

**Aus dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten  
Mariensee**

**Heinrich Niemann**

**Bio- und Gentechnologie in der Milchproduktion :  
Projektionen für das Jahr 2025**

Manuskript, zu finden in [www.fal.de](http://www.fal.de)

Published in: Landbauforschung Völkenrode Sonderheft 242,  
pp. 25-35

**Braunschweig  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)  
2002**

## Bio- und Gentechnologie in der Milchproduktion: Projektionen für das Jahr 2025

Heiner Niemann\*

### 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 Eignungen. 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 Potenzial wertvoller Vätertiere wirksam in einer Population verbreitet werden. Aus einem Bullenejakulat lassen sich durchschnittlich etwa 200 bis 300 tiefgefriertaugliche Besamungsportionen herstellen; beim Eber sind es nur 10 bis 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 Potenzial weiblicher Zuchttiere besser ausgenutzt werden. Die bisherige züchterische Arbeit mit dem Einsatz von künstlicher Besamung und Embryotransfer oder anderen biotechnologischen Verfahren hat zu den bekannten beachtlichen Leistungssteigerungen bei unseren Nutztieren geführt. So ist bei der Kuh die Milchleistung um jährlich 4 % gestiegen. Drei wesentliche Nachteile sind jedoch zu berücksichtigen (Wheeler and Campion, 1993):

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

Mit den in der Entwicklung begriffenen neuen biotechnologischen Verfahren werden diese Begrenzungen der bisherigen züchterischen Arbeit zu überwinden sein. 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. Klonen (Embryosplitting und Kerntransfer)
8. Geschlechtsbestimmung (Sexing)

Auf molekularbiologischer Seite sind zu nennen:

1. Genomanalyse
  - Sequenzierung
  - Genkartierung
  - Einzelgenanalyse
  - Polymorphismen
2. molekulare Diagnostik
  - genetische Defekte (MHS, BLAD, etc.)
  - genetische Abstammung
  - genetische Diversität
  - Geschlechtsbestimmung bei Embryonen
3. funktionelle Genomik
  - Expressionsmuster
  - Gen-Interaktionen
4. transgene (Mikroinjektion, Transfektion, homologe Rekombination)
  - Additiv (Knock-in)
  - Knock-out

Die Biotechnologie bei landwirtschaftlichen Nutztieren weist einen ausgeprägten interdisziplinären Charakter auf, indem sie u. a. Elemente der Anatomie, der Gynäkologie und Geburtshilfe,

---

\* Prof. Dr. Heiner Niemann, Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Tierzucht und Tiervershalten (FAL) Mariensee, 31535 Neustadt, Germany.

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 Entwicklungsstand und Anwendungsperspektiven einiger biotechnologischer Verfahren näher erläutert und im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit in der Milchviehhaltung im Jahre 2025 betrachtet.

## 2 Embryotransfer

Der Begriff „Embryotransfer“ umfasst bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren die folgende Sequenz von Vorgängen:

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

Die Superovulation mit eCG 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 (Armstrong, 1993). Es wurde eine Vielzahl von Einflussfaktoren identifiziert; besonders bedeutsam scheint die An- oder Abwesenheit eines dominanten Follikels (d. h. Follikelgröße > 10 mm) zu sein. Die Auslösung einer Superovulation in Abwesenheit eines solchen dominanten Follikels führt zu erheblich besseren Ergebnissen als bei dessen Anwesenheit. Der große Follikel kann mit Hilfe der Ultraschall-geleiteten Punktion sicher erkannt und entfernt werden (Bungartz und Niemann, 1994).

Gewinnung und Transfer von Embryonen erfolgen beim Rind heute unblutig mit Hilfe spezieller Katheter, die unter rektaler Kontrolle bis in die Gebärmutterhornspitze vorgeschoben werden. Bei optimalem Transferverlauf kann 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

etwa 2,5 bis 3 Kälber erzeugt werden (Niemann und Meinecke, 1993).

Der Embryotransfer ist beim Rind heute in die züchterische Praxis fest integriert und weltweit sind im Jahr 2000 ca. 530.000 Embryonen übertragen worden, davon etwa die Hälfte nach Tiefgefrieren und Auftauen. Der Schwerpunkt der Anwendung liegt in Nordamerika (45 %) und Europa (27 %). Innerhalb von Europa werden in Frankreich, den Niederlanden und Deutschland die meisten Embryotransfers durchgeführt (Thibier, 2001). Der Embryotransfer wird heute bei den besten weiblichen Tieren einer Population eingesetzt. Die Mehrheit der Besamungsbullen ist über Embryotransferverfahren generiert worden. Die Vorteile des Embryotransfers liegen in der verbesserten Ausnutzung des weiblichen Keimzellpotenzials, 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 in der Möglichkeit der Genkonservierung und der Forschung an Oozyten und Embryonen. Der Embryotransfer ist dementsprechend eine Basistechnologie für viele der anderen Biotechnologien (Niemann und Meinecke, 1993).

## 3 Kryokonservierung von Oozyten und Embryonen

Durch intensive Forschungsarbeiten sind heute verschiedene methodische Ansätze zum Gefrieren für die Langzeitkonservierung von Embryonen, insbesondere beim Rind, verfügbar, die auch in der Praxis eingesetzt werden. Rinderembryonen können mit kontrollierten Tiefgefrierverfahren oder durch Vitrifikation erfolgreich kryokonserviert werden (Niemann, 1991). Letzteres beinhaltet eine kurzzeitige Äquilibration in hohen Konzentrationen an penetrierenden und nicht penetrierenden Gefrierschutzmitteln (3 bis 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 sehr schnell aufgetaut werden, beispielsweise durch Überführung in warmes Wasser oder in Luft.

Ein gebräuchliches kontrolliertes Gefrier- und Auftauverfahren beinhaltet die Zugabe des Gefrierschutzmittels, das Verpacken der Embryonen in Gefrierbehälter (feine Palletten), deren Überführung in eine Gefriermaschine (meistens ein Alkoholbad), die Auslösung der Kristallisation (= Seeding), gefolgt von einer langsamen Kühlungsphase mit 0,3°/Min. bis -30 bis -40° C, der 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 bis 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 ausverdünnt wird (Voelkel und Hu, 1992). 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 (Niemann, 1991). Nach

Vitrifikation liegen die Überlebensraten noch etwa 10 bis 15 % niedriger. Interessanterweise scheinen sich insbesondere *in vitro* produzierte Rinderembryonen mit diesem Verfahren besser einfrieren zu lassen als mit dem kontrollierten Gefrierverfahren (Sommerfeld und Niemann, 1999). Weibliche Keimzellen (Oozyten) lassen sich heute noch bei keiner landwirtschaftlichen Nutztierspezies mit ausreichend hohen Erfolgsquoten einfrieren (Niemann, 1995).

#### 4 In-vitro-Produktion von Embryonen

Die In-vitro-Produktion (IVP) von Embryonen beinhaltet die In-vitro-Reifung, Befruchtung und Kultivierung bis zu transfertauglichen Entwicklungsstadien (Lucas-Hahn und Eckert, 1996). Dieses Verfahren ist insbesondere beim Rind sehr weit entwickelt und findet bereits Anwendung in der Praxis. Im Jahr 2000 wurden ca. 42.000 Übertragungen mit *in vitro* produzierten Rinderembryonen unter Feldbedingungen registriert (Thibier, 2001). Die Oozyten können entweder aus Schlachthofovarien oder durch ultraschallgeleitete Follikelpunktion (OPU; Abbildung 1) sogar wiederholt von individuellen Spendertieren gewonnen werden (Bungartz et al., 1995).

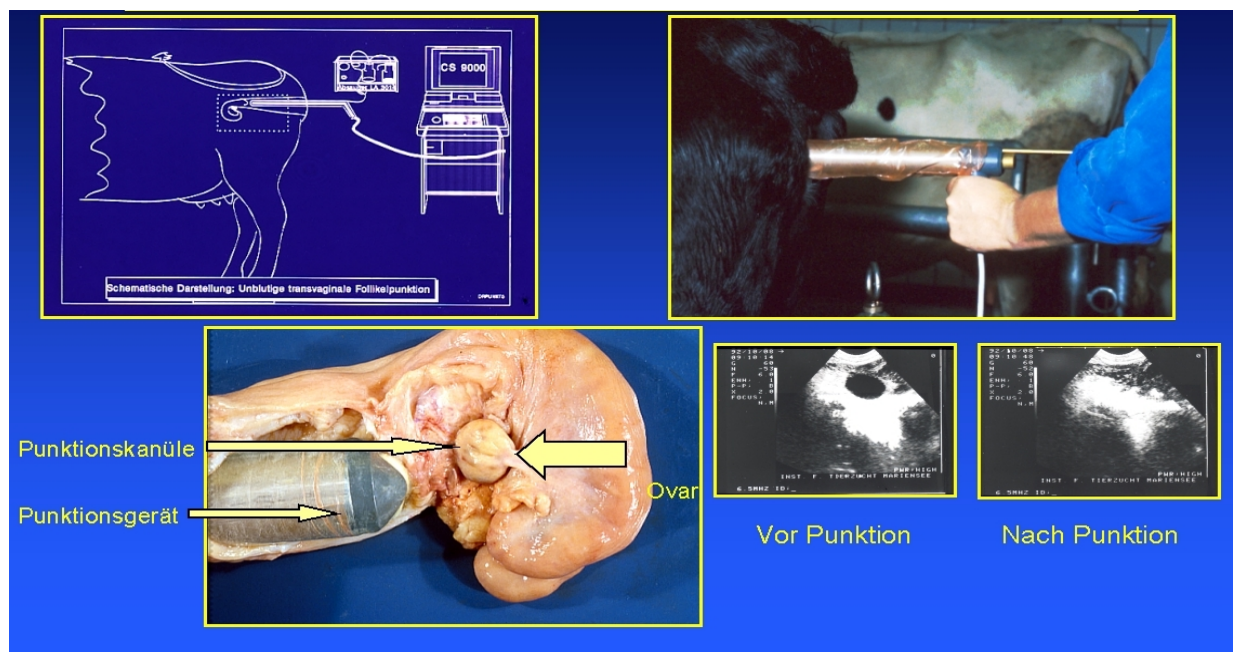


Abbildung 1  
Durchführung der transvaginalen Follikelpunktion beim Rind

Bedingt durch das kontinuierlich stattfindende Follikelwachstum sind zu jedem Zeitpunkt Follikel in ausreichender Größe ( $> 2$  mm) zur Punktion vorhanden. Für das OPU wird 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 Follikelflüssigkeit mit der Oocyte abgesaugt. Die Oozyten werden anschließend morphologisch beurteilt und intakt eingestufte Oozyten zur In-vitro-Reifung gegeben. 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 (allerdings mit noch 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. In einem konventionellen Embryotransferprogramm können bei

sechs Spülungen im Jahr etwa 21 bis 25 Embryonen gewonnen werden, mit denen 10 bis 15 Trächtigkeiten etabliert werden können. Bei OPU/IVP können bei zweimal wöchentlichem Einsatz unter Zugrundelegung von 100 OPU-Einsätzen schließlich etwa 60 transfertaugliche Embryonen in vitro produziert werden, mit denen 30 bis 35 Trächtigkeiten zu erreichen sind.

Aus Follikeln mit einem Durchmesser  $> 2$  mm können entwicklungsfähige Oozyten isoliert und in vitro erfolgreich maturiert werden (Pavlok et al., 1992). 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-Komplexe bezeichnet (COK). Die COK werden dann unter geeigneten Kulturbedingungen für ca. 24 Stunden bis zur Befruchtungsreife kultiviert, danach erfolgt für 15 bis 18 Stunden eine Koinkubation mit kapazitierten Spermien, bevor wiederum unter geeigneten Kulturbedingungen die Weiterentwicklung bis zur Blastozyste erfolgen kann (Abbildung 2).

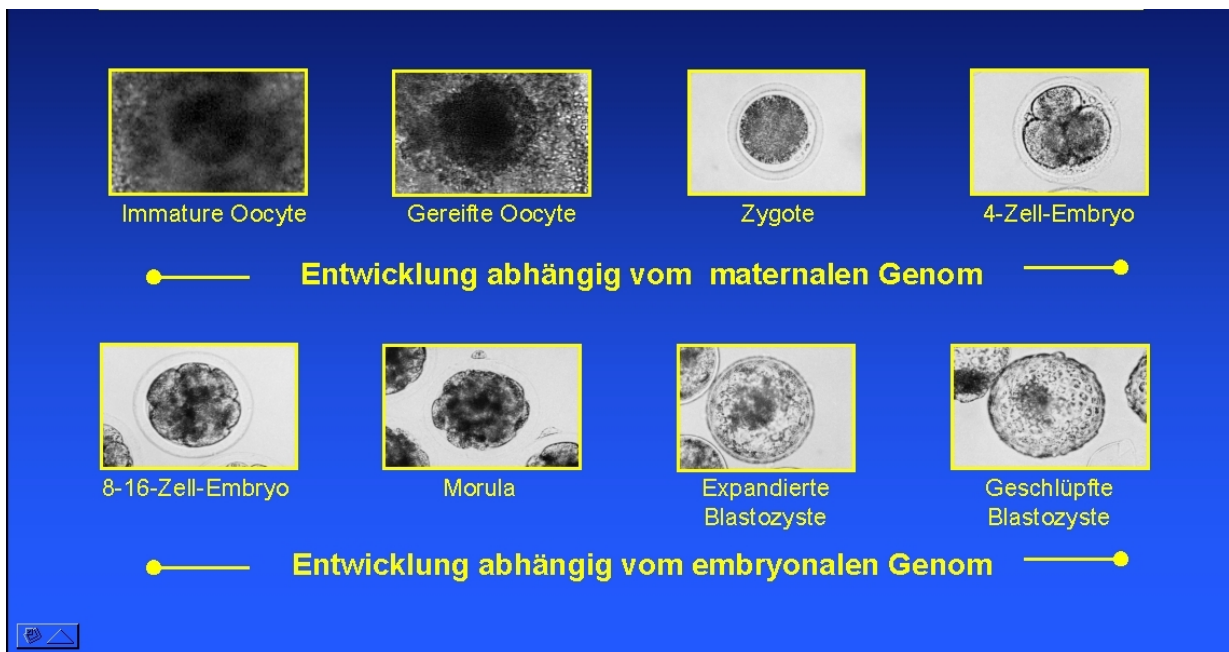


Abbildung 2  
Oocytenreifung und embryonale Frühentwicklung beim Rind

Die morphologische Qualitätsbeurteilung der Oozyten anhand von Dichte und Anzahl der Cumuluszellen liefert ausreichend sichere Aussagen zum Entwicklungspotential der Oozyten, was durch Kultivierung in Gruppen noch verbessert werden kann (Khurana und Niemann, 2000). 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 abgeschlossen werden. 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 im Wesentlichen um biochemische Veränderungen handelt, stellt die Akrosomenreaktion eine umfangreiche morphologische Umstrukturierung des Spermienkopfes dar. Durch Zugabe des Glykosaminoglykans 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 (Abbildung 2). Die Gesamtphase kann 8 bis 12 Tage dauern. Die durchschnittlichen Erfolgsquoten liegen bei über 90 % für die *In-vitro*-Reifung, 70 bis 85 % für die *In-vitro*-Befruchtung und 30 bis 40 % für die Entwicklung bis zur Blastozyste. Die *in vitro* produzierten Embryonen können in etwa 40 bis 60 % der Fälle zur Trächtigkeit führen (Trounson et al., 1994; Bavister, 1995; Lucas-Hahn und Eckert, 1996).

Zwischen *in vivo* und *in vitro* erzeugten Embryonen bestehen erhebliche Unterschiede bei vielen Eigenschaften. *In vitro* produzierte Embryonen können sich von den entsprechenden *in vivo* generierten Rinderembryonen in Bezug auf Morphologie (Farbe, Zellzahl, Zellgröße), zeitlichen Ablauf der Entwicklung (schneller oder langsamer), Empfindlichkeit gegenüber Kühlung oder Gefrieren, Stabilität der Zona pellucida oder Eigenschaften des embryonalen Metabolismus unterscheiden (Niemann und Wrenzycki, 2000). 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 kann Symptome des „Large Calf Syndroms“ zeigen. 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 (Niemann und Wrenzycki, 2000; Niemann et al., 2002).

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 der Spermien an die jeweiligen Kulturbedingungen erforderlich (Kreysing et al., 1997). 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 Milchviehrassen, sowie bei Verwendung geschlechtsgetrennter Spermien die gezielte Erstellung männlicher oder weiblicher Nachkommen. Auch für die Erhaltung bedrohter Wild- und Nutztierarten kann die *In-vitro*-Produktion erfolgreich eingesetzt werden, was am Beispiel des Moufflons gezeigt wurde (Ptak et al., 2002).

## 5 Erstellung genetisch identischer Nachkommen (Klonen)

### 5.1 Mikrochirurgische Embryonenteilung

Durch mikrochirurgische Teilung von Embryonalstadien können identische (= monozygote) 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 weiter entwickeln können (Brem, 1986; Williams et al., 1984). Dazu werden die Embryonen mit Hilfe eines geeigneten Mikromessers, einer Glasnadel oder eines anderen Schneidegerätes unter 100- bis 200-facher mikroskopischer Vergrößerung 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 (Reichelt und Niemann, 1994; Abbildung 3). Beim Rind ist das Verfahren besonders effektiv; aus der Teilung von 50 Embryonen können 100 Hälften entstehen, die nach Transfer wiederum 50 bis 55 Trächtigkeiten ergeben können. Darunter kann ein Anteil von 25 bis 35 % monozygoter Zwillinge sein (Saito und Niemann, 1993). 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 Mäusen nur bei 1 bis 2 % liegt (Reichelt und Niemann, 1994). 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.

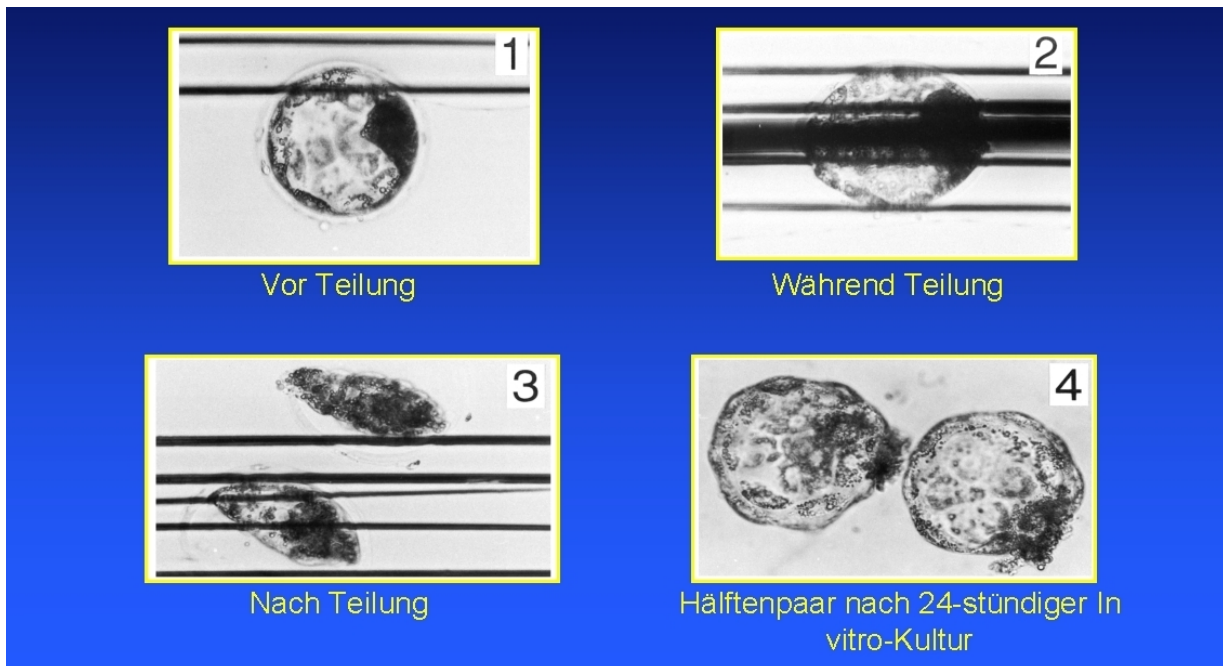


Abbildung 3  
Mikrochirurgische Teilung einer Blastozyste

## 5.2 Kerntransfer

Größere Anzahlen identischer Nachkommen können nur mit Hilfe des somatischen Kerntransfers 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 (Willadsen et al., 1986; Prather and First, 1990). 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 bis 30 % der geborenen Kälber verlängerte Trächtigkeiten, verbunden mit einer Übergröße der Nachkommen („Large calf syndrome“) auftreten können, was zu erheblichen Geburtskomplikationen führen kann (Bondioli et al., 1990; Willadsen et al., 1991).

Der erfolgreiche Kerntransfer unter Verwendung somatischer Spenderzellen wurde erstmals 1997 berichtet (Schaf „Dolly“; Campbell et al.,

1996; Wilmut et al., 1997). Bis heute ist eine Vielzahl somatischer Zellen (z. B. Fibroblasten, Haut-, Muskel-, Cumulus-, Granulosazellen, Leukozyten, Leberzellen, Sertolizellen, Euterepithelzellen) als Spenderzellen eingesetzt worden (Brem und Kühholzer, 2002). Durch Serumentzug oder chemische Zellzyklusregulatoren kann der Anteil an Spenderzellen im am besten geeigneten Zellzyklusstadium ( $G_1/G_0$ ) signifikant gesteigert werden (Kues et al., 2000). Nur die gereifte Metaphase-II-Oozyte bietet nach derzeitigem Erkenntnisstand die geeignete Umgebung zur Rückprogrammierung differenzierter somatischer Zellen. Besondere Bedeutung haben Fibroblasten als Spenderzellen erlangt, die über längere Zeiträume in der In-vitro-Kultur 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 (Cibelli et al., 1998b; Schnieke et al., 1997). Ein funktionelles Kerntransferverfahren erlaubt die Erstellung größerer Gruppen identischer Nachkommen für spezifische Produktionszwecke (Kato et al., 1999). Aufgrund der noch geringen Effizienz scheint es aber zur Zeit vor allem für den Einsatz zur Verbesserung des Gentransfers besonders geeignet. Weitere, biomedizinisch interessante An-

wendungsmöglichkeiten könnten im Tissue Engineering (Gewebeersatz aus somatischen Zellen) und in der Xenotransplantation liegen (Di Bernardino, 2001). Auch die Erhaltung bedrohter Wild- und Nutztierarten ist mit Hilfe des Kerntransfers möglich (Loi et al., 2001).

## 6 Transgene Nutztiere

Das Säugergenom besteht aus etwa 3 Mrd. Basenpaaren, die ca. 100.000 bis 140.000 Gene beinhalten. Beim Menschen ist das gesamte Genom kürzlich vollständig sequenziert worden. Bei einer Reihe von Organismen (Bakterien, Hefe, Würmern, Drosophila, etc.) mit kleinerem Genom ist dies ebenfalls gelungen; kürzlich ist auch das Mausgenom vollständig sequenziert worden. Im Gegensatz dazu ist bei Nutztieren nur von wenigen Genen (< 1000) Sequenz und Lokalisation bekannt. Da zwischen dem Genom von Säugern, aber auch von anderen Organismen, teilweise ausgedehnte Homologien bestehen, wird die Identifizierung neuer 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 (Espanion und Niemann, 1996). 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 'Gen-expression' bezeichnet, die sowohl auf mRNA- als auch auf der Proteinebene bestimmt werden kann. Die Erstellung transgener Nutztiere ist bis vor kurzem ausschließlich über Mikroinjektion in den Vorkern von Zygoten möglich gewesen (Pursel und Rexroad, 1993; Espanion und Niemann, 1996). Dabei werden ca. 2pl ( $10^{-12}$ l) DNA-Lösung mit etwa 3.000 bis 5.000 Kopien in einen Vorkern mikroinjiziert. Die Zygoten werden aus den Eileitern kurz nach der Befruchtung gewonnen, wobei die

beiden Vorkerne noch voneinander getrennt sind. Im nachfolgenden Vorgang der Syngamie (Verschmelzen der Vorkerne) erfolgt die Rekombination des maternalen und paternalen genetischen Materials. Zu diesem Zeitpunkt besteht somit eine erhöhte Chance auf einen Einbau der mikroinjizierten DNA-Sequenzen. Die Vorkerne müssen beim Rind durch kurzzeitige Zentrifugation der Zygoten sichtbar gemacht werden, da sie durch ein dichtes Plasma verdeckt sind. 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 über 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 (Transmission), 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 (Pursel und Rexroad, 1993; Espanion und Niemann, 1996).

Die allermeisten Nutztiere sind bisher noch mit Hilfe der Mikroinjektion erstellt worden und haben insbesondere Wachstumshormongenkonstrukte erhalten (Hammer et al., 1985; Pursel et al., 1989). 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

genetisch 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 (Abbildung 4). 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 (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998b). 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.

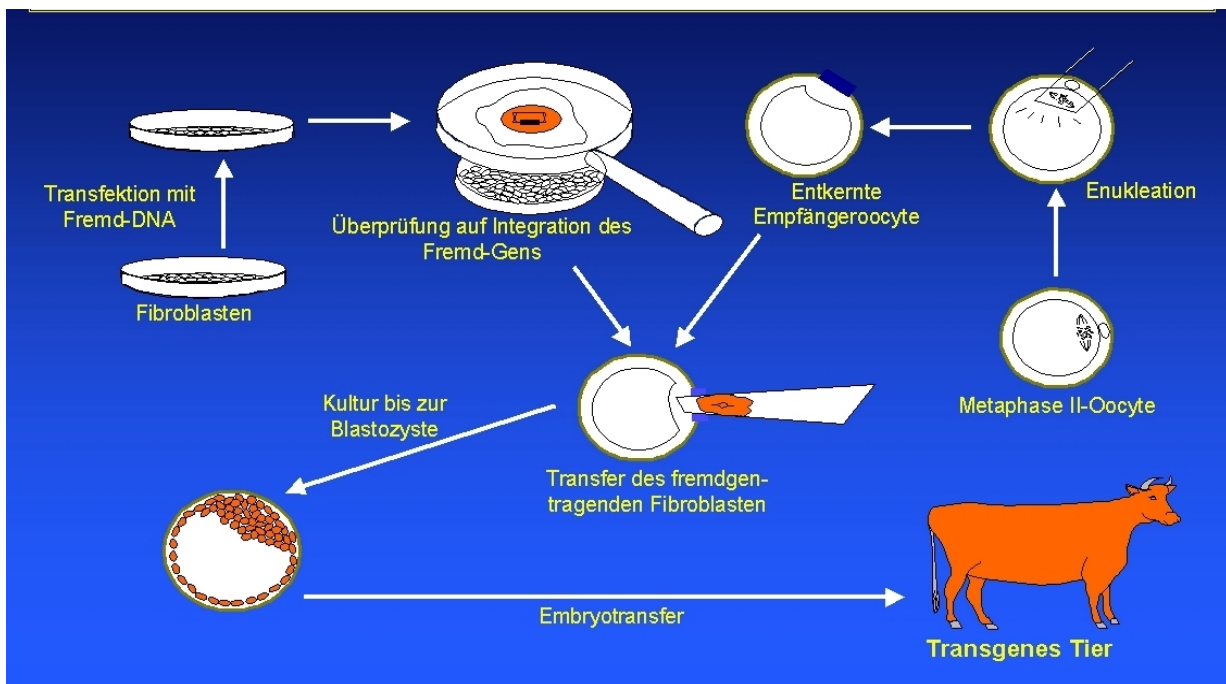


Abbildung 4  
Erstellung transgener Tiere mit Hilfe des Kerntransfers

Weitere qualitative Verbesserungen sind durch die Anwendung homologer Rekombinationstechniken zu erzielen (Niemann und Kues, 2000). Zahlreiche Studien bei der Maus haben gezeigt, dass 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 ein 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. Dabei wird gezielt ein bestimmter Genort angesteuert, da das Targeting-Konstrukt nur die homologen Sequenzen erkennt und mit ihnen rekombiniert. Die Zellen können in

in vitro auf korrekte Integration geprüft und anschließend in eine entkernte Oocyte übertragen werden. Bei Nutztieren sind trotz vielfältiger Bemühungen geeignete ES-Zelllinien für homologe Rekombinationsverfahren noch nicht verfügbar. Kürzlich wurde jedoch erstmals bekannt, dass auch primäre fetale Fibroblasten über homologe Rekombination gezielt genetisch verändert werden können und nach Verwendung im Kerntransfer transgene Lämmer und Schweine geboren wurden (McCreath et al., 2001; Denning et al., 2001; Dai et al., 2002; Lai et al., 2002). Auch über die Geburt von transgenen Nachkommen beim Rind wurde berichtet, die von „Stammzell-ähnlichen“ Zellen abstammten (Cibelli et al., 1998a). Da 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 Kerntransfervorgang wesentlich verbessert werden, so dass präzise und genau kontrollierte genetische Veränderungen möglich sind. 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. Beim Rind ist durch die geschilderten Entwicklungen eine erhebliche Vielfalt in der Milchproduktion erreichbar. Neben der konventionellen Vollmilch könnte dann gezielt z. B. Magermilch (durch genetische Modifikation der Milchfettsynthese), Milch für die Joghurtherstellung (durch Modifikation im Kaseinbereich), Milch für die Käseherstellung (durch modifizierte Kaseine), hypoallergene Milch (durch Ausschaltung von  $\beta$ -Lactoglobulin), Milchzuckerfreie oder – reduzierte Milch (durch Ausschaltung von  $\alpha$ -Lactalbumin oder Laktase-Expression), „Kleinkindermilch“ (durch zusätzliches Laktoferrin) oder eine hygienisch hochwertige Milch (durch zusätzliche Expression von Lysozym oder anderen antibakteriellen Enzymen) produziert werden.

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. Beim Rind sind kürzlich transgene Tiere mit effizienter Expression von Laktoferrin berichtet worden (van Berkel et al., 2002). Die Milch dieser Tiere soll insbesondere in der Säuglings – und Kleinkinderernährung verwendet werden. 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 Schafe und Ziegen, die größere Mengen pharmazeutischer Proteine in der Milchdrüse produzieren. Wesentliche Voraussetzung dafür ist, dass das jeweilige Strukturprotein unter Kontrolle eines milchdrüsen-spezifischen Regulationselements effizient im Euter produziert wird und aus der Milch aufgereinigt werden kann (Clark et al., 1987). Die Blutproteine  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Antithrombin III (AT III) oder Tissue Plasminogen Activator (TPA), produziert in der Milchdrüse transgener Ziegen oder Schafe, befinden sich bereits in der fortgeschrittenen klinischen Prüfung (Rudolph, 1999; Niemann und Kues, 2000). Bei deren erfolgreichen Ausgang wird mit einer Verfügbarkeit auf dem

Arzneimittelmarkt in den nächsten drei bis fünf Jahren gerechnet. In eigenen Forschungsarbeiten wurde erstmals biologisch aktiver humaner Blutgerinnungsfaktor VIII in der Milchdrüse transgener Schafe exprimiert (Niemann et al., 1999).

## 7 Abschließende Betrachtungen und Projektion für das Jahr 2025

Angesichts der sich dramatisch verschärfenden weltweiten Ressourcen- und Umweltproblematik machen die geschilderten vielfältigen positiven Anwendungsbereiche der Bio- und Gentechnologie eine intensive Forschung erforderlich. Bei Forschung und Anwendung biotechnologischer Verfahren sind die 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 tiergerechte 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.

Im Jahr 2025 wird die Milchviehproduktion wahrscheinlich durch folgende Elemente gekennzeichnet sein:

- Nachkommen können von züchterisch wertvollen präpuberalen Spendertieren gewonnen und damit das Generationsintervall deutlich verkürzt werden.
- Erzeugung geschlechtsvorbestimmter Nachkommen ist möglich.
- Das somatische Klonen ist mit ausreichender Effizienz und ohne Nebenwirkungen möglich und wird eingesetzt. Rückprogrammierung und Redifferenzierung sind ohne die Übertragung in eine entkernte Oozyte möglich.
- Das Genom der Nutztiere ist vollständig und im Detail sequenziert.
- Transgene Tiere mit kontrollierter Transgen-Expression können mit ausreichender Effizienz erstellt werden.

- Die Milchviehzucht wird wesentlich auf molekularer Ebene durchgeführt werden und wird sich auf Elemente der Bio- und Gentechnologie stützen.
- Die Tierzucht wird noch stärker globalisiert sein und viele Bereiche werden durch Patente geschützt sein.

Mit dem Eintritt ins 21. Jahrhundert ist beim Rind bereits ein umfangreiches Arsenal praxisreifer reproduktionsbiotechnologischer Verfahren vorhanden (Tabelle 1), während bei den anderen land-

wirtschaftlichen Nutztieren teilweise noch erheblicher Entwicklungsbedarf besteht. In Kombination mit den sich rasant weiter entwickelnden molekulargenetischen Erkenntnissen und dem Methodenspektrum steht somit in allernächster Zukunft ein wichtiges Instrumentarium zur Bewältigung zukünftiger Herausforderungen in Tierzucht und Tierproduktion zur Verfügung. Nur die Tierzucht wird wettbewerbsfähig sein, die rechtzeitig neue Technologien aufgenommen hat.

Tabelle 1

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

## Literatur

- Armstrong DT (1993): Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39: 7-24
- Armstrong DT, Leung PCK (1990): The physiological basis of superovulation: Seminars in Reproductive Endocrinology 8: 219-231
- Bavister BD (1995): Culture of preimplantation embryos: Facts and Artifacts. *Hum Reprod Update* 1: 91-148
- Bondioli KR, Westhusin ME, Looney CR (1990): Production of identical offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33: 165-174
- Brackett BG, Zuelke KA (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
- Brem G, Kühholzer B (2002): The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning and Stem Cells* 4: 57-63
- Bungartz L, 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, 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 KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Léon FA, Robl JM (1998a): Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem cell like cells. *Nat Biotechnol* 16: 642-646
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Léon FA, Robl JM (1998b): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258
- Clark AJ, Simons P, Wilmut I, Lathe R (1987): Pharmaceuticals from transgenic livestock. *Tibtech* 5: 20-24.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen S-H, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero LJ, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL (2002): Targeted disruption of the  $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20: 251-255

- Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ (2001): Deletion of the  $\alpha(1,3)$ galactosyl transferase (GGTAI) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* 19: 559-562
- Di Berardino MA (2001): Animal cloning – the route to new genomics in agriculture and medicine. *Differentiation* 68: 67-83
- Espanion G, Niemann H (1996): Methodik der Erstellung und Anwendungsperspektiven transgener Nutztiere. *Dt Tierärztl Wschr* 103: 320-328
- Hammer RE, Palmiter RD, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Brinster RL, Palmiter RE (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato JY, Daguchi H, Yasue H, Tsunoda Y (1999): Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098
- Khurana NK, Niemann H (2000): Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54: 741-756
- Kreysing U, Nagai T, Niemann H (1997): Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reprod Fertil Dev* 9: 465-474
- Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H (2000): Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* 62: 412-419
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park K-W, Cheong H-T, Greenstein JL, Im G-S, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS (2002): Production of  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-1092
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M (2001): Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 19: 962-964
- Lucas-Hahn A, Eckert J (1996): Entwicklungsstand und Anwendungsbereiche der In-vitro-Produktion von Rinderembryonen. *Dt Tierärztl Wschr* 103: 306-311
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ (2000): Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1069
- 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, GF Greppi, A Lauria, Elsevier, Biofutur pp. 117-128
- Niemann H, Halter R, Carnwath JW, Herrmann D, Lemme E, Paul D (1999): Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res* 8: 237-247
- Niemann H, Kues W (2000): Transgenic livestock: Premises and promises. *Anim Reprod Sci* 60-61: 278-296
- Niemann H, Meinecke B (1993): Embryo Transfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, ISBN 3432 254717
- Niemann H, 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, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW (2002): Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning and Stem Cells* 4: 29-38
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H (1992): Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31: 63-67
- Prather RS, First NL (1990): Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int Rev Cytol* 120: 169-190
- Ptak G, Clinton M, Barboni B, Muzzeddu M, Cappai P, Tischner M, Loi P (2002): Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol Reprod* 66: 796-801
- Pursel VG, Rexroad CE Jr (1993): Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* 71 Suppl 3: 10-19
- Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE (1989): Genetic engineering of livestock. *Science* 244: 1281-1288
- Reichelt B, Niemann H (1994): Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J Reprod Fertil* 100: 163-172
- Rudolph NS (1999): Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Tibtech* 17: 367-374
- Saito S, Niemann H (1993): In vitro and in vivo survival of bovine demi-embryos following simplified bisection and transfer of one or two halves per recipient. *J Reprod Dev* 39: 251-258
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock C, Scott AR, Ritchie M, Wilmut J, Colman A, Campbell KHS (1997): Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130-2133
- Sommerfeld V, Niemann H (1999): Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105
- Thibier M (2001): The animal embryo transfer industry in figures. *IETS Newsletter* 19(4): 16-22
- Trounson AO, Pushett D, MacLellan LJ, Lewis I, Gardner DK (1994): Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41: 57-66
- van Berkel PHC, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EKJ, Pieper F, Nuijting JH, Nibbering PH (2002): Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol* 20: 484-487
- Voelkel SA, Hu Y (1992): Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37
- Wheeler MB, Champion DR (1993): Animal production – a longstanding biotechnological success. *Am J Clin Nutr* 58 Suppl: 276-281
- Willadsen SM (1986): Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 64-65
- Willadsen SM, Janzen RE, McAlister RJ, Shea BF, Hamilton G, McDermid D (1991): The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35: 161-170
- Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GE Jr (1994): Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22: 521-531
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813