



Tiere als Arzneimittel- und Organlieferanten

Neue Perspektiven in der Biomedizin

Heiner Niemann (Neustadt-Mariensee)

Im Jahr 1985 wurde erstmals über die Geburt transgener Nutztiere berichtet. Seitdem hat es auf diesem Gebiet erhebliche Fortschritte gegeben. Transgene Nutztiere haben allerdings bislang weniger in der Landwirtschaft, als vielmehr in einem anderen Bereich Bedeutung erlangt: in der Biomedizin. Dies liegt unter anderem daran, daß bisher kaum Gene bekannt sind, die im engeren Sinne landwirtschaftlich relevante Merkmale ausprägen. Zudem werden tierzüchterisch interessante Merkmale häufig durch das Zusammenspiel mehrerer Gene beeinflusst. Im folgenden werden die gegenwärtigen methodischen Ansätze zur Erstellung transgener Tiere kurz skizziert und der Entwicklungsstand in zwei biomedizinisch relevanten Bereichen – der Produktion rekombinanter Proteine durch transgene Nutztiere und der Transplantation von Tierorganen auf den Menschen – näher erläutert.

ERSTELLUNG TRANSGENER TIERE

Aufgrund des langen Generationsintervalls (Tabelle 1) ist die Erstellung transgener Linien bei Nutztieren ein sehr langwieriges Unternehmen. Mit dem Gentransfer soll erreicht werden, ein Genkonstrukt in allen Körperzellen eines Tieres einschließlich der Keimzellen zu integrieren und zu exprimieren. Deshalb sind für den Gentransfer bisher fast ausschließlich frühe embryonale Entwicklungsstadien verwendet worden. Voraussetzung für einen erfolgreichen Gentransfer ist ein funktionsfähiges Genkonstrukt. Dafür muß ein Strukturgen, also das Gen, das für ein bestimmtes Protein kodiert, mit

einem geeigneten Regulationselement (Promotor) zusammengebracht werden. Man ist dabei nicht an Promotor-Elemente der gleichen Tierart gebunden.

Die Genkonstrukte sind bisher überwiegend in frisch befruchtete Eizellen (Zygoten) übertragen worden, und zwar zu einem Zeitpunkt, bei dem die Kerne des Spermiums und der Eizelle noch nicht miteinander verschmolzen sind, sondern sich als Vorkerne getrennt in der Zygote befinden. Das genetische Material wurde durch Mikroinjektion in einen der beiden Vorkerne eingebracht.

Die Eizelle hat einen Durchmesser von rund 150 µm; der männliche und weibliche Vorkern ist jeweils etwa 8-10 µm groß. Für die Gen-

übertragung wird eine geeignete Injektionsnadel unter mikroskopischer Kontrolle in einen Vorkern vorgeschoben und die DNA-Lösung mit

Tab. 1: Auswirkungen des Generationsintervalls auf die Erstellung transgener Tiere

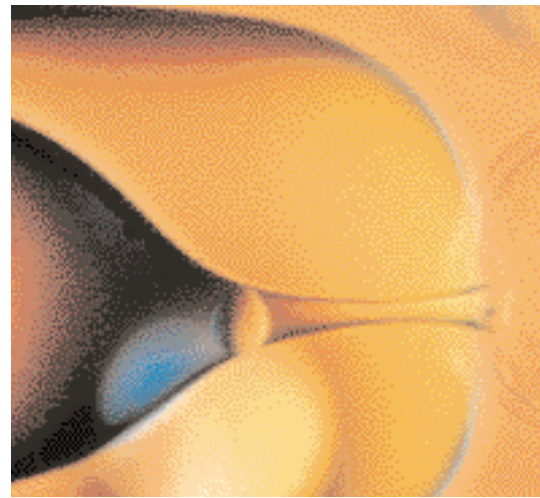
	Zeitpunkt nach Mikroinjektion (in Monaten)			
	Maus	Schaf	Schwein	Rind
Geschlechtsreife	<2	10	6	14
Geburt Foundertiere	<1	5	4	9
Geburt Nachkommen Foundertiere	3	20	10	32
Geburt von Homozygoten	5	35	20	55
Nachkommen von Homozygoten	7,5	50	30	78

etwa 3.000 bis 5.000 Kopien des jeweiligen Genkonstruktes mikroinjiziert (Abb. 1). In der nachfolgenden Verschmelzung der beiden Vorkerne wird das mütterliche und väterliche Erbgut neu kombiniert, so daß auch das Fremdgen in das Genom des Wirtes mit eingebaut werden kann.

Die Zygote befinden sich zu dem Zeitpunkt, an dem sie für die Mikroinjektion benötigt werden, noch im Eileiter und können über einen operativen Eingriff durch Spülung der Eileiter gewonnen werden. Beim Rind ist dies sehr aufwendig, deshalb werden dort überwiegend in vitro erzeugte Embryonalstadien verwendet. Die mikroinjizierten Eizellen werden dann nach einer kurzzeitigen in-vitro-Kultivierung, bei der injektionsbedingte Schädigungen

und die Expression des fremden Gens kann durch das umgebende Genom beeinflusst werden. Deshalb wird intensiv nach effizienteren Alternativen gesucht. Dazu müssen geeignete, in der in-vitro-Kultur handhabbare Zellen oder Zelllinien verfügbar sein. Diese scheinen inzwischen bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Form von fetalen Fibroblasten (Bindegewebszellen), möglicherweise auch Keimzell-Vorläuferzellen, vorhanden zu sein.

Erste Studien haben ergeben, daß sich diese Zellen relativ leicht genetisch verändern lassen und zudem die Integration und Funktionsfähigkeit des Transgens in vitro geprüft werden kann. Der Kern einer solchen transgenen Zelle wird in eine Empfänger-Eizelle, deren Chromosomen zuvor entfernt wurden, eingesetzt (Abb. 2). Auf diese Weise sind kürzlich erstmals transgene Schafe und Rinder geboren worden.



duktionswegen gesucht. Die Produktion biologisch aktiver pharmazeutischer Proteine mit Hilfe gentechnisch veränderter Bakterien oder Hefen ist jedoch meist nicht möglich, da diese Mikroorganismen nicht die Fähigkeit besitzen, die primären Genkonstrukte innerhalb der Zelle korrekt weiterzuverarbeiten. Proteine sind nämlich mehr als die bloße Aneinanderreihung von Aminosäuren, die durch das Gen kodiert werden. Für die biologische Wirksamkeit komplexer Proteine sind auch bestimmte Modifikationen, wie Glykosylierung, β -Hydroxilierungen oder Carboxylierungen, notwendig. Die hierfür benötigten Enzyme fehlen den Bakterienzellen oder Hefen häufig.

Transgene Nutztiere wie Rind, Schaf, Ziege, aber auch Schwein produzieren große Mengen Milchproteine, die leicht durch Melken zu gewinnen sind. Beispielsweise beträgt die Syntheserate der Milchdrüse für endogene Proteine zum Laktationshöhepunkt etwa 0,1 kg Protein/Tag beim Schaf und 1 kg/Tag beim Rind. Da diese enorme Syntheseleistung auch eine hohe Fremdgenexpression erwarten läßt, liegt die Idee nahe, die Milchdrüse als Bioreaktor zu verwenden. Die Milchdrüsenzellen transgener Nutztiere sind in der Lage, die erforderlichen Modifikationen an den Fremdproteinen durchzuführen, die für eine biologische Aktivität erforderlich sind.

DIE MILCHDRÜSE ALS BIOREAKTOR

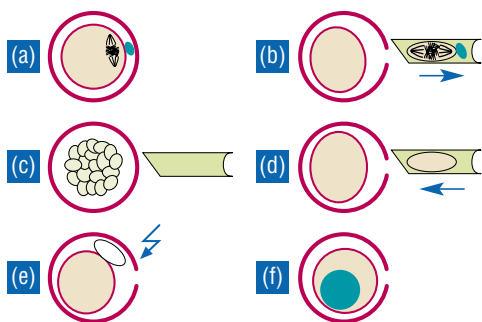
Für zahlreiche pharmazeutisch wirksame Proteine, insbesondere Blutgerinnungsfaktoren und andere Blutproteine, überschreitet der Bedarf bei weitem die heutigen Produktionsmöglichkeiten. Diese Stoffe werden überwiegend noch durch Fraktionierung menschlichen Blutes gewonnen. Trotz sorgfältigster Kontrollen besteht dabei das Risiko der Übertragung viraler Krankheitserreger, wie Hepatitis B oder HIV. Aufgrund der aufwendigen und teuren Reinigungsverfahren sind die benötigten Proteine zudem extrem teuer. Durch den Mangel an diesen Proteinen können Patienten statt der erforderlichen prophylaktischen Behandlung häufig nur sporadisch und therapeutisch behandelt werden, was erhebliche Beschwerden und Einbußen in der Lebensqualität verursacht.

Mit Hilfe der Gentechnologie wird weltweit nach alternativen Pro-

erkannt werden können, in die Eileiter synchronisierter, das heißt zyklusgleicher Empfängertiere übertragen.

Das gesamte Verfahren ist sehr aufwendig und nur wenig effizient, da durchschnittlich nur 1–4% der geborenen Nachkommen das Fremdgen integriert haben und damit als 'transgen' bezeichnet werden können. Zudem erfolgt die Integration zufällig in das Wirtsgenom,

Abb. 2: Schematische Darstellung des Kerntransfers mit embryonalen Zellen (Oozyte = weibl. Keimzelle)



- (a) Metaphase II-Oozyte
- (b) Metaphase II-Oozyte nach Entfernung der Chromosomen
- (c) Spenderembryo mit 16 Blastomeren
- (d) Entkernte Empfängeroozyte vor Transfer der Blastomere
- (e) Oozyte und Blastomere nach Transfer
- (f) Aufnahme der Blastomere im Ooplasm nach Elektrofusion und Kernschwellung als Zeichen der Reprogrammierung

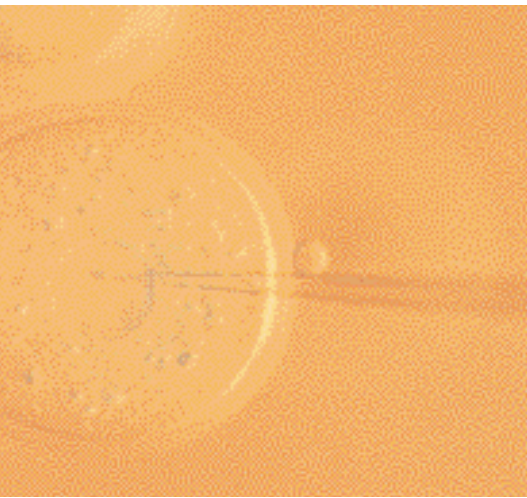


Abb. 1: Mikroinjektion in den Vorkern einer Schafzygote bei 320facher mikroskopischer Vergrößerung.

Allerdings ist der finanzielle Aufwand, um ein exprimierendes Tier zu erstellen, aufgrund der geringen Effizienz des Gentransfers über Mikroinjektion noch sehr hoch. Da die Genkonstrukte aber nach den Mendelschen Regeln weitervererbt werden, stehen nach einem entsprechenden Zeitraum homozygote, also reinerbige Individuen zur Verfügung. Nachdem eine solche transgene Linie erst einmal etabliert ist, sind die Haltungskosten für die Tiere gering, auch

im Verhältnis zu anderen Produktionssystemen. Die Proteine müssen aus der Milch gewonnen, aufgereinigt und als pharmazeutisch wirksame Substanzen aufbereitet werden.

Inzwischen sind mehrere Proteine in der Milchdrüse transgener Tiere teilweise in beachtlichen Konzentrationen produziert worden (Tabelle 2). Prominentestes Beispiel ist sicherlich die Produktion von α -Anti-Trypsin in der Milchdrüse des transgenen Schafes „Tracy“ (Abb. 3). α -Anti-Trypsin ist der Hauptgegensepieler des Enzyms Elastase, das den Abbau während des kontinuierlichen Ab- und Neuaufbaus des Gewebes steuert. Ein genetisch bedingter Mangel oder vollständiges Fehlen von α -Anti-Trypsin führt zu gesteigertem Gewebeabbau, der besonders in der Lunge manifest wird. Von diesem genetischen Defekt sind in Europa und Amerika etwa 100.000 Menschen betroffen. Die benötigten Mengen an α -Anti-Trypsin können durch Isolierung aus menschlichem Blutplasma nicht gewonnen werden.

Bei dem Schaf „Tracy“ lag die Expressionshöhe in der Milch bis zu 63 g pro Liter, bei durchschnittlich 35 g pro Liter während der gesamten Laktation. Das aus der Milch aufgereinigte Protein war vollständig

und korrekt glykosiliert und besaß eine nahezu identische biologische Aktivität wie das humane α -Anti-Trypsin-Präparat.

Inzwischen sind neben dem α -Anti-Trypsin auch der Tissue Plasminogen Activator (TPA), eine Substanz, die hochwirksam Blutgerinnsel aufzulösen vermag, und Antithrombin III, eine gerinnungshem-



mende Substanz, in der Milchdrüse transgener Schafe und Ziegen produziert und aufgereinigt worden. Diese drei Substanzen befinden sich bereits im fortgeschrittenen Stadium der klinischen Prüfung. Bei deren positiven Ausgang wird damit gerechnet, daß sie im Jahre 2001 bis 2002 auf den Markt kommen. Dies sind dann die ersten pharmazeutischen Proteine, die aus der Milchdrüse transgener Tiere für therapeutische Zwecke bereitgestellt werden

Die Milchdrüse als Bioreaktor: Aus der Milch transgener Kühe, Schafe und Ziegen sollen pharmazeutisch wirksame Proteine gewonnen werden.

Tab. 2: Transgene landwirtschaftliche Nutztiere mit milchdrüsenpezifischer Expression pharmazeutischer Proteine

Tierart	Genkonstrukt	Mikroinjizierte übertragene Eizellen	Nachkommen Anzahl/(%)*	Transgene Nachkommen/Exp.*	Expressionshöhe (pro ml)	Autoren
Schaf	β -lac-hFIX	307	57 (18,6)	4/2	25 ng	Simons et. al. (1988); Clark et al. (1989)
Schaf	β -lac-h α AT	439	113 (25,7)	5/4	35 mg (bis 63 mg)	Wright et al. (1991)
Schaf	β -lac-hFVIII-MT-I	277	103 (37,2)	6/3	5 – 10 ng	Niemann et al. (1996, 1997)
Schaf	MAR β -lac-hFVIII-MT-I	255	94 (36,9)	4/1	mRNA	Niemann et al. (1996)
Ziege	mWAP-LA-tPA	203	29 (14,3)	2/1	2 – 3 mg	Ebert et al. (1991)
Schwein	mWAP-hPrC	320	26 (8,2)	7	1 mg	Velander et al. (1992)
Rind	β -cas-hLF	129	19 (14,7)	2/1	~ 30 mg	Lee and de Boer (1994); Krimpenfort et al. (1991)
Rind	β -cas-hERY	859	1 (0,1)	1/0	–	Hyttinen et al. (1994)

β -lac = β -Lactoglobulin
 MAR = Matrix Attachment Regions
 β -cas = boviner Caseinpromotor
 mWAP = muriner saurer Molkenproteinpromotor
 FIX = humaner Blutgerinnungsfaktor IX
 h α AT = humanes α -Anti-Trypsin
 hFVIII = humaner Blutgerinnungsfaktor VIII
 LA-tPA = Gewebe Plasminogen-Aktivator
 hPrC = humanes Protein C
 hLF = humanes Laktotferin
 hERY = humanes Erythropoetin
 MT-I = Murines Metallothionein I

* Die Angaben sind folgendermaßen zu verstehen: Aus 307 übertragenen Eizellen (im Fall der transgenen Schafe mit β -lac-hFIX-Genkonstrukt) sind 57 Nachkommen (= 18,6 %) hervorgegangen, davon waren 4 Tiere transgen, von diesen exprimierten 2 das entsprechende Protein.

können. Angesichts dieser äußerst komplexen und schwierigen Technologie ist die kurze Entwicklungszeit von annähernd 20 Jahren besonders bemerkenswert. Diese Arbeiten sind im wesentlichen durch zwei Biotechnologie-Firmen, Genzyme Transgenics in den USA und Pharmaceutical Proteins Ltd. (PPL) in Schottland, durchgeführt worden.

In eigenen Forschungsarbeiten am FAL-Institut für Tierzucht und Tierverhalten ist in engster Kooperation mit der Arbeitsgruppe Zellbiologie des Fraunhofer Instituts in Hannover der menschliche Blutgerinnungsfaktor VIII in der Milchdrüse transgener Schafe exprimiert worden. Genetisch bedingter Mangel oder vollständiges Fehlen von Faktor VIII hat das klinische Bild der Hämophilie A zur Folge. Dabei handelt es sich um die am weitesten verbreitete genetisch bedingte Blutgerinnungsstörung beim Menschen („Bluterkrankheit“). Zur Behandlung werden überwiegend Plasmapräparate eingesetzt, die vielfach mit pathogenen Viren kontaminiert und zudem mengenmäßig völlig unzureichend verfügbar sind.

Das Faktor VIII-Gen ist ein besonders großes und extrem komplex reguliertes Gen, was eine effiziente Expression in der Milchdrüse transgener Tiere besonders schwierig macht. In den bisherigen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß Faktor VIII-Foundertiere lebensfähig sind und die Genkonstrukte von transgenen Tieren weitervererbt werden, daß das Genkonstrukt in der Milchdrüse korrekt prozessiert wird und biologische Wirksamkeit entfaltet. In zukünftigen Forschungsarbeiten soll die Expressionshöhe durch neuartige Genkonstrukte erhöht werden. Berechnungen haben ergeben, daß bereits 20–25 Schafe den gesamten Jahresbedarf der USA an Faktor VIII (ca. 120 g) decken könnten, und zwar unter der Voraussetzung einer Expressionshöhe von 0,01 g/ltr. und einer Ausbeute von nur 10% des Proteins.

XENOTRANSPANTATION

Viele Menschen verdanken ihr Leben der Übertragung eines geeigneten Organs. In solchen Fällen existierte keine alternative Behandlungsmöglichkeit, und der Empfänger wäre ohne die Organtransplantation gestorben. Die großen medizinisch-technischen Fortschritte bei der Organtransplantation, die heute das Überleben vieler Kranker gewährleisten, haben jedoch weltweit zu einem akuten Mangel an Spenderorganen geführt. Während die Nachfrage nach transplantierbaren Organen jährlich um circa 15% steigt, ist die Bereitschaft zur Organspende in etwa gleich geblieben oder sogar gesunken. Schätzungen in den USA haben ergeben, daß für 45.000 Menschen, jünger als 65 Jahre, eine Herztransplantation notwendig ist, aber nur 2.000 menschliche Herzen pro Jahr zur Verfügung stehen. Deshalb sterben heute in jedem Jahr viele tausend Patienten, die bei Verfügbarkeit geeigneter Organe überleben könnten.

Um diese immer größer werdende Lücke zwischen Nachfrage und Verfügbarkeit geeigneter Organe schließen zu können, wird heute die Xenotransplantation – das heißt Übertragung von Organen zwischen nichtverwandten Arten, zum Beispiel von Tieren auf den Menschen – als beste Lösung angesehen. Dabei ist das Schwein offenbar besonders geeignet, da dessen Organe in etwa die gleiche Größe und eine ähnliche Physiologie und Anatomie wie die des Menschen besitzen. Charakteristisch für das Schwein sind außerdem kurze Reproduktionszyklen und große Nachkommenszahlen sowie schnelles Wachstum. Darüber hinaus sind die Haltungskosten auch unter hygienisch hohem Standard relativ niedrig.

Die wesentliche immunologische Hürde, die überwunden werden muß, ist die hyperakute Abstoßung,



Abb. 3: Das transgene Schaf „Tracy“ mit Nachkommen im schottischen Roslin-Institut (Foto: Ges. für Biotechnische Forschung)

die innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Übertragung eines Xenotransplantats eintritt. Im Falle der Übertragung von Organen des Schweins auf den Menschen reagieren die menschlichen Antikörper auf Antigene auf der Oberfläche des Fremdorgans. Diese Antikörper aktivieren das Komplementsystem, eines der Hauptabwehrsysteme im Blut des Empfängers, und die Antikörper-Komplementkomplexe zerstören die Gefäßinnenauskleidung des Fremdorgans und damit letztlich das Organ selbst.

Dementsprechend zielt die Strategie, Schweine genetisch zu verändern, im wesentlichen darauf ab, diese hyperakute Abstoßungsreaktion zu überwinden. Dies kann durch Synthese humaner Komplementregulatoren im Schwein offenbar erreicht werden. Nach Transplantation in den Empfänger würde das Schweineorgan diese Regulatoren produzieren und damit die Komplementattacke des Empfängers ausschalten. Inzwischen sind transgene Schweine erstellt worden, die humane Komplementregulatoren exprimieren und deren Herzen in Primaten übertragen worden sind. Die durchschnittliche Überlebensrate betrug 30–60 Tage, während die

nichttransgenen Kontrollen bereits innerhalb weniger Minuten zerstört wurden. Empfängerprimaten mußten allerdings mit immun-suppressiven Medikamenten behandelt werden, um die akute Abstoßungsreaktion, die auch bei der Transplantation menschlicher Organe auftritt, zu beherrschen.

Eine andere Strategie für eine erfolgreiche Xenotransplantation könnte die Ausschaltung der auf der Oberfläche der Schweineorgane befindlichen antigenen Strukturen betreffen. Diese sind als 1,3 β -Gal-Epitope bekannt. Da jedoch bei Nutztieren – anders als bei der Maus – noch keine effektiven Verfahren zum Knock-out (= Ausschaltung) von Genen bekannt sind, wird versucht, die Enzyme, die für die Bildung dieser Epitope verantwortlich sind, kompetitiv durch Überproduktion eines anderen Enzyms zu unterdrücken.

UMSETZUNG IN DIE PRAXIS

Am weitesten ist die Entwicklung der Xenotransplantation bisher bei der Firma Imutran, einer Tochter der schweizer Firma Novartis, gediehen. Sie besitzt bereits umfangreiche Erfahrungen mit der Übertragung von Herzen aus transgenen Schweinen in Primaten. Allerdings sind die beantragten klinischen Tests zunächst zurückgestellt worden, um weitere Erkenntnisse zur potentiellen Übertragung von Krankheitserregern zu gewinnen.

In den USA werden zur Zeit Experimente durchgeführt, in denen das Blut von leberkranken Patienten durch eine außerhalb des Körpers befindliche Schweineleber geführt wird. Dies stellt eine Überbrückungsmaßnahme dar, bis ein geeignetes humanes Organ beschafft werden kann.

Wesentlich für eine erfolgreiche Anwendung der Xenotransplantation wird die Klärung der Frage sein,

inwieweit endogene Retroviren vom Xenotransplantat auf den Menschen übergehen können. Es wird heute davon ausgegangen, daß durch entsprechend hohe hygienische Standards und prophylaktische Behandlungen das Risiko einer Übertragung anderer Erreger weitgehend ausgeschaltet werden kann. Daneben wird auch bedeutsam sein, inwieweit die Fremdorgane im Empfänger ihre Aufgaben hinreichend erfüllen. In einem größeren Kooperationsprojekt mit mehreren Arbeitsgruppen, unter anderem auch an der Medizinischen Hochschule Hannover, werden in eigenen Forschungsarbeiten transgene Schweine erstellt, die für Xenotransplantations-Forschungsarbeiten verwendet werden können (Abb. 4). Erste Ergebnisse zeigen, daß die eingesetzten Transgene an die Nachkommen weitergegeben und auch exprimiert werden.

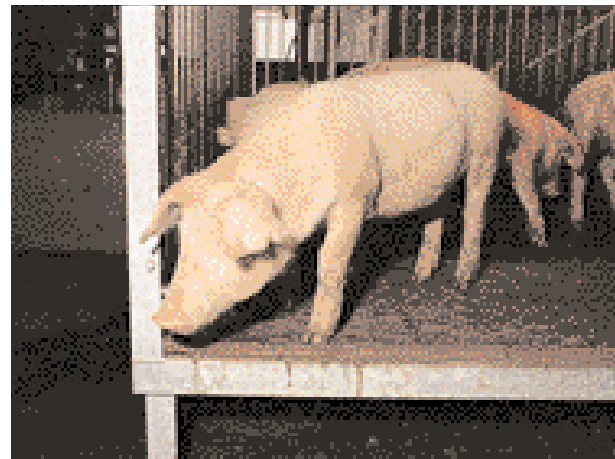
Prognosen besagen, daß die Xenotransplantation im Verlaufe der nächsten 8–10 Jahre klinisch einsetzbar sein wird, wobei vor allem Herz, Lunge und auch Niere verwendet werden können. Bei der Leber erscheint dies hingegen – wesentlich bedingt durch die umfangreiche Syntheseleistung biologisch wirksamer Substanzen – fraglich. Mit der Verfügbarkeit geeigneter Xenotransplantate könnten viele der bedrückenden Probleme, die durch den Mangel an geeigneten Organen auftreten, gemildert werden. Dies ist auch angesichts der Tatsache bedeutsam, daß alternative Verfahren, wie künstliche Organe und Zelllinien, offenbar in absehbarer Zeit nicht zur Verfügung stehen werden.

SCHLUSFOLGERUNGEN

Transgene Nutztiere bieten beachtliche Perspektiven zur Lösung dringender Fragen in der Humanmedizin. Die Entwicklung auf diesem Sektor ist erheblich weiter als

auf dem landwirtschaftlichen Anwendungssektor für transgene Nutztiere. Es ist davon auszugehen, daß Produkte bzw. Organe transgener Tiere innerhalb der nächsten 10 Jahre einen wichtigen Bestandteil neuzeitlicher Therapieformen ausmachen werden und zu beträchtlichen Verbesserungen in der medizinischen Versorgung bei zahlreichen Patientengruppen beitragen werden.

Jüngste Forschungsergebnisse, in denen erstmals transgene Tiere über die Verwendung transfizierter Zellen und Kerntransfer erstellt wurden, lassen vermuten, daß die Effizienz des



Gentransfers sowohl qualitativ als auch quantitativ in absehbarer Zukunft erheblich verbessert werden wird. Dies wird auch die Entwicklung von Anwendungsmodellen für transgene Nutztiere mit Merkmalen im engeren landwirtschaftlichen Sinne möglich machen, zumal die Kenntnisse über Gene und deren Funktionen auch in diesem Bereich stark im Zunehmen begriffen sind.

Aufgrund dieser vielversprechenden Perspektiven sollte diese Technologie deshalb intensiv weiterverfolgt und verbessert werden. ■

Prof. Dr. Dr. habil. Heiner Niemann, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee, 31535 Neustadt a. Rbg.

Abb. 4:
Transgene Schweine im FAL-Institut in Mariensee. Mit den Tieren werden Möglichkeiten der Xenotransplantation erforscht.