

Ich habe die Verstärkung der experimentellen Tierzucht gefordert, weil es sehr schwierig ist, diese Phänotypen in der Population exakt genug zu erfassen.

HARLIZIUS

Für die Praxis ist derzeit das Finden der den QTLs zugrundeliegenden Gene nicht finanzierbar. Das Beispiel Zellzahl zeigt aber auch, dass wir als Wissenschaftler versuchen sollten, mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln diese Gene zu suchen. Die Erfahrung der letzten Jahre zeigt ja auch, dass die über die humane Genomforschung erreichbaren Mittel schneller zum Ziel führen können, als wir das vor 10 Jahren gedacht hätten.

DISTL

Die FAO und andere Organisationen bemühen sich, genetische Ressourcen von Arten, die im Aussterben sind oder sehr stark bedroht sind, zu erhalten. Hauptgrund hierfür ist, dass diese sehr wertvolle Gene für Krankheitsresistenz beinhalten

können. Welche Möglichkeiten und welche Ansätze würden Molekulargenetiker vorschlagen? Noch eine Ehrenrettung für die Zellzahl, die nach bisherigem Wissen eines der besten Parameter für die Mastitisabwehr ist.

ERHARDT

Die Zellzahl selber ist nur eine Momentaufnahme. Entscheidend ist, wie schnell die Kuh auf den eindringenden Erreger reagieren kann und wie schnell sie Granulozyten aus der Blutbahn mobilisiert. Es ist sehr mühsam, dieses Reaktionsvermögen zu quantifizieren, da hierfür über eine standardisierte Infektion die Dynamik erfasst werden muss.

KALM

Bei Populationen in der Größenordnung von 12.000 Kühen, wie wir sie bei Anglern und bei Gelbvieh haben, könnten wir noch eine Leistungserfassung für besondere Merkmale durchführen. Die Züchter würden hier mitarbeiten. Zwar heißt es immer, diese Kühe seien gegenüber Pyogenemastitis resistent und hätten bessere Klauen und Gliedmaßen, erfasst sind diese Merkmale aber leider nicht. Für ganz kleine Populationen haben wir noch kein ideales Konzept. Der Vorsitzende des Ausschusses zur Erhaltung der genetischen Vielfalt zählt zu seinen Hauptaufgaben, die wichtigsten Merkmale, die in den aussterbenden Populationen vorhanden sind, auf molekulargenetischer Basis zu beschreiben.

GLODEK

Würde ein Gen gegen die Aujetzkische Krankheit gefunden, so müsste dies doch sofort in allen Leistungspopulationen genutzt werden. Der beste Weg hierfür wäre ein funktionierendes Transgen-System, da die Rückkreuzung hierfür kein wettbewerbsfähiger Weg ist. Sind wir nicht eines Tages sogar gezwungen, derartige Techniken zu benutzen, um die vorhandenen Hochleistungspopulationen zu schützen?

MÜLLER

Von einem Resistenzgen für Aujetzkische Krankheit ist mir bisher nichts bekannt. Bei allen reproduktions-technischen Möglichkeiten können wir doch im landwirtschaftlichen Nutztier in Zukunft nicht über den klassischen additiven Gentransfer gehen. Nötig sind Knock-in-Strategien, um wirklich gesunde Tiere in die Welt zu bringen. Dabei müssen wir immer von einer sehr limitierten Anzahl von Foundertieren ausgehen.

Wenn ein Pathogen auf einen resistenten Organismus stößt, ist gewöhnlich das Pathogen schneller als der Säugerorganismus in der Generierung eines Genotyps, der dann doch wieder zu Krankheitsausbrüchen führen kann. In Virusreservoirs treten Mutationen auf, für die die genetisch eng miteinander verwandten transgenen Populationen dann erneut anfällig sind. In der Wildtyp-Mauspopulation haben wir mit dem MX-Gen einen Abwehrmechanismus gegen Pathogene bei 25%. Dies bedeutet, dass 25% der Individuen resistent gegen Influenza sind, 75% dagegen anfällig. Hätte sich dies umgekehrt, dann hätten sich ganz schnell Serotypen von Influenza entwickelt, die dann auch die jetzt resistenten 25% krankmachen würden. Eine ganze Population von Nutztieren ist also nicht durch einen resistenten Genotypen zu ersetzen.

GELDERMANN

Die Bedeutung eines QTL-Profiles hat viele Ähnlichkeiten mit einem Zuchtwert und hängt ab von dem Founderindividuum, also von dessen Haplo- oder Kopplungstyp. Wenn Sie dieses QTL-Profil implementieren, wird die Sicherheit der Selektion einer Population für andere Individuen mehr und mehr abnehmen, je weiter in der Verwandtschaft dieses Tier entfernt ist. Über indirekte Schätzungen von multifaktoriell bedingten Eigenschaften reduzieren sie nützliche Variabilität, die in den Populationen benötigt wird. Es kommt hinzu, dass sie mit geringerer Genauigkeit arbeiten als das ihre QTL-Profile suggerieren. QTL-Kartierung ist für die Wissenschaft zunächst ein Startpunkt für weitere

Arbeiten, um über die positionale Klonierung an die Gene heranzukommen. Für die Anwendung in der Züchtung gibt es dann viele Möglichkeiten zur Nutzung der QTL-Profile.

KALM

Der Leiter eines Zuchtunternehmens wird bei der Entscheidung über Beteiligung an marker-gestützter Selektion und Auffinden von Genen seinen Forschungsetat nicht als erstes in eine positionale Klonierung einsetzen. In der ersten Runde wird es darum gehen, die relativ genau geschätzten Marker zu nutzen für eine Auswahl zwischen Vollgeschwistern oder Halbgeschwisterbullen. Hieraus ergeben sich Pedigree-Index und Markerinformation für ein bestimmtes Merkmal. Daneben nutzen die Züchter auch andere Merkmale für die Entscheidung über Zucht oder nicht. Es wird also nicht die ganze Variabilität auf eine einzige Bullenlinie reduziert, da ja noch andere Kriterien mitentscheidend sind. Die Feinkartierung kann für andere Merkmale vorgenommen werden. Beim Merkmalkomplex Eutergesundheit ist es besonders wichtig, dass wissenschaftliches Know-How eingebunden wird.

REINER

Wir haben wirklich gegen Aujetzksische Krankheit resistente Schweine auf der Basis der chinesischen Rasse Mai chan. Kreuzungsexperimente zeigen, dass sogar ein Hauptgen hierfür verantwortlich ist, wobei sicher auch QTL-Effekte beteiligt sind. Sowohl Gentransfer als auch Marker-gestützte Introgression sollten in diesem Zusammenhang genutzt werden. Zwar haben wir relativ große Populationen, die aber doch nur von wenigen Zuchttieren getragen werden. Entscheidend ist die wirtschaftliche Bedeutung. Im Fall des MHS-Gens haben die Amerikaner sehr schnell halothan-negative Pietrain-Linien aufgebaut. Bei Vorliegen entsprechender Bedeutung kann so etwas mit Nachdruck durchgesetzt werden. Diese Resistenz muss dann charakterisiert werden.

FRIES

Zunächst muss durch Charakterisierung des Gens die molekulare Grundlage gefunden werden. Dann ist zu überprüfen, ob diese Variante in Zuchtpopulationen vorhanden ist. Es könnte ja sein, dass noch genügend resistente Tiere vorhanden sind. Die molekulare Charakterisierung ist Voraussetzung für das Finden derartiger Tiere. Wenn eine genügend große Basis vorhanden ist, kann das in großem Rahmen in die Population eingebracht werden. Transgen-Technologie ist eine Option, die später anschließen kann. Der große Vorteil einer molekularen Charakterisierung der Resistenz ist die Möglichkeit zum Screenen der gesamten Zuchtpopulation.

STRANZINGER

Erfinder bekommen oft vor ihren Erfindungen die meiste Angst, weil sie die Hintergründe kennen. Ich möchte Herrn Geldermann darin unterstützen, dass wir von der Wissenschaft her die Verpflichtung haben, diese Phänomene genauer abzuklären, bevor wir in die Praxis gehen. Es gibt genügend Beispiele dafür, dass vorschnell in die Praxis eingebrachte Erkenntnisse zurückgezogen werden mussten.

PFEFFER

Ich bitte jetzt um Fragen und Anmerkungen zu den Vorträgen von Herrn Schlapp und Herrn Simon.

JANSEN

Bei Interferon wird die Hitzestabilität durch Einbau von Disulfidbrücken erreicht. Könnte man nicht bei Phytasen in ähnlicher Weise über Cystinbrücken das Molekül stabilisieren?

SIMON

Es gibt verschiedene Konzepte für die Stabilisierung von Enzymen. Voraussetzung ist immer die Kenntnis der Aminosäuresequenz. Nicht nur Disulfidbrücken spielen hier eine Rolle, wichtig sind

auch Oberflächenladungen. Es kommt darauf an, Ladungen ins Innere des Moleküls zu verpacken und damit die Reaktivität mit anderen Substanzen herabzusetzen. Die Schaffung einiger Disulfidbrücken allein bewirkt noch nicht die Stabilität des Enzyms.

KANITZ

Es gibt Vakzine, mit denen man recht effektiv Feldvirus verdrängen kann, z. B. Tollwut. Andererseits gibt es Vakzine, die die entsprechenden in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllt haben, z. B. Markervakzin gegen BHV 1. Herr Schlapp hat über Arbeiten zur Entwicklung einer Vakzine gegen europäische Schweinepest berichtet, wobei die Zielsetzung bezeichnet werden kann: Verhinderung der Klinik und Unterbindung der Erregerausbreitung. Warum werden keine weiterreichenden Ziele verfolgt oder gibt es Alternativen, wenn man mit dieser Art der Vakzinierung ESP oder BHV 1 Viren nicht eliminieren oder verdrängen kann?

SCHLAPP

Sicherlich werden weiterreichende Ziele verfolgt, nur stößt jede Vakzine an ihre Grenzen. Die gerade entwickelte Markervakzine gegen Schweinepest zeigt die genannte Effizienz. Alternativen sind vorhanden oder könnten entwickelt werden. Im Moment wird ein Forschungsansatz zur direkten Veränderung des Schweinepestvirus verfolgt, um so an lebende attenuierte Vakzine zu kommen. Ein anderer Ansatzpunkt ist die DNA-Vakzinierungsstrategie. Hier ist nur noch nicht annähernd die Zulassungsreife erreicht. Insofern ist die zur Zeit von Bayer produzierte Vakzine eigentlich eine Verhinderungsvakzine, um die Verbreitung des Virus nach einem Ausbruch in einem bestimmten geographischen Raum zu verhindern.

PFEFFER

Kann man nicht Enzyme auch wirken lassen, bevor man die Futtermittel weiter bearbeitet?

SIMON

Die Enzymwirkung ist immer an die Anwesenheit von Wasser gebunden. Man müsste also eine Vorbehandlung in feuchtem Medium vornehmen. Wegen der damit verbundenen großen hygienischen Probleme sehe ich hierin keine Zukunft. Die Enzyme müssen so konzipiert sein, dass sie den Herstellungsprozess unbeschadet überleben und dass sie im Verdauungstrakt auch wirken.

STEINHART

1. Wie sieht es bei den Enzymen aus mit der Patentsituation? Viele gute Ansätze und Ideen werden dadurch blockiert, dass die meisten interessanten Enzyme bereits patentiert sind.

2. Durch Oxidation von Cystein zu Cystin können stabilisierende Brücken geschaffen werden, aber in Futtermitteln hat man eine Reihe von Reduktionsäquivalenten. Bei isolierten Substanzen kann man das gut machen, aber in labilen Systemen wie Futtermitteln und Lebensmitteln würde ich mich darauf nicht verlassen.

3. Bei Arabinoxylanen spielen die Cross-Links, beispielsweise die Ferulasäure, eine große Rolle bei der Beeinflussung der Viskosität. Wird erwogen, durch Veränderung dieser Cross-Links bei Arabinoxylanen, Hemicellulosen und ähnlichen Verbindungen zu verändern?

SIMON

Zur Patentsituation kann ich eigentlich nichts sagen, weil ich in den Herstellungsprozess nicht eingebunden bin. Die Tatsache, dass permanent Enzyme zugelassen werden, deutet aber darauf hin, dass es keine unüberwindliche Schwierigkeit gibt. Wie es wird, wenn man durch gentechnisch veränderte Methoden Konstrukte hat, ist dann ein andere Sache.

Hinsichtlich der Cross-Links bei Arabinoxylanen ist mir nicht bekannt, dass Pflanzenzüchter dort tätig sind. Bei der Ausbildung von Viskosität gibt es eine

Sortenspezifität und es gibt eine Spezifität des Anbaugesbietes oder Anbaujahres. Dies heißt, es gibt bestimmte Sorten, die immer eine erhöhte Viskosität ausbilden und es gibt bestimmte Jahre und bestimmte Anbaugesbiete, in denen man mit gleichen Sorten immer niedrigere Viskositäten innerhalb des gleichen Ranking findet. Es ist also nicht nur eine Frage der Genetik. In Abhängigkeit vom Ablauf des Reifestadiums dieser Pflanzen sind auch Umwelteinflüsse wirksam. Daher ist unsicher, ob man durch genetische Bearbeitung der Pflanze das Problem beseitigen kann.

RODEHUTSCORD

Mit dem Zusatz von Phytase kann eine wirklich beeindruckende Steigerung in der Verdaulichkeit des Phosphors erreicht werden, wenn keine pflanzeneigene Phytase enthalten ist. Andererseits wird bei 65 bis 70% Verdaulichkeit die Obergrenze der Wirksamkeit dieser Phytase erreicht, obwohl ein viel höheres Potential zur Absorption von Phosphat besteht. Können Sie abschätzen, welche Faktoren die Effizienz der Wirkung des Enzyms begrenzen, und gibt es die Möglichkeit, dass die Hybridisierung auch bei diesem Enzym eine weitere Steigerung in der Effizienz bewirken kann?

SIMON

Vielleicht heißt der Faktor Zeit. Alle bisher eingesetzten Phytasen sind total labil im Milieu des Magens. In den Digesta aus dem Duodenum sind praktisch keine Phytaseaktivitäten mehr nachzuweisen. Dies ist ganz anders bei NSP-Enzymen, bis zum Ende des Dünndarms sind Xylanasen beispielsweise noch zu 70 bis 80% in ihrer Aktivität nachweisbar. Phytasen müssten wegen ihrer pH-Optima zwischen 2,5 und 5,5 das Milieu im Magen gut vertragen, sind aber offensichtlich sehr labil gegenüber Proteolyse. Deshalb versuchen wir jetzt, Enzyme zu screenen, die nicht so schnell proteolytisch abgebaut werden. Daneben ist zu bedenken, dass es 1- und 6-Phytasen gibt, die an unterschiedlichen Positionen im Inosytolring den Abbau beginnen und dann suk-

zessive weiter arbeiten. Es ist zu untersuchen, ob diese Enzyme unterschiedlich schnell die Esterbindungen hydrolysieren oder ob man durch Kombination solcher verschiedener Phytasen die Geschwindigkeit erhöhen kann.

HAGEMEISTER

Bei Xylanasen und β -Glucosidasen wird ein Einfluss auf die Passage im Magen-Darmtrakt untersucht. Kommt diese Beeinflussung der Passage durch die Freisetzung von irgendwelchen Kohlenhydraten zu Stande oder kann durch Kombination beider Faktoren, Passage und Enzymaktivität, die Effizienz erhöht werden?

SIMON

Es gibt mehrere Befunde, die nachweisen, dass speziell die Passagerate mit erhöhter Viskosität abnimmt. Wahrscheinlich spielen Regulationsmechanismen über Nährstofffreisetzung hier keine Rolle, sondern physikalische Gründe reichen zur Erklärung. Deshalb ist die Futteraufnahme der Tiere leicht rückläufig.

PALLAUF

Haben Sie auch die Temperaturempfindlichkeit der phytogenen Phytasen untersucht, z. B. in Roggen, Triticale und Weizen?

SIMON

Bei den Pelletierversuchen haben wir die native Restaktivität jeweils von der Gesamtaktivität abgezogen. Die Ration enthielt im Wesentlichen Weizen und Roggen aber keinen Mais, so dass wir auf etwa 500 Einheiten des nativen Enzyms gekommen sind. Diese native Aktivität war etwa so labil wie die schlechteste pilzliche. Die Restaktivität wurde durch die Behandlung also auf 10–20% erniedrigt. Wir haben eine starke Überdosierung der Phytasen vorgenommen, also nicht 500, sondern 2000 Einheiten zugesetzt, um sicher zu sein, dass Störungen durch native Aktivität ausgeschlossen würden, um bei sehr

starker Inaktivierung am Ende immer noch Aktivitäten messen zu können.

SCHUH

Bei Mykoplasmen-Impfstoffen auf dem Markt sind wir nicht in der Lage nachzuweisen, ob Tiere geimpft sind oder nicht. Genauso bei Lebend-Impfstoff, denn RNS ist ein sehr mutationsfreudiges Virus. Auch hier versucht man Markerimpfstoffe herzustellen, die aber nicht funktionieren. Worauf ist diese Problematik zurückzuführen?

SCHLAPP

Mit den beiden von Ihnen genannten Impfstoffen habe ich selbst mich nicht beschäftigt und weiß daher nicht, wo das Problem liegt. Ich kann mir vorstellen, dass bei Wahl eines falschen Markers in einem Impfstoff Teile aus dem immunogenen Potential des Virus entfernt werden, was für den protektiven Schutz nötig ist.

TEUBER

Gibt es in der EU Beispiele für die Zulassung eines durch Proteinengineering optimierten Enzyms? Wenn ja, wie schwierig ist es?

SIMON

Damals erzeugte Konstrukte sind patentiert und meines Wissens gibt es eine Anwendung dieser Hybridenzyme in den USA. Sie wurden sogar in Gerste exprimiert. Aber verlangen Sie von mir keine Voraussage, was wann hier in Deutschland und Europa zugelassen werden wird.

JUTZI

Herr Schlapp, wenn Sie von heute auf morgen den dreifachen Etat hätten für Forschung und Entwicklung, wo würden Sie investieren?

SCHLAPP

Auf dem Impfstoffsektor würde ich schwerpunktmäßig in DNA-Vakzinen investieren wegen der Sicherheit eines DNA-Plasmids. Auf der Gentherapie würde ich investieren in nicht-virale Delivery-Systeme. Ich würde also den somatischen Gentransfer sehr stark fördern.

ABEL

Wir haben sehr viel gehört über Verwertungssteigerung durch β -Glucanasen. Andere Konzepte sprechen gerade diesen NSP Eigenschaften als Präbiotika oder sogar Probiotika zu. Zerstören die zugesetzten Enzyme eventuell also für die Tiere sehr Nützliches?

SIMON

Diese Enzyme leisten keinen vollständigen Abbau bis zu den monomeren Bestandteilen, sie sind Endoenzyme, die in kurzer Zeit Riesenpolymere in kleinere Moleküle spalten, die immer noch als Polymere anzusprechen sind. Sie beseitigen eine Eigenschaft, nämlich die Viskosität. Der antinutritive Effekt wird beseitigt, ohne dass die Polymere zu resorbierbaren Einheiten abgebaut würden. Als Präbiotika bezeichnen wir solche Kohlenhydrate, die nicht durch körpereigene Enzyme abgebaut werden können, und die als Substrate möglicherweise einen günstigen Einfluss auf gewünschte Bifidobakterien oder Lactobazillen haben. In diesem Fall würden also die Enzyme präbiotische Eigenschaften fördern, so dass ich hier nicht unbedingt eine konträre Wirkung zu anderen Konzepten sehe.

PETERSEN

Die Frage, ob gentechnisch veränderte Enzyme eine Chance auf Zulassung haben, ist nach der Rechtslage kein Problem, denn die gentechnisch veränderten Enzyme sind keine GVO im Sinne der Rechtsdefinition und insofern gibt es keine besondere Hürde im Zulassungssystem der EU. Wir haben auch schon einige gentechnisch veränderte Moleküle in unserem Inventar der Zusatzstoffliste.

PFEFFER

Damit muss ich die Diskussion zum Abschluss bringen und ich danke nochmals allen Rednern für die guten Vorträge und allen Diskussionsteilnehmern für die lebhafteste und vielschichtige Beteiligung an der Diskussion.

IV.

Konsequenzen (mögliche Folgen)
der Anwendung im Nutztierbereich

The Potential Impact of Biotechnology in on the Global Livestock Sector



Summary

Human population growth, increasing urbanisation and rising incomes are driving a vigorous increase in demand for food of animal origin in developing countries. Globally, livestock production is growing faster than any other agricultural sector. In view of its substantial dynamics, this process has been referred to as the »Livestock Revolution«. Important features of this process are: a rapid increase in consumption of livestock products in developing countries with, e. g. per caput meat consumption in the developing world expected to double between 1993 and 2020; a shift of livestock production from temperate and dry areas to warmer and more humid environments; a change to market-oriented production; more large-scale, industrial production units located close to urban centres; decreasing importance of ruminant vis-à-vis monogastric livestock species; and a rapid rise in the use of cereal-based feeds.

Agricultural biotechnology has long been a source of innovation in production and processing profoundly impacting the livestock sector; however, this impact has been and continues to be primarily notable on the animal agriculture in developed countries, while the adoption even of early generation biotechnology in the livestock sector of developing countries tends to be far lower. However, with the market demand for food of animal origin dynamically growing in many developing countries, there will be a commercial, often industrial livestock sub-

sector emerging in many of these countries. This subsector is likely to more readily pick up modern biotechnology options than the traditional small-scale subsector. The existing dichotomy between the modern and traditional subsectors will thus be exacerbated. The impact of biotechnology on the animal sector will also vary substantially from region to region.

Concerns about the potential risks posed by certain aspects of biotechnology are increasingly expressed worldwide. These risks refer to the effects on human and animal health and on the socio-economic and bio-physical environment. It appears prudent to adopt a cautious and science-based case-by-case approach when assessing the risks of the new products and processes before their release.

I. Development Trends in the Global Livestock Sector

Urbanization, population and income growth are fuelling a massive demand increase for food of animal origin in developing countries – this process has been termed »Livestock Revolution« in a recent study (Delgado et al., 1999). The predicted increases in meat consumption for the period 1993 to 2020 are very substantial (Table 1), though with large regional variability.

Consumer demand for food of animal origin starts from a low base in most developing countries, with an average annual per caput consumption of around 40 kg and 20 kg of milk and meat respectively, which

is equivalent to approximately a quarter of the per caput consumption in developed countries. The impact which increased intake of food of animal origin has on the consumers' health under these circumstances is considerable (micro-nutrients, amino-acids), particularly in children and mothers.

Table 1 Actual and projected per caput meat and milk consumption by region

Region	Meat		Milk	
	1993	2020	1993	2020
	(kg/year)		(kg/year)	
China	33	60	7	12
Other East Asia	44	67	16	20
India	4	6	58	125
Other South Asia	7	10	58	82
Southeast Asia	15	24	11	16
Latin America	46	59	100	117
West Asia/North Africa	20	24	62	80
Sub-Saharan Africa	9	11	23	30
Developing World	21	30	40	62
Developed World	76	83	192	189
World	34	39	75	85

Source: Delgado et al., 1999

It is almost entirely the developing country consumers who drive the strong and sustained global expansion of the demand for food of animal origin. This process is determined by population growth, by continued strong urbanization and by rising incomes in many developing countries (Delgado et al., 1999).

Given the strategic importance of food supplies and the economic importance of the agricultural sector in most developing countries, a considerable degree of self-sufficiency is generally a significant national policy goal. Thus, growth rates for livestock production have generally followed those for consumption quite closely in most regions and overall

only a small proportion of the world's supply of live-stock products (e.g. 3% of bovine meat) is traded internationally.

In the past, the majority of the increases in live-stock production in developing countries have been achieved by expanding livestock populations and by switching systems rather than by productivity increases within production system. This is no longer the case in many developing countries where strong consumer demand drives a transformation and intensification of the livestock sector. Mono-gastric animals, i.e. pigs and particular poultry, are the most important source of growth with increasing adoption of industrial forms of production with substantial reliance on grain feeding. Average annual growth in cereal feed use across all developing countries has been 4.2% for the period 1982-94, with Southeast Asia leading with 7.2% annual growth (Delgado et al., 1999). It is estimated that the increase in livestock production in developing countries will require annual feed consumption of cereals to rise by 292 million metric tons between 1993 and 2020 (2.8% per year).

Despite concerns that such large increases in demand for cereals as animal feed will substantially raise cereal prices, inflation-adjusted prices of feed and livestock commodities are expected to fall by 2020. Even with increases in livestock productivity far below historical trends, predictions are that enough livestock products will be available in 2020 without prices rising above 1992-94 levels. The key issue, therefore, is not primarily the availability of livestock products, but access to the products by the consumer and the effect of the 'livestock revolution' on small-scale producers, the environment and human health.

II. Potential Contributions of Biotechnology to the Livestock Revolution

In livestock production, mechanical, biological and chemical innovations have reduced labour requirements, increased yields and contained the

impact of livestock diseases to such an extent that despite the vast increases in demand for livestock products, real prices for meat and milk have fallen by approximately a third between the early 1980s and 1990s. Modern agricultural biotechnology is another source of innovations that will reshape agriculture as profoundly as any of the previous fields of technological innovation.

The application of modern genetic technologies in livestock such as genome mapping, marker-assisted selection, transgenesis, has lagged behind its application in the plant sector. While genetically modified livestock, in contrast to genetically modified crops, are not likely to play a major role in developing countries in the near future, considerable potential exists for the application of biotechnologies in the use of bio-engineered inputs covering the entire food production chain from animal feed to product processing, importantly also including animal health.

Reproductive Biotechnologies

The analysis of the use of animal reproductive biotechnologies, both well-established, early generation options and more recent, advanced options highlights a considerable North-South divide which deserves attention in research and development.

Artificial Insemination (AI) has had a major impact on cattle, sheep, goat, pig, turkey and chicken improvement programmes of developed countries by accelerating breeding progress primarily through increased intensity of selection of males and through diffusion of breeding progress, initially with fresh and later with frozen semen, offering rapid worldwide transport of male genetic material. Globally, more than 100 million artificial inseminations in cattle, 40 million in pigs, 3.3 million in sheep and 0.5 million in goats are performed annually (Wagner and Thibier, in press; Thibier and Wagner, in press). Only in few developing countries, notably in Asia (China, India), is AI practised to a level that impacts substantially national livestock production (Table 2).

Table 2 Overall Impact of Artificial Insemination in Cattle and Buffaloes

Regions	Total Females of Breeding Age (40 % of Total Cattle and Buffaloes)	Total First Service AI	% Inseminated
	(thousands)	(thousands)	
Africa	69,121	870	1.3
North America	45,206	11,204	24.7
South America	140,755	1,366	1.0
Far East	240,860	58,181	24.2
Near East	32,600	1,069	3.1
Europe	67,628	33,873	50.1
Total	596,172	106,564	

Source: Thibier and Wagner, in press

Embryo transfer (ET) in the mammalian species, enhanced by multiple ovulation and oestrus synchronisation (MOET), allows the acceleration of genetic progress through increased selection intensity of females, and freezing of embryos enables low cost transport of genetic material across continents, and also conservation of diploid genomes. MOET may also be used to produce crossbred replacement females while only maintaining a small number of straightbreds. In 1998, worldwide 440,000 ETs have been recorded in cattle, 17,000 in sheep, 1,200 in goats, and 2,500 in horses with more than 75 % of these transactions in North America and Europe (IETS, 1999). About 80 % of the bulls used in AI are derived from ET (Thibier, pers. comm.). Despite the obvious benefits of ET, its application is thus largely limited to developed countries. ET is also one of the basic technologies for the application of more advanced reproductive biotechnologies such as ovum pick-up (OPU) and in-vitro maturation and fertilisation (IVM/IVF), sexing of semen and embryos, cloning, and of transgenesis. These technologies appear to be limited to laboratories in developed countries.

The sampling of somatic tissue may assist collection and transfer of breed samples from remote areas for conservation purposes. Once broadly feasible and viable, somatic cloning will enable regeneration of rare and/or endangered domestic animal resources. Given that the developing countries harbour the bulk of the world's domestic animal biodiversity, this technology appears to have particular relevance for this region.

Molecular Biotechnologies

A vast array of molecular biotechnology applications are available and emerging in animal production and health involving both on-farm production and off-farm product processing applications. As animal production intensifies and as it increasingly moves into warmer and more humid ecologies, animal diseases are an increasingly important factor reducing livestock productivity in developing countries. Use of DNA biotechnology in animal health may contribute significantly to improved animal disease control, thereby stimulating both food production and livestock trade.

Advanced biotechnology-based diagnostic tests make it possible to identify the disease-causing agent(s) and to monitor the impact of disease control programmes, to a degree of diagnostic precision (sub-species, strain, bio-type level) not previously possible. Enzyme-immunoassay (EIA) tests, which have the advantage of being relatively easily automated, have been developed for a wide range of parasites and microbes. The relevance of these diagnostic tests to the livestock industry in developing countries is obvious, their accessibility and utilization, however, is lagging far behind developed countries.

Molecular epidemiology is a fast growing discipline that enables characterisation of pathogen isolates (virus, bacteria, parasites) by nucleotide sequencing for the tracing of their origin. This is particularly important for epidemic diseases, where the possibility to pinpoint the source of infection can

significantly contribute to improved disease control. Furthermore, the development of genetic probes, which allow the detection of pathogen DNA/RNA (rather than antibodies) in livestock, and the advances in accurate, pen-side diagnostic kits considerably enhance animal health programmes.

Although vaccines developed using traditional approaches have had a major impact on the control of many epidemic and endemic viral, mycoplasmal and bacterial diseases affecting livestock, recombinant vaccines offer various advantages over conventional vaccines. These are safety (no risk of reversion to virulent form, reduced potential for contamination with other pathogens, etc.) and specificity, better stability and, importantly, such vaccines, coupled with the appropriate diagnostic test, allow the distinction between vaccinated and naturally infected animals. The latter characteristic is important in disease control programmes as it enables continued vaccination even when the shift from the control to the eradication stage is contemplated. Recombinant DNA technology also provides new opportunities for the development of vaccines against parasites (e. g. ticks, helminths, etc.) where conventional approaches have failed.

As certain parts of livestock production vigorously expand, intensify and industrialize, especially in the poultry sector, economics (high reproduction rates, advanced vertical integration, large numbers of short-lived individuals) may favour the use of transgenic animals rather than the treatment or diagnostics on individuals. Consumer acceptance and ethical considerations will be decisive in the use of such technologies worldwide.

Biotechnology applications are being developed for improving the performance of animals through better nutrition. Enzymes can improve the nutrient availability from feedstuffs, lower feed costs and reduce output of waste into the environment. Prebiotics and probiotics or immune supplements can inhibit pathogenic gut microorganisms or make the animal more resistant to them. Administration of

recombinant somatotropin (ST) results in accelerated growth and leaner carcasses in meat animals and increased milk production in dairy cows. Immunomodulation can be used for enhancing the activity of endogenous anabolic hormones. In poultry nutrition, possibilities include the use of feed enzymes, probiotics, single cell protein, and antibiotic feed additives. The production of tailor-made plant products for use as feeds and free from antinutritional factors through recombinant DNA technology is also a possibility.

The inclusion of genetically modified organisms in animal feeds raises issues of risk, e.g. of the transfer of foreign genes introduced into GM (genetically modified) feed grain crops, especially antibiotic resistance marker genes, to bacteria, which might render common infectious diseases untreatable. The main conclusion of research to-date (Ryan and Mae-Wan, 2000) is that DNA is not degraded under most commercial processing conditions, nor in silage, and that therefore further studies on GM use in animal feeding would be indicated. Potential feed safety problems related to the use of antibiotic marker genes may be avoidable through the use of alternative transgenic systems which are now becoming available.

Plant biotechnology may produce forages with improved nutritional value or incorporate vaccines or antibodies into feeds that may protect animals against diseases. Rumen biotechnology has the potential to improve the nutritive value of ruminant feedstuffs that are fibrous, low in nitrogen and of limited nutritional value for other animal species. Biotechnology can alter the amount and availability of carbohydrate and protein in plants as well as the rate and extent of fermentation and metabolism of these nutrients in the rumen. The potential applications of biotechnology to rumen microorganisms are many but technical difficulties are limiting its progress.

The use of microsatellites in genetic distancing of breeds is gaining momentum. While most breeds are

located in the developing world, this work is confined to developed countries. Its application to concerted animal genetic resources utilization and conservation programmes is a major objective of the Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources which FAO has been mandated to implement.

There is rapid progress in the preparation of sufficiently dense microsatellite linkage maps to assist in the search for genetic traits of economic importance. These linkage maps can be used to develop strategies of marker assisted selection (MAS) and marker assisted introgression (MAI) to meet developing country breeding goals capitalising on the rapidly accumulating functional genomic information on humans, mice and *Drosophila*.

Transgenesis technologies in domestic animals offer considerable opportunities in the areas of increasing productivity, product quality and even adaptive fitness. Transgenesis technology is currently very costly and inefficient and applications in the near future seem to be limited to the production of transgenic animals as bio-reactors. Consumer acceptance and ethical considerations may reduce considerably the scope of this technology for some time, and rigorous risk evaluation will be required increasingly as all societies adopt precautionary approaches on all technologies, procedures and systems affecting humans.

A large number of biotechnology applications are available and coming on-stream in the areas of modification of product quality; reduced contamination and perishability; mitigation of environmental impact of livestock production; and new products (»pharming«). Transgenic animals are increasingly designed for a number of non-food purposes, including medical research, the production of pharmaceutical products in milk and the production of organs for transplantation to humans. The livestock production sector is unlikely to be involved to a considerable degree in the »pharming« business, which is estimated to require less than 400,000 animals (Wall, 1996; Cunningham, 1999).

Biotechnology thus offers considerable potential for improvements in agro-industrial processing, particularly for more environmentally friendly or energy-efficient processes. While such technologies are not likely to be accessible to traditional animal agriculture and post-harvest product treatment, they will be accessible to a considerable degree to the emerging commercial and industrial sector in many developing countries. The dichotomy between the small-scale producers and the emerging commercial, large-scale livestock industry is thus likely to determine the further development of the livestock sector in many developing countries. The commercial subsector is far more likely to use and benefit from the up-market technology options than the small-scale subsector.

There are, however, substantial region-specific issues to consider:

Global market forces strongly impinge on the development of animal agriculture in **Asia**. In the coming two decades there will be an explosive growth of industrial poultry production throughout Asia. China will modernise and expand pork, poultry and red meat production while India will concentrate on dairy and poultry development, introducing novel technologies and economies of scale. Aggregation of large scale bio-protein production in densely populated areas will pose very considerable environmental, health and safety problems.

The main livestock product in **South Asia** is milk from cattle and buffalo, the majority being kept in small units in mixed, irrigated farming systems, with crop by-products being the main source of feed. Major prospects for productivity increases in the region therefore would stem from enhancing nutritive value and feed conversion efficiency of poor quality feeds to enhance milk production. Technological capacity in South Asia is available to drive biotechnology research and development in this area of very high potential return.

Poultry and pork constitute the bulk of livestock products produced in **East Asia** with highest growth

rates recorded for poultry. Vertical integration and industrialisation of both the pig and poultry sector are not as far advanced as in other regions (e. g. Latin America) with more than 60 % of the pigs and poultry currently still kept by small-scale producers. The control and efficient management of epidemic and endemic diseases of pigs and poultry is a prerequisite for integration of small-scale producers into the production chain by large-scale finishers and processors; these are presumably the entry points for biotechnology applications with the highest potential returns.

With land relatively abundant and with an expanding feed resource base, **Latin America** will significantly step up production, productivity and exports of livestock products. Of particular importance is thereby the careful use of less exploitative forms of livestock production. Latin America holds a large share of the world's bio-diversity, which is being threatened by habitat loss, partially driven by land lost to livestock operations. Markets are being liberalized and related infrastructure developed, forming the prerequisite for export-oriented production and processing and for the utilization of biotechnology options as they become commercially available. The region will benefit from genetic gain, mainly for feed conversion efficiency, enhanced by biotechnology interventions. This is expected to happen particularly rapidly in species with short generation intervals – poultry, pigs (and potentially small ruminants). Improvements are likely to be rapidly taken on board in South America, where the industrialisation of the sector is much advanced with technical coefficients of production, e. g. in poultry being close to those achieved in developed countries. Reduction and transformation of livestock waste is another area, where biotechnology is likely to offer major benefits.

Poverty, diseases and agricultural pest problems prevail at a continental scale in **Africa**. Animal agriculture is largely traditional, with modern commercial operations developing at different scales and intensities depending on specific local circumstances. Over the past decades there have been signi-

ificant increases in the volume of small ruminant production, particularly goats, but low productivity levels persist. Livestock production is much complicated by the prevalence of diseases. Commercial beef ranching exists in some places and also modern poultry and dairy develops mainly around urban centres. There is potential for significant development of both crop and livestock production provided favourable policy frameworks are put in place.

In sub-Saharan Africa (SSA) diseases are estimated to cause losses of between 20 and 25 % of the livestock sector output. Although monogastrics are growing in importance, in 2015 they are expected to only contribute around 25 % of meat production, most meat coming from grassland and mixed rainfed systems. For SSA, therefore, utilization of biotechnology appears to offer most prospects in the field of the control of major diseases and parasites of ruminants to support intensification of production. SSA has very limited capacities for biotechnology generation, adaptation and extension, however. Without substantial public and international investment in these areas, the productivity and technology gap with other regions will further increase and small-scale livestock producers will benefit little from modern biotechnology.

In West Asia and North Africa the situation for poultry, the main growth sector in the region, is similar to that in Latin America. However, climate being harsher in most of the region, breeding poultry for better heat tolerance and tolerance to other environmental stressors may bring additional advantages. For small ruminants, the situation appears similar to SSA, with enhanced disease control probably offering the most immediate returns. Biotechnology inputs in support of these areas may thus primarily be forthcoming.

III. Risks and Ethical Concerns, Policy Considerations

There are substantial public concerns expressed on potential negative consequences of biotechno-

logy in general and on genetic engineering products and processes in particular on human and animal health, and on the socio-economic and the biophysical environment. These concerns also relate to ethical dimensions of the relationship of mankind with nature.

Most of the biotechnology R&D activities (>80%; Persley and Lantin, 2000) are conducted by large private companies for commercial exploitation and are designed to meet the requirements of developed markets. They are thus unlikely to be very suitable for the conditions of small-scale farmers in tropical regions of the world and this may lead to increasing inequality of income and wealth within countries (large vs. small farmers) and between countries (developed vs. developing). Legal registration requirements can serve as barriers to commercial product introduction, giving relative advantage to large, mostly international corporations that have sufficient institutional infrastructure and financial resources to meet intensive registration requirements.

The gap between the industrialised and developing countries in technical expertise and relevant research capacity is becoming wider and contributing to brain drain in the profession. Out of 152 laboratories involved in veterinary biotechnology in 1991, only 26 were located in developing countries (Rege 1992).

With the establishment of WTO in 1995 members are bound by the Agreement on Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights (TRIPS), stipulating the granting of patents for inventions in all fields of technology. Most processes and many products of biotechnology are patentable. Increasingly, public concerns about animal welfare when applying biotechnology, and about ownership of genetic material, particularly with respect to patents on life, and general misgivings about »tampering« with nature, require careful and politico-culturally sensitive procedures of analysis, evaluation, information and arbitration.

In 1991 the FAO Council endorsed a request from the Commission on Plant Genetic resources to draft a *Code of Conduct for Biotechnology as It Affects the Conservation and Use of Plant Genetic Resources*. The further development of the code was decided to be stalled, pending the revision of the Undertaking on Plant Genetic Resources expected to be concluded in late 2000. In the interim, FAO has prepared a statement on biotechnology where the Organisation states its support of a science-based evaluation system that would objectively determine benefits and risks of each individual GMO; this statement implies a call for a cautious case-by-case approach to address legitimate concerns for the biosafety of each product or process prior to its release. FAO thus supports the general application of the increasingly accepted precautionary principle in assessing biotechnological products and processes. Careful monitoring of the post-release effects of these products and processes is also considered essential to ensure their continued safety to human beings, animals and the environment. The Codex Alimentarius Committee (CAC) is considering the development of a standard which would apply basic food safety and control disciplines to foods derived through biotechnology.

Agricultural problems are multidisciplinary in their nature and biotechnology in isolation is unlikely to solve them. Agricultural technology is only one tool in addressing poverty and food security. Ultimately the reduction of poverty and associated malnutrition and hunger requires political solutions. Technology application by developing country farmers is often hampered by limited access to delivery systems, extension services, productive resources and markets as well as poorly developed rural infrastructure. Biotechnology is no 'quick fix' for the infrastructural, political and institutional constraints in many developing countries and policies that facilitate the incorporation of smallholders into commercial production are required. This requires revision of policies that tend to favour large-scale, industrial livestock production through artificial economies of

scale and externalization of negative environmental impacts. Linking small-scale producers vertically with larger-scale marketers and processors would combine the environmental and poverty-alleviation benefits of small-scale livestock production with the economies of scale that derive from larger-scale processing. Regulatory systems compatible with international best practice to ensure compliance with agreed bio-safety standards are required for consumer protection.

References

Cunningham, E. P., 1999. Recent developments in biotechnology as they relate to animal genetic resources for food and agriculture. Background Study Paper No. 10. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, FAO, Rome.

Delgado, C., M. Rosegrant, H. Steinfeld, S. Ehui, and C. Courbois, 1999. Livestock to 2020: The next food revolution. Food, Agriculture, and the Environment Discussion Paper 28. IFPRI/FAO/ILRI, IFPRI Washington, D. C.

FAO, 2000. World meat situation in 1999 and outlook for 2000. FAO, Rome.

IETS, 1999. The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: a data retrieval committee report (chair: M. Thibier). IETS Newsletter, Dec. 1999.

Rege, J. E. O. 1996. Biotechnology options for improving livestock production in developing countries, with special reference to sub-Saharan Africa. In: Lebbie S. H. B. and Kagwini E. 1996. Small Ruminant Research and Development in Africa. Proceedings of the Third Biennial Conference of the African Small Ruminant Research Network, UICC, Kampala, Uganda, 5-9 December 1994. ILRI (International Livestock Research Institute) Nairobi, Kenya. 326 pp. <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5473b/x5473b05.htm>.

Ryan, A., and Mae-Wan Ho, 2000. Transgenic DNA in animal feed critique of MAFF report CS0116 »Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation«. Institute of Science in Society and Biology Department Open University Walton Hall, Milton Keynes MK 7 6 AA, UK. <http://www.twinside.org.sg/title/feed-cn.htm>.

Thibier, M., and H.-G. Wagner, (accepted). World statistics for artificial insemination in cattle. Proc. 14th Internat. Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2-6 July 2000.

Wagner, H.-G., and M. Thibier, (accepted). World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. Proc. 14th Internat. Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2-6 July 2000.

Über die Integration fremder DNA in das Säugergenom und deren Folgen



Einleitung und Übersicht

Die Formen- und Artenvielfalt in der Biologie verstehen wir heute als Manifestation praktisch unbegrenzter Kombinationsmöglichkeiten der vier Nukleotide und ihrer Modifikationen, vorwiegend Methylierungen, im Genom aller Organismen und der Interaktionen dieser Genome und der sie tragenden Lebewesen mit den physikalisch-chemischen Bedingungen dieses Planeten und der auf ihn einwirkenden Kräfte. Die heute existierenden Lebensformen sind das Ergebnis einer Evolution über Milliarden von Jahren, der Schöpfung, deren Ursachen bei nüchterner Betrachtungsweise wissenschaftlich noch nicht verstanden sind. Ein Grundprinzip der Biologie ist die begrenzte Lebensdauer einzelner Individuen und Arten. Bei ihrem physischen Ende verbleiben große Mengen DNA mit erstaunlicher Stabilität, und ein Teil dieser Genome wird in der Umwelt freigesetzt. Die Überlebenden nehmen diese Genome vorwiegend und beständig mit der für sie essentiellen Nahrung in unterschiedlicher Form und Menge und auf sehr verschiedenen Wegen auf. Es wäre verwunderlich, wenn Teilsequenzen aus den so applizierten Fremd-Genomen nicht wieder verwendet werden könnten und so einen Beitrag zur Evolution geleistet haben sollten. Die Wirklichkeit dieser interessanten Vorgänge liegt im Dunklen und kann nur hypothetisch dargestellt werden.

In Tabelle 1 sind einige Quellen fremder DNA in der natürlichen Umwelt zusammengestellt. Die

Mengenangaben beruhen auf realistischen Schätzungen, aber nur zum Teil auf Messungen. Bei dieser Art von Überlegungen kann man davon ausgehen, daß DNA-Moleküle sehr stabil sind. Allerdings kann man nicht annehmen, daß sie in voller Länge, doppelsträngiger Form und ohne Mutationen in ihrer Nukleotidzusammensetzung alle Einflüsse einer DNA-feindlichen Umwelt überleben können. Erheblicher Schutz von Nukleotidsequenzen scheint dadurch gewährleistet zu sein, daß DNA vielfältige Fähigkeiten zur Interaktion mit Proteinen besitzt. In der Umwelt werden also vorwiegend Bruchstücke der in der Natur vorkommenden DNA Moleküle wahrscheinlich in mit Proteinen komplexierter Form anzutreffen sein oder noch in Resten von Zellen verwesender Organismen eingeschlossen sein.

Seit 1966 habe ich mich für das Schicksal fremder DNA in Säugerzellen interessiert, zunächst vorwiegend für den Verbleib von DNA aus dem menschlichen Adenovirus Typ 12 (Ad 12), das die Fähigkeit besitzt nach Injektion in neugeborene Syrische Hamster (*Mesocricetus auratus*) in der Mehrzahl der die Injektion überlebenden Tiere innerhalb von 4 bis 6 Wochen Neuroblastom-ähnliche Tumoren an der Injektionsstelle auszulösen. Die Integration viraler (fremder) DNA in ein etabliertes Genom könnte einen wesentlichen Beitrag bei der onkogenen Transformation von Zellen leisten. Auch aus diesem Grund habe ich dieses Thema zu einem zentralen Anliegen meiner Arbeiten in der molekulargene-

Tabelle 1: Große Mengen fremder DNA sind Teil unseres Ökosystems

1.	Nahrungsaufnahme (Mensch)
a)	Aufnahme pro Tag: 100 mg bis 1 g DNA
b)	Ausscheidung pro Tag: 1 mg bis 10 mg, etwa 1 Prozent der aufgenommenen DNA
c)	Kloake pro Tag: 1 kg bis 10 kg DNA pro Tag pro 1 Millionen Einwohner; DNA in Form hoch rekombinogener Fragmente
2.	Infektionen mit Viren und Mikroorganismen
3.	Beerdigungen pro Jahr 10 g DNA pro Mensch; 88 Tonnen DNA pro Jahr in Deutschland ¹
4.	Jahreszeitliche Belastung durch Pflanzen
a)	Pollenflug im Frühjahr
b)	Laub und Früchte im Herbst Wahrscheinlich Tonnen von DNA
5.	Übertragung bei Sexualverhalten 10 bis 30 mg DNA pro Jahr; 5 bis 15 kg DNA/Jahr pro 1 Million Einwohner
6.	Rekombinante DNA in den Laboratorien Pro Labor ng bis µg DNA pro Experiment ²
1.	bis 5. Vorgänge seit Jahrtausenden
6.	Rekombinante DNA seit 1972

¹ Im Jahr 1996 verstarben in Deutschland etwa 880 000 Menschen. Der Mensch besteht aus 10^{14} Zellen. Eine menschliche Zelle enthält etwa 10^{-6} µg DNA (Größenordnung): $10^{14} \times 11^{-6}$ µg = 10^2 g DNA pro Mensch.

² Ein Nanogramm (ng) ist 10^{-9} g, ein Mikrogramm (µg) 10^{-6} g.

tischen Grundlagenforschung gemacht. Zu diesem Thema habe ich zusammen mit über 100 Doktorandinnen, Doktoranden, Postdoktorandinnen und Postdoktoranden, die in meinem Laboratorium ausgebildet wurden, die folgenden grundlegend neuen Entdeckungen gemacht.

1. Die DNA des Tumovirus Ad12 wird durch eine kovalente Bindung in das Genom von Hamsterzellen integriert, und zwar transient in abortiv infizierten Hamsterzellen, permanent in Ad12-transformierten Zellen sowie in Ad12-induzierten Hamstertumorzellen (Doerfler 1968, 1970, Sutter et al. 1978, Gahlmann et al. 1982, Stabel and Doerfler 1982, Doerfler et al. 1983, Hilger-Eversheim and Doerfler 1997).

2. Möglicherweise kommt es zur kovalenten Bindung zwischen viraler und zellulärer DNA auch in produktiv infizierten Zellen, ist dort aber schwerer nachweisbar, weil die für Ad12 permissiven menschlichen Zellen die Infektion mit diesem Virus nicht überleben (Burger and Doerfler 1974, Schick et al. 1976, Schröer et al. 1997). Wir haben in produktiv infizierten menschlichen Zellen aber eine natürlich entstandene symmetrische Rekombinante (SYREC) von Ad12 DNA gefunden, die an beiden Termini die linksterminalen 2081 Nukleotidpaare von Ad12 DNA trägt und im Inneren des Moleküls aus einem sehr großen Palindrom zellulärer DNA besteht (Deuring et al. 1981; Deuring and Doerfler 1983). In dieser Rekombinante ist das Ad12 DNA Fragment kovalent an die zelluläre DNA gebunden. Diese Entdeckung hat die Voraussetzung geschaffen für die Konstruktion der sog. dritten Generation von Adenovirus-Vektoren in anderen Laboratorien.

3. Hamsterzellen stellen für Ad12 ein strikt abortives System dar, die Ad12 DNA Replikation ist in diesen Zellen vollständig blockiert (Doerfler 1969, Hösel et al. 2000). Ein Mitigator-Element in der »downstream« Region des späten Hauptpromotors von Ad12 DNA verhindert die Transkription aller späten Gene in diesem System (Zock and Doerfler 1990, 1995).

4. Die integrierte Ad12 DNA wird in Hamsterzellen umfassend und Segment-spezifisch *de novo* methyliert. Die *de novo* Methylierung wird an bestimmten Stellen der integrierten Ad12 Genome initiiert und breitet sich dann (»spreading«) über das Genom aus (Toth et al. 1989, Orend et al. 1995). Diese *de novo* Methylierung ist eine der Folgen der Integration fremder DNA in das Säuger-genom. Wir haben als erstes Laboratorium eine inverse Korrelation zwischen Promotor Methylierung und Promotor Aktivität nachgewiesen (Sutter and Doerfler 1979, 1980, Vardimon et al. 1980, Kruczek and Doerfler 1982). In späteren Jahren wurden diese Zusammenhänge in vielen anderen eukaryotischen Systemen für eine sehr große Zahl von Promotoren bestätigt (Übersicht bei Munnes and Doerfler 1997).

5. Die *in vitro* Prämethylierung inaktiviert viele Promotoren. Diese Inaktivierung wurde nach Transfektion in Säugerzellen nachgewiesen (Vardimon et al. 1982, Kruczek and Doerfler 1983, Langner et al. 1984, 1986). Dabei ist es entscheidend wichtig, an welcher Stelle im Promotor die Methylierung erfolgt und um welchen Promotor es sich dabei handelt (Muiznieks and Doerfler 1994, Munnes et al. 1995).

6. Die Beobachtung, daß fremde DNA in fast allen eukaryotischen Systemen *de novo* methyliert werden kann, hat zu der Arbeitshypothese geführt, daß die *de novo* Methylierung einen sehr alten zellulären Abwehr- und Schutzmechanismus darstellen könnte, der verhindern soll, daß fremde Gene, deren Eindringen in das Genom unter den Bedingungen unserer Umwelt nicht immer zu verhindern ist, unkontrolliert exprimiert werden (Doerfler 1991).

7. Die Integration fremder DNA in ein etabliertes Säuger-genom hat weiterhin zur Folge, daß die Methylierungs- und Expressionsmuster offenbar einer erheblichen Anzahl von zellulären Genen und DNA-Abschnitten, die auch weit entfernt von der Insertionsstelle der fremden DNA liegen können, grundlegend verändert werden (Heller et al. 1995, Doerfler 1996, Remus et al. 1999, Müller et al. 2000; Doerfler 1999 – bietet eine ausführliche Darstellung der möglichen Bedeutung dieser Beobachtungen in Buchform). Die möglichen Folgerungen aus dieser Entdeckung werden in einem späteren Abschnitt dieses Artikels diskutiert. Schon früher hatten wir beobachtet, daß die Methylierungsmuster zellulärer DNA unmittelbar an der Insertionsstelle fremder DNA verändert werden (Lichtenberg et al. 1988).

8. Aus dem Phänomen der *de novo* Methylierung und der unter 6. beschriebenen Arbeitshypothese ergab sich letztlich die Frage, auf welchem Weg Säugerorganismen, und in der Tat die meisten Organismen, vorwiegend mit fremder DNA in Berührung kommen. Die Entstehung eines so allgemein nachweisbaren Schutzmechanismus setzt möglicherweise dauernde und massive Exposition gegenüber fremder DNA voraus. Ohne Zweifel ist der Verdau-

ungstrakt das Organsystem bei Tieren, das mit einer stark vergrößerten, optimal die Resorption essentieller Nährstoffe ermöglichenden Oberfläche fremder DNA aus einer Vielzahl von Lebewesen am häufigsten und mit den größten Mengen ausgesetzt ist.

Wir haben gezeigt, daß nackte Test-DNAs unterschiedlicher Herkunft sowie Gene, die mit Pflanzen in den Gastrointestinaltrakt von Mäusen gelangen zwar zum größten Teil zu einer Form abgebaut werden, die durch Hybridisierungs- oder Amplifikationsmethoden der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nicht mehr nachgewiesen werden können. Ein kleiner Prozentsatz dieser DNAs übersteht aber in fragmentierter Form, wenn nackte DNA appliziert wurde, oder auch relativ intakt, wenn Blätter von Pflanzen verfüttert wurden, die Passage durch den Magen-Darm-Trakt von Mäusen. Fragmente dieser DNA können außerdem in den weißen Blutzellen, in Epithelzellen der Darmwand, in Zellen der Peyer-schen Plaques in der Darmwand sowie in Zellen von Leber und Milz mit verschiedenen Methoden (PCR, FISH) nachgewiesen werden. Die fremde DNA findet man dabei immer in den Kernen der Zellen. Wir haben gute Evidenz für die Annahme, daß ein kleiner Teil dieser fremden DNA auch kovalent an zelluläre Maus-DNA, möglicherweise an Pseudogene der Maus, gebunden (integriert) werden kann. Wenn trächtige Mäuse mit Fremd-DNA gefüttert werden, findet man Fragmente dieser DNA in Zellgruppen der Foeten und der Neugeborenen, zum Teil in Assoziation mit den Chromosomen. Der Nachweis insbesondere in Neugeborenen spricht ebenfalls für die Integration in das Genom der Zielzellen. Da wir durch langfristige DNA-Fütterung von Mäusen bisher niemals transgene Tiere erzeugen konnten, scheint der Transfer vom trächtigen Tier auf die Nachkommen diaplazentar und nicht über die Keimbahn erfolgt zu sein. Offenbar und sinnvollerweise ist die Keimbahn vor dem Eindringen von Fremd-DNA geschützt. Über Abwehr- und Schutzmechanismen gegenüber fremder DNA im Organismus von Säugern wissen wir zur Zeit

nichts. Wir haben jetzt Experimente initiiert, um außer DNA auch das Schicksal anderer Makromoleküle im Gastrointestinaltrakt von Säugern zu verfolgen. Die hier zusammengefaßten Ergebnisse sind bereits zum größten Teil publiziert worden (Schubert et al. 1994, 1997, 1998, Doerfler et al. 1997) oder werden für die Veröffentlichung vorbereitet (Hohlweg and Doerfler 2000).

Integration von Ad 12 DNA in das zelluläre Genom in Ad 12-induzierten Hamstertumoren: Keine Evidenz für spezifische Insertionsstellen (Hilger-Eversheim and Doerfler 1997).

Die Nukleotidsequenzanalyse einer Anzahl von Verbindungsstellen zwischen Ad 12 DNA und zellulären Genomen aus Ad 12-transformierten oder Ad 12-induzierten Tumorzellen oder aus Ad 2-transformierten Zellen hatte keine Hinweise für das Vorkommen spezifischer Integrationsstellen in das Säuger-genom ergeben (Doerfler et al., 1983). In einer größeren Versuchsserie wurden jetzt die Insertionsstellen von Ad 12 DNA in das Genom von Hamstern in etwa 60 unabhängig voneinander durch Injektion von Ad 12 in Hamstern induzierten Tumoren analysiert. Dazu wurden einerseits die FISH Methode an Karyotypen einzelner Zellen, zum anderen die Southern DNA Transfer Hybridisierungsmethode an der DNA angewandt, die aus einzelnen Tumoren isoliert worden war. Beide experimentelle Ansätze zeigten eindeutig, daß die Insertionsstelle der Ad 12 DNA in jedem Tumor sowohl an einer anderen Stelle der Chromosomen lag als auch ein Integrationsmuster aufwies, das in jedem Tumor unterschiedlich war. Dagegen wiesen alle Zellen eines bestimmten Tumors das gleiche Integrationsmuster und die gleiche chromosomale Insertionsstelle auf. Die Tumoren sind also mit größter Wahrscheinlichkeit klonalen Ursprungs. Mit Interesse ist festzuhalten, daß in den meisten der 60 unterschiedlichen Tumoren multiple Kopien von Ad 12 DNA an einer Stelle im Genom integriert werden. Nicht selten entstehen in einem Tier an der Injektionsstelle mehrere, voneinander durch streng getrennte Kapseln

eindeutig unterscheidbare Tumoren. Die Insertionsstellen der Ad 12 DNA sind selbst in unterschiedlichen Tumoren im gleichen Tier unterschiedlich und so charakterisiert wie eben beschrieben. Nach der Explantation von Tumorzellen aus einem Tumor in Zellkultur bleiben die Integrationsmuster über viele Zellgenerationen stabil und unterscheiden sich nicht von denen, die im ursprünglichen Tumor gefunden worden waren. Es ergibt sich also keine Evidenz für die Annahme, daß es nach Überführung der Zellen aus dem Tumor in Zellkultur zu Umlagerungen der integrierten Ad 12 (Fremd) Genome gekommen sein könnte. Auch in Ad 12-induzierten Tumoren gibt es keine Hinweise auf spezifische Insertionsstellen der Ad 12 (Fremd-) DNA.

Ad 12-induzierte Hamstertumoren sind klonalen Ursprungs. Alle Zellen eines Tumors tragen multiple Kopien von Ad 12 DNA meist an einer Stelle im zellulären Genom integriert. In jedem Tumor erfolgt die Integration der Fremd (Ad 12) DNA an einer anderen Stelle. Es gibt keine Hinweise für die Existenz von spezifischen Stellen der Ad 12 DNA Integration im Hamstergenom. Transkriptionell aktive Stellen im Genom der Rezipientenzelle könnten allerdings bei der Rekombination mit Fremd (Ad 12) DNA bevorzugt werden. Die Integrationsstellen in den Tumorzellen sind auch in Zellkultur in der Regel sehr stabil.

Folgen der Integration fremder DNA in das Hamsterzellgenom (Heller et al. 1995, Doerfler 1996, Remus et al. 1999).

Nachdem wir beobachtet hatten, daß sich die Methylierung von 5'-CCGG-3' und 5'-GCGC-3' Sequenzen in der unmittelbaren Nachbarschaft von Ad 12 Integrationsstellen im Genom von Hamster Tumorzellen erheblich verändert (Lichtenberg et al. 1988), ergab sich die Frage ob derartige Veränderungen im Methylierungsmuster des Hamstergenoms auch an anderen, weiter von der Integrationsstelle entfernten Stellen nachzuweisen sein könnten. In einer Reihe von Ad 12-transformierten Hamsterzelllinien und Ad 12-induzierten Tumoren

haben wir erhebliche Veränderungen im Methylierungsmuster in den IAP-Sequenzen (intracisternale A Partikel, die mit etwa 900 Kopien im Hamstergenom vorkommen) und in einer Reihe bekannter Hamstergene nachweisen können. Dieser Nachweis gelang sowohl durch Restriktion mit Methylierungsempfindlichen Endonukleasen und durch die Southern DNA Transfer Hybridisierung als auch mit Hilfe des sehr exakten Bisulfit-Protokolls der genomischen Sequenzierungsmethode. Die letztere Methode ermöglicht es, alle Cytidinreste in einem Genomabschnitt auf das Vorkommen von Methylgruppen zu untersuchen (Frommer et al. 1992; Clark et al. 1994, Zeschnigk et al., 1997, Schumacher et al. 1998).

In den Ad 12-transformierten Zellen oder in den Ad 12-induzierten Tumorzellen konnten die Veränderungen im Methylierungsmuster mehrerer zellulärer Gene oder DNA Abschnitte zumindest teilweise durch den transformierten Zustand der Zellen bedingt sein. Wir haben deshalb Hamsterzellen durch Transfektion mit der DNA des Bakteriophagen Lambda transgen für diese Fremd-DNA gemacht. Auch Lambda DNA integriert nach der Transfektion der Zellen an vielen verschiedenen Stellen im Hamstergenom, und die inserierte Fremd-DNA wird ebenfalls extensiv de novo methyliert. Mit den oben beschriebenen Methoden konnten wir in den Lambda DNA-transgenen Zellen ebenfalls deutliche Veränderungen im Methylierungsmuster der repetitiven IAP Sequenzen im Hamstergenom nachweisen.

In zahlreichen Subklonen der verwendeten BHK 21 Hamsterzelllinie konnten wir in Kontrollexperimenten keine unterschiedlichen Methylierungsmuster in den IAP Sequenzen finden, wenn diese Zellen nicht transgen waren. Es bestand also *a priori* kein nachweisbarer Mosaizismus im IAP Methylierungsmuster in den Hamsterzellen. Zur Zeit wenden wir eine Reihe verschiedener sehr empfindlicher Methoden an, mit denen wir Methylierungsunterschiede in randomisiert gewählten DNA Ab-

schnitten im Hamstergenom für Lambda DNA transgener Zellen mit denen in nicht transgenen Hamsterzellen vergleichen. Für einige Hamstergene und DNA Abschnitte haben wir ebenfalls Veränderungen im Methylierungsmuster, sowie auch im Expressionsmuster von verschiedenen Genen in den transgenen Zellen gefunden (Müller et al., submitted, 2000).

Diese Resultate sprechen dafür, daß durch die Integration von fremder DNA in ein etabliertes Säuger-genom die Methylierungsmuster in zellulären DNA Abschnitten und Genen auch fernab der Insertionsstelle erheblich verändert werden können. Da DNA Methylierungsmuster, vor allem im Promotor Bereich von Genen, und Expressionsmuster von Genen häufig invers korreliert sind (Doerfler 1983), besteht zumindest die Möglichkeit, daß Veränderungen im Methylierungsmuster auch die Expression bestimmter Gene beeinflussen können. In vielen Experimenten der molekulargenetischen Grundlagenforschung, bei der Herstellung transgener Tiere und Pflanzen sowie bei der Ausschaltung von Genen (»knockout« Experimente) oder bei Experimenten zur somatischen Gentherapie inseriert man fremde DNA in etablierte Genome von Tieren oder Pflanzen. Die Interpretation vieler dieser Experimente könnte durch die hier geschilderten Daten auch in einem komplexeren Licht zu betrachten sein. Zumindest wird die Möglichkeit veränderter Methylierungs- und Expressionsmuster bei der Interpretation vieler dieser Experimente zu berücksichtigen sein.

Über das Schicksal mit der Nahrung aufgenommenen fremder DNA im Säugerorganismus: Fremde DNA aus dem Gastrointestinaltrakt vermag die Darm- und Plazentarschranke zu überwinden (Schubbert et al. 1994, 1997, 1998).

Die bisherigen, zum großen Teil veröffentlichten Ergebnisse zeigen, daß DNA Fragmente aus dem Darm über das einschichtige Zylinderepithel des Darms und Abwehrzellen in den Peyerschen Plaques durch den Ductus thoracicus in die Blutbahn

gelangen, dann in Milz- und Leberendothelzellen, möglicherweise in Kupfer Zellen, kurze Zeit gespeichert und letztlich wahrscheinlich abgebaut werden. Über den Abbau der Fremd-DNA wissen wir noch nichts. In wenigen Milzzellen könnten Fremd-DNA Fragmente in das Genom dieser Zellen integriert werden. Die Häufigkeit dieser Fremd-DNA Persistenz in Geweben des Empfängerorganismus, Abwehrmechanismen und langfristige Auswirkungen für die befallenen Zellen haben wir noch nicht untersucht. Diese Fragen sollen in den nächsten Jahren intensiv bearbeitet werden. Über mutagene oder onkogene Folgen dieser Fremd-DNA Persistenz kann man zur Zeit nur spekulieren. Als gesichert gilt, daß Fragmente von Fremd-DNA im Darm persistieren und in den Organismus gelangen können, selbst wenn man – als hier gewähltes extremes experimentelles Szenario – freie, ungeschützte DNA an Mäuse verfüttert.

Wir haben auch trächtige Mäuse mit Test-DNAs gefüttert und anschließend Fragmente von 830 bp über PCR in Geweben der Foeten und Neugeborenen nachweisen können. FISH-Analysen zeigten Gruppen von Zellen in verschiedenen Organen von Foeten und Neugeborenen, deren Kerne Test-DNA enthielten. In vereinzelt Fällen gelang in foetalen Zellen der Nachweise einer Assoziation von Fremd-DNA mit den Chromosomen dieser Zellen. Die oben geschilderten Reklonierungsexperimente, die chromosomale Assoziation in foetalen Zellen sowie der Nachweis in Geweben von Neugeborenen ergeben sehr gute Evidenzen für die Annahme, daß Fremd-DNA nach oraler Applikation in seltenen Fällen und in ganz vereinzelt Zellen tatsächlich in das Genom der Rezipienten oder deren Nachkommen integriert werden kann. Wie bereits ausgeführt, gelangt Fremd-DNA vom mütterlichen Organismus transplacentar, nicht über die Keimbahn, in den foetalen Organismus.

Als mögliche praktische Schlußfolgerung aus diesen Resultaten ergibt sich der Hinweis, daß die Ernährung während der Schwangerschaft sinnvol-

erweise den Genuß von kernreichen, z. B. parenchymatösen Geweben meiden sollte. Der DNA Gehalt der gängigen Nahrungsmittel ist bisher nicht exakt bestimmt worden.

Das Schicksal von Pflanzen- und anderen fremden Genen nach Aufnahme mit der Nahrung oder nach intramuskulärer Injektion (Hohlweg and Doerfler, 2000).

Die Nahrung ist die Haupt-Quelle bei der Aufnahme fremder DNA durch alle Organismen. Wir haben die Aufnahme und Verteilung von mit der Nahrung aufgenommenen DNA in Modelexperimenten mit Mäusen untersucht. Die DNA des Bakteriophagen M13 und des klonierten Gens für das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, die als Testgene an Mäuse verfüttert wurden, konnten vom Darminhalt über die Darmwand, die Peyerschen Plaques und periphere weiße Blutzellen bis in die Milz und Leber verfolgt werden. Es gibt Hinweise darauf, daß aus der Milz rekloniert und durch ihre Sequenz identifizierte Test-DNA kovalent an Maus-Pseudogene gebunden worden ist. Fremde DNA, die trächtigen Mäusen oral verabreicht wurde, kann über die Plazenta auf den Foetus und neugeborene Tiere übertragen werden.

In neueren Experimenten haben wir jetzt ein natürliches Szenario gewählt und Sojablätter an Mäuse verfüttert. Dabei wurde die Verteilung des Pflanzen-spezifischen Gens für die kleine Unter-einheit des Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) Gens im Mausorganismus untersucht. Ab 2 Stunden nach Verfütterung von Sojablättern konnte das Rubisco-Gen fast intakt im Inhalt verschiedener Darmsegmente, wahrscheinlich in subzellulärer Kompartimentalisierung noch komplexiert mit Proteinen nachgewiesen werden. Mit Hilfe der PCR konnten Fragmente des Rubisco-Gens bis zu 49 Stunden nach Fütterung im Darm gefunden werden, im Caecum sogar noch nach 121 Stunden. Somit ist natürlich verfütterte Pflanzen-DNA im Intestinaltrakt stabiler als nackte DNA, die schon nach 18 Stunden nach Verfütterung aus dem Intestinaltrakt

verschwunden war. Rubisco-Gen-spezifische PCR Produkte von einer Länge von 337 Nukleotiden konnten aus Milz- und Leber-DNA amplifiziert werden. Nach Verfütterung des klonierten GFP-Gens konnten in keinem Fall GFP-exprimierende, grün fluoreszierende Zellen in den Organsystemen der Maus gefunden werden. RNA-Präparationen aus verschiedenen Organen mit dem klonierten GFP-Gen gefütterter Mäuse wurden mit Hilfe der RT-PCR Technik auf das Vorhandensein GFP-spezifischer Sequenzen untersucht. Die Ergebnisse waren alle negativ. Somit gibt es keine nachweisbare Expression der oral verabreichten GFP DNA. Desweiteren wurden Mäuse täglich mit 50 µg der klonierten GFP DNA kontinuierlich über acht Generationen hinweg gefüttert. Es wurden durchschnittlich je 12 Tiere pro Generation auf den transgenen Zustand durch PCR-Analyse von der Schwanzspitze entnommener DNA, manchmal auch der inneren Organe, untersucht. Die Ergebnisse waren durchweg negativ und sprechen gegen einen Transfer der oral verabreichten DNA über die Keimbahn. Nach intramuskulärer Injektion klonierter GFP-DNA wurden 772 Nukleotide lange authentische GFP-DNA-Abschnitte mit Hilfe der PCR bis zu 4 Monate nach der Injektion aus Muskel-DNA amplifiziert, bis zu 24 Stunden nach intramuskulärer Injektion aus der Leber und der DNA des kontralateralen Muskels. GFP Fragmente mit einer Größe von 594 Basenpaaren können auch bis zu 6 Stunden nach Injektion im Darminhalt wiedergefunden werden. Offensichtlich eliminiert der Organismus injizierte fremde DNA über die Leber-Galle-Darm Route. An der Injektionsstelle konnte die Transkription von GFP DNA nachgewiesen und grün fluoreszierende Muskelfasern gefunden werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

DNA ist in der natürlichen Umwelt weit verbreitet und kann nicht nur durch Infektionen mit Viren oder anderen Mikroorganismen in Säugerorganismen gelangen. Zweifellos verfügen Viren und

andere Mikroorganismen über hoch-spezialisierte Mechanismen, um ihre Genome in Zellen und spezifische Organe von Säugern einzuschleusen. Andererseits ist die permanente Exposition des Magen-Darmtraktes u. a. von Säugern, und natürlich von allen Tieren, mit Fremd-DNA die häufigste und wahrscheinlichste Eintrittspforte fremder DNA in die Organismen. Immunologische Abwehrmechanismen gegenüber fremden Proteinen oder den Proteinhüllen von Viren und Mikroorganismen sind zum Teil hervorragend untersucht worden. Andererseits sind Mechanismen, durch die sich die Organismen gegen die in der Natur weitverbreitete und sehr stabile DNA schützen, bisher kaum identifiziert und analysiert worden.

Die Integration fremder DNA in etablierte Säugergenome und deren Folgen für Methylierungs- und Expressionsmuster im Genom der Rezipientenzellen haben wir am Beispiel der Ad 12 DNA und der DNA des Bakteriophagen Lambda, die auf unterschiedliche Weise, nämlich durch Virusinfektion (Ad 12) oder durch Transfektion von DNA (Lambda DNA) in das Säuger genom integriert wurden, im Detail beschrieben. Adenovirus DNA, möglicherweise auch andere fremde DNA integriert offenbar häufig an transkriptionell aktiven, strukturell für die Rekombination mit Fremd-DNA prädisponierten Stellen in das Hamstergenom (Gahlmann et al. 1984, Schulz et al. 1987). Nachdem wir in diesen Fällen mit klonierten Zelllinien transformierter oder Tumorzellen arbeiten konnten, wurden detaillierte molekulare Analysen möglich.

Wir haben in den letzten Jahren versucht, den Mechanismus der Fremd-DNA Integration am Ad12-Hamsterzell System mit Hilfe eines in meinem Laboratorium entwickelten *in vitro* Systems aus zellfreien Extrakten von Hamsterzellkernen zu untersuchen (Jessberger et al. 1989, Tatzelt et al. 1993, Wronka et al. 2000). Diese Kernextrakte wurden mit chromatographischen Methoden partiell gereinigt. Die am weitesten gereinigten Fraktionen, die noch Rekombinationsaktivität *in vitro*

aufwiesen, enthielten 6 Hauptkomponenten von Proteinen und eine Reihe weiterer Proteine in geringeren Konzentrationen. Die Struktur der *in vitro* entstandenen Rekombinanten zwischen einem Ad12 DNA Fragment und einer sog. Präinsertionssequenz aus Hamsterzellen, in die Ad12 DNA in einem *in vivo* durch Ad12 Injektion in einem Hamster entstandenen Tumor integriert worden war (Stabel et al. 1980), zeigte große Ähnlichkeit mit den Integraten von Ad12 DNA in transformierten und Tumorzellen. Nach diesen Sequenzanalysen an den Verbindungsstellen zwischen Ad12 DNA und Hamster-DNA aus transformierten oder Tumorzellen einerseits und an Rekombinanten, die im zellfreien System generiert worden waren, scheinen kurze Sequenzhomologien zwischen der integrierenden Ad12 DNA und der Rezipienten-Hamster DNA eine wichtige Rolle für die Auswahl der Integrations- bzw. Rekombinationsstellen zu spielen. An den Verbindungsstellen können Nukleotide deletiert werden, allerdings finden sich solche Deletionen nicht immer (Gahlmann et al. 1982, Stabel and Doerfler 1982, Schulz and Doerfler. 1984, Wronka et al. 2000). Zellfreie Extrakte aus uninfizierten Hamsterzellen enthalten offenbar alle Komponenten für diese zellfreie (integrative) Rekombination. Extrakte aus Kernen von Ad12-infizierten Hamsterzellen könnten eine etwas höhere Rekombinationsaktivität im zellfreien System besitzen.

In den jetzt initiierten Forschungsprojekten werden wir uns vorwiegend mit den Änderungen von Methylierungs- und Expressionsmustern in Säugergenomen beschäftigen, in die fremde DNA integriert wurde. Diese Resultate haben allgemeine Bedeutung, haben sie doch erhebliche Konsequenzen für die Interpretation von Transfektionsexperimenten und von Resultaten mit transgenen Tieren (knock-out Technologie) und Pflanzen. Insbesondere die sinnvolle Anwendung von Verfahren für die somatische Gentherapie wird durch unsere Untersuchungen in ein zu hinterfragendes Licht gestellt. Effekte an transgenen Organismen müssen in Zukunft sehr viel genauer untersucht werden, ins-

besondere auf die Beiträge vieler anderer Gene, deren Expression durch den Einbau von Fremd-DNA verändert worden sein könnte.

Finanzielle Förderung der Forschungsprojekte des Autors

Seit 1966 wurden meine hier beschriebenen Forschungsprojekte zu verschiedenen Zeiten von den folgenden Institutionen gefördert: National Institutes of Health (1966–1969), Public Health Research Council of the City of New York (Career Scientist Award an W. D., 1969 bis 1971), American Cancer Society (1969 bis 1972), Swedish Cancer Society (1971 bis 1972), Universität zu Köln (seit 1972), Deutsche Forschungsgemeinschaft über verschiedene Programme, insbesondere durch die SFBs 74 (1972 bis 1988) und 274 (1989 bis 2000), Land Nordrhein-Westfalen (seit 1972), Alexander-von-Humboldt-Stiftung, Bonn durch Stipendien an Postdoktoranden, Fritz-Thyssen-Stiftung, Köln, Sander Stiftung, München, Kämpgen-Stiftung, Köln, Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt/Main, Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, München.

Literatur

BURGER, H., and DOERFLER, W.: Intracellular forms of adenovirus DNA. III. Integration of the DNA of adenovirus type 2 into host DNA in productively infected cells. *J. Virol.* 13, 975–992 (1974)

CLARK, S.J., HARRISON, J., PAUL, C.L., and FROMMER, M.: High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22, 2999–2997 (1994)

DEURING, R., and DOERFLER, W.: Proof of recombination between viral and cellular genomes in human KB cells productively infected by adenovirus type 12: structure of the junction site in a symmetric recombinant (SYREC). *Gene* 26, 283–289 (1983).

DEURING, R., KLOTZ, G., and DOERFLER, W.: An unusual symmetric recombinant between adenovirus type 12 DNA and human cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3142–3146 (1981).

DOERFLER, W.: The fate of DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 636–643 (1968).

DOERFLER, W.: Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* 38, 587–606 (1969).

- DOERFLER, W.: Integration of the deoxyribonucleic acid of adenovirus type 12 into the deoxyribonucleic acid of baby hamster kidney cells. *J. Virol.* 6, 652-666 (1970).
- DOERFLER, W.: DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 93-124.
- DOERFLER, W.: Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism - A proposal. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 557-564 (1991).
- DOERFLER, W.: A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *BBA Rev. Cancer* 1288, F-79-F99 (1996).
- DOERFLER, W.: Foreign DNA in Mammalian Systems. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH 1999.
- DOERFLER, W., GAHLMANN, R., STABEL, S., DEURING, R., LICHTENBERG, U., SCHULZ, M., EICK, D., and LEISTEN, R.: On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs: the structure of junction sites. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 109, 193-228 (1983).
- DOERFLER, W., SCHUBBERT, R., HELLER, H., KÄMMER, C., HILGER-EVERSHEIM, K., KNOBLAUCH, M., and REMUS, R.: Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends Biotech.* 15, 297-301 (1997).
- FROMMER, M., MCDONALD, L.E., MILLAR, D.S., COLLIS, C.M., WATT, F., GRIGG, G.W., MOLLOY, P.L., and PAUL, C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831 (1992).
- GAHLMANN, R., LEISTEN, R., VARDIMON, L., and DOERFLER, W.: Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. *EMBO J.* 1, 1101-1104 (1982).
- GAHLMANN, R., SCHULZ, M., and DOERFLER, W.: Low molecular weight RNAs with homologies to cellular DNA at sites of adenovirus DNA insertion in hamster or mouse cells. *EMBO J.* 3, 3263-3269 (1984).
- HELLER, H., KÄMMER, C., WILGENBUS, P., and DOERFLER, W.: Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid or bacteriophage ϕ) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5515-5519 (1995).
- HILGER-EVERSHEIM, K., and DOERFLER, W.: Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors: nonspecific chromosomal integration sites of viral DNA. *Cancer Res.* 57, 3001-3009 (1997).
- HÖSEL, M., SCHRÖER, J., WEBB, D., JAROSCHEVSKAJA, E., and DOERFLER, W.: Cellular and early viral factors in the interaction of adenovirus type 12 with hamster cells: the abortive response. Submitted (2000).
- HOHLWEG, U., and DOERFLER, W.: On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection. Submitted (2000).
- JESSBERGER, R., HEUSS, D., and DOERFLER, W.: Recombination in hamster cell nuclear extracts between adenovirus type 12 DNA and two hamster preinsertion sequences. *EMBO J.* 8, 869-878 (1989).
- KRUCZEK, I., and DOERFLER, W.: The unmethylated state of the promoter/leader and 5'-regions of integrated adenovirus genes correlates with gene expression. *EMBO J.* 1, 409-414 (1982).
- KRUCZEK, I., and DOERFLER, W.: Expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in mammalian cells under the control of adenovirus type 12 promoters: effect of promoter methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7586-7590 (1983).
- LANGNER, K.-D., VARDIMON, L., RENZ, D., and DOERFLER, W.: DNA methylation of three 5' C-C-G-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivates the E2a gene of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2950-2954 (1984).
- LANGNER, K.-D., WEYER, U., and DOERFLER, W.: Trans effect of the E1 region of adenoviruses on the expression of a prokaryotic gene in mammalian cells: resistance to 5'-CCGG-3' methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1598-1602 (1986).
- LICHTENBERG, U., ZOCK, C., and DOERFLER, W.: Integration of foreign DNA into mammalian genome can be associated with hypomethylation at site of insertion. *Virus Res.* 11, 335-342 (1988).
- MÜLLER, K., HELLER, H., AND DOERFLER, W.: The integration of foreign DNA into an established mammalian genome can lead to alterations in methylation and transcription patterns remote from the insertion site. Submitted (2000).
- MUIZNIKES, I., and DOERFLER, W.: The topology of the promoter of RNA polymerase II- and III-transcribed genes is modified by the methylation of 5'-CG-3' dinucleotides. *Nucleic Acids Res.* 22, 2568-2575 (1994).
- MUNNES, M., and DOERFLER, W.: DNA methylation in mammalian genomes: promoter activity and genetic imprinting. In: Dulbecco, R. (Eds.): *Encyclopedia of Human Biology*, vol. 3, pp. 435-446. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 1997.
- MUNNES, M., SCHETTER, D., HÖLKER, I., and DOERFLER, W.: A fully 5'-CG-3' but not a 5'-CCGG-3' methylated late frog virus 3 promoter retains activity. *J. Virol.* 69, 2240-2247 (1995).
- OREND, G., KNOBLAUCH, M., KÄMMER, C., TJIA, S.T., SCHMITZ, B., LINKWITZ, A., MEYER ZU ALTENSCHILDESCHE, G., MAAS, J., and DOERFLER, W.: The initiation of de novo methylation of foreign DNA integrated into a mammalian genome is not exclusively targeted by nucleotide sequence. *J. Virol.* 69, 1226-1242 (1995).
- REMUS, R., KÄMMER, C., HELLER, B., SCHMITZ, B., SCHELL, G., and DOERFLER, W.: Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J. Virol.* 73, 1010-1022 (1999).
- SCHICK, J., BACZKO, K., FANNING, E., GRONEBERG, J., BURGER, H., and DOERFLER, W.: Intracellular forms of adenovirus DNA: integrated form of adenovirus DNA appears early in productive infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1043-1047 (1976).
- SCHRÖER, J., HÖLKER, I., and DOERFLER, W.: Adenovirus type 12 DNA firmly associates with mammalian chromosomes early after virus infection or after DNA transfer by the addition of DNA to the cell culture medium. *J. Virol.* 71, 7923-7932 (1997).
- SCHUBBERT, R., GERHARDT, U., and DOERFLER, W.: On the fate of food-ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet.* 259, 569-576 (1998).

- SCHUBBERT, R., LETTMANN, C., and DOERFLER, W.: Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* 242, 495-504 (1994).
- SCHUBBERT, R., RENZ, D., SCHMITZ, B., and DOERFLER, W.: Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 961-966 (1997).
- SCHULZ, M., and DOERFLER, W.: Deletion of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA-12-1-T. *Nucleic Acids Res.* 12, 4959-4976 (1984).
- SCHULZ, M., FREISEM-RABIEN, U., JESSBERGER, R., and DOERFLER, W.: Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. *J. Virol.* 61, 344-353 (1987).
- SCHUMACHER, A., BUITING, K., ZESCHNIGK, W., DOERFLER, W., and HORSTHEMKE, B.: Methylation analysis of the PWS/AS region does not support an enhancer competition model of genomic imprinting on human chromosome 15. *Nature Genet.* 19, 324-325 (1998).
- STABEL, S., and DOERFLER, W.: Nucleotide sequence at the site of junction between adenovirus type 12 DNA and repetitive hamster cell DNA in transformed cell line CLAC1. *Nucleic Acids Res.* 10, 8007-8023 (1982).
- STABEL, S., DOERFLER, W., and FRIIS, R.R.: Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells. *J. Virol.* 36, 22-40 (1980).
- SUTTER, D., and DOERFLER, W.: Methylation of integrated viral DNA sequences in hamster cells transformed by adenovirus 12. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 565-568 (1979).
- SUTTER, D., and DOERFLER, W.: Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 253-256 (1980).
- SUTTER, D., WESTPHAL, M., and DOERFLER, W.: Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* 14, 569-585 (1978).
- TATZELT, J., FECHTELER, K., LANGENBACH, P., and DOERFLER, W.: Fractionated nuclear extracts from hamster cells catalyze cell-free recombination at selective sequences between adenovirus DNA and a hamster preinsertion site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7356-7360 (1993).
- TOTH, M., LICHTENBERG, U., and DOERFLER, W.: Genomic sequencing reveals a 5-methylcytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3728-3732 (1989).
- VARDIMON, L., KRESSMANN, A., CEDAR, H., MAECHLER, M., and DOERFLER, W.: Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1073-1077 (1982).
- VARDIMON, L., NEUMANN, R., KUHLMANN, I., SUTTER, D., and DOERFLER, W.: DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells. *Nucleic Acids Res.* 8, 2461-2473 (1980).
- WRONKA, G., FECHTELER, K., SCHMITZ, B., and DOERFLER, W.: Recombination between adenovirus type 12 DNA and mammalian DNA: purification of a cell-free system and analyses of in vitro generated recombinants. *J. Virol.*, under revision (2000).
- ZESCHNIGK, M., SCHMITZ, B., DITTRICH, B., BUITING, K., HORSTHEMKE, B., and DOERFLER, W.: Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum. Mol. Genet.* 6, 387-395 (1997).
- ZOCK, C., and DOERFLER, W.: A mitigator sequence in the downstream region of the major late promoter of adenovirus type 12 DNA. *EMBO J.* 9, 1615-1623 (1990).
- ZOCK, C., and DOERFLER, W.: Investigations on virus-host interactions: an abortive system. *Methods Mol. Genet.* 7, 167-192 (1995).

Zur Frage der ethischen Bewertung der Anwendung von Biotechnologien bei Nutztieren



1. Einleitung

Der Zugriff auf Tiere zu vom Menschen gesetzten Zwecken im allgemeinen und der Einsatz von Biotechnologien bei Nutztieren im besonderen werfen neben rechtlichen Fragen, solchen also nach der Legalität, auch ethische Probleme auf, solche nämlich nach der Legitimität der verfolgten Ziele, der Vertretbarkeit der eingesetzten Mittel und der Hinnehmbarkeit der Folgen. Der Beitrag der Philosophie als analytischer Reflexionswissenschaft zur Frage der Bewertung der Anwendung von Biotechnologien bei Nutztieren besteht zum einen darin, die für diesen Handlungsbereich einschlägigen Prinzipien und Normen zu diskutieren und ihr Verhältnis zueinander zu reflektieren, und zum anderen darin, Begründungszusammenhänge zu analysieren.

Im Folgenden geht es, vor dem Hintergrund einer kurzen begrifflichen Darstellung der Unterschiede und Aufgaben von Moral und Ethik, in einem ersten Schritt um eine Skizze der gegenwärtigen Tierethikdiskussion. In einem zweiten Schritt wird ein Ausgang an tierethische Fragen vorgestellt, den man zwecks Unterscheidung von bio- oder pathozentrischen Ansätzen einerseits und dem anthropozentrischen Ansatz andererseits *anthropo-relational* nennen kann. Der dritte Schritt gilt der Anwendung dieses ethischen Ansatzes auf die Analyse biotechnologischer Verfahren bei Nutztieren. Die Darlegungen enden mit einem Blick auf den Zusammenhang zwischen Natur und Kultur ange-

sichts der sich rapide entwickelnden Möglichkeiten biotechnologischer Verfahren bei Tieren.

2. Moral und Ethik

Auch wenn die Begriffe »Moral« und »Ethik« bzw. die entsprechenden Adjektive »moralisch« und »ethisch« in der Öffentlichkeit vielfach synonym verwendet werden, läßt sich mit ihrer Hilfe ein wichtiger Unterschied namhaft machen. Unter *Moral* versteht man in der Philosophie in der Regel die Gesamtheit der in einer gegebenen Gesellschaft zu einer gegebenen Zeit im Konsens akzeptierten Normen Gutes bewirkender und Schlechtes vermeidender Handlungsvorschriften; Ethik meint im Unterschied hierzu die Analyse und Reflexion der einer gegebenen Moral unterliegenden Prinzipien und Normen. Moral ist mithin stets ein empirisches Phänomen, Ethik hingegen ein theoretisches Konstrukt. Es gibt durch die Zeiten hindurch viele Moralen, ja selbst zu ein und derselben Zeit existiert in der Welt eine Pluralität von Moralen – ein allgemein bekanntes empirisches Phänomen. Dessen wissenschaftliche Reflexion, die Ethik, ist nicht Rede *von*, sondern *über* Moral. Ethik gibt sich nicht zufrieden mit der Feststellung, eine bestimmte Handlung sei moralisch gut oder schlecht, Ethik fragt nach der *Begründung* moralischen Gut- bzw. Schlechtseins von Handlungen. Wenn die in unserem Kulturkreis akzeptierte Moral den Zugriff des Menschen auf Tiere zu vom Menschen gesetzten Zwecken unter bestimmten Bedingungen

erlaubt, so fragt die Ethik nach der Begründung der Moralität dieser Praxis. Dies bedeutet im Hinblick auf tierethische Fragen: Während moralische Analyse untersucht, wie der Umgang mit Tieren in unserer Moral gerechtfertigt ist, analysiert Ethik, auf welcher Grundlage ein solcher Umgang mit dem Tier überhaupt rechtfertigungsfähig ist und warum Grenzziehungen vorzunehmen sind. Genereller Hintergrund der heutigen Tierethikdiskussion ist die Frage, ob es eine Mensch und Tier einigende Moral gibt, ob beide Mitglieder derselben moralischen Gemeinschaft sind oder nicht.

3. Skizze der gegenwärtigen tierethischen Diskussion

Die Vorstellung, der Mensch könne Tiere nach Belieben seinen Zwecken unterwerfen, findet heute kaum noch Befürworter. Eine derartige Einstellung wäre in Deutschland überdies mit dem Tierschutzgesetz im Konflikt, welches den Menschen auf das Wohl des Tieres verpflichtet. Darüber, was dies konkret bedeutet, gehen die Meinungen jedoch seit geraumer Zeit mit zunehmender Deutlichkeit auseinander. Ist das Tier menschlicher Zwecksetzung grundsätzlich entzogen oder kann es unter engen Bedingungen vom Menschen in Anspruch genommen werden oder ist es gar einer relativ freien Abwägbarkeit zugänglich?

In der gegenwärtigen tierethischen Diskussion lassen sich drei Grundansätze voneinander unterscheiden: der *biozentrische*, der *pathozentrische* und der *anthropozentrische* Ansatz. Für den biozentrischen Ansatz gilt das sogenannte »Bio-Prinzip«. Danach hat jedwedes Lebewesen ungeachtet seiner Komplexität ein und denselben moralischen Status. Das heißt: Mensch wie Wurm, streng genommen auch der Einzeller besitzen den gleichen moralischen Status und müssen daher nach Maßgabe des Gleichheitsgrundsatzes auch moralisch gleich behandelt werden.

Für den pathozentrischen Ansatz hingegen besitzt nicht jedes Lebewesen den gleichen moralischen Status; ein solcher kommt nur denjenigen

Lebewesen zu, die, wie der Mensch, *schmerzempfindlich* sind. Fehlende Schmerzempfindung, etwa infolge des Mangels der dazu notwendigen neuronalen Anlagen, führt zu einem verminderten, wenn nicht zum gänzlichen Fortfall des moralischen Status. Dagegen gilt für alle schmerzempfindlichen Lebewesen, ob Tier oder Mensch, der gleiche moralische Status. Und da Menschen Schmerzen vermeiden wollen, geht man davon aus, daß dies bei Tieren nicht grundsätzlich anders ist. Da man jedoch im Unterschied zu den Menschen die Tiere nicht fragen kann, ob sie um des Menschen willen Schmerzen zu akzeptieren bereit sind, sind dem Menschen im Falle des schmerzzufügenden Zugriffs auf das Tier enge Grenzen gesetzt bzw. existiert grundsätzlich keine Abwägungsmöglichkeit.

Hauptschwierigkeit des Bio- wie des Pathozentrismus ist die Annahme, Tiere besäßen wie der Mensch »Interessen« im Sinne bewußter und intentionaler Einstellungen. Dies ist aber nur unter anthropomorphen Annahmen plausibel. Fragwürdig ist darüber hinaus die Annahme, nur wer Interessen (wie Lebenserhalt und Schmerzvermeidung) auch tatsächlich artikulieren könne, besitze einen eigenen moralischen Status; dies würde z. B. dem Komatösen für die Zeit seiner Bewußtlosigkeit seines moralischen Status berauben.

Aus dem Skizzierten folgt nicht, daß der Umgang des Menschen mit dem Tier nicht enge Grenzen hätte, wohl jedoch, daß die Grenzziehung nicht gleichsam kontraktualistisch zwischen beiden »vereinbart« werden kann, sondern einseitig vom Menschen, der verantwortlich für das Tier handelt, vorgenommen werden muß. Statt der kaum beweisbaren Annahme, das Tier besäße ein »Interesse« an Schmerzvermeidung, genügt es zu unterstellen, daß eine schmerzvolle Tiernutzung »nicht im Interesse des Tieres« liegen kann. Ob Tiere Schmerzen vermeiden *wollen*, wissen wir nicht mit Bestimmtheit; daß der Mensch ihnen keine unnötigen und unerträglichen Scherzen zufügen *darf*, wissen wir hingegen mit Bestimmtheit. Dies bedeutet keine Rück-

kehr zum *anthropozentrischen* Ansatz, demzufolge nur der Mensch einen moralischen Status besitzt und alle nichtmenschlichen Lebewesen dem Bereich nicht-personaler Lebewesen angehören, die der Mensch zwar nach moralischen Prinzipien behandeln muß, dies aber nicht deswegen, weil die betreffenden nicht-personalen Lebewesen einen eigenen moralischen Status besäßen, sondern weil der Mensch auf sich selbst als moralisches Wesen Rücksicht nehmen muß. Ein die Tiere quälender Umgang wäre demnach moralisch in erster Linie deswegen defizitär, weil er den Menschen verrohen würde. Anthropozentrisch ist z. B. das heute gängige Argument, man müsse gentechnische Eingriffe beim Tier *deswegen* unterlassen oder zumindest eng begrenzen, weil die dabei verwandten genetischen Methoden auch auf den Menschen übertragen werden könnten: Hier wird das Tier insoweit nicht um seiner selbst willen, sondern um des Menschen willen geschützt. Solches sucht der *anthropo-relationale*, d. h. nicht auf den Menschen zentrierte, wohl aber aus Gründen der Konstitution auf ihn bezogene Ansatz einer Tierethik zu vermeiden.

4. Der anthropo-relationale Ansatz in der Tierethik

Der *anthropo-relationale* Ansatz in der Ethik unterscheidet sich einerseits vom anthropozentrischen im wesentlichen dadurch, daß er dem Tier einen eigenen, d. h. nicht ausschließlich vom Menschen und seinen Zwecksetzungen abhängigen moralischen Status zuerkennt, und er unterscheidet sich andererseits vom bio- wie vom pathozentrischen Ansatz darin, daß er auf empirisch nicht nachweisbare Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Tier verzichtet. Das Tier ist wie der Mensch *Objekt* von Moral, im Unterschied zum Menschen jedoch nicht zugleich auch *Subjekt* von Moral. Folge: Tiere sind etwa hinsichtlich des Gebotes der Schmerzvermeidung *gleich*, aber nicht *als* (dem Menschen) *Gleiche* zu behandeln. Jede Inanspruchnahme der Tiere zu vom Menschen gesetzten Zwecken ist grundsätzlich nicht nur aus der Sicht des Menschen, sondern auch

aus der Perspektive der Tiere zu überprüfen und zu rechtfertigen. Hierzu bedarf es nicht der schwer beweisbaren Annahme, daß Tiere »Interessen« im Sinne bewußter intentionaler Akte besitzen; es genügt der Nachweis, daß bestimmte Weisen des Umgangs mit dem Tier als objektiv nicht in seinem Interesse liegend erkennbar sind. Dies ist vor allem in Bezug auf diejenigen Weisen der Inanspruchnahme von Tieren anzunehmen, die für sie mit Angst und Schmerz verbunden sind.

5. Einsatz der Gentechnik

Die Herstellung erbgleicher Tiere durch Klonierung, d. h. durch Zellkernübertragung in entkernte Eizellen mit anschließendem Transfer auf ein Empfängertier, scheint vor allem durch die Möglichkeit der Kombination mit dem Verfahren des Gentransfers in einer wichtigen Entwicklung. Im Unterschied zum menschlichen hat der tierische Embryo bisher keinen eigenen moralischen Status. Gleichwohl gilt auch hier die Pflicht zu einem verantwortlichen Vorgehen einschließlich des kritischen Blicks auf die Folgen, etwa das »large offspring syndrome« u. ä. Was genetische Veränderungen an Tieren angeht, so spielt die Eingriffstiefe – somatisch wie keimbahnbetreffend – eine wichtige Rolle. Hier gilt es, als erstes die mit gentechnischen Veränderungen an Tieren verfolgten Ziele einer kritischen Prüfung zu unterziehen; im Falle der Rechtfertigungsfähigkeit der Ziele ist sodann die Vertretbarkeit und Alternativlosigkeit der Mittel sicherzustellen und wenn beides gegeben ist, die Hinnehmbarkeit der Folgen auf ihre Rechtfertigungsfähigkeit hin zu überprüfen. Dabei tritt neben die Schmerzvermeidungspflicht die Pflicht zur Erhaltung von Tierarten sowie darüber hinaus der Erhaltung der Biodiversität und des ökologischen Gleichgewichts. Hinzukommt die Prüfung, ob die angestrebten Ziele nicht schon mit einem Gentransfer auf *somatische* Zellen erreicht werden können, was Eingriffe in die tierische *Keimbahn* u. U. fragwürdig erscheinen lassen würde.

Unstrittig rechtfertigungsfähig ist das Ziel, mit Verfahren des »Genetic Engineering« via Mutagenese und Gentransfer die Krankheitsresistenz von Tieren zu erhöhen und so die Tiergesundheit zu verbessern, sofern dies mit den herkömmlichen züchterischen Mitteln nicht oder nicht angemessen erreichbar ist und Biosicherheit und Erhaltung der Biodiversität gegeben sind. Auch wenn dabei das Interesse des Menschen im Spiel ist, kann doch die Anwendung gentechnischer Verfahren auf das Tier zugleich im Interesse des Tieres liegen.

Was die Legimität der Interessen des Menschen angeht, so gilt generell – und damit auch für die Anwendung der Gentechnik auf das Tier –, daß die vom Menschen vorgenommene Zwecksetzung objektiv *bedeutend*, zeitlich *dringlich*, in ihren Folgen *kontrollierbar* und hinsichtlich der Nutzen-Risiko-Abwägung *vertretbar* ist. Schwieriger wird es hinsichtlich der Frage der Legitimität von Zielen wie desjenigen der Steigerung tierischer Leistungsfähigkeit. Hilft dieselbe den Tieren, sich an schwankende Umweltbedingungen besser anzupassen, einer geringeren Streßempfindlichkeit ausgesetzt zu sein, etc., so enthält die stets erforderliche Risiko-Nutzen-Abwägung vorrangig eine *tierbezogene* Zielsetzung. Viele der Zielsetzungen der Applikation gentechnischer Verfahren auf das Tier sind jedoch vorrangig, wenn nicht ausschließlich auf den Menschen bezogen, wie die Erzielung bestimmter Merkmalsausprägungen zum Zwecke der Verbesserung des Wachstums, der Fleischqualität, der Milchproduktion o. ä. Manche dieser Zielsetzungen erscheinen unter den Kriterien ihrer *Bedeutung*, *Dringlichkeit* und/oder *Alternativlosigkeit* von problematischem moralischen Status. Auch ist das Erfülltsein der genannten Kriterien nicht ein für alle mal konstantierbar, sondern muß einer ständigen Überprüfung unterzogen werden. Daß es andererseits Zielsetzungen von unbestreitbarer moralischer Qualität gibt, zeigt das Beispiel der Bemühung um Lebensrettung und Leidverminderung von Patienten mit Hilfe des Verfahrens der *Xenotransplantation*, der Übertragung von Zellen, Geweben und Organen vom Tier

auf den Menschen. Hier verursacht freilich die noch ungeklärte Frage der möglichen Übertragung von Krankheitserregern (viraler wie retroviraler Natur) hinsichtlich der Hinnehmbarkeit der Folgen (Gefährdung Dritter mit epidemischen oder gar pandemischen Ausmaßen) z. Z. noch große Schwierigkeiten.

Schlußüberlegung

Die in einer schnellen Entwicklung begriffenen Verfahren der Reproduktions- und der Molekularbiologie und ihrer Anwendung auf das Nutztier führen unvermeidlich zur Doppelfrage, ob der Mensch hier einen tiefen Zwiespalt zwischen Kultur und Natur aufreißt und ob angesichts der vielfach gleichen reproduktions- und gentechnischen Anwendbarkeit dieser Verfahren auf den Menschen ethische Dammbürche vorprogrammiert sind. Was die erste Frage angeht, so ist die den Menschen umgebende Natur immer schon *kulturalisierte*, d. h. vom Menschen nach Maßgabe seiner Bedürfnisse und Zwecksetzungen gestaltete Natur. Nicht *daß*, sondern *wie* der Mensch diesen Prozeß gestaltet, ist Gegenstand ethischer Analyse und Reflexion. Konsequenz daraus ist die Erarbeitung von Begründungen für *Grenzziehungen*. Grenzen sind dort überschritten, wo die Natur – und das gilt auch hinsichtlich des Umgangs mit dem Nutztier – zum reinen *Konstrukt* gemacht würde. Hinsichtlich des Dammbürcharguments ist zu sagen, daß sich hier die alte Frage wiederholt: Soll der Mensch das Tier deswegen respektieren, weil er sonst »verroht«, oder muß er den moralischen Status der Tiere bereits um der Tiere willen respektieren?

Literatur

- Wolf, J.-C. (1992) Tierethik. Neue Perspektiven für Menschen und Tiere. Freiburg (Schweiz).
Wolf, U. (1990) Das Tier in der Moral, Frankfurt am Main.
Wolf, U. (1997) Haben wir moralische Verpflichtungen gegen Tiere? In: Angelika Krebs (Hrsg.) Naturethik. Grundtexte der gegenwärtigen tier- und ökoethischen Diskussion. Frankfurt/Main, 47–75.

Teutsch, G. M. (1979) Die Intensivhaltung von Nutztieren in ethischer Sicht.
- Als Ms. gedr. Ebenhausen (Isartal).

Teutsch, G. M. (1995) Die Würde der Kreatur, Erläuterungen zu einem
neuen Verfassungsbegriff am Beispiel des Tieres, Verlag Paul Haupt.

Teutsch, G. M. (1995) Das Tier als Objekt: Streitfragen zur Ethik des Tier-
schutzes. 2., überarb. Aufl. VAS, Frankfurt/Main.

Cohen, C. (1997) Do animals have rights? In: Ethics and Behavior, 7 (2).

Regan (1988) The case for animal rights. Routledge, London.

Regan, T. (1995) Animal Welfare & Rights. In: Reich, W. (Hrsg.) Encyclo-
pedia of Bioethics, Bd I, 158-171.

Regan, T./Singer, P. (2nd ed.) (1989) Animal Rights and Human Obligations,
Englewood Cliffs/N. J. [u. a.]: Prentice Hall.

Rechtliche Fragen zur Biotechnologie bei Tieren



I.

Gentechnologische Verfahren und Klonierung stehen auch soweit es um die Anwendung bei Tieren geht, im Streit, es gibt bisher in Deutschland nur bruchstückhaft rechtliche Regeln.

Im Jahr 1979 haben die Grünen im Deutschen Bundestag den Antrag gestellt, in das Tierschutzgesetz bei der anstehenden Novellierung folgendes aufzunehmen (BT-Drucksache 13/7160):

- den Schutz der geschöpflichen Würde des Tieres
- den Schutz der natürlichen Identität von Tieren
- und das Verbot der Klonierung von Tieren.

Begründet wird das damit, Klonierung und DNA-Techniken stünden den Grundsätzen des Tierschutzes entgegen, da sie die geschöpfliche Würde des Tieres mißachteten und seine natürliche Identität verletzen.

Die Techniken zur identischen Vervielfältigung und Genmanipulation von Tieren seien die letzten Schritte zu deren vollständiger Verdinglichung unter rein zweckrationalen Verwertungsinteressen des Menschen. Tiere würden zu Bioreaktoren oder bloßen Ersatzteillagern, zu bloßen Dingen, die beliebig verfügbar sind, degradiert.

In gleiche Richtung zielt teilweise der Versuch, den Tierschutz in das Grundgesetz aufzunehmen, ihm Verfassungsrang zu geben und damit den Regelungen über die Genmedizin beim Menschen nahezurücken.

Bisher haben wir für den Menschen im Embryoschutzgesetz weitreichende Verbote von Eingriffen. Verboten sind das Klonen von Menschen sowie alle Eingriffe in die Keimbahn. Die Europäische Menschenrechtskonvention zur Bioethik hat für den Menschen Festlegungen in gleicher Richtung getroffen: Verbot des Klonens in beiden Formen, kein erlaubter Eingriff in die Keimbahn, auch wenn es um die Bekämpfung schwerer Erkrankungen geht. Das Genom wird für geschützt erklärt. Ob sich diese Position so weiter wird halten lassen, wenn nach der Kartierung des Genoms gezielte Eingriffe in das Genom zur Bekämpfung schwerster Krankheiten möglich werden, bleibt abzuwarten.

Auf die Zulässigkeit gentechnologischer Eingriffe bei Tieren wird mit besonderer Aufmerksamkeit geachtet, einmal weil diese Erprobung von Eingriffen beim Tier exemplarisch für die spätere Anwendung beim Menschen werden könnte, zum anderen weil Parallelen bei Mensch und Tier offenbar nicht zu vermeiden sein werden.

Andererseits hat der Mensch seit er seßhaft wurde durch Auswahl und Züchtung Einfluß auf die Entwicklung von Pflanzen und Tieren genommen. Die von Sloterdijk apostrophierte »optionale Geburt« ist dort schon länger eingeführt. Mit der Kartierung des tierischen Genoms wächst nun die Möglichkeit, direkt über die Gene die Entwicklung zu beeinflussen. Man wird genauer als durch bisherige Züchtungsmethoden über die Genstruktur die Entwicklung beeinflussen können. Die absehbaren Ver-

fahren gehen schnell, der Zugriff ist genau, es wird ein über die bisherigen Erbgrenzen hinausgehender Gentransfer möglich. Krankheiten und Belastungen können korrigiert, der Nutzen der Tierzucht wesentlich erhöht werden.

Es gibt meines Erachtens keine prinzipiellen Argumente, die ein grundsätzliches Verbot solcher Eingriffe rechtfertigen könnten. Transgene Tiere sind nicht von vorn herein Schlechtes oder Gefährliches. Freilich ist die Entwicklung von Gefahren ernstzunehmen, die drohen könnten. Die Vielfalt der Arten könnte drastisch reduziert werden, tierisches Leben somit zum bloßen Material und zur Verfügungsmasse für die Hand des Menschen werden. Es sei – so heißt es – nicht abzusehen, wie sich gentechnologische Veränderungen mittel- und langfristig auswirken würden. Lebensweise und Gesundheit der betroffenen Tiere könnten gravierend beeinflusst werden. Die Herstellung gentechnologisch veränderter Tiere sei ein letztlich unkontrollierbarer Eingriff. Es müsse die »natürliche Integrität« der Tiere gewahrt werden, so dass das Tier trotz seiner Haltung durch den Menschen und trotz der züchterischen Eingriffe seine selbständige Lebensfähigkeit in natürlicher Umgebung behalten und ohne dauernden Schmerz und dauernde Belastungen durch mit gentechnologischen Eingriffen entstehende Verhaltensstörungen leben könne.

Die Enquete-Kommission des Deutschen Bundestages über Chancen und Risiken der Gentechnologie (BT-Drucksache 10/6775) hat sich kritisch zu den möglichen Auswirkungen der Gentechnologie auf die Tiergesundheit geäußert. Der Mensch habe seit Jahrtausenden seine Umwelt gezielt beeinflusst und verändert. Dabei habe er natürliche Gleichgewichte nachhaltig unwiderruflich und global verändert. Durch Veränderungen der Umweltbedingungen habe er in den natürlichen Evolutionsprozess, der durch Mutation und Selektion erfolge, eingegriffen. Mit der Gentechnologie verfüge der Mensch über neue Möglichkeiten, durch gezielten

Genaustausch über alle Arten hinweg die natürliche Evolution mit neuen Stufen der Geschwindigkeit und Direktheit zu beeinflussen. Damit trage die Menschheit eine besondere Verantwortung dafür, rechtzeitig die ökologische Verträglichkeit und die toxikologischen Auswirkungen der gezielten Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt abzuschätzen und zu prüfen, ob eine solche Freisetzung verantwortbar sei. Die letzten zwanzig Jahre der Produktion landwirtschaftlicher Nutztiere mit Hilfe arbeits- und ressourcensparender Technologien zum Zwecke der Steigerung der Erträge hätten durchaus auch negative Auswirkungen auf die Tiergesundheit gehabt und deren Lebensleistung verringert. Es habe gegeben und es drohe weiter zu geben Stoffwechsel- und Fruchtbarkeitsstörungen, Schwächungen der Immunsysteme sowie zahlreiche Verhaltensstörungen. Die Gefahr bestehe, dass die Schmerzbelastung wachsen und der Eigenwert, die Eigenidentität des Tieres sinken werde.

II.

Nähere gesetzliche Regelungen fehlen bisher. Tierschutzgesetz, Gentechnikgesetz und Gentechnikverordnungen enthalten aber einige Regeln. Sehen wir uns sie näher an.

Gentechnische Eingriffe sind zu den Tierversuchen im Sinne von § 7 Tierschutzgesetz zu rechnen, da sie noch nicht voll erprobte tiermedizinische Eingriffe darstellen, für Tiere mit Schmerzen, Leiden oder Schäden verbunden sein können, sowie als Eingriffe in das Erbgut von Tieren mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägartiere verbunden sein könnten (§ 7 Abs. 1 Nr. 1 und Nr. 2 Tierschutzgesetz).

Solche Versuche dürfen nur durchgeführt werden, soweit sie zu einem der in § 7 Abs. 2 Tierschutzgesetz genannten Zwecke unerlässlich sind. Insbesondere, wenn sie dem Vorbeugen, Erkennen

oder Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperliche Beschwerden oder Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch oder Tier oder z. B. weiter der Grundlagenforschung unerlässlich sind.

Bei der Prüfung, ob das der Fall ist, ist insbesondere der jeweilige Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde zu legen und zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere weniger eingreifende Methoden oder Verfahren erreicht werden kann. Die Versuche bedürfen der Genehmigung. Tierversuche müssen unter bestimmten Bedingungen (§§ 8, 9 Tierschutzgesetz) durchgeführt werden, sie sind auf das unerlässliche Maß zu beschränken.

Eine weitere Grenze stellt das Verbot sogenannter »Qualzüchtungen« dar. Nach § 11 b Tierschutzgesetz ist es verboten, Wirbeltiere zu züchten oder durch bio- oder gentechnische Maßnahmen zu verändern, wenn damit gerechnet werden muss, dass bei der Nachzucht den bio- oder gentechnisch veränderten Tieren selbst oder deren Nachkommen erblich bedingt Körperteile oder Organe für den artgemäßen Gebrauch fehlen oder untauglich oder umgestaltet sind und hierdurch Schmerzen, Leiden oder Schäden entstehen. Dabei muss es sich um nicht fernliegende, sondern realistische Möglichkeiten handeln.

Bemerkenswert ist, dass § 11, Abs. 4 vom Verbot insofern eine Ausnahme macht, als es sich um durch Züchtung oder bio- oder gentechnische Maßnahmen veränderte Wirbeltiere handelt, die für wissenschaftliche Zwecke notwendig sind. Das ist meines Erachtens eine sehr weitgehende und recht allgemeine Ausnahme.

Das Gentechnikgesetz beschreibt für die verschiedenen Sicherheitsstufen bestimmte Bedingungen der Haltung.

Nach § 14 Gentechnikgesetz gelten für die sogenannte »Freisetzung« und das »Inverkehrbringen« gentechnisch veränderter Organismen besondere

Bedingungen. Eine Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (früher Bundesgesundheitsamt) ist erforderlich. Dadurch soll eine unkontrollierte Ausbreitung der veränderten Organismen verhindert und die Auswirkungen der Veränderung unter Kontrolle gehalten werden. Es kommt dabei auch auf die Art der Tiere an. Die Möglichkeit der Rückholung und der gezielten Inaktivierung spielen dabei eine Rolle. So hat man gesagt, dass ein Weidezaun die Ausbreitungsbegrenzung und Rückholbarkeit der auf die Weide und damit in die spezifischen ökologischen Wirkungsgefüge entlassenen transgenen Tiere begrenze, so dass dabei von einer Freisetzung und nicht mehr von Arbeiten im geschlossenen System auszugehen sei. Für die Genehmigungsfähigkeit kommt es auf solche Kriterien wie Vertretbarkeit und Rückholbarkeit an.

Berichtet wird, dass bei Tieren bisher die Freisetzung vor allem durch die Aussetzung transgener Fische erfolge, weil Fische einmal in fremden Gewässern kaum noch rückholbar seien. Die Genehmigung kann auch mit Verwendungsbeschränkungen verbunden sein.

Prinzip ist also wie überhaupt im Gentechnikrecht eine begrenzte, unter Bedingungen zulässige Anwendung gentechnologischer Verfahren unter Kontrollen nach Genehmigung. Darin liegt eine weitgehende Prozeduralisierung der Zulassung unter Verwendung weniger Sachkriterien. Man stellt ein Verfahren auf, in dem über die Zulässigkeit nach Anhörung der Beteiligten entschieden werden kann.

III.

Auf europäischer Ebene gibt es eine Richtlinie des Rates vom 23. April 1990 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (RL 90/220 EWG). Ihr Ziel ist die Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften zur absichtlichen Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt. Vor einer solchen absichtlichen Freisetzung muss eine Anmel-

dung erfolgen, die unter anderem Informationen über eine Überwachung, Kontrollmaßnahmen, Abfallbehandlung und Noteinsatzpläne enthalten muss. Die zuständige Behörde hat dem Anmelder binnen 90 Tagen zu antworten.

Inzwischen liegen Neuformulierungsvorschläge für die Richtlinie vor. Die Umweltverträglichkeitsprüfung, das heißt die Abschätzung der direkten und indirekten Risiken für menschliche Gesundheit, muss eine Risikobewertung nach bestimmten Grundsätzen durchführen. Ich habe den Eindruck, dass die Richtlinie durchaus strenger werden soll. So solle (vgl. Anlage II) die Begründung für jede Risikobewertung in einem vorbeugenden Ansatz bestehen. Falls über den Umfang der Risiken oder eine Wahrscheinlichkeit unerwünschter Auswirkungen in der Wissenschaft nicht vollständige Gewißheit oder vollständiger Konsens bestehe, sollte dies nicht als Anlass dazu benutzt werden, Maßnahmen zur Unterbindung der Risiken aufzuheben.

Die potentiell schädlichen Folgen werden näher als bisher beschrieben. Soweit ich unterrichtet bin, ist die Änderung der Richtlinie bisher noch nicht erfolgt.

IV.

Was das Klonen von Tieren angeht, so ist es anders als beim Menschen durch das Embryonenschutzgesetz nicht prinzipiell verboten. Der Antrag der Grünen hat bisher keinen Erfolg gehabt, es gibt in Deutschland keine spezielle Regelung. Die Technologiekommission des Deutschen Bundestages arbeitet an einem Bericht über das Klonen bei Tieren.

Fraglich ist, ob Klonierungsverfahren unter § 7 Abs. 1 Tierschutzgesetz fallen und damit den Regeln über Tierversuche, ihre Grenzen und ihre Genehmigungspflicht nach § 8 Tierschutzgesetz unterliegen. Nach meines Erachtens richtiger Ansicht ist das im Ergebnis nicht der Fall. § 7 Abs. 1 Tierschutzgesetz bezeichnet als Tierversuche Eingriffe oder

Behandlungen zu Versuchszwecken, die an Tieren (Abs. 1 Nr. 1) oder am Erbgut von Tieren (Abs. 1 Nr. 2) vorgenommen werden. Dann, wenn solche Eingriffe mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die betroffenen Tiere selbst (Nr. 1) oder für die ergutveränderten Tiere oder ihre Trägartiere verbunden sein können, greifen die Vorschriften über Tierversuche ein.

Eingriffe oder Behandlungen an Tieren werden in § 7 Abs. 1 Nr. 1 als Tierversuche bezeichnet. Aus der eingefügten Nr. 2, die neu geschaffen worden ist, um auch Versuche an Tierembryonen und Eizellen als Tierversuche zu erfassen, ergibt sich im Umkehrschluss, dass als »Tiere« im Sinne von Nr. 1 nur bereits geborene Tiere gelten können.

Da sich das Klonen als Verfahren aber nicht auf lebende Tiere bezieht, kann § 7 Abs. 1 Nr. 1 Klonverfahren nur insoweit erfassen, als möglicherweise das Implantieren des Klons in das Mutter- bzw. Trägartier als Versuch an diesem Tier ein Eingriff i. S. von Nr. 1 sein könnte. Trägartiere werden aber in § 7 Abs. 1 Nr. 2 ausdrücklich erfasst. Dessen hätte es nicht bedurft, wenn das Gesetz davon ausgegangen wäre, dass das Herbeiführen einer Trächtigkeit schon von Nr. 1 erfasst wäre. Daher soll weder der Austausch des Zellkerns oder die Embryonenteilung, noch das Implantieren des gewonnenen Klons von § 7 Abs. 1 Nr. 1 - Eingriff an Tieren - erfasst sein (vgl. zum Ganzen mit Literaturangaben Vesting/Simon: Die Zulässigkeit des Klonens von Tieren in Deutschland, Zeitschrift für Rechtspolitik 1998, S. 261 ff.). § 7 Nr. 2 Tierschutzgesetz erfasst die Veränderungen des Erbgutes von Zellen und Embryonen. Wenn die Teilung totipotenter Zellen als Klonierungsverfahren angewandt wird, so liegt kein Eingriff in das Erbgut vor, vielmehr wird vorhandenes Erbgut lediglich vervielfältigt. Das wird von § 7 Abs. 1 Nr. 2 nicht erfasst (vgl. Vesting/Simon a. a. O.). Das muss wohl auch für die Zellkerntransplantation gelten. Zweifelhaft ist hier zunächst schon, ob nichtbefruchtete Eizellen befruchteten Eizellen gleichstehen. Man wird das wohl annehmen können, da

Nr. 2 eine Beschränkung auf befruchtete Eizellen nicht enthält und der Schutzzweck auch den Schutz nichtbefruchteter Eizellen deckt. Wenn aber ein vollständiger Austausch des Zellkerns der Eizelle gegen den Zellkern einer Körperzelle erfolgt, dann kann das kaum als ein »Eingriff am Erbgut« von Tieren im Sinne von § 7 Abs. 1 Nr. 2 verstanden werden. Zu einem anderen Ergebnis kommt allerdings das Gutachten von Eser/Frühwald u. a. im Auftrag des BMWFG aus dem April 1997 hinsichtlich des Zellkernaustausches. Für die hier vertretene Meinung spricht, dass Veränderungen am Erbgut ein vorhandenes Erbgut voraussetzen, das als solches verändert wird.

Nach meiner Ansicht gilt freilich § 11 b Tierschutzgesetz – Verbot von Qualzuchtungen und ähnlicher Maßnahmen – auch für Klonierungsverfahren. Der Versuch von Vesting/Simon, unter Berufung auf § 11 b Abs. 3 Tierschutzgesetz diese ganze Vorschrift für unanwendbar zu erklären, weil das Tierschutzgesetz, wenn es von »Unfruchtbarmachung« spreche, nur die geschlechtliche Tiervermehrung meine, kann meines Erachtens nicht anerkannt werden.

Es erscheint auch richtig, dass für die biotechnologischen Züchtungsmaßnahmen eine Grenze insofern gilt, als bei den Tieren selbst oder ihren Nachkommen nicht erblich bedingt Körperteile oder Organe für den artgemässen Gebrauch fehlen oder untauglich oder umgestaltet sind und dadurch Schmerzen, Leiden oder Schäden auftreten.

Hinzuweisen ist in diesem Zusammenhang freilich wiederum auf § 11 b Abs. 4, wonach das Verbot der sogenannten Qualzuchtung nicht für durch Züchtung oder bio- oder gentechnische Maßnahmen veränderte Wirbeltiere gilt, die für wissenschaftliche Zwecke notwendig sind. Diese Generalklausel der »wissenschaftlichen Zwecke« reicht sehr weit. Die damit weitgehende Freistellung des Klonens vom Regelungsbereich der Tierversuche könnte freilich vom Gesetzgeber leicht verändert werden. Ich meine nicht, dass das – wie Vesting/Simon a. a. O. meinen – weitgehend außerhalb des

Bereiches der Nutztiere unter dem Gesichtspunkt der Wissenschaft und Berufsfreiheit verfassungswidrig wäre. Das scheint mir jedenfalls dann nicht der Fall zu sein, wenn die Regelung sich darauf beschränken würde, dieses Klonen den Regeln über Tierversuche zu unterstellen.

Danach scheinen mir die Anwendungen der Klonierung in der Tierzuchtforschung und der tierischen Produktion, wie sie Brem in seinem Vortrag beschreibt, jedenfalls weitgehend zulässig. Unzweifelhaft muss als Grenze die Erhaltung der Biodiversität gelten. Jedenfalls ist Klonierung zur Bekämpfung von Krankheiten von Tieren zur Erreichung besserer Nutzbarkeit ebenso wie durch andere züchterische Maßnahmen zulässig. Die Frage, auch bei grundsätzlicher Zulässigkeit ist, wieweit der Mensch mit Maßnahmen von seiner Hand auf die Natur einwirken darf. Enge Grenzen dürfen meines Erachtens hier nicht gesetzt werden. Der Mensch hat auch schon früher mit den ihm möglichen Eingriffen natürliche Vorgänge kultural beeinflusst. Das darf ihm auch angesichts der durch die Biotechnologie quantitativ und qualitativ erheblich gewachsenen Möglichkeiten nicht verboten werden. Freilich dürfen seine Eingriffsbefugnisse nicht unbegrenzt sein. Die gegenwärtig geltenden Bestimmungen scheinen grundsätzlich auszureichen.

Literatur

Altner, Günter u. a. (Hrsg.): Gentechnik und Landwirtschaft, 2. Aufl., Karlsruhe 1990.

Brem, Gottfried: Klonierung, in diesem Band, S. 86.

Brem, G./Brenig, B./Goddmann, H. M. u. a.: Production of transgenic mice rabbits and fogs by microinjection into pronuclei, *Reprod. Dem. Anim.* 1985 (20), S. 257 f.

Bundestagsdrucksache 10/6775 vom 6. 1. 87, Bericht der Enquete Kommission, Chancen und Risiken der Gentechnologie.

Bundestagsdrucksache 13/7160 vom 11. 3. 97, Antrag der Abgeordneten Marina Steindor u. a. und der Fraktion Bündnis 90/Die Grünen: Verbot des Klonens von Tieren.

Cesper-Koch (Hrsg.): Tierschutz für Versuchstiere – Ein Widerspruch in sich? 1998.

Eberbach, Wolfgang/Lange, Peter/Ronellenfitsch, Michael: Recht der Gentechnik und Biomedizin, Bd. 1, Stand: 28. Ergänzungslieferung, Heidelberg 2000.

Eser / Frühwald / Honnefelder / Markl / Reiter / Winnacker: Klonierung beim Menschen, Gutachten im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Manuskript, April 1997.

Evangelische Akademie Bad Goll: Gene und Klone – Möglichkeiten sowie ethische Grenzen der Bio- und Gentechnologie bei Tieren. Protokolldienst 20/98, Tagung vom 15./17. 5. 98.

Lorz, Albrecht / Metzger, Ernst: Tierschutzgesetz, 5. Auflage, München 1990.

Hegemann, Rudolf (Hrsg.): Ergebnisse und Trends der Gentechnologie, Berlin 1991.

Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaften vom 23. 4. 90 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt.

Verordnung Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten.

Vesting, Jan W. / Simon, Jürgen: Die Zulässigkeit des Klonens von Tieren in Deutschland, Zeitschrift für Rechtspolitik 1998, S. 261 ff.

Diskussion



Sehr geehrte Damen und Herren,

ich denke, wir haben einen sehr interessanten Ausklang der Hülsenberger Gespräche gehabt und es hat sich sicherlich in diesem vierten Block eine Menge von Fragen angesammelt. Ich darf daher um Ihre Wortmeldungen bitten.

SEELAND

Ich möchte gern eine Bemerkung zur sog. Dammbrechhypothese machen, die ja wohl beinhaltet, wenn irgend etwas beim Tier eingeführt wird, dass das dann zwangsläufig auch irgendwann beim Menschen gemacht wird. Ich möchte das Gegenteil behaupten, denn es ist hier bereits gesagt worden, dass seit mehr als 10.000 Jahren, seit Haustiere domestiziert werden, eine Auswahl, eine Züchtung stattfindet. Diese Züchtung hat aber nicht beim Menschen stattgefunden. - Ich möchte noch eins drauflegen - obwohl einzelne züchterische Elemente durchaus in menschlichen Kulturen sinnvoll angewendet worden sind, beispielsweise, dass Verwandtenpaarungen in vielen Gesellschaften ausgeschlossen waren und vermieden wurden. Nun wird als Argument immer angeführt, im dritten Reich, im Nationalsozialismus, sei so etwas passiert. Aber das hat sicherlich andere Gründe, das ist nicht deshalb passiert, weil das irgendwann bei Tieren gemacht wurde. Ganz abgesehen davon, dass es ein ganz stümperhafter Versuch war, der jeder züchterischen Qualität entbehrt.

SCHREIBER

Darin glaube ich, haben Sie sicher recht, dass das Dammbrechargument eigentlich nicht viel Gewicht hat, nur wenn sie etwa die Diskussion über die Gentechnologie am Menschen sehen, so blickt man dort mit großem Interesse auf das, was an Tieren möglich ist und was an Tieren gemacht wird. Wenn es denn geht, genau bestimmte Genabschnitte zu treffen und bestimmte Krankheiten und sonstige Folgen auszumerzen, dann mag es einen Anreiz für die Human-Gentechnologie sein, diese Wege auch eher zu versuchen. Also ich würde das Dammbrechargument, wie Sie glaube ich auch, Herr Beckmann, nicht für richtig halten, aber gewisse Beispielfunktionen oder gewisse Vorreiterfunktionen könnten hier die Maßnahmen am Tier schon haben.

SEEMANN

Nur ein Satz. Ich hatte ja vorgeschlagen, dass angesichts der Ambivalenz aller Handlungsmöglichkeiten des Menschen Dammbrechargumente immer wohlfeil sind, und ich hatte zu bedenken gegeben, ob man nicht einfach sagt, Prinzip ist: wenn wir den Menschen behandeln, dann um des Menschen willen, d. h. in Respektierung seiner Würde, seiner Autonomie, seiner Identität, und diese Gegebenheiten sind beim Tier anders; also mein Vorschlag: das Tier um des Tieres willen. Da gibt es andere Gesichtspunkte. Dann sinkt das Dammbrechargument herunter auf das Küchenmesser, verzeihen Sie, mit dem ich das Brot schneide, was

notwendig ist, aber eben auch einen furchtbaren Mord begehen kann.

HOFFMANN

Herr Beckmann, sie haben im Zusammenhang mit der Xenotransplantation besonders die Lebenserhaltung des Menschen als Gebot dargestellt. Bei der Frage der Leistungssteigerung bei Tieren durch irgendwelche Massnahmen waren Sie dagegen sehr viel kritischer. Und wenn wir dagegen das Referat von Herrn Jutzi vorher gehört haben, sehen wir, dass gerade auch die tierische Leistung im Sinne einer Mehrproduktion lebenserhaltend für den Menschen ist. Wie stellen Sie sich dazu? Eine Frage an Herrn Jutzi: Sie haben gezeigt, dass nun auch gerade in den Entwicklungsländern viel mehr Getreide in die tierische Produktion geht, dass dieser Trend steigend ist. Gerade bei uns in Europa und in Deutschland wird das sehr kritisch diskutiert mit dem Argument, lasst doch das Getreide für die menschliche Ernährung sein und verschwendet es nicht beim Tier. Wie stehen Sie dazu?

BECKMANN

Also das Prinzip der Erhaltung menschlichen Lebens ist ein Höchstprinzip. Mit der Transplantationsmedizin haben wir ein bewährtes Verfahren bei drohendem Organversagen den Tod abzuwenden. Es fehlen uns die Organe, wie Sie alle wissen. Gelingt dies durch tierischen Organersatz, dann ist es zwingend in meinen Augen, das Prinzip Leben zu erhalten, sofern das betroffene Individuum dem nach Aufklärung zustimmt (das immer mitgesagt), während es nach dem, was man hört, nicht zwingend ist, dass man tierisches Fleisch zur Lebenserhaltung braucht. Hier würde ich wieder differenzieren, wenn Sie (wie der Kollege ja gesagt zu haben scheint) – dieses brauchen, um Menschen zu erhalten, dann gilt natürlich dasselbe wie im Falle der Xenotransplantation, aber es bleibt immerhin doch die Prüfung, ob in unserer Gesellschaft der extensive Fleischgenuss wirklich zwingend lebenserhaltend ist. Diesen Zwang sehe ich im Falle der Xenotrans-

plantation, solange wir nicht genug menschliche Organe haben, in der Tat höher.

JUTZI

Ihre Frage zur Getreideverfütterung: Der Prozentsatz des Getreides, das in der OECD verfüttert wird, ist ja bekanntlich 60%. In Entwicklungsländern ist das ein einstelliger Prozentsatz. Was in den Entwicklungsländern geschieht, ist nichts anderes als eine marktgetriebene Aufholentwicklung zu dem, was auch in den OECD-Ländern geschieht. In unserem Modell zur Projektion auf 2020 hin, haben wir auch nachweisen können, dass die Zusatznachfrage nach Futtergetreide, die ja enorm massiv ist, 300 Millionen Jahrestonnen, keinen negativen Einfluss auf den Getreidepreis haben wird und damit wirtschaftlich machbar und gangbar sein wird – und auch gedanklich. Es ist der Markt, der diese Entwicklung leitet, auch wenn Sie möglicherweise sagen, dass diese Getreideverfütterung moralisch verwerflich ist – man würde höchstens vielleicht im Bereich der ökologischen Wirkungen nachfragen, was denn die Wirkungen sein könnten bei der Verschiffung von Getreiden vom Norden in den Süden für die Verfütterung im Süden. Das hat dann schon erhebliche ökologische Implikationen.

SIMON

Meine Frage schliesst sich gleich an Herrn Jutzi an. Auch mich hat die Prognose der erhöhten Verfütterung von Getreide in den Entwicklungsländern etwas erschreckt, aber Sie sagten ja, das sei im Moment nur ein Prozent. Aber meine Frage geht dahin: wenn das jetzt ein marktgesteuerter Prozess ist, den man einfach so beobachten kann, dass die Tierzahlen ansteigen, sieht die FAO eine Möglichkeit, das zu steuern oder Strategien zu entwickeln, dass die Menschen, die ja ernährt werden müssen, sich vorwiegend aus pflanzlichem Material ernähren können, mit natürlich einem gewissen Anteil an tierischen Proteinen, oder muss man da einfach zusehen, dass sich also diese marktwirtschaftlichen Kräfte durchsetzen?

JUTZI

Vermutlich bleibt nicht viel anderes übrig als zuzusehen oder als eine Organisation wie die FAO aufmerksam zu machen, wie ich schon sagte, auf die ökologischen Implikationen einer solchen Entwicklung, wenn diese Entwicklung eben – und das wissen wir – rein nachfragegetrieben ist und so verläuft und diese Konsumenten es eben so wollen, was machen sie als internationale Organisation? Sie geben Information, Sie machen aufmerksam auf negative Implikationen solcher Entwicklungen, versuchen vielleicht auch gewisse Regeln zu entwickeln, mehr können Sie ja wohl nicht tun.

KLOSTERMEYER

Frage an Herrn Schreiber: Chimärenbildung ist ein alter Traum der Menschheit, von der Sphinx angefangen, über den fuchsköpfigen Gott, es geht durch alle Kulturen, Centaurus usw., genau so auch bei uns, wie manche unserer Vorfahren für die schöne Frau geschwärmt haben, die leider einen Fischunterleib hat. Solche Chimären sind ja eigentlich auch Xenotransplantationen. Wie ist die Regelungsdichte jetzt dort? Ich würde könnte mir vorstellen, dass es einfach experimentell viel sinnvoller wäre aus der Sicht der Molekularbiologie, nicht Organe zu übertragen, sondern einfach erst einmal anzufangen, Embryonalzellen unterschiedlicher Spezies zusammenwachsen zu lassen und zu sehen was passiert. Es ist einfach arbeitstechnisch besser, so kommen die molekularen Grundlagen besser herein. Ist da die Regelungsdichte genauso hoch wie bei gentechnologischen Massnahmen?

SCHREIBER

Wir haben in dem auch von mir erwähnten Embryonenschutzgesetz ein ausdrückliches Verbot der Chimären- und Hybridbildung. Wir haben es diskutiert – Herr Beckmann, auch in unserer Kommission, ob die vorherige Einschleusung etwa von menschlichen Genbestandteilen in das Schweinegenom eine verbotene Chimärenbildung ist. Wir haben gesagt, das mag sein, aber dieses Verbot gilt

im strengen Sinne nur bei lebenden Tieren und nicht bei Zellkombinationen. Man versucht dort auf diesem Wege, wie man ja auch beim Menschen durch das Klonen von Geweben versucht, neue Organe zu gewinnen und damit das Verbot des Klonens ganzer Menschen zu umgehen, hier möglicherweise Wege zu finden, artübergreifende Kombinationen zu machen. Ich glaube nicht, dass es gegen die Menschenwürde, die als das Prinzip des Verbots gilt, verstösst, wenn ein Stück des Schweinegenoms in das menschliche Genom implantiert wird, um das Schweinegenom bei einer Transplantation sozusagen anpassungsfähiger zu machen. Das verstösst weder gegen die Menschenwürde noch gegen die Schweinewürde, wenn man das so formulieren sollte. Ich glaube, das wird man zulassen können, das ist noch etwas anderes als die Chimärenbildung.

BECKMANN

Wir haben hier ganz zentral die Frage: Wird das Individuum, das xenotransplantiert wird, vorher voll aufgeklärt und um seine vollinformierte Zustimmung gebeten. Wenn das nicht konsequent gemacht würde, dann würden sich in der Tat Fragen stellen. Das Individuum kann jedoch frei und selbstbestimmt über die Annahme eines Tierorgans entscheiden. Das Zweite, das man sicher sehen muss: bei der Xenotransplantation besteht ja kein Kontakt mit der Keimbahn, d. h. hier wird nicht die Nachfolgegeneration beeinflusst. In der Tat wären, wenn man das nur via Keimbahn machen könnte, dann Autonomiefragen der künftigen Generationen im Spiel, und da wissen wir alle, dass die Autonomie eine rationale Norm ist, d. h. die eigene Autonomie hat ihre Grenzen an der Autonomie der anderen. Dann würden sich in der Tat höchst kritische, ich würde sagen, wahrscheinlich negativ zu beurteilende Konsequenzen einstellen.

VON LUKOWICZ

Es ist ja nicht über Fische gesprochen worden auf dieser Tagung, obwohl das ja auch Nutztiere sind, an denen sehr emsig gentechnologisch herumgebastelt

wird. Gestern haben wir einen kurzen Hinweis bekommen bezüglich der Verbesserung der Wachstumsleistung, aber das ist eigentlich nicht mein Punkt. Prof. Schreiber erwähnte, dass es auch Freisetzen von Fischen gibt. Stellen sie sich folgendes Beispiel vor: man kann Lachsen das Anti-Freeze-Gen von Plattfischen einsetzen, was bedeutet, dass sie mehrere hundert Quadratkilometer arktischer Gebiete erobern könnten und dort durch ihr Verhalten als starke Raubfische das ganze Lebensgefüge total umdrehen würden. Das ist für mich als Biologe natürlich inakzeptabel, und ich denke, das hat auch eine gewisse ethische Dimension. Mich interessiert daher die ethische Einstellung von Professor Beckmann und die Meinung von Professor Schreiber, ob solche Dinge auch im internationalen Bereich durch irgendwelche rechtlichen Regelungen in den Griff zu bekommen sind, denn das EU-Recht wird da ja sicher nicht reichen, oder ob man auf Konventionen angewiesen ist, die ja bei weitem nicht so greifen.

BECKMANN

Ganz kurz, es ist natürlich ein Unterschied, ob ich sage, das ist kritikwürdig, weil es à la longue menschlichen Zwecksetzungen zuwider läuft, dann habe ich eine andere Norm als die entscheidende identifiziert, als wenn ich sagen würde, das ist eine Rücksichtslosigkeit gegenüber anderen biologischen Erscheinungen, das bringt die Biodiversität durcheinander, dann setze ich ein anderes Prinzip. Ich denke, was wir brauchen, ist ein gesellschaftlicher Diskurs über diese Fragen. A la longue wird man sagen können, dass beide Prinzipien nicht gegeneinander stehen, sondern miteinander aufs engste zu tun haben. Wir sind von der Biodiversität und ihrer Erhaltung mit Sicherheit abhängig. Es ist jenseits unserer Autonomie zu sagen, davon können wir uns aus kurzfristigen Überlegungen emanzipieren. Auf der anderen Seite ist es in der Tat eine Frage, wie diese Biodiversität erhalten oder wie sie gefährdet wird, und damit würde ich die Frage in der fachlichen Aussage wieder an Sie zurückgeben.

SCHREIBER

Die Frage ist in der Tat ausserordentlich schwierig. Unter § 11 b des Tierschutzgesetzes kann man es nicht subsumieren. Die Frage ist, ob aber nicht bei der Zulassung von Versuchen solche allgemeinen Grenzen der Erhaltung der einen Art und der Nichtüberwältigung der anderen durch die eine solche objektiven Grenzen gesetzt werden müssen. Vielleicht ist es ja auch nur eine Hypothese, der Sie nachgehen. Oder haben Sie da schon Erfahrungen mit Versuchen gemacht? Vielleicht könnte man es zum Gegenstand eines Versuches machen, aber dann würden wohl für die Züchtung Grenzen entstehen. Gefährlich wäre dann hier auch die Freisetzung, wenn man diese Tiere loslässt, dann sind sie nicht mehr rückholbar, und das steht ja dann immer bei allen Fischversuchen, die seien weg und kämen nicht wieder zurück. In europäischen Zusammenhängen sehe ich hier im Augenblick keine Norm, man müsste da schon zu Konventionen kommen, aber das ist – da haben Sie recht – sehr schwer erreichbar, weil solche Konventionen dann mit sehr vielen individuellen Interessen belastet wären und nicht nur auf diesen einen Punkt beschränkt werden können. Aber – Sie haben recht – es ist ein gefährlicher Punkt, man muss ihm wohl begegnen durch eine Begrenzung der Zulässigkeit weiterer Experimente, wenn es um die Überwältigung einer Art durch die andere geht.

JUTZI

Wenn Sie erlauben, nur einen Nachsatz hierzu. Wie Sie selbst gesagt haben, sind wir hier nur auf Konventionen angewiesen, ich weise darauf hin, dass die FAO einen Code für verantwortliche Fischerei erarbeitet hat, der verabschiedet worden ist von der Konferenz der FAO und der auch den Habitat-Schutz der einzelnen Arten zum Inhalt hat, aber es ist eben keine rechtsverbindliche Konvention.

GLODEK

Ich möchte Herrn Schreiber eine Frage stellen, und zwar als Tierzüchter. Ich möchte nicht das

Klonen als Tierversuch genehmigt haben, und auch nicht um eine Genehmigung, dieses in meinen Augen als zuchtmethodisches Instrument zu betrachtendes Verfahren beantragen zu müssen. Wir glauben, dass das Klonen, auch im Hinblick auf das, was Herr Jutzi gesagt hat, grosses Potential bietet, um deutliche Leistungsverbesserungen, die auf dem Ernährungssektor der Bevölkerung von Bedeutung sind, zu erreichen. Unser Problem ist – wir sind noch nicht soweit, dass wir das routinemässig anwenden können – dass wir immer zur Antwort bekommen, wenn es der Gesundheit des Menschen oder möglichst des Tieres dient, dann können wir über Ausnahmen reden, oder man sagt, wir können keine generelle Zulassung als Routineverfahren machen, weil das Klonen auch auf Menschen angewendet werden kann, und deswegen muss es generell verboten werden. Wir haben das vor zwei Tagen hier diskutiert, und was wir eigentlich möchten, ist eine klare Unterscheidung zwischen den legitimen methodischen Wünschen der Tierzüchter – die im übrigen keine Angst davor haben, dass dann die genetische Diversität bedroht wäre, jeder Tierzüchter, der die Grundregeln kennt, weiss was da zu tun ist, und das wird sich durch das Klonen keineswegs ändern, glaube ich – uns geht es darum, wie kann man das entkoppeln a) von Versuchen, die für die Forschung wichtig sind und die man heute auch schon durchführen kann und b) von diesem Odium, weil es beim Menschen auch angewandt werden kann, dürfen wir es bei Tieren nicht gestatten. Sie kennen sich gut in der Politik aus – was ist Ihre Prognose, wie man das bewerkstelligen kann?

SCHREIBER

Zur zweiten Hälfte, darüber haben wir ja auch vorhin schon gesprochen, und da leuchtet mir ein, auch was Herr Beckmann gesagt hat, dass das Argument vom Slippery Slope und vom Dammbruch, der entstehen kann, nicht trägt, weil es hier doch ganz anders ist. Ich habe auch – zunächst in juristischer Wortakrobatik (wir müssen ja vom Gesetz ausgehen) – vorgetragen, ob der § 7 des Tierschutzgesetzes Klo-

nierungsverfahren eigentlich mit erfasst, weil sie auf Tiere oder Erbgut von Tieren einwirken und insofern zu Schädigungen, Leiden oder Schmerzen führen können. Ich habe im Wege der normalen Auslegung die Meinung vorgetragen, das verneinen zu sollen und habe dafür Verbündete, aber auch Gegner in dieser allgemeinen Erklärung von Eser, Frühwald und anderen. Ich habe versucht, mit Frühwald darüber nochmals zu sprechen und er sagte mir: »Daran haben wir eigentlich gar nicht gedacht, so weit geht diese Erklärung nicht«. Ich würde sagen, die Auslegungsfrage ergibt, dass dieses Klonen weder eine gentechnologische Massnahme noch sonst irgendetwas ist, sondern eine ungeschlechtliche Vermehrung, und wenn sie beim Menschen – meiner Meinung nach aus guten Gründen – verboten ist, wegen der Individualität und Identität des Menschen, dass da keine Kopien herumlaufen sollen (und ich möchte auch keiner Kopie von mir begegnen). Manche sagen ja, das Verbot des Klonens beim Menschen sei nur auf der gleichen Regung begründet wie bei Frauen, die beim Ball keine andere Frau mit dem gleichen Kleid treffen wollen. Das ist wohl zu äusserlich und es steckt mehr dahinter. Beim Tier dagegen würde ich es als eine normale Weise der Züchtung ansehen, die auch die Individualität des Tieres nicht verletzt. Hoffen wir, dass das so bleibt und dass der § 7 so angewendet wird. Wie es politisch ausgehen wird, das weiss ich nicht. Eigentlich geht die Wendung gegen das Klonen so einhellig bei vielen Leuten einher, dass der Trend dahin geht, das Klonen beim Tier wenigstens zum Versuch zu erklären, um es dadurch politisch in die Hand zu bekommen. Dagegen meine ich, sollten Sie sich wehren und sollten sich dann auf den § 7 des Tierschutzgesetzes berufen, der freilich – fürchte ich – nicht so sehr im Hinblick auf diese neue Entwicklung geschaffen wurde. Aber die meisten Gesetze müssen ja klüger sein als der Gesetzgeber und dann für Dinge gelten, die auch später eintreten. Ich weiss nicht, was ich prophezeien soll, aber ich würde mich freuen, wenn Sie diese juristische Auslegung teilen und sie auch – was ja das Wichtigere ist –

sie auch als sachlich begründete Differenz zu sonstigen gentechnologischen Verfahren ansehen. Das ist der eigentliche Kern der Geschichte. Das was ich vorgetragen habe, ist ja nur die juristische Auslegung.

SCHULTE-CROENE

Zunächst ein Kommentar zu dem letztgenannten Problem: Liegt hier ein genehmigungsfähiger Tierversuch vor bei der Frage der Klonierung. Hier möchte ich lediglich darauf hinweisen, dass durchaus die Auffassung vertreten wird, dass das als Eingriff ins Erbgut gesehen werden kann – ich zitiere lediglich – , dass durch die Neukombination von chromosomaler DNA und mitochondrialer DNA beim Kerntransfer durchaus von einem Eingriff ins Erbgut gesprochen werden könnte. Das bitte ich doch noch einmal in diesem Kreise zu diskutieren. Dieses Argument ist nun einmal da und das sollte man wissen.

SCHREIBER

Das hatte ich Ihnen bereits vorgetragen, das sind Eser/Frühwald und die Gruppe, unter anderem, die genau das gesagt hat, dass der Gentransfer einen Eingriff in das Erbgut darstellt, das ist die Gegenmeinung.

SCHULTE-CROENE

Wenn das heute diskutiert werden soll, ich hätte sonst noch eine ganz andere Thematik, aber ich glaube, Herr Brem wollte dazu noch etwas sagen.

BREM

Wenn die Neukombination zwischen chromosomaler und mitochondrialer DNA schon genehmigungspflichtig ist, dann muss ja jede Verpaarung genehmigungspflichtig sein, denn da tun wir ja nichts anderes, eine Neukombination von Genen, irgendwo hört es auf. Dieses liesse sich sogar vermeiden, indem man die Eizellen aus der gleichen

Mutterlinie nimmt, dann wäre es keine Neukombination. Hinsichtlich des Prozesses der Klonierung würde sich überhaupt nichts ändern. Ich bitte doch von solch haarsträubenden Argumenten Abstand zu nehmen. Gegen solch unrealistischen Argumente muss man sich wehren.

SCHULTE-CROENE

Meine zweite Frage bezieht sich darauf, dass wir ein Thema hier noch gar nicht angesprochen haben, was ich eigentlich erwartet habe: Die Bedeutung der Patentierung. Hier ist auf der einen Seite – das ist am ersten Tag zur Sprache gekommen – deutlich festzustellen, dass durch die Patentierung auch durchaus problematische Bereiche entstehen können, z.B. wurde dargestellt, dass eine Gensequenz patentiert wurde, ohne dass zu diesem Zeitpunkt die Funktion des Gens bekannt war und die Funktion im Nachhinein von einer Arbeitsgruppe geklärt wurde, die dann später keinen Nutzen von diesem Patent hatte. Das ist ein generelles Problemfeld des Patentes, was ich aber nicht ins Zentrum meiner Frage stellen möchte. Einerseits gibt es hier die neue Möglichkeit, Eigentumsrechte wahrzunehmen, andererseits möchte ich auch gerade an Herrn Jutzi appellieren: die FAO macht auf dem Gebiet Undertaking genetischer Ressourcen zur Zeit auch Bemühungen, wie z.B. der Zugang zu genetischen Ressourcen geregelt werden soll in dem Sinne, dass derjenige, dem die Ressourcen gehören, auch gewisse Rechte behalten soll, und auch die Frage des Benefit Sharings ist eine Sache, die auch für die FAO eine grosse Rolle spielt. Hier ist die Frage: wie passen diese beiden Dinge, die möglicherweise etwas gegenläufig gesehen werden können, zusammen. Ich möchte noch einen dritten Bereich nennen – die klassische Betrachtungsweise, wie wir Tierrassen heute im Sinne von Eigentum sehen. Im Grunde sind heute bei uns Tierrassen ein freies Gut. Wenn eine Schweinezuchtorganisation einen guten Piétrain-Eber herstellt, kann jedermann auf der Welt diesen Eber kaufen und weiterzüchten. Das sind möglicherweise Dinge, die sich durch die Patentierung anders entwickeln können. Hier hätte

ich gern einmal Kommentare von Professor Schreiber und auch von Herrn Jutzi, wie diese Entwicklung weitergehen wird.

SCHREIBER

Wie die Entwicklung weitergehen wird, weiss ich nicht. Ich teile nicht die helle Aufregung, dass der Mensch nun verdinglicht sei, wenn Patente auf Genbestandteile erteilt werden, aber ich teile die Meinung, die das ausschliessen sollte. Patent ist insofern kein Eigentum, auch wenn man von geistigem Eigentum spricht, es ist ein Mittel des gewerblichen Rechtsschutzes. Hier geht es um Verfahren, mit genetischen Strukturen umzugehen, und diese dürfen meiner Meinung nach nicht exklusiv für das Gewerbe geschützt und festgelegt werden. Im Ergebnis halte ich es für richtig, dass die Entwicklung dahin geht, wenngleich ich nicht darin eine Verdinglichung oder Abwertung des Menschen zur Sache sehe, sondern ich sehe darin kein richtiges Verfahren, bestimmten Umgang mit menschlichen Substanzen zu monopolisieren, wenngleich das möglicherweise wirtschaftlich von erheblicher Bedeutung für bestimmte Entdecker sein könnte. Mich würde sehr interessieren, Herr Beckmann, wie Sie das ethisch sehen und wie Sie auch die Klonierung ethisch anders betrachten, als ich es eventuell aus der rechtlichen Auslegung her versucht habe, aber Herr Jutzi ist da auch gefragt, wegen des Patentes.

JUTZI

In aller Kürze: es ist nicht so, dass ein menschlicher Klon nicht dieselbe Menschenwürde hätte wie wir alle, das ist keine Frage. Wir können ihn ja nicht für die Art und Weise seines Zustandekommens verantwortlich machen. Was ist so problematisch am Klonen des Menschen – und da frage ich zurück – ist das auch so beim Tier? Problematisch am Klonen des Menschen ist bekanntlich, dass ein solcher Mensch der Möglichkeit, die wir alle genossen haben, beraubt worden ist, nämlich in grosser Weise

ein Ergebnis des Zufalls, nicht planbar gewesen zu sein. Das ist durch das Klonieren ausgeschaltet. Das Zweite, was am Klonieren von Menschen so problematisch ist – die ungeschlechtliche Weise des Zustandekommens. Auch hier geniessen wir alle eine Besonderheit, dass wir uns dem freien Zusammensein von Mann und Frau verdanken und nicht einer Planung. Das dritte Merkmal, und das ist besonders wichtig: die Generation, die lebte, bevor wir auf die Welt kamen, hat von vornherein akzeptiert, dass die Art und Weise, wie wir ausgestattet sind, nicht von uns gerechtfertigt werden muss. Die Tatsache, dass keiner von uns seine genetische Disposition je vor jemandem rechtfertigen muss, ist ein ganz entscheidendes Argument gegen das Klonen von Menschen. Wenn Sie diese drei Überlegungen auf das Tier übertragen, dann sieht man sehr schnell, dass sie schon in gewisser Weise auch ins Spiel kommen, aber dass wir nicht genug empirische Evidenz haben, ob nun das Tier weiss, es verdankt sich einem genetischen Zufall. Wir haben nicht die Evidenz zu wissen, ob das Tier auf gewisse geschlechtliche Weise zustande kommt. Ich will durchaus sagen, wir haben die Pflicht, uns zu vergewissern, aber man muss enorme Annahmen machen, wenn man das als Klonierungsverbot bei Tieren anführt. Von daher wird man dazu kommen müssen, dass es die Zielsetzungen sind – warum klonen ich Tiere und nicht das Klonen bei Tieren à tout prix erlaubt oder à tout prix verboten wäre. Es ist eine Frage der Zielsetzung. Eine kurze Replik auf die Intervention von Herrn Schulte-Coerne. Was die Verhandlungen zum internationalen Übereinkommen zu pflanzengenetischen Ressourcen angeht, diese Verhandlungen laufen seit acht Jahren und sollen dazu führen, dass ein verbindlicher Text beschlossen wird, daher dauert es so lange. Wir erwarten den Abschluss dieser Verhandlungen zur neuen Formulierung dieses Übereinkommens noch dieses Jahr. Dort soll der Zugang zu genetischen Ressourcen geregelt werden, es wird ein multilaterales System vorgeschlagen, wo auch Entschädigungsleistungen für die Landwirte, die die genetischen Ressourcen bisher

gepflegt haben und weiterhin pflegen, erbracht werden. Dazu ist ein multinationaler Aktionsplan aufgelegt worden, dieser Plan muss finanziert werden. Es geht im Wesentlichen darum, diese sog. Farmers' Rights umzusetzen und auch Dollars dafür einzusetzen, so dass dieser globale Aktionsplan der Kompensationsleistung für den Zugang zu genetischen Ressourcen auch tatsächlich zum Tragen kommt. Wenn dieser Erfolg dieses Jahr tatsächlich eintritt, dann wird das für uns im Tierbereich auch ein Türöffner sein, und wir werden dann auch im Tierbereich ähnliche Verhandlungen aufnehmen müssen.

STEINHART

Vielen Dank, ich denke, wir sind damit am Ende der vier Hauptaspekte angekommen. Wir konnten sicher nicht alle Aspekte in dieser letzten Diskussion, die die Ethik, die gesetzliche Situation, aber auch die globale Situation der Biotechnologie im Tierbereich umfasst, diskutieren, wir haben jedoch sehr wichtige Aspekte hier angesprochen und andiskutiert. Das ist im Wesentlichen den drei bzw. vier Rednern, wenn ich Herrn Doerfel von gestern noch dazu nehme, zu verdanken, und vor allen Dingen auch der Diskussionsdisziplin der Fragesteller, aber auch der hier am Podium sitzenden Referenten. Ich möchte mich daher bei Ihnen als Referenten bedanken, bei Ihnen als Diskutanten und als Zuhörer.

Zusammenfassung



2 Tage intensiver Diskussion über Entwicklungen und Anwendungsbereiche der »Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften« liegen hinter uns. »Why should animal scientists be concerned?« fragt John Hodges in den EAAP-News der Livestock Production Science in einem Leitartikel über »The genetically modified food muddle«. Er nennt 3 Gründe, weshalb sich die Tierwissenschaft Gedanken machen muss:

1. Die Tierwissenschaften befassen sich in erheblichem Umfang mit der Nahrungsmittelerzeugung.
2. Genetisch veränderte Organismen werden in der Tierernährung eingesetzt.
3. Es geht im Kern auch um die Glaubwürdigkeit der Tierwissenschaften in der Gesellschaft.

Es erschien mir passend, dies zu Beginn meiner Zusammenfassung zu zitieren, da ich damit die Feststellung verbinde, dass sich die hier versammelten Tierwissenschaftler mit ausgeprägtem Ernst und hohem Verantwortungsgefühl eingehend mit dem Bereich Biotechnologie befasst haben, wobei die Motive, sich Gedanken zu machen, sicherlich über die von John Hodges genannten Gründe noch erheblich hinausgehen.

Wir haben auch gehört, dass Biotechnologie in den Agrar- und Veterinärwissenschaften Wechselbädern der öffentlichen und politischen Wertschätzung unterworfen war und ist.

Ich möchte in diesem Kontext die enorme Leistung der in diesem Bereich tätigen Wissenschaftler,

insbesondere der jüngeren Generation, hervorheben, die unter häufig schwierigen Bedingungen und in zum Teil wenig ermutigender politischer Atmosphäre mit viel Stehvermögen gearbeitet und damit die Voraussetzungen für die fachliche Substanz und das hohe Niveau der 18. Hülensberger Gespräche in Weimar geschaffen haben.

Große Anerkennung verdienen in diesem Zusammenhang auch die Förderinstitutionen, die in richtiger Einschätzung der damit verbundenen Chancen die biotechnologische Forschung bei Nutztieren auf den Weg gebracht und durch Anschub- und Schwerpunktförderung auf tragfähige Füße gestellt haben.

Als Beispiel nenne ich die Deutsche Forschungsgemeinschaft mit dem Schwerpunktprogramm »Genomanalyse und Gentransfer bei landwirtschaftlichen Nutztieren«, und wenn man die Ergebnisse des Abschlusskolloquiums in Hohenheim mit den hier in Weimar vorgestellten Arbeiten vergleicht, ist das DFG-Programm offensichtlich auf fruchtbaren Boden gefallen.

Meine Funktion im Stiftungsvorstand erlaubt mir aber auch, auf die vielfältige Förderung der biotechnologischen Forschung durch die H.W. Schumann-Stiftung hinzuweisen.

Diese Förderung besteht in

- Projektförderungen, deren Ergebnisse hier teilweise auf Postern zu sehen waren,

- Förderpreisen, deren Träger als Referenten und Tagungsteilnehmer hier in Weimar vertreten sind,
- Beihilfen zu Kongreßbesuchen.

So können wir die 18. Hülseberger Gespräche auch als ein Stück Bestandsaufnahme zu diesen Förderungseffekten verstehen.

Folgende Ziele der Veranstaltung waren erkennbar:

1. Analyse des Wissensstandes im Treibhaus der Wissensvermehrung in der Biotechnologie.
2. Diskussion realistischer Chancen und Möglichkeiten der Anwendung biotechnischer Verfahren in Wissenschaft und Praxis auf dem Nutztiersektor.
3. Betrachtung rechtlicher, ethischer, gesundheitsrelevanter und der Nachhaltigkeit des Handelns verbundener Rahmenbedingungen für die Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften.

Die gesteckten Ziele wurden aus meiner Sicht dank der inhaltlich, didaktisch und vortragstechnisch hervorragenden Beiträge der Referenten und der Poster sowie dank der kritischen interdisziplinären Diskussion der Teilnehmer ein gutes Stück weit erreicht.

Nach der Begrüßung und Vorstellung der Thematik durch den Vorsitzenden des Kuratoriums der H. W. Schaumann-Stiftung, Herrn Jensen, hat der Landwirtschaftsminister des Landes Thüringen, Herr Dr. Sklenar, in seinem Grußwort seine Wertschätzung für die Rolle der Biotechnologie für die Tierwissenschaften und die Praxis der Tierproduktion zum Ausdruck gebracht, wobei selbstverständlich auch die erforderliche Sorgfalt und ökologisch-soziale Verträglichkeit hervorgehoben wurden.

Was die drei Herausforderungen der modernen Biotechnologie betrifft, können die H. W. Schaumann-Stiftung und die Teilnehmer der 18. Hülseberger Gespräche sich glücklich schätzen, durch einen der führenden Köpfe der Gentechnologie und Molekulargenetik, den Präsidenten der DFG, Herrn Prof.

Dr. Dr. h. c. Winnacker, so kompetent und mitreißend in die Materie eingeführt worden zu sein. Es würde mir daher anmaßend erscheinen, hier den Inhalt wiedergeben zu wollen. Lassen wir das Gehörte im Original weiter auf uns wirken. Insbesondere sollte sich in unserer Einstellung zur Biotechnologie bei Nutztieren der von Herrn Winnacker vermittelte Imperativ tief einprägen, nämlich:

»Die Biotechnologie hat dem Menschen zu dienen, nicht umgekehrt!«

Das weitere Vortragsprogramm war in folgende Blöcke unterteilt:

- I. Analyse von Nutztier - Genomen sowie gendiagnostische Verfahren
- II. Reproduktionsbiologische Verfahren
- III. Anwendungen biotechnischer Verfahren
- IV. Konsequenzen der Anwendung im Nutztierbetrieb

Lassen Sie mich, ohne die Beiträge inhaltlich ausführlich zu rekapitulieren, einige aufarbeitende Anmerkungen aus meiner Sicht machen:

I. Analyse von Nutztier-Genomen sowie gendiagnostische Verfahren

Analyse und Kartierung von Nutztier-Genomen (Brenig)

Struktur und Funktion von Kandidatengenen (Schwerin)

DNA-Variation - Polymorphismus - Genetische Variation (Fries)

Somatischer Gentransfer (Geldermann)

Mir ist aus dem informativen Überblick zur *Analyse und Kartierung von Nutztiergenomen* besonders geblieben, dass die Genomanalytik nicht mit molekulargenetischen Verfahren begonnen hat, sondern letztere die Fortsetzung der seit der Domestikation erfolgten Genomanalytik mit neuen Mitteln und Möglichkeiten sind. Dies kann man sicherlich erweitern auf die Biotechnologie bei Nutztieren ins-

gesamt. Weiterhin habe ich registriert, dass die Genomanalyse bei Nutztieren auch in Zukunft keine triviale Aufgabe sein wird, sondern im Gegenteil weitere Automation und logistische Entwicklungen, das heißt auch finanzielles Engagement, erfordert.

Die Einführung in die *Struktur und Funktion von Kandidatengen* hat die Brücke geschlagen zu den verschiedenen Ebenen möglicher Nutzanwendung. Die Definition des Begriffs »Gen« erscheint aufgrund neuer Erkenntnisse ständig anpassungsbedürftig. Da Gene nur eine Komponente der Merkmalsausprägung sind, sind weiterhin für deren Verständnis komplexe Untersuchungen auf allen Stufen der Merkmalsausprägung unter Einbeziehung aller Ansätze erforderlich. Hierzu ist die interdisziplinäre Kooperation unerlässlich, z. B. unter Einbeziehung der Bioinformatik.

Genetische Variation ist das Substrat der Tierzucht. Auf der DNA-Ebene bietet diese Variation neue tierzüchterische Perspektiven, wenn auch einschränkend gesagt wurde, dass die polygene Variation des quantitativen genetischen Modells nicht vollständig molekular dargestellt werden kann. Die auf der Variation basierende digitale DNA-Signatur kann gegebenenfalls sehr nutzbringend verwendet werden, beispielsweise für Abstammungskontrollen, Identifizierung von Produkten oder Sichtung genetischer Diversität, soweit die logistischen Probleme sich lösen lassen.

Für den *somatischen*, also nicht auf die Keimbahnintegration abzielenden *Gentransfer* gibt es, neben der Anwendung auf humanmedizinischen Gebieten, ein breites Feld wichtiger Zielbereiche auf dem Nutztiersektor, wie z. B. die Beeinflussung von Einzelgenwirkungen, die Beeinflussung der Proliferation bestimmter Zellklone im Organismus, DNA-Vakzinierung, sowie Genexpression in transgenen Zellkulturen zur Produktion wirtschaftlich nutzbarer Substanzen und zur Wirkungsmessung regulatorischer DNA-Regionen. Vorrangige Arbeitsbereiche im somatischen Gentransfer sind die Herstel-

lung, Klonierung und Charakterisierung von Genkonstrukten, die Einschleusung von DNA-Konstrukten in Zellen und Gewebe, Gentransferstrategien, die Ausrichtung auf bestimmte Zellen und Gewebe, sowie die Berücksichtigung von Barrieren und Kinetik.

Die Diskussion über Zukunftsstrategien der Genomforschung hat insbesondere das Erfordernis interdisziplinärer und institutionsübergreifender Kooperation deutlich werden lassen. Die Devise, »Schritt für Schritt« voranzugehen, kann sicher sinnvoll umgesetzt werden.

II. Reproduktionsbiologische Verfahren

Biotechnologie der Reproduktion an der Schwelle des neuen Jahrtausends (Niemann).

In vitro-Produktion von Embryonen (Schellander).

Keimbahn-Gentransfer (Besenfelder).

Klonierung (Brem).

Embryo-Sexen und Spermatrennung (Wolf).

Anhand von 9 Anwendungsbereichen, von denen einige am Beispiel aktueller Forschungsergebnisse eingehender vorgestellt wurden, konnte festgestellt werden, dass an der Schwelle des neuen Jahrtausends ein Arsenal an *reproduktionsbiotechnologischen Verfahren* vorhanden ist, das in Kombination mit den genomanalytischen Erkenntnissen ein wichtiges Instrumentarium zur Bewältigung künftiger Herausforderungen in der Tierzucht ergibt. Besonders zu erwähnen sind dabei auch unkonventionelle, medizinisch-humanitär bedeutsame Nutzungsmöglichkeiten für landwirtschaftliche Nutztiere.

Zu einer »Schlüsseltechnologie« wurde die *in vitro-Produktion (IVP) von Embryonen* entwickelt, wobei viele Einzelprobleme schrittweise gelöst wurden. Diese Entwicklung ist geradezu ein Musterbeispiel dafür, wie wenig Anfangsschwierigkeiten sich dazu eignen, spätere Praxisrelevanz einer Methode a priori in Zweifel zu ziehen. Auch die Nutztierwissenschaften brauchen heute die Illusionen für den Realitätsfortschritt von morgen.

Mit der IVP auch verbundene Probleme, wie z. B. übergewichtige Kälber, demonstrieren in den damit verbundenen Untersuchungen überzeugend die Bedeutung molekulargenetischer Ursachenforschung bei Expressionsstörungen.

Neben dem somatischen Gentransfer kommt dem *Keimbahn-Gentransfer* große potenzielle Bedeutung zu, vor allem für Grundlagenforschung und die Erstellung von Tiermodellen, für Gene Farming sowie für Verbesserungen und Innovationen bei tierischen Produkten.

Die Schaffung von für Mensch und Tier schonenden und effektiven reproduktionsbiotechnologischen Voraussetzungen hat die Praktikabilität des Keimbahn – Gentransfers erheblich vorangebracht, wobei die Effizienz des Verfahrens noch weiterer Verbesserungen bedarf.

Obwohl die Natur Klone als biologisches Prinzip auch bei Säugern kennt, und Klone seit längerem biotechnologisch erzeugt werden können, hat der Begriff »Klonierung« mit »Dolly« eine neue Dimension der Technologie und der Diskussion eröffnet, die inzwischen zu einer Fülle von Fortschritten und Problemidentifizierungen geführt hat. Dies kann Ausgangspunkt für sinnvolle Entwicklungen und Anwendungen zum Nutzen von Mensch, Tier und Umwelt sein, aber auch Phantastereien im menschlichen Bereich auslösen.

Es ist gut, dass der maßgebliche Programmgestalter dieser Tagung, Herr Professor Brem, hierzu mit der strikten Ablehnung des Klonens von Menschen eine deutliche Position bezogen hat.

Der alte Traum, das Geschlecht eines Individuums vorherbestimmen zu können, ist der Realisierung durch *Embryo-Sexen und Spermientrennung* in den letzten Jahren mit großen Schritten näher gerückt. Die Flowzytometrie ermöglicht heute eine sichere Auftrennung in x- und y-Spermien, wobei eine Anwendungsbegrenzung sicherlich in der quantitativen Verfügbarkeit an gesexeten Spermien liegt. Neue reproduktionsbiotechnische Verfahren

zur Befruchtung können hier neue Perspektiven bieten.

Freeflow-Elektrophorese und neue gentechnische Aspekte der selektiven Spermienproduktion und -motilität sind Stichworte mit möglicherweise neuen Ansätzen für die Geschlechtsbestimmung.

Für das praktisch angewandte und technisch gelöste Embryo-Sexen wurden auch Begrenzungen, z. B. durch hohe Kosten, angesprochen.

III. Anwendungen biotechnologischer Verfahren

Molekulare Gendiagnostik bei qualitativen Merkmalen und Erbfehlern (Erhardt).

Möglichkeiten und Grenzen der markergestützten Selektion (Kalm).

Optimierung der genetischen Grundlagen tierischer Leistungen durch Genomveränderung (Kräußlich).

Tiergesundheit und neue Nutzungsmöglichkeiten von Tieren durch Gentransfer (Müller).

Konstruktion und Einsatzmöglichkeiten von rekombinanten Impfstoffen und der Gentherapie in der Tiermedizin (Schlapp).

Wirkungen mikrobieller Enzyme als Futterzusatzstoffe (Simon).

Für *qualitative Merkmale und Erbfehler* existieren bereits direkte Tests in der Ebene molekularer Gendiagnostik, z. B. für Allele der Milchproteingene, Fleischqualitätsgene, Farbfaktoren, Fruchtbarkeitsgene und für Erbfehler. Für rezessive Erbfehler ist die Gendiagnostik kostengünstig und wirksam zur Erkennung von Anlagenträgern einzusetzen. Strategisches Ziel wird, vor allem bei zunehmender Zahl molekulargenetisch diagnostizierter Erbfehler, sein müssen, züchterisch wertvolle Eigenschaften von Anlagenträgern zu nutzen, aber deren Paarung untereinander zwecks Vermeidung phänotypischer Ausprägung von Erbfehlern zu unterlassen.

Weitere Fortschritte auf diesem Sektor erfordern das Anlegen von DNA-Banken und eine breite Merkmalerfassung im Feld.

Die potentielle Bedeutung *markergestützter Selektion* beim Nutztier wurde mit der Darstellung der Zusammenhänge und der Nennung eines möglichen Anstiegs des genetischen Fortschritts beim Rind um etwa 10% deutlich gemacht. Aber auch Anwendungsbegrenzungen und Erfolgsrisiken in der Zuchtpraxis wurden diskutiert. Stichpunktartig wurde eine Reihe von Feststellungen getroffen, z. B.:

- Es gibt ökonomisch wichtige Chromosomenbereiche beim Rind,
- Die Umsetzung der markergestützten Selektion in praktische Zuchtarbeit läuft an, und die erforderliche Infrastruktur ist im Werden.
- Notwendige Voraussetzungen für weitere Fortschritte, z. B. hoch auflösende Markerkarten, lassen sich entwickeln.
- Forschung und Praxis müssen intensiver zusammen gespannt werden.

Die Nutzung neuer Möglichkeiten der *Genombeeinflussung zur Optimierung tierischer Leistungen*, beindruckend dargestellt vom Senior unter den Referenten, Professor Horst Kräusslich, ist wahrscheinlich aufgrund der raschen Fortschritte in der Genomforschung schneller zu realisieren als heute angenommen wird. Um diese Entwicklung in richtigen und effizienten Bahnen ablaufen zu lassen, erscheint es notwendig, die experimentelle Tierzucht zu intensivieren, wobei eine enge interdisziplinäre Verflechtung, z. B. mit dem Bereich Physiologie, geboten ist. Dies ist auch deshalb besonders wichtig, um in der Hochleistungszucht das Auftreten antagonistischer, sich negativ für Tiere und Produkte auswirkender Effekte zu vermeiden. Im Gesamtzusammenhang ist auch über den Ersatz heutiger populationsgenetischer Modelle durch molekularbiologische Modelle der quantitativen Genetik nachzudenken.

Tiergesundheit ist in hohem Maße genetisch bestimmt und beeinflussbar. Die konventionelle Züchtung hat in der Förderung der Krankheits-

resistenz der Nutztiere zwar Teilerfolge, bisher aber noch nicht den entscheidenden Durchbruch erzielen können. Die Gentechnik eröffnet neue Möglichkeiten der Erzeugung intrazellulärer, extrazellulärer, genetischer und kongenitaler Immunisierung, deren Nutzung zunächst speziellen Bereichen der Tiergesundheit vorbehalten sein wird. Es ist aber wichtig, im Auge zu behalten, dass Pathogene sich immer wieder an neue Situationen anpassen können, und dass neue biotechnologische Möglichkeiten kein Ersatz für integrierte tierärztliche Bestandsbetreuung und optimale Haltungsbedingungen für Nutztiere sind.

Im Rahmen der sogenannten »roten Gentechnologie«, der Herstellung von Arzneimitteln, befasst sich Bayer Tiergesundheit mit der Synthese rekombinanter Arzneimittel. Es handelt sich dabei um *rekombinante Impfstoffe* gegen bakterielle, virale und parasitäre Erreger, sowie um die Entwicklung *gentherapeutischer* Verfahren. Rekombinante Impfstoffe verbinden hohe Wirksamkeit mit bester Verträglichkeit, und zwar in Form von Subunit-Vakzinen, Vektor-Vakzinen und Nukleinsäure-Vakzinen.

Methoden zur Gentherapie, mit deren Hilfe mittels Expression entsprechender Gene in den jeweiligen Zielgeweben Gendefekte ausgeglichen oder therapeutische Proteine synthetisiert werden sollen, gewinnen im F & E-Bereich an Bedeutung.

Es gibt viele *Enzyme als Futterzusatzstoffe*, von denen im vergangenen Jahr bereits 32 Präparate nach dem geltenden Futtermittelrecht zugelassen waren. Es handelt sich dabei um biotechnologisch hergestellte Produkte, bei deren Erzeugung gentechnische Methoden eine wesentliche Rolle spielen. Das *Enzym* Phytase kann die P-Exkretion bei Schweinen und Geflügel ohne Leistungseinbußen reduzieren und damit einen Beitrag zum Umweltschutz erbringen. Gentechnologische Verfahren können eingesetzt werden, um Charakteristika der Enzyme zu modifizieren und diese damit für Technologie und Verwendung zu optimieren.

IV. Konsequenzen der Anwendung biotechnischer Verfahren im Nutztierbereich

Potenzielle Bedeutung der Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften für die globale Tierproduktion und Ernährungssicherung beim Menschen (Jutzi).

Konsequenzen externer DNA-Insertion in etablierte Säuger-Genome (Doerfler).

Zur Frage der ethischen Bewertung der Anwendung von Biotechnologien bei Nutztieren (Beckmann).

Rechtliche Fragen und EU-Harmonisierung der Anwendung biotechnologischer Verfahren bei Tieren (Schreiber).

Der Bedarf an Nahrungsmitteln tierischer Herkunft steigt nachhaltig, unter anderem bedingt durch eine zahlenmäßig zunehmende Weltbevölkerung und deren vermehrte Urbanisierung. Die Biotechnologie kann zur Lösung der Probleme *globaler Tierproduktion und Ernährungssicherung beim Menschen* wichtige Beiträge leisten, aber nicht ohne Rücksichtnahme auf soziale Komponenten, auf Folgen für Biosicherheit und Biodiversität sowie auf weitere absehbare Problembereiche. Die FAO sagt ja zur Biotechnologie, aber mit dem Vorbehalt der Ergebnisse von Folgenabschätzungen, der Risikovermeidung und der Sicherheit in der Anwendung.

In den Medien gebräuchliche Wortverbindungen wie »Gen-Food«, »Gen-Tomaten« etc. können bei nicht informierten Konsumenten die abwegige Vorstellung wecken, nur mit solchen Nahrungsmitteln und möglicherweise zu ihrem Schaden Gene aufzunehmen. Offenbar ist nicht immer klar, dass der Mensch seit eh und je praktisch mit jedem Essen DNA zu sich nimmt. Es war daher sehr interessant, zu erfahren, was nach dem heutigen Stand diesbezüglicher Forschungsergebnisse mit oral aufgenommener DNA passiert. Sie ist, z. B. bei Mäusen, zu finden in den Darmepithelzellen, den Peyerschen Platten und in verschiedenen Organzellen, und kann auch transplazentar in Zellen der Konzeptionsprodukte übertragen werden. Man darf gespannt sein auf die weitere Erforschung dieser Zusammen-

hänge, z. B. der Transportmechanismen und der Reaktionen des Organismus gegenüber fremder DNA.

Zur Frage der *ethischen Bewertung der Anwendung von Biotechnologie bei Nutztieren* stellt der vorgestellte anthroporelationale Ansatz offensichtlich eine einleuchtende Überbrückung von Gegensätzen der anthropozentrischen Betrachtung auf der einen und der biozentrischen oder pathozentrischen Sicht auf der anderen Seite dar. Das Tier ist demnach Objekt, aber nicht Subjekt von Moral. Die vom Menschen vorgenommene Zweckbestimmung einer Inanspruchnahme von Tieren muss objektiv gewichtig, dringlich, kontrollierbar in den Folgen, in der Nutzen-Risiko-Abwägung vertretbar und zudem aus der Sicht des Tieres – als Objekt der Moral – zu rechtfertigen sein. Ich betrachte das unter anderem auch als Bestätigung eines Standpunktes, den wir Tierwissenschaftler zur Biotechnologie bei Nutztieren auch bisher im wesentlichen so eingenommen und vertreten haben.

Gesetzliche Rahmenbedingungen sind eine wichtige Grundlage für wissenschaftlich-technische Entwicklungen und deren Anwendung. Wo biologische Fragen mit einer Tragweite wie Reproduktion und Genetik massiv tangiert sind, haben rechtliche Bestimmungen, neben einer sinnvollen Kanalisierung von Entwicklungen, auch die Aufgabe, den gesellschaftlichen Frieden zu gewährleisten. Es war daher besonders wichtig, als Endpunkt aller interdisziplinären Betrachtungen zur Biotechnologie die heute gültigen und sich abzeichnenden gesetzlichen Regelungen aus so berufenem Munde dargestellt und interpretiert zu bekommen.

Zwei Dinge erscheinen mir für die Zukunft bedeutsam: Gesetze dürfen nicht bewirken, dass die Luft für Innovationen zu dünn wird, und bei Themen von solcher Bedeutung für die Menschheit wie die Biotechnologie sind nicht nur EU-Harmonisierungen wichtig, sondern es werden auch globale Abstimmungen notwendig.

Die 18. Hülzenberger Gespräche haben eine Fülle von Erkenntnissen, Möglichkeiten, Einsichten und Perspektiven zur Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften vermittelt. Will man die in den 3 Tagen wahrzunehmenden Botschaften konzentrieren, könnte sich das in etwa so anhören:

Biotechnologie in den Nutztierwissenschaften kann, zum Nutzen von Mensch, Tier und Umwelt konzipiert und in sinnvollen Kategorien angewandt, positiv zu Problemlösungen in der Sicherung der Ernährung einer wachsenden Weltbevölkerung, in der Gesundheit von Mensch und Tier, im Umwelt- und Ressourcenschutz und, last not least, in der Tierzucht und -haltung beitragen. Ihre Weiterentwicklung verdient daher, gezielt und nachhaltig gefördert zu werden. Gesetze sollen die Entwicklung und Anwendung der Biotechnologie im obigen Sinne richtig kanalisieren, aber nicht strangulieren.

Ethische Aufarbeitung und entsprechende Grenzziehungen sind unverzichtbar und wichtiger Bestandteil des Umgangs mit neuen Technologien insgesamt. Bedenkenträger sind ernst zu nehmen und in die Diskussion zu integrieren, während militante Protestaktionen abzulehnen sind.

Gerade für die Biotechnologie sind die von Neethling formulierten Grundlagen des Erfolgs im Leben von besonderer Bedeutung:

Mut, Ausdauer und Stehvermögen, Hingabe und Passion, Visionen und kritisches Vorausschauen.

Alles in allem: Die Biotechnologie hat dem Menschen zu dienen, wobei wir als Tierwissenschaftler diesem Credo von Herrn Winnacker noch anfügen, dass sie auch dem Wohl der Tiere dienlich sein sollte.

Schlußwort

Im Hinblick auf den Zeitplan muss mein Schlusswort sehr kurz ausfallen. Deshalb möchte ich mich zunächst bei den Inhabern der Fa. Schaumann, den Mitgliedern der Familie Seiller, dafür bedanken, dass sie nicht nur durch die finanziellen Leistungen an die Stiftung eine derartige Tagung ermöglichen, sondern auch durch ihre stete Anwesenheit während der Tagung ihr Interesse an den Nutztierwissenschaften bekunden.

Mein Dank gilt auch den Kuratoren, insbesondere Herrn Brem, die das Programm der »18. Hülseberger Gespräche« gestalteten und moderierten. Die Anregung des Kuratoriums, erstmalig gezielt auch junge Wissenschaftler einzuladen, fand allgemeine Zustimmung, und die Präsentation von 13 Postern im Foyer zeugte von ihrem Engagement und von den Ergebnissen einiger von der H. Wilhelm Schaumann Stiftung geförderten Vorhaben. Ich danke Herrn Dr. Looft für die Organisation dieser Ausstellung und den Transport der Stelltafeln. Ferner bedanke ich mich bei den Referenten, bei den



Diskussionsrednern und bei allen Teilnehmern für ihre konstruktive Mitarbeit.

Im nächsten Jahr wird die Stiftung wieder Förderpreise von je DM 10.000,- für die besten Habilitationenleistungen in Nutztierwissenschaften vergeben. Außerdem werden die besten Dissertationen der Jahre 1999 und 2000 im Fach Tierernährung mit je DM 2.000,- und die besten Studienleistungen mit je 1.000,- ausgezeichnet. Die einschlägigen Fakultäten, Hochschulen und Institute werden demnächst um entsprechende Vorschläge gebeten werden.

Wer Informationen über die Stiftung und Hinweise für Fördermöglichkeiten benötigt, findet diese nunmehr auch im Internet unter »schaumannstiftung.de«. Dort werden auch die Vorträge der »Hülseberger Gespräche« veröffentlicht.

Ich schließe die 18. Hülseberger Gespräche und wünsche Ihnen einen angenehmen und sicheren Heimweg!

Teilnehmer der 18. HÜLSENBERGER GESPRÄCHE 2000

ABEL, Prof. Dr. Hansjörg	Institut für Tierphysiologie und Tierernährung Kellnerweg 6, 37077 Göttingen
AIGNER, Dr. Bernhard	Institut für Tierzucht, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
ANACKER, Dr. habil. Gerhard	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Naumburger Straße 98, 07743 Jena
BALJER, Prof. Dr. Georg	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Frankfurter Straße 89-91, 35392 Gießen
BAUER, Prof. Dr. Johann	Institut für Tierhygiene Weihestephan, 85354 Freising
BAUMGARTNER, Prof. Dr. Walter	II. Medizinische Universitäts-Klinik für Klautiere Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
BECKMANN, Prof. Dr. Jan P.	Institut für Philosophie Feithstraße 140 / AVZ II, 58084 Hagen
BESENFELDER, Univ.-Doz. Dr. Urban	Untere Marktstraße 50/2, A-3443 Sieghartskirchen
BIEDERMANN, Prof. Dr. Günter	Gesamthochschule Kassel Nordbahnhofstraße 1a, 37213 Witzenhausen
BORELL, Prof. Dr. Eberhard von	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Adam-Kuckhoff-Straße 35, 06108 Halle
BRANSCHIED, Prof. Dr. Wolfgang	Institut für Fleischerzeugung und Vermarktung E. C. Baumann Straße 20, 95326 Kulmbach

BRAUN, Prof. Dr. Joachim	Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik Königinstraße 12, 80539 München
BREM, Prof. Dr. Dr. h. c. Gottfried	Thalmanndorf 25, 86567 Hilgertshausen
BRENIG, Prof. Dr. Dr. Bertram	Tierärztliches Institut Groner Landstraße 2, 37073 Göttingen
BREVES, Prof. Dr. Gerhard	Physiologisches Institut Bischofsholer Damm 15/102, 30173 Hannover
BROCKMANN, Frau Dr. Gudrun	Institut für die Biologie landwirtschaftliche Nuttiere Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf
BRÜCKMANN, Frau Dr. Annette	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Olshausenstraße 40, 24098 Kiel
BUSCH, Frau Dr. Eva	BAYER AG, GB Tiergesundheit Alfred-Nobel-Straße 50, 40769 Monheim
CLAUS, Prof. Dr. Rolf	Institut für Tierhaltung Garbenstraße 17, 70593 Stuttgart
DE GROOT, Frau Hilka	Oldenburger Straße 40, 26835 Hesel
DISTL, Prof. Dr. Ottmar	Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung Bünteweg 17 p, 30559 Hannover
DOERFLER, Prof. Dr. Walter	Institut für Genetik Weyertal 121, 50931 Köln
DREPPER, Prof. Dr. Dr. Kraft	Niemannsweg 116, 24105 Kiel
DRÖGEMÜLLER, Dr. Cord	Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung Bünteweg 17 p, 30559 Hannover
DZAPO, Prof. Dr. Vladimir	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Ludwigstraße 21 B, 35390 Gießen
EDER, Prof. Dr.	Institut für Tierernährung und Vorratshaltung Emil-Abderhalden-Straße 26, 06108 Halle
EINSPANIER, PD. Dr. Dr. Ralf	Institut für Physiologie Vöttingerstraße 45, 85350 Freising

ENDER, Prof. Dr. Klaus	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftliche Nutztiere Wilhelm-Stahl-Alle 2, 18196 Dummerstorf
ERHARDT, Prof. Dr. Dr. Georg	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Ludwigstraße 21 b, 35390 Gießen
FISCHER, Prof. Dr. Bernd	Institut für Anatomie und Zellbiologie Große Steinstraße 52, 06097 Halle
FÖRSTER, Prof. Dr. Martin	Institut für Tierzucht Veterinärstraße 13, 80539 München
FRIES, Prof. Dr. Ruedi	Lehrstuhl für Tierzucht Weihenstephan, 85350 Freising
GABEL, Prof. Dr. Martin	Institut für umweltgerechte Tierhaltung Justus-von-Liebig-Weg 6, 18051 Rostock
GÄBEL, Prof. Dr. Gotthold	Institut für Veterinär-Physiologie Sammelweiß-Straße 2, 04103 Leipzig
GELDERMANN, Prof. Dr. Hermann	Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung Garbenstraße 17, 70599 Stuttgart
GERKEN, Prof. Dr. Martina	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Albrecht-Thaer-Weg 1, 37075 Göttingen
GERNAND, Dr. Erhard	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Am Rennsteig 3, 99819 Oberellen OT Clausberg
GLODEK, Prof. Dr. Peter	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Albrecht-Thaer-Weg 1, 37075 Göttingen
GRAVERT, Prof. Dr. Dr. h. c. Hans Otto	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Hasselkamp 90, 24119 Kronshagen
GÜRTLER, Prof. Dr. Herbert	Dorfstraße 19, 04460 Kitzen, OT Sittel
HAGEMEISTER, Prof. Dr. Hans	Forschungsinstitut für die Biologie landw. Nutztiere Justus-von-Liebig-Weg 2, 18059 Rostock
HARLIZIUS, Frau Dr. Barbara	Institut für Tierzucht und Vererbungsforshung Bünteweg 17 p, 30559 Hannover

HARTUNG, Prof. Dr. Jörg	Institut für Tierhygiene und Tierschutz Bünteweg 17 p, 30559 Hannover
HIENDLEDER, PD Dr. Stefan	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Ludwigstraße 21 b, 35390 Gießen
HOFFMANN, Prof. Dr. Bernd	Gynäkologische und Ambulatorische Veterinärklinik Frankfurter Straße 106, 35392 Gießen
HOLTZ, Prof. Dr. Wolfgang	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen
HONIKEL, Prof. Dr. K. O.	Bundesanstalt für Fleischforschung E.-C.-Baumann-Straße 20, 95326 Kulmbach
JANSEN, PD Dr. Stephan	Tierärztliches Institut Groner Landstraße 2, 37073 Göttingen
JENSEN, Geschäftsführer Jörn	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Thiensen 13, 25373 Ellerhoop
JUTZI, Prof. Dr. Samuel	Director Div. of Animal Production, FAO Viale delle Terme di Caracalla, I-00100 Roma
KALM, Prof. Dr. Drs. h. c. Ernst	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Olshausenstraße 40, 24098 Kiel
KANITZ, Dr. W.	Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftliche Nutztiere Wilhelm-Stahl-Alle 2, 18196 Dummerstorf
KARG, Prof. Dr. Drs. h. c. Heinrich	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Osterwaldstraße 53, 80805 München
KLOSTERMEYER, Prof. Dr. Henning	Institut für Chemie und Physik Weihenstephaner Berg 5, 85350 Freising
KRÄUBLICH, Prof. Dr. Drs. h. c. Horst	Lärchenstraße 22, 82131 Gauting
KRENZ, Dipl.-Kfm. Hartmut	H. Wilhelm Schaumann Stiftung An der Mühlenau 4, 25421 Pinneberg
KRIETER, Prof. Dr. Joachim	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Olshausenstraße 40, 24098 Kiel

KÜTHER, Dr. Klaus	Lohmann Animal Health GmbH & Co KG Heinz-Lohmann-Straße 4, 27472 Cuxhaven
LANDSIEDEL, Präsident Dr. Uwe	Tierärztekammer Thüringen Barbarastraße 68, 99752 Bleicherode
LANGHOLZ, Prof. Dr. Hans-Jürgen	Institut für Tierzucht und Haustiergenetik Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen
LENGERKEN, Prof. Dr. Gerhard von	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Adam-Kuckhoff-Straße 35, 06108 Halle
LETTNER, Prof. Dr. Franz	Institut für Nutztierwissenschaften Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien
LIEBERT, Prof. Dr. Frank	Institut für Tierphysiologie und Tierernährung Kellnerweg 6, 37077 Göttingen
LOH, Tierarzt Gunnar	Institut für Tierernährung Brümmerstraße 34, 14195 Berlin
LOOFT, Dr. Christian	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Olshausenstraße 40, 24098 Kiel
LUKOWICZ, Ltd. RD. Dr. Mathias von	Bayerische Landesanstalt für Fischerei Weilheimerstraße 8, 82319 Starnberg
MEINECKE, Prof. Dr. Burchard	Institut für Reproduktionsmedizin Bünteweg 15, 30559 Hannover
MEINECKE-TILLMANN, PD Dr. Dr. Sabine	Institut für Reproduktionsmedizin Bünteweg 15, 30559 Hannover
MEYER, Prof. Dr. Dr. Heinrich D.	Institut für Physiologie Vöttingerstraße 45, 85350 Freising
MÖSSLACHER, Dr. Georg	Institut für Tierzucht Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
MÜLLER, Frau Dr. Simone	Institut für Tierzucht Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
MÜLLER, Prof. Dr. Mathias	Institut für Tierzucht Veterinärplatz 1, A-1210 Wien

NIEMANN, Prof. Dr. Dr. Heiner	Institut für Tierzucht und Tiervershalten, Mariensee Hölty-Straße 10, 31535 Neustadt
PALLAUF, Prof. Dr. Josef	Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie Senckenbergstraße 5, 35390 Gießen
PETERSEN, MR Dr. Uwe	BML, Rochusstraße 1, 53123 Bonn
PFEFFER, Prof. Dr. Ernst	Institut für Tierernährung Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
PLATZER, Frau Dr. Katrin	Evangelische Studiengemeinschaft Schmeilweg 5, 69118 Heidelberg
PRELLE, Frau Dr. Katja	Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 München
REICHARDT, Dr. habil. Werner	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Am Rennsteig 3, 99819 Oberellen OT Clausberg
REINER, PD Dr. Gerald	Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung Garbenstraße 17, 70599 Stuttgart
RODEHUTSCORD, Prof. Dr. Markus	Institut für Ernährungs-wissenschaften Emil-Abderhalden-Straße 26, 06108 Halle
ROTH, Prof. Dr. Franz X.	Institut für Ernährungsphysiologie Weihenstephan, 85350 Freising
SAUERWEIN, Prof. Dr. Dr. habil. Helga	Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere Katzenburgweg 7-9, 53115 Bonn
SCHALLENBERGER, Prof. Dr. Edgar	Institut für Tierzucht und Tierhaltung Olshausenstraße 40, 24098 Kiel
SCHELLANDER, Prof. Dr. Karl	Institut für Tierzuchtwissenschaft Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
SCHLAPP, Dr. Tobias	Bayer AG / Tiergesundheit Mohnheim Alfred-Nobel-Straße 50, 51368 Leverkusen
SCHNEIDER, Prof. Dr. Dieter	Institut für Tierernährung Brümmerstraße 34, 14195 Berlin

SCHRAMM, Prokurist Rüdiger	An der Mühlenau 4, 25421 Pinneberg
SCHREIBER, Prof. Dr. Dr. h. c. Hans Ludwig	Universität Göttingen Wilhelmsplatz 1, 37027 Göttingen
SCHUH, Prof. Dr. Maximilian	II. Medizinische Universitäts-Klinik für Klautiere Veterinärplatz 1, A-1210 Wien
SCHUHMACHER, Frau Dr. Annette	Institut für Tierernährung, Ernährungsschäden und Diätetik Gustav-Kühn-Straße 8, 04159 Leipzig
SCHULTE-COERNE, MR Dr. Hermann	BML, Ref. 322, Postfach 14 02 70, 53107 Bonn
SCHWARZ, Prof. Dr. Frieder	Institut für Tierernährung Weihenstephan, 85350 Freising
SCHWERIN, Prof. Dr. Manfred	Institut für die Biologie landwirtschaftliche Nutztiere Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf
SEELAND Prof. Dr. Gerhard	nstitut für Nutztierwissenschaften Invalidenstr. 42, 10115 Berlin
SEILLER Marcel	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Kollaustraße 105 22453 Hamburg
SEILLER Olivier M.	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Kollaustraße 105, 22453 Hamburg
SEYFERT PD Dr. Hans-Martin	Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere 18196 Dummerstorf
SIMON Prof. Dr. Ortwin	Institut für Tierernährung Brümmerstraße 34, 14195 Berlin
SMIDT Prof. Dr. Dr. h. c. Dietrich	H. Wilhelm Schaumann Stiftung Pfennigsmoorweg 11, 30826 Garbsen OT Frielingen
STANGASSINGER, Prof. Dr. Manfred	Institut für Physiologie, Physiol. Chemie und Tierernährung Veterinärstraße 13, 80539 München
STEINHART, Prof. Dr. Dr. Hans	Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie Grindelallee 117, 20146 Hamburg

STÖVE-SCHIMMELPFENNIG, Prof. Dr. Kathrin	Fachhochschule Kiel Am Kamp 11, 24783 Osterrönfeld
STRANZINGER, Prof. Dr. Gerald	ETH, Tannenstraße 1, CH-8006 Zürich
TENHUMBERG, Dr. Heinrich	Rindergesundheitsdienst Senator-Gerauer-Straße 23, 85586 Grub
TEUBER, Prof. Dr. Michael	Institut für Lebensmittelwissenschaft Schmelzbergstraße 9, CH-8092 Zürich
THALLER, Dr. Georg	Lehrstuhl für Tierzucht Weihenstephan, 85350 Freising
TRAPPMANN, Prof. Dr. Wolfgang	Institut für Tierzuchtwissenschaft Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
VELKE, Frau Dr. Heike	Deutsche Forschungsgemeinschaft Kennedyallee 40, 53175 Bonn
WAGNER, Dr. Eugene	Administration des Services Techniques de l'Agriculture 16, Route d'Esch, L-1019 Luxemburg
WALLENBURG, Dr. Jobst	Versuchsgut Hülsenberg Wiesenweg 32, 23812 Wahlstedt
WABMUTH, Prof. Dr. Rudolf	Nelkenweg 73, 35396 Gießen
WIMMERS, Dr. Klaus	Institut für Tierzuchtwissenschaft Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
WINNACKER, Prof. Dr. Dr. h. c. Ernst-Ludwig	Präsident der Deutschen Forschungsgemeinschaft Kennedyallee 40, 53170 Bonn
WOLF, Prof. Dr. Eckhard	Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik Feodor-Lynen-Straße 25, 81377 München
WOLFFRAM, Prof. Dr. Siegfried	Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie Hermann-Rodewald-Straße 9, 24098 Kiel
WRENZYCKI, Frau Dr. Christine	Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee 31535 Neustadt