

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der Eigenschaften der Genkonstrukte WAP-FVIII und WAP-FVIII-MTI im Mausmodell für eine potentielle Anwendung beim Schaf. Dazu erfolgte zunächst die Mikroinjektion der beiden Fusionsgene in den männlichen Vorkern muriner Zygoten, die zuvor durch Spülung der Eileiter superovulierter Weibchen gewonnen worden waren. Der Transfer in die Eileiter pseudogravider Rezipienten wurde entweder unmittelbar im Anschluß an die Mikroinjektion oder nach ein- bis zweitägiger Kultivierung durchgeführt. Die Identifizierung der aus den Transfers hervorgegangenen transgenen Jungtiere wurde mit Hilfe von Southern Blot-Analysen vorgenommen. Diese Founder-Tiere dienten zur Etablierung transgener WAP-FVIII- und WAP-FVIII-MTI-Mauslinien. Ein Vergleich der Expressionseigenschaften des intronlosen und des intronhaltigen Fusionsgens sollte zeigen, ob ein in der Literatur beschriebener positiver Einfluß geeigneter Intronsequenzen auf die Expressionseffizienz von cDNA-Genkonstrukten auch für diese Konstrukte zu erreichen war. Der Nachweis der Faktor VIII-mRNA erfolgte aus Milchdrüsengewebe transgener Mäuse mittels Reverser PCR, für den Translationsnachweis wurden Milchproben laktierender Weibchen gewonnen. Da kein Verfahren zum Nachweis des humanen Blutgerinnungsfaktors VIII in (Maus-) Milch zur Verfügung stand, wurden Versuche zur Etablierung einer geeigneten Nachweismethode auf immunologischer Ebene sowie auf der Basis funktioneller Tests durchgeführt.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Aus 863 transferierten murinen Zygoten entwickelten sich insgesamt 128 (14,8%) lebende Jungtiere, von denen 20 als transgen identifiziert wurden. 8 Mäuse hatten das intronlose, 12 Mäuse das intronhaltige Konstrukt in ihr Genom integriert. Die Integrationsrate (Anteil transgener Jungtiere / lebende Nachkommen) betrug 13,1% (für WAP-FVIII) bzw. 17,9% (für WAP-FVIII-MTI), die Gesamteffizienz (Anteil transgener Jungtiere / transferierte Embryonen) lag bei 1,6% bzw. 3,4%.

2. 18 von 19 (94,7%) untersuchten Founder-Tieren gaben das Transgen an die Nachkommen der 1. und 2. Generation weiter, so daß 18 Faktor VIII-transgene Mauslinien erstellt werden konnten, von denen 7 das intronlose und 11 das intronhaltige Fusionsgen aufwiesen.
3. Zum Nachweis der Transkription der Genkonstrukte in der Milchdrüse laktierender Mäuse wurde ein RT-PCR-Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe die F VIII-mRNA in insgesamt 50% der etablierten Linien nachgewiesen werden konnte. Eine erhöhte Expressionsfrequenz bei WAP-FVIII-MTI-transgenen Linien gegenüber Linien mit dem intronlosen Fremdgen war an Hand der vorliegenden Daten nicht feststellbar.
4. Für den Nachweis der Genexpression auf Translationsebene wurde ein ELISA-Verfahren entwickelt, mit dem der menschliche Blutgerinnungsfaktor in den gewonnenen Milchproben laktierender Mäuse jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Der Immunochem® FVIII:C-Test und der automatisierte IL-Gerinnungstest® zur Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität in menschlichem Blut erwiesen sich für das Untersuchungsmaterial "Mausmilch" aufgrund unspezifischer Reaktionen sowie hoher Hintergrundaktivitätswerte als ungeeignet.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die beiden verwendeten Genkonstrukte WAP-FVIII und WAP-FVIII-MTI bei der Erstellung transgener Mauslinien zu einer hohen Integrations- und Transmissionsrate führten. Unterschiede in der Integrationsfrequenz wurden dabei nicht festgestellt. Die Transkription der Transgene wurde in 50% aller etablierten Linien mittels Reverser PCR nachgewiesen. Obwohl diese Resultate nicht uneingeschränkt auf andere Spezies übertragbar sind, ist der Einsatz der Konstrukte beim Schaf vielversprechend. An Hand der vorliegenden Daten konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, welches der beiden Genkonstrukte die effektivere Expression bewirkte. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Nachweis von Faktor VIII in der Milch transgener Tiere mit ausreichender Sicherheit zu führen.

Gudrun Espanion

Generation of transgenic mouse lines expressing human blood clotting factor VIII-cDNA in the mammary gland

The purpose of the present study was to investigate the characteristics of the gene constructs WAP-FVIII and WAP-FVIII-MTI in mice as a model system for potential application in sheep. The constructs were microinjected into pronuclei of mouse zygotes which had been flushed out of the oviducts of superovulated females. Transfers into the oviducts of pseudopregnant recipients were carried out after microinjection either immediately or after one or two days in culture. The transgenic pups born were identified by Southern Blot analysis. From these founder animals WAP-FVIII and WAP-FVIII-MTI transgenic murine lines were established. Comparison of expression levels of constructs with or without introns should reveal whether the enhancing effect of introns described in the literature applied to these constructs. The detection of factor FVIII-mRNA was carried out in mammary tissue of transgenic mice by Reverse Transcription-PCR. In order to analyse translation, milk samples were collected from lactating females. Because there isn't any assay available to detect human blood clotting factor VIII in (mouse) milk, various modifications of clinical immunological and functional assays were evaluated.

The following results were obtained:

1. A total of 863 transferred murine zygotes resulted in 128 (14.8%) surviving pups, 20 of which were transgenic. 8 mice had integrated the construct without introns and 12 mice had the construct with introns. The integration rate (percentage of live pups which were transgenic) was 13.1% and 17.9% (for WAP-FVIII and WAP-FVIII-MTI respectively). The total efficiency (percentage of transferred embryos which yielded transgenic founders) was 1.6% and 3.4% respectively.

2. 18 out of 19 (94.7%) founder animals investigated transmitted the foreign genes to the first and second generation of progeny, so that 18 factor VIII transgenic murine lines were established, 7 of which had integrated the intronless construct and 11 the intron containing construct.
3. For transcription analysis of the gene constructs in the mammary gland of lactating mice, an RT-PCR method was developed which detected F VIII mRNA in a total of about 50% of the established lines. The data didn't reveal a higher expression frequency in WAP-FVIII-MTI-lines than in the lines without introns.
4. In order to analyse translation, an ELISA-assay was developed. Unfortunately this failed to detect human clotting factor in the milk samples collected from lactating mice. The Immunochrom[®] FVIII:C Assay and the automated IL Clotting Assay[®] for determining factor VIII activity in human blood turned out to be unsuitable for the examined material (mouse milk) because of unspecific reactions and high background activity.

These results indicate that both gene constructs, WAP-FVIII and WAP-FVIII-MTI, resulted in high integration and transmission rates. Differences in integration frequency were not observed. In 50% of the lines established, transcription of the transgenes was detected by RT-PCR. Although these results aren't unrestrictedly transferable to other species, the application of the constructs in sheep is promising. It is not clear from the present data whether introns produced a detectable increase in expression from the WAP (Whey Acidic Protein) promoter with the large F VIII cDNA containing construct. The reliable detection of factor VIII in the milk of transgenic animals warrants further investigation.