

**Stammzellen und *Genome Editing* bei Nutztieren:
Perspektiven für die Landwirtschaft
und die medizinische Forschung**

Gutachten im Auftrag der Eidgenössischen Ethikkommission
für die Biotechnologie im Ausserhumanbereich (EKAH)

Eckhard Wolf¹

¹Dr. med. vet., Inhaber des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie am Genzentrum und am Veterinärwissenschaftlichen Department der Ludwig-Maximilians-Universität München

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ziel und Gliederung des Gutachtens	2
1.2	Begriffsbestimmungen	3
2	STAND DER GENOMFORSCHUNG BEI HAUS- UND NUTZTIERARTEN	4
2.1	Referenzgenome	4
2.2	Genetische Polymorphismen und Marker	5
2.3	Kartierung und Identifizierung von Erbfehlern	6
2.4	Genomische Selektion	10
3	STAMMZELLFORSCHUNG BEI HAUS- UND NUTZTIERARTEN	15
3.1	Pluripotente Stammzellen	18
3.2	Multipotente Stammzellen	22
3.3	Spermatogoniale Stammzellen	25
4	MÖGLICHKEITEN UND ZIELSETZUNGEN DER GEZIELTEN GENETISCHEN VERÄNDERUNG VON NUTZTIEREN	28
4.1	Gentransfer und <i>Gene Targeting</i>	28
4.2	<i>Genome Editing</i>	30
4.3	Genetisch modifizierte Großtiere als Modelle für die medizinische Forschung	33
4.3.1	Schweinemodell für die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) mit Krankheitsverlauf im Zeitraffer	35
4.3.2	Schweinemodelle für die Mukoviszidose/Zystische Fibrose (CF) zeigen die Symptomatik der humanen Erkrankung	38
4.3.3	Genetisch veränderte Schweine als potentielle Spender für die Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen	41
4.3.4	Koordination der Forschung mit genetisch veränderten Tiermodellen auf europäischer und internationaler Ebene	49
4.4	Chancen und Risiken des <i>Genome Editing</i> bei landwirtschaftlich genutzten Tieren	51
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	54
6	LITERATUR	56

1 EINLEITUNG

Die Gesellschaft erwartet im Hinblick auf die Nutztierzucht qualitativ hochwertige Lebensmittel tierischer Herkunft, mit einem hohen Maß an Transparenz in den Bereichen Produktion, Verarbeitung und Handel. Zudem sollen gesundheitlicher Verbraucherschutz und Tiergesundheit gewährleistet sein. Letzteres beinhaltet eine artgerechte Nutztierhaltung unter Berücksichtigung angeborener Verhaltensweisen. Weiteres Ziel ist eine ressourcenschonende Produktion. Die Deutsche Agrarforschungsallianz (DAFA) hat in ihrem Fachforum Nutztiere treffend formuliert: „*Im Endeffekt führt kein Weg daran vorbei, dass bahnbrechende Lösungen nur als Systemansatz im Zusammenspiel von Wissenschaft, Wirtschaft, Politik und Gesellschaft entstehen können*“¹. Dies steht im größeren Kontext globaler Abwägungen und Ansätze, die Nachhaltigkeit des „Systems Erde“ zu sichern (Steffen et al., 2015).

In diesem Gutachten werden in erster Linie neue wissenschaftliche Entwicklungen dargestellt, welche die Tierzucht und Tierproduktion nachhaltig beeinflussen können, mittelfristig aber auch Auswirkungen auf die medizinische Forschung haben können.

Eine herausragende Rolle spielt dabei die rasante Entwicklung der Nutztiergenomik. So sind mittlerweile Gesamtgenomsequenzen für die wichtigsten Haus- und Nutztierspezies öffentlich verfügbar². Durch einen drastischen Rückgang der Kosten für die DNA-Sequenzierung ist es zudem möglich geworden, neben dem Referenzgenom DNA-Sequenzen vieler Individuen einer Spezies zu bestimmen und so präzise Einblicke in die genetische Variation und ihre Auswirkungen auf die Merkmalsausprägung zu gewinnen. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann die Auswahl von Zuchttieren allein aufgrund ihrer genetischen Information getroffen werden (genomische Selektion).

Durch die Entwicklung leistungsfähiger Technologien, mit denen verschiedene Ebenen der Genaktivität und ihre Auswirkungen erfasst werden können (sog. Omics-Technologien), ist es zudem auch möglich geworden, die Biologie wichtiger Merkmale unserer Haus- und Nutztiere besser zu verstehen und neue Parameter für die Weiterentwicklung in der Tierzucht zu etablieren. Dies betrifft insbesondere Merkmale der Tiergesundheit und Fruchtbarkeit, die aufgrund ihrer niedrigen Heritabilität mit dem Methodenspektrum der klassischen Tierzucht nur schwer positiv zu beeinflussen waren.

Ein dritter Bereich sind neue Entwicklungen im Bereich der Tier-Biotechnologie, die es erstmals ermöglichen, gezielte Veränderungen im Genom von Haus- und Nutztieren vorzunehmen. Im Vordergrund stehen einerseits neue Erkenntnisse im Bereich der Stammzellbiologie, andererseits aber insbesondere neue Verfahren des sog. *Genome Editing*, wodurch mit sehr hoher Effizienz zielgerichtete DNA-Sequenzveränderungen induziert werden können. Im Bereich der Haus- und Nutztierzucht werden diese Verfahren bislang fast ausschließlich im experimentellen Bereich genutzt, zum Beispiel um die biologische Relevanz

¹ http://www.dafa.de/fileadmin/dam_uploads/images/Veranstaltungen/FF_Nutztiere_2012/FF%20Nutztiere_2012_02-29.pdf

² siehe <http://www.ensembl.org/index.html>

eines Gens oder einer Genvariante zu zeigen oder um gezielt ein Tiermodell für eine genetisch bedingte Erkrankung zu generieren. Grundsätzlich beinhalten diese Technologien allerdings auch das Potenzial, im Bereich der landwirtschaftlichen Tierzucht gezielt Gendefekte zu eliminieren oder erwünschte Genvarianten in eine Population einzuführen.

Die folgende **Abbildung 1** zeigt die verschiedenen Betrachtungsebenen der Biologie von Haus- und Nutztieren sowie die jeweiligen Disziplinen und methodischen Herangehensweisen, mit denen sie analysiert werden. Ziel dieser systemischen Betrachtungsweise ist es, mit einem erkenntnisbasierten Ansatz dazu beizutragen, die Produktivität in der Tierzucht zu erhalten, gleichzeitig aber die Tiergesundheit zu fördern, indem mögliche negative Auswirkungen der Selektion frühzeitig erkannt und entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden können.

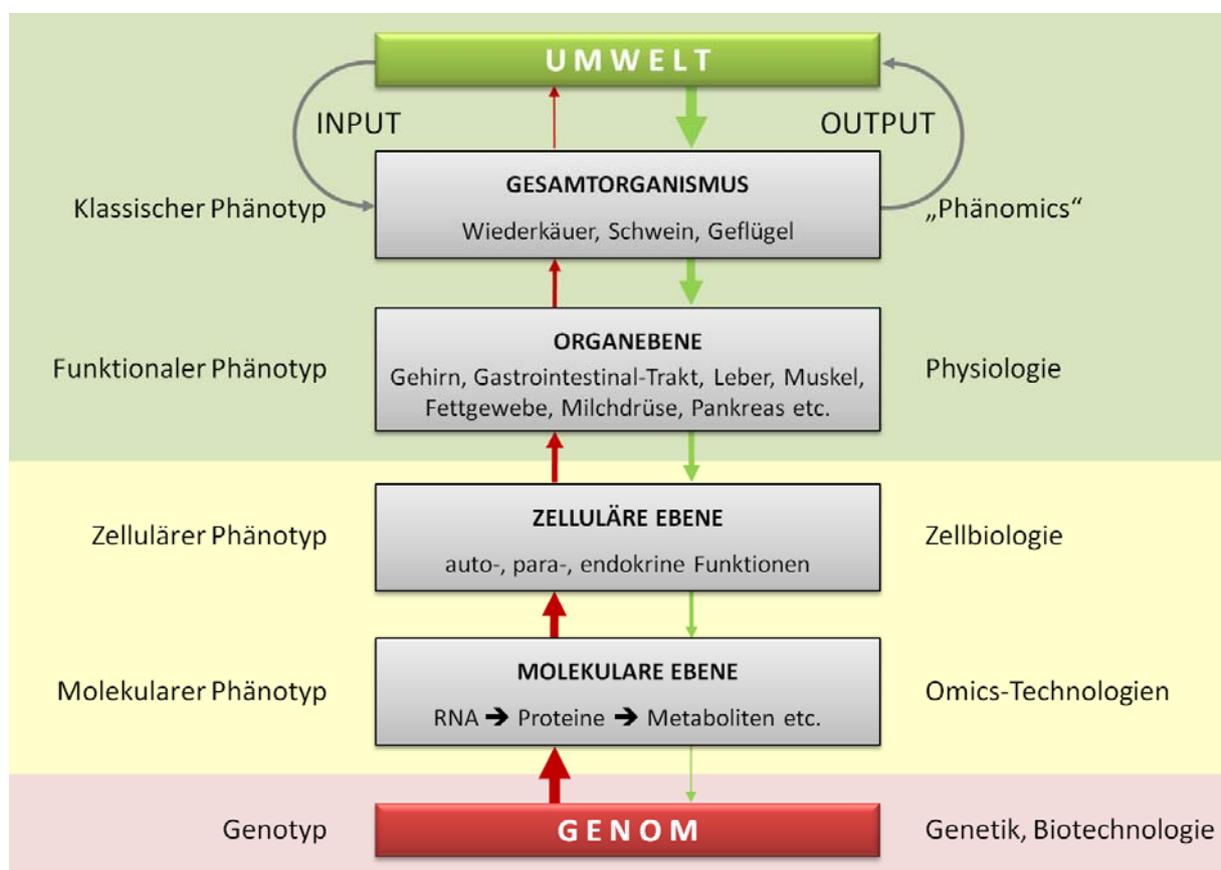


Abbildung 1. Verschiedene Ebenen der Merkmalsausprägung sowie Disziplinen/Methoden, mit denen sie untersucht werden. Mit Hilfe sogenannter „Omics“-Technologien ist es möglich, auf der molekularen Untersuchungsebene die Gesamtheit der RNAs (Transkriptom), der Proteine (Proteom) und der Metaboliten (Metabolom) zu erfassen. Ziel solcher Untersuchungen ist es, den Zusammenhang zwischen genetischer Veranlagung und Merkmalsausprägung besser zu verstehen.

1.1 Ziel und Gliederung des Gutachtens

Ziel dieses Gutachtens ist es, eine Übersicht zum Stand der Genomprojekte bei Haus- und Nutztieren zu geben sowie Strategien zu erläutern, wie diese Erkenntnisse in der Tierzucht eingesetzt werden können. Darüber hinaus erörtert das Gutachten Ansätze der

Stammzellforschung bei diesen Spezies, insbesondere wichtige Unterschiede in diesem Gebiet zu den Nagerspezies sowie zum Menschen. Im letzten Abschnitt beschäftigt sich das Gutachten mit neuen Methoden des sog. *Genome Editing* sowie seinen möglichen Anwendungen in der experimentellen Genetik und Tierzucht. Das Gutachten endet mit einem Versuch der Bewertung neuer Entwicklungen im Bereich der Genomforschung und Biotechnologie bei Haus- und Nutztieren vor dem Hintergrund der aktuellen Gesetzeslage und ethischer Prinzipien.

1.2 Begriffsbestimmungen

Stammzellen sind durch eine hohe Teilungsfähigkeit und einen meist geringen Differenzierungsgrad charakterisiert. Sie haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, können durch asymmetrische Zellteilung aber auch differenzierte Zellerivate hervorbringen.

Totipotente Zellen sind in der Lage, aus sich allein einen vollständigen Organismus zu bilden. Beispiele dafür sind die befruchtete Eizelle sowie bei den Säugetieren die Zellen früher Embryonen bis zum Achtzell-Stadium.

Pluripotente Stammzellen können in eine Vielzahl verschiedener Zellen und Gewebetypen differenzieren, sie sind allerdings nicht in der Lage allein einen vollständigen Organismus zu bilden. Beispiele sind die sog. embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder die sog. induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen), die in Kapitel 3 im Detail erläutert werden.

Multipotente Stammzellen schließlich haben im Vergleich zu den pluripotenten Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial und sind Grundlage von Regenerationsprozessen in zahlreichen Geweben.

Der Begriff *Gen(om)e Editing* wurde für Techniken geprägt, mit denen an einer bestimmten Stelle im Genom ein Doppelstrangbruch der DNA erzeugt werden kann. Dies erfolgt durch DNA-schneidende Enzyme (Nukleasen), die durch Proteine oder RNA-Sequenzen mit definierten DNA-Bindungsspezifitäten zur jeweils gewünschten Stelle im Genom geleitet werden können. Zelleigene Reparaturmechanismen ermöglichen, dass an der Schnittstelle eine Mutation entsteht, die zur Inaktivierung des betreffenden Gens führen kann. Alternativ kann der Doppelstrangbruch auch vollständig repariert oder biotechnologisch für das Einbringen einer definierten Sequenzveränderung genutzt werden. Diese Möglichkeiten werden im Kapitel 4 diskutiert.

2 STAND DER GENOMFORSCHUNG BEI HAUS- UND NUTZTIERARTEN

Die Genomforschung bei Haus- und Nutztieren hat durch die Entwicklung von leistungsfähigen DNA-Sequenzierungstechniken in den letzten zehn Jahren einen enormen Aufschwung genommen. Daher existieren heute für die wichtigsten Spezies nicht nur Referenzgenome, sondern auch eine Vielzahl von genetischen Markern (DNA-Varianten bei verschiedenen Individuen), mit denen einzelne Individuen sicher identifiziert und die genetischen Grundlagen monogener sowie komplexer polygener Merkmale aufgeklärt werden können. Diese technischen Möglichkeiten werden nicht nur zur Identifizierung und Eliminierung von Erbfehlern eingesetzt, sondern sind auch Grundlage der sogenannten genomischen Selektion, bei der die Auswahl der Elterntiere für die nächste Generation allein auf der Basis ihres Genotyps erfolgt, während auf kosten- und zeitaufwendige Leistungsprüfungen weitgehend verzichtet werden kann. In den folgenden Kapiteln werden die Fortschritte in den verschiedenen Bereichen der Genomforschung bei Haus- und Nutztieren erläutert.

2.1 Referenzgenome

Aufgrund der Formierung von internationalen Genomforschungs-Konsortien sind heute für eine Reihe von Haus- und Nutztierspezies Gesamt-Genomsequenzen verfügbar. Maßgeblich dazu beigetragen hat eine dramatische Senkung der Kosten für die DNA-Sequenzierung. Während die Kosten für die Sequenzierung eines humanen Genoms im Jahr 2007 noch in der Größenordnung von 10 Millionen US-Dollar lagen, nähern sich die Kosten für diese Leistung heute der 1000 US-Dollar Marke (Hayden, 2014). Gesamt-Genomsequenzen wurden für das Huhn (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004), das Rind (Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, 2009), das Pferd (Wade et al., 2009), das Schwein (Groenen et al., 2012) und das Schaf (Jiang et al., 2014) publiziert. Darüber hinaus wurden kürzlich auch Genomsequenzen von der Ziege veröffentlicht (Dong et al., 2013). Die gesamte Genomgröße für das Huhn liegt in der Größenordnung von einer Milliarde Basenpaaren, bei den Säugetieren schwankt sie zwischen 2,4 und 2,8 Milliarden Basenpaaren.

Diese Genomsequenzen sowie zusätzliche Informationen, wie z.B. DNA-Sequenzvariation, Zahlen unterschiedlicher Transkripte etc., sind in der Ensemble-Datenbank³ öffentlich verfügbar. Die folgende [Abbildung 2](#) bietet eine Übersicht über den Stand der Genomforschung bei verschiedenen Haustierarten.

³ siehe <http://www.ensembl.org/>

A	Huhn	Galgal4	B	Rind	UMD3.1
	Gesamtgröße (Basenpaare)	1.046.932.099		Gesamtgröße (Basenpaare)	2.670.422.299
	Kodierende Gene	15.508		Kodierende Gene	19.994
	Nichtkodierende Gene	1.558		Nichtkodierende Gene	3.825
	kleine nichtkodierende	1.408		kleine nichtkodierende	3.650
	andere nichtkodierende	150		andere nichtkodierende	175
	Pseudogene	42		Pseudogene	797
	Transkripte	17.954		Transkripte	26.740
	Kurze Sequenzvarianten	9.534.437		Kurze Sequenzvarianten	74.449.951
	Strukturelle Varianten	n.n.		Strukturelle Varianten	2.581

C	Schwein	Sscrofa10.2	D	Schaf	Oar_v3.1
	Gesamtgröße (Basenpaare)	2.808.525.991		Gesamtgröße (Basenpaare)	2.619.054.388
	Kodierende Gene	21.630		Kodierende Gene	20.921
	Nichtkodierende Gene	3.124		Nichtkodierende Gene	3.985
	kleine nichtkodierende	2.804		kleine nichtkodierende	3.624
	andere nichtkodierende	320		andere nichtkodierende	361
	Pseudogene	568		Pseudogene	291
	Transkripte	30.585		Transkripte	27.099
	Kurze Sequenzvarianten	28.719.390		Kurze Sequenzvarianten	59.980.114
	Strukturelle Varianten	85		Strukturelle Varianten	n.n.

Abbildung 2. Stand der Genomsequenzierung bei den Tierarten Huhn (A), Rind (B), Schwein (C) und Schaf (D). Die Daten sind der Ensemble-Datenbank (<http://www.ensembl.org/>) mit Stand vom 16.05.2015 entnommen.

2.2 Genetische Polymorphismen und Marker

Aufgrund der sinkenden Kosten für die DNA-Sequenzierung war es möglich, neben dem jeweiligen Referenzgenom einer Spezies die Genome zahlreicher weiterer Individuen zu sequenzieren, um so einen Einblick in die genetische Variation und die genetischen Distanzen zwischen verschiedenen Spezies oder zwischen verschiedenen Rassen innerhalb einer Spezies zu gewinnen. Die häufigsten DNA-Sequenzvarianten sind sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen, auch *Single Nucleotide Polymorphisms* oder SNPs genannt.

Wie der Name schon sagt unterscheiden sich Individuen in einzelnen Basen. SNPs können in kodierenden oder nichtkodierenden Bereichen von Genen wie auch in intergenen Regionen liegen. Ihre Häufigkeit liegt bei etwa eins in 1000 Basenpaaren. Synonyme SNPs führen zu keiner Veränderung der Aminosäure (AS)-Sequenz des kodierten Proteins. Nicht-synonyme SNPs können entweder zu einer Veränderung der AS-Sequenz (missense SNP) oder zur Entstehung eines prämaternen Stop-Kodons führen (nonsense SNP), was häufig in einem instabilen Transkript und dem völligen Fehlen des betreffenden Proteins resultiert. Für die Genomforschung haben SNPs als genetische Marker neben ihrer hohen Frequenz und

gleichmäßigen Verteilung im Genom den Vorteil, dass sie mit einfachen, hochparallelen Verfahren genomweit analysiert werden können. Ein gängiges Analyseverfahren sind sogenannte SNP-Chips, deren Funktionsweise in der folgenden **Abbildung 3** erklärt ist.

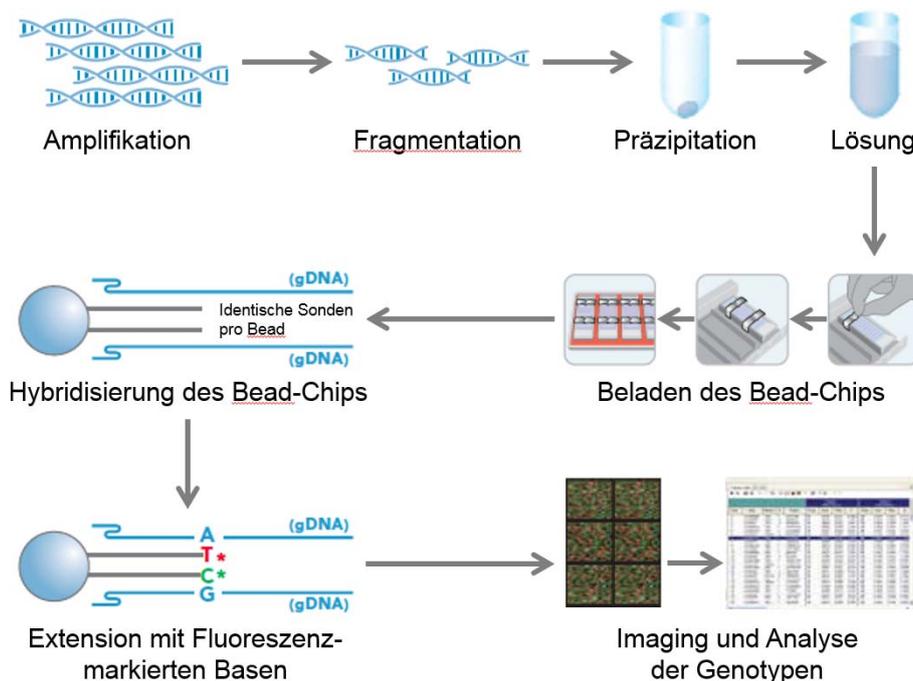


Abbildung 3. Genomweite Genotypisierung mit dem Illumina Infinium II Array. Die zu untersuchende DNA aus Blut- oder Gewebeprobe wird amplifiziert, fragmentiert, ausgefällt und in einem für die Hybridisierung des Bead-Chips geeigneten Puffer gelöst. Der Bead-Chip enthält kleine Kügelchen, auf denen sich jeweils einzelsträngige Nukleinsäure-Sequenzen (Sonden) befinden, die komplementär zu den Basensequenzen in der Nähe von SNPs sind. Dabei sind die Sonden so designed, dass die Bindung der genomischen Fragmente durch komplementäre Basenpaarung genau bis zu der Position vor dem SNP erfolgt. Anschließend erfolgt eine Extension um eine Base, wobei die verwendeten Basen spezifisch durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind. Mit einem Fluoreszenz-Scanner kann man daher erkennen, auf welchem Bead welche Base eingebaut worden ist und so auf die komplementäre Base in der SNP-Position der genomischen DNA schließen. Die besondere Leistungsfähigkeit des Verfahrens liegt darin, dass eine hohe Zahl von SNPs parallel nachgewiesen werden kann. Für die Haustiere sind SNP-Chips mit 50.000 SNPs am weitesten verbreitet (graphische Elemente übernommen aus <http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/infinium-assay/>).

2.3 Kartierung und Identifizierung von Erbfehlern

Eine wichtige Anwendung der hoch aufgelösten SNP-Genotypisierung ist die Kartierung und Identifizierung von Erbfehlern. In **Abbildung 4** ist dies am Beispiel eines rezessiven Erbfehlers dargestellt.

Ausgangspunkt ist die zufällige Entstehung der kausalen Mutation in einem Gen des sogenannten Foundertieres. Der chromosomale Bereich, in dem sich die Mutation befindet, zeichnet sich durch ein charakteristisches SNP-Muster aus, das in allen Körperzellen gleich ist. Bei der Keimzellbildung kommt es allerdings zu Veränderungen, da in der ersten Reifeteilung der Meiose eine homologe Rekombination (*Crossing Over*) der väterlichen und mütterlichen Erbanlagen stattfindet. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit eines *Crossing Over* zwischen der

kausalen Mutation und einem benachbarten Chromosomenabschnitt umso geringer, je näher dieser Chromosomenabschnitt an der Mutation liegt (= Kopplungsungleichgewicht, *Linkage Disequilibrium*), d.h. in der unmittelbaren Nachbarschaft der Mutation bleibt das SNP-Muster des betroffenen Chromosomenabschnitts vom Foundertier erhalten.

Im Falle eines rezessiven Erbfehlers ist das Foundertier unauffällig, da es noch ein zweites Allel des Gens hat, dessen Sequenz intakt ist und das defekte Allel funktionell kompensieren kann. Nach Verpaarung des Foundertieres mit gesunden Tieren der Population erben 50 % der Nachkommen das defekte Allel. Werden diese Nachkommen der ersten Generation untereinander verpaart, treten in der nächsten Generation mit der Wahrscheinlichkeit von 25 % Tiere auf, die zwei defekte Allele des betroffenen Gens tragen und entsprechende Veränderungen zeigen. Für die Kartierung und Identifizierung der Mutation ist wichtig, dass die flankierenden Sequenzen auf beiden betroffenen Chromosomen bei diesen Tieren das gleiche SNP-Muster haben wie das Chromosom der Foundertieres, in dem die Mutation erstmals entstanden ist.

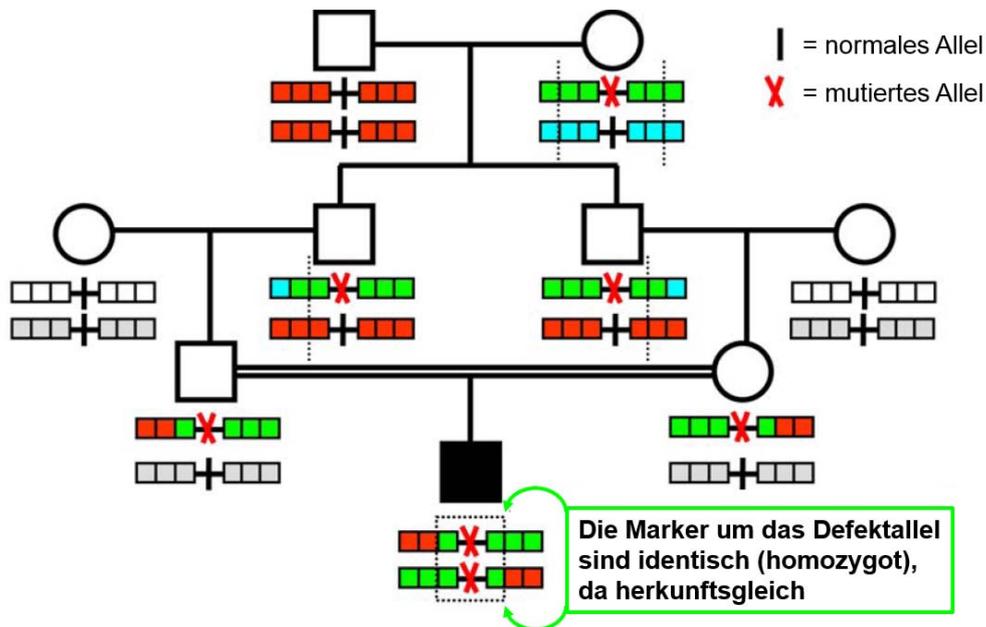


Abbildung 4. Kartierung rezessiver Defektallele durch genomweite Markeranalysen, die den betroffenen Chromosomenabschnitt aufgrund der Herkunftsgleichheit mit dem Foundertier, bei dem die Mutation erstmals auftrat, identifizieren. Dieses Verfahren wird auch *Identity by Descendant* (IBD)-Kartierung genannt (nach Hildebrandt et al., 2009).

Das Prinzip der IBD-Kartierung ist in [Abbildung 5](#) am Beispiel der Identifizierung der kausalen Mutation im *ATP2A1*-Gen bei Rindern mit kongenitaler Muskeldystonie 1 (CMD1) illustriert.

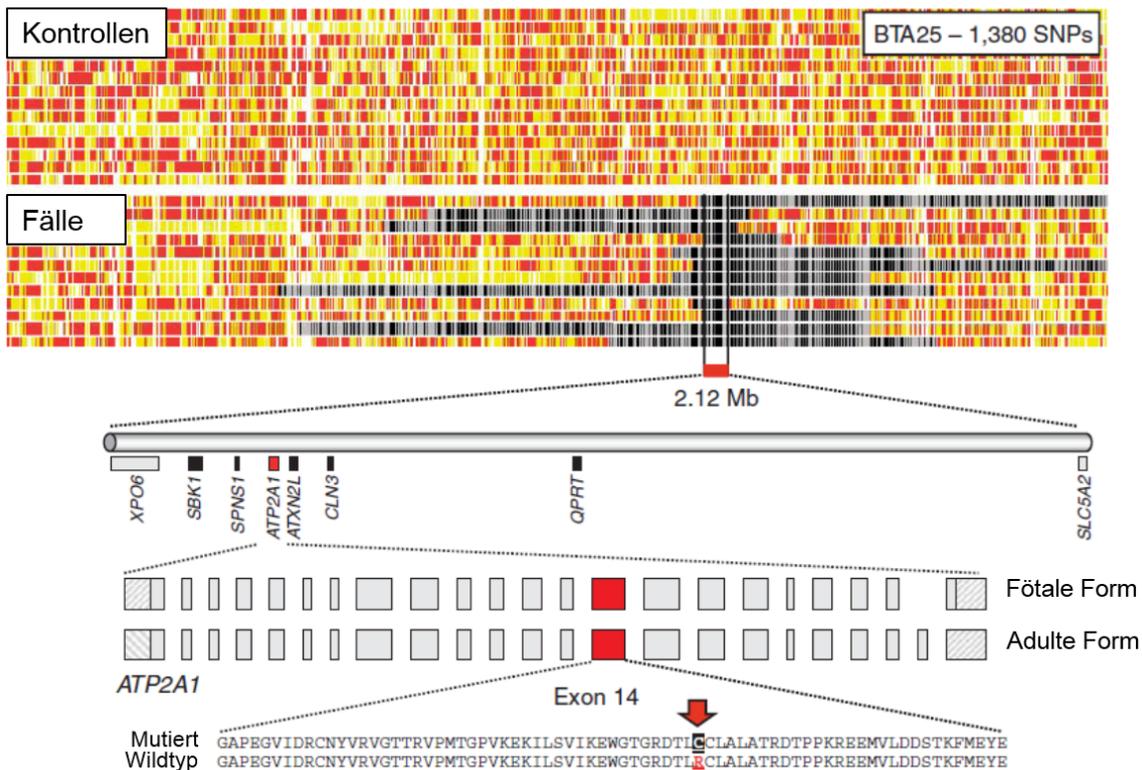


Abbildung 5. Identifizierung der kausalen Mutation im *ATP2A1*-Gen bei Rindern mit kongenitaler Muskeldystonie 1 (CMD1). Betroffene Kälber haben Schluckprobleme, ermüden rasch bei Belastung, zeigen eine Myotonie und sterben meist innerhalb weniger Wochen an Atemkomplikaionen. In einer genomweiten SNP-Analyse von 12 betroffenen Tieren (Fälle) und 14 Kontrollen wurde zunächst eine Assoziation der Erkrankung mit Chromosom 25 gefunden. Auf diesem Chromosom hatten in einem Bereich von 2,12 Mega-Basenpaaren alle betroffenen Tiere (Fälle) das gleiche SNP-Muster. In diesem Bereich konnte das Kandidatengen *ATP2A1* lokalisiert und in seinem Exon 14 die kausale Mutation identifiziert werden, die zu einem Aminosäure-Austausch (Arginin → Cystein) in Position 559 des Proteins führt (nach Charlier et al., 2008). BTA25 = Chromosom 25 des Rindes.

Mit diesem Ansatz konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl von genetischen Defekten bei Nutztieren identifiziert und entsprechende Gentests zu ihrer Eliminierung entwickelt werden. Prominente Beispiele beim Fleckvieh sind die Spinnengliedrigkeit (Arachnomelie-Syndrom), für die ursächlich eine Deletion von 2 Basenpaaren im Molybdenum Cofactor Synthesis Step 1 (*MOCS1*)-Gen identifiziert wurde (Buitkamp et al., 2011), das Zinkdefizienz-ähnliche Syndrom (BHZD), für das eine Nonsense-Mutation im Phospholipase 4 (*PLD4*)-Gen verantwortlich ist (Jung et al., 2014), sowie die Bovine männliche Subfertilität (BMS), verursacht durch eine Nonsense-Mutation im Transmembran-Protein 95 (*TMEM95*)-Gen (Pausch et al., 2014). Weitere Beispiele sind in der folgenden [Tabelle 1](#) gelistet. Eine umfangreiche Liste monogener Merkmale und Erbfehler bei Tieren findet sich in der Datenbank OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals⁴.

⁴ siehe <http://omia.angis.org.au/>

Tabelle 1. Beispiele für monogene Erbkrankheiten bei Haus- und Nutztierenarten.

Spezies	Phänotyp/Syndrom	Mutiertes Gen	Referenz
Rind	Epidermolysis bullosa	<i>ITGB4</i>	Peters et al. (2015)
Rind	Letale Chondrodysplasie („Bulldog-Kalb“)	<i>COL2A1</i>	Daetwyler et al. (2014)
Rind	Embryonale Letalität	<i>SMC2</i>	Daetwyler et al. (2014)
Rind	Fötaler Tod und Brachyspina	<i>FANCI</i>	Charlier et al. (2012)
Rind	Kongenitale Muskeldystonie Typ 2	<i>SLC6A5</i>	Gill et al. (2012)
Rind	Axonale Neuropathie	<i>MFN2</i>	Drögemüller et al. (2011)
Rind	Arachnomelie (Spinnengliedrigkeit)	<i>SUOX</i>	Drögemüller et al. (2010)
Rind	Osteopetrose, Knochendeformationen	<i>SLC4A2</i>	Meyers et al. (2010)
Rind	Zwergwuchs	<i>PRKG2</i>	Koltjes et al. (2009)
Rind	Kongenitale Pseudomyotonie	<i>ATP2A1</i>	Sacchetto et al. (2009)
Schwein	Mikrotia, Verformung des Außenohrs	<i>HOXA1</i>	Qiao et al. (2015)
Schwein	Porcines Stress-Syndrom	<i>DMD</i>	Nonneman et al. (2012)
Schwein	Hochfrequenter Tremor	<i>MYH7</i>	Murgiano et al. (2012)
Schwein	Unfruchtbarkeit, Spermatogenese-Arrest	<i>TEX14</i>	Sironen et al. (2011)
Schwein	Unfruchtbarkeit, immotile Spermien	<i>SPEF2</i>	Sironen et al. (2006)
Schwein	Rachitis, Pseudo-Vitamin D-Defizienz	<i>CYP27B1</i>	Chavez et al. (2003)
Schaf	Epidermolysis bullosa	<i>ITGB4</i>	Suarez-Vega et al. (2015)
Schaf	Lissenzephalie, zerebellare Hypoplasie	<i>RELN</i>	Suarez-Vega et al. (2013)
Schaf	Epidermolysis bullosa	<i>LAMC2</i>	Momke et al. (2011)
Schaf	Tagblindheit	<i>CNGA3</i>	Reicher et al. (2010)
Schaf	GM2 Gangliosidose	<i>HEXA</i>	Torres et al. (2010)
Schaf	Chondrodysplasie	<i>FGFR3</i>	Beever et al. (2006)
Ziege	Myotonie	<i>CLCN1</i>	Beck et al. (1996)
Ziege	Mucopolysaccharidose IIID	<i>GNS</i>	Cavanagh et al. (1995)
Pferd	Kongenitale stationäre Nachtblindheit	<i>TRPM1</i>	Bellone et al. (2013)
Pferd	Immundefizienz	<i>SLC5A3</i>	Fox-Clipsham et al. (2011)
Pferd	Lavender Foal Syndrome, Tetanie	<i>MYO5A</i>	Brooks et al. (2010)
Pferd	Epidermolysis bullosa	<i>LAMA3</i>	Graves et al. (2009)
Pferd	Glykogen-Speicherkrankheit IV	<i>GBE1</i>	Ward et al. (2004)
Pferd	Maligne Hyperthermie	<i>RYR1</i>	Aleman et al. (2004)
Pferd	Epidermolysis bullosa	<i>LAMC2</i>	Spirito et al. (2002)
Pferd	Immundefizienz, SCID	<i>DNAPK</i>	Shin et al. (1997)
Pferd	Hyperkaliämische periodische Paralyse	<i>SCN4A</i>	Rudolph et al. (1992)
Hund	Zerebellare Ataxie	<i>RAB24</i>	Agler et al. (2014)
Hund	Gaumenspalte	<i>DLX6</i>	Wolf et al. (2014b)
Hund	Chondrodysplasie	<i>ITGA10</i>	Kyostila et al. (2013)
Hund	Cystinurie	<i>SLC3A1, SLC7A9</i>	Brons et al. (2013)
Hund	Zerebellare Ataxie	<i>GRM1</i>	Zeng et al. (2011)
Katze	Hyperkaliämische periodische Paralyse	<i>WNK4</i>	Gandolfi et al. (2012)
Katze	Hypertrophe Kardiomyopathie	<i>MYBPC3</i>	Meurs et al. (2005)

Darüber hinaus erlaubt die genomweite Genotypisierung mit SNP-Markern in Verbindung mit der Anwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes auch das Erkennen von letalen rezessiven Erbdefekten. Auf der Basis des Hardy-Weinberg-Gesetzes können aus den Allelfrequenzen in einer Population die erwarteten Genotypfrequenzen geschätzt werden (Abbildung 6). Wenn der Genotyp homozygot rezessiv gar nicht oder in signifikant niedrigerer Frequenz als erwartet auftritt, liegt der Verdacht auf das Vorliegen einer letalen oder subletalen Defektvariante nahe. Mit diesem Ansatz gelang es VanRaden et al. (2011) 5 neue homozygot letale Defektvarianten beim Rind zu identifizieren. Als alternative Strategie für die Identifizierung von Defektmutanten wurde die Sequenzierung aller kodierenden Bereiche im Genom (= Exom-Sequenzierung) vorgeschlagen (Charlier et al., 2012).

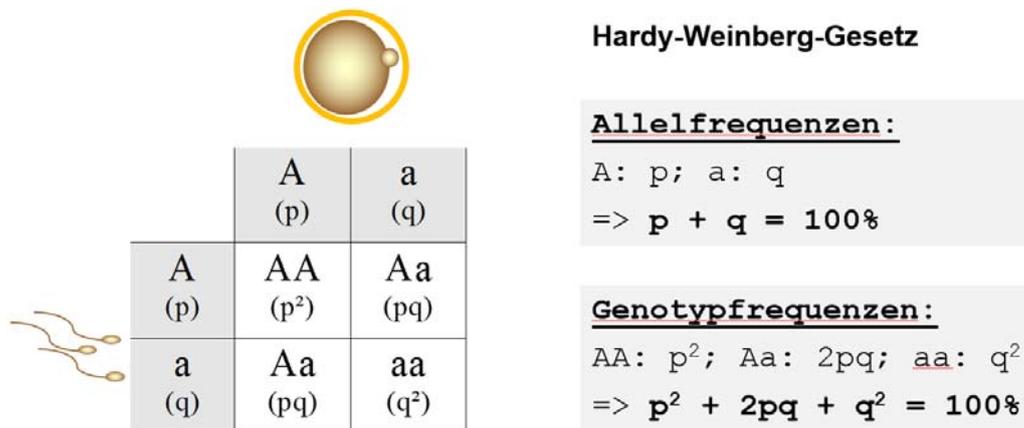


Abbildung 6. Schätzung der erwarteten Genotypfrequenzen aus den gemessenen Allelfrequenzen. Fehlt der Genotyp aa oder liegt seine Frequenz q^2 signifikant unter dem Erwartungswert, ist es ein Hinweis auf ein rezessives homozygot letales oder negativ wirksames Allel in diesem Bereich.

2.4 Genomische Selektion

Neben der Identifizierung von DNA-Varianten, die für monogene Erbkrankheiten oder Merkmale verantwortlich sind, erlauben genomweite SNP-Analysen auch Untersuchungen zur genetischen Komponente von komplexen, multigenen Merkmalen. Traditionell wurde die genetische Veranlagung für solche Merkmale geschätzt, ohne die involvierten Gene konkret zu kennen. Die Selektion der Zuchttiere für die nächste Generation basierte auf Zuchtwerten, die aufgrund von phänotypischen Messungen, Verwandtschaftsverhältnis zwischen Informationsquelle und Proband sowie der Heritabilität (Grad der Erbllichkeit) des jeweiligen Merkmals geschätzt wurden. Die dafür notwendigen Leistungsprüfungen sind allerdings zeit- und kostenaufwendig.

Daher versucht man seit drei Jahrzehnten gezielt die Komponenten der genetischen Varianz zu identifizieren, die zur Ausprägung komplexer Merkmale beitragen, um diese Information in den Selektionsprozess einbeziehen zu können (= markergestützte Selektion, MAS). Ein Ansatz basiert auf der Analyse von Kandidatengenomen, deren Bedeutung für bestimmte Merkmale man zum Beispiel aus physiologischen Studien oder aus Modelltieren kennt. Ein zweiter Ansatz verwendet genetische Marker, um Genomregionen zu identifizieren,

die auf die Ausprägung des untersuchten Merkmals einen signifikanten Einfluss haben. Für die MAS können einerseits Genvarianten verwendet werden, die einen bekannten Einfluss auf die Ausprägung eines Merkmals haben, oder aber Marker, die im Kopplungsungleichgewicht mit einem quantitativen Merkmals-Locus (*Quantitative Trait Locus*, QTL) stehen. Die klassische MAS hat allerdings den Nachteil, dass sie meist nur wenige Marker einbezieht, die in der Summe nur einen geringen Anteil der genetisch bedingten Varianz eines Merkmals erklären (Übersicht in Goddard & Hayes, 2009).

Genomweite Assoziationsstudien (GWA-Studien) basieren darauf, dass in einer Kohorte von Tieren das zu analysierende Merkmal quantitativ gemessen und zudem eine genomweite Genotypisierung mit SNP-Chips durchgeführt wird. Anschließend sucht man nach statistisch signifikanten Assoziationen zwischen Merkmalsausprägung und bestimmten SNPs. Entscheidend für den Erfolg solcher Studien sind die Auswahl und Zahl der untersuchten Tiere sowie der verwendeten SNPs. Meist werden für solche Analysen einfache lineare Modelle eingesetzt, welche den Effekt eines bestimmten SNPs, bestimmte fixe Effekte wie zum Beispiel das Tierkollektiv, aus dem das untersuchte Tier stammt, sowie die polygenen Effekte jedes untersuchten Tieres für das betreffende Merkmal berücksichtigen (Übersicht in Goddard & Hayes, 2009).

Um die Nachteile der klassischen MAS zu überwinden, entwickelten Meuwissen et al. (2001) das Konzept der genomischen Selektion (GS). Die Grundlage dafür ist eine hoch auflösende Genotypisierung mit SNP-Markern, sodass jeder DNA-Locus, der einen Effekt auf die Merkmalsausprägung hat, im Kopplungsungleichgewicht mit mindestens einem SNP-Marker steht. Im Vergleich zur klassischen MAS hat dieses Verfahren den Vorteil, dass ein großer Anteil der genetisch bedingten Varianz für ein Merkmal mit dem genomweiten Marker-Panel erfasst werden kann. Zudem können die Effekte von Marker-Allelen auf der Basis der Population und nicht nur innerhalb einer Familie geschätzt werden. Für die Umsetzung der genomischen Selektion müssen in einer Referenzpopulation (auch Trainingspopulation) von vielen Individuen quantitative Phänotypwerte sowie die Ergebnisse der genomweiten SNP-Genotypisierung vorliegen. Auf dieser Basis wird ein Vorhersage-Algorithmus entwickelt, der den Zuchtwert eines Tieres auf der Basis seiner genetischen Marker vorhersagt. In diesem sogenannten genomischen Zuchtwert wird der Effekt jedes Markers gleichzeitig mit denen der anderen Marker vorhergesagt. Wenn der Zusammenhang zwischen phänotypischer Ausprägung und Marker-Genotyp einmal hergestellt ist, kann die Information auch zur Auswahl von Selektionskandidaten verwendet werden, für die keine Phänotypwerte vorliegen (*Abbildung 7*). Dies ist für Merkmale, die nicht bei jungen Tieren erhoben werden können bzw. deren Erhebung kostspielig ist, besonders vorteilhaft.

Die Präzision der GS kann noch verbessert werden, wenn statt der SNP-Genotypen komplette genomische Sequenzen vorliegen. Das sogenannte 1000 Bullen-Genomprojekt⁵ liefert dafür eine wichtige Datengrundlage. Ziel ist es, die Genome von 1000 Bullen mit hoher

⁵ siehe <http://www.1000bullgenomes.com/>

Auflösung zu sequenzieren. Dafür wurden wichtige Ahnen der heutigen Rinderpopulationen, vor allem eine große Zahl von Holstein Bullen, aber auch Tiere der Rassen Jersey, Fleckvieh, Angus, Brown Swiss und Ayrshire einbezogen. Mit dieser Datengrundlage können für SNP-genotypisierte Nachkommen die Genomsequenzen imputiert werden (Abbildung 7), wodurch die genomischen Zuchtwerte noch genauer geschätzt werden können (Übersicht in Georges, 2014). Die Sequenzdaten der ersten 234 Bullen wurden kürzlich veröffentlicht (Daetwyler et al., 2014). Der Vergleich der Sequenzen ergab über 26 Millionen SNPs sowie 1,6 Millionen Insertionen bzw. Deletionen, von denen bislang fast 80% nicht bekannt waren.

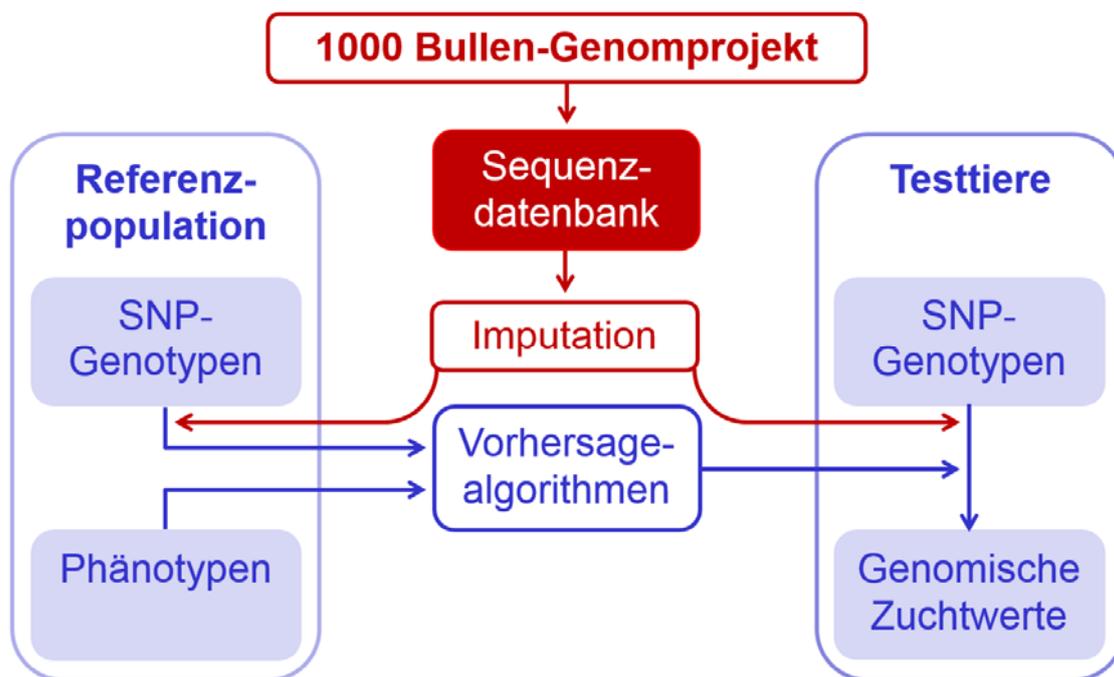


Abbildung 7. Prinzip der genomischen Selektion (GS) und Verbesserung ihrer Genauigkeit durch Imputation von Sequenzdaten (nach Georges, 2014).

Ein weiterer großer Vorteil der GS ist, dass sie bereits im Embryonalstadium durchgeführt werden kann. Dafür wird von potentiell genetisch herausragenden Embryonen eine Biopsie gewonnen, aus der die DNA extrahiert und für molekulargenetische Analysen amplifiziert wird. Diese können einerseits in der Untersuchung von Kandidatengenen, z.B. zur Eliminierung von Erbfehlern, andererseits in einer genomweiten SNP-Typisierung für die genomische Zuchtwertschätzung bestehen (Abbildung 8). Bis zum Abschluss dieser Analysen werden die biopsierten Embryonen kryokonserviert und nach der Selektionsentscheidung aufgetaut und in Zyklus-synchronisierte Empfängertiere übertragen. Die wesentlichen Vorteile der genomischen Evaluation und Selektion von Embryonen sind:

- Ausschluss von Embryonen mit Defektallelen
- Schnellere Erhöhung der Frequenz von gewünschten Allelen (z.B. Hornlosigkeit)
- Übertragung von Embryonen des gewünschten Geschlechts
- Kostenersparnis in den Bereichen Embryotransfer und Empfängerhaltung

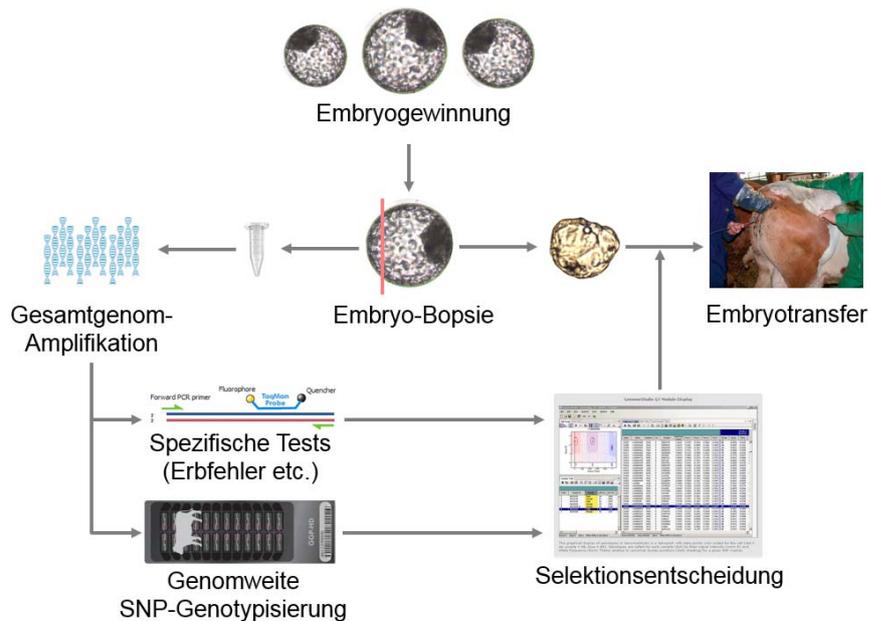


Abbildung 8. Ablauf der genomischen Evaluation und Selektion von Rinderembryonen.

Die Vorreiterrolle in der Einführung der GS hat die Milchrinderzucht übernommen. Bei Milchrindern ist das Verfahren besonders attraktiv, da für die konventionelle Zuchtwertschätzung von Bullen die Leistung der Nachkommen abgewartet werden muss. Während bei der konventionellen Zuchtwertschätzung mit Leistungsprüfung das Generationsintervall in der Selektionslinie der Bullenväter bei über 60 Monaten lag, kann dieses durch die GS auf etwas über 20 Monate verkürzt werden. Zudem können durch den periodischen Wegfall der Leistungsprüfung phasenweise bis zu 90% der Kosten für die Selektion eingespart werden (Übersicht in Stock & Reents, 2013). Ein kompletter Wegfall der Leistungsprüfung ist nicht zu erwarten. Die GS ist eher ein zyklischer Prozess ([Abbildung 9](#)), in dem leistungsgeprüfte Tiere die Trainingspopulation kontinuierlich verbessern und deren genetische Architektur in Richtung der Kandidatentiere, die nur aufgrund ihres genomischen Zuchtwerts selektiert werden, kontinuierlich anpassen.

Durch die genomische Evaluierung von Embryonen sollte es möglich sein, weitere Kosten z.B. im Bereich der Empfängertierhaltung einzusparen. Inzwischen spielt die GS auch in der Fleischrinderzucht sowie in der Schweine- und Geflügelzucht eine zunehmend große Rolle (Übersicht in Stock & Reents, 2013).

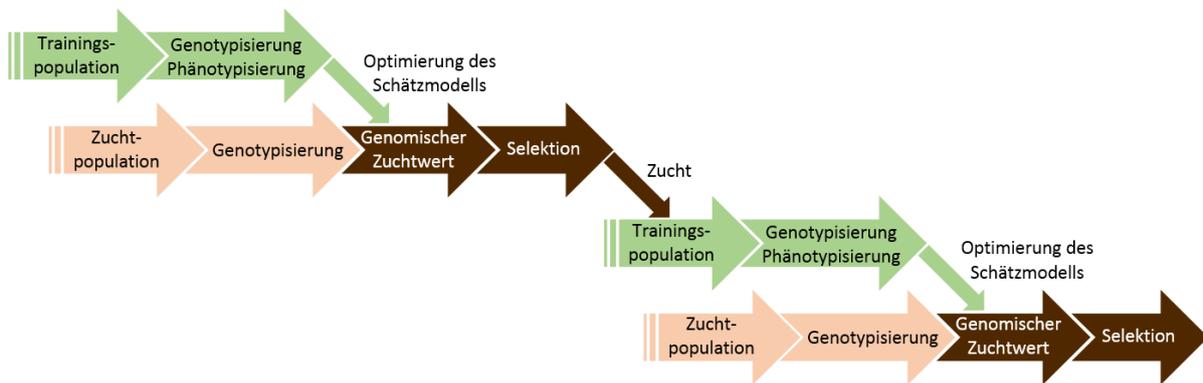


Abbildung 9. Langfristiger Ablauf der genomischen Selektion. Im Zuge der praktischen Durchführung der GS wird die Trainingspopulation immer größer, d.h. vor Jahren genotypisierte Tiere bekommen eine ausreichende Zahl an phänotypisierten Nachkommen. Solche genotypisierten und Nachkommengeprüften Tiere werden in die Trainingspopulation eingegliedert und für eine Rekalibrierung des genomischen Zuchtwertschätzsystems genutzt (Abbildung von PD Dr. Ivica Medugorac).

FAZIT: Die Genomforschung bei Haus- und Nutztieren hat in den letzten Jahren aufgrund der Formation von großen internationalen Konsortien und eines dramatischen Rückgangs der Kosten für die DNA-Sequenzierung enorme Fortschritte erzielt. Neben den Referenz-Genomsequenzen liegen umfangreiche Informationen zur genetischen Variation innerhalb und zwischen Spezies vor. Zudem wurden leistungsfähige Verfahren entwickelt, mit denen diese genetische Variation genomweit und kostengünstig erfasst werden kann. Die Identifizierung monogener Merkmale und Erbfehler ist dadurch erheblich effizienter geworden. Die erfolgreiche Einführung der genomischen Selektion zeigt, dass auch polygene quantitative Merkmale allein aufgrund der Analyse der DNA-Variation verbessert werden können. Zudem liefern die Gesamt-Genomsequenzen auch die Basis für holistische Genexpressionsuntersuchungen auf der Ebene der RNA (Transkriptomik) und der Proteine (Proteomik). Diese Elemente der funktionalen Genomforschung werden zu einem besseren Verständnis der Mechanismen führen, die komplexen Merkmalen zugrunde liegen.

3 STAMMZELLFORSCHUNG BEI HAUS- UND NUTZTIERARTEN

Stammzellen sind ganz allgemein Zellen, die sich in unterschiedlichen Differenzierungsstadien selbst erneuern, unter bestimmten Bedingungen aber auch differenzierte Zellderivate hervorbringen können. Seit der Entdeckung der embryonalen Stammzellen bei der Maus im Jahr 1981 (Evans & Kaufman, 1981) ist die Stammzellforschung eines der zentralen und am meisten geförderten Gebiete in den Lebenswissenschaften. Stammzellen können – abhängig von ihrem Differenzierungspotential – für unterschiedliche Forschungsrichtungen genutzt werden.

Insbesondere pluripotente Stammzellen, die in eine Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen und Geweben differenzieren können (Abbildung 10), sind sehr interessante Modelle für die Entwicklungsbiologie, da Differenzierungsvorgänge *in vitro* beobachtet und die für verschiedene Entwicklungsschritte entscheidenden Faktoren identifiziert werden können (Übersicht in Martello & Smith, 2014). Besonders bedeutsam sind unter diesem Gesichtspunkt pluripotente Stammzellen vom Menschen, da entwicklungsbiologische Prozesse aus ethischen Gründen nicht an menschlichen Embryonen untersucht werden können.

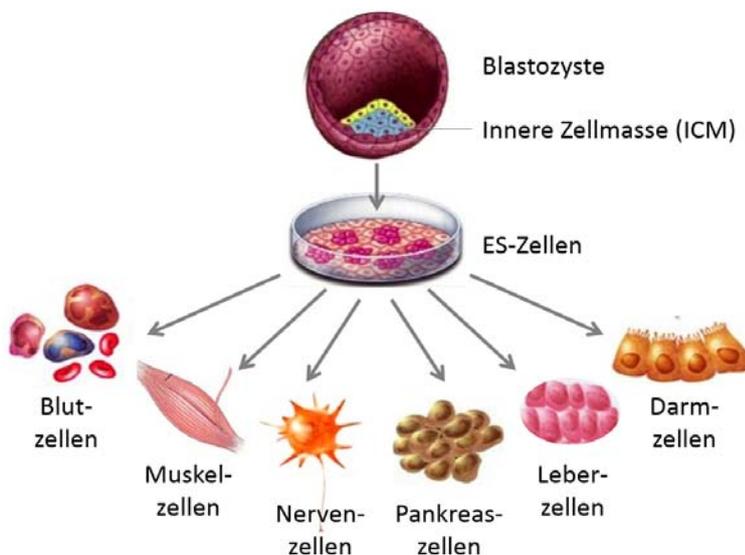


Abbildung 10. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus frühen Embryonalstadien (meist Blastozysten) etabliert und können als permanente pluripotente Zelllinien *in vitro* propagiert werden. Durch gezielte Veränderungen der Kulturbedingungen (z.B. Zusatz von Wachstumsfaktoren) können sie sich in eine Vielzahl differenzierter Zelltypen entwickeln.

Graphikelemente von INTECH⁶.

Eine zweite wichtige Anwendung von pluripotenten Stammzellen ist die Entwicklung von Tiermodellen mit gezielten genetischen Modifikationen. Embryonale Stammzellen von Nagern können aus frühen Embryonalstadien etabliert und als permanente Zellkulturen propagiert werden. In der Zellkultur können mit verschiedenen Verfahren, wie z.B. der Positiv-Negativ-Selektion (Abbildung 11) gezielte genetische Modifikationen, wie die Inaktivierung bestimmter Gene (*Knock-out*) oder die Insertion definierter Sequenzen an einer bestimmten Stelle im Genom (*Knock-in*), eingeführt werden. Die so genetisch modifizierten Stammzellen können anschließend wieder in ein frühes Embryonalstadium injiziert werden, wo sie sich an der Embryogenese beteiligen, inklusive der Ausbildung von Keimzellen. Nach Verpaarung

⁶ <http://www.intechopen.com/source/html/18233/media/image2.jpeg>

solcher chimärer Tiere kann man in der nächsten Generation Mäuse erhalten, welche die ursprünglich in der Zellkultur eingeführte genetische Modifikation in allen Körperzellen haben und – je nach biologischer Auswirkung der Modifikation – zur Etablierung einer genetisch modifizierten Mauslinie verpaart werden können (Abbildung 12).

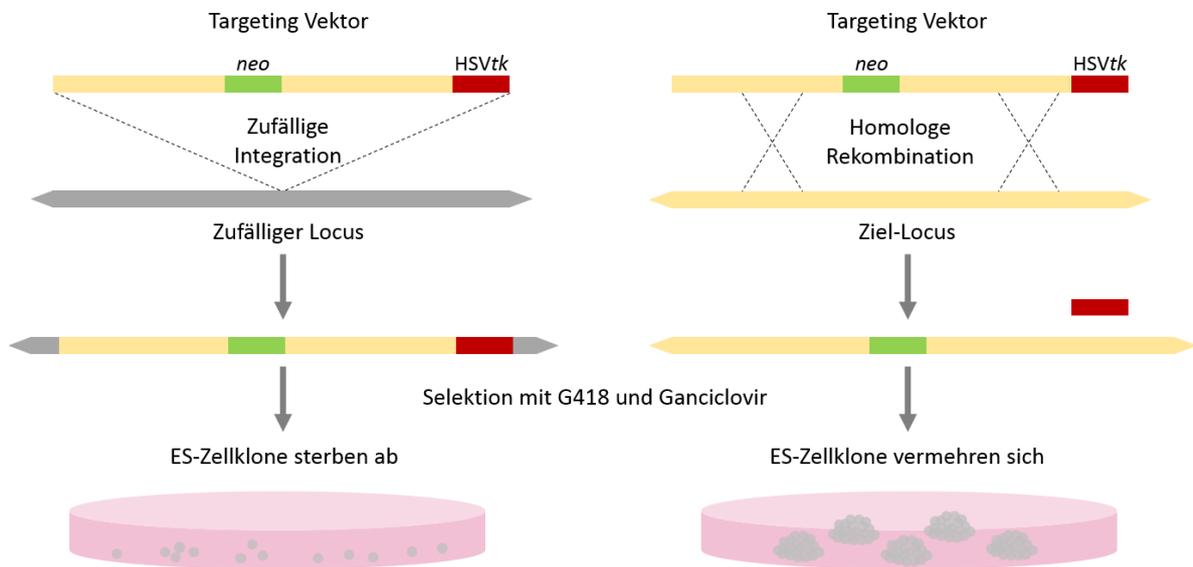


Abbildung 11. Gezielte genetische Modifikation von ES-Zellen mit Hilfe einer Positiv-Negativ-Selektionsstrategie. Dafür verwendet man ein Genkonstrukt (Targeting Vektor), das mit dem zu verändernden Gen (Ziel-Locus) weitgehend sequenzidentisch ist. Der Targeting Vektor trägt intern ein positiv selektierbares Markergen (*neo* = Neomycin-Phosphotransferase; macht resistent gegen G418) und zudem an einem oder beiden Enden ein negativ selektierbares Markergen (*HSVtk* = Thymidinkinase des *Herpes simplex*-Virus; macht Ganciclovir toxisch). Dieses Genkonstrukt wird in ES-Zellen eingeschleust (z.B. durch Elektroporation). Bei einer zufälligen Integration wird meist das gesamte Genkonstrukt eingebaut, weshalb die Zellen bei Doppelselektion mit G418 und Ganciclovir absterben. Im Falle eines gerichteten Einbaus am Ziel-Locus durch homologe Rekombination wird die *HSVtk* Kassette abgespalten, weshalb diese Zellen die Doppelselektion überleben.



Abbildung 12. Erzeugung von Keimbahnchimären mit Hilfe von embryonalen Stammzellen. A) Kolonie von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) auf einem Rasen von Feeder-Zellen. B) Injektion von ES-Zellen in eine Blastozyste. C) Chimäre, deren Keimbahn auf die injizierten ES-Zellen zurückgeht.

Für die Entwicklung dieser bahnbrechenden Strategie der funktionalen Genomforschung im Mausmodell wurden Sir Martin J. Evans, Mario R. Capecchi und Oliver Smithies im Jahr 2007 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Inzwischen gibt es zahlreiche Weiterentwicklungen dieses Ansatzes, die neben konstitutiven genetischen Veränderungen auch induzierbare und/oder Gewebe- bzw. Entwicklungsstadien-spezifische genetische Modifikationen ermöglichen (Übersicht in Glaser et al., 2005).

Ein drittes Anwendungsgebiet von Stammzellen liegt im Bereich der regenerativen Medizin bzw. Stammzelltransplantation. Pluripotente Stammzellen können in der Zellkultur durch Zusatz bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren in verschiedenste Zelltypen differenziert werden. Nach Anreicherung bzw. Aufreinigung eines bestimmten Zelltyps kann dieser verwendet werden, um degenerierte Zellen oder Gewebe zu ersetzen (Übersicht in Keller, 2005). Diese Strategie erscheint besonders attraktiv, wenn pluripotente Stammzellen vom betroffenen Patienten generiert werden, da auf die Weise nach der Transplantation Abstoßungsreaktionen vermieden werden können. Dafür wurde bereits kurz nach der Etablierung der somatischen Kerntransfer-Technologie und der Publikation des damit erzeugten Klonlammes „Dolly“ (Wilmut et al., 1997) das Prinzip des sogenannten „Therapeutischen Klonens“ diskutiert (Lanza et al., 1999). Die zugrunde liegende Idee ist, dass Körperzellen eines Patienten durch den Kerntransfer in eine entkernte Eizelle reprogrammiert, d.h. in ein undifferenziertes Stadium versetzt werden. Dadurch entsteht ein Kerntransfer-Embryo, aus dem pluripotente Stammzellen generiert werden können, und aus diesen wiederum differenzierte Zellerivate für die Behandlung des jeweiligen Patienten (Abbildung 13A).

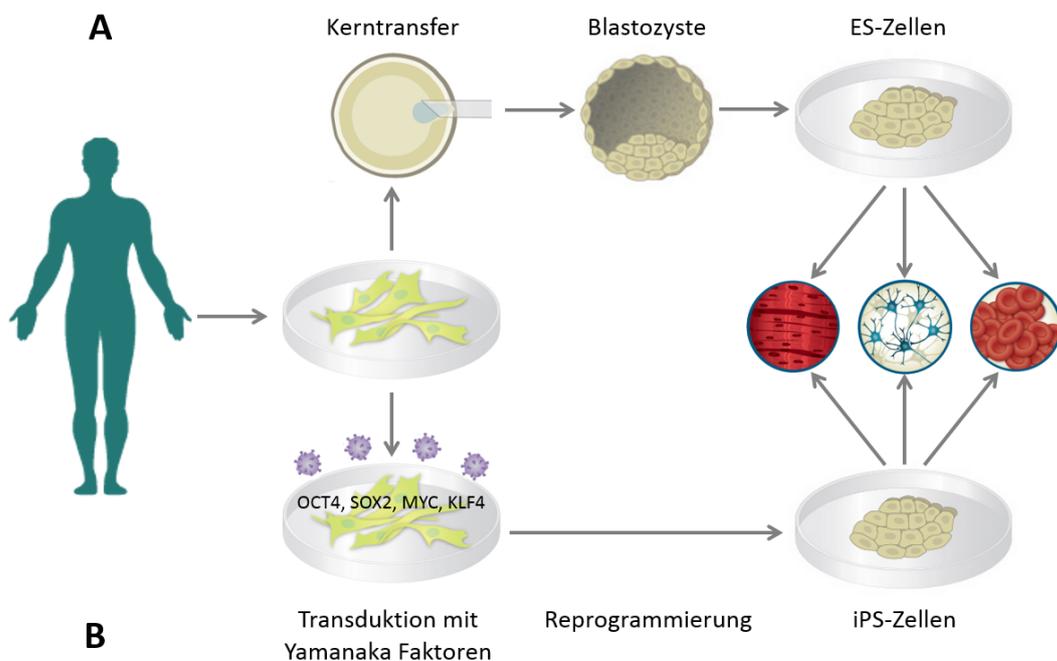


Abbildung 13. Wege der Generierung von Patienten-spezifischen pluripotenten Stammzellen. **A)** „Therapeutisches Klonen“ zur Herstellung von autologen ES-Zellen. **B)** Herstellung von autologen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen).

Dieses an sich einleuchtende Prinzip warf eine Vielzahl von ethischen und rechtlichen Fragen auf, die u.a. mit der Gewinnung der notwendigen Eizellen oder mit der Transplantation potentiell tumorigener Stammzellen zusammenhängen (Kfoury, 2007). Diese Probleme konnten zumindest teilweise durch die bahnbrechende Entdeckung von Shinya Yamanaka, dass eine Reprogrammierung von somatischen Zellen zur Pluripotenz auch durch die transiente Expression von wenigen Reprogrammierungsfaktoren (OCT4, SOX2, MYC, KLF4) möglich ist (Takahashi & Yamanaka, 2006), ausgeräumt werden (Abbildung 13B). Diese induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) gehören im Moment zu den kompetitivsten und meistgeförderten Forschungsgebieten der Lebenswissenschaften. Für ihre Entdeckung wurde Shinya Yamanaka zusammen mit dem Pionier der Reprogrammierungsforschung, Sir John B. Gurdon, im Jahr 2012 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Die nachfolgenden Kapitel geben einen Überblick über den Stand der Stammzellforschung und ihrer Anwendungsgebiete bei Haus- und Nutztieren.

3.1 Pluripotente Stammzellen

Nach der Publikation der ersten pluripotenten ES-Zellen der Maus (Evans & Kaufman, 1981) und dem Nachweis, dass diese in Chimären an der Bildung aller Gewebe einschließlich der Keimbahn teilhaben können (Bradley et al., 1984), gab es große Bestrebungen, entsprechende Zelllinien auch für Haus- und Nutztiere zu etablieren. Einmal sollte damit eine ähnliche Technologie für gezielte genetische Modifikationen wie bei der Maus etabliert werden. Weiterhin wären pluripotente Stammzellen von Haus- und Nutztieren wichtige Modelle für die vergleichende Entwicklungsbiologie. Zudem könnten bei Verfügbarkeit von pluripotenten Stammzellen auch Tiermodelle für die Stammzelltransplantation zur Testung von neuen Strategien der regenerativen Medizin etabliert werden. Nachdem die *International Society for Stem Cell Research (ISSCR)* in ihren *Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells*⁷ ausdrücklich den Einsatz von Großtiermodellen fordert, hat der letztgenannte Punkt besondere Relevanz (Harding et al., 2013). Dabei stehen einerseits das Tumorrisiko nach Übertragung pluripotenter Zellen und andererseits Fragen der besten Applikationsroute und der Biodistribution der applizierten Stammzellen im Vordergrund. Diese Fragen können im Schweinmodell oder anderen Großtiermodellen, die hinsichtlich Größe, Anatomie und Physiologie dem Menschen näher stehen, besser untersucht werden als in den klassischen Nagernmodellen.

Eine Vielzahl von Arbeiten berichten über Zellen, die mithilfe von modifizierten Protokollen der Maus ES-Zellkultur etabliert und als „ES-ähnlich“ charakterisiert wurden. Diese Charakterisierung beruhte meist auf einer morphologischen Evaluierung der Zellkolonien sowie auf der Expression bestimmter Markergene (z.B. *OCT4/POU5F1*, *NANOG*, *SOX2*) bzw. Enzyme (Alkalische Phosphatase) oder Oberflächenantigene (SSEA-1). Allerdings

⁷ <http://www.isscr.org/docs/guidelines/isscrglclinicaltrans.pdf>

wurden wichtige Tests, wie die Fähigkeit zur Bildung von Teratomen nach Injektion in immundefiziente Mäuse oder die Bildung von Chimären nach Injektion in Blastozysten, in den meisten dieser Studien nicht durchgeführt (Übersicht in Koh & Piedrahita, 2014). Obwohl eine Reihe von embryonalen Zelllinien vom Schwein mit „ES-ähnlichen“ Charakteristika publiziert wurden (Brevini et al., 2010; Li et al., 2003; Notarianni et al., 1990; Piedrahita et al., 1990), erwies sich keine als leicht in Kultur zu halten und genetisch zu manipulieren, noch wurde ihre Fähigkeit, sich in Chimären an der Keimbahn zu beteiligen, nachgewiesen. Gleiches gilt für ES-ähnliche Zellen, die aus Rinderembryonen etabliert wurden (Übersicht in Gjorret & Maddox-Hyttel, 2005). Auch aus frühen Embryonalstadien vom Hund wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen ES-ähnliche Zellkulturen etabliert (Übersicht in Schneider et al., 2008), allerdings wurde nur in einer Arbeit ihre Fähigkeit zur Bildung von Teratomen nach Injektion in immundefiziente Mäuse gezeigt (Vaags et al., 2009).

Daher versuchten viele Arbeitsgruppen unmittelbar nach der Erstpublikation von iPS-Zellen der Maus, auf diesem Weg pluripotente Stammzellen von Haus- und Nutztieren zu etablieren. Eine Übersicht dieser Experimente findet sich bei Plews et al. (2012) sowie in der nachfolgenden [Tabelle 2](#). Dafür wurden unterschiedliche Ausgangszellen (z.B. Bindegewebszellen aus Föten oder nach der Geburt gewonnenen Gewebeproben, mesenchymale Stammzellen, Stromazellen aus dem Fettgewebe), Spezies-homologe oder -heterologe Reprogrammierungsfaktoren (OCT2, SOX2, KLF4, MYC = OSKM, z.T. zusätzlich NANOG und LIN28), verschiedene Vektoren (retroviral, lentiviral, nicht-viral) und Expressionssysteme (konstitutiv, induzierbar) sowie weitere spezielle Kulturbedingungen (Zusatz von Wachstumsfaktoren, Proteinkinase-Inhibitoren etc.) verwendet. Der Nachweis der Pluripotenz der erhaltenen putativen iPS-Zellen erfolgte in den meisten Fällen durch die Fähigkeit der Ausbildung sogenannter *Embryoid Bodies* und die Differenzierung in Zellderivate aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm). Zudem wurde nach Injektion von iPS-Zellen die Formation von Mischtumoren (Teratomen) beobachtet, was ebenfalls ein Indiz für Pluripotenz darstellt. Für iPS-Zellen vom Schwein wurde auch die Fähigkeit der Chimärenbildung nach Injektion in frühe Embryonalstadien berichtet (West et al., 2010).

Die ersten iPS-Zellen von Haus- und Nutztieren entsprachen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Proliferationsverhaltens mehr dem „*primed*“ oder „*epiblast-like*“ Typ von pluripotenten Stammzellen, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) und Activin benötigt, um undifferenziert wachsen zu können. Diese Eigenschaft ist auch charakteristisch für humane ES-Zellen. Neuere Ansätze zielen darauf ab, einen „*naive*“ Typ von iPS-Zellen zu entwickeln, der in seinen Eigenschaften mehr den ES-Zellen der Maus entspricht. Dafür werden dem Kulturmedium LIF (*leukemia inhibitory factor*) sowie spezielle Proteinkinase-Inhibitoren zugesetzt, die bestimmte Signalwege der Zellen aktivieren (z.B. WNT-Signalweg) oder inhibieren (z.B. ERK-Signalweg) (Übersicht in Ezashi et al., 2012).

Tabelle 2. Versuche zur Etablierung von induzierten pluripotenten Stammzellen bei Haus- und Nutztierarten.

Spezies	Ausgangszellen	Reprogrammierungsfaktoren	Nachweis der Pluripotenz	Referenz
Schwein	Fötale Fibroblasten	Human OSKM; LV	Embryoid Bodies, Teratome	Ezashi et al. (2009)
Schwein	Fötale Fibroblasten	Human oder Maus OSKM; RV	Teratome	Esteban et al. (2009)
Schwein	Adulte Fibroblasten, Knochenmarkszellen	Human OSKM, NANOG, LIN28; LV; induzierbar	Embryoid Bodies, Teratome	Wu et al. (2009)
Schwein	Mesenchymale Stammzellen	Human OSKM, NANOG, LIN28; LV	Teratome, chimäre NK	West et al. (2010)
Schwein	Fötale Fibroblasten	Maus OSKM; RV	Embryoid Bodies, Teratome	Cheng et al. (2012)
Schaf	Fötale Fibroblasten	Maus OSKM; LV; induzierbar	Embryoid Bodies, Teratome	Li et al. (2011)
Schaf	Adulte Fibroblasten	Human OSKM, NANOG, LIN28; LV; induzierbar	Embryoid Bodies, Teratome	Bao et al. (2011)
Ziege	Adulte Fibroblasten	Maus OSKM, Nanog, Lin28, SV40 large T, hTERT; LV; induzierbar	Embryoid Bodies, Teratome	Ren et al. (2011)
Ziege	Adulte Fibroblasten	Human OSKM, LV	Embryoid Bodies, Teratome	Song et al. (2013)
Rind	Fötale Fibroblasten	Bovin OSKM, NANOG, LIN28; RV	Embryoid Bodies, Teratome	Han et al. (2011)
Rind	Fötale Fibroblasten, adulte Fibroblasten, Follikelzellen	Bovin OSKM, nicht viraler Polypromotor-Vektor	Embryoid Bodies, Teratome	Huang et al. (2011)
Rind	Adulte Fibroblasten	Human O, porcine SKM; LV	Embryoid Bodies, Teratome	Cao et al. (2012)
Hund	Fötale Fibroblasten	Canine OSKM	<i>In vitro</i> Differenzierung	Shimada et al. (2010)
Hund	Stromazellen aus Fettgewebe, adulte Fibroblasten	Human OSKM, LV	Embryoid Bodies, Teratome	Lee et al. (2011)

LV = lentiviraler Vektor; RV = retroviraler Vektor; OSKM = *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*; NK = Nachkommen

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass bei Schwein, kleinen Wiederkäuern, Rind und Hund iPS-ähnliche Zelllinien etabliert wurden, welche über lange Zeit proliferieren und in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren können. Dennoch bleiben eine Reihe von Fragen offen, wie z.B. die Möglichkeit die exogen zugeführten Reprogrammierungsgene abzuschalten, die Effizienz der Chimären-Bildung inklusive Keimbahn-Transmission, wie auch die chromosomale Stabilität der Zelllinien (Koh & Piedrahita, 2014).

Eine weitere wichtige Frage ist, warum die Effizienz der Erstellung von pluripotenten Zelllinien zwischen Spezies so unterschiedlich ist. Dieser Fragestellung widmete sich das EU-

Projekt *PLURISYS (Systems Biology Approaches to Understand Cell Pluripotency)*⁸. Dabei nutzte ein Untersuchungsansatz die frühe Embryonalentwicklung beim Rind als Modell um zu klären, welche Transkriptom-Veränderungen mit dem Verlust der Totipotenz in der frühen Embryonalentwicklung assoziiert sind. Während der frühen Embryonalentwicklung werden maternale RNAs und Proteine, die in der Eizelle gespeichert sind, graduell abgebaut, während die Transkription des embryonalen Genoms schrittweise aktiviert wird. Dieser Prozess wird in der englisch-sprachigen Literatur unter dem Begriff *Maternal-to-Embryonic Transition* (MET) zusammengefasst. Erste Einblicke in den zeitlichen Ablauf der embryonalen Genomaktivierung (EGA) konnten durch autoradiographische Analysen von Embryonen, die während der Kultur [³H]-Uridin aufgenommen und eingebaut hatten, gewonnen werden. Diese Studien zeigten, dass bei Rinderembryonen die Hauptwelle der embryonalen Genomaktivierung im 8- bis 16-Zell-Stadium erfolgt, transkriptionelle Aktivität jedoch auch schon im Einzell-Stadium nachzuweisen ist. Nachfolgende Studien verglichen die Transkriptomprofile von unbehandelten Embryonen mit denen von Embryonen, die mit dem Transkriptioneninhibitor α -Amanitin behandelt worden waren, um so Transkripte embryonalen Ursprungs zu identifizieren (Übersicht in Graf et al., 2014a). Zudem wurden Kandidatengenbasierte sowie holistische Genexpressionsuntersuchungen an verschiedenen Stadien der präimplantativen Embryonalentwicklung durchgeführt und stadienspezifisch charakteristische Transkriptomprofile identifiziert. Allerdings konnte in diesen Studien der Beginn der embryonalen Transkription nur für solche Gene nachgewiesen werden, die nicht in Eizellen exprimiert werden, da anderenfalls nicht zwischen bereits vorhandenen maternalen und neu entstandenen embryonalen Transkripten unterschieden werden konnte. Mittels RNA-Sequencing haben wir holistische Transkriptomanalysen an bovinen Eizellen im Germinalvesikel- bzw. im Metaphase II-Stadium sowie an Embryonen im 4-Zell-, 8-Zell-, 16-Zell- und Blastozysten-Stadium durchgeführt und den bislang umfangreichsten Transkriptom-Datensatz für die Eizell- und frühe Embryonalentwicklung beim Rind erstellt. Dabei wurde der Ablauf der EGA mittels verschiedener Strategien untersucht: i) durch den Nachweis von embryonalen Transkripten, die nicht in Eizellen vorkommen; ii) durch den Nachweis von Transkripten der väterlichen Allele; und iii) durch das Auftreten von ungereiften Transkripten, die Intronsequenzen enthalten. Mit diesen drei Ansätzen konnten wir für fast 7400 Gene den Beginn der embryonalen Expression bestimmen (Graf et al., 2014b). Parallel dazu wurden charakteristische Veränderungen der Zellkernarchitektur beobachtet (Popken et al., 2014a; Popken et al., 2014b). Damit stehen neue Informationsebenen für zukünftige Untersuchungen zu Störungen der frühen Embryonalentwicklung durch genetische, epigenetische und Umweltfaktoren zur Verfügung, die auch zum Verständnis essentieller Mechanismen der Erhaltung von Pluripotenz beitragen können.

⁸ <http://plurisys.biotalentum.eu/>

3.2 Multipotente Stammzellen

Multipotente Stammzellen werden in der Regel aus Geweben von postnatalen Individuen isoliert und bilden die Basis von Regenerationsprozessen in vielen Geweben. Zu den multipotenten Stammzellen gehören beispielsweise sogenannte mesenchymale Stammzellen (MSCs). MSCs sind adhären wachsende, nicht hämatopoietische Stammzellen, die durch die Expression der Zelloberflächenmarker CD90, CD105, CD29 und CD73 sowie durch die Abwesenheit der Marker CD34, CD31, CD45 und CD11b charakterisiert sind und mit bestimmten Behandlungsprotokollen in die osteogene, chondrogene und adipogene Linie differenziert werden können (Übersicht in Ma et al., 2014 und [Abbildung 14](#)). MSCs wurden ursprünglich aus dem Knochenmark isoliert (Prockop, 1997), inzwischen gelang ihre Isolierung aber auch aus verschiedenen anderen Geweben bzw. Substraten, wie z.B. Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskelgewebe, Nabelschnurblut, peripheres Blut, Zahnpulpa und Chorion-Zotten (Übersicht in Madrigal et al., 2014).

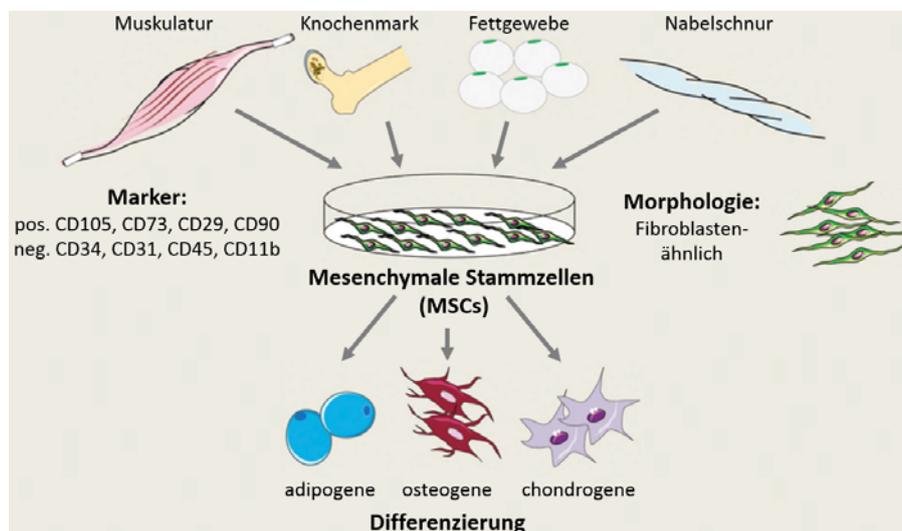


Abbildung 14. Gewinnung und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen (modifiziert nach Ma et al., 2014). CD steht für *Cluster of Differentiation*, die darauf folgenden Nummern bezeichnen unterschiedliche Zelloberflächenmarker, die für bestimmte Zelltypen charakteristisch sind.

In der Humanmedizin wurden viele klinischen Studien mit MSCs für verschiedene Indikationsgebiete durchgeführt (Übersicht in Wei et al., 2013 und [Abbildung 15](#)).

Während man zunächst davon ausging, dass MSCs nach der Applikation differenzieren und defekte Zellen des Empfängers ersetzen können, führt man die Wirkung von MSCs heute überwiegend auf deren Sekretionsprodukte zurück, die sich – je nach Umgebung der MSCs – verändern und therapeutisch genutzt werden können. So stimuliert beispielsweise eine hypoxische Umgebung der MSCs die Produktion von Wachstumsfaktoren und anti-inflammatorischen Molekülen. Eine pro-inflammatorische Umgebung induziert die Sekretion von immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Faktoren. Dabei zeigte sich, dass die Kulturform der Zellen (dreidimensional vs. eindimensional) diese Eigenschaften beeinflusst. Als wichtige Sekretionsprodukte von MSCs wurden u.a. HGF (*Hepatocyte Growth Factor*),

TGF β (*Transforming Growth Factor Beta*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PGE $_2$ (*Prostaglandin E2*) sowie die Galektine 1 und 9 identifiziert. Daher werden MSCs bzw. ihren Sekretionsprodukten positive Eigenschaften für die Behandlung von Autoimmun-Krankheiten, entzündlichen Erkrankungen und Tumoren sowie für die Förderung von Regenerationsprozessen zugeschrieben (Übersicht in Madrigal et al., 2014).

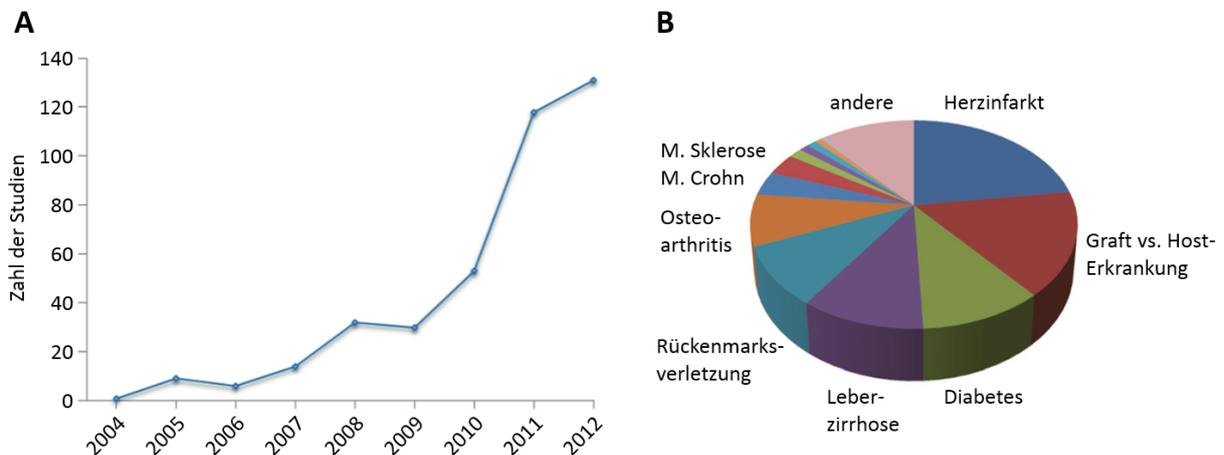


Abbildung 15. Zahl klinischer Studien mit MSCs (**A**) und wichtigste Anwendungsgebiete (**B**) (modifiziert nach Wei et al., 2013). M. Sklerose = Multiple Sklerose; M. Crohn = Morbus Crohn.

Im Bereich der klinischen Tiermedizin werden Stammzellen vor allem für die Behandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparates bei Pferden und Hunden eingesetzt (Fortier & Travis, 2011). Darüber hinaus haben Stammzelltherapien bei Tieren auch einen wichtigen Modellcharakter für die therapeutische Anwendung von Stammzellen beim Menschen. Dabei unterliegen Stammzelltherapien bei Tieren keinen regulatorischen Auflagen, die Zelltherapien beim Menschen vergleichbar sind (Fortier & Travis, 2011). In vielen durchgeführten Studien ist jedoch unklar, über welchen Wirkmechanismus Stammzelltherapien zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen. Insbesondere bleibt - wie oben bereits ausgeführt - oft die Frage offen, ob Stammzellen in gewebespezifische Zellen, wie z.B. in Knorpel-, Knochen- oder Sehngewebe, differenzieren, oder ob die Effekte auf immunmodulatorische Wirkungen bzw. auf die Sekretion von bioaktiven, trophischen Faktoren zurückzuführen sind. Auch eine Kombination beider Effekte wird als möglicher Wirkmechanismus diskutiert. Die Frage, ob Stammzellen immunmodulatorische Wirkungen haben, ist klinisch relevant, da davon abhängt, ob körpereigene Stammzellen verwendet werden müssen oder auch eine Allotransplantation von Stammzellen möglich ist.

In der Behandlung von Sehnen-, Bänder- und Knorpel-/Gelenkerkrankungen bei Hunden und Pferden sind derzeit drei verschiedene Ansätze von MSC-Therapien im Einsatz (Fortier & Travis, 2011):

- MSCs aus dem Knochenmark, die in der Zellkultur expandiert werden (*Culture-Expanded Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells* = BM-MSCs)
- Konzentriertes Knochenmark (*Bone Marrow Concentrate* = BMC)

- Stammzellen aus der Stroma-/Gefäßfraktion von Fettgewebe (*Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells = AD-SVF*)

In vitro expandierte BM-MSCs haben den Vorteil, dass sie besser als andere Stammzell-Präparationen in verschiedene Zelltypen des muskulo-skelettalen Systems differenzieren können (Kisiday et al., 2008). Die Aspiration von Knochenmark erfolgt beim Pferd unter Sedation oder Narkose aus dem Brustbein oder Hüfthöcker, bei Hunden wird Knochenmark in der Regel aus dem proximalen Oberarm- oder Oberschenkelknochen bzw. auch aus dem Hüfthöcker gewonnen. Ein Nachteil der Verwendung dieses Zelltyps ist die mehrere Wochen lange Kulturphase zwischen Gewinnung und therapeutischer Applikation (Fortier & Travis, 2011).

Bei der Anwendung von BMC ist die Konzentration von Stammzellen erhöht, wodurch die Zeit von der Diagnose bis zur Zell-Applikation verkürzt werden kann. Zudem haben der hohe Gehalt an Blutplättchen sowie Wachstumsfaktoren zusätzlich positive Effekte auf regenerative Prozesse (Fortier et al., 2010). BMC enthält Fibrinogen, das durch den Zusatz von Thrombin in Fibrin konvertiert werden kann und so eine dreidimensionale Matrix für die transplantierten Zellen und Wachstumsfaktoren bildet.

AD-SVF Zellen stellen ein Gemisch verschiedener Zelltypen dar, die aus chirurgisch entferntem Fettgewebe gewonnen werden. Die Zellen werden nach ihrer Isolierung ohne längere Zwischenkultur dem Patienten appliziert. Auf diese Weise können große Zellmengen gewonnen werden, allerdings sind nur wenige Prozent tatsächlich Stammzellen (Jurgens et al., 2008).

Wesentliche Fragen, die derzeit im Hinblick auf die klinische Anwendung von Stammzellentherapien bei Haus- und Nutztieren diskutiert werden, sind (Fortier & Travis, 2011):

- die beste Quelle von Stammzellen für die jeweilige Applikation
- die notwendige Zahl von Stammzellen für eine effektive Geweberegeneration
- die beste Applikationsroute (lokal vs. systemisch)
- die Konfektionierung des Stammzellpräparats, zum Beispiel in speziellen Matrices bzw. in Kombination mit Wachstumsfaktoren

Obwohl diese Fragen nicht abschließend beantwortet sind, werden vor allem Stammzellen aus dem Fettgewebe bereits kommerziell verwendet, um traumatische oder degenerative Erkrankungen im Bereich von Sehnen, Bändern und Gelenken von Pferden, Hunden und Katzen zu behandeln⁹. Erste klinische Studien mit Stammzellen aus dem Fettgewebe, die zum Beispiel bei Sehnenenerkrankungen von Pferden (Nixon et al., 2008) oder bei Osteoarthritis von Hunden (Black et al., 2007) durchgeführt wurden, zeigen tatsächlich einen positiven Effekt. Trotzdem sollten sich Forschungsprojekte akademischer Einrichtungen darauf konzentrieren, die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um die Effizienz der Stammzelltherapien weiter verbessern zu können.

⁹ <https://www.vet-stem.com/science.php>

3.3 Spermatogoniale Stammzellen

Spermatogoniale Stammzellen (SSCs) bilden die Grundlage der Spermatogenese und halten diese lebenslang durch Proliferation und Differenzierung aufrecht. SSCs sind in der basalen Schicht der *Tubuli seminiferi* des Hodens lokalisiert ([Abbildung 16](#)) und in der Lage, sich selbst zu erneuern sowie Tochterzellen zu produzieren, die final in Spermien differenzieren können (Phillips et al., 2010). Als wesentlicher Faktor für die Selbsterneuerung von SSCs wurde GDNF (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*) identifiziert (Meng et al., 2000), und auf der Basis dieser Erkenntnis wurden Kulturbedingungen etabliert, mit denen die wenigen SSCs im Hoden *in vitro* expandiert werden können (Kanatsu-Shinohara et al., 2003). Die dabei involvierten Signalkaskaden sind Gegenstand eines kürzlich publizierten umfangreichen Übersichtsartikels (Kanatsu-Shinohara & Shinohara, 2013).

SSCs sind die einzigen adulten Stammzellen, die genetische Information in die nächste Generation transmittieren können. Diese besondere Eigenschaft macht sie für die Biotechnologie sehr interessant.

Das hervorragende Ziel der Verwendung von SSCs von Tieren ist die Konservierung oder Manipulation der männlichen Keimbahn (Dobrinski & Travis, 2007). Dafür wird eine gemischte Population von Keimbahn-Zellen, möglichst angereichert für SSCs, aus dem Hoden eines Spenders isoliert. Die isolierten Zellen werden dann retrograd in das Samen-ableitende System (*Rete testis*) eines Empfängerhodens injiziert. Die transplantierten SSCs attachieren an Sertoli-Zellen und wandern dann im Samenkanälchen von der luminalen Seite in Richtung Basalmembran, siedeln sich dort an und können die Spermatogenese beginnen (Übersicht in Kanatsu-Shinohara & Shinohara, 2013). Dabei müssen sie die *Tight Junctions* zwischen Sertoli-Zellen überwinden ([Abbildung 16](#)), was als kritischer Schritt bei der Besiedelung des Empfängerhodens gesehen wird.

Die Kolonialisierung des Hodens durch die injizierten SSCs kann durch vorangehende Bestrahlung des Hodens (Honaramooz et al., 2005; Kim et al., 2008) oder die Behandlung des Empfängertieres mit Busulfan (Brinster & Zimmermann, 1994; Hill & Dobrinski, 2006), wodurch die eigenen SSCs des Empfängers geschädigt werden, verbessert werden. Nach ausreichend langer Zeit, um eine Kolonialisierung des Hodens, die Proliferation der SSCs und die Spermatogenese zu ermöglichen, wird vom Empfängertier Samen gewonnen und im Hinblick auf den relativen Anteil von Spermien, die ihren Ursprung in den übertragenen SSCs haben, untersucht.

Nach der erfolgreichen Etablierung des Verfahrens bei Maus (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994) und Ratte (Ogawa et al., 1999) wurde der Transfer von SSCs auch bei anderen Spezies versucht (Übersicht in Zheng et al., 2014). Dabei wurden für SSCs verschiedener Haus- und Nutztierarten entweder Empfänger der jeweils gleichen Art oder Mäuse verwendet. Nach Xenotransplantation von SSCs aus Ebern, Bullen, Hengsten, Katern und Rüden in Maushoden wurde zwar eine Ansiedlung der SSCs im Empfängerhoden, aber keine Spermatogenese beobachtet. Nach Allotransplantation von SSCs kam es jedoch beim Eber (Honaramooz et al., 2002), Bullen (Herrid et al., 2006; Izadyar et al., 2003),

Ziegenbock (Honaramooz et al., 2003), Schafbock (Herrid et al., 2009) und Rüden (Kim et al., 2008) zu einer kompletten Spermatogenese, beim Ziegen- und Schafbock sogar zu Nachkommen aus den transplantierten SSCs (Herrid et al., 2009; Honaramooz et al., 2003).

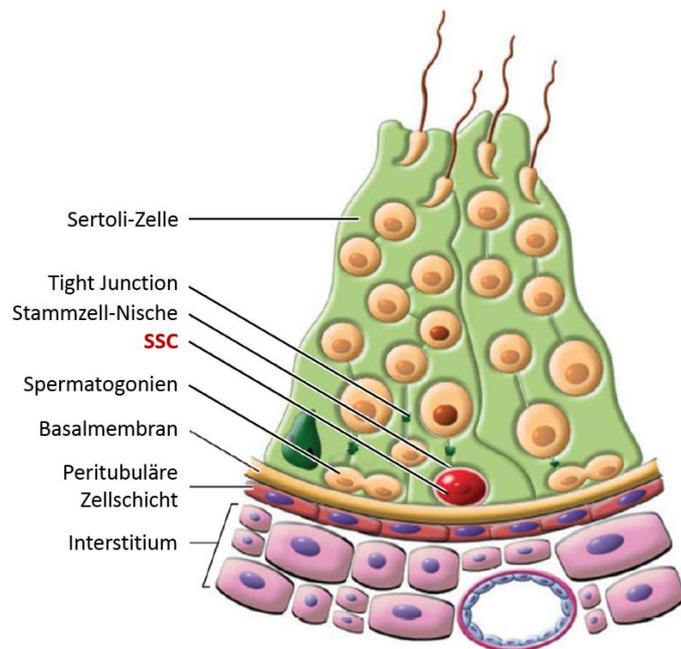
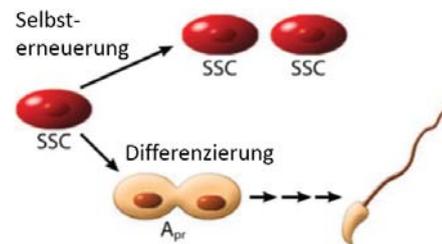


Abbildung 16. Position von spermato gonialen Stammzellen (SSCs) im Samenkanälchen (links) und Mechanismus der asymmetrischen Teilung (unten).



(nach Oatley & Brinster, 2008).

Insbesondere beim Rind wurde die Transplantation von SSCs als Alternative zur künstlichen Besamung diskutiert, wenn diese aus logistischen oder sonstigen Gründen schwierig oder unmöglich durchgeführt werden kann (Übersicht in Hill & Dobrinski, 2006). Ein mögliches Szenario ist in **Abbildung 17** skizziert. Die Expansion von SSCs aus Elite-Bullen hätte zudem das Potential, nach Transplantation in mehrere Empfängerbullen eine theoretisch unlimitierte Zahl von Samenportionen des Elite-Bullen zu produzieren. Darüber hinaus bestünde auch die Möglichkeit, in kultivierten SSCs genetische Modifikationen vorzunehmen. Durch klonale Expansion von SSCs mit der gewünschten Modifikation und Transfer in Empfängerhoden könnte die Modifikation in der Population verbreitet werden. Die Isolierung, Expansion und Kryokonservierung von SSCs ist auch eine Möglichkeit Genomreserven anzulegen. SSCs haben dabei im Vergleich zur Kryokonservierung von Spermien den Vorteil, dass sie bereits von Tieren vor der Pubertät gewonnen werden können.

Die in **Abbildung 17** skizzierte Strategie wurde in einem Projekt der *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO)* als Teil des *CSIRO National Research Flagship Program* in Australien verfolgt¹⁰, seit dieser Kurzmitteilung aus dem Jahr 2005 sind allerdings keine weiteren Erfolgsberichte zu finden, so dass dieser Ansatz insgesamt wenig aussichtsreich erscheint.

¹⁰ <http://www.publish.csiro.au/paper/SRB05Abs021.htm>

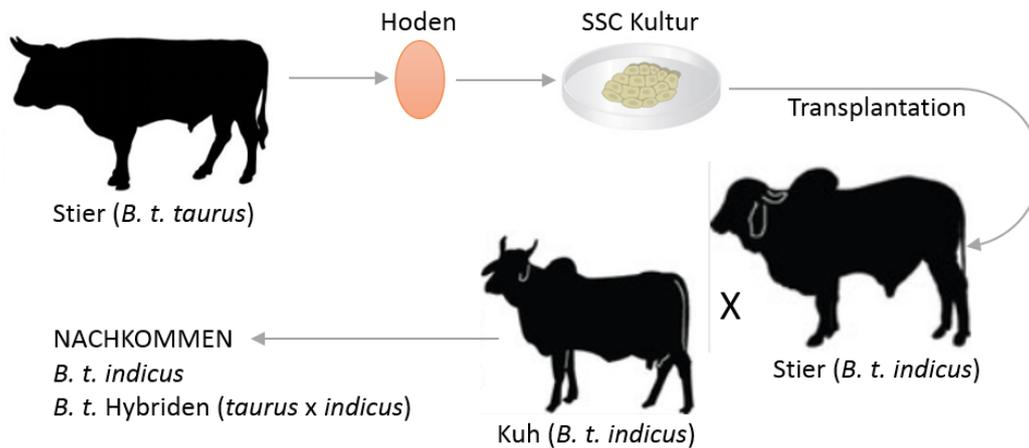


Abbildung 17. Transplantation von spermatogonialen Stammzellen (SSCs) zur Erzeugung von *Bos taurus* (*B. t.*) *taurus* x *B. t. indicus* Hybriden in tropischen Gebieten bei extensiver Haltung. *B. t. taurus* Stiere können unter den extremen klimatischen Bedingungen nicht gut überleben. Künstliche Besamung ist aus logistischen Gründen nicht möglich. Man könnte jedoch SSCs von *B. t. taurus* Stieren isolieren, vermehren und in die Hoden von *B. t. indicus* Stieren transplantieren. Je nach Vorbehandlung der Empfängerstiere und Besiedelung ihrer Hoden mit den transplantierten SSCs sollte nach Paarung mit *B. t. indicus* Kühen ein großer Anteil der Nachkommen den gewünschten Hybrid-Genotyp haben.

FAZIT: Basierend auf den bahnbrechenden Fortschritten der Stammzellforschung bei Nagern und beim Menschen wurden auch im Bereich der Haus- und Nutztiere große Aktivitäten gestartet, um pluripotente Stammzellen zu entwickeln. Bislang gelang es allerdings nicht, bei diesen Spezies nachweislich embryonale Stammzellen, welche die Keimbahn von chimären Embryonen besiedeln können, zu etablieren. Ein neuer Ansatz ist die Entwicklung von iPS-Zelllinien, über die es insbesondere für das Schwein eine Reihe von Berichten gibt. Allerdings kann der pluripotente Charakter der Zellen meist nur erhalten werden, wenn die Reprogrammierungsgene, die exogen zugefügt wurden, permanent exprimiert bleiben. Nur in einer einzigen Studie wurde die Fähigkeit zur Chimärenbildung dokumentiert. Durch neue Methoden der holistischen Transkriptom- und Proteomanalytik und speziesübergreifende Untersuchungsansätze versucht man, die molekularen Ursachen für die unterschiedliche Fähigkeit der Bildung von pluripotenten Zelllinien zu verstehen. Spermatogoniale Stammzellen von Haus- und Nutztieren werden als Modell für *in vitro* Studien der Gametogenese oder als Substrat für das Anlegen von Genomreserven, aber auch für Transplantationszwecke diskutiert. Mesenchymale Stammzellen werden als Behandlungsansatz für degenerative Erkrankungen bereits in der tiermedizinischen Praxis eingesetzt, allerdings gibt es nur wenige Studien, die den Behandlungserfolg wissenschaftlich eindeutig dokumentieren. Insgesamt bleibt festzustellen, dass im Bereich der Stammzellforschung bei Haus- und Nutztieren die wissenschaftlichen Erfolge bei Maus und Mensch nur eingeschränkt reproduziert werden konnten. Zumindest im Bereich der genetischen Modifikation, für die embryonale Stammzellen im Mausmodell eine entscheidende Rolle gespielt haben und nach wie vor spielen, gibt es bei den Nutztieren leistungsfähige alternative Technologien, die im nächsten Kapitel dargestellt und diskutiert werden.

4 MÖGLICHKEITEN UND ZIELSETZUNGEN DER GEZIELTEN GENETISCHEN VERÄNDERUNG VON NUTZTIEREN

4.1 Gentransfer und *Gene Targeting*

Nachdem verschiedene Verfahren der genetischen Modifikation von Nutztieren vor allem für das Schwein entwickelt und eingesetzt wurden, wurde der Fokus im vorliegenden Gutachten auf diese Spezies gelegt. Die Meilensteine der genetischen Modifikation von Schweinen sind in [Abbildung 18](#) zusammengefasst.

Die ersten transgenen Schweine wurden durch DNA-Mikroinjektion in die Vorkerne von befruchteten Eizellen (Zygoten) generiert (Brem et al., 1985; Hammer et al., 1985). Die Limitationen dieser Technik liegen in der vergleichsweise niedrigen Effizienz (wenige Prozent transgene Nachkommen pro injizierte und in Empfängertiere übertragene Zygoten), der Entstehung von genetischen Mosaiken, welche die injizierte DNA nur in einem Teil ihrer Körper- und Keimzellen eingebaut haben, sowie im zufälligen Einbau der exogenen DNA im Genom, weshalb eine gezielte genetische Modifikation, z.B. das Ausschalten eines bestimmten Gens, mit dieser Technik unmöglich ist.

Diese Nachteile existieren analog für den Spermien-vermittelten Gentransfer nach normaler Befruchtung (Lavitrano et al., 2002) bzw. nach Injektion von Spermien in das Zytoplasma von Eizellen (ICSI) (Kurome et al., 2006; zur Übersicht siehe Aigner et al., 2010).

Neben diesen Verfahren ist die Verwendung von lentiviralen Vektoren eine weitere Option für die genetische Modifikation von Schweinen. Diese Vektoren können – neben somatischen Zellen – auch porcine Oozyten oder Zygoten sehr effizient transduzieren, woraus ein hoher Anteil transgener Ferkel (bis >80%) resultieren kann (Hofmann et al., 2003). Allerdings hat auch diese Technik entscheidende Nachteile. Zum einen ist die Größe der mit lentiviralen Vektoren übertragbaren DNA-Konstrukte limitiert auf etwa 8 Kilobasenpaare, zum anderen gibt es nach lentiviralem Gentransfer oft multiple unabhängige Integrationsstellen im Genom, mit der Konsequenz einer zufälligen Segregation in nachfolgenden Generationen. Letzteres kann auch bei der Verwendung von Transposon-Systemen wie *Sleeping Beauty* beobachtet werden (Garrels et al., 2011; Jakobsen et al., 2011).

Einen großen Durchbruch erzielte man mit der Etablierung der Kerntransfer-Klonierung (*Somatic Cell Nuclear Transfer* = SCNT) beim Schwein (Betthausen et al., 2000; Onishi et al., 2000; Polejaeva et al., 2000), wodurch die technologische Grundlage für eine gezielte Genmodifikation dieser Spezies geschaffen wurde (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002). Mit Hilfe des Kerntransfers aus genetisch modifizierten Zellen wurden zudem die ersten Schweine generiert, in denen über das binäre Tet-On System die Expression von Transgenen exogen durch Behandlung mit Doxycyclin induzierbar ist (Klymiuk et al., 2012a). In einer vielschichtigen Datenanalyse wurden die wesentlichen Einflussfaktoren identifiziert, welche für den Erfolg der genetischen Modifikation von Schweinen mittels SCNT-Technologie eine Rolle spielen (Kurome et al., 2013).

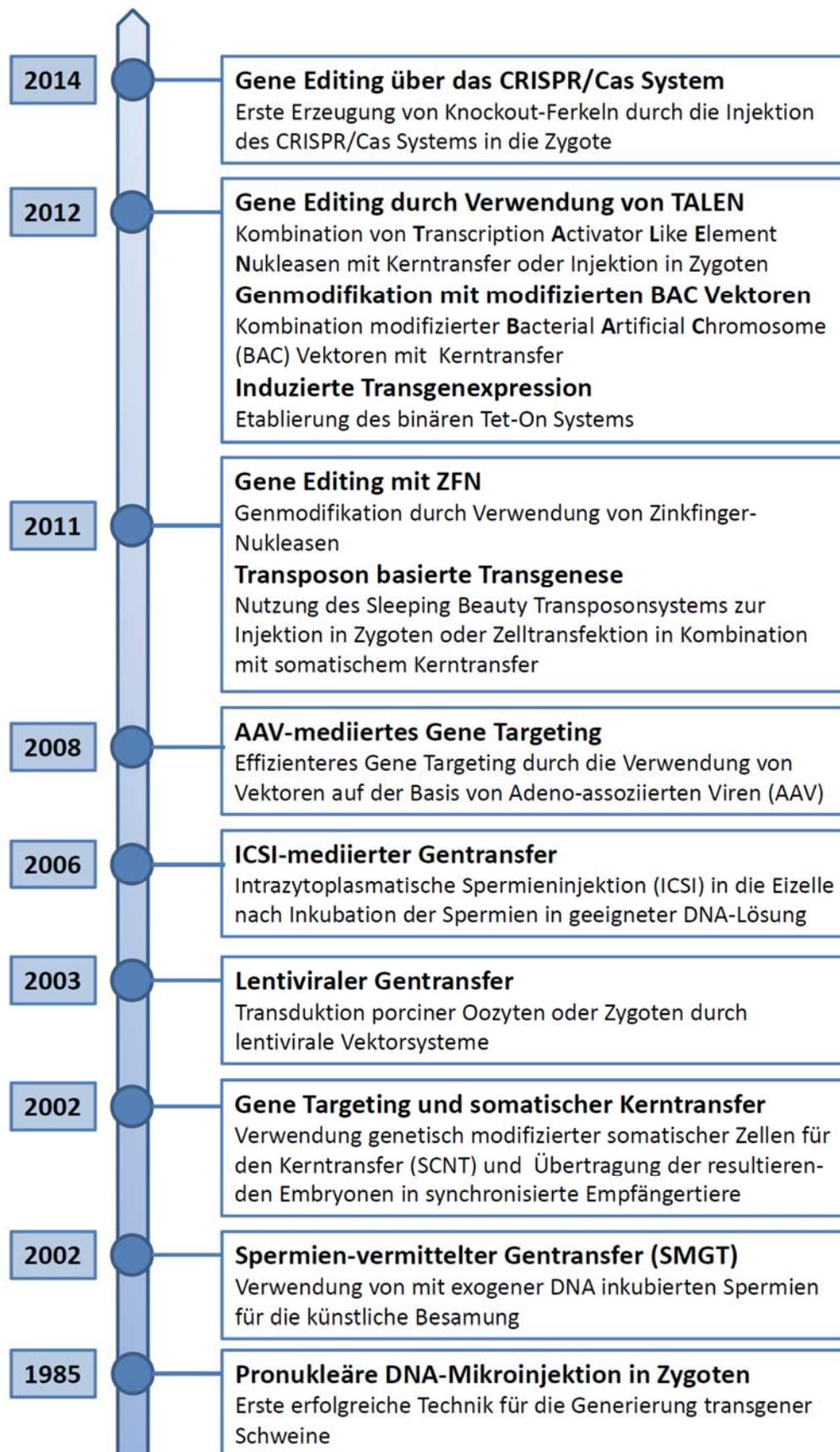


Abbildung 18. Meilensteine der genetischen Modifikation von Schweinen (aus Dmochewitz & Wolf, 2015).

Die Verfügbarkeit einer Gesamtgenom-Sequenz vom Schwein (Groenen et al., 2012) und die Entwicklung effizienter Methoden zur genetischen Modifikation ermöglichten in den letzten Jahren die Etablierung einiger maßgeschneiderter Schweinemodelle für die translationale biomedizinische Forschung.

Der Zellkerntransfer aus genetisch veränderten Spenderzellen ist die gebräuchlichste Methode zur Generierung von Schweinen mit zielgerichteter Mutation (detaillierte Beschreibung der Methodik in Kurome et al., 2015). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der homologen Rekombination (HR) zwischen Zielgen und modifizierter Zielgen-DNA in einem sogenannten Targeting Vektor, der in die Zelle eingeschleust wird. Die HR ist eine effiziente und standardmäßig etablierte Technik in embryonalen Stammzellen der Maus. Da es bislang nicht gelang, für die Spezies Schwein embryonale Stammzellen oder funktionell äquivalente pluripotente Stammzellen zu etablieren, müssen somatische Zellen verwendet werden, in denen homologe Rekombination in nur einer von 10^5 bis 10^7 Zellen erfolgt und damit äußerst selten auftritt (Vasquez et al., 2001). Durch verschiedene Strategien, wie Positiv-Negativ-Selektion (Jin et al., 2003), *Gene-Trapping* (Lai et al., 2002) oder die Verwendung Adeno-assoziiierter Viren (AAV) als Vektoren (Rogers et al., 2008a) wurde versucht, das Problem der geringen Rate an homologer Rekombination in somatischen Zellen zu überwinden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung sehr großer Targeting Vektoren, z.B. modifizierter BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), da eine Verlängerung der zur Zielstruktur homologen Regionen sich positiv auf die Rate homologer Rekombination auswirkt. Für den porcinen Dystrophin (*DMD*) Locus (Klymiuk et al., 2013) führte die Anwendung modifizierter BAC-Vektoren in primären Nierenzellen (Richter et al., 2012) zu einer Targeting Rate von über 1%.

4.2 Genome Editing

In den letzten Jahren verlagerte sich der Fokus auf die Entwicklung Nuklease-basierter Technologien, die neue Möglichkeiten für die genetische Modifikation im Schwein eröffnen. Die eingesetzten Nukleasen verursachen ortsspezifisch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) und aktivieren dadurch das zelluläre DNA-Reparatursystem. DSB werden hauptsächlich über zwei Mechanismen repariert: das nichthomologe End-Joining (NHEJ) oder die homologe Rekombination (HR) (van Gent et al., 2001). Beide Mechanismen können genutzt werden, um eine Modifikation an einer bestimmten Stelle zu generieren (= *Gene Editing*). In Säugerzellen ist das NHEJ der im Zellzyklus favorisierte Reparaturmechanismus (Fattah et al., 2010) und beruht auf der einfachen Verknüpfung der aufgewundenen DNA-Enden. Ohne homologe DNA-Matrizen entstehen auf diese Weise oft kleine Insertionen oder Deletionen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*) und damit zum Funktionsverlust des betroffenen Gens führen können. Wird nun eine Matrize mit homologen Sequenzen der Zielregion (DNA oder einzelsträngiges Oligodeoxynukleotid) zusammen mit der spezifischen Nuklease eingebracht, kann der Reparaturmechanismus der homologen Rekombination genutzt werden, um gezielt eine Punktmutation oder auch eine längere Sequenz an einer spezifischen

Stelle im Genom einzuführen. Dadurch besteht die Möglichkeit, ein für die jeweilige humane Erkrankung individuell zugeschnittenes Tiermodell zu generieren.

Für die gezielte Genmodifikation im Schwein stehen bisher drei verschiedene Klassen von zielgerichteten Nukleasen zur Verfügung (Abbildung 19): Zinkfingernukleasen (ZFNs) (Hauschild et al., 2011; Whyte et al., 2011), Transcription Activator-Like Effector Nukleasen (TALENs) (Carlson et al., 2012) und zuletzt die aus dem bakteriellen CRISPR/Cas System stammenden RNA-Guided Endonukleasen (RGENs) (Hai et al., 2014). Der wesentliche Vorteil des Nuklease-basierten *Gene Editing* liegt in der Möglichkeit einer direkten zytoplasmatischen Injektion in die Zygote, ohne auf den somatischen Zellkerntransfer zurückgreifen zu müssen.

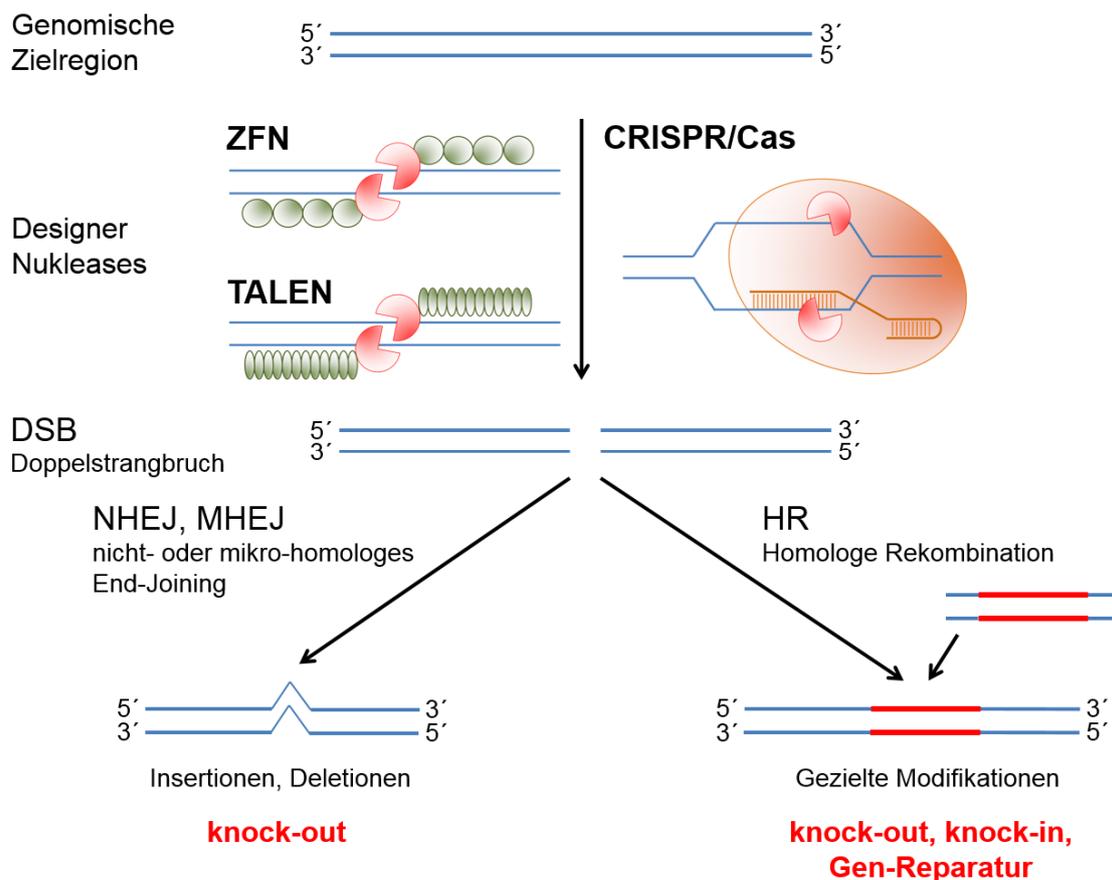


Abbildung 19. Prinzip des *Genome Editing*. Durch eine zielgerichtete Nuklease wird ein DNA-Doppelstrangbruch induziert, der durch verschiedene Mechanismen repariert werden kann. Die Reparatur durch nicht-homologes oder mikro-homologes End-Joining führt meist zu Mutationen, welche das Gen inaktivieren können. Die Reparatur durch homologe Rekombination ermöglicht die Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz oder aber die gezielte Insertion einer exogen zugegebenen Sequenz (Abbildung von Dr. Nikolai Klymiuk).

Sowohl ZFNs als auch TALENs sind artifizielle Fusionsproteine, in denen die Nuklease FokI mit einer sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (Zinkfingermotiv oder gekürzte Transcription Activator-Like Effector Domäne) gekoppelt ist (Kim et al., 1996; Miller et al., 2011). Um aktiv zu sein, muss die Nuklease FokI als Dimer vorliegen (Bitinaite et al., 1998). ZFN-Monomere enthalten ein Tandem-Array von 3-6 Zinkfingermotiven, die jeweils 3

Basenpaare der DNA-Sequenz erkennen. Somit kann ein ZFN-Dimer spezifisch an eine Zielsequenz mit einer Länge von 18-36 Basenpaaren binden. Die Kombinationsmöglichkeiten sind allerdings eingeschränkt, so dass es nur etwa alle 100 Basenpaare eine Bindungsstelle für ein ZFN-Dimer gibt (Kim et al., 2009).

Die DNA-Bindungsdomäne von TALENs, gewonnen aus pflanzenpathogenen *Xanthomonas spp.*, besteht aus Tandem-Arrays von 33-35 sich wiederholenden Aminosäuren, die jeweils ein einzelnes Nukleotid erkennen. Die Basenspezifität ist durch zwei Aminosäuren an Position 12 und 13 festgelegt, die als „Repeat Variable Diresidues“ (RVDs) bezeichnet werden (Miller et al., 2011). Obwohl die Etablierung neuer TALEN aufgrund ihrer repetitiven Sequenzen nicht trivial ist, liegt ihr großer Vorteil im Vergleich zu den ZFN in einer größeren Flexibilität, da fast jede beliebige DNA-Sequenz durch das Arrangement von Tandemwiederholungen gezielt angesteuert werden kann.

Im Jahr 2013 wurde eine neue Klasse ortsspezifischer Nukleasen, die RNA-Guided Nukleasen (RGNs) aus dem CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas (CRISPR assoziiertem) System für ein erfolgreiches *Gene Editing* in einer Vielzahl von Zellen und Organismen etabliert. CRISPR Sequenzen und Cas Proteine sind zwei Elemente eines konservierten adaptiven Restriktionssystems in Prokaryoten. CRISPRs repräsentieren eine Ansammlung von kurzen, sich wiederholenden Nukleotid-Sequenzen, die sich mit kleinen singulären, aus Phagen oder Plasmiden stammenden DNA-Sequenzen abwechseln und dadurch eine Art molekulares Gedächtnis bilden (zum Überblick, siehe Seruggia & Montoliu, 2014). Diese CRISPR Regionen werden in zielspezifische crRNA und zielunabhängige *trans*-activating crRNA (tracrRNA) transkribiert, welche hybridisieren und mit der Cas-Nuklease einen Komplex bilden, der fremdes genetisches Material, welches mit der CRISPR-abhängigen RNA übereinstimmt, erkennt und spaltet (Bhaya et al., 2011). Aus diesem komplexen System wurde ein elegantes Verfahren für das *Gene Editing* entwickelt, indem man crRNA und tracrRNA zu einer synthetischen, sogenannten small guide RNA (sgRNA) zusammenfasste, in der die Zielspezifität für die Cas Nuklease durch eine 20 Basen lange Nukleotidsequenz vorgegeben ist.

Im Vergleich zu ZFNs und TALENs haben die RGNs zwei wesentliche Vorteile: zum einen ist die Herstellung und Präparation einfacher, da kein kompliziertes Proteinkonstrukt benötigt wird, zum anderen ermöglicht eine simultane Koexpression verschiedener sgRNAs ein Editing multipler Gene in einem Arbeitsschritt (Wang et al., 2013). Im Jahr 2014 wurden die ersten Schweine mit einem Gen-Knockout durch Injektion des CRISPR-Cas Systems in Zygoten generiert (Hai et al., 2014). RGNs sind somit ein vielversprechendes Werkzeug für ein effizientes und schnelles *Gene Editing* im Großtier.

Als möglicher Risikofaktor bei der Verwendung des CRISPR-Cas Systems, aber auch der anderen *Genome Editing*-Strategien wurden mögliche „*Off-Target*“ Effekte, d.h. Schnitte im Genom an ungewollten Stellen, diskutiert (Cho et al., 2014). Inzwischen gibt es eine Reihe von Verbesserungen des Verfahrens, um die Frequenz von *Off-Target* Effekten zu minimieren. Dies betrifft z.B. die Optimierung von Sequenz und Länge der sgRNAs (Fu et al., 2014), spezielle

Software zur Vorhersage von *Off-Target* Effekten¹¹, die Einstellung der Konzentration der Cas-Nuklease (Pattanayak et al., 2013) oder Modifikationen der Cas-Nuklease, z.B. die Umwandlung von einem DNA-Doppelstrang- zu einem Einzelstrang-schneidenden Enzym (*Nickase*). Für dieses System werden zwei Einzelstrang-schneidende Enzyme benötigt, die durch zwei verschiedene sgRNAs an eng benachbarte Stellen im Genom dirigiert werden. Dadurch wird die Spezifität des Systems im Vergleich zur klassischen Doppelstrang-schneidenden Cas-Nuklease mit nur einer sgRNA um mehrere Größenordnungen verbessert (Mali et al., 2013; Ran et al., 2013). Zudem stehen für das Screening von *Off-Target* Effekten in kultivierten Zellen leistungsfähige Technologien zur Verfügung (z.B. Tsai et al., 2015), so dass solche Effekte vor Verwendung der Zellen für die Transplantation oder für den Kernttransfer zur Erzeugung Genom-editierter Tiere weitestgehend ausgeschlossen werden können.

Der schnelle Fortschritt in der Methodenentwicklung zur Genmodifikation, vor allem in den erst jüngst etablierten Nuklease-basierten Technologien, hat die Generierung von exakt an das Profil humaner Krankheitsbilder angepassten Schweinemodellen maßgeblich erleichtert. Zusätzlich zu ihrem Potential als Instrument für ein effizientes *Gene Editing* bieten diese Methoden therapeutische Einsatzmöglichkeiten für Erbkrankheiten wie die Zystische Fibrose/Mukoviszidose (Schwank et al., 2013) oder die Duchenne-Muskeldystrophie (Long et al., 2014). Damit können genetisch modifizierte Schweine nicht nur für die Aufklärung von Pathomechanismen ausgesuchter Krankheiten, sondern auch für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapieansätze eingesetzt werden.

4.3 Genetisch modifizierte Großtiere als Modelle für die medizinische Forschung

Die Erforschung von Krankheitsmechanismen ist die entscheidende Grundlage für die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapieansätze. Der Weg von dieser krankheitsorientierten Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung am Patienten (= Translationale Medizin) ist jedoch meist langwierig und kostenintensiv. Geeignete Tiermodelle, die Vorhersagen über die Wirksamkeit und Sicherheit neuer Therapiestrategien erlauben, sind in diesem Prozess unverzichtbar.

Bislang werden dafür meist Nagermodelle verwendet, allerdings bilden diese humane Krankheitsmechanismen bzw. -phänotypen oft nicht gut genug ab, um Befunde aus präklinischen Studien auf den Menschen extrapolieren zu können. Daher werden als Ergänzung zu den weit verbreiteten Nagermodellen Großtiermodelle benötigt, die dem Menschen in anatomischen und physiologischen Merkmalen meist ähnlicher sind. Aus verschiedenen Gründen bietet sich vor allem das Schwein als translationales Tiermodell an (zur Übersicht siehe Aigner et al., 2010).

Aufgrund der Entwicklung von Technologien für die gezielte genetische Modifikation von Schweinen ist es heute möglich, humane Krankheitsmechanismen auf molekularer und

¹¹ z.B. <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/help.html>; <http://research.microsoft.com/en-us/projects/azimuth/>; <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/aboutpage.html>

funktionaler Ebene detailgetreu in dieser Spezies nachzubilden. Beispiele genetisch maßgeschneiderter Schweinemodelle und ihre möglichen Anwendungen sind in der folgenden [Tabelle 3](#) gelistet.

Tabelle 3. Beispiele von genetisch maßgeschneiderten Schweinemodellen für die translationale medizinische Forschung.

Linie	Phänotyp	Mögliche Anwendungen	Referenzen
RIP-GIPR ^{dn}	Reduzierter Inkretineffekt, gestörte Glukosetoleranz, reduzierte Insulinsekretion, gestörte Expansion der Betazell-Masse	Screening nach Biomarkern für Prädiabetes, Behandlungsstudien mit Inkretin-basierten Therapeutika	Renner et al. (2010) Renner et al. (2012) Streckel et al. (2015)
INS ^{C94Y}	Permanenter neonataler Diabetes mellitus (PNDM), gestörte Insulinsekretion, progressive Reduktion der Betazell-Masse	Behandlungsstudien mit Insulin, Mechanismen diabetischer Sekundärläsionen, entwicklungsbiologische Effekte von präkonzeptionellem DM	Renner et al. (2013)
PCSK9 ^{D374Y}	Verminderte LDL-Rezeptor Expression in der Leber, verminderte LDL Clearance, schwere Hypercholesterolämie, progressive Atherosklerose	Imaging atherosklerotischer Läsionen, Testen von Atherosklerose-Therapien	Al-Mashhadi et al. (2013)
LDLR KO	Schwere Hypercholesterolämie und Atherosklerose	Imaging atherosklerotischer Läsionen, Testen von Atherosklerose-Therapien	Davis et al. (2014)
IL2RG KO	Immundefizienz	Testen humaner Zelltherapien	Suzuki et al. (2012)
RAG2 KO	Immundefizienz	Testen humaner Zelltherapien	Lee et al. (2014)
RHO ^{P347L}	Retinitis pigmentosa	Korrektur der Mutation (<i>Gene Editing</i>), Implantation von Stammzellen oder technischen Devices	Petters et al. (1997)
APC ^{I311/+}	Polyphen und Adenome im Dickdarm	Endoskopische Tumordiagnostik und Behandlungsverfahren	Flisikowska et al. (2012)
KRAS ^{G12D} , TP53 ^{R167H}	Adenovirus-Cre induzierbare Tumoren in verschiedenen Geweben	Studien zur Mehrschritt-Tumorigenese, Identifizierung von diagnostischen Markern	Schook et al. (2015)

Am Beispiel von Schweinemodellen für die monogenen Erkrankungen Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) und Mukoviszidose/Zystische Fibrose (CF) wird erläutert, wie maßgeschneiderte Großtiermodelle die Lücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung am Menschen überbrücken und damit translationale Forschung in der Medizin maßgeblich unterstützen können. Zudem werden genetisch modifizierte Schweine auch als potentielle Spender von Zellen, Geweben und Organen für die Xenotransplantation in Patienten mit irreversiblen Gewebeschäden diskutiert. In den letzten Jahren wurden in präklinischen Xenotransplantations-Experimenten sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt.

4.3.1 Schweinemodell für die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) mit Krankheitsverlauf im Zeitraffer

Die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) ist eine schwere X-chromosomale Erbkrankheit mit einer Inzidenz von 1 in 3500 Jungen. Ursächlich für die DMD sind Mutationen im *DMD*-Gen, das mit rund 2,5 Millionen Basenpaaren und 79 Exons das größte Gen des Menschen darstellt. In der Vielzahl unterschiedlicher Mutationen, die man inzwischen kennt, sind Verluste kompletter Exons in Hotspots im Bereich der Exons 3 bis 7 sowie 45 bis 55 besonders prominent. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens, zu instabilen Transkripten und meist zu einem völligen Verlust des essentiellen Muskelproteins Dystrophin (Hoffman et al., 1987). Die DMD ist charakterisiert durch eine progrediente Muskelschwäche und einen kontinuierlich fortschreitenden Muskelabbau: die meisten Patienten erliegen ihrer Krankheit aufgrund eines Atmungs- oder Herzversagen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (zur Übersicht siehe Spurney, 2011). Genetische und pharmakologische Therapieansätze befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung (zur Übersicht siehe Fairclough et al., 2013). Die vorhandenen Tiermodelle der DMD ermöglichten zwar die Aufklärung der zugrunde liegenden Pathomechanismen, haben aber aufgrund der Art der *DMD*-Mutation und des klinischen Phänotyps einige Einschränkungen (Nakamura & Takeda, 2011).

Die X-Chromosom-abhängige Muskeldystrophie der Maus (*mdx*) trat spontan im Inzuchtstamm C57BL/10 auf und hat als Ursache eine Nonsense-Mutation im Exon 23 des *Dmd*-Gens. Vier weitere *mdx*-Mausstämme mit unterschiedlichen Mutationen wurden identifiziert. Zusätzlich wurde eine *mdx*-Maus mit fehlendem Exon 52 durch gezielte Genmodifikation generiert (Araki et al., 1997). Jedoch entwickelt sich im Mausmodell mit Ausnahme des Zwerchfells keine der menschlichen DMD entsprechende Myopathie. Zudem haben die Tiere eine annähernd normale Lebenserwartung (Nakamura & Takeda, 2011).

Weiterhin wurden in einigen Hunderassen Mutationen im *DMD*-Gen identifiziert, worunter die Golden Retriever-Muskeldystrophie (GRMD) am besten untersucht ist (zur Übersicht siehe Nakamura & Takeda, 2011). GRMD-Hunde zeigen einen schwereren Krankheitsverlauf als *mdx*-Mäuse, weisen aber eine hohe Variabilität des Phänotyps auf und sind schwierig zu züchten. Außerdem repräsentiert die *DMD*-Mutation des GRMD-Modells (Punktmutation des Spleiß-Akzeptors im Intron 6, die zu einem Skipping von Exon 7 und einem frühzeitigen Stopcodon in Exon 8 führt) nicht die Mehrzahl humaner *DMD*-Mutationen mit einem Hotspot für Deletionen in den Exons 45-55 des *DMD*-Gens. Eine schwere Form der feline Muskeldystrophie mit Dystrophindefizienz wird durch eine Deletion in der Promotor-Region des *DMD*-Gens verursacht, wurde bislang aber nicht als Modell für die Etablierung therapeutischer Verfahren genutzt (zur Übersicht siehe Nakamura & Takeda, 2011).

Um ein maßgeschneidertes Großtiermodell für eine häufige DMD-Form des Menschen zu entwickeln, entfernten Klymiuk et al. (2013) das Exon 52 des *DMD*-Gens in männlichen Schweinezellen durch homologe Rekombination mit einem entsprechend modifizierten BAC der betreffenden *DMD*-Region und erzeugten aus diesen *DMD*-mutanten Zellen durch

Kerntransfer-Klonierung DMD-Schweine. Diese zeigten einen vollständigen Verlust von Dystrophin im Skelettmuskel (**Abbildung 20A**), eine erhöhte Kreatinkinase-Aktivität im Serum als Ausdruck einer Myopathie, verminderte Beweglichkeit und Muskelschwäche (**Abbildung 20B**) sowie eine maximale Lebenserwartung von 14 Wochen.

Die pathologische Untersuchung der DMD-Schweine ergab eine blass-feuchte Skelettmuskulatur mit multifokalen Zonen markanter Entfärbung. Die histologische Analyse zeigte eine Myopathie mit erheblicher Variation der Muskelfaserdurchmesser, zahlreichen großen abgerundeten hypertrophen Fasern, verzweigten Fasern und Fasern mit zentral gelegenen Kernen sowie ein unregelmäßiges Muster von abschnittsweise nekrotischen neben hyperkontrahierten Fasern und Gruppen weniger regenerierender Fasern. Diese Läsionen waren mit interstitiellen Fibrosen und mononukleären Zellinfiltraten assoziiert und entsprachen insgesamt in allen Aspekten dem Spektrum pathologischer Veränderungen der humanen DMD. Schwere und Ausmaß dieser Läsionen nahmen in Abhängigkeit vom Alter progredient zu (**Abbildung 20C**).

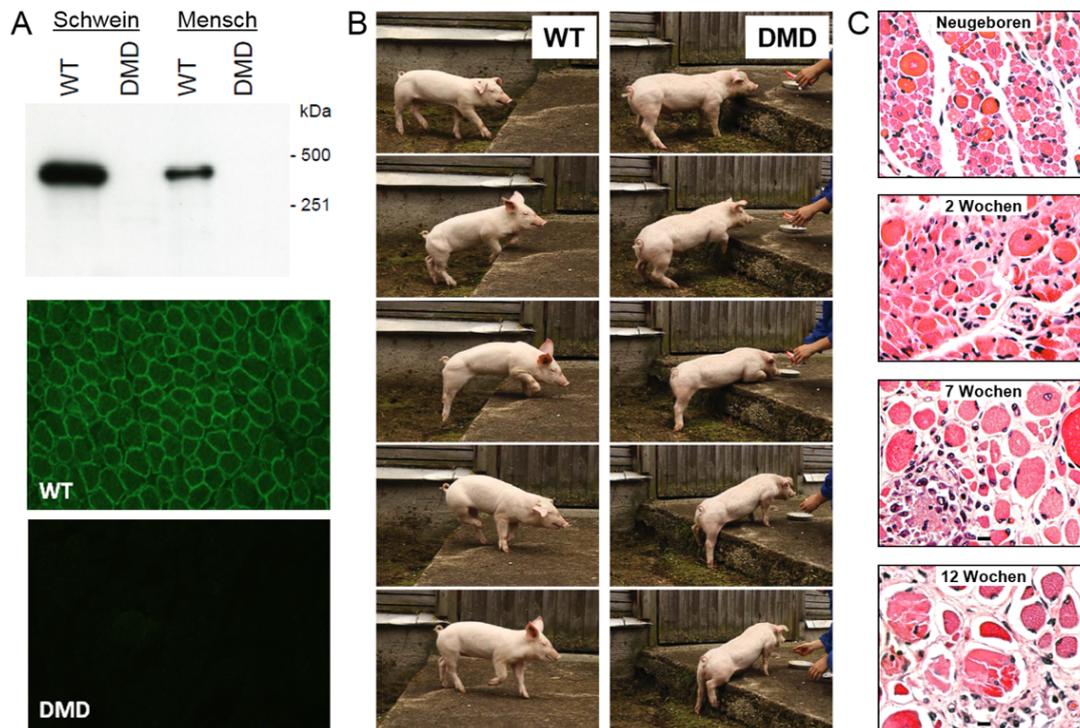


Abbildung 20. Biochemische, klinische, und pathologische Veränderungen bei Schweinen, in denen Exon 52 des Dystrophin (*DMD*)-Gens deletiert ist. **(A)** Verlust des essentiellen Muskelproteins Dystrophin dargestellt anhand von Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen. **(B)** Charakteristischer klinischer Phänotyp mit ausgeprägter Bewegungseinschränkung. **(C)** Altersabhängige progressive, schwere Muskeldystrophie (Klymiuk et al., 2013). WT = Kontrollschwein.

Untersuchungen des Genexpressionsprofils (= Transkriptom) in Skelettmuskelproben von jungen (2 Tage) und älteren (ca. 3 Monate) DMD-Schweinen sowie gleichaltrigen Kontrollen ergaben neue Erkenntnisse zur Hierarchie der molekularen Veränderungen im dystrophischen Muskel. Die Veränderungen im Muskel-Transkriptom 3 Monate alter DMD-Schweine ähnelten jenen in humanen DMD-Muskelproben und waren charakteristisch für

degenerative, regenerative und entzündliche Prozesse sowie für eine verminderte metabolische Aktivität. Im Gegensatz dazu waren die Transkriptom-Veränderungen der Skelettmuskulatur 2 Tage alter DMD-Schweine dem Genexpressionsprofil einer akuten belastungsinduzierten Myopathie ähnlich. Dies legt den Schluss nahe, dass mechanischer Stress an der muskulären Zellmembran ein früher Faktor in der Pathogenese der DMD ist (Klymiuk et al., 2013).

DMD-Schweine zeigen die funktionellen und pathologischen Merkmale der humanen Erkrankung, entwickeln diese aber sehr viel schneller. Dadurch bietet sich die Möglichkeit einer frühen und eindeutigen Datenerhebung in Wirksamkeitsstudien neuer Behandlungsoptionen. Da der Verlust des Exon 52 eine häufige Ursache der DMD des Menschen ist, die durch Skipping von Exon 51 behandelt werden kann (zur Übersicht siehe Fairclough et al., 2013), erfüllt das neue Schweinemodell alle Voraussetzungen, diese zielgerichtete therapeutische Strategie zu testen und zu verbessern (Abbildung 21).

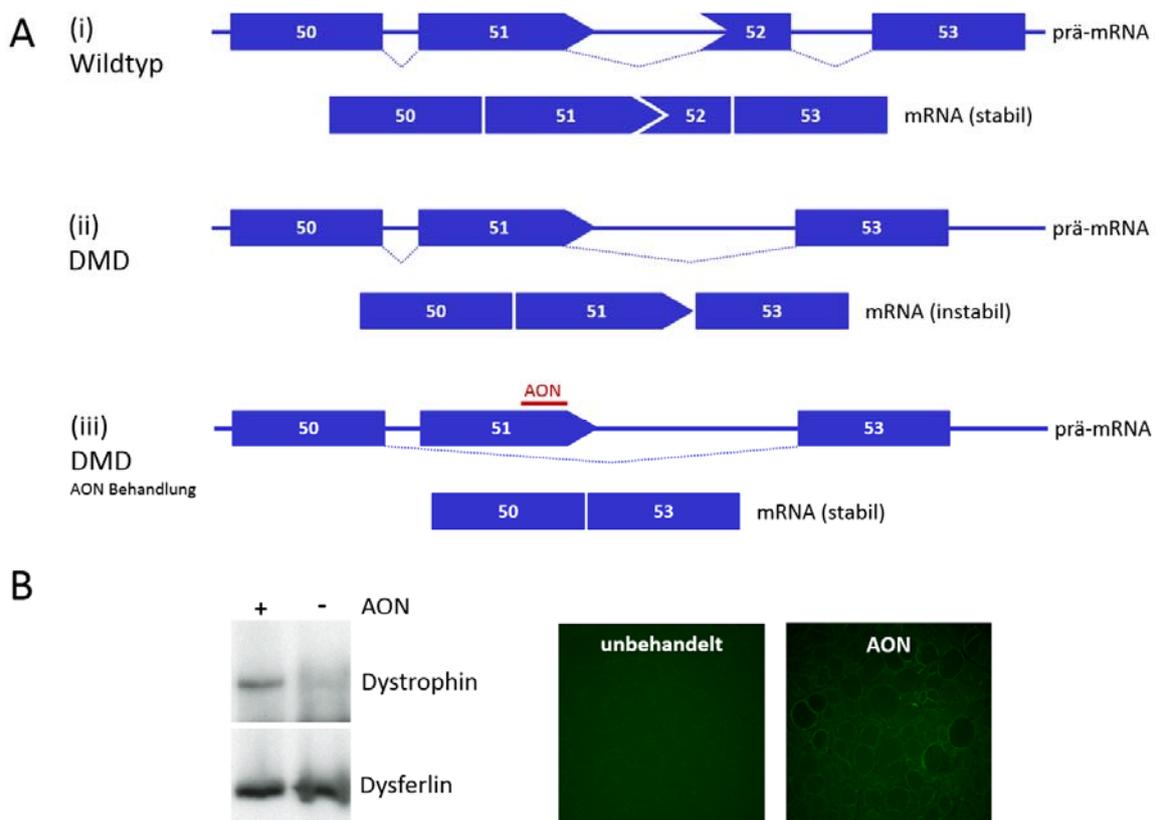


Abbildung 21. Prinzip und Anwendung des Exon-Skipping zur Herstellung eines intakten Leserahmens der Dystrophin (*DMD*)-mRNA. **(A)** i) Ausschnitt aus dem *DMD*-Primärtranskript (Exons 50-53) bei intaktem *DMD*-Gen. Durch Spleißen (Entfernen der Introns) entsteht eine stabile mRNA mit intaktem Leserahmen. ii) Primärtranskript des mutierten *DMD*-Gens (Verlust von Exon 52). Spleißen führt zu einer instabilen mRNA mit Verschiebung des Leserahmens. iii) Durch Behandlung mit einem Antisense-Oligonukleotid (AON) gegen Exon 51 kann ein alternatives Spleißen favorisiert werden, wodurch neben dem genetisch deletierten Exon 52 das Exon 51 beim Spleißen des Primärtranskripts entfernt wird. Dadurch entsteht eine verkürzte, aber stabile mRNA, da ein intakter Leserahmen wiederhergestellt ist. **(B)** Pilotversuch zum Exon-Skipping im DMD-Schwein. Nach subkutaner Injektion von AON51 ist im Gegensatz zum unbehandelten Schwein Dystrophin im Skelettmuskel durch Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse nachweisbar (aus Dmochewitz & Wolf, 2015).

4.3.2 Schweinemodelle für die Mukoviszidose/Zystische Fibrose (CF) zeigen die Symptomatik der humanen Erkrankung

Die Mukoviszidose/Zystische Fibrose (CF) ist die häufigste genetisch bedingte Erkrankung in der kaukasischen Bevölkerung und betrifft weltweit ungefähr 70000 Patienten (Cutting, 2015). Das betroffene Gen *CFTR* kodiert für den *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, ein Anionen-Kanalprotein in Epithelzellen. Bislang sind fast 2000 Mutationen im *CFTR*-Gen bekannt, von denen der Verlust der Aminosäure Phenylalanin in Position 508 (F508del) die am weitesten verbreitete ist (Sosnay et al., 2013). Die letztgenannte Mutation führt zu einer abnormalen Faltung des *CFTR*-Proteins, das nachfolgend zum größten Teil degradiert wird. Wenn F508del-*CFTR* zur Zellmembran transportiert wird, hat es dort eine verminderte Halbwertszeit und Funktion als Chloridkanal (Übersicht in Cutting, 2015). CF ist eine multisystemische Erkrankung, die den Atemtrakt, den Magen-Darm-Trakt und den männlichen Reproduktionstrakt betrifft. Chronische bakterielle Infektionen und persistierende Entzündungsprozesse der Lunge sind die Hauptursachen der Morbidität und Mortalität bei der Mukoviszidose (Übersicht in Elston & Geddes, 2007).

Während der defekte transepitheliale Transport von Elektrolyten sicher eine Rolle spielt, sind die einzelnen Mechanismen, die in verschiedenen Organen zu pathologischen Veränderungen führen, nicht vollständig bekannt. Einer der Gründe dafür ist, dass es bis vor kurzem keine Tiermodelle gab, welche die humane CF ausreichend gut widerspiegeln. Obwohl eine Vielzahl von *Cftr*-mutanten Mauslinien generiert wurden, zeigen diese die Symptomatik der menschlichen Erkrankung nur teilweise (Übersicht in Wilke et al., 2011). Dies betrifft insbesondere die pathologischen Veränderungen des Atemtrakts, welche die vorwiegende Ursache der abnehmenden Lebensqualität und oft auch die Todesursache von CF-Patienten sind. Ein *CFTR*-defizientes Rattenmodell zeigt ebenfalls nur einen Teil der Veränderungen der CF des Menschen (Tuggle et al., 2014).

Erst kürzlich wurden die ersten Nicht-Nagetiermodelle für die CF publiziert. *CFTR*-defiziente Schweinemodelle wurden entweder durch Einfügen eines Stop-Kodons in Exon 10 (Rogers et al., 2008b) oder einer STOP-Box, die die Transkription und Translation in Exon 1 des *CFTR*-Gens verhindert (Klymiuk et al., 2012b), generiert. Das dritte Schweinmodell für CF spiegelt die häufigste humane *CFTR*-Mutation F508del im Exon 10 wider (Ostedgaard et al., 2011). Trotz der unterschiedlichen *CFTR*-Mutationen zeigen die drei Modelle sehr ähnliche Veränderungen. Charakteristisch ist die fast 100%ige Penetranz eines Mekonium-Ileus (Abbildung 22A). Diese mechanische Obstruktion des Darms kommt auch bei CF-Patienten vor, betrifft allerdings nur etwa 10-20% von ihnen (Kelly & Buxbaum, 2015). CF-Schweine können nur überleben, wenn die mechanische Obstruktion chirurgisch durch eine Ileostomie beseitigt wird. Stoltz et al. (2013) entwickelten daher ein CF-Schweinmodell, in dem auf dem *CFTR*^{-/-} Hintergrund *CFTR* unter der Kontrolle eines darmspezifischen Promotors exprimiert wird. Solche Schweine konnten bis zu 12 Monate überleben. Eine genaue Charakterisierung des CF-Schweinmodells erfolgte allerdings bislang überwiegend nur im neugeborenen Stadium. Trotz ihrer Limitationen haben die CF-Schweinemodelle wesentlich zum Verständnis

der Pathogenese von CF beigetragen, insbesondere was die frühesten Veränderungen bei der Erkrankung anbelangt.

Die progressive Obstruktion des Respirationstrakts ist die wichtigste Krankheits- und Todesursache von CF-Patienten. Während die histologische Untersuchung von neugeborenen CF-Schweinen unauffälliges Lungengewebe ergab (Rogers et al., 2008b), zeigte die Trachea eine charakteristische Verformung ([Abbildung 22B](#)) sowie strukturelle Veränderungen der Knorpel (Klymiuk et al., 2012b; Meyerholz et al., 2010). Diese wurden auch bei Kindern mit CF beobachtet (Meyerholz et al., 2010). Eine Wachstumsverzögerung wurde ebenfalls zunächst bei CF-Ferkeln beobachtet und später bei Kindern, die von der Krankheit betroffen sind, bestätigt (Rogan et al., 2010). In beiden Fällen wurden reduzierte Spiegel von Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF1) als ursächlich für die Wachstumsverzögerung gefunden, allerdings bleibt der Zusammenhang mit der CFTR-Defizienz unklar.

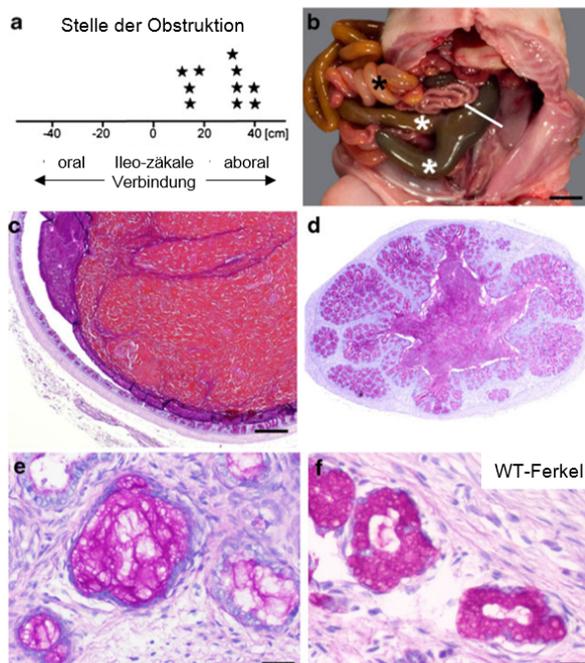
Die molekulare Charakterisierung von epithelalem Gewebe oder kultivierten Zellen von CF-Schweinen ergab, dass der Verlust von CFTR zu einem verminderten transzellulärem Transport von Cl^- und HCO_3^- führte, während der Transport von Na^+ und die Absorption von Flüssigkeit nicht verändert waren (Chen et al., 2010). Dieser Befund wurde später an primären Epithelzellen von CF-Patienten bestätigt (Itani et al., 2011) und zeigte, dass die Verdickung des Schleims in den Atemwegen über einen Na^+ -unabhängigen Mechanismus zustande kommt. Gleichzeitig stellt dieser Befund transgene Mäuse, die den epithelialen Na^+ Kanal (ENaC) überexprimieren und eine Verdickung des Schleims in den Luftwegen zeigen, als Modell für die CF-Forschung in Frage (Collawn et al., 2012).

Da neugeborene CF-Schweine keine Anzeichen einer Infektion oder Entzündung der Luftwege zeigen, sind sie ein sehr interessantes Modell, um frühe Krankheitsmechanismen zu untersuchen. Bereits bei Geburt ist die Eradikation von Bakterien in den Luftwegen gestört (Stoltz et al., 2010), und es wurde postuliert, dass dies mit einem reduzierten pH-Wert auf den Epithelien zusammenhängt (Pezzulo et al., 2012). Zudem wurde gezeigt, dass die Abgabe von Schleim von den Drüsen der Submukosa gestört ist (Hoegger et al., 2014).

Zusammenfassend stellen die etablierten Linien von CF-Schweinen sehr interessante Modelle dar, um die frühen Stadien der Lungenerkrankung zu untersuchen und therapeutische Strategien zu entwickeln. Dazu gehört beispielsweise die Optimierung von gentherapeutischen Ansätzen, insbesondere Applikationsstrategien und Sicherheitsfragen. Für die Gentherapie von CF wurden sowohl virale (Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Lentivirus) als auch nicht-virale Vektoren getestet (Übersichten in Griesenbach & Alton, 2009; Prickett & Jain, 2013). Diese Studien führten bislang nicht zu einer klinisch anwendbaren Therapie, zeigten aber eine Reihe von Problemen auf, welche die Effizienz einer Gentherapie von CF-Patienten einschränken können. Diese Schwierigkeiten betreffen insbesondere die lokale Applikation der Gentherapie-Vektoren, die durch die verdickte, zähe Schleimschicht auf den Epithelzellen von CF-Patienten erschwert ist. Eine weitere Schwierigkeit stellen Immunreaktionen gegen die verwendeten Gentherapie-Vektoren dar. Nachdem Schweinemodelle für CF eine dem Menschen ähnliche Struktur der luftführenden Wege und

Lunge haben, sind sie gut als Modelle geeignet, um das Design von Vektoren und lokale Applikationsstrategien zu verbessern. Cao et al. (2013) konnten z.B. nach der intratrachealen Applikation von vernebelten Helfer-abhängigen adenoviralen Vektoren einen effizienten Transfer von *LacZ*-Reportergenen und humanen *CFTR*-Expressionskassetten in Epithelzellen der luftführenden Wege und in die submukösen Drüsen von normalen Schweinen nachweisen. Es wäre interessant zu testen, ob dies auch bei CF-Schweinen funktioniert, da der lokale Gentransfer vermutlich durch die vermehrte Schleimschicht und eventuell bestehende Infektionen erschwert ist. Das F508del-*CFTR*-Schweinemodell könnte verwendet werden, um Kombinationen von *CFTR*-Korrektoren und -Potentiatoren zu testen. *CFTR*-Korrektoren, wie Lumacaftor, korrigieren den Faltungsdefekt von F508del-*CFTR* und erhöhen seine Menge. *CFTR*-Potentiatoren, wie Ivacaftor, erhöhen die Aktivität von F508del-*CFTR*, nachdem seine Faltung korrigiert wurde (Übersicht in Cutting, 2015).

A) Mekonium-Ileus



B) Pathologie Luftröhre und Lunge

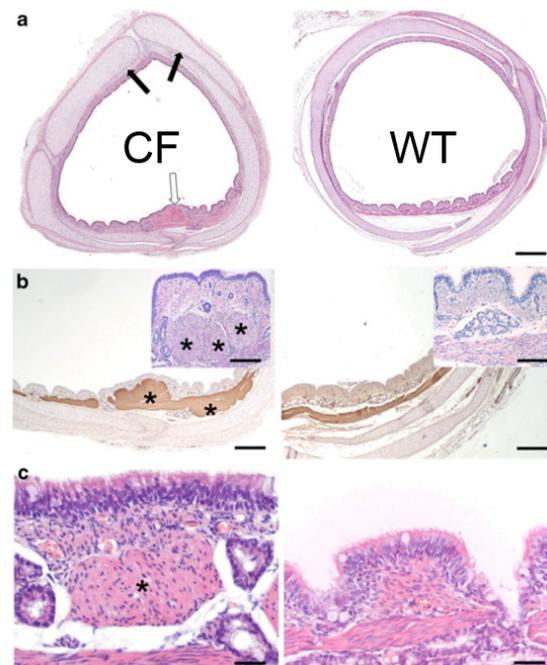


Abbildung 22. Veränderungen in einem Schweinemodell für die Mukoviszidose/Zystische Fibrose (aus Klymiuk et al., 2012b).

A) Mekonium-Ileus und charakteristische Veränderungen der Darmschleimhaut. **a** Der Mekonium-Ileus befindet sich distal der ileo-zäkalen Verbindung; **b** Ileum und Zäkum sind durch Mekonium erweitert (weiße Sterne), im Dünndarm befindet sich Gas (schwarzer Stern), das Kolon hat einen stark reduzierten Abschnitt (Mikro-Kolon); **c,d** Histologie der Darmabschnitte vor (**c**) und nach (**d**) der Obstruktion, komplett mit Mekonium gefüllt; **e** Lumen der Brunnerschen Drüsen im Duodenum durch Schleim erweitert; **f** Brunnersche Drüsen bei einem Kontrollschwein (WT = Wildtyp).

B) Pathologische Veränderungen von Luftröhre und Lunge. **a** Deformierte Trachea eines CF-Ferkels (links) im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrolle (rechts), weißer Pfeil zeigt vermehrte glatte Muskulatur, schwarze Pfeile zeigen verdickte, unterbrochene Knorpelabschnitte; **b,c** Verdickte, fehlorientierte Bündel glatter Muskulatur (schwarze Sterne) beim CF-Ferkel in der Trachea (**b**) und in den großen Bronchien.

4.3.3 Genetisch veränderte Schweine als potentielle Spender für die Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen

Für viele chronische Erkrankungen ist der Ersatz irreversibel geschädigter Organe oder Gewebe die letzte therapeutische Option. Trotz verbesserter medikamentöser Behandlungsverfahren steigt die Diskrepanz zwischen den verfügbaren menschlichen Spenderorganen und dem tatsächlichen Bedarf. Dies wird aus den Statistiken der Stiftung Eurotransplant deutlich, die für die Entwicklungen der Nieren- und Herztransplantation in den [Abbildungen 23](#) und [24](#) exemplarisch dargestellt sind. Diese sind dem Annual Report 2014 der Stiftung Eurotransplant¹² entnommen. Eurotransplant ist als Service-Organisation für die Zuteilung von Spenderorganen in acht europäischen Ländern verantwortlich. Mitglieder von Eurotransplant sind Belgien, Deutschland, Kroatien, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Ungarn und Slowenien. In diesem Einzugsgebiet leben circa 135 Millionen Menschen¹³.

Aus den Daten wird deutlich, dass der Bedarf an Spenderorganen bei weitem nicht durch die verfügbaren menschlichen Spenderorgane gedeckt werden kann. Daher wird seit mehr als drei Jahrzehnten die Verwendung tierischer Gewebe und Organe für die Xenotransplantation diskutiert.

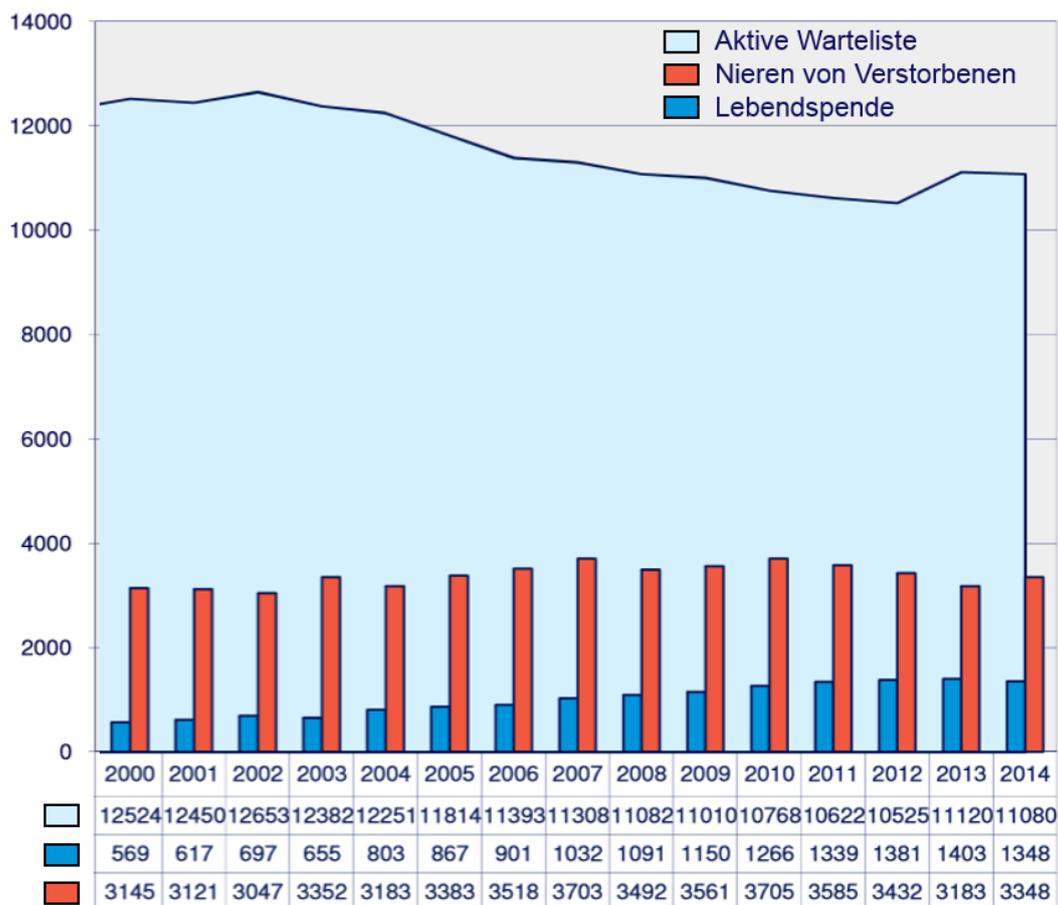


Abbildung 23. Entwicklung der Nierentransplantationszahlen im Gebiet von Eurotransplant seit 2000.

¹² https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2014.pdf

¹³ https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=pat_germany

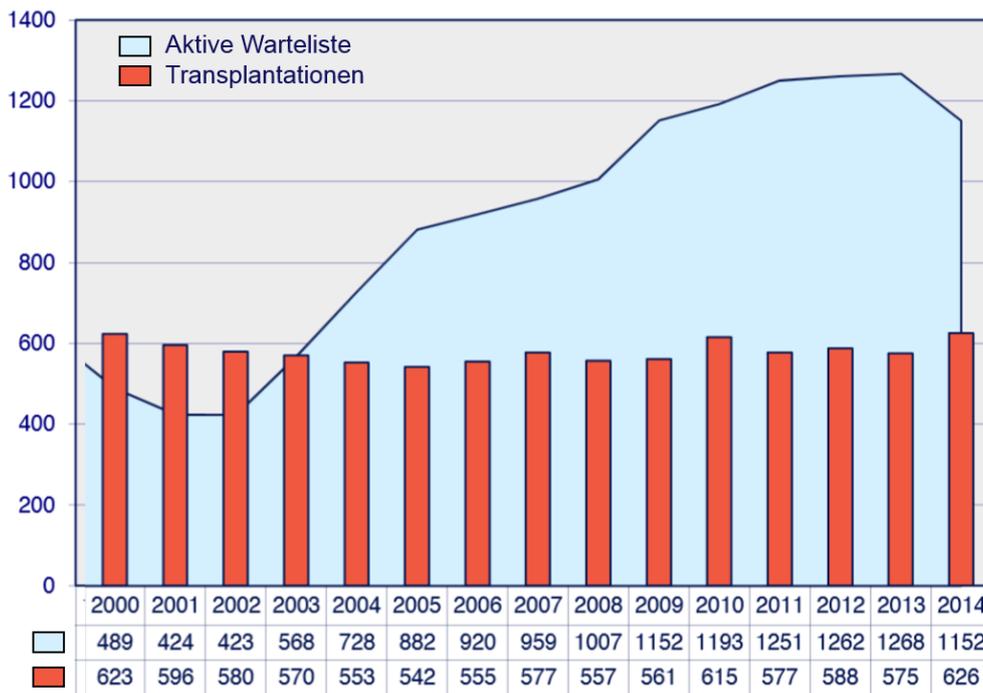


Abbildung 24. Entwicklung der Herztransplantationszahlen im Gebiet von Eurotransplant seit 2000.

Aus logistischen und ethischen Gründen kommen nicht-humane Primaten als Spender für die Xenotransplantation nicht in Frage. Aufgrund der Größe und Funktion seiner Organe sowie der Möglichkeit seiner genetischen Modifikation hat sich das Schwein dafür als wichtigster Kandidat herauskristallisiert. Allerdings sind beim Schwein komplexe genetische Modifikationen erforderlich, um verschiedene Stufen der Abstoßung und funktionelle Inkompatibilitäten von porcinen Xenotransplantaten in Primaten zu überwinden (Übersicht in Cooper et al., 2014; Klymiuk et al., 2010).

Eine erste immunologische Hürde stellen präformierte Antikörper im Blut von Primaten gegen bestimmte Antigene auf Schweinezellen dar. Das prominenteste Antigen ist das Zuckerepitop Galaktose- α 1,3-Galaktose (α Gal), das durch das Enzym α 1,3-Galaktosyl-Transferase (GGTA1) synthetisiert wird. Menschen und Altweltaffen sind defizient für dieses Enzym, werden aber durch die Anwesenheit von α Gal-Epitopen auf Darmbakterien dagegen sensibilisiert und haben daher hohe anti- α Gal-Antikörperspiegel. Nach Transplantation von Schweinegewebe binden diese Antikörper die auf Schweinezellen vorhandenen α Gal-Epitope und es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur hyperakuten Abstoßung des Organs bzw. Gewebes. Um diese zu überwinden, wurden zunächst transgene Schweine generiert, die membranständige Komplement-regulatorische Proteine (*Membrane Cofactor Protein* = MCP = CD46; *Decay-Accelerating Factor* = DAF = CD55; *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis* = MIRL = CD59) überexprimieren, um die Aktivierung des Komplementsystems auf verschiedenen Stufen zu blockieren. Ein entscheidender Schritt zur Überwindung der hyperakuten Abstoßungsreaktion war die Entwicklung von GGTA1-defizienten Schweinelinien (Phelps et al., 2003), die heute den genetischen Hintergrund der Wahl für weitere genetische

Modifikationen von Spenderschweinen für die Xenotransplantation darstellen (Übersicht in Klymiuk et al., 2010).

Durch die Eliminierung der α Gal-Epitope konnte – insbesondere in Kombination mit der Expression eines Komplement-regulatorischen Proteins – die hyperakute Abstoßung überwunden werden. Herzen von GGTA1-defizienten, human CD46-transgenen Schweinen konnten beispielsweise nach heterotop abdominalen Transplantation in Pavianen bis zu 236 Tage überleben und schlagen, wenn weitere Abstoßungsmechanismen durch Immunsuppressiva blockiert wurden (Mohiuddin et al., 2012). Im orthotopen Xenotransplantationsmodell konnte im Pavian mit einem human CD46-transgenen Schweineherzen eine maximale Überlebenszeit von 57 Tagen erzielt werden (Byrne et al., 2011). Eine umfassende Zusammenstellung aller heterotopen und orthotopen Xenotransplantationsexperimente von Herzen genetisch modifizierter Spenderschweine einschließlich der jeweils verwendeten immunsuppressiven Therapien findet sich in der Übersichtsarbeit von Cooper et al. (2014).

Die histologische Untersuchung längerfristig überlebender Xenotransplantate zeigte allerdings eine Komplikation, die als thrombotische Mikroangiopathie bezeichnet wird (Houser et al., 2004). Aufgrund von Inkompatibilitäten zwischen den Blutgerinnungssystemen von Spender (Schwein) und Empfänger (Pavian) kommt es zur Bildung multipler Thromben in den Kapillaren und mittelfristig zu einer ischämischen Schädigung und Nekrose des Herzmuskelgewebes. Eine dieser Inkompatibilitäten betrifft das Thrombomodulin-Thrombin-System. Porcines Thrombomodulin auf den Endothelzellen des Spenderherzens kann zwar Thrombin im Blut von Primaten binden, ist aber ein schlechter Koaktivator für gerinnungshemmendes aktiviertes Protein C. Daher haben wir transgene Schweine generiert, die humanes Thrombomodulin unter der Kontrolle des porcinen Thrombomodulin (*THBD*)-Promotors exprimieren (Wuensch et al., 2014). Diese Tiere zeigen eine konsistente Expression von humanem Thrombomodulin in den Gefäßendothelzellen des Herzens. Isolierte Endothelzellen von diesen Schweinen hemmen zudem die Gerinnung von humanem Vollblut ([Abbildung 25](#)). Für Herzen von dreifach genetisch modifizierten Schweinen mit GGTA1-Defizienz sowie Überexpression von humanem CD46 und humanem Thrombomodulin wurde nach heterotop abdominalen Transplantation in Paviane erstmals eine Überlebenszeit von mehr als einem Jahr berichtet (Mohiuddin et al., 2014), was die Bedeutung von Maßnahmen zur Adaptation von Inkompatibilitäten des Gerinnungssystems unterstreicht. Weitere Strategien in dieser Richtung sind die transgene Expression von CD39 und endotheliale Protein C-Rezeptor (EPCR) in den Spenderschweinen (Übersicht in Cowan et al., 2011).

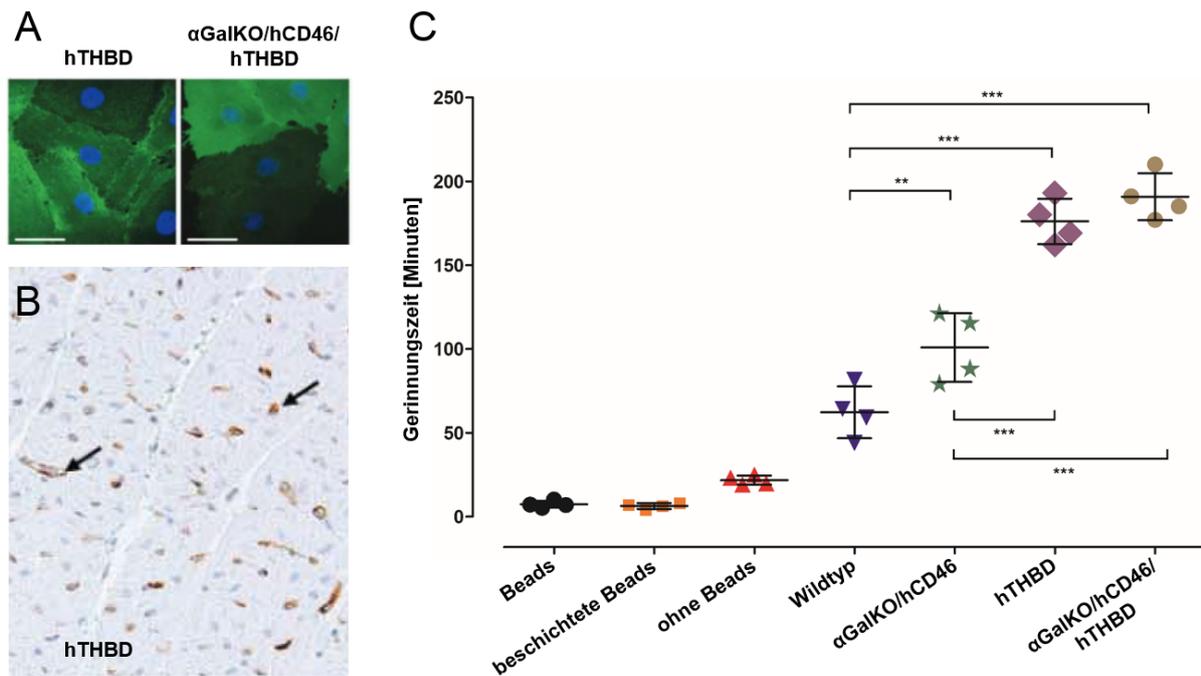


Abbildung 25. Die Expression von humanem Thrombomodulin (hTHBD) in Endothelzellen transgener Schweine hemmt die Gerinnung von humanem Blut. **A)** Darstellung der Expression von hTHBD in isolierten Endothelzellen von einfach bzw. mehrfach genetisch modifizierten Schweinen (α GalKO = defizient für das Enzym α 1,3 Galaktosyltransferase; hCD46 = transgen für humanes CD46) mittels Immunfluoreszenz-Analyse. **B)** Immunhistochemischer Nachweis von hTHBD in einem histologischen Schnitt von Herzmuskulatur eines transgenen Schweines. Die Markierung in Gefäßendothelzellen ist exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. **C)** Gerinnungstest, in dem Beads, die mit Endothelzellen verschiedener genetisch modifizierter Schweine bewachsen sind, in menschlichem Blut inkubiert und die Gerinnungszeiten gemessen werden. Die Expression von hTHBD in Endothelzellen von einfach oder mehrfach genetisch modifizierten Schweinen führt zu einer signifikant verlängerten Blutgerinnungszeit (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Modifiziert nach Wuensch et al. (2014).

Trotz großer Fortschritte in der Weiterentwicklung von mehrfach genetisch modifizierten Schweinen als Spender von Herzen für die Xenotransplantation haben Pankreasinseln von Schweinen das größere Potential, tatsächlich klinisch eingesetzt zu werden. Patienten-Zielgruppe sind in erster Linie Typ 1-Diabetiker, die schwierig mit Insulin einzustellen sind und Gefahr laufen, in lebensbedrohliche Unterzuckerkrisen zu fallen. Für die Transplantation kommen entweder Pankreasinseln von adulten Spenderschweinen oder sogenannte neonatale Inselzell-Cluster (NICCs) von Ferkeln in Frage. Erstere haben den Nachteil, dass sie relativ schwierig zu isolieren sind und dass die Spenderschweine über einen langen Zeitraum unter aufwendigen designiert Pathogen-freien (DPF) Bedingungen gehalten werden müssen. NICCs sind vergleichsweise einfach zu isolieren, benötigen allerdings Zeit um zu reifen und voll funktionsfähig zu werden (Übersicht in Reichart et al., 2015). Vor Abstoßungsreaktionen können xenotransplantierte Schweineinseln durch Mikro- oder Makroverkapselung (Übersicht in Yang & Yoon, 2015) oder durch genetische Modifikationen der Spenderschweine geschützt werden. Die notwendigen genetischen Modifikationen hängen vom Transplantationsort ab. Als mögliche Transplantationsstrategien werden u.a. die

Infusion über die Pfortader in die Leber, aber auch intraperitoneale, subkutane und intramuskuläre Applikationen bzw. die Transplantation ins Knochenmark diskutiert.

Die derzeit gängige Applikationsform für die Allotransplantation von Pankreasinseln ist die Infusion in die Leber über die Pfortader. Dabei kann es zu einer Reaktion kommen, für die der Begriff IBMIR (*Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction*) geprägt wurde. Durch die Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems sowie durch Zellen des angeborenen Immunsystems kann dabei ein großer Teil der transplantierten Inselzellen zerstört werden (Nilsson et al., 2011). Im Fall der Insel-Xenotransplantation von nicht genetisch modifizierten Spenderschweinen wäre aufgrund der präformierten anti- α Gal-Antikörper sogar noch eine stärkere IBMIR zu erwarten (van der Windt et al., 2007). Als Strategien für die Überwindung von IBMIR wurden die Inaktivierung des *GGTA1*-Gens sowie die Überexpression von Komplementregulatoren bzw. Modulatoren des Gerinnungssystems diskutiert und teilweise schon getestet (Übersicht in Reichart et al., 2015).

Darüber hinaus ist die T-Zell-vermittelte Abstoßung eine wichtige Hürde für die klinische Insel-Xenotransplantation. Diese kann durch eine systemische Blockade der Kostimulation von T-Zellen überwunden werden. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch die Wechselwirkung des T-Zell-Rezeptors mit einem Antigen-beladenen MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Molekül einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) sowie ein zweites Signal (= Kostimulation), das durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von T-Zellen und APCs induziert wird. Ein solches Paar von kostimulatorischen Molekülen ist CD28 auf T-Zellen und CD80/CD86 auf APCs. Deren Interaktion kann durch lösliche Moleküle, wie CTLA4-Ig oder seine affinitätsoptimierte Variante LEA29Y, die CD80/CD86 mit höherer Affinität bindet, blockiert werden, wodurch die Aktivierung von T-Zellen verhindert wird. Diese Kostimulations-blockierenden Moleküle wurden bislang meist systemisch verabreicht. Die genetische Modifikation der Spenderschweine ermöglicht jedoch auch deren lokale Expression im Transplantat. Dies bietet die Chance, das Xenotransplantat vor der T-Zell-vermittelten Abstoßung zu schützen, ohne eine systemische Blockade der T-Zell-Aktivierung zu verursachen. Um diese Hypothese in Bezug auf die Insel-Xenotransplantation zu testen, wurden transgene Schweine generiert, die LEA29Y unter der Kontrolle des porcinen Insulin-Promotors spezifisch in den Betazellen des Pankreas exprimieren. Nach Transplantation in diabetische, immundefiziente Mäuse waren isolierte Pankreasinseln von diesen transgenen Schweinen, aber auch die von nicht-transgenen Schweinen in der Lage, den Blutzuckerspiegel der Mäuse zu normalisieren. Nach der anschließenden Behandlung der Mäuse mit menschlichen Immunzellen wurden allerdings die Wildtyp-Inseln abgestoßen, während die LEA29Y-transgenen Inseln vor der Abstoßung geschützt waren ([Abbildung 26](#)). Dabei waren nur sehr niedrige Konzentrationen von LEA29Y im Blut der transplantierten Mäuse nachweisbar, was die Hypothese der lokalen Hemmung der T-Zell-vermittelten Abstoßung unterstreicht (Klymiuk et al., 2012c).

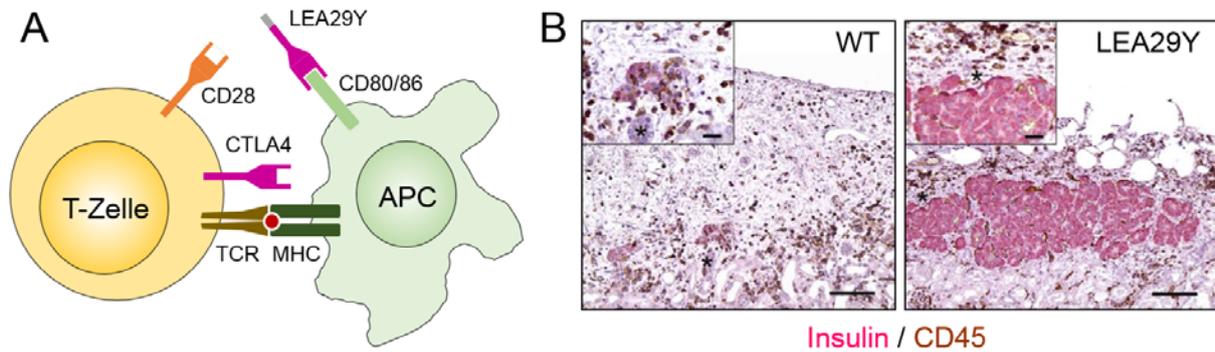


Abbildung 26. Schutz xenotransplanteder porciner Pankreasinseln vor T-Zell-vermittelter Abstoßung durch lokale Expression von LEA29Y. **A)** Prinzip der Kostimulations-Blockade von T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen benötigt die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem Peptid-beladenen Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC). Zudem ist als zweites Signal die Wechselwirkung zwischen CD28 und CD80/CD86 erforderlich. Die Wechselwirkung zwischen CTLA4 und CD80/CD86 hemmt die T-Zell-Aktivierung. Letzteres kann auch durch Zugabe des löslichen Moleküls CTLA4-Ig oder seiner affinitätsoptimierten Variante LEA29Y erreicht werden. **B)** Nach Transplantation von neonatalen Inselzellclustern aus normalen (WT) oder LEA29Y-transgenen Schweinen (LEA29Y) in immundefiziente diabetische Mäuse entwickelt sich eine Insulin-positive Zellmasse, die den Blutzuckerspiegel der Mäuse normalisiert. Behandelt man die Mäuse anschließend mit menschlichen Immunzellen aus dem peripheren Blut, werden die WT-Inseln abgestoßen, während die transgenen Inseln vor der Abstoßung geschützt sind (aus Klymiuk et al., 2012c). CD45 markiert infiltrierende T-Zellen.

Neben diesen genetischen Modifikationen von Schweinen als Spender von Zellen, Geweben und Organen für die Xenotransplantation gibt es auch noch den Ansatz, komplett humane Gewebe im Schwein zu generieren. Dieses Konzept basiert auf der Idee, Empfängerorganismen, in denen die Ausbildung bestimmter Gewebe durch die gezielte Ausschaltung von Schlüsselgenen ihrer Entwicklung gehemmt ist, zu verwenden. Die dadurch entstehende entwicklungsbiologische Nische wird mit entwicklungs-kompetenten Stammzellen einer anderen Spezies gefüllt, die dann das betreffende Gewebe bilden können. Diese Idee wurde erstmals in Interspezies-Chimären zwischen Ratte und Maus realisiert. Die Arbeitsgruppe von Hiromitsu Nakauchi (Kobayashi et al., 2010) verwendete einen Mäusestamm, in dem die Entwicklung des Pankreas durch Ausschaltung des essentiellen Transkriptionsfaktors PDX1 gehemmt ist. Die Wissenschaftler injizierten *Pdx1* intakte pluripotente Stammzellen von Mäusen in *Pdx1*^{-/-} Blastozysten, die durch Verpaarung von *Pdx1*^{+/-} Mäusen generiert wurden, und konnten zeigen, dass die resultierenden Chimären ein funktionelles Pankreas besaßen, das sich aus den Stammzellen entwickelt hatte. In einem weiteren Experiment konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass dies auch mit pluripotenten Stammzellen der Ratte möglich war (Abbildung 27).

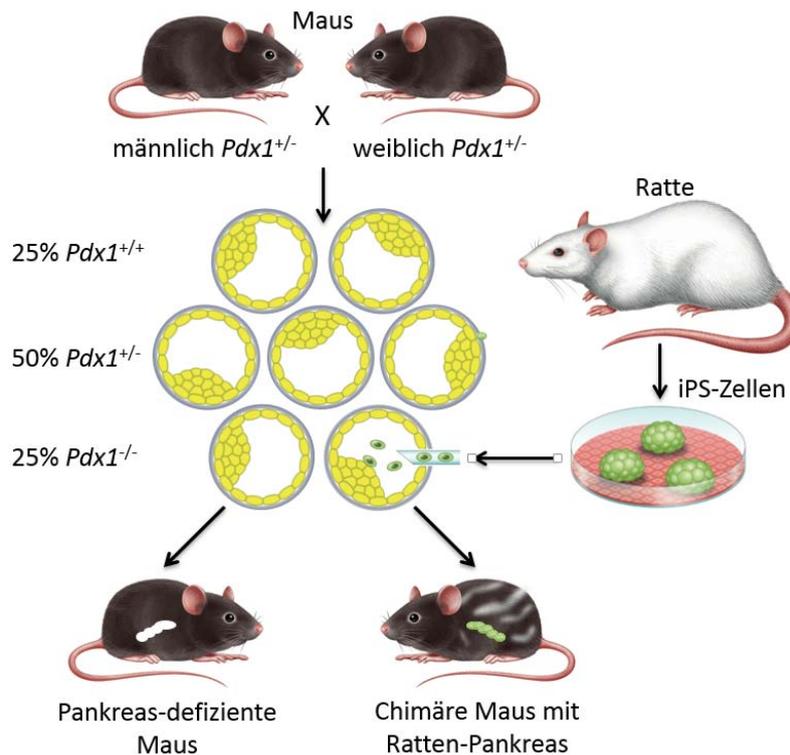


Abbildung 27. Generierung von xenogenem Pankreasgewebe in Empfängermäusen mit einem genetischen Defekt der Pankreasentwicklung (nach Kobayashi et al., 2010). Das Gen *Pdx1* ist für die Pankreasentwicklung essentiell. Mäuse, in denen dieses Gen komplett ausgeschaltet wurde ($Pdx1^{-/-}$), können kein Pankreas bilden. Wenn man allerdings in $Pdx1$ -defiziente Blastozysten induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) von Ratten injiziert, bildet sich in der daraus entstehenden chimären Maus ein Pankreas, das - bis auf die Gefäßversorgung - von den iPS-Zellen der Ratte stammt.

In einer weiteren Studie (Usui et al., 2012) zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass die Ausschaltung des Gens *Sall1* in der Maus zu Defekten der Nierenentwicklung führt und eine biologische Nische erzeugt, die durch pluripotente Stammzellen nach Injektion in $Sall1^{-/-}$ Blastozysten gefüllt werden kann. Auf diese Weise konnte in der Maus allogenes Nierengewebe generiert werden, allerdings blieben die Versuche in dieser Studie innerhalb der Spezies Maus.

Um dieses Konzept der allo- bzw. xenogenen *in vivo* Organogenese in Empfängerorganismen mit selektiven Organ- bzw. Gewebe-Entwicklungsdefekten potentiell für die Entwicklung von menschlichen Organen oder Geweben nutzen zu können, ist ein Empfängerorganismus erforderlich, der hinsichtlich Größe und Physiologie dem Menschen näher steht als die Maus. Aus den vorher genannten Gründen ist das Schwein dafür ein guter Kandidat. Als ersten Schritt in diese Richtung generierte die Arbeitsgruppe von Hiroshi Nagashima Zellen, die ein *Pdx1-Hes*-Transgen integriert haben. Schweine, die aus diese Zellen geklont werden, können aufgrund der *Pdx1-Hes*-Transgenexpression kein Pankreas ausbilden und sind daher sofort nach der Geburt hochgradig diabetisch (Matsunari et al., 2013). In Embryonen, die aus männlichen *Pdx1-Hes*-transgenen Zellen geklont wurden, injizierten die Wissenschaftler Zellen aus weiblichen Klonembryonen, die aus Zellen mit dem fluoreszierenden Markergen Kusabira-Orange (*K-O*) generiert wurden. Auf diese Weise

konnten die Autoren die Herkunft der Zell- bzw. Gewebeanteile in den entstehenden chimären Föten und Nachkommen identifizieren und zeigen, dass das Pankreas komplett durch die injizierten *K-O*-transgenen Zellen gebildet worden war. Die chimären Tiere hatten daher normale Blutzuckerspiegel. Aufgrund der gewählten Kombination von Kernspender-Zellen bzw. Klonembryonen unterschiedlichen Geschlechts konnte zudem sicher gestellt werden, dass die Chimären phänotypisch männlich wurden und das *Pdx1-Hes*-Transgen an ihre Nachkommen weitergeben konnten (zur Erklärung siehe Legende von [Abbildung 28](#)), was die Erzeugung von *Pdx1-Hes*-transgenen Embryonen für weiterführende Untersuchungen erheblich erleichtert.

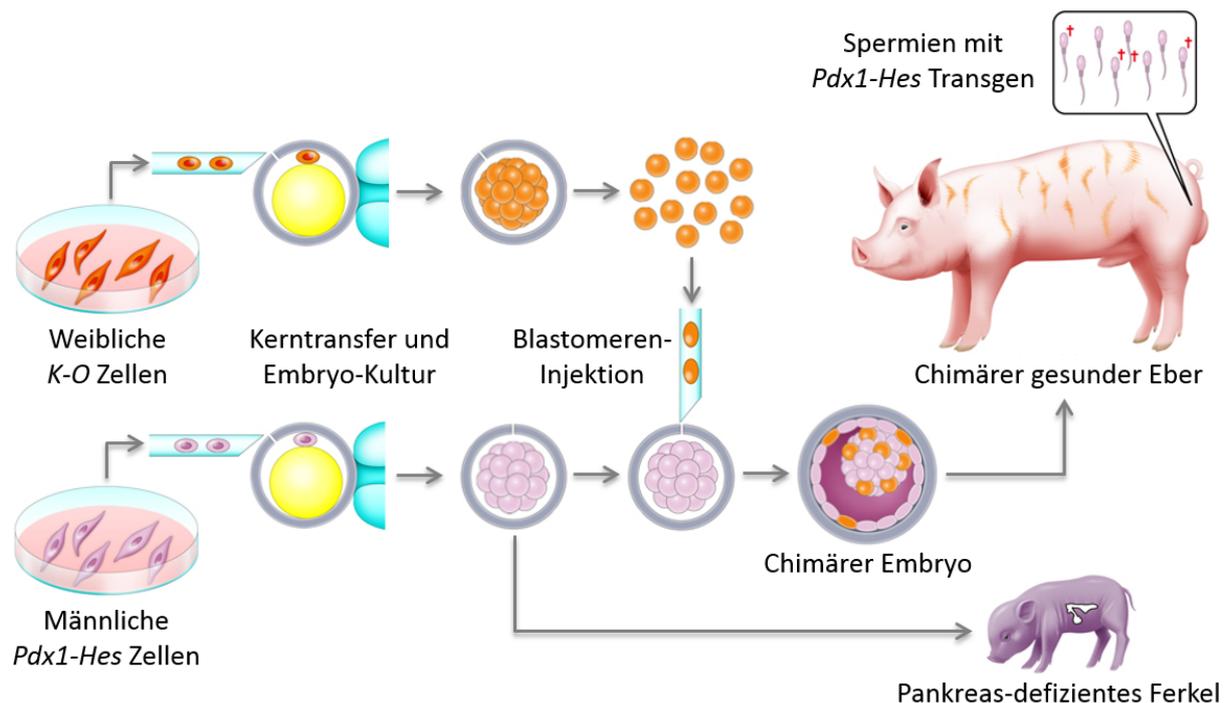


Abbildung 28. Generierung von allogenem Pankreasgewebe in chimären Schweinen. Dafür wurden einerseits Embryonen verwendet, in denen durch die Expression eines *Pdx1-Hes*-Transgens die Pankreasentwicklung gehemmt ist, andererseits Embryonen, deren Zellen durch das fluoreszierende Markerprotein Kusabira-Orange (*K-O*) markiert sind. Chimäre Embryonen wurden durch Injektion der *K-O*-transgenen Zellen in *Pdx1-Hes*-Embryonen erzeugt und in Zyklus-synchronisierte Empfängertiere übertragen. Während aus *Pdx1-Hes*-Embryonen resultierende Ferkel Pankreas-defizient und diabetisch waren, entwickelten die chimären Ferkel ein Pankreas, das in der Lage war, den Blutzuckerspiegel zu kontrollieren. Eine Besonderheit an diesem Experiment war die Verwendung von Embryonen mit unterschiedlichem Geschlecht. Die *Pdx1-Hes*-transgenen Embryonen wurden durch Kerntransfer aus einer männlichen Zelllinie generiert, die *K-O*-transgenen aus einer weiblichen Zelllinie. Da männliche Zellen in chimären Embryonen die Ausbildung der weiblichen Keimbahn unterdrücken, entwickelten sich die Chimären phänotypisch zu Ebern, die das *Pdx1-Hes*-Transgen an ihre Nachkommen weitervererbten, ohne selbst diabetisch zu sein. Sie hatten nämlich ein funktionierendes Pankreas, das auf den *K-O*-transgenen Zellen basierte (nach Matsunari et al., 2013).

Für eine xenogene *in vivo* Genese von menschlichen Organen („*Targeted Organ Generation*“ wie Nakauchi sein Konzept bezeichnet) in Großtieren könnten pluripotente humane Stammzellen in Schweineembryonen injiziert werden, die aus Zelllinien mit spezifischen Organ-Entwicklungsdefekten generiert wurden. Die Pilotexperimente zwischen

Maus und Ratte zeigten jedoch, dass aus den in Blastozysten injizierten xenogenen pluripotenten Stammzellen nicht nur das defiziente Gewebe entsteht, sondern dass differenzierte Zellerivate sich an vielen Geweben, inklusive z.B. des Zentralnervensystems beteiligen können. Dies würde in der Konstellation Mensch-Schwein natürlich große ethische Probleme hervorrufen, abgesehen davon, dass z.B. das Deutsche Embryonenschutzgesetz diese Chimärenbildung ohnehin verbietet, während in Japan eine Erlaubnis für die Durchführung solcher Experimente erteilt wurde¹⁴. Als technischer Lösungsansatz, um einen ubiquitären Chimärismus zu verhindern, bietet sich die Einschränkung des Differenzierungspotentials der verwendeten Stammzellen an. In einer neuen Arbeit der Gruppe Nakauchi (Kobayashi et al., 2015) wurde beispielsweise gezeigt, dass durch eine induzierbare Expression von MIXL1 (*Mix-Like Protein 1*) das Differenzierungspotential von murinen Stammzellen auf Endoderm-Derivate eingeschränkt werden kann. Somit können aus diesen Zellen zwar Pankreaszellen, nicht aber Nervenzellen entstehen.

Trotz großer ethischer Bedenken und legaler Restriktionen in Europa wird Nakauchi's Forschungsansatz sowohl in Japan als auch in den USA durch umfangreiche Forschungsmittel unterstützt (u.a. durch ein CIRM Research Leadership Grant in Höhe von über 5 Millionen US Dollar¹⁵). Biologisch bleibt zu klären, ob die Unterschiede in der Embryonalentwicklung von Schwein und Mensch die Entstehung komplett humaner Gewebe und Organe im Schwein zulassen. Weitere offene Fragen sind, ob potentiell verbleibende Reste von Schweinegewebe im humanen Organ nach einer Transplantation eine Abstoßungsreaktion auslösen würden. Zudem werden – ähnlich wie bei der Xenotransplantation – Infektionsrisiken bei der Transplantation von im Schwein entwickelten menschlichen Geweben diskutiert.

4.3.4 Koordination der Forschung mit genetisch veränderten Tiermodellen auf europäischer und internationaler Ebene

Der technologische Fortschritt und die Verfügbarkeit porciner Genomdaten erleichtern die genetische Modifikation von Schweinen für spezifische Fragestellungen. Dies hat einen beträchtlichen Einfluss auf die biomedizinische Forschung, da es die Möglichkeiten porciner experimenteller Modelle immens erweitert. Neben chirurgisch, fütterungsbedingt oder medikamentös induzierten experimentellen Veränderungen erlauben genetisch modifizierte Tiermodelle ein viel umfangreicheres Spektrum bezüglich Präzision, Reproduzierbarkeit und Aussagekraft. Die in diesem Gutachten beschriebenen Schweinemodelle sind nur Beispiele aus vielen Möglichkeiten auf einem sich schnell entwickelnden Feld an der Schnittstelle zwischen Veterinärwissenschaft und Biomedizin.

Genetisch maßgeschneiderte Großtiermodelle, insbesondere Schweine, sind vor allem dann sehr wichtig, wenn die entsprechenden Mausmodelle nicht die Mechanismen und Symptome der jeweiligen Erkrankung des Menschen abbilden. Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Schweinemodelle für die Duchenne-Muskeldystrophie und die

¹⁴ <http://phys.org/news/2013-06-japan-experts-mull-chimeric-embryos.html>

¹⁵ <https://www.cirm.ca.gov/our-progress/awards/generation-functional-cells-and-organs-ipscs>

Zystische Fibrose sind dafür hervorragende Beispiele. Insbesondere für die Testung der Anwendung und Wirksamkeit neuer Therapien spielt auch die Größe der Versuchstiere eine wichtige Rolle. Die Pharmakokinetik vieler Substanzen ist im Schwein sehr ähnlich wie im Menschen, während sie in den Nagermodellen allein schon aufgrund ihrer viel geringeren Größe oft sehr unterschiedlich ist. Daher wurden auch bislang schon für die präklinische Testung neuer Medikamente jeweils ein Nager- und ein Nichtnager-Modell verwendet. Da die Nichtnager-Modelle aber in den meisten Fällen nicht die der zu therapierenden menschlichen Erkrankung entsprechenden Veränderungen zeigten, konnten damit nur Fragen der Sicherheit, nicht aber der Wirksamkeit neuer Therapieverfahren geklärt werden. Dies hat sich durch die Verfügbarkeit der o.g. Methoden zur genetischen Modifikation von Großtieren erheblich geändert, da dadurch die Mechanismen und Symptome der jeweiligen Erkrankung des Menschen in diesen Spezies nachgeahmt werden können, wodurch auch Wirksamkeitsstudien möglich werden.

Inzwischen sind genetisch modifizierte Schweinemodelle für verschiedenste Krankheitsbilder entwickelt worden, unter anderem für Diabetes mellitus (Wolf et al., 2014a), und für die Krebsforschung (Flisikowska et al., 2013). Diese auf die humanen Erkrankungen zugeschnittenen Schweinemodelle, kombiniert mit interdisziplinär koordinierten Bemühungen zu ihrer Charakterisierung, Validierung und Etablierung (z.B. innerhalb der EU COST Action BM1308 „Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM“), bieten die einmalige Möglichkeit, die Lücke zwischen Grundlagenforschung und der klinischen Anwendung am Patienten zu schließen (Abbildung 29).

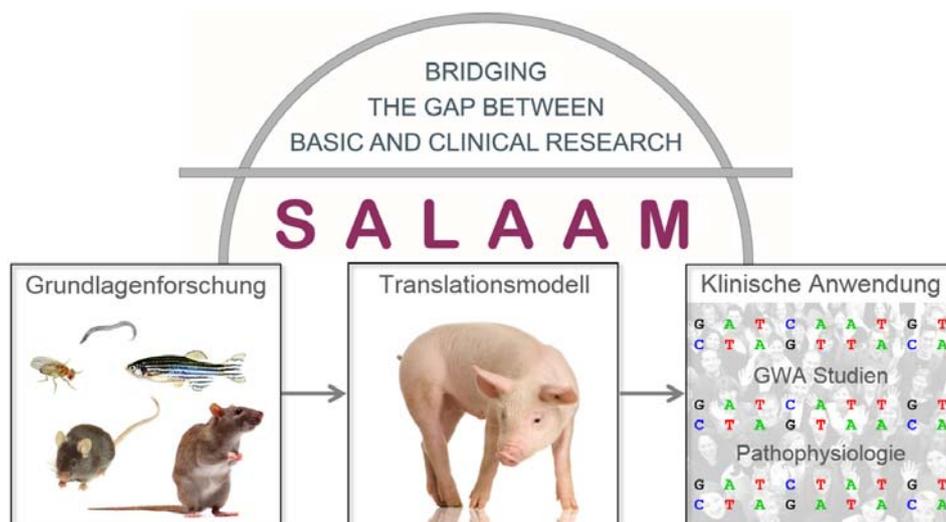


Abbildung 29. Ansatz zur Überbrückung der Lücke zwischen Grundlagenforschung an klassischen Tiermodellen und klinischer Forschung an Patienten durch die Etablierung, Charakterisierung und Implementierung genetisch maßgeschneiderter Großtiermodelle. Die EU COST Action BM1308 „Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM“ bündelt die Aktivitäten in Europa auf diesem Gebiet. Die Arbeitspakete beinhalten Methoden zur Verbesserung und Standardisierung von Methoden der genetischen Modifikation und Phänotypisierung von Großtiermodellen, die Entwicklung entsprechender Datenbanken sowie die Etablierung von Konzepten zur ethischen Bewertung solcher Tiermodelle und ihrer Kommunikation an die Gesellschaft (<http://www.salaam.genzentrum.lmu.de/>).

4.4 Chancen und Risiken des *Genome Editing* bei landwirtschaftlich genutzten Tieren

Die am Beispiel von Tiermodellen und Spenderschweinen für die Xenotransplantation aufgezeigten Möglichkeiten der genetischen Modifikation bzw. des *Genome Editing* wären im Prinzip auch für landwirtschaftlich genutzte Tiere einsetzbar. Insbesondere Verfahren des *Genome Editing* ermöglichen einen gezielten Austausch von Genvarianten innerhalb einer Tierart, der – einmal erfolgt – nicht mehr nachweisbar ist. Durch die im ersten Kapitel geschilderten Fortschritte der Genomforschung können Erbfehler bzw. Defektallele zunehmend einfach identifiziert werden. Durch *Genome Editing* wäre es möglich, bei Anlageträgern das defekte Allel zu korrigieren, ohne sonstige Veränderungen des Genotyps zu verursachen. Nach dem gleichen Prinzip wäre es möglich, erwünschte Allele zielgerichtet in bestimmte Genotypen einzuführen.

Auch wenn Hörner ein wichtiges Spezifikationsmerkmal der Familie *Bovidae* darstellen, sind sie in modernen Rinderhaltungssystemen meist unerwünscht. Genetisch hornlose Rinder sind seit langem bekannt. Bei einigen Fleischrinderrassen, wie Aberdeen Angus, Deutsch Angus, Polled Hereford oder Galloway, ist die Hornlosigkeit dauerhaft genetisch verankert. Bei vielen gehörnten Rassen, wie z.B. Charolais, Limousin, Shorthorn, Pinzgauer, Braunvieh, Deutsche Holsteins, Gelbvieh, Fleckvieh u. a., existieren hornlose Zuchtlinien. Als Vorteile hornloser Rinder werden diskutiert:¹⁶

- Geringere Stoßverletzungen unter den Tieren (Vermeidung von Aborten, Wertminderungen von Haut und Schlachtkörper)
- Geringere Verletzungsgefahr für den Menschen im Umgang mit den Rindern
- Ruhigeres Verhalten der Tiere in der Gruppe (Jungviehaufzucht, Laufstallhaltung, Bullenmast, Haltung von Besamungsbullen)

Die daher üblicherweise mit physikalischen Methoden durchgeführten Enthornungen sind nicht nur mit einem hohen Kostenaufwand verbunden, sondern auch unter Aspekten des Tierschutzes bedenklich. Ein züchterischer Ansatz zur Erlangung genetisch hornloser Populationen ist daher wünschenswert. Dass dieser Phänotyp (Hornlosigkeit) dominant vererbt wird, ist bereits seit über 70 Jahren bekannt. Auch der die Hornlosigkeit verursachende Locus konnte schon vor fast 20 Jahren dem Rinderchromosom 1 zugeordnet werden. Doch erst im Jahr 2012 konnte Ivica Medugorac mit seiner Arbeitsgruppe die verantwortliche Region auf Chromosom 1 auf 381 Kilobasenpaare eingrenzen und zwei verschiedene Mutationen aufklären, die perfekt mit dem Merkmal Hornlosigkeit assoziiert sind (Medugorac et al., 2012). In verschiedenen Fleisch- und Zweinutzungs-Rinderrassen handelt es sich um die sogenannte „keltische Mutation“, bei der in einer nicht-kodierenden Region zwischen den Genen *IFNAR2* und *OLIG1* ein Abschnitt von 212 Basenpaaren (1.705.834–1.706.045) dupliziert und dadurch ein Abschnitt von 10 Basenpaaren (1.706.051–1.706.060) ersetzt ist. Bei Rinderrassen friesischen Ursprungs wurde eine Duplikation eines ca. 80 Kilobasenpaare langen DNA-Abschnitts als für die Hornlosigkeit verantwortliche Mutation

¹⁶ <http://www.lfl.bayern.de/itz/rind/025175/>

identifiziert (Rothammer et al., 2014). In beiden Fällen bleibt der genaue biologische Mechanismus, über den diese Mutationen dominant zur Hornlosigkeit führen, noch zu klären.

Wie oben erwähnt existieren in einigen wirtschaftlich sehr wichtigen Rinderrassen nur einzelne hornlose Zuchtlinien, in denen es meist keine Spitzenvererber gibt. Das Merkmal muss daher mühsam über mehrere Generationen in züchterisch interessante Linien eingeführt werden. Zumindest für die keltische Mutation wurde aber ein Weg skizziert, wie diese gezielt in einen gehörnten Genotyp eingeführt werden könnte, ohne diesen ansonsten zu verändern (Tan et al., 2013). Die nachfolgende **Abbildung 30** zeigt eine Zusammenfassung dieser Strategie. Allerdings ist zu bedenken, dass die dafür notwendige Kerntransfer-Technologie in ihrer Effizienz stark von den verwendeten Kernspenderzellen abhängt und bei Embryonen, Föten und direkten Nachkommen aus dem Verfahren epigenetische Veränderungen, z. B. im Bereich der DNA-Methylierung, auftreten können. Bei Nachkommen aus der geschlechtlichen Fortpflanzung von Klontieren wurden solche Veränderungen allerdings nicht beobachtet^{17,18}.

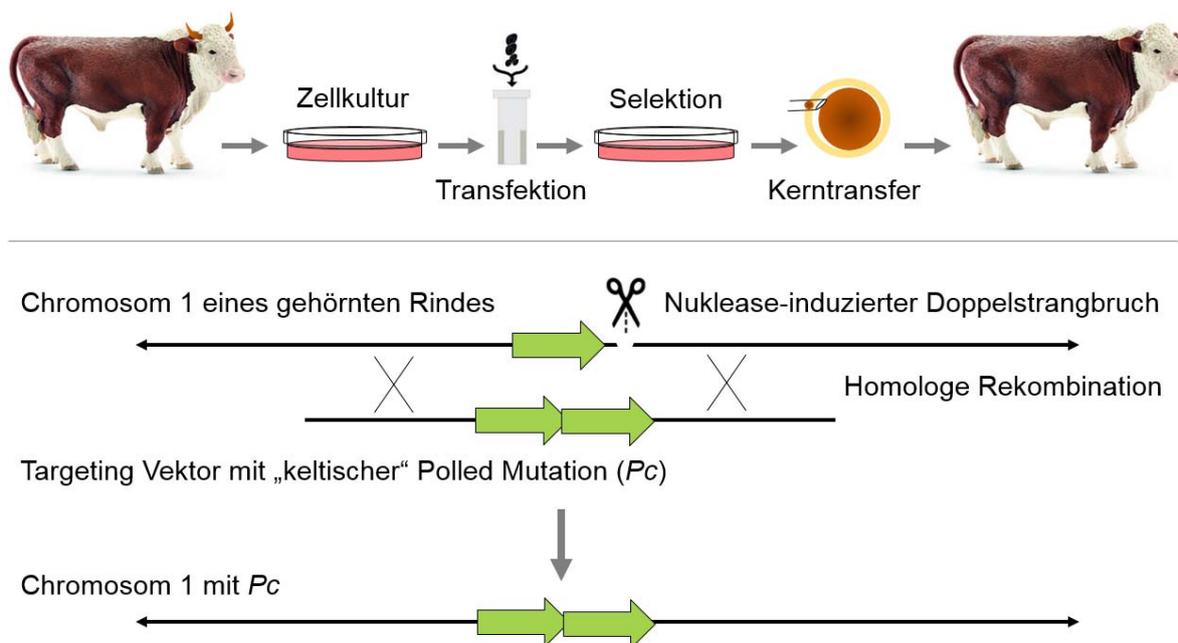


Abbildung 30. Konzept zur gezielten Einföhrung des Merkmals Hornlosigkeit beim Rind (Tan et al., 2013). Die Strategie kombiniert *Genome Editing* in kultivierten Zellen eines gehörnten Rindes mit dem Kerntransfer aus Zellen, in die die „keltische“ Polled Mutation durch homologe Rekombination gezielt eingeföhrt wurde. Durch die Einföhrung eines DNA-Doppelstrangbruchs im Bereich der Zielregion wird die Rate homologer Rekombination erhöht. Mit diesem Ansatz wäre es möglich, das Merkmal Hornlosigkeit gezielt einzuföhren, ohne den Genotyp ansonsten zu verändern.

¹⁷ <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/319r.pdf>

¹⁸ <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/2794.pdf>

FAZIT: Das Methodenspektrum für die genetische Modifikation von Haus- und Nutztieren wurde in den letzten zwei Dekaden erheblich erweitert, so dass heute ähnliche Möglichkeiten der reversen Genetik wie für die Nagermodelle bestehen. Insbesondere die Kerntransfer-technologie mit genetisch modifizierten Zellen sowie neue Methoden des *Genome Editing* ermöglichen zielgerichtete genetische Veränderungen. Bislang werden diese Technologien vor allem im Bereich der biomedizinischen Forschung eingesetzt. Ein wichtiges Gebiet ist die Erstellung translationaler Großtiermodelle, die in der Entwicklung neuer Therapien zwischen grundlegende Untersuchungen an Nagermodellen und klinische Studien beim Menschen geschaltet werden können. Damit sollten Wirksamkeit und potentielle Nebenwirkungen neuer Therapien besser abgeschätzt und die Effizienz der Entwicklung neuer Therapien verbessert werden können. Ein weiteres wichtiges Gebiet ist die genetische Modifikation von Schweinen als Donoren von Zellen, Geweben oder Organen für die Xenotransplantation. Diese Option wird vermutlich zuerst für Insulin-produzierende Zellen zur Verfügung stehen, allerdings wurden in den letzten Jahren auch große Fortschritte in der genetischen Modifikation und präklinischen Testung von Spenderschweinen für die xenogene Herztransplantation erzielt. Die Generierung komplett humaner Organe in Großtieren wird als Option diskutiert, die Realisierbarkeit ist aber aus biologischen und ethischen Gründen im Moment fraglich. *Genome Editing* ermöglicht gezielte genetische Veränderungen prinzipiell auch in landwirtschaftlich genutzten Spezies. Insbesondere bietet diese Technologie die Möglichkeit, interessante Genvarianten zielgerichtet innerhalb einer Rasse oder Art auszutauschen. Damit könnte man in einem Schritt erreichen, was anderenfalls nur durch Kreuzung und viele Generationen Rückkreuzung möglich wäre.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch die Fortschritte der Genomforschung bei Haus- und Nutztieren können interessante Genvarianten, aber auch Defektgene zunehmend schnell identifiziert werden. Neue Methoden des *Genome Editing* ermöglichen erstmals zielgerichtete Veränderungen im Genom, die außer der eingeführten Veränderung keine Spuren hinterlassen. Damit ist es theoretisch möglich, genetische Defekte zu korrigieren oder interessante Genvarianten passgenau zwischen Rassen einer Art auszutauschen. Dies beinhaltet auch Genvarianten ausgestorbener Rassen, von denen nur noch DNA vorhanden ist.

Die zielgerichtete Veränderung genetischer Information von Tieren ist im Bereich der medizinischen Forschung durch die internationale und nationale Tierschutzgesetzgebung reguliert und in weiten Kreisen der Gesellschaft als notwendig akzeptiert. Genetisch veränderte Großtiere, vor allem Schweine, haben als biomedizinische Modelle das Potential, die translationale Lücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Testung neuer Therapieverfahren zu schließen. Um eine unnötige Duplikation von Untersuchungen zu vermeiden, ist eine enge Abstimmung der auf diesem Gebiet arbeitenden Forschergruppen wünschenswert und zumindest in Europa bislang auch gut gelungen. Die Sichtung der Literatur zeigt, dass die einzelnen Arbeitsgruppen unterschiedliche Schwerpunkte haben und speziell dafür Tiermodelle generieren. Die Etablierung der EU COST Action BM1308 „Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM“ verbessert die Transparenz und Interaktion zwischen den Arbeitsgruppen zusätzlich. Transparenz ist jedoch nicht nur zwischen Forschern untereinander, sondern auch gegenüber der Gesellschaft erforderlich. Mit diesem Ziel wurde 2011 die Basel Declaration Society¹⁹ gegründet, deren Ziel es ist, die Kommunikation zwischen Forschern und der Öffentlichkeit zu fördern und damit das Vertrauen der Öffentlichkeit in die tierexperimentelle biomedizinische Forschung zu stärken. Wie die Deklaration von Helsinki, in der die ethischen Grundsätze für die klinische Forschung am Menschen formuliert sind²⁰, will die Basel Declaration Society dazu beitragen, dass ethische Prinzipien in der tierexperimentellen Forschung weltweit angewendet werden. Eine besondere Position nimmt die genetische Modifikation von Tieren als Spender von Zellen, Geweben und Organen für die Xenotransplantation ein, da der Mensch als potentieller Empfänger unmittelbar betroffen ist. Die ethischen und theologischen Aspekte aus der Sicht von drei Weltreligionen wurden 2013 in einem interdisziplinären Symposium an der Katholischen Akademie in Bayern²¹ erörtert und die Schlussfolgerungen kürzlich publiziert (Sautermeister et al., 2015). Demnach stehen weder aus christlicher, noch aus jüdischer oder islamischer Sicht fundamentale Gründe gegen die Xenotransplantation als Maßnahme zur Behandlung von lebensbedrohlichen oder schweren Erkrankungen. Für die Minimierung eines potentiell mit der Xenotransplantation assoziierten

¹⁹ <http://de.basel-declaration.org/>

²⁰ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>

²¹ <http://www.kath-akademie-bayern.de/vorschau-detail/events/xenotransplantation-als-theologisch-ethische-herausforderung.html>

Infektionsrisikos wurden Leitlinien publiziert, die sowohl das Hygiene- und genetische Monitoring der Spendertiere, als auch ein Untersuchungsprogramm für Empfänger und ihre Kontaktpersonen beinhalten (Fishman et al., 2012).

Weniger übersichtlich ist die Lage im Hinblick auf genetische Modifikationen, insbesondere *Genome Editing*, von landwirtschaftlich genutzten Tieren. Aufgrund der großen Effizienz und relativ einfachen Handhabung des CRISPR/Cas Systems ist damit zu rechnen, dass es in naher Zukunft international auch zu Anwendungen im landwirtschaftlichen Bereich kommen wird. Für die zielgerichtete Einführung des Merkmals Hornlosigkeit wurde die technische Möglichkeit bereits aufgezeigt (Tan et al., 2013; Tan et al., 2012). Nachdem – einmal erfolgt – in den meisten Fällen die Herkunft bzw. Methode der eingeführten Veränderung nicht mehr nachweisbar ist, erscheint ein generelles Verbot der Nutzung vor dem Hintergrund eines globalen Marktes für Zuchttiere bzw. deren Gameten wenig sinnvoll. Gleiches gilt für den Vorschlag der EU-Kommission, Klonen für den landwirtschaftlichen Bereich gänzlich zu verbieten²². Diesem Vorschlag haben der Agrar- und der Umweltausschuss des EU-Parlaments im Juni 2015 zugestimmt²³. Viel zielführender wäre eine Regelung, die – ähnlich wie bei Tierversuchen – auf der Basis von Einzelfallentscheidungen sinnvolle und ethisch gerechtfertigte Vorhaben des *Genome Editing* auch bei landwirtschaftlich genutzten Tieren zulassen kann. Die wissenschaftliche Entwicklung in diesem Bereich ist zu schnell, um derzeit kategorisch ausschließen zu können, dass es solche Vorhaben geben wird.

²² <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:52013PC0892&from=EN>

²³ <http://www.europarl.europa.eu/news/de/news-room/content/20150617IPR67269/html/Ban-not-just-animal-cloning-but-cloned-food-feed-and-imports-too-say-MEPs>

6 LITERATUR

- Agler, C., Nielsen, D.M., Urkasemsin, G., Singleton, A., Tonomura, N., Sigurdsson, S., Tang, R., Linder, K., Arepalli, S., Hernandez, D., *et al.* (2014). Canine hereditary ataxia in old english sheepdogs and gordon setters is associated with a defect in the autophagy gene encoding RAB24. *PLoS Genet* *10*, e1003991.
- Aigner, B., Renner, S., Kessler, B., Klymiuk, N., Kurome, M., Wunsch, A., and Wolf, E. (2010). Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *Journal of molecular medicine* *88*, 653-664.
- Al-Mashhadi, R.H., Sorensen, C.B., Kragh, P.M., Christoffersen, C., Mortensen, M.B., Tolbod, L.P., Thim, T., Du, Y., Li, J., Liu, Y., *et al.* (2013). Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Sci Transl Med* *5*, 166ra161.
- Aleman, M., Riehl, J., Aldridge, B.M., Lecouteur, R.A., Stott, J.L., and Pessah, I.N. (2004). Association of a mutation in the ryanodine receptor 1 gene with equine malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* *30*, 356-365.
- Araki, E., Nakamura, K., Nakao, K., Kameya, S., Kobayashi, O., Nonaka, I., Kobayashi, T., and Katsuki, M. (1997). Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle Degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Bioph Res Co* *238*, 492-497.
- Bao, L., He, L., Chen, J., Wu, Z., Liao, J., Rao, L., Ren, J., Li, H., Zhu, H., Qian, L., *et al.* (2011). Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res* *21*, 600-608.
- Beck, C.L., Fahlke, C., and George, A.L., Jr. (1996). Molecular basis for decreased muscle chloride conductance in the myotonic goat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 11248-11252.
- Beever, J.E., Smit, M.A., Meyers, S.N., Hadfield, T.S., Bottema, C., Albretsen, J., and Cockett, N.E. (2006). A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Anim Genet* *37*, 66-71.
- Bellone, R.R., Holl, H., Setaluri, V., Devi, S., Maddodi, N., Archer, S., Sandmeyer, L., Ludwig, A., Foerster, D., Pruvost, M., *et al.* (2013). Evidence for a retroviral insertion in TRPM1 as the cause of congenital stationary night blindness and leopard complex spotting in the horse. *PLoS One* *8*, e78280.
- Betthausen, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., *et al.* (2000). Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nature biotechnology* *18*, 1055-1059.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* *45*, 273-297.
- Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K., and Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 10570-10575.
- Black, L.L., Gaynor, J., Gahring, D., Adams, C., Aron, D., Harman, S., Gingerich, D.A., and Harman, R. (2007). Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther* *8*, 272-284.
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik, C.G., Tellam, R.L., Worley, K.C., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Weinstock, G.M., Adelson, D.L., Eichler, E.E., *et al.* (2009). The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* *324*, 522-528.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255-256.

- Brem, G., Brenig, B., Goodman, H.M., Selden, R.C., Graf, F., Kruff, B., Springmann, K., Hondele, J., Meyer, J., Winnacker, E.L., *et al.* (1985). Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 20, 251-252.
- Brevini, T.A., Pennarossa, G., Attanasio, L., Vanelli, A., Gasparrini, B., and Gandolfi, F. (2010). Culture conditions and signalling networks promoting the establishment of cell lines from parthenogenetic and biparental pig embryos. *Stem Cell Rev* 6, 484-495.
- Brinster, R.L., and Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11303-11307.
- Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11298-11302.
- Brons, A.K., Henthorn, P.S., Raj, K., Fitzgerald, C.A., Liu, J., Sewell, A.C., and Giger, U. (2013). SLC3A1 and SLC7A9 mutations in autosomal recessive or dominant canine cystinuria: a new classification system. *J Vet Intern Med* 27, 1400-1408.
- Brooks, S.A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H.E., Streeter, C., Mezey, J., Cook, D., and Antczak, D.F. (2010). Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genet* 6, e1000909.
- Buitkamp, J., Semmer, J., and Gotz, K.U. (2011). Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (MOCS1). *BMC Genet* 12, 11.
- Byrne, G.W., Du, Z., Sun, Z., Asmann, Y.W., and McGregor, C.G. (2011). Changes in cardiac gene expression after pig-to-primate orthotopic xenotransplantation. *Xenotransplantation* 18, 14-27.
- Cao, H., Machuca, T.N., Yeung, J.C., Wu, J., Du, K., Duan, C., Hashimoto, K., Linacre, V., Coates, A.L., Leung, K., *et al.* (2013). Efficient gene delivery to pig airway epithelia and submucosal glands using helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, e127.
- Cao, H., Yang, P., Pu, Y., Sun, X., Yin, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Liu, Y., Fang, F., *et al.* (2012). Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int J Biol Sci* 8, 498-511.
- Carlson, D.F., Tan, W., Lillico, S.G., Stverakova, D., Proudfoot, C., Christian, M., Voytas, D.F., Long, C.R., Whitelaw, C.B., and Fahrenkrug, S.C. (2012). Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 17382-17387.
- Cavanagh, K.T., Leipprandt, J.R., Jones, M.Z., and Friderici, K. (1995). Molecular defect of caprine N-acetylglucosamine-6-sulphatase deficiency. A single base substitution creates a stop codon in the 5'-region of the coding sequence. *J Inherit Metab Dis* 18, 96.
- Charlier, C., Agerholm, J.S., Coppieters, W., Karlskov-Mortensen, P., Li, W., de Jong, G., Fasquelle, C., Karim, L., Cirera, S., Cambisano, N., *et al.* (2012). A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS One* 7, e43085.
- Charlier, C., Coppieters, W., Rollin, F., Desmecht, D., Agerholm, J.S., Cambisano, N., Carta, E., Dardano, S., Dive, M., Fasquelle, C., *et al.* (2008). Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat Genet* 40, 449-454.
- Chavez, L.S., Serda, R., Choe, S., Davidi, L., Harmeyer, J., and Omdahl, J.L. (2003). Molecular basis for pseudo vitamin D-deficiency rickets in the Hannover pig. *J Nutr Biochem* 14, 378-385.
- Chen, J.H., Stoltz, D.A., Karp, P.H., Ernst, S.E., Pezzulo, A.A., Moninger, T.O., Rector, M.V., Reznikov, L.R., Launspach, J.L., Chaloner, K., *et al.* (2010). Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell* 143, 911-923.

Cheng, D., Guo, Y., Li, Z., Liu, Y., Gao, X., Gao, Y., Cheng, X., Hu, J., and Wang, H. (2012). Porcine induced pluripotent stem cells require LIF and maintain their developmental potential in early stage of embryos. *PLoS One* *7*, e51778.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* *24*, 132-141.

Collawn, J.F., Lazrak, A., Bebok, Z., and Matalon, S. (2012). The CFTR and ENaC debate: how important is ENaC in CF lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *302*, L1141-1146.

Cooper, D.K., Satyananda, V., Ekser, B., van der Windt, D.J., Hara, H., Ezzelarab, M.B., and Schuurman, H.J. (2014). Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998-2013): a comprehensive review of the literature. *Xenotransplantation* *21*, 397-419.

Cowan, P.J., Robson, S.C., and d'Apice, A.J. (2011). Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* *16*, 214-221.

Cutting, G.R. (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* *16*, 45-56.

Daetwyler, H.D., Capitan, A., Pausch, H., Stothard, P., van Binsbergen, R., Brondum, R.F., Liao, X., Djari, A., Rodriguez, S.C., Grohs, C., *et al.* (2014). Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nat Genet* *46*, 858-865.

Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., *et al.* (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature biotechnology* *20*, 251-255.

Davis, B.T., Wang, X.J., Rohret, J.A., Struzynski, J.T., Merricks, E.P., Bellinger, D.A., Rohret, F.A., Nichols, T.C., and Rogers, C.S. (2014). Targeted disruption of LDLR causes hypercholesterolemia and atherosclerosis in Yucatan miniature pigs. *PLoS One* *9*, e93457.

Dmochewicz, M., and Wolf, E. (2015). Genetic engineering of pigs for the creation of translational models of human pathologies. *Animal Frontiers* *5*, 50-56.

Dobrinski, I., and Travis, A.J. (2007). Germ cell transplantation for the propagation of companion animals, non-domestic and endangered species. *Reproduction, fertility, and development* *19*, 732-739.

Dong, Y., Xie, M., Jiang, Y., Xiao, N., Du, X., Zhang, W., Tosser-Klopp, G., Wang, J., Yang, S., Liang, J., *et al.* (2013). Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nat Biotechnol* *31*, 135-141.

Drögemüller, C., Reichart, U., Seuberlich, T., Oevermann, A., Baumgartner, M., Kuhni Bogenbor, K., Stoffel, M.H., Syring, C., Meylan, M., Muller, S., *et al.* (2011). An unusual splice defect in the mitofusin 2 gene (MFN2) is associated with degenerative axonopathy in Tyrolean Grey cattle. *PLoS One* *6*, e18931.

Drögemüller, C., Tetens, J., Sigurdsson, S., Gentile, A., Testoni, S., Lindblad-Toh, K., and Leeb, T. (2010). Identification of the bovine Arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (SUOX) in bone development. *PLoS Genet* *6*.

Elston, C., and Geddes, D. (2007). Inflammation in cystic fibrosis--when and why? Friend or foe? *Seminars in respiratory and critical care medicine* *28*, 286-294.

Esteban, M.A., Xu, J., Yang, J., Peng, M., Qin, D., Li, W., Jiang, Z., Chen, J., Deng, K., Zhong, M., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* *284*, 17634-17640.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154-156.

Ezashi, T., Telugu, B.P., Alexenko, A.P., Sachdev, S., Sinha, S., and Roberts, R.M. (2009). Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 10993-10998.

- Ezashi, T., Telugu, B.P., and Roberts, R.M. (2012). Induced pluripotent stem cells from pigs and other ungulate species: an alternative to embryonic stem cells? *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 47 Suppl 4, 92-97.
- Fairclough, R.J., Wood, M.J., and Davies, K.E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature reviews Genetics* 14, 373-378.
- Fattah, F., Lee, E.H., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N., and Hendrickson, E.A. (2010). Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS genetics* 6, e1000855.
- Fishman, J.A., Scobie, L., and Takeuchi, Y. (2012). Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation. *Xenotransplantation* 19, 72-81.
- Flisikowska, T., Kind, A., and Schnieke, A. (2013). The new pig on the block: modelling cancer in pigs. *Transgenic research* 22, 673-680.
- Flisikowska, T., Merkl, C., Landmann, M., Eser, S., Rezaei, N., Cui, X., Kurome, M., Zakhartchenko, V., Kessler, B., Wieland, H., *et al.* (2012). A porcine model of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 143, 1173-1175 e1171-1177.
- Fortier, L.A., Potter, H.G., Rickey, E.J., Schnabel, L.V., Foo, L.F., Chong, L.R., Stokol, T., Cheetham, J., and Nixon, A.J. (2010). Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* 92, 1927-1937.
- Fortier, L.A., and Travis, A.J. (2011). Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther* 2, 9.
- Fox-Clipsham, L.Y., Carter, S.D., Goodhead, I., Hall, N., Knottenbelt, D.C., May, P.D., Ollier, W.E., and Swinburne, J.E. (2011). Identification of a mutation associated with fatal Foal Immunodeficiency Syndrome in the Fell and Dales pony. *PLoS Genet* 7, e1002133.
- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32, 279-284.
- Gandolfi, B., Gruffydd-Jones, T.J., Malik, R., Cortes, A., Jones, B.R., Helps, C.R., Prinzenberg, E.M., Erhardt, G., and Lyons, L.A. (2012). First WNK4-hypokalemia animal model identified by genome-wide association in Burmese cats. *PLoS One* 7, e53173.
- Garrels, W., Mates, L., Holler, S., Dalda, A., Taylor, U., Petersen, B., Niemann, H., Izsvak, Z., Ivics, Z., and Kues, W.A. (2011). Germline transgenic pigs by Sleeping Beauty transposition in porcine zygotes and targeted integration in the pig genome. *PLoS one* 6, e23573.
- Georges, M. (2014). Towards sequence-based genomic selection of cattle. *Nat Genet* 46, 807-809.
- Gill, J.L., James, V.M., Carta, E., Harris, D., Topf, M., Scholes, S.F., Hateley, G., and Harvey, R.J. (2012). Identification of congenital muscular dystonia 2 associated with an inherited GlyT2 defect in Belgian Blue cattle from the United Kingdom. *Anim Genet* 43, 267-270.
- Gjorret, J.O., and Maddox-Hyttel, P. (2005). Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reproduction, fertility, and development* 17, 113-124.
- Glaser, S., Anastassiadis, K., and Stewart, A.F. (2005). Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet* 37, 1187-1193.
- Goddard, M.E., and Hayes, B.J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Rev Genet* 10, 381-391.
- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., and Wolf, E. (2014a). Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal reproduction science* 149, 46-58.
- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H., and Wolf, E. (2014b). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 4139-4144.

- Graves, K.T., Henney, P.J., and Ennis, R.B. (2009). Partial deletion of the LAMA3 gene is responsible for hereditary junctional epidermolysis bullosa in the American Saddlebred Horse. *Anim Genet* *40*, 35-41.
- Griesenbach, U., and Alton, E.W. (2009). Cystic fibrosis gene therapy: successes, failures and hopes for the future. *Expert Rev Respir Med* *3*, 363-371.
- Groenen, M.A., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H.J., *et al.* (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* *491*, 393-398.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., and Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell research* *24*, 372-375.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Jr., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* *315*, 680-683.
- Han, X., Han, J., Ding, F., Cao, S., Lim, S.S., Dai, Y., Zhang, R., Zhang, Y., Lim, B., and Li, N. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. *Cell Res* *21*, 1509-1512.
- Harding, J., Roberts, R.M., and Mirochnitchenko, O. (2013). Large animal models for stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther* *4*, 23.
- Hauschild, J., Petersen, B., Santiago, Y., Queisser, A.L., Carnwath, J.W., Lucas-Hahn, A., Zhang, L., Meng, X., Gregory, P.D., Schwinzer, R., *et al.* (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 12013-12017.
- Hayden, E.C. (2014). Technology: The \$1,000 genome. *Nature* *507*, 294-295.
- Herrid, M., Olejnik, J., Jackson, M., Suchowerska, N., Stockwell, S., Davey, R., Hutton, K., Hope, S., and Hill, J.R. (2009). Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biology of reproduction* *81*, 898-905.
- Herrid, M., Vignarajan, S., Davey, R., Dobrinski, I., and Hill, J.R. (2006). Successful transplantation of bovine testicular cells to heterologous recipients. *Reproduction* *132*, 617-624.
- Hildebrandt, F., Heeringa, S.F., Ruschendorf, F., Attanasio, M., Nurnberg, G., Becker, C., Seelow, D., Huebner, N., Chernin, G., Vlangos, C.N., *et al.* (2009). A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. *PLoS Genet* *5*, e1000353.
- Hill, J.R., and Dobrinski, I. (2006). Male germ cell transplantation in livestock. *Reproduction, fertility, and development* *18*, 13-18.
- Hoegger, M.J., Fischer, A.J., McMenimen, J.D., Ostedgaard, L.S., Tucker, A.J., Awadalla, M.A., Moninger, T.O., Michalski, A.S., Hoffman, E.A., Zabner, J., *et al.* (2014). Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science* *345*, 818-822.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* *51*, 919-928.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhaue, M., Brem, G., Wolf, E., *et al.* (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* *4*, 1054-1060.
- Honaramooz, A., Behboodi, E., Hausler, C.L., Blash, S., Ayres, S., Azuma, C., Echelard, Y., and Dobrinski, I. (2005). Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl* *26*, 698-705.
- Honaramooz, A., Behboodi, E., Megee, S.O., Overton, S.A., Galantino-Homer, H., Echelard, Y., and Dobrinski, I. (2003). Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biology of reproduction* *69*, 1260-1264.

Honaramooz, A., Megee, S.O., and Dobrinski, I. (2002). Germ cell transplantation in pigs. *Biology of reproduction* *66*, 21-28.

Houser, S.L., Kuwaki, K., Knosalla, C., Dor, F.J., Gollackner, B., Cheng, J., Shimizu, A., Schuurman, H.J., and Cooper, D.K. (2004). Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* *11*, 416-425.

Huang, B., Li, T., Alonso-Gonzalez, L., Gorre, R., Keatley, S., Green, A., Turner, P., Kallingappa, P.K., Verma, V., and Oback, B. (2011). A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. *PLoS One* *6*, e24501.

International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004). Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* *432*, 695-716.

Itani, O.A., Chen, J.H., Karp, P.H., Ernst, S., Keshavjee, S., Parekh, K., Klesney-Tait, J., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2011). Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl⁻ conductance but not increased Na⁺ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 10260-10265.

Izadyar, F., Den Ouden, K., Stout, T.A., Stout, J., Coret, J., Lankveld, D.P., Spoomakers, T.J., Colenbrander, B., Oldenbroek, J.K., Van der Ploeg, K.D., *et al.* (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction* *126*, 765-774.

Jakobsen, J.E., Li, J., Kragh, P.M., Moldt, B., Lin, L., Liu, Y., Schmidt, M., Winther, K.D., Schyth, B.D., Holm, I.E., *et al.* (2011). Pig transgenesis by Sleeping Beauty DNA transposition. *Transgenic research* *20*, 533-545.

Jiang, Y., Xie, M., Chen, W., Talbot, R., Maddox, J.F., Faraut, T., Wu, C., Muzny, D.M., Li, Y., Zhang, W., *et al.* (2014). The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science* *344*, 1168-1173.

Jin, D.I., Lee, S.H., Choi, J.H., Lee, J.S., Lee, J.E., Park, K.W., and Seo, J.S. (2003). Targeting efficiency of α -1,3-galactosyl transferase gene in pig fetal fibroblast cells. *Experimental & molecular medicine* *35*, 572-577.

Jung, S., Pausch, H., Langenmayer, M.C., Schwarzenbacher, H., Majzoub-Altweck, M., Gollnick, N.S., and Fries, R. (2014). A nonsense mutation in PLD4 is associated with a zinc deficiency-like syndrome in Fleckvieh cattle. *BMC Genomics* *15*, 623.

Jurgens, W.J., Oedayrasingh-Varma, M.J., Helder, M.N., Zandiehoulabi, B., Schouten, T.E., Kuik, D.J., Ritt, M.J., and van Milligen, F.J. (2008). Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* *332*, 415-426.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of reproduction* *69*, 612-616.

Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. (2013). Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu Rev Cell Dev Biol* *29*, 163-187.

Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* *19*, 1129-1155.

Kelly, T., and Buxbaum, J. (2015). Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* *60*, 1903-1913.

Kfoury, C. (2007). Therapeutic cloning: promises and issues. *McGill J Med* *10*, 112-120.

Kim, H.J., Lee, H.J., Kim, H., Cho, S.W., and Kim, J.S. (2009). Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome research* *19*, 1279-1288.

Kim, Y., Turner, D., Nelson, J., Dobrinski, I., McEntee, M., and Travis, A.J. (2008). Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog. *Reproduction* *136*, 823-831.

Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 1156-1160.

- Kisiday, J.D., Kopesky, P.W., Evans, C.H., Grodzinsky, A.J., McIlwraith, C.W., and Frisbie, D.D. (2008). Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J Orthop Res* 26, 322-331.
- Klymiuk, N., Aigner, B., Brem, G., and Wolf, E. (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev* 77, 209-221.
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., *et al.* (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Human molecular genetics* 22, 4368-4382.
- Klymiuk, N., Bocker, W., Schonitzer, V., Bahr, A., Radic, T., Frohlich, T., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Schilling, E., *et al.* (2012a). First inducible transgene expression in porcine large animal models. *FASEB J* 26, 1086-1099.
- Klymiuk, N., Mundhenk, L., Kraehe, K., Wuensch, A., Plog, S., Emrich, D., Langenmayer, M.C., Stehr, M., Holzinger, A., Kroner, C., *et al.* (2012b). Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 90, 597-608.
- Klymiuk, N., van Buerck, L., Bahr, A., Offers, M., Kessler, B., Wuensch, A., Kurome, M., Thormann, M., Lochner, K., Nagashima, H., *et al.* (2012c). Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* 61, 1527-1532.
- Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., and Nakauchi, H. (2015). Targeted organ generation using Mixl1-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst complementation. *Stem Cells Dev* 24, 182-189.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.S., Usui, J., Knisely, A.S., *et al.* (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787-799.
- Koh, S., and Piedrahita, J.A. (2014). From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. *Theriogenology* 81, 103-111.
- Koltes, J.E., Mishra, B.P., Kumar, D., Kataria, R.S., Totir, L.R., Fernando, R.L., Cobbold, R., Steffen, D., Coppieters, W., Georges, M., *et al.* (2009). A nonsense mutation in cGMP-dependent type II protein kinase (PRKG2) causes dwarfism in American Angus cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 19250-19255.
- Kurome, M., Geistlinger, L., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Klymiuk, N., Wuensch, A., Richter, A., Baehr, A., Kraehe, K., Burkhardt, K., *et al.* (2013). Factors influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC biotechnology* 13, 43.
- Kurome, M., Kessler, B., Wuensch, A., Nagashima, H., and Wolf, E. (2015). Nuclear transfer and transgenesis in the pig. *Methods Mol Biol* 1222, 37-59.
- Kurome, M., Ueda, H., Tomii, R., Naruse, K., and Nagashima, H. (2006). Production of transgenic-clone pigs by the combination of ICSI-mediated gene transfer with somatic cell nuclear transfer. *Transgenic research* 15, 229-240.
- Kyostila, K., Lappalainen, A.K., and Lohi, H. (2013). Canine chondrodysplasia caused by a truncating mutation in collagen-binding integrin alpha subunit 10. *PLoS One* 8, e75621.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., *et al.* (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., and West, M.D. (1999). Human therapeutic cloning. *Nat Med* 5, 975-977.
- Lavitrano, M., Bacci, M.L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., Fioretti, D., Giancotti, P., Marfe, G., Pucci, L., Renzi, L., *et al.* (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14230-14235.

- Lee, A.S., Xu, D., Plews, J.R., Nguyen, P.K., Nag, D., Lyons, J.K., Han, L., Hu, S., Lan, F., Liu, J., *et al.* (2011). Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* *286*, 32697-32704.
- Lee, K., Kwon, D.N., Ezashi, T., Choi, Y.J., Park, C., Ericsson, A.C., Brown, A.N., Samuel, M.S., Park, K.W., Walters, E.M., *et al.* (2014). Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 7260-7265.
- Li, M., Zhang, D., Hou, Y., Jiao, L., Zheng, X., and Wang, W.H. (2003). Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev* *65*, 429-434.
- Li, Y., Cang, M., Lee, A.S., Zhang, K., and Liu, D. (2011). Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. *PLoS One* *6*, e15947.
- Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* *345*, 1184-1188.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* *21*, 216-225.
- Madrigal, M., Rao, K.S., and Riordan, N.H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* *12*, 260.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., and Church, G.M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* *31*, 833-838.
- Martello, G., and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* *30*, 647-675.
- Matsunari, H., Nagashima, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Nagaya, M., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Sumazaki, R., Herzenberg, L.A., *et al.* (2013). Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 4557-4562.
- Medugorac, I., Seichter, D., Graf, A., Russ, I., Blum, H., Gopel, K.H., Rothhammer, S., Forster, M., and Krebs, S. (2012). Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity. *PLoS One* *7*, e39477.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., *et al.* (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* *287*, 1489-1493.
- Meurs, K.M., Sanchez, X., David, R.M., Bowles, N.E., Towbin, J.A., Reiser, P.J., Kittleson, J.A., Munro, M.J., Dryburgh, K., Macdonald, K.A., *et al.* (2005). A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* *14*, 3587-3593.
- Meuwissen, T.H., Hayes, B.J., and Goddard, M.E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* *157*, 1819-1829.
- Meyerholz, D.K., Stoltz, D.A., Namati, E., Ramachandran, S., Pezzulo, A.A., Smith, A.R., Rector, M.V., Suter, M.J., Kao, S., McLennan, G., *et al.* (2010). Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function produces abnormalities in tracheal development in neonatal pigs and young children. *Am J Respir Crit Care Med* *182*, 1251-1261.
- Meyers, S.N., McDanel, T.G., Swist, S.L., Marron, B.M., Steffen, D.J., O'Toole, D., O'Connell, J.R., Beever, J.E., Sonstegard, T.S., and Smith, T.P. (2010). A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genomics* *11*, 337.

Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., *et al.* (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* *29*, 143-148.

Mohiuddin, M.M., Corcoran, P.C., Singh, A.K., Azimzadeh, A., Hoyt, R.F., Jr., Thomas, M.L., Eckhaus, M.A., Seavey, C., Ayares, D., Pierson, R.N., 3rd, *et al.* (2012). B-cell depletion extends the survival of GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months. *Am J Transplant* *12*, 763-771.

Mohiuddin, M.M., Singh, A.K., Corcoran, P.C., Hoyt, R.F., Thomas, M.L., 3rd, Lewis, B.G., Eckhaus, M., Reimann, K.A., Klymiuk, N., Wolf, E., *et al.* (2014). One-year heterotopic cardiac xenograft survival in a pig to baboon model. *Am J Transplant* *14*, 488-489.

Momke, S., Kerkmann, A., Wohlke, A., Ostmeier, M., Hewicker-Trautwein, M., Ganter, M., Kijas, J., International Sheep, C., and Distl, O. (2011). A frameshift mutation within LAMC2 is responsible for Herlitz type junctional epidermolysis bullosa (HJEB) in black headed mutton sheep. *PLoS One* *6*, e18943.

Murgiano, L., Tammen, I., Harlizius, B., and Drogemuller, C. (2012). A de novo germline mutation in MYH7 causes a progressive dominant myopathy in pigs. *BMC Genet* *13*, 99.

Nakamura, A., and Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2011*, 184393.

Nilsson, B., Ekdahl, K.N., and Korsgren, O. (2011). Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant* *16*, 620-626.

Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., and Ward, D.L. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res* *69*, 928-937.

Nonneman, D.J., Brown-Brandl, T., Jones, S.A., Wiedmann, R.T., and Rohrer, G.A. (2012). A defect in dystrophin causes a novel porcine stress syndrome. *BMC Genomics* *13*, 233.

Notarianni, E., Laurie, S., Moor, R.M., and Evans, M.J. (1990). Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J Reprod Fertil Suppl* *41*, 51-56.

Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* *24*, 263-286.

Ogawa, T., Dobrinski, I., and Brinster, R.L. (1999). Recipient preparation is critical for spermatogonial transplantation in the rat. *Tissue Cell* *31*, 461-472.

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., and Perry, A.C. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* *289*, 1188-1190.

Ostedgaard, L.S., Meyerholz, D.K., Chen, J.H., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Rokhlina, T., Ernst, S.E., Hanfland, R.A., Reznikov, L.R., Ludwig, P.S., *et al.* (2011). The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci Transl Med* *3*, 74ra24.

Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol* *31*, 839-843.

Pausch, H., Kolle, S., Wurmser, C., Schwarzenbacher, H., Emmerling, R., Jansen, S., Trottmann, M., Fuerst, C., Gotz, K.U., and Fries, R. (2014). A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle. *PLoS Genet* *10*, e1004044.

Peters, M., Reber, I., Jagannathan, V., Raddatz, B., Wohlsein, P., and Drogemuller, C. (2015). DNA-based diagnosis of rare diseases in veterinary medicine: a 4.4 kb deletion of ITGB4 is associated with epidermolysis bullosa in Charolais cattle. *BMC Vet Res* *11*, 48.

Petters, R.M., Alexander, C.A., Wells, K.D., Collins, E.B., Sommer, J.R., Blanton, M.R., Rojas, G., Hao, Y., Flowers, W.L., Banin, E., *et al.* (1997). Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa. *Nat Biotechnol* *15*, 965-970.

Pezzulo, A.A., Tang, X.X., Hoegger, M.J., Alaiwa, M.H., Ramachandran, S., Moninger, T.O., Karp, P.H., Wohlford-Lenane, C.L., Haagsman, H.P., van Eijk, M., *et al.* (2012). Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* *487*, 109-113.

Phelps, C.J., Koike, C., Vaught, T.D., Boone, J., Wells, K.D., Chen, S.H., Ball, S., Specht, S.M., Polejaeva, I.A., Monahan, J.A., *et al.* (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* *299*, 411-414.

Phillips, B.T., Gassei, K., and Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *365*, 1663-1678.

Piedrahita, J.A., Anderson, G.B., and Bondurant, R.H. (1990). Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology* *34*, 865-877.

Plews, J.R., Gu, M., Longaker, M.T., and Wu, J.C. (2012). Large animal induced pluripotent stem cells as pre-clinical models for studying human disease. *J Cell Mol Med* *16*, 1196-1202.

Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., *et al.* (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* *407*, 86-90.

Popken, J., Brero, A., Koehler, D., Schmid, V.J., Strauss, A., Wuensch, A., Guengoer, T., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., *et al.* (2014a). Reprogramming of fibroblast nuclei in cloned bovine embryos involves major structural remodeling with both striking similarities and differences to nuclear phenotypes of in vitro fertilized embryos. *Nucleus* *5*, 555-589.

Popken, J., Koehler, D., Brero, A., Wuensch, A., Guengoer, T., Thormeyer, T., Wolf, E., Cremer, T., and Zakhartchenko, V. (2014b). Positional changes of a pluripotency marker gene during structural reorganization of fibroblast nuclei in cloned early bovine embryos. *Nucleus* *5*, 542-554.

Prickett, M., and Jain, M. (2013). Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl Res* *161*, 255-264.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* *276*, 71-74.

Qiao, R., He, Y., Pan, B., Xiao, S., Zhang, X., Li, J., Zhang, Z., Hong, Y., Xing, Y., and Ren, J. (2015). Understanding the molecular mechanisms of human microtia via a pig model of HOXA1 syndrome. *Dis Model Mech* *8*, 611-622.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., *et al.* (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* *154*, 1380-1389.

Reichart, B., Niemann, H., Chavakis, T., Denner, J., Jaeckel, E., Ludwig, B., Marckmann, G., Schnieke, A., Schwinzer, R., Seissler, J., *et al.* (2015). Xenotransplantation of porcine islet cells as a potential option for the treatment of type 1 diabetes in the future. *Horm Metab Res* *47*, 31-35.

Reicher, S., Seroussi, E., and Gootwine, E. (2010). A mutation in gene CNGA3 is associated with day blindness in sheep. *Genomics* *95*, 101-104.

Ren, J., Pak, Y., He, L., Qian, L., Gu, Y., Li, H., Rao, L., Liao, J., Cui, C., Xu, X., *et al.* (2011). Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. *Cell Res* *21*, 849-853.

Renner, S., Braun-Reichhart, C., Blutke, A., Herbach, N., Emrich, D., Streckel, E., Wunsch, A., Kessler, B., Kurome, M., Bahr, A., *et al.* (2013). Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes* *62*, 1505-1511.

Renner, S., Fehlings, C., Herbach, N., Hofmann, A., von Waldthausen, D.C., Kessler, B., Ulrichs, K., Chodnevskaja, I., Moskalenko, V., Amselgruber, W., *et al.* (2010). Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* *59*, 1228-1238.

Renner, S., Romisch-Margl, W., Prehn, C., Krebs, S., Adamski, J., Goke, B., Blum, H., Suhre, K., Roscher, A.A., and Wolf, E. (2012). Changing metabolic signatures of amino acids and lipids during

the prediabetic period in a pig model with impaired incretin function and reduced beta-cell mass. *Diabetes* 61, 2166-2175.

Richter, A., Kurome, M., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Klymiuk, N., Nagashima, H., Wolf, E., and Wuensch, A. (2012). Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol* 12, 84.

Rogan, M.P., Reznikov, L.R., Pezzulo, A.A., Gansemer, N.D., Samuel, M., Prather, R.S., Zabner, J., Fredericks, D.C., McCray, P.B., Jr., Welsh, M.J., *et al.* (2010). Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20571-20575.

Rogers, C.S., Hao, Y., Rokhlina, T., Samuel, M., Stoltz, D.A., Li, Y., Petroff, E., Vermeer, D.W., Kabel, A.C., Yan, Z., *et al.* (2008a). Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *The Journal of clinical investigation* 118, 1571-1577.

Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., Rogan, M.P., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Itani, O.A., *et al.* (2008b). Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321, 1837-1841.

Rothhammer, S., Capitan, A., Mullaart, E., Seichter, D., Russ, I., and Medugorac, I. (2014). The 80-kb DNA duplication on BTA1 is the only remaining candidate mutation for the polled phenotype of Friesian origin. *Genet Sel Evol* 46, 44.

Rudolph, J.A., Spier, S.J., Byrns, G., Rojas, C.V., Bernoco, D., and Hoffman, E.P. (1992). Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nat Genet* 2, 144-147.

Sacchetto, R., Testoni, S., Gentile, A., Damiani, E., Rossi, M., Liguori, R., Drogemuller, C., and Mascarello, F. (2009). A defective SERCA1 protein is responsible for congenital pseudomyotonia in Chianina cattle. *Am J Pathol* 174, 565-573.

Sautermeister, J., Mathieu, R., and Bogner, V. (2015). Xenotransplantation-theological-ethical considerations in an interdisciplinary symposium. *Xenotransplantation* 22, 174-182.

Schneider, M.R., Wolf, E., Braun, J., Kolb, H.J., and Adler, H. (2008). Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. *Hum Mol Genet* 17, R42-47.

Schook, L.B., Collares, T.V., Hu, W., Liang, Y., Rodrigues, F.M., Rund, L.A., Schachtschneider, K.M., Seixas, F.K., Singh, K., Wells, K.D., *et al.* (2015). A genetic porcine model of cancer. *PLoS One* 10, e0128864.

Schwank, G., Koo, B.K., Sasselli, V., Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C.K., *et al.* (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell stem cell* 13, 653-658.

Seruggia, D., and Montoliu, L. (2014). The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic research* 23, 707-716.

Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., and Nakamura, T. (2010). Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* 77, 2.

Shin, E.K., Perryman, L.E., and Meek, K. (1997). A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J Immunol* 158, 3565-3569.

Sironen, A., Thomsen, B., Andersson, M., Ahola, V., and Vilkki, J. (2006). An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5006-5011.

Sironen, A., Uimari, P., Venhoranta, H., Andersson, M., and Vilkki, J. (2011). An exonic insertion within Tex14 gene causes spermatogenic arrest in pigs. *BMC Genomics* 12, 591.

Song, H., Li, H., Huang, M., Xu, D., Gu, C., Wang, Z., Dong, F., and Wang, F. (2013). Induced pluripotent stem cells from goat fibroblasts. *Mol Reprod Dev* 80, 1009-1017.

Sosnay, P.R., Siklosi, K.R., Van Goor, F., Kaniecki, K., Yu, H., Sharma, N., Ramalho, A.S., Amaral, M.D., Dorfman, R., Zielenski, J., *et al.* (2013). Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nature genetics* *45*, 1160-1167.

Spirito, F., Charlesworth, A., Linder, K., Ortonne, J.P., Baird, J., and Meneguzzi, G. (2002). Animal models for skin blistering conditions: absence of laminin 5 causes hereditary junctional mechanobullous disease in the Belgian horse. *J Invest Dermatol* *119*, 684-691.

Spurney, C.F. (2011). Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. *Muscle Nerve* *44*, 8-19.

Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S.E., Fetzer, I., Bennett, E.M., Biggs, R., Carpenter, S.R., de Vries, W., de Wit, C.A., *et al.* (2015). Sustainability. Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet. *Science* *347*, 1259855.

Stock, K.F., and Reents, R. (2013). Genomic selection: Status in different species and challenges for breeding. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* *48 Suppl 1*, 2-10.

Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Pezzulo, A.A., Ramachandran, S., Rogan, M.P., Davis, G.J., Hanfland, R.A., Wohlford-Lenane, C., Dohrn, C.L., Bartlett, J.A., *et al.* (2010). Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med* *2*, 29ra31.

Stoltz, D.A., Rokhlina, T., Ernst, S.E., Pezzulo, A.A., Ostedgaard, L.S., Karp, P.H., Samuel, M.S., Reznikov, L.R., Rector, M.V., Gansemer, N.D., *et al.* (2013). Intestinal CFTR expression alleviates meconium ileus in cystic fibrosis pigs. *J Clin Invest* *123*, 2685-2693.

Streckel, E., Braun-Reichhart, C., Herbach, N., Dahlhoff, M., Kessler, B., Blutke, A., Bahr, A., Ubel, N., Eddicks, M., Ritzmann, M., *et al.* (2015). Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in juvenile transgenic pigs modeling a pre-diabetic condition. *J Transl Med* *13*, 73.

Suarez-Vega, A., Gutierrez-Gil, B., Benavides, J., Perez, V., Tosser-Klopp, G., Klopp, C., Keennel, S.J., and Arranz, J.J. (2015). Combining GWAS and RNA-Seq Approaches for Detection of the Causal Mutation for Hereditary Junctional Epidermolysis Bullosa in Sheep. *PLoS One* *10*, e0126416.

Suarez-Vega, A., Gutierrez-Gil, B., Cuchillo-Ibanez, I., Saez-Valero, J., Perez, V., Garcia-Gamez, E., Benavides, J., and Arranz, J.J. (2013). Identification of a 31-bp deletion in the RELN gene causing lissencephaly with cerebellar hypoplasia in sheep. *PLoS One* *8*, e81072.

Suzuki, S., Iwamoto, M., Saito, Y., Fuchimoto, D., Sembon, S., Suzuki, M., Mikawa, S., Hashimoto, M., Aoki, Y., Najima, Y., *et al.* (2012). Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. *Cell stem cell* *10*, 753-758.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.

Tan, W., Carlson, D.F., Lancto, C.A., Garbe, J.R., Webster, D.A., Hackett, P.B., and Fahrenkrug, S.C. (2013). Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 16526-16531.

Tan, W.S., Carlson, D.F., Walton, M.W., Fahrenkrug, S.C., and Hackett, P.B. (2012). Precision editing of large animal genomes. *Advances in genetics* *80*, 37-97.

Torres, P.A., Zeng, B.J., Porter, B.F., Alroy, J., Horak, F., Horak, J., and Kolodny, E.H. (2010). Tay-Sachs disease in Jacob sheep. *Mol Genet Metab* *101*, 357-363.

Tsai, S.Q., Zheng, Z., Nguyen, N.T., Liebers, M., Topkar, V.V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A.J., Le, L.P., *et al.* (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* *33*, 187-197.

Tuggle, K.L., Birket, S.E., Cui, X., Hong, J., Warren, J., Reid, L., Chambers, A., Ji, D., Gamber, K., Chu, K.K., *et al.* (2014). Characterization of defects in ion transport and tissue development in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-knockout rats. *PLoS One* *9*, e91253.

- Usui, J., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Knisely, A.S., Nishinakamura, R., and Nakauchi, H. (2012). Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* *180*, 2417-2426.
- Vaags, A.K., Rosic-Kablar, S., Gartley, C.J., Zheng, Y.Z., Chesney, A., Villagomez, D.A., Kruth, S.A., and Hough, M.R. (2009). Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. *Stem Cells* *27*, 329-340.
- van der Windt, D.J., Bottino, R., Casu, A., Campanile, N., and Cooper, D.K. (2007). Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation* *14*, 288-297.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews Genetics* *2*, 196-206.
- VanRaden, P.M., Olson, K.M., Null, D.J., and Hutchison, J.L. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci* *94*, 6153-6161.
- Vasquez, K.M., Marburger, K., Intody, Z., and Wilson, J.H. (2001). Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 8403-8410.
- Wade, C.M., Giolotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., *et al.* (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* *326*, 865-867.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* *153*, 910-918.
- Ward, T.L., Valberg, S.J., Adelson, D.L., Abbey, C.A., Binns, M.M., and Mickelson, J.R. (2004). Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV. *Mamm Genome* *15*, 570-577.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z.P., Qu, F.F., Shao, L., and Shi, Y.F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* *34*, 747-754.
- West, F.D., Terlouw, S.L., Kwon, D.J., Mumaw, J.L., Dhara, S.K., Hasneen, K., Dobrinsky, J.R., and Stice, S.L. (2010). Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev* *19*, 1211-1220.
- Whyte, J.J., Zhao, J., Wells, K.D., Samuel, M.S., Whitworth, K.M., Walters, E.M., Laughlin, M.H., and Prather, R.S. (2011). Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev* *78*, 2.
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R.M., Aarbiou, J., Colledge, W.H., Sheppard, D.N., Touqui, L., Bot, A., Jorna, H., de Jonge, H.R., and Scholte, B.J. (2011). Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* *10 Suppl 2*, S152-171.
- 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.
- Wolf, E., Braun-Reichhart, C., Streckel, E., and Renner, S. (2014a). Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic research* *23*, 27-38.
- Wolf, Z.T., Leslie, E.J., Arzi, B., Jayashankar, K., Karmi, N., Jia, Z., Rowland, D.J., Young, A., Safra, N., Sliskovic, S., *et al.* (2014b). A LINE-1 insertion in DLX6 is responsible for cleft palate and mandibular abnormalities in a canine model of Pierre Robin sequence. *PLoS Genet* *10*, e1004257.
- Wu, Z., Chen, J., Ren, J., Bao, L., Liao, J., Cui, C., Rao, L., Li, H., Gu, Y., Dai, H., *et al.* (2009). Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol* *1*, 46-54.
- Wuensch, A., Baehr, A., Bongoni, A.K., Kemter, E., Blutke, A., Baars, W., Haertle, S., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kessler, B., *et al.* (2014). Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate

endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation* 97, 138-147.

Yang, H.K., and Yoon, K.H. (2015). Current status of encapsulated islet transplantation. *J Diabetes Complications* 29, 737-743.

Zeng, R., Farias, F.H., Johnson, G.S., McKay, S.D., Schnabel, R.D., Decker, J.E., Taylor, J.F., Mann, C.S., Katz, M.L., Johnson, G.C., *et al.* (2011). A truncated retrotransposon disrupts the GRM1 coding sequence in Coton de Tulear dogs with Bandera's neonatal ataxia. *J Vet Intern Med* 25, 267-272.

Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., and Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction* 147, R65-74.

Danksagung

Für Anregungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Herrn PD Dr. Ivica Medugorac, Frau Dr. Ingrid Renner-Müller, Frau Dr. Elisabeth Kemter und Herrn Kilian Simmet.