



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 26 335 T2** 2009.09.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 446 004 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 26 335.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/03992**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 796 854.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/043415**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.11.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **30.05.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.08.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **30.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.09.2009**

(51) Int Cl.⁸: **A01K 67/027** (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0115111 22.11.2001 FR

(73) Patentinhaber:

Vivalis, Roussay, FR; Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.), Paris, FR; Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), Paris, FR; Ens - Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, FR

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(72) Erfinder:

PAIN, Bertrand, F-69003 Lyon, FR; SAMARUT, Jacques, F-69100 Villeurbanne, FR; VALARCHE, Isabelle, F-44100 Nantes, FR; CHAMPION-ARNAUD, Patrick, F-44300 Nantes, FR; SOBCZYK, Andre, F-44100 Nantes, FR; KUNITA, Ryota, Atsugi-shi, 243-0035 Kanagawa, JP

(54) Bezeichnung: **AVIÄRES EXPRESSIONSSYSTEM FÜR FREMDPROTEINE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET:

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung einer Vogel-Zelle für die Herstellung eines exogenen Proteins von Interesse in einem Tier, welches zu der Spezies der Vögel gehört, wobei die Zelle durch einen Expressionsvektor transformiert ist, welcher das das Protein kodierende Gen umfasst, wobei die Zelle in die Keimhöhle eines Embryos oder in den Blutkreislauf des Embryos eingeführt wird.

STAND DER TECHNIK:

[0002] Traditionell sind die ersten pharmazeutischen Wirkstoffe durch Extraktion aus Geweben unterschiedlicher Herkunft, wie Pflanzen, Tiere, wie sogar Menschen, erhalten worden. Drei Hauptfaktoren haben zu der Entwicklung von Ersatzmöglichkeiten zu dieser Extraktionstechnik beigetragen. Die Verknappung der Gewebe aufgrund der Zunahme der Nachfrage, die den tierischen und menschlichen Produkten innewohnenden Risiken haben mit dem Auftreten oder der Identifizierung von neuen Pathologien, insbesondere viralen und nicht-konventionellen, zugenommen. Schließlich und vor allen Dingen haben die Forschung und die Ausnutzung der Entdeckungen der verschiedenen Zweige der Biologie (Biochemie, Molekularbiologie...) es erlaubt, neue Moleküle zu entdecken und folglich den ständig wachsenden Bedarf an neuen Molekülen zu befriedigen.

[0003] Um der Nachfrage an therapeutischen Produkten zu entsprechen, sind die Expressionssysteme von Molekülen, wie Proteinen mit therapeutischer Verwendung, mit einer aktiven biologischen Komponente (Bakterium, Hefe, höhere eukaryotische Zelle...) und einem genetischen Element, das die für die Produktion erforderliche Unterstützung beiträgt, kombiniert worden. Die verschiedenen eingesetzten genetischen Träger sind zumeist entweder einfache Expressionsvektoren, die für die Expression optimiert worden sind, deren Integration aber weiterhin zufallsgesteuert bleibt, oder virale oder retrovirale Systeme. Diese Letzteren erlauben nicht mehr, weder den Ort noch das Niveau der Expression zu steuern.

[0004] Diese Herstellungsverfahren erleben gegenwärtig eine neue sowohl numerische als auch qualitative Revolution. So hat im Zeitraum von einigen Jahren dank der konstanten, schnellen Fortschritte der Genomik und der Molekularbiologie die Anzahl von Molekülen, die ein oder mehrere therapeutische und medizinische Potentiale aufweisen, signifikant zugenommen. Beispielsweise repräsentieren die Antikörper mit therapeutischer Zielrichtung bereits etwa 50% von diesen Molekülen. Außerdem hat sich die Komplexität dieser rekombinanten Moleküle erhöht. Von einfachen Peptiden oder kleinen Zytokinen, die in Bakterien leicht hergestellt werden, gelangt man fortschreitend zu komplexen Molekülen mit einer biologischen Aktivität, die strikt von deren Sekundärstruktur, von deren Faltung und von komplexen posttranslationalen Modifizierungen abhängig ist. Folglich reicht das einfache Mittel einer Herstellung in Bakterien nicht mehr aus.

[0005] Es sind dann anspruchsvollere Techniken aufgetaucht, unter denen man die in vitro-Kultur von eukaryotischen Zellen, Hefen und Insektenzellen aufführen kann. Vor noch kürzerer Zeit sind die Fortschritte, die im Bereich der Herstellung von transgenen Pflanzen und Tieren erzielt worden sind, mit Erfolg eingesetzt worden, um diese komplexen Moleküle entweder in Blätter oder Samenkörner von Pflanzenspezies (Tabak, Mais...) oder in den physiologischen Flüssigkeiten von Tieren, wie der Milch von Tieren (Ziege, Kuh, Sau, Kaninchen...), herzustellen.

[0006] Zudem ist die Korrelation zwischen der Wirksamkeit des zielgerichteten Ansteuerns („Targeting“) eines gegebenen Genorts und dessen Transkriptionsniveau, insbesondere auf der Ebene der durch den Vektor zielgerichtet angesteuerten Zellen, darunter Stammzellen, nicht absolut. So weisen diese Methoden noch stets Probleme, wie die Herstellungskosten, die Menge der erhaltenen Produkte und technische Schwierigkeiten, wenn es sich darum handelt, komplexe Moleküle herzustellen, auf.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG:

[0007] Um diese Probleme zu lösen, wird im Rahmen der Erfindung vorgeschlagen, therapeutische Moleküle herzustellen, indem die Expression zielgerichtet in speziellen Geweben, insbesondere im Ei und im Speziellen im Eiweiß, erfolgt mit Hilfe von Tieren, die modifiziert sind mit Stammzellen, die ihrerseits durch Rekombinationsvektoren modifiziert sind.

[0008] Die verschiedenen Schritte, die für das Ausführen der Erfindung erforderlich sind, implizieren zuallererst die Konstruktion von Vektoren, die das zielgerichtete Ansteuern („Targeting“) des gewählten Genorts in

einer Vogel-Zelle und insbesondere einer Stammzelle erlaubt, die Gewinnung von rekombinanten Zellen, die diesen Vektor in dem gewählten Genort integriert aufweisen, und die Erzeugung von mit diesen Zellen modifizierten Tieren.

[0009] Einer der Vorteile der Gesamtheit dieses Systems ist der gesteuerte Charakter der Expression des Proteins von Interesse. Tatsächlich erlaubt die Wirkung der substitutiven Ersetzung eines endogenen Vogel-Genorts durch ein exogenes Gen oder Genfragment von Interesse, eine Produktion des eingeführten exogenen Proteins an Ort und Stelle des endogenen Genorts zu erhalten. Indem beispielsweise in den Genort des Ovalbumins das zu produzierende Gen durch die Gesamtheit des beschriebenen Mechanismus eingeführt wird, wird das Produkt von diesem Gen gemäß dem Expressionsprofil des Ovalbumins, das perfekt bekannt ist, produziert werden. So liefert die Erfindung eine Lösung für die Probleme, die durch die zufällige Integration einer heterologen Sequenz, deren Expression von ihrer Chromatin-Umgebung abhängen könnte, aufgeworfen werden.

[0010] Außerdem und im Gegensatz zu den oben erwähnten Methoden erlaubt das Vogel-Produktionssystem der Erfindung, höhere Mengen von aktiven Substanzen bei geringeren Kosten zu erhalten angesichts dessen, dass sie leicht isoliert und gereinigt werden können.

[0011] Ein Rekombinationsverfahren in einer Linie von lymphoiden Zellen (der Linie DT40) ist dank eines Rekombinationsverfahrens aufgrund einer besonderen Mutation (die Mutation wirkt sich auf das Expressionsniveau des Proteins Rad54 aus) ermöglicht worden (Kim et al., 1990; Baba et al., 1988; Buerstedde et al., 1990; Buerstedde und Takeda, 1991; Bezzubova et al., 1993; Bezzubova et al., 1997). In dieser Veröffentlichung geben die Autoren zu, dass sie nicht in der Lage gewesen waren, eine homologe Rekombination mit ES-Zellen auszuführen.

[0012] Das Dokument WO 9919472 beschreibt die Herstellung von transgenen Hühnern, welche ein heterologes Gen von Interesse in den Zellen des Eileiters (Legedarms) exprimieren.

[0013] Das Dokument von Prella, K., et al., (1999) in „Cells, Tissues and Organs“ (ISSN: 1422–6405), Band 165, Seiten 220–236, beschreibt bezüglich embryonaler Vogel-Stammzellen, dass diese die einzigen embryonalen Stammzellen neben den embryonalen Stammzellen von der Maus sind, bei denen die Transmission in der Keimbahn gezeigt worden ist.

[0014] Im Gegensatz zu dieser Lehre hat der Anmelder gezeigt, dass ein Verfahren zur zielgerichteten homologen Rekombination eine Expression eines exogenen Moleküls von Interesse in Vogel-Systemen erlaubt und dass genau dieses Verfahren auf der Versuchsebene in verschiedenen Arten von Vogel-Zellen, darunter Linien, primäre Zellen und Stammzellen und embryonale Stammzellen, bewältigbar ist.

[0015] Der Gegenstand der Erfindung ist folglich:

ein Verfahren zur Gewinnung einer embryonalen Stammzelle (ES) von Vögeln, welche durch homologe Rekombination modifiziert ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- A) die Einführung eines homologe Rekombination ermöglichenden Vektors in die ES-Zelle von Vögeln durch ein Transfektionsverfahren;
- B) die Selektion der Zellen durch die Zugabe eines Selektionsmittels in das Kulturmedium; und
- C) das Screenen der resistenten Klone und Amplifizierung, dadurch gekennzeichnet, dass:
 - der eine homologe Rekombination ermöglichende Vektor, der in Schritt A) eingeführt wird, in einer Plasmid-Grundstruktur eine Aneinanderreihung von mindestens einem Element umfasst, welches nacheinander ausgewählt wird unter:
 - a) einem genomischen DNA-Fragment, enthaltend den 5' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitt des Zielgens, fusioniert mit
 - b) einer Sekretionssignal-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
 - c) einer kurzen Intron-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
 - d) einer Nukleotidsequenz, welche ein exogenes Protein von Interesse kodiert, fusioniert mit
 - e) einer poly A-Transkriptionsterminationssequenz, fusioniert mit
 - f) einer positiven Selektion ermöglichenden Kasette, umfassend einen Promotor, ein Resistenz gegen ein Selektionsmittel verleihendes Gen und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz, wobei die Kasette fusioniert sein kann mit
 - g) einem genomischen DNA-Fragment, welches den 3' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitt des Zielgens enthält,

h) einer eine negative Selektion ermöglichenden Kasette, umfassend einen Promotor, ein Gen, welches die Umwandlung eines in dem Kulturmedium vorhandenen Substrats zu einer für die Zelle, die das Gen exprimiert, toxischen Substanz sicherstellt, und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz und das dadurch gekennzeichnet ist, dass:

der Genort, der zielgerichtet durch den Rekombinationsvektor angesteuert wird, der Genort von Ovalbumin oder der Genort von Lysozym ist.

ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse, umfassend die Extraktion des in den Überstand der Zellen, die aus dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 stammen, exprimierten exogenen Proteins.

eine Verwendung einer Vogel-Zelle, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erhalten worden ist, für die Herstellung des exogenen Proteins von Interesse.

ein Verfahren zur Gewinnung eines Tiers, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches in der Lage ist, ein exogenes Protein von Interesse zu exprimieren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

a) Gewinnung von Vogel-Zellen, die durch das gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 definierte Verfahren modifiziert worden sind,

b) Einführung der in Schritt a) erhaltenen Zelle in die Keimhöhle eines Embryos oder in den Blutkreislauf des Embryos und

c) Inkubation (Bebrüten) des in Schritt b) erhaltenen Embryos.

ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse, umfassend die Extraktion des in den Geweben eines Tiers, das ausgehend von dem Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20 erhalten worden ist, exprimierten exogenen Proteins.

ein Verfahren nach Anspruch 21, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Protein aus dem Blut, dem Eigelb oder dem Eiweiß extrahiert wird.

ein Ei, welches ausgehend von einem durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20 erhaltenen Tier erhalten werden kann, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Teil des Ovalbumins oder des Lysozyms teilweise oder vollständig durch das exogene Protein von Interesse ersetzt ist.

[0016] Die Gesamtheit dieser Erfindung erlaubt folglich, ein neues System zur Herstellung von Molekülen von Interesse gemäß einer perfekt vorhersagbaren, denn sowohl auf räumlicher wie zeitlicher Ebene gesteuerten Weise vorzuschlagen, wodurch die Antworten auf die im Stand der Technik existierenden Probleme gegeben werden.

BESCHREIBUNG

[0017] So bezieht sich unter einem ersten Aspekt die Erfindung auf die Verwendung einer Vogel-Zelle für die Herstellung eines exogenen Proteins von Interesse in einem Tier, das zu der Spezies der Vögel gehört, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle durch einen Expressionsvektor, welcher das das Protein kodierende Gen umfasst, transformiert ist, wobei die Zelle entweder in die Keimhöhle eines Embryos oder in den Blutkreislauf des Embryos eingeführt wird.

[0018] Unter Vogel-Zelle versteht man eine embryonale Stammzelle (ES), einen zellulären Klon der vorerwähnten Zellen, eine ausgehend von den vorerwähnten Zellen etablierte Linie oder einen „embryoid body“, der ausgehend von den vorerwähnten Zellen erhalten worden ist.

[0019] Die verschiedenen Zellen, die zuvor ins Auge gefasst worden sind, werden nachfolgend eingehender definiert:

– Unter einer embryonalen Stammzelle (ES) versteht man eine nicht differenzierte Zelle, die sich von einem Embryo ableitet und die die Potentiale aufweist, eine sehr große Vielzahl von spezialisierten Zellen zu ergeben.

– Unter einem zellulären Klon versteht man eine jegliche Gesamtheit von Zellen, die genetisch identisch sind mit der Zelle, von welcher sie sich durch Teilung ableiten.

– Unter „embryoid bodies“ versteht man ein jegliches Aggregat von Zellen, die sich von in Kultur gehaltenen embryonalen Stammzellen ableiten. Die „embryoid bodies“ nehmen an der normalen Entwicklung eines Embryos nicht teil und werden nur in vitro beobachtet.

– Unter Linie versteht man eine jegliche Zellkultur, die in der Lage ist, unbegrenzt zu proliferieren, wobei sie die gleichen phänotypischen Merkmale beibehält.

I. Verschiedene Vektoren können für die Transformation der Zellen eingesetzt werden:

[0020] Der für diesen Zweck eingesetzte Vektor, ein Rekombinationsvektor, erlaubt eine gewebespezifische Expression insbesondere im Eileiter (Legedarm), der Leber, dem Blut, dem Mark und den lymphatischen Organen.

1.1 – Rekombinationsvektoren.

[0021] Der homologe Rekombinationsvektor (eine homologe Rekombination ermöglichende Vektor) erlaubt, einen endogenen Genort zielgerichtet anzusteuern, um ein Gen von Interesse an Ort und Stelle dieses endogenen Genorts zu exprimieren. Auf der Ebene des Chromatins ist die homologe Rekombination ein Verfahren, das darin besteht, partiell oder vollständig einen Teil eines Gens durch ein Konstrukt zu ersetzen, das teilweise oder in der Gesamtheit bestimmte Sequenzen, die mit eben diesem Gen identisch sind, in sich aufnimmt. Die identischen Abschnitte erlauben, den Austausch der DNA, die sich in dem endogenen Genort befindet, zu realisieren und die modifizierten Teile in die betreffende und folglich bewahrte Umgebung des zielgerichtet angesteuerten Genorts einzuführen. Daraus resultiert eine Insertion von Modifizierungen, die sich in bestimmten Abschnitten des Konstrukts befinden, in den zielgerichtet angesteuerten Genort. Die verschiedenen Abschnitte des Konstrukts erlauben, die Expression der eingeführten Kassetten zu steuern. Diese Kassetten sind entweder abhängig von ihrem eigenen Promotor oder abhängig von der transkriptionellen Aktivität des zielgerichtet angesteuerten Genorts, wenn die Kassette unter die Abhängigkeit von dem internen Promotor platziert ist. Die Rekombinationsreaktion kann in drei große Schritte unterteilt werden:

- Der erste Schritt ist die unter Paarbildung erfolgende Anordnung der homologen Regionen, was zu einer vorübergehenden „dreifachsträngigen“ Struktur der DNA führt.
- Der zweite Schritt ist die Ausführung eines unabhängigen doppelten Crossing-Over in den Regionen von Homologie, was zu der Bildung eines hybriden Moleküls zwischen dem zielgerichtet angesteuerten Chromosom und dem eingeführten Vektor führt.
- Der Dritte ist die Integration dieses Vektors als stabiles genetisches Element des zielgerichtet angesteuerten Chromosoms, wobei die Modifizierung dann wie die Gesamtheit des genetischen Materials mit den Zellteilungen vermehrt wird.

[0022] Ein jegliches Element, das in dem System vorhanden ist oder auf stabile oder vorübergehende Weise hinzugefügt worden ist, das diese verschiedenen Mechanismen steuert, modifiziert oder beeinflusst, wird einen essentiellen Beitrag in dem Rekombinationsprozess und folglich hinsichtlich der Integrationseffizienz des Vektors leisten.

[0023] Im Rahmen der Erfindung ist der Rekombinationsvektor, der erlaubt, die Moleküle in dem Vogel-System, insbesondere im Huhn, herzustellen, nicht ein einfacher Zerstörungsvektor, sondern ein substitutiver Ersetzungsvektor. Diese komplexen Vektoren sind das Ergebnis der geordneten und aufeinanderfolgenden Kombination von wenigstens einem der folgenden Elemente in einem klassischen Klonierungsplasmid (pBSK, pUC, ...):

- Ein genomisches DNA-Fragment von variabler Größe, entnommen strangaufwärts von dem ATG (Translationsstartstelle) des zielgerichtet angesteuerten Gens. Dieses Element bildet den 5'-Arm oder -Sequenzabschnitt.
- Eine cDNA oder ein Teil des oder der Gene von Interesse, platziert direkt unter die Abhängigkeit des ATG des zielgerichtet angesteuerten endogenen Gens. Diese Kombination der Fragmente wird in den meisten Fällen direkt durch eine Fusion der zweiten Aminosäure des Proteins mit dem ATG des zielgerichtet angesteuerten Genorts realisiert. Um die Exportierung des Proteins von Interesse direkt in das Ei zu erlauben, muss außerdem eine ein Signalpeptid spezifizierende Nukleotidequenz strangaufwärts von der cDNA von Interesse und strangabwärts von den Signalen des zielgerichtet angesteuerten Gens platziert werden. Sie wird entweder durch das Fragment von Interesse oder durch eine ergänzende exogene Nukleotidsequenz beigetragen.

[0024] Unter cDNA versteht man die Gesamtheit oder einen Teil einer ein Protein von Interesse kodierenden Nukleinsäuresequenz. Unter Protein von Interesse versteht man ein Protein, ein Fragment eines Proteins oder ein Peptid, das einen therapeutischen Nutzen für den Mensch oder das Tier aufweist, aber auch eine jegliche Proteinform, die dem Menschen oder dem Tier eine Wohltat spenden kann, was seinen körperlichen Status, seine Gesundheit, sein Verhalten oder seine Vitalität angeht, was insbesondere ein endogenes Protein oder Peptid von Interesse und ein exogenes Protein oder Peptid von Interesse, das nachfolgend definiert wird, umfasst:

Unter endogenem Protein von Interesse versteht man ein jegliches in dem System, insbesondere dem Ei, vor-

handenes Protein, das in variablen, aber in einer normalen physiologischen Situation nachweisbaren Konzentrationen vorhanden ist.

[0025] Unter exogenem Protein von Interesse versteht man ein jegliches Protein von zu dem System exogener Herkunft, das in einem normalen physiologischen Zustand in dem System, insbesondere dem Ei, nicht identifiziert wird. Sein Vorhandensein ist das direkte oder indirekte Ergebnis der genetischen und/oder biochemischen Modifizierung, die durch den Vektor in dem System induziert wird.

- Eine Resistenzkassette (sogenannte positive Selektionskassette (eine positive Selektion ermöglichende Kassette) für ein exogenes Selektionssystem), die im Allgemeinen aus einem Promotor, einer cDNA, die die Resistenz gegen die exogene Selektion beiträgt, und einer polyA-Sequenz, welche das Anhalten der Transkription von diesem unabhängigen transkriptionellen Element erlaubt, gebildet wird. Der Promotor kann von unterschiedlicher Herkunft sein.
- Ein genomisches DNA-Fragment von variabler Größe, entnommen strangabwärts von diesen verschiedenen Elementen und folglich von dem ATG des zielgerichtet angesteuerten Gens. Dieses Fragment weist im Allgemeinen eine Größe auf, die sich von dem genomischen DNA-Fragment, das 5' gelegen ist, unterscheidet. Dieses Element bildet den 3'-Arm oder -Sequenzabschnitt.
- Eine ergänzende, sogenannte negative Selektionskassette (eine negative Selektion ermöglichende Kassette) kann in diesen Vektor eingebaut werden. Sie ist dann im Allgemeinen strangabwärts von dem genomischen 3'-Arm integriert. 3' von dem 3'-Homologie-Arm gelegen, bleibt diese Kassette in dem Genom der zielgerichtet angesteuerten Zelle nicht erhalten, wenn die Integration gemäß dem korrekten Schema stattfindet. Nur die nicht korrekt rekombinierten Ereignisse sind für diese Wirkung empfindlich.
- Wenigstens eine einmalig vorkommende Linearisierungsstelle auf dem Vektor, die durch die Erfahrung empfohlen wird. Dieser Schritt scheint für die wirksame Einführung dieses Vektors in das genetische Erbgut der zielgerichtet angesteuerten Zelle notwendig zu sein.
- Verschiedene Elemente, die insbesondere konditionelle Modifizierungen erlauben, können an verschiedenen Stellen des Konstrukts inseriert werden.

[0026] Die hauptsächlichsten Merkmale eines Rekombinationsvektors, wie sie bis zum heutigen Tage in Säuger-Systemen beschrieben worden sind, beruhen auf der Aufeinanderfolge der verschiedenen Elemente innerhalb des Plasmids und auf der Positionierung der genomischen Arme (Herkunft der DNA, Größe der homologen genomischen Elemente, relative Dissymetrie...). In der Hauptzahl der Fälle ist die in vitro beobachtete Rekombinationsfrequenz abhängig von dem zielgerichtet angesteuerten Genort und folglich der zielgerichtet angesteuerten Chromatin-Umgebung (Ramirez-Solis et al., 1993; Hasty et al., 1995; Hasty et al., 1991). Diese Umgebung ist eng verbunden mit der Physiologie der Zelle. Es erweist sich, dass der auf die transfizierten Zellen ausgeübte Selektionsdruck eine Anzahl von hauptsächlich nicht-homologen Integrationen bezogen auf die Anzahl von homologen Integrationen erlaubt. Das Screeningverfahren, von dem Prinzip und Beispiele im Text erläutert werden, erlaubt, die beiden Arten von Ereignissen zu unterscheiden. Das Kennen, Evaluieren und Beherrschen des Anteils von homologer Integration ist essentiell für eine zufriedenstellende Expressionsstrategie. Die Zuverlässigkeit der Rekombination zwischen den hinzugefügten Fragmenten und jenen des Ursprungsmaterials muss gleichfalls die bestmögliche sein. Dies scheint zumindest für die ES-Zellen von der Maus und die humanen Fibroblasten der Fall zu sein (Zheng et al., 1991; Lederman et al., 2000; Templeton, 2000).

[0027] Außerdem kann allein die Basenzusammensetzung eines Genorts die Rekombinationseffizienzen stark beeinflussen, insbesondere durch das starke Vorhandensein von zahlreichen CpG-Inseln (Yanez und Porter, 2000). Andere kryptische Elemente (Poison-Sequenz) können gleichfalls die Effizienz des homologen Rekombinationsprozesses modifizieren (Replikationsstartstellen, wiederholte Sequenzen...). Außerdem scheint die Frequenz der homologen Rekombination sehr stark von der Zielzelle abhängig zu sein mit besonderen Situationen, wie für die Linie von lymphoiden Zellen DT40 vom Huhn, die beeindruckende Rekombinationsraten (> 10%) aufweist. Diese Spezifität ist mit einer Überexpression des Moleküls Rad54 verbunden, die zweifelsohne mit einer noch nicht identifizierten Mutation verbunden ist, die in die Kontrolle des Regulationsniveaus dieses Gens eingreift (Bezzubova et al., 1993; Bezzubova et al., 1994; Bezzubova et al., 1997). Diese Beobachtung kann zu einer Erhöhung der Rekombinationsfrequenz führen.

[0028] Im Rahmen der Erfindung ist die Effizienz der homologen Rekombination in embryonalen Zellen von Vögeln und bestimmten anderen primären Vogel-Zellen, die in Form einer Linie etabliert worden sind, gezeigt worden.

[0029] In einer ergänzenden Ausführungsweise kann man Rad54 oder ein Protein der rad-Familie überexprimieren lassen mit dem Ziel, die Effizienz des Rekombinationsprozesses zu verbessern.

Länge der homologen Fragmente

[0030] Einige Untersuchungen, die in embryonalen Stammzellen von der Maus an verschiedenen Genorten ausgeführt worden sind, zeigen an, dass eine minimale Länge der 5' und 3' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitte erforderlich ist, um eine Rekombination an dem Genort mit einer zufriedenstellenden Frequenz sicherzustellen (Hasty et al., 1991; Thompson et al., 1989; Thomas und Capecchi, 1987). Wenn eine minimale Größe von 250–500 bp ausreichend zu sein scheint, um ein Rekombinationsereignis von einer der beiden Seiten sicherzustellen, bestünde der Schlüsselparameter mehr in der gesamten Länge der Homologie als in der jeweiligen Größe der Homologie-Sequenzabschnitte (Elliott et al., 2001; Philips und Calos, 1999; Fujitani et al., 1995). Diese Grenze wäre minimal 5 bis 6 kb. Die Extrapolation der Ergebnisse ausgehend von den sehr vollständigen Daten, die bei den Bakterien erhalten worden sind, könnte darauf hinweisen, dass der limitierende Faktor bei der Rekombinationseffizienz nicht auf der Ebene der Untersuchung der Homologien zwischen den durch den Vektor zugeführten Donor-DNA-Fragmenten und den Empfänger-DNA-Abschnitten des zielgerichtet anzusteuernenden Genorts liegt (Yancey-Wrona und Caerini-Otero, 1995), sondern vielmehr in dem Austauschsystem zwischen diesen Fragmenten, das auf die Paarbildung folgt. Gleichwohl muss man große Vorsicht walten lassen, was die Interpretation dieser Ergebnisse und deren Extrapolation in das eukaryotische System angeht, die möglicherweise empfindlich sind hinsichtlich des Vorhandenseins von Stellen, welche die Rekombination an bestimmten Genorten vereinfachen („hot spot“).

[0031] Die Genorte von Immunglobulinen scheinen in dieser Hinsicht sehr besonders zu sein. Es wurden Ereignisse von homologer Integration eines Vektors, der eine Homologie lediglich in dem 3'-Arm aufweist, beobachtet (Berinstein et al., 1992). Außerdem scheinen die Rekombinationen in den Genorten von Immunglobulinen besonders zu sein aufgrund der Aktivität der Stellen, die durch die Rekombinasen, die diesen Genen eigen sind, erkannt werden. Es könnten möglicherweise bestimmte Interferenzen mit der Ausrüstung von diesen Zellen und dem Rekombinationsverfahren beobachtet werden.

[0032] So ist der Vektor ein homologer Rekombinationsvektor, welcher Homologie zu den Sequenzen eines gegebenen Genorts aufweisende 5'- und 3'-Sequenzabschnitte bzw. -Arme aufweist. Der zielgerichtet angesteuerte Genort wird unter dem Genort des Ovalbumins und des Lysozyms ausgewählt.

Zu diesem Zweck umfasst der Vektor heterologe Segmente:

[0033] Dieses Vorhandensein eines bedeutenden homologen Anteils ist umso notwendiger, je bedeutender die heterologen Segmente sind (Kumar und Simons, 1993). So erfährt der isogene Ansatz (Te Riele et al., 1992) eine Stärkung durch die Beobachtung einer Verringerung der Frequenz der homologen Rekombination im Falle einer Unterbrechung eines langen Homologien aufweisenden Fragments durch variable „Stretches“, die mit dem Vorhandensein von Polymorphismus eines Genorts verbunden sind (Lukacsovich und Waldman, 1999). Aber das symmetrische Vorhandensein von heterologen Segmenten, die strangaufwärts von den eigenen homologen Elementen gelegen sind, kann gleichfalls die Niveaus von homologer Integration des Vektors verstärken. Dieses Vorhandensein könnte die Homologien vor den durch Exonukleasen induzierten Abbau-Vorgängen schützen.

Induktion eines zielgerichteten Schnitts

[0034] Eine jegliche zielgerichtete Induktion (beispielsweise durch eine Meganuklease) eines doppelsträngigen Schnitts, eines in der DNA der Zielzelle spezifischen und seltenen Schnitts, erhöht die Rekombinationsfrequenzen. Es könnte scheinen, dass diese Induktion das Reparatursystem auslöst und den Einbau der exogenen DNA vereinfacht (Bibikova et al., 2001; Sargent et al., 2000; Donoho et al., 1998; Sargent et al., 1997; Brenneman et al., 1996; Hasty et al., 1992b). Dieser Ansatz wird insbesondere eingesetzt, indem eine Stelle eingeführt wird, die spezifisch durch eine Meganuklease, insbesondere vom Typ 1-Sce1 oder einen anderen, erkannt wird, um die Rekombinationsereignisse zu begünstigen (Sang et al., 2000; Cohen-Tanoudji et al., 1998; Robine et al., 1998; Jasin et al., 1996).

Linearisierung eines Vektors

[0035] Es wurden Vergleichstests zwischen linearen und zirkulären Vektoren ausgeführt. In dem Mäuse-System scheint es, dass die Linearisierung eine vorab erfolgreiche Notwendigkeit ist, um die Frequenzen zu erhöhen. Andere Abgabewirkungen haben manchmal einen Einfluss (Yanez und Porter, 1999).

[0036] Die verschiedenen gegenwärtig in den Vektoren vorhandenen Elemente sind auf konstitutive Weise aktiv, hat das homologe Rekombinationsereignis einmal stattgefunden. Indessen kann die Expression eines exogenen Proteins im Ei eine etwaige Toxizität zugleich auf der Ebene des Gewebes, das die Produktion sicherstellen wird, und gegebenenfalls auf der Ebene des Eis, dem Ort der letztendlichen Anhäufung, zur Folge haben. Diese Anhäufung muss folglich sowohl auf zeitlicher als auch räumlicher Ebene induziert und beendet werden können.

[0037] Einer der möglichen Ansätze besteht in der Verwendung von induzierbaren und konditionellen Systemen. Unter induzierbarem System versteht man beispielsweise das als Tet off/tet an bezeichnete System. Dieses Letztere wird aus zwei Elementen gebildet: dem Donor und dem Operator. Das Donor-System umfasst seinerseits ein genetisches Konstrukt, das von einem Tetracyclinresistenz-System, das in einem bakteriellen Tn10-Transposon identifiziert worden ist, abgeleitet ist. In Abwesenheit von Tetracyclin blockiert das konstitutiv exprimierte Repressorprotein TetR die Transkription des Gens, wodurch die Resistenz gegen Tetracyclin sichergestellt wird. In Gegenwart von Tetracyclin kann sich der Repressor nicht mehr an die Kontrollsequenzen binden. Dieses System ist erfolgreich eingesetzt worden, indem diese tetR-Sequenz mit der transaktivierenden Domäne des viralen Proteins VP16 fusioniert wurde (Gossens und Bujard, 1992), U.S.-Patent Nr. 5,589,362. Daraus resultieren die Proteine tTA (für „Tetracycline controlled Trans Activator“), die auf den seinerseits modifizierten Promotor TetO (für „Tet Operator“) einwirken können. In dem Falle der im Rahmen der Erfindung beschriebenen Vektoren wird ein erster „Donor“-Vektor (einfacher oder durch Rekombination zielgerichtet einen speziellen Genort beispielsweise des Eileitergewebes (Legedarmgewebes) ansteuernder Vektor) in die Stammzelle eingeführt und die hinsichtlich der Wirkung von Tetracyclin empfindlichen Elemente werden innerhalb des Rekombinationskonstrukts, das zielgerichtet beispielsweise den Genort von Ovalbumin ansteuert, platziert. Diese Elemente werden in einer Region des Ovalbumin-Promotors inseriert, um auf transkriptioneller Ebene das Ausmaß von exprimiertem Protein zu steuern.

[0038] Unter den anderen induzierbaren Systemen kann man die Fusionen von diesen verschiedenen Akteuren (VP16, Gal4...) mit Kontrollproteinsequenzen, wie bestimmten Rezeptoren für die nukleären Hormone, die mehr oder weniger modifiziert sind, um auf spezifische Weise auf das Vorhandensein von Analoga von Hormonen (mutierter ER, welcher Tamoxifen bindet (Metzger et al., 1995; Indra et al., 1999), der Ecdyson-Rezeptor, der PR, der RU486 bindet...) anzusprechen, aufführen.

[0039] Unter konditionellem System versteht man beispielsweise die Systeme, die bestimmte Enzyme, wie bestimmte Rekombinasen, einsetzen. Diese Enzyme erkennen bestimmte und spezifische kleine Sequenzen (loxP-Sequenzen für das Enzym CRE, die Sequenz FLP für die FRT-Rekombinase...), die dann in das zu steuernde Konstrukt inseriert werden. Die allgemeine Wirkungsweise besteht darin, eine Deletion der zwischen diesen Sequenzen gelegenen Elemente während der Wirkung der Rekombinase vorzunehmen. Die Einführung der Rekombinase erfolgt auf verschiedenen Wegen (vorübergehende Transfektion, stabile integrierte Expression...) und ihre Expression konditioniert die Exzisionsreaktion auf der Höhe der eingeführten Sequenzen.

[0040] Indem das Vorhandensein von diesen Rekombinasen mit den durch die Rezeptoren der nukleären Hormone induzierbaren Systemen kombiniert wird, macht man die Gesamtheit des konditionellen Systems induzierbar. So kann man beispielsweise die CRE-Rekombinase mit der mutierten Form des ER, welche gegenüber Tamoxifen empfindlich ist, fusionieren. Dieses System ist mit Erfolg in dem Mäuse-System eingesetzt worden (Metzger und Chambon, 2001; Vallier et al., 2001). Für das Mäuse-System sind andere Systeme beschrieben worden, wie FLT-EcDR (Sawicki et al., 1998).

Grundelemente der Konstrukte

[0041] Die Herkunft der Grundelemente der Vektoren ist variabel. Die Gerüste der hauptsächlichlichen Plasmide sind von kommerzieller Herkunft. Sie erlauben eine leichte Vermehrung der Konstrukte, die diese tragen, in einer bakteriellen, gut beherrschten Umgebung, jener von E. coli, sogar wenn verschiedene Stämme eingesetzt werden. So werden die Plasmide pBSK, pMCS5, pCI Néo eingesetzt, um eine allgemeine Grundlage für viele intermediäre oder endgültige Vektoren zu sein.

[0042] Die positiven Selektionskassetten (eine positive Selektion ermöglichenden Kassetten) werden gebildet:

- aus einem Promotor, welcher aus unterschiedlicher, viraler Herkunft stammt, wie beispielsweise der CMV (Zytomegalievirus)-Promotor, der Promotor des Virus SV40, die LTR des RSV, oder nicht-viraler Herkunft

stammt, wie Promotoren von ubiquitären Genen (wie der b-Actin-Promotor vom Huhn) oder Promotoren von in bestimmten Phasen der Entwicklung spezifisch exprimierten Genen oder Promotoren von in bestimmten Geweben spezifisch exprimierten Genen. Ein besonderer Fall besteht darin, einen für den Zustand von Stammzellen spezifischen Promotor einzusetzen.

– aus einem Gen, welches eine „positive“ Resistenz gegen ein Antibiotikum kodiert, wie beispielsweise das Neomycin-, Hygromycin-, Puromycin-, Phleomycin-, Zeomycin-, Blasticidin-, Viomycinresistenzgen, aber auch das Gen DHFR (Dihydrofolatreduktase), welches die Resistenz gegen Methotrexat sicherstellt, das Gen HPRT (Hypoxanthinphosphoribosyltransferase), welches die Transformation von speziellen vorhandenen Basen in dem HAT-Selektionsmedium (Aminopterin, Hypoxanthin, Thymidin) sicherstellt, wie auch andere Gene, welche die Entgiftungen gegenüber bestimmten Arzneimitteln bzw. Wirkstoffen sicherstellen.

[0043] Die negativen Selektionskassetten (eine negative Selektion ermöglichenden Kassetten) werden gebildet:

- aus einem Promotor, wie zuvor beschrieben,
- aus einem Gen, welches die Umwandlung eines in dem Kulturmedium vorhandenen Substrats in eine für die Zelle, die das Gen exprimiert, toxische Substanz sicherstellt. Unter diesen Molekülen kann man die Entgiftungsgene des Diphtherietoxins (DTA) (Yagi et al, 1998; Yanagawa et al., 1999), das Gen der Thymidinkinase des Herpesvirus (HSV TK), die gegenüber dem Vorhandensein von Ganciclovir oder FIAU empfindlich ist, aufführen. Das HPRT-Gen kann gleichfalls als negative Selektion durch Zugabe von 6-Thioguanin (6TG) in das Medium eingesetzt werden.
- und für die Gesamtheit der positiven und negativen Selektionen aus einer polyA-Transkriptionsterminationssequenz von unterschiedlicher Herkunft, von der die klassischsten jene sind, die von dem polyA von SV40 oder einem polyA eines eukaryotischen Gens (Rinderwachstumshormon, b-Globin vom Hasen...) abgeleitet sind.
- Ein besonderer Fall besteht darin, die positive Selektionskassette unter die direkte Abhängigkeit des zielgerichtet angesteuerten endogenen Genorts zu stellen. Dieser Ansatz erfordert die Funktionalität, folglich die transkriptionelle Aktivierung des zielgerichtet angesteuerten Genorts, um eingesetzt werden zu können und um folglich die Selektion der Klone nach Transfektion mit einem bestimmten Differenzierungs- oder Nicht-Differenzierungszustand zu verknüpfen. Diese Beispiele sind nicht einschränkend.

[0044] So umfasst der homologe Rekombinationsvektor gemäß der Erfindung in einer Plasmid-Grundstruktur eine Aneinanderreihung von wenigstens einem Element, welches nacheinander ausgewählt wird aus:

- h) einem genomischen DNA-Fragment, enthaltend den 5' gelegenen Homologie- Sequenzabschnitt des Zielgens, fusioniert mit
- h) einer Sekretionssignal-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
- h) einer kurzen Intron-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
- h) der Nukleotidsequenz, welche das Protein von Interesse kodiert, fusioniert mit
- h) einer poly A-Transkriptionsterminationssequenz, fusioniert mit
- h) einer eine positive Selektion ermöglichenden Kassette, umfassend einen Promotor, ein Resistenz gegen ein Selektionsmittel verleihendes Gen und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz, wobei die Kassette fusioniert sein kann mit
- h) einem genomischen DNA-Fragment, welches den 3' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitt des Zielgens enthält,
- h) einer eine negative Selektion ermöglichenden Kassette, umfassend einen Promotor, ein Gen, welches die Umwandlung eines in dem Kulturmedium vorhandenen Substrats zu einer für die Zelle, die das Gen exprimiert, toxischen Substanz sicherstellt, und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz.

– Unter Promotor versteht man eine jegliche Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, die Initiation der Transkription eines Gens, das strangabwärts von dieser Sequenz platziert ist, sicherzustellen und zu dirigieren.

[0045] Dieser Vektor kann gleichfalls d) die das exogene Protein kodierende Sequenz fusioniert an ihrem 5'-Ende mit c) einer kurzen Intronsequenz, welche insbesondere die Sequenz SEQ ID NO: 1 umfasst, ihrerseits fusioniert mit b) einer Sekretionssignalpeptidsequenz, insbesondere der das Signalpeptid von Lysozym kodierenden Sequenz, umfassend die Sequenz SEQ ID NO: 2, umfassen.

[0046] Der erfindungsgemäße Vektor kann gleichfalls d) die das exogene Protein kodierende Sequenz fusioniert an ihrem 3'-Ende mit einer polyA-Sequenz umfassen. Der Vektor kann gleichfalls mindestens eine IRES-Sequenz fusioniert mit wenigstens zwei das exogene Protein von Interesse kodierenden Sequenzen oder wenigstens eine IRES-Sequenz fusioniert mit wenigstens zwei Sequenzen, welche unterschiedliche Ketten, welche ein Protein von Interesse bilden, kodieren, insbesondere die schweren und leichten Ketten eines

Antikörpers von beliebiger Natur, insbesondere eines monoklonalen Antikörpers, eines Fab-Fragments, umfassen.

[0047] Unter den IRES wählt man die IRES der Gruppe I oder der Gruppe II, insbesondere die Sequenzen V130 (U.S.-Patente 5,925,565; WO 9601324, Idemfix und Zam (WO 99/29844), (Leblanc et al., 1997; 1999), aus.

1.2 Einfacher Expressionsvektor (Vergleichsbeispiel)

[0048] Diese Vektoren sind gekennzeichnet durch die aufeinanderfolgende Kombination eines Promotors, einer cDNA oder eines Abschnitts eines Gens, einer polyA-Sequenz, welche das Anhalten der Transkription erlaubt. Nach Transfektion von eukaryotischen Zellen mit diesen Vektoren weisen diese Vektoren den Vorteil und den Nachteil auf, dass sie sich zufällig in das Genom integrieren. Die Effizienz ist oftmals gut und es kann eine große Anzahl von Integrationsstellen erhalten werden. Indessen macht der zufällige Charakter dieser Insertion die Expression ausgehend von dem Promotor, den der Vektor enthält, abhängig von der Umgebung der Insertionsstelle (Methylierung, Imprinting, Enhancer, Silencer...).

[0049] So kann man unter den einsetzbaren Promotoren, die diesen Schwierigkeiten entsprechen und mit einem Ziel einer gewebespezifischen Expression eingesetzt werden, auf nicht erschöpfende Weise den Promotor des Gens von Lysozym (von 2500 bis 100 bp), aber auch den Promotor des Gens des Ovalbumins in langen Formen (von 5 bis 1 kb), enthaltend positive und negative Regulationsregionen, oder kurzen Formen (von 1000 bis 100 bp), wissend, dass ein minimaler Promotor von etwa 100 bp durch verschiedene Hormone spezifisch aktiviert werden kann (Monroe und Sanders, 2000), erwähnen.

[0050] Das nachfolgende Beispiel 1 (Vergleichsbeispiel) veranschaulicht die Möglichkeiten zur Gewinnung von Stammzellklonen mit solchen einfachen Expressionsvektoren.

[0051] Der Vektor kann folglich ein Expressionsvektor sein, welcher die das Protein von Interesse kodierende Sequenz fusioniert mit wenigstens einem Element, ausgewählt aus

- a) einem Promotor, insbesondere ausgewählt unter den Promotoren der Gene des Ovalbumins, der Ovomucoide, von Conalbumin und von Lysozym,
- b) einer Signalpeptidsequenz
- c) einer polyA-Transkriptionsterminationsnukleotidsequenz, umfasst.

[0052] Dieser Expressionsvektor und der Rekombinationsvektor können eine IRES-Sequenz umfassen, die mit wenigstens zwei das gleiche Protein von Interesse kodierenden Sequenzen oder unterschiedliche Sequenzen kodierenden Sequenzen fusioniert ist.

[0053] Die vorerwähnten Vektoren erlauben, eine Vogel-Zelle, wie zuvor definiert, zu transformieren.

[0054] In vorteilhafter Weise ist die Zelle eine embryonale primäre Vogel-Zelle, eine embryonale Vogel-Stammzelle, insbesondere die embryonalen Stammzellen, die aus der Kultivierung von Blastodermen stammen.

- unter Blastoderm versteht man einen Vogel-Embryo in einem Stadium, das der Gastrulation vorangeht, und umfassend eine einfache zelluläre Organisation mit wenigstens zwei Schichten von Zellen, die durch einen Hohlraum getrennt sind.

[0055] Die embryonale Vogel-Zelle der Erfindung weist einen Phänotyp einer alkalischen Phosphatase-positiven embryonalen Stammzelle auf.

[0056] Die embryonalen Vogel-Zellen, die embryonalen Stammzellen und die embryonalen Keimzellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie spezifisch mit mindestens einem Antikörper, ausgewählt aus ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 und EMA-6, reagieren.

[0057] In einer besonderen Ausführungsweise ist die Zelle eine Vogel-Zelle, die abgeleitet ist von embryonalen Stammzellen, die induziert worden sind, so dass sie sich unter der Einwirkung von verschiedenen Induktoren, insbesondere Retinsäure, Dimethylsulfoxid, TPA, oder speziellen Kulturbedingungen differenzieren, insbesondere durch die Bildung von „embryoid bodies“ (siehe obige Definition).

[0058] Alternativ ist in diesen Vergleichsbeispielen die Zelle eine in Form einer Linie etablierte Vogel-Zelle,

insbesondere die hepatischen Zellen LMH, die Monozytenzellen HD11 und die Fibroblastenzellen QT6.

[0059] Wie zuvor erwähnt, kann die Zelle mit einem Expressionsvektor, welcher ein Protein der Familie Rad, insbesondere das Protein Rad54 exprimiert, transformiert sein.

[0060] So bezieht sich unter einem zweiten Aspekt die Erfindung auf ein Verfahren zur Gewinnung einer durch einen der vorstehend definierten Vektoren modifizierten Vogel-Zelle.

[0061] Dieses Verfahren kann die folgenden Schritte umfassen

- a) Einführung des vorstehend definierten Vektors in eine embryonale Vogel-Zelle durch eine Transfektionsmethode, insbesondere mit Hilfe eines Liposoms, eines Polykations oder durch Elektroporation,
- b) Selektion der Zellen durch die Zugabe eines Selektionsmittels in das Kulturmedium, insbesondere von Geneticin in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg/ml,
- c) Screening der resistenten Klone und Amplifizierung.

[0062] Diese Selektion erfolgt vorzugsweise während wenigstens etwa 2 bis 10 Tagen, insbesondere 2, 3, 4, 5 oder 6 Tagen.

[0063] Die Erfindung bezieht sich in vorteilhafter Weise auf ein Verfahren zur Gewinnung einer embryonalen Stammzelle von Vögeln, die durch einen der vorstehend definierten Vektoren modifiziert ist, welches die folgenden Schritte umfasst:

- a) Einführung des gemäß einem der vorstehenden Ansprüche definierten Rekombinationsvektors in eine embryonale Stammzelle von Vögeln durch eine Transfektionsmethode, insbesondere mit Hilfe eines Liposoms, eines Polykations oder durch Elektroporation,
- b) Selektion der Zellen durch die Zugabe eines Selektionsmittels in das Kulturmedium, insbesondere von Geneticin in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 500 µg/ml,
- c) Gewinnung von genetisch stabilen rekombinierten Klonen, die eine Morphologie und Charakteristiken ähnlich zu den Ausgangszellen aufweisen (endogener Gehalt an alkalischer Phosphatase, Reaktivität mit Oberflächenantikörpern und Telomerase-Aktivität)
- d) Screening der resistenten Klone und Amplifizierung der resultierenden, korrekt rekombinierten resistenten Zellen.

[0064] Unter einem bestimmten Aspekt steuert der Rekombinationsvektor zielgerichtet den Genort des Lysozyms an.

[0065] Die Erfindung bezieht sich gleichfalls auf ein zuvor erwähntes Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der Kulturüberstand der rekombinierten Klone das exogene Protein von Interesse enthält, insbesondere nach Induktion des Klons mit Hilfe von verschiedenen Induktoren, insbesondere Retinsäure, Dimethylsulfoxid, TPA, oder speziellen Kulturbedingungen, insbesondere durch die Bildung von „embryoid bodies“.

[0066] In diesem Verfahren sind die beiden Allele des zielgerichtet angesteuerten Genorts vorzugsweise modifiziert.

[0067] Außerdem sind die Zellen embryonale Stammzellen von Vögeln, insbesondere die embryonalen Stammzellen, die aus der Kultivierung von Blastodermen stammen. Diese Zellen weisen einen Phänotyp einer alkalische Phosphatase-positiven embryonalen Stammzelle auf.

[0068] Die embryonalen Vogel-Zellen des Verfahrens sind dadurch gekennzeichnet, dass sie spezifisch mit wenigstens einem aus ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 und EMA-6 ausgewählten Antikörper reagieren.

[0069] Die Erfindung bezieht sich gleichfalls auf ein vorstehend definiertes Verfahren, in welchem die Zellen embryonale Stammzellen sind, die induziert worden sind, so dass sie sich unter der Einwirkung von verschiedenen Induktoren, insbesondere Retinsäure, Dimethylsulfoxid, TPA, oder speziellen Kulturbedingungen, differenzieren, insbesondere durch die Bildung von „embryoid bodies“.

[0070] Die vorstehend definierten Zellen können außerdem mit einem Expressionsvektor, welcher ein Protein aus der Familie Rad, insbesondere das Protein Rad54 exprimiert, transformiert sein.

[0071] Für dieses Verfahren kann das eingesetzte Medium Anti-Retinsäure-Antikörper (ARMA) und ein Zyto-

kin, ausgewählt in der aus LIF, IL-11, IL-6 und deren verschiedenen Mischungen bestehenden Gruppe, umfassen.

[0072] Das eingesetzte Medium kann gleichfalls verschiedene Faktoren, insbesondere SCF, IGF-1, bFGF, CNTF und Oncostatin, umfassen.

[0073] Unter einem dritten Aspekt bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Gewinnung eines Tiers, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches in der Lage ist, ein exogenes Protein von Interesse zu exprimieren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- a) Gewinnung von Vogel-Zellen, die durch das vorstehend definierte Verfahren modifiziert worden sind,
- b) Einführung der in Schritt a) erhaltenen Zelle in die Keimhöhle eines Embryos oder in den Blutkreislauf des Embryos und
- c) Inkubation (Bebrütung) des in Schritt b) erhaltenen Embryos.

[0074] Der in dem Schritt a) eingesetzte Vektor erlaubt vorzugsweise eine gewebespezifische Expression, insbesondere im Eileiter (Legedarm), in der Leber, dem Blut, dem Knochenmark und den lymphatischen Organen.

– Unter Knochenmark wird das Gewebe verstanden, das den Hohlraum des größten Teils der Knochen ausfüllt und welches die hämopoetischen Stammzellen, von welchen sich alle roten und weißen Zellen des Bluts ableiten, enthält

[0075] Die Erfindung bezieht sich gleichfalls auf das vorerwähnte Verfahren, um ein Tier zu erhalten, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches eine gewebespezifische Expression eines exogenen Proteins von Interesse aufweist, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass der Vektor ein homologer Rekombinationsvektor ist, welcher unter verschiedenen konstitutiven Elementen, die für sein Funktionieren erforderlich sind, 5'- und 3'-Sequenzabschnitte mit Homologie zu den Sequenzen eines Genorts, welcher unter dem Genort des Ovalbumins und des Lysozyms ausgewählt ist, aufweist.

[0076] Ein solcher Vektor kann die das exogene Protein kodierende Sequenz fusioniert mit wenigstens einem Element, ausgewählt unter einer Intronsequenz, einer Sekretionssignalpeptidsequenz, insbesondere dem Signalpeptid des Lysozyms, welches die Sequenz SEQ ID NO: 2 umfasst, einer polyA-Sequenz, einem IRES und einem Promotor, insbesondere ausgewählt unter den Promotoren der Gene des Ovalbumins, der Ovomucoide, von Conalbumin und von Lysozym, umfassen.

[0077] Der Schritt b) des Verfahrens, um ein Tier, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches eine gewebespezifische Expression eines exogenen Proteins von Interesse aufweist, zu erhalten, kann außerdem die Transformation der Vogel-Zellen mit einem Vektor, welcher ein Protein aus der Rad-Familie, insbesondere Rad54, exprimiert, umfassen.

[0078] Unter einem ergänzenden Aspekt bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse, welches die Extraktion des in den Geweben eines ausgehend von dem zuvor erläuterten Verfahren erhaltenen Tiers exprimierten exogenen Proteins umfasst. In diesem Verfahren wird das Protein vorzugsweise aus dem Blut, Eigelb oder Eiweiß extrahiert.

[0079] Alternativ kann das Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse in der Extraktion des im Überstand der aus dem erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Zellen exprimierten exogenen Proteins bestehen.

[0080] Die Erfindung bezieht sich gleichfalls auf ein Tier, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches ausgehend von dem oben beschriebenen Verfahren erhalten werden kann, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein exogenes Protein in einem speziellen Gewebe, beispielsweise in der Leber, dem Blut, dem Knochenmark, den lymphatischen Organen oder dem Eileiter (Legedarm), exprimiert.

[0081] Unter einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auf ein Ei, welches ausgehend von einem oben beschriebenen Tier erhalten werden kann, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Teil von diesen Komponenten, insbesondere das Ovalbumin und das Lysozym, teilweise oder vollständig durch ein exogenes Protein von Interesse, welches insbesondere unter den Peptiden von therapeutischem Interesse, den Interleukinen, den Zytokinen, den Hormonen und den Antikörpern ausgewählt wird, ersetzt ist.

– Unter Antikörper versteht man ein Protein, welches eine spezifische Affinität für ein Antigen aufweist, umfassend die polyklonalen Antikörper, monoklonalen Antikörper und deren Fab-Fragment.

[0082] Das Ei der Erfindung kann einen Anteil an exogenem Protein zwischen einigen mg (1 bis 10 mg) und 500 mg Trockensubstanz anstelle eines Teils oder der Gesamtheit von wenigstens einem endogenen Protein, welches insbesondere unter dem Ovalbumin und dem Lysozym ausgewählt wird, umfassen.

[0083] Nachfolgend werden nicht-einschränkende Beispiele von Ausführungsweisen der Erfindung angegeben.

Abkürzungen

cDNA:	komplementäre DNA
CMV:	Zytomegalievirus
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
ER:	Östrogenrezeptor
FGF:	Fibroblastenwachstumsfaktor
GFP:	"Green Fluorescent Protein"
GR:	Glucocorticoidrezeptor
HRE:	"Hormone Responsive Element"
IGF-1:	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
PS:	Lipopolysaccharide
LTR:	Lange terminale Wiederholung
MAR:	Matrix-Anheftungsregion
MCSF:	Makrophagen-kolonie-stimulierender Faktor
NRE:	Negatives Response-Element
PR:	Progesteronrezeptor
RAR:	Retinsäurerezeptor
RNA:	Ribonukleinsäure
RSV:	Rous-Sarkom-Virus
RXR:	Retinoid-X-Rezeptor
SCF:	Stammzellwachstumsfaktor
SDRE:	Steroid-abhängiges regulatorisches Element
TPB:	Tryptose Broth Phosphate
TPA:	Triphorbolester
TR:	Schilddrüsenhormon-Rezeptor
VDR:	Vitamin D-Rezeptor

Beispiel 1: Das Ei als Produktionssystem

[0084] Die Expression eines Proteins von Interesse in einer physiologischen Flüssigkeit eines Tiers, beispielsweise des Huhns, insbesondere im Ei und insbesondere im Eiweiß erweist sich als mit der Hilfe von verschiedenen molekularen Hilfsmitteln (Tools), darunter den Expressionsvektoren, realisierbar. Das allgemeine Prinzip der Erfindung besteht darin, direkt im Ei ein exogenes Molekül von Interesse anstelle eines endogenen Moleküls oder eines Teils dieses endogenen Moleküls exprimieren zu lassen.

1.1 Die Proteine des Eiweiß

[0085] Das Ei ist ein für die Expression von exogenen Molekülen besonders gut angepasstes Medium. Das Eiweiß ist ein komplexes Medium, dessen biochemische Zusammensetzung ziemlich gut charakterisiert ist (siehe nachfolgende Tabelle I):

Tabelle 1: Mittlerer Gehalt (in g) für ein Ei von 60 g

	Ganzes Ei	Eiweiß	Eigelb
Wasser	40	31	9
Trockensubstanz	20	4	10
Proteine	6,9	3,6	3,2
Lipide	6,4	< 0,2	6,4
Glucide	0,2	0,2	< 0,1

Nach Sauveur, 1988, op. cit.

[0086] Arm an Lipiden (0,02%), an anorganischen Ionen und an Gluciden (0,5%, darunter freie Glucose), besteht das Eiweiß hauptsächlich zu 88% aus Wasser und aus in Lösung befindlichen Proteinen (11,5%). Die Proteine des Eiweiß sind in ihrer Gänze gut charakterisiert, wenn auch deren genaue Anzahl noch Schwankungen unterliegt (Stevens, 1991; Li-Chan und Nakai, 1989; Sauveur, 1988). Man einigt sich im Allgemeinen darauf, dass etwa 40 unterschiedliche Proteine identifiziert worden sind. Unter jenen unterscheidet man fünf hauptsächliche Proteine (Ovalbumin, Conalbumin, Ovomuroid, Ovomucin a und b und Lysozym), die ihrerseits allein nahezu 83–84% der Proteine des Eiweiß repräsentieren. Angesichts dieser Zusammensetzung und eines mittleren Gewichts an Trockensubstanz von etwa 6–7 g repräsentieren diese hauptsächlichen Proteine folglich das Äquivalent von etwa 4,8–5,6 g. Die in geringerem Ausmaß vorhandenen, aber signifikant nachweisbaren Proteine machen 5 bis 6% der gesamten Proteine aus. Unter diesen in geringerem Ausmaß vorhandenen Komponenten kann man das Avidin aufführen, das in der Welt der Diagnostik für seine sehr hohe Affinität und seine sehr hohe Spezifität gegenüber Biotin sehr bekannt ist. Die anderen Komponenten werden in geringen, von einem Präparat zum anderen schwankenden Anteilen identifiziert und sind oftmals sowohl auf biochemischer wie molekularer Ebene schlecht charakterisiert. Die Anzahl von Untersuchungen, die diese betreffen, ist außerdem in Übereinstimmung mit ihrer geringen Repräsentanz wenig bedeutend. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der hauptsächlichen Proteine des Eiweiß werden aufgeführt (siehe nachfolgende Tabelle 2).

Tabelle 2: Proteinzusammensetzung des Hühnereiweiß

Protein	% des Proteins	MG	pl	% Kohlenhydr. (carb.)	Funktion	AS	S-S
Ovalbumin	54	45,0	4,5	3,5	Strukturell	385	1
Conalbumin	12–13	77,7	6,0	2,6	Eisen-transport	686	15
Ovomucoid	11	28,0	4,1	16	Proteinas-einhibitor	185	9
Ovomucin a Ovomucin b	1,5–3,5	210 720	4,5	13 58	Strukturell	1276 246	
Lysozym	3,5	14,3	10,7	0	Proteolytisches Enzym	129	4
Ovoinhibitor	0,5–1,5	49,0	5,1	5–9,6	Proteinas-einhibitor		21
Ovoglycoprotein	0,5–1,0	24,4	3,9		?		
Ovoflavoprotein	0,8	32,0	4,0	11	Riboflavin-transport	234	9
Ovostatin	0,5	780	4,9	5,8	Proteinas-einhibitor	2762	
Ovoglobulin G2	> 1	47	4,9	?	?	102	
Ovoglobulin G3	> 1	50	4,8	?	?	103	
Cystatin	0,05	12,7	5,1	0	Proteinas-einhibitor	124	2
Avidin	0,05	68,3	10	7	Biotin-transport	4 × 129	4 × 1
Thiamin bindendes Protein	< 0,05	38		0	Thiamin-transport		
Andere Proteine	9						

Nach: Stevens (1991), Corp. Bioch. Physiol. 100b 1–9 und Li-Chan und Nakai (1989), Critical review in Poultry Biology 2, 21–58.

[0087] Die Proteine des Eiweiß werden allesamt durch die Zellen des Eileiters (Legedarms) auf der Höhe des Magnums hergestellt. Es werden verschiedene Zellarten gefunden und zwischen den Zellen, die für die Sekretion verantwortlich sind, wird eine bestimmte Spezialisierung beobachtet. Die kalkbildenden (calciformen) Epithelzellen (welche gleichfalls als muköse Zellen bezeichnet werden) sind auf die Produktion von Avidin und Ovomucin spezialisiert, wohingegen die Zellen der tubulären Drüsen präferentiell Lysozym und Ovalbumin sekretieren. Die Verteilung dieser verschiedenen Zellarten ist im sekretorischen Epithel des Magnums variabel, es wird aber keinerlei Regionalisierung beobachtet (Sauveur, 1988).

[0088] Die Synthese der Proteine des Eiweiß erfolgt auf der Ebene der Zellen kontinuierlich. Die glandulären und kalkbildenden Epithelzellen „lagern“ die Proteine, die während des Transits in das Magnum in einigen Stunden (etwa 3 h 30) um das Eigelb herum abgegeben werden. Die mechanische Deformation induziert diese sehr schnelle Sekretion und Ablagerung (Sauveur, 1988).

[0089] So erscheint es für den guten Ablauf der Sekretion der exogenen Proteine in das Eiweiß essentiell, alle diese Regulationssignale auf molekularer und physikalischer Ebene aufrechtzuerhalten.

[0090] Auf der Ebene eines chimären Tiers ist die Voraussetzung für eine jegliche Produktion eines exogenen Moleküls von Interesse das Vorhandensein der genetischen Modifizierung im Eileiter (Legedarm) und insbesondere in den Zellen des Magnums. Der privilegierte Ansatz des Einsatzes von embryonalen Stammzellen scheint diesen Mosaik-Charakter zu erlauben. Auf der Ebene der Etablierung einer Linie von Tieren wird dieser Beitrag durch die adäquaten Kreuzungen automatisch auf den heterozygoten, dann homozygoten Zustand übertragen, denn er ist auf der Ebene des Genoms integriert.

1.2 Die Komponenten des Eigelbs

[0091] Das Eigelb besteht im Wesentlichen aus einer Anhäufung von Lipiden (Tabelle 1 oben) in Form von Lipoproteinen. Es ist das Ergebnis einer engen Assoziation der beiden Hauptproteine, des Vitellins und des Vitellenins, mit Phospholipiden und Triglyceriden. Die anderen Bestandteile (Cholesterin, Vitamine und fettlösliche Pigmente) sind in geringeren Mengen vorhanden. Im Gegensatz zu den Proteinen des Eiweiß werden alle Proteine und die Komponenten des Eigelbs durch die Leber synthetisiert und über den Blutkreislauf transportiert, um sich auf der Ebene des Eigelbs während der Entwicklung der Follikel anzuhäufen (Sauveur, 1988; Nau, 1987). Man findet im Eigelb gleichfalls einen nicht vernachlässigbaren Anteil von Immunglobulinen, die direkt im Verlauf der Herstellung von diesem Vitellus angehäuft werden. Das Vorhandensein von diesen Immunglobulinen mütterlicher Herkunft stellt überdies einen gewissen Immunschutz im Verlauf der ersten Tage, ja sogar mehr, des Lebens des Kükens sicher. Es wird gerade damit begonnen, den Transportmechanismus von diesen Immunglobulinen und deren Anhäufung im Ei zu untersuchen. Das Verfahren zur Reinigung dieser für den Vogel spezifischen IgY-Moleküle (Äquivalente zu den IgG der Säugetiere) wird gut beherrscht. Diese Eigenschaft kann mit Erfolg eingesetzt werden, um Immunglobuline von Vögeln in relativ bedeutender Menge (manchmal in der Größenordnung von 10 mg pro Ei) zu erhalten, ja sogar die Anhäufung davon durch eine zielgerichtete Immunisierung des Eier legenden Tiers zu begünstigen. Es ist außerdem gezeigt worden, dass die humanen Immunglobuline sich gleichfalls in dem Eigelb anhäufen können durch einen Mechanismus, der zu den endogenen Immunglobulinen ähnlich ist (Mohammed et al., 1998). Unter dieser Perspektive, durch das Huhn bestimmte Immunglobuline produzieren zu lassen, kann eine spezifische Expressionsstrategie entwickelt werden.

Beispiel 2: Beschreibung der molekularen Genorte und deren transkriptionelle Regulation

[0092] Der Hauptteil der Gene, die die hauptsächlichsten Proteine des Eiweiß spezifizieren, sind auf molekularer Ebene untersucht worden. Die kodierenden Phasen sind im Allgemeinen identifiziert und der Hauptteil der Sequenzen der entsprechenden cDNAs findet sich in den Genbanken. Auf genomischer Ebene sind die Fortschritte langsamer gewesen. Die Struktur der Genorte des Hauptteils der hauptsächlichsten Moleküle ist vollständig oder partiell veröffentlicht worden. Gleichwohl können die veröffentlichten Sequenzen sich als unvollständig erweisen (siehe Tabelle 3 unten).

Tabelle 3: Identifizierte Sequenzen des Proteine des Eiweiß

	cDNA	Gen	Gen (partiell)
Ovalbumin	V00383	J00895	
Ovalbumin X			J00917 5' ex 1 (Exon 1), J00918 ex5, J00919 ex6, J00920 ex7
Ovalbumin Y		J00922	
Conalbumin	X02009	Y00407	
Ovomucoid	J00902		J00897 (5'), J00898 (3', kodierend), J00899 (3', nicht-kodierend)
Ovomucin □	AB046524		

Lysozym	X61198	X98408 X00589 X00591 X05461 X05463 X05462	J00882 5' ex1 J00883 ex2 J00884 ex3 J00885 ex4 3'
Ovoinhibitor (16 Exons)			M15962 ex1, M16127 ex2, M16128 ex3 M16129 ex4, M 16130 ex5, M16131 ex6 M16132 ex7, M16133 ex8, M16134 ex9 M16135 ex10, M16136 ex11, M16137 ex12 M16138 ex13, M16139 ex14, M16140 ex15 M16141 ex16
Ovostatin	X78801		
Cystatin	J05077	M95725	X62413 (synthetische Mut. V55D) X62411 (synthetische Mut. Q53N S56A) X62412 (synthetische Mut. R52L Q53E) X62409 (synthetische Mut. Q53N) X62408 (synthetische Mut. Q53E) X62407 (synthetische Mut. L54M G57A) X62410 (synthetische Mut. Q53N G57C) X62406 (synthetische Mut. G57A) X14685 (1-23 SIM 129 189)
Avidin (Avd)	X05343	AJ311647	
Avr1		AJ311647	221611
Avr2		AJ311648	221554
Avr3			221612
Avr4			222883
Avr5			222882
Avro		AJ237658	
Avr7		AJ237659	

2.1 Genort des Ovalbumins

[0093] Der Genort des Ovalbumins mit einer Größe von 100 kb gehört zu der Multigen-Familie der Serpine und enthält 3 verwandte Gene, ova, ovaX und ovaY. Sie werden allesamt im Eileiter (Legedarm) eines im Zu-

stand des Eierlegens befindlichen Huhns exprimiert (LeMeur et al., 1981; Baldacci et al., 1981). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen strukturell seit 1979 bekannt (Gannon et al., 1979), befindet sich der Genort des Ovalbumins auf dem Chromosom 2 (Dominguez-Steglich et al., 1992). Die erste vollständige Sequenz, die 1978 veröffentlicht worden ist, ist jene des Ovalbumins. Seine prä-mRNA hat eine Größe von 7564 bp und umfasst 7 Exons (McReynolds et al., 1978). Die gespleißte mRNA enthält 1872 bp (Woo et al., 1981).

[0094] Die Transkription des Ovalbumin kodierenden Gens (wie überdies jene des Conalbumins, siehe 2.3) wird durch die Steroidhormone gesteuert. So stimuliert die Zugabe von Östrogenen die Produktion von Ovalbumin um das 20-fache und jene des Conalbumins um das 2,5-fache (N'guyen et al., 1979). Vor einer hormonalen Stimulation sind die Transkripte des Ovalbumins in den Zellen des Eileiters (Legedarms) nicht nachweisbar, wohingegen sie proportional zu der Ostrogendosis mehr als 50% der gesamten Transkripte einer Zelle nach maximaler Stimulation repräsentieren (Dean et al., 1983). Während das Transkriptionsniveau des Conalbumins zu der Menge der Östrogenrezeptoren im Kern direkt proportional ist, weist jenes des Ovalbumins darauf hin, dass es mehrere Bindungsstellen der Östrogenrezeptoren auf der Ebene des Promotors gibt (Palmiter et al., 1981). Die nukleosomale Struktur der Gene des Ovalbumins und des Conalbumins modifiziert sich im Verlauf der transkriptionellen Aktivierung. Die genomischen Fragmente assoziieren sich mit der nuklearen Matrix und weisen vier Hauptregionen von übermäßiger Empfindlichkeit gegenüber DNase infolge einer Behandlung mit den Hormonen auf (Ciejek et al., 1983). Diese Regionen befinden sich in der 5'-Region des Promotors und 3' von dem letzten Exon auf der Höhe der Polyadenylierungsstelle (Bellard et al., 1982; Bellard et al., 1986) ([Fig. 1](#): Regulationselemente des Gens des Ovalbumins). In Kombination mit den Östrogenen sind gleichfalls verschiedene Steroidhormone (Progesteron, Glucocorticoide oder Androgen) und verschiedene Faktoren (Insulin, IGF-1, cAMP...) an der transkriptionellen Kontrolle beteiligt. Die Gesamtheit von diesen Faktoren erhöht überdies die Halbwertszeit der mRNA des Ovalbumins, eine Halbwertszeit, die nach Zugabe von bestimmten von diesen Faktoren 6 bis 24 h übersteigt (Arao et al., 1996; Kida et al., 1995; Evans und McKnight, 1984). Diese Faktoren erhöhen gleichfalls das Translationsniveau der mRNA (Skafar et al., 1985; Skoufos und Sanders, 1992).

[0095] Die Ergebnisse von zahlreichen Arbeiten, die mit dem Promotor des Ovalbumins ausgeführt worden sind, haben erlaubt, die verschiedenen Nukleotidregionen, die das Ziel der Wirkung von diesen Hormonen und Faktoren sind, aufzuklären (Sensenbaugh und Sanders, 1999). Sukzessive Deletionsarbeiten auf der Ebene des Promotors und Transfektionsexperimente von verschiedenen Konstrukten zeigen, dass die Aktivierung des Promotors in den primären Zellen des Eileiters (Legedarms) des Huhns in Gegenwart von Östrogenen oder nicht optimal ist. Das Vorhandensein von gewebespezifischen Aktivatoren und Repressoren ist folglich für die Expression von diesem Gen essentiell (Dierich et al., 1987). Die [Fig. 1](#) veranschaulicht die hauptsächlichen Regulationsstellen, die identifiziert worden sind.

[0096] Man findet so aufeinanderfolgend eine HSIV-Region im Bereich von -6000 bp bezogen auf die Transkriptionsstartstelle, die keine auf Östrogene ansprechenden Elemente aufweist. Eine Region HS III, die zwischen -3200/-2800 bp bezogen auf die Transkriptionsstelle lokalisiert ist, umfasst die hauptsächlichen Regulationsstellen durch die Östrogene. Die Deletion von dieser Region vernichtet den größten Teil der HSIII-Reaktion, die durch vier wiederholte halbe ERE-Sequenzen, die voneinander durch etwa 100 Nukleotide getrennt sind, vermittelt wird. Diese Elemente kooperieren mit der Stelle der in der Nähe gelegenen TATA-Box. Jede Stelle bindet einen Rezeptor schwach, aber die Kooperation der verschiedenen Stellen stellt einen starken induzierbaren Charakter in einer Umgebung eines Minimalpromotors oder heterologen Promotors sicher. Die gleiche Region zeigt inhibitorische Elemente der Expression des Gens, Elemente, die in den nicht-produktiven Zellen aktiv sind, aber in einer Situation außerhalb des Eileiters (Legedarms) (Kato et al., 1992; Muramatsu et al., 1995).

[0097] Die HS II-Region umfasst das SDRE („Steroid Dependent Regulatory Element“), das zwischen -800 und -585 bp bezogen auf die Transkriptionsstartstelle (+1) lokalisiert ist. Diese Region weist Homologien zu dem Promotor des Gens NF-kappa B auf, was Kontrollen durch gemeinsame Faktoren nahelegt (Schweers und Sanders, 1991). Mehrere Faktoren aus der Familie der Proteine W-H, die Proteine Chirp-I, Chirp II, Chirp III („Chicken ovalbumin Induced Regulatory Protein I“) binden sich gleichfalls an das SDRE einzig in Gegenwart von Östrogen und von Glucocorticoiden (Dean et al., 1996; Dean et al., 1998; Dean et al., 2001). Erneut führt, wie um die Komplexität der eingesetzten Regulationen zu zeigen, das alleinige Vorhandensein von dieser SDRE-Region innerhalb eines heterologen Promotors nicht zu einer von Steroidhormonen abhängigen Reaktion (Response). Gleichwohl scheint diese Region von diesen Hormonen abhängig zu sein, wenn sie mit der HSI-Region assoziiert ist.

[0098] Diese Region HS I, die von -350 bis -32 lokalisiert ist, ist die NRE (Negative Response Element)-Re-

gion, die die hauptsächliche negative Regulation des Promotors kontrolliert. NRE reprimiert die Expression des Gens in Abwesenheit von Steroidhormonen. Das Vorhandensein allein von NRE oder allein von SDRE reicht nicht aus, um ein exogenes Gen zu regulieren. Diese Sequenzen müssen kooperieren, um „die Derepression zu induzieren“ (Hasty et al., 1994; Schweers et al., 1990; Sanders und McKnight, 1988). Aber die Ansicht ist grob vereinfachend, denn diese HSI-Region wird tatsächlich aus einem veritablen Mosaik von Stellen, die eine positive und negative Regulation der Transkription des Gens sicherstellen, gebildet. Es sind drei Domänen hinsichtlich des Einflusses von ihren Wirkungen unterscheidbar. Domäne I. Die Region –239 bis –220 ist eine Sequenz vom Silencer-Typ. Die drei Zonen weisen Affinität für spezifische Proteinkomplexe der Zellen des Eileiters (Legedarms) auf, aber die bedeutendsten sind die Regionen –280 bis –252 und –134 bis –88. Diese Region umfasst das Motiv CAR („COUP Adjacent Repression“). Die als NRE bezeichnete Region ist tatsächlich komplexer als zu Anfang beschrieben (Haecker et al., 1995). Es ist auch eine positive Regulationsstelle, die den Faktor delta EF1 („Estrogen responsive transcription factor“) bindet, identifiziert worden. So überlappen sich die Wechselwirkungsstellen (–197 bis –95) des Progesterons und der Östrogene partiell (Dean et al., 1983; Dean et al., 1984). Strangabwärts von der Position von –95 bp haben ergänzende Deletionen die beobachteten Konzentrationen der Transkripte dramatisch abfallen lassen (Knoll et al., 1983). Außer den Östrogenrezeptoren ist ein wichtiger der Regulationsfaktoren der Orphelinrezeptor COUP TF („Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor“) (Sawaya et al., 1996; Robinson et al., 1999). Dieser Faktor wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Durch gemeinsame Reinigung mit dem Östrogenrezeptor identifiziert, weist er Affinität zu einer zwischen –90 und –70 bp gelegenen Region auf (Wang et al., 1987; Hwung et al., 1988a, Hwung et al. 1988b; Monroe und Sanders, 2000). Die Bildung von Rezeptor-Rezeptor-Komplexen zwischen COUP-TF und den verschiedenen Rezeptoren für die nuklearen Hormone (VDR, ER, TR, GR, PR, RXR, HNF-4...) auf der Ebene der verschiedenen HRE, darunter ERE, begünstigt die Bindungen an diese Regulationselemente. COUP-TF reguliert die Wirkung von ER durch direkte Kontakte mit der DNA, aber auch über direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren (Klinge et al., 1997). Die Wirkungsweisen von COUP-TF und verschiedenen verwandten Rezeptoren (COUP-TFII oder APRI) sind komplex (Kimura et al., 1993) in einem positiven oder negativen Sinne für die Regulation der Transkription gemäß den im Spiel befindlichen Proteinpartnern. Unter den beteiligten Proteinen kann man nicht erschöpfend ear 2 (Pereira et al., 1995); N-CoR („Nuclear Repressor Coreceptor“) und SMRT („Silencing Mediator for retinoic acid and Thyroid hormone Receptor“) (Shibata et al., 1997) aufführen.

2.2 Der Genort des Lysozyms

[0099] Der Genort des Lysozyms ist ein Genort, der hinsichtlich der Größe stärker beschränkt ist als jener des Ovalbumins. Er wird auf etwa 40 bp geschätzt (Sippel et al., 1978; Short et al., 1996). Zwei MAR („Matrix Attachment Region“)-Einheiten, die bei –11,1 kb/–8,85 kb und +1,3 kb bis +5,0 kb bezogen auf die Transkriptionsstartstelle (+1) gelegen sind, begrenzen diesen Genort genauer auf 22 kb. Diese MAR-Sequenzen bestehen aus mehreren Verankerungsstellen an die Proteinmatrix der nuklearen Membran (Loc und Strätling, 1988; Phi-van und Strätling, 1996; Phi-van, 1996). Das Hinzufügen von MAR-Sequenzen zu heterologen Genen erhöht deren Transkription (Stief et al., 1989; Phi-Van et al., 1990). Noch zusätzlich zu dem Vorhandensein der MAR gibt es wenigstens eine Replikationsstartstelle der DNA in dem Genort des Lysozyms, eine Startstelle, die mehrere Initiationsgabeln der Replikation enthält (Bonifer et al., 1997; Phi-van et al., 1998; Phi-van und Strätling, 1999). Diese Stelle scheint überdies den Genort des Lysozyms ganz und gar besonders zu machen hinsichtlich der Klonierung, da bestimmte Abschnitte ziemlich schwierig in Klonierungsplasmide subzuklonieren sind. Das Gen des Lysozyms beim Huhn umfasst 4 Exons und weist eine bedeutende Homologie zu den Genen des humanen Lysozyms und des Lysozyms von der Maus auf. Es wurden mehrere sekundäre Transkriptionsstartstellen nachgewiesen, die im Allgemeinen in über die Gesamtheit des Genorts verteilten wiederholten Sequenzen gelegen sind (Von Kries und Strätling, 1988). Von –14 kb bis +6 kb, d. h. über die vollständige Gesamtheit des Genorts, wurden die Expression regulierende Sequenzen identifiziert. Das Gen des Lysozyms wird in den reifen Makrophagen, Zellen, in denen das Lysozym als Differenzierungsmarker eingesetzt wird, konstitutiv exprimiert, wohingegen seine Expression in den Zellen des Eileiters (Legedarms) unter die Kontrolle der Steroidhormone gestellt ist (Short et al., 1996; Fritton et al., 1987; Jantzen et al., 1986; Fritton et al., 1983). Diese Spezifitäten der Expression sind von verschiedenen Sequenzen, von denen die hauptsächlichsten Stellen in der [Fig. 2](#): Regulationselemente des Gens des Lysozyms, aufgeführt sind, abhängig.

[0100] Man unterscheidet zwei Kategorien von regulatorischen Sequenzen: die sogenannten positiven Regulationssequenzen oder „Enhancer“ und die sogenannten negativen Regulationssequenzen oder „Silencer“. Diese Sequenzen wurden nach der Analyse der elektrophoretischen Profile der DNA, von Profilen, die nach Behandlung mit DNase I erhalten worden sind, als „hypersensible“ Regionen identifiziert.

[0101] Die hauptsächlichsten Enhancer- und Silencer-Stellen sind jeweils die Regionen E-6,1 kb, E-2,7 kb,

E-0,2 kb bzw. N-2,4 kb, N-1,0 kb und N-0,25 kb. Bestimmte sind für myeloische Zellen spezifisch (E-6,1 kb, E-2,7 kb, E-0,2 kb für die reifen Makrophagen und N-2,4 kb in den Fibroblasten und unreifen Makrophagen) (Steiner et al., 1987; Huber et al., 1995). In den Zellen des Eileiters (Legedarm) stellt das Element E-6,1 kb den Hauptanteil der Spezifität sicher. Die sequentielle Aktivierung der Gesamtheit von diesen unterschiedlichen Stellen ist gleichfalls ein zell- und gewebespezifisches Regulationselement (Regenhard et al., 2001; Kontraki et al., 2000). Detaillierter besteht der Enhancer E-2,7 kb aus 4 Regionen (I bis IV). Die Region I bindet den Faktor FEF („c-fes Expression Factor“), die Region II enthält eine Erkennungsstelle für den Faktor PU.1 aus der EST-Familie und ist spezifisch für Makrophagen (Ahne und Strätling, 1994). Alle diese unterschiedlichen Regulationselemente überlappen sich teilweise, zumindest in dem Gen vom Huhn, aber nicht auf der Ebene des Gens von der Maus, einer Spezies, in welcher eine anzestrale Verdoppelung das Gen und seine Regulationselemente voneinander getrennt hat. Es wurden andere Elemente lokalisiert, insbesondere die Bindungsstellen von ubiquitären Transkriptionsfaktoren, wie NF-1, aber auch AP1, gelegen bei -0,2 kb und -6,1 kb, eine Stelle, für welche eine Region von 157 bp die Spezifität der Expression in den Makrophagen sicherstellt (Goethe et al., 1994; Theisen et al., 1986; Grewal et al., 1992; Nowock und Sippel, 1982). Interessanterweise blockiert das Onkogen *vmyc* (das beispielsweise in den HD11-Zellen vorhanden ist), welches die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen inhibiert, die Transkription, indem es die Bindung des Faktors C/EBP inhibiert (Hink et al., 1996).

[0102] Die Elemente (HRE), welche die Empfindlichkeit der Transkription gegenüber den Steroidhormonen (PRE für Progesteron und GRE für Glucocorticoide) sicherstellen, sind in der bei -0,2 kb von der Transkriptionsstartstelle (+1) des Promotors gelegenen Region vorhanden (Renkawitz et al., 1982; Renkawitz et al., 1984a; Renkawitz et al., 1984b; Hecht et al., 1988). Spezieller stellen zwei Stellen zwischen -220 und -140 bp und zwischen -80 bp und -50 bp das Wesentliche der Regulation sicher (Altschmied et al., 1989; Dolle und Strätling, 1990; Von der Ahe et al., 1986).

[0103] Ein bedeutender Teil der Regulation wird durch „Silencer“ gesteuert. Zwei von jenen (N-1,0 kb und N-0,25 kb) inhibieren die Transkription, sogar von heterologen Promotoren (Baniahmad et al., 1987; Faust et al., 1999). Der dritte (N-2,4 kb) wird durch die Rezeptoren für die Schilddrüsenhormone (TR) und durch dessen onkogenes Homolog *v-erbA* wie auch durch den Regulator NeP1 („negative Protein 1“), welches auch als „CTCF (CCCTC-binding factor)“ (Burcin et al., 1997; Darling et al., 1993; Kohne et al., 1993; Bhat et al., 1994) bezeichnet wird, erkannt. NeP1 bindet sich auf der Höhe des F1-Abschnitts von 50 bp von N-2,4, wohingegen der TR hauptsächlich im Bereich des Abschnitts F2 von diesem Element bindet. Die homodimeren oder heterodimeren Assoziationen mit den anderen nukleären Rezeptoren (RAR, RXR) modulieren das Transkriptionsniveau von diesem Gen (Baniahmad et al., 1990; Arnold et al., 1996). Der Phosphorylierungszustand des TR-Rezeptors ist gleichfalls ein wichtiges Element. Schließlich spielt der Faktor HNF-I alpha („Hepatic nuclear Factor-I“), der in den Zellen des Eileiters (Legedarms) exprimiert wird, eine Rolle bei der Regulation des Lysozym-Gens. Der Promotor des Gens enthält zwei Regionen, die durch dieses HNF-I-Protein erkannt werden. Diese Regulation der Expression des Gens des Lysozyms durch HNF-I scheint auf der phylogenetischen Ebene zwischen den Vögeln und den Säugetieren verloren gegangen zu sein (Grajer et al., 1993).

2.3 Der Genort des Conalbumins

[0104] Das Gen des Conalbumins, welches auch als Ovotransferrin bezeichnet wird, wurde zuallererst beim Menschen identifiziert. Es erstreckt sich über mindestens 33,5 kbp und umfasst 17 Exons. Das Gen vom Huhn ist gleichfalls in 17 Exons und 16 Introns organisiert, aber nur über 10,5 kb. Die mRNA hat eine Größe von 2376 bp (Cochet et al., 1979; Jeltsch und Chambon, 1982; Jeltsch et al., 1987; Schaeffer et al., 1987). Es wurden sehr wenig Untersuchungen über die Regulation der Expression von diesem Gen ausgeführt. Die Regulation der Stabilität der mRNA ist besonders. Das Molekül, das zu der Familie der Transferrine gehört, bindet Eisen in ionischer Form und reguliert die Stabilität und das Transkriptionsniveau von seiner eigenen mRNA. Auch wenn viele Untersuchungen an dem humanen Transferrin und seinem Rezeptor (CD71) ausgeführt worden sind, gibt es wenig Dokumentation hinsichtlich der Vogel-Formen.

Beispiel 3: Vereinfachende äußere Elemente

[0105] Bei den Eukaryoten ist die homologe Rekombination ein natürliches Ereignis, das überdies im Moment der Meiose auftritt, um in einer grob vereinfachenden Aussage eine Durchmischung der Gene und der Allele sicherzustellen. Die Rolle der homologen Rekombination ist während einer mitotischen Teilung viel delikater zu interpretieren. Die homologen und nicht-homologen Rekombinationsphänomene scheinen gleichwohl entscheidend zu sein, sobald das genetische Material geschädigt ist. Zahlreiche Situationen im Leben einer Zelle und eines Organismus exponieren so das genetische Material. Beispielsweise ein unerwarteter Replikations-

fehler, eine mit Strahlungen verbundene radikalische Ionisation, ein oxidativer Stress, die Wirkung von Endonukleasen oder von Topoisomerasen, die mit der mitotischen Segregation verbundene mechanische Belastung, können zu zufälligen doppelsträngigen Schnitten führen. Wenn auch die Hefe die homologen Reparaturmechanismen favorisiert, scheint die höhere eukaryotische Zelle die nicht-homologe Zusammenfügung bzw. Reparatur von diesen Schnitten zu bevorzugen, obgleich auch die homologe Reparatur beobachtet wird. Aber in allen Fällen, da die genetische Unversehrtheit eine Voraussetzung für eine jegliche Teilung ist, setzt die Zelle ein ganzes Ensemble von Genen, die damit beauftragt sind, diese Schnitte zu reparieren, in Gang, um sich dieser für das geschädigte Material kritischen Situation zu stellen. Anfänglich in dem Hefesystem beschrieben, wurden die Rad-Gene (rad51, rad52, rad53 und rad54) (Takata et al., 2000; Morrison und Takeda, 2000; Bell et al., 1999; Shinohara et al., 1997; Bezzubova et al., 1997; Ivanov und Haber, 1997; Porter et al., 1996), die an der Reparatur durch homologe Rekombination beteiligt sind, auch in den höheren Organismen identifiziert. Die Homologen Rad51 und Rad54 vom Huhn sind kloniert worden. Die DNA und das Protein weisen starke Homologien zu den Sequenzen aus der Hefe, der Maus und dem Menschen auf (Essers et al., 1997; Dronkert et al., 2000). Es werden auch Ähnlichkeiten bei der Wirkung beobachtet, aber auch Unterschiede, insbesondere was die Wirkung von Rad51 angeht (Bezzubova et al., 1993). Ebenso sind die humanen Homologen der Gene ku70 und ku80 von der Hefe zugleich an den nicht-homologen Reparaturen und an den Rekombinationsphänomenen, die bei den Umlagerungen der Genorte der Immunglobuline beobachtet werden, beteiligt. Man beginnt, sich den Beziehungen zwischen diesen verschiedenen Akteuren ebenfalls anzunähern, und hierbei wird die Bildung von Proteinkomplexen nachgewiesen, deren Regulationen ihrerseits komplex sind (Morrison et al., 2000; Morrison et al., 1999; Yamaguchi-Iwai et al., 1999; Takata et al., 1998; Yamaguchi-Iwai et al., 1998). So kann eine nicht erschöpfende Liste von Proteinen, die die Rekombination vereinfachen (Rekombinase), angegeben werden, von dem einfachen bakteriellen Protein RecA (Shcherbakova et al., 2000) bis zu den Mitgliedern der Rad-Familie, aber auch Proteine, wie BraC1 (Moynahan et al., 1999).

[0106] In einem Ansatz, der Ereignisse von homologer Rekombination vereinfachen soll, wird die Wirkung von Rad 54 zum Zeitpunkt der Einführung des homologen Rekombinationsvektors ausgewertet. So sind zwei Ansätze möglich. Der erste besteht darin, eine Cotransfektion eines Expressionsvektors von einem der Proteine der Rad-Familie, insbesondere Rad 54, mit dem homologen Rekombinationsvektor vorzunehmen. Der zweite besteht darin, die Zellen mit einem konditionellen Expressionsvektor von einem der Proteine aus der Rad-Familie, insbesondere Rad 54, zu transfizieren. In diesem Falle werden die Zellen zuallererst selektioniert, stabilisiert und etabliert, um erneut mit einem homologen Rekombinationsvektor transfiziert zu werden, dann induziert, um das Protein aus der Rad-Familie maximal zu exprimieren. Die Wirkung von Rad54, die auf der Ebene der Transfektionseffizienz getestet worden ist, ist in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgeführt:

Tabelle 4: Einfluss der Expression von Rad54 auf die Anzahl von transfizierten Klonen

Bedingungen	1	2	3	4	5	Vergleichsprobe
pOvaRH (µg)	5	5	5	5	5	0
pMCS5 (µg)	5	4	3	2	0	10
pRad54 (µg)	0	1	2	3	5	0
Fugène	30	30	30	30	30	30
DMEM	970	970	970	970	970	970
Anzahl von Klonen						
Schale 1	344	304	172	248	292	0
Schale 2	128	324	212	264	300	0
Mittelwert	236	314	193	256	296	0

[0107] Um die Bedeutung von einem der Proteine aus der Rad-Familie zu testen, wird das Expressionsplasmid pRad54 (Expressionsplasmid des Proteins RAD54 unter der Kontrolle des CMV-Promotors) in Gegenwart des Plasmids pOvaRH, einem Rekombinationsplasmid, welches keine cDNA von Interesse enthält, für eine Cotransfektion eingesetzt. Die gesamte Menge von Plasmid beträgt 5 µg von pOvaRH in Gegenwart von variablen Mengen von pRad54. Da die molare Ergänzung durch ein „Carrier“-Plasmid beitragen wird, hat das pMCS5 kommerzieller Herkunft ungefähr die gleiche Größe wie pCMV Rad54. Die Stammzellen S86N werden zu 1×10^6 Zellen pro Schale in Proliferationsmedium in Gegenwart von durch Bestrahlung inaktiviertem Feeder

ausgesät. Die Transfektionsmischung wird zugesetzt und die Selektion mit Neomycin während etwa 7 Tagen angewendet. Die Klone werden dann nach Fixierung mit Methanol und Anfärbung mit Wright/Giemsa gezählt. Als Schlussfolgerung scheint das Vorhandensein von Rad54 die Effizienz der Gewinnung von Klonen nicht wesentlich zu modifizieren.

Beispiel 4: Wahl des Signalpeptids

[0108] Einer der Ansätze, die gewählt wurden, um die exogenen Proteine zu produzieren, besteht in deren Anhäufung im Ei. Die im Rahmen der Erfindung eingesetzte substitutive Ersetzungsstrategie nutzt die Verwendung eines aktiven Systems (aber gegebenenfalls passiven Systems für spezielle Proteine, die dazu die Fähigkeit haben) zur Anhäufung des exogenen Proteins im Eiweiß aus. So werden die kodierenden Phasen unter die Abhängigkeit des endogenen Promotors des endogenen Zielgens gestellt und werden mit einem Referenz-Signalpeptid fusioniert. Die Funktion des Signalpeptids besteht darin, die Translokation des Proteins in Richtung der Außenseite der Zelle durch die verschiedenen konstitutiven Elemente des sekretorischen Apparats der Zellen (Retikulum, Golgi...) sicherzustellen. Die Signalpeptide sind dazu bestimmt, im Verlauf des Reifungsprozesses des Proteins abgespalten zu werden. Jenes häuft sich dann in der physiologischen Flüssigkeit und insbesondere im Eiweiß an. Man setzt entweder die Signalpeptide der endogenen Proteine oder Signalpeptide von anderen Molekülen, bekannte Sequenzen, um korrekt behandelt zu werden, ein. Insbesondere wird das Signalpeptid des Lysozyms präferentiell ausgewählt, denn seine Struktur ist gut bekannt und die 18 ersten Aminosäuren werden während der Exportierung des reifen Proteins in das Eiweiß abgespalten. Außerdem gehört dieses Signalpeptid zu einem Protein, das sich von Natur aus im Eiweiß anhäuft.

[0109] Unter den anderen eingesetzten Signalpeptiden findet man jene der Interleukine, jene von bestimmten Membranrezeptoren, jene von durch verschiedene Zellarten sekretierten Wachstumsfaktoren, jene von anderen Proteinen, von denen bekannt ist, dass sie in verschiedenen biologischen Systemen sekretiert werden. Die Liste ist nicht einschränkend.

Beispiel 5: Konstruktion von Rekombinationsvektoren

5.1 Gewinnung der intermediären Elemente

– Kasette pCMV Néo polyA

[0110] Das kommerzielle Plasmid pCI Néo (Promega, Madison, USA) wird durch HindIII-Verdau geöffnet und intramolekular mit sich selbst ligiert, um das Plasmid pCI Néo (Δ HindIII) zu erhalten, das das Gen der Neomycinphosphotransferase unter die direkte Abhängigkeit des CMV-Promotors stellt. Die polyA-Ausgangssequenz wird bewahrt.

– Herstellung der cDNAs von Interesse

[0111] Die cDNAs von Interesse werden hergestellt durch PCR-Amplifizierung mit

- einem Oligonukleotid Sma-3'incDNA S, enthaltend die SmaI-Stelle, den 3'-Abschnitt des künstlichen Introns des kommerziellen Vektors pCINéo und den Beginn der spezifischen 5'-Sequenz der cDNA, wobei das ATG der cDNA ausgelassen wurde, um das Leseraster der cDNA von Interesse im Raster direkt mit jenem des Ovalbumins oder das Lysozyms zu verbinden.
- einem Oligonukleotid cDNA-SmaI AS, enthaltend die SmaI-Stelle und die 3'-Region der cDNA von Interesse, wobei gegebenenfalls ein endogenes polyA ausgelassen wird, die cDNA und das 3'-Oligonukleotid, enthaltend die spezifische Sequenz der cDNA und die SmaI-Stelle

[0112] Das amplifizierte PCR-Fragment wird durch SmaI hydrolysiert (unter der Voraussetzung der Abwesenheit von dieser Stelle in der cDNA) und in die SmaI-Stelle in einem pMOS5-Vektor (Mobictech, Deutschland), in welchen vorab eine polyA-Sequenz von 277 bp in die XbaI/XhoI-Stellen subkloniert worden ist, kloniert. Diese polyA-Sequenz stammt ihrerseits aus einer Hydrolyse des Vektors pIRESHygro (Clontech) durch XbaI/XhoI. Die Orientierung des Fragments wird dann durch einfachen Verdau mit der von der cDNA von Interesse gelieferten Karte kontrolliert. Im Falle des Vorhandenseins einer SmaI-Restriktionsstelle in der cDNA von Interesse wird das amplifizierte PCR-Fragment der Wirkung der T4-DNA-Polymerase unterworfen, um die Enden stumpf zu machen, und direkt in den an der SmaI-Stelle geöffneten Vektor pMCS5 (stumpfes Ende) kloniert.

5.2 Gewinnung der genomischen Fragmente

[0113] Die genomische DNA von 6 bis 9 Tage alten Embryos von verschiedenen Stämmen, darunter der Stamm CNR (Cou Nu Rouge) und der Stamm S86N, wird entweder gemäß einer klassischen Methode mit einem SDS-Proteinase K-Lysepuffer, gefolgt von Extraktionen mit Phenol und Phenol-Chloroform, oder mit Hilfe eines Präparationskits (beispielsweise Promega- oder Qiagen-Kit) extrahiert. Die verschiedenen Protokolle liefern Ausbeuten und Qualitäten von DNA, die mit deren jeweiliger Verwendung bei der Herstellung einer genomischen DNA-Bank und einer Gewinnung von PCR-Fragmenten durch direkte Amplifizierung verträglich sind.

[0114] In dem ersten Falle wird die genomische DNA partiell durch das Enzym Sau3AI verdaut und die erzeugten Enden durch die Klenow-Polymerase in Gegenwart von zwei der vier Nukleotide, die für die Synthese notwendig sind, aufgefüllt. Daraus resultiert eine partielle Auffüllung, um die Bildung von konkateren Inserts zu verhindern. Die so partiell aufgefüllten Inserts werden durch Ligation in den Vektor λ -GEM-12 inseriert. Die aus dieser Vorgehensweise resultierenden Vektoren werden in Kapside von Phagen verpackt. Als Beispiel wurden 3 unabhängige Isolate erzeugt und ihr Titer bestimmt, wobei jedes Isolat auf etwa 3×10^6 pfu/ml titriert wurde. Die Qualität der Bank wurde durch die Untersuchung von einigen zufällig ausgewählten Inserts verifiziert. Mit einer Ovalbumin-Sonde, erhalten durch genomische PCR mit ausgehend von der veröffentlichten Sequenz ausgewählten Oligonukleotiden (Tabelle 3), erlaubt das Screening der Phagen, Inserts zu erhalten, die in pBS SK+-Plasmidvektoren subkloniert werden, um das Plasmid #72 zu erhalten. Diese Inserts, die einer Restriktionskartierung (darunter EcoRI und BamHI) unterworfen worden sind, wurden dann sequenziert. Ein Vergleich zwischen dem veröffentlichten Gen (Ref. J00895 und Tabelle Nr. 3) und den beiden 5'- und 3'-Sequenzabschnitten des Vektors preRH wie auch den Fragmenten des Klons #72 zeigt, dass die Homologien auf der Nukleotidebene extrem hoch sind. Allein zwei Segmente, die sich im Bereich der Introns 6 und 7 befinden, weisen geringfügige Abweichungen, die über einige zehn Nukleotide verteilt sind, auf (Ergebnis nicht gezeigt). Dieser Vergleich zeigt die starke Konservierung von diesem Gen zwischen den analysierten Stämmen.

[0115] In dem zweiten Fall werden verschiedene Oligonukleotide, die ausgehend von der veröffentlichten Sequenz erhalten worden sind (Tabelle 3 oben) eingesetzt, um durch genomische PCR die Fragmente, die die 5'- und 3'-Sequenzabschnitte (-Arme) der Vektoren ergeben, zu erhalten.

[0116] Für den 5'-Sequenzabschnitt des Vektors pOvaRH amplifizieren die Oligonukleotide OvaL 2995S und OvaL 80 AS, die bei -2995 bp bzw. bei +80 bp bezogen auf das ATG des Ovalbumingens gelegen sind, eine Region von 3075 bp, die, wenn sie einer Hydrolyse durch NcoI unterworfen wird, ein Fragment von 2860 bp freisetzt. Parallel dazu wird ausgehend von der Sequenz, die das Signalpeptid des Lysozyms spezifiziert, ein als lyso 1-18 – intron bezeichnetes Fragment durch PCR-Amplifizierung an dem Genort des Lysozyms mit den Oligonukleotiden Lyso 1-18 und GE-IN-AS hergestellt. Dieses letztere Oligonukleotid enthält die 30 bp des künstlichen Introns des Plasmids pCkNéo. Die beiden Fragmente (Ova5' und Lyso1-18 intron) werden unabhängig durch NcoI hydrolysiert, gereinigt, dann zusammen ligiert und die Amplifizierung an dem Ligationsprodukt mit den Oligonukleotiden OvaL 2995S und GE-IN-AS liefert das Fragment Ova5' Lyso 1-18 von 3050 bp. Dieses PCR-Produkt wird mit EcoRI-Adaptoren ligiert, die erlauben, diese Gesamtheit entweder an der EcoRI-Stelle in den Vektor pBSK oder in den durch EcoRV zu stumpfen Enden verdauten Vektor pMCS5 zu klonieren.

[0117] Eine letzte Hydrolyse von diesem Fragment Ova5'Lyso1-18 durch Bst981 und AscI setzt das geschnittene Plasmid und ein kleines Fragment von 220 bp strangaufwärts von dem ova5'-Fragment frei. Diese kleine Deletion erlaubt, zwei Oligonukleotide Ova5'.1S und Ova5'.2S zu gestalten, die später für das Screening der Rekombinationsereignisse eingesetzt werden.

[0118] Das geschnittene Plasmid wird der Wirkung der Klenow-Polymerase unterworfen, um die Enden stumpf zu machen, bevor es mit AscI-Adaptoren ligiert und intramolekular ligiert wird. Daraus resultiert ein Plasmid pOvaLyso, das strangaufwärts von dem Ova5'-Arm eine einmalig vorkommende Stelle, die eine Linearisierung des endgültigen Vektors erlauben wird, enthält.

[0119] Für den 3'-Arm des Vektors pOvaRH liefert die Amplifizierung der strangabwärts zwischen den Positionen +1657 und -7707 bezogen auf das ATG des Ovalbumingens gelegenen Region mit den Oligonukleotiden OvaL 1657S und OvaL7707 AS ein Fragment von einer Größe von 6050 bp. Dieses Fragment wurde in die EcoRV-Stelle von pMCS5 subkloniert, um das Plasmid pMCS5-Ova3' Sinn und pMCS5-Ova3' Antisinn zu erzeugen. Ausgehend von dem Plasmid pMCS5-Ova3' Antisinn erlaubt ein Verdau durch HpaI (stumpfe Enden) und NarI (5'-überhängend), das Fragment von 6 kb zu erhalten, das in pBS-SK an der ApaI- (mit stumpfen Enden versehen) und Accl-Stelle (kompatibel mit NarI) subkloniert wird, um das Plasmid pBS-SK Ova3' zu erhal-

ten.

[0120] Für den 5'-Sequenzabschnitt des Vektors pLyso RH haben die proximalen Amplifizierungen mit den Oligonukleotiden lyso 1789 S und GE-IN-Ceu-AS erlaubt, ein Fragment zu isolieren und dieses direkt nach Behandlung mit T4-DNA-Polymerase und Phosphorylierung durch die Polynukleotidkinase in den kommerziellen Vektor pMCS5, der mit stumpfen Enden an der EcoRV-Stelle geöffnet worden ist, subzuklonieren. Dieses Fragment pLyso 5' enthält die teilweise nicht veröffentlichte 2900 bp lange Sequenz des proximalen Abschnitts des Lysozym-Gens wie auch das Äquivalent der 18 ersten Aminosäuren des Exons 1, welches dem Signalpeptid des Lysozyms entspricht. Dieses Fragment enthält folglich ein Spleiß-Donorstelle wie auch die Sequenz des kleinen künstlichen Introns, einer durch das Oligonukleotid AS hinzugefügten Sequenz, wie zuvor hinsichtlich des 5'-Sequenzabschnitts (-Arms) des Vektors pOva5' beschrieben.

[0121] Für den 3'-Sequenzabschnitt des Vektors pLysoRH haben die distalen Amplifizierungen mit den Oligonukleotiden Lyso 2859S und Lyso 3185 AS erlaubt, ein Fragment von 2150 bp 3' von dem Gen zu isolieren. Diese Oligonukleotide tragen an ihrem Ende SclI- und MluI-Stellen. Dieses einer Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase, einer Phosphorylierung durch die Polynukleotidkinase unterworfenen und direkt in das durch EcoRV mit stumpfen Enden geöffnete Plasmid pMCS5 ligierte Fragment liefert das Plasmid pLyso3'. Die Hydrolyse von diesem Plasmid durch AflII/AvrII, gefolgt von der Wirkung der T4-DNA-Polymerase und einer intramolekularen Ligierung erlaubt, das Plasmid pLyso3' zu erzeugen.

5.3. Konstruktion des pOvaRH-Gerüsts

[0122] Der endgültige Zusammenbau des RH-Vektors durch aufeinanderfolgende Hinzufügungen von verschiedenen Kassetten (Selektionskassette, Insertion der cDNA oder des Gens von Interesse...) erfolgt gemäß verschiedenen Schematas. Es wird ein Schema beschrieben, ohne dass dieses andere Möglichkeiten, die in Abhängigkeit von den in bestimmten cDNAs von Interesse vorhandenen Restriktionsstellen existieren, ausschließen soll. Das Plasmid pCMV NéoOva3' wird durch Ligation des Fragments Ova3', das aus der Reinigung nach Schnitt des Plasmids pOva3' durch BamHI resultiert, mit dem gereinigten und dephosphorylierten Fragment pCMV Néo polyA, erhalten durch BglIII/BamHI-Hydrolyse des Plasmids pCINeo(Δ -hindIII), konstruiert. Es werden gleichfalls einige Modifizierungen des strangabwärts von dem Ova5'lyso-Insert vorhandenen Polyliners vorgenommen, bevor die beiden Fragmente Ova5'lyso und pCMV-Néo-Ova3' in einem Vektor pOvaRH zusammengefügt werden ([Fig. 3](#)). Das NarI/NotI-Fragment, das in pOvaLyso vorhanden ist, wird durch einen NotI-Adaptor ersetzt, um pOvaLyso-NotI zu erhalten, was erlaubt, unter Eliminierung von zahlreichen Stellen die NotI-Stelle als einmalig vorkommende Klonierungsstelle der cDNAs von Interesse zu bewahren. Das Plasmid pOvaLyso-NotI wird anfänglich durch PacI geschnitten, dann mit der T4-DNA-Polymerase behandelt, um die DNA mit stumpfen Enden zu versehen. Die Freisetzung des Inserts OvaLyso-NotI wird dann erhalten durch einen NotI-Schnitt. Das 3 kb-Fragment OvaLyso PacI^F/NotI wird in die KspI-Stelle, welche der Wirkung der T4-DNA-Polymerase unterworfen worden ist, um die Enden stumpf zu machen, und die NotI-Stelle von pCMV-Neo Ova3' kloniert. Diese gerichtete Klonierung erlaubt, den endgültigen Vektor pOvaRH zu erzeugen, der von 5' nach 3' aufweist:

[0123] – die einmalig vorkommende AscI-Stelle, die die Linearisierung des Vektors vor Transfektion erlaubt,
 – den genomischen Sequenzabschnitt Ova5'lyso(1–18)-Beginn Intron,
 – die einmalig vorkommende NotI-Stelle, eine einmalig vorkommende Klonierungsstelle für cDNAs,
 – die Neomycin-Selektionskassette
 – den genomischen Sequenzabschnitt Ova3'.

[0124] Der Vektor pOva RH ist dann einsetzbar, um die verschiedenen cDNAs von Interesse zu inserieren.

5.4 Konstruktion des pLysoRH-Gerüsts

[0125] Das Fragment Lyso 3', erhalten durch die Hydrolyse des Plasmids pLyso3' durch MluI, wird in das Plasmid pLyso5', das zuvor geöffnet und nach Hydrolyse durch MluI dephosphoryliert worden ist, ligiert. Daraus resultiert das Plasmid pLyso5'Lyso3', in welches das gereinigte und dephosphorylierte Fragment pCMV Néo polyA, erhalten durch NotI/MluI-Hydrolyse des intermediären Plasmids pMCS5 CMVNéoPolyA. Diese letztere Subklonierung erfolgt, um die Selektionskassette 5' mit der NotI-Stelle zu flankieren, um diese Stelle für die Klonierung der cDNAs von Interesse zu bewahren. Sie wird durch Insertion des BglIII/BamHI-Fragments des Plasmids pCINéo(Δ -hindIII) in das an der EcoRV-Stelle geöffnete und dephosphorylierte Plasmid pMCS5 erhalten.

- [0126]** Der erhaltene Vektor pLysoRH enthält aufeinanderfolgend von 5' nach 3':
- die einmalig vorkommende AscI-Stelle, die die Linearisierung des Vektors vor einer Transfektion erlaubt,
 - den genomischen Sequenzabschnitt Lyso5' mit dem Signalpeptid 1–18 – Beginn Intron,
 - die einmalig vorkommende NotI-Stelle, eine einmalig vorkommende Klonierungsstelle für cDNAs,
 - die Neomycin-Selektionskassette,
 - den genomischen Sequenzabschnitt Lyso3'.

[0127] Der Vektor pLysoRH ist dann einsetzbar, um die verschiedenen cDNAs von Interesse zu inserieren ([Fig. 4](#)).

5.5 Anwendung für die Expression von verschiedenen Proteinen

[0128] Die cDNAs von verschiedenen Proteinen von Interesse oder Modellproteinen werden in diese Vektoren pOvaRH und pLyso RH inseriert. Nicht erschöpfend besteht die Strategie darin, die cDNA gemäß dem zuvor präsentierten Schema herzustellen und diese in den an der NotI-Stelle geöffneten Vektor zu inserieren. Varianten hinsichtlich der Reihenfolge der Klonierungen der verschiedenen Abschnitte können erforderlich sein. Es erfolgen partielle Sequenzierungen oder Sequenzierungen zur Gänze, um die korrekte Aneinanderreihung der verschiedenen inserierten Elemente zu verifizieren. So wurden als nicht erschöpfende Beispiele Vektoren mit den cDNAs des Erythropoietins pOvaRH Epo, pLysoRH Epo, der beta-Galactosidase pOva RH LacZ, pLysoRH LacZ, des Heliumycins (antibakterielles Peptid pO-varRH Hélio, pLysoRH Hélio) konstruiert. Die [Fig. 5](#) veranschaulicht den pOvaRH LacZ.

[0129] Ein besonderer Fall ist die Anwendung der Vektoren pOvaRH und pLyso RH auf die Herstellung von Molekülen, die ihr eigenes Signalpeptid aufweisen. Die eingesetzte Konstruktionsstrategie unterscheidet sich ein wenig von jenen, die zuvor beschrieben worden sind. Beispielsweise ist die cDNA des Interleukins 11 ein Nukleotidfragment von 1100 bp, das in die EcoRI-Stellen in den Vektor pBS SK subkloniert ist. Wenn es folglich nicht notwendig ist, die cDNA von Interesse mit dem Signalpeptid des Lysozyms zu fusionieren, wird die cDNA direkt im Raster auf der Höhe des ATG des Ovalbumins inseriert, was zu einer Fusion auf der Höhe der zweiten Aminosäure des Interleukins 11 führt. In diesem Beispiel wird die cDNA von IL-11 der Wirkung der Taq-Polymerase in einer PCR-Reaktion in Gegenwart von zwei Sinn- und Antisinn-Oligonukleotiden, die die HindIII- und XbaI-Stellen aufweisen, unterworfen. Dieses Fragment wird so der doppelten HindIII/XbaI-Hydrolyse unterworfen und in den Vektor pMCS5, der seinerseits geöffnet an den HindIII/XbaI-Stellen vorbereitet worden ist nach doppelter Hydrolyse durch diese Enzyme und Dephosphorylierungsbehandlung mit CIAP, ligiert. Aus dieser gerichteten Klonierung resultiert das Plasmid pMCS5-II-11. Dieses Letztere wird dem HpaI/NsiI-Verdau unterworfen, das Fragment wird gereinigt und in das Plasmid pOva5' AS, das seinerseits an der NcoI/PstI-Stelle geöffnet und zu stumpfen Enden durch die Wirkung der Klenow-Polymerase repariert worden ist, ligiert. Daraus resultiert das Plasmid pOva5' IL-11.

[0130] Dieses Plasmid pOva5'-II11 wird dem Verdau durch NotI unterworfen, das Insert wird gereinigt und mit dem Plasmid pCMVNéoOva3', das seinerseits durch NotI hydrolysiert und dephosphoryliert worden ist, ligiert. Daraus resultiert das Plasmid pOvaRH II-11, das gebildet wird aus:

- der NotI-Stelle (Linearisierung des Vektors vor Transfektion)
- dem genomischen Sequenzabschnitt (Arm) Ova5' mit dem ATG des Ovalbumins,
- der cDNA von IL-11 fusioniert mit dem ATG und umfassend ein polyA
- der Selektionskassette, welche das Neomycinresistenzgen unter der Abhängigkeit des CMV-Promotors enthält,
- dem genomischen Sequenzabschnitt (Arm) Ova3'.

[0131] Eine analoge Strategie erlaubt, den Vektor pLysoRH IL-11 in Gegenwart des endogenen Signalpeptids von Lysozym und durch Deletion des Signalpeptids von IL-11 und umgekehrt durch Deletion des endogenen Signalpeptids von Lysozym und Hinzufügen des Signalpeptids von IL-11 zu erhalten.

Beispiel 6: Transfektion von verschiedenen Vogel-Zellen mit den Vektoren

6.1 Transfektionsmethoden

[0132] Es werden zwei allgemeine Transfektionsmethoden eingesetzt: die Elektroporation und die Transfektion durch Liposome. Es scheint, dass in dem Mäuse-System im Allgemeinen die Elektroporation gewählt wird, um die Rekombinationseffizienz der homologen Rekombinationsvektoren zu erhöhen. Gleichwohl sind wenig vergleichende Untersuchungen ausgeführt worden.

– die Elektroporation

[0133] Die Elektroporation ist ein Verfahren, welches erlaubt, eine DNA von sehr variabler Größe in eine Zelle eintreten zu lassen, indem durch einen elektrischen Schlag eine vorübergehende Pore auf der Ebene der Zellmembran erzeugt wird. Unter den verschiedenen Parametern, die die Wirksamkeit dieses Experiments beeinflussen können, kann man die Zellkonzentration (von 1 bis 10×10^6 Zellen), die das Signal leitende Lösung, welche die Mischung von Zellen und DNA enthält (PBS, serumfreies Medium...), die Konzentration von im Allgemeinen linearisierter DNA (von 5 bis 25 μg), den Abstand der Elektroden (Küvetten oder einfache Elektroden direkt in der Kulturschale oder der Kulturvertiefung), die Amplitude des Signals, welche von der angewandten Kapazität (von 10 bis 1000 μF) und der angelegten Spannung (von 5 bis 100 mV für Rechtecksignale und von 200 bis 350 V für die Nicht-Rechtecksignale), die Anzahl von abgegebenen elektrischen Schlägen und die Form von diesem bzw. diesen angewandten elektrischen Schlag bzw. Schlägen aufführen. Unter Form versteht man die Art und Weise, in der ein und dieselbe elektrische Ladung abgegeben wird, insbesondere gemäß einem Rechtecksignal, Nicht-Rechtecksignal, exponentiellen inversen Signal...

[0134] Die Tabelle 5 veranschaulicht einige von diesen Parametern:

Tabelle 5: Elektroporationseffizienz des Plasmids pCINéo in Stammzellen

Kapazität (μF)	25	150	300	500	700	1000
Klone A	5	122	226	335	408	286
Klone B	9	149	297	454	443	361
Klone C	10	180	218	361	402	365
Mittelwert	8	150	247	383	418	337
Standardabweichung	3	29	43	63	22	45

[0135] Die Elektroporation des linearen Plasmids pCINéo erfolgt mit Hilfe eines BioRad-Elektroporationsgeräts (Gene Pulser II). Die dissoziierten, mit einem serumfreien Medium gewaschenen und auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen in 0,8 ml eingestellten Zellen werden in eine Elektroporationsküvette (4 mm-Kammer) gegeben. 5 bis 20 μg linearisiertes Plasmid, hergestellt in TE, werden zu den Zellen hinzugegeben und man lässt die Mischung 5–10 min bei Umgebungstemperatur stehen, dann wird der elektrische Schlag mit einer auf 560 μF festgelegten Kapazität angewendet. Die Zellen werden dann etwa 10 min bei 4°C platziert, dann in Kulturschalen mit Feeder unter den Kulturbedingungen von diesen Zellen ausgesät. Klassischerweise wird das Äquivalent von einer Küvette, d. h. 5×10^6 Zellen, in zwei 100 mm-Kulturschalen verteilt.

[0136] Die Tabelle führt 3 mit 15 μg Plasmid bei 270 V ausgeführte Reihen auf. Die Klone werden nach Selektion mit Neomycin während 7 Tagen (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Fixierung mit Methanol und Anfärbung mit Wright/Giemsa gezählt.

– die Liposome

[0137] Unter Liposomen versteht man ein jegliches chemisches Molekül, welches unter anderem Merkmale von kationischen Lipiden aufweist, allein oder assoziiert mit anderen Elementen. Die Wirksamkeit von verschiedenen Liposomen wurde an verschiedenen Zellarten verglichen. Da die embryonalen Stammzellen fragil sind, ist das Vorhandensein von Serum während der Transfektion ein wichtiger Faktor. Es wurden verschiedene kommerzielle Materialien getestet. Daraus geht hervor, dass die Wirksamkeit und die Toxizität von diesen Komponenten variabel sind (Pain et al., 1999). Außerdem erlaubt das Vorhandensein von Serum, die relativen toxischen Wirkungen der Exposition der Zellen gegenüber den Lipofektionsmaterialien zu verringern und so die Chancen zu bewahren, rekombinante Zellen in einem zufrieden stellenden physiologischen und morphologischen Zustand zu erhalten. Ein Vorteil der Verwendung der Liposome ist unter anderem die geringe Anzahl von Zellen, die pro Versuch eingesetzt werden. Die nachfolgende Tabelle 6 veranschaulicht eine relative Transfektionseffizienz mit einem einfachen Expressionsvektor:

Tabelle 6: Transfektion von verschiedenen Zellarten mit Rekombinationsvektoren

[0138] Die Zellen werden in ihr jeweiliges Medium in einer Dichte von 5×10^5 bis 10^6 Zellen pro 100 mm-Scha-

le für jede Zellart ausgesät. Die Transfektionsmischung, welche von 10,5 µg Liposome/3,5 µg DNA bis 15 µg Liposome/5 µg DNA pro 100 mm-Schale variieren kann, wird je nach Fall 3 bis 15 h auf die Zellen gegeben. Die Selektion mit Neomycin wird mit einer Konzentration von 250 µg/ml angewendet und die Klone erscheinen 5 bis 10 Tage nach der Transfektion. Die Klone werden entnommen und durch PCR analysiert, um die Rekombinationsereignisse nachzuweisen.

[0139] Ein typisches Amplifizierungsbeispiel besteht in einer Klonierung in Vertiefungen einer Platte mit 24 Vertiefungen, in einer Passage in Vertiefungen einer Platte mit 12 Vertiefungen, dann einer Amplifizierung in einer 60 mm- oder 100 mm-Schale. Die auf optimale Weise zwischen der Passage von den Vertiefungen einer Platte mit 24 Vertiefungen zu den Vertiefungen einer Platte mit 12 Vertiefungen ausgeführten Screeningschritte erlauben, die Amplifizierung allein auf die Klone, die durch PCR als positiv nachgewiesen worden sind, zu beschränken. Pro Vertiefung einer Platte mit 6 Vertiefungen erhält man im Allgemeinen 5×10^5 bis 10^6 Zellen. So werden als lebensfähig lediglich die durch PCR als positiv gescreenten Klone eingefroren. Die Amplifizierung für eine Southern-Blot-Analyse betrifft gleichfalls lediglich eine geringe Anzahl von Klonen.

[0140] Die Tabelle fasst verschiedene Beispiele, die mit Zellen unterschiedlicher Natur und mit unterschiedlichen Passagen erhalten worden sind, zusammen. Es ist notwendig, festzustellen, dass die Transfektionseffizienzen und die Rekombinationseffizienz je nach den Vektoren variabel scheinen und für ein und denselben Vektor von der Physiologie (Alter, Zustand...) der eingesetzten Zellen abhängig sein können.

Zellen (Nr. der Passage)	Vektoren	Analysierte Klone	Anhand positiv	von PCR e Klone
		nb	nb	%
LMH (p25)	pOvaRH Hélio	35	1	3,8
HDI 1	pLysoRH GFP	40	1	2,5
HD11	pLysoRH Epo	36	3	8,3
Valo4 (p39)	pOvaRH Hélio	64	1	1,6
Valo4 (p53)	pOvaRH LacZ	28	1	3,6
S86N 48 (p13)	pOvaRH Hélio	48	1	2,1
S86N 16 (p123)	pOvaRH Hélio	264	23	8,7
S86N 16 (p129)	pOvaRH LacZ	168	1	0,6
S86N 16 (p129)	pOvaRH hélio	157	14	8,9
S86N 16 (p137)	pOvaRH Hélio	96	3	3,1
S86N 16 (p140)	pOvaRH LacZ	143	7	4,9
S86N 16 (p203)	pLysoRHx	94	25	26
S86N 45 (p71)	pLysoRHx	94	10	10,4
S86N 45 (p79)	pLysoRH Hélio	96	15	15,6
S86N 88 (p14°)	pOvaRH LacZ	79'	1	1.2
Valo8 (p10)	pOvaRH Hélio	35	1	2.8
Valo8 (p 13)	pOvaRH Hélio	120	3	2.5

6.2 Effizienz hinsichtlich stabilen Transfektionen mit den Rekombinationsvektoren

[0141] Die Effizienz hinsichtlich stabilen Transfektionen wird anhand der Anzahl von Klonen, die nach Selektion durch das Arzneimittel, das durch das in der Selektionskassette vorhandene Gen entgiftet wird, erhalten werden, abgeschätzt. In den berichteten Fällen wird im Allgemeinen Neomycin eingesetzt. Abhängig von dem Vorhandensein eines unterschiedlichen Resistenzgens in dem für die Transfektion eingesetzten Vektor können andere Arzneimittel bzw. Wirkstoffe eingesetzt werden. Unter den klassischen Arzneimitteln findet man Neomycin, Hygromycin, Puromycin, Phleomycin, Zeomycin, Blastidin, Viomycin... Es können andere Selektionsmedien eingesetzt werden, wie das Hinzufügen von Basenanaloga, die klassischen Selektionsmedien, wie das HAT-Medium....

[0142] Die Klone werden am Ende des Selektionszeitraums, welches dem Verschwinden der Zellen in den

Vergleichsschalen des Experiments entspricht, gezählt. Diese Vergleichsproben sind entweder nicht transfizierte Zellen oder mit einem Vektor, der kein Resistenzgen für das eingesetzte Antibiotikum enthält, transfizierte Zellen.

6.3 Eingesetzte Zellen

6.3.1 Embryonale Fibroblasten vom Huhn (CEFs) (Vergleichsbeispiel)

[0143] Die embryonalen Fibroblasten vom Huhn („Chicken Embryonic Fibroblasts“) werden ausgehend von einem Inkulturnehmen von 9 bis 13 Tage bebrüteten Hühnerembryos gemäß einem gut etablierten und den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Protokoll erhalten. Diese primären Zellen werden amplifiziert und während einer wenig bedeutenden Anzahl von Passagen (im Allgemeinen unter 30) in Kultur gehalten, denn die Zellen zeigen schnell (im Allgemeinen ab den Passagen 15 bis 20) eine progressive Phase von Anhalten der Proliferation und einen Eintritt in die Seneszenz, der durch eine geringere Teilungsrate, eine immer weniger fibroblastische zur Schau gestellte Morphologie gekennzeichnet ist. Diese Seneszenzphase führt zu dem Verschwinden der Zellen bis auf sehr seltene Fälle, wo die spontane Etablierung von fibroblastischen Vogel-Zellen und insbesondere von Hühnerzellen beobachtet worden ist (Linie DF-1) (Himly et al., 1998; Kim et al., 2001).

[0144] Die Transfektionen durch die homologen Rekombinationsvektoren erfolgen folglich während früher Passagen (von 1 bis 10), um zugleich die Möglichkeit, die gegenüber der Selektion resistenten Klone zu selektionieren und zu amplifizieren, zu optimieren, aber auch um ein etwaiges karyotypisches Derivat und den schnellen Eintritt in die Seneszenz zu begrenzen. Im Allgemeinen sind die erhaltenen Klone isolierbar, aber nicht oder wenig amplifizierbar. Im Gegenzug können sie als potentielle Quellen für modifizierte Kerne für nukleare Klonierungsexperimente angesehen werden.

6.3.2 Linie LMH (Vergleichsbeispiel)

[0145] Die Zelllinie LMH ist eine Hepatozytenlinie vom Huhn, erhalten durch chemische Kanerzogenese (Kawaguchi et al., 1987). Diese Linie ist auf karyotypischer Ebene charakterisiert worden und weist eine bedeutende Polyploidie auf. Die Zellen werden im Allgemeinen in DMEM oder HamF12 in Gegenwart von 8% fötalem Kälberserum, 2% Hühnerserum, 10% TPB und von Antibiotika gehalten. Diese Zellen weisen einen interessanten dendritischen Zelltyp, der von den Monozytenzellen, Fibroblastenzellen und Stammzellen sehr verschieden ist, auf und weisen eine relative Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Steroidhormonen auf. Die Transfektionen von insbesondere diesen Zellen mit pOvaRH-Rekombinationsvektoren haben erlaubt, Klone und Rekombinationsereignisse zu erhalten. Die Tabelle 6 veranschaulicht die Ergebnisse von diesen Transfektionen.

[0146] 6.3.3 Linie HD11 (Vergleichsbeispiel) Die Zelllinie HD11 ist eine Monozytenlinie vom Huhn, die durch das Vorhandensein des Onkogens v-myc, das durch ein Vogel-Retrovirus hinzugefügt worden ist, unsterblich gemacht worden ist (Beug et al., 1979). Diese Linie ist Produzent von Viren, die das Onkogen propagieren können. Bestimmte Klone könnten gegebenenfalls keine Produzenten sein. Die Zellen werden im Allgemeinen in HamF12-Medium, ergänzt mit 5% fötalem Kälberserum, 2% Hühnerserum, 10% TPB, gehalten. Wie in der Einleitung präzisiert, produzieren die aktivierten Makrophagen Mengen von endogenem Lysozym. Indem sie durch die pLysoRH-Rekombinationsvektoren modifiziert werden, können diese Zellen folglich als Produktionsmodell für das in diesen Vektor inserierte Molekül dienen. Man realisiert so eine „knock in“-Produktionsstrategie. Die Tabelle 6 veranschaulicht vorstehend die Ergebnisse von diesen Transfektionen.

6.3.4 Embryonale Stammzellen

[0147] Die embryonalen Stammzellen vom Huhn, die in den Beispielen eingesetzt werden, sind Stammzellen, die in vivo durch das Inkulturnehmen von Blastodermen vom Huhn erhalten worden sind (Pain et al., 1996; US 6,114,168; WO 96/12793). Die Zellen werden gehalten, in vitro amplifiziert und sind überdies in der Lage, über lange Zeiträume hinweg zu proliferieren. Die Proliferationsprofile weisen im Verlauf der relativen Etablierung der Zellen schnelle und langsamere Proliferationsphasen nach. Diese Besonderheit einer Etablierung ausgehend von einem primären Isolat ist ganz und gar einzigartig für eine Zelle von Vogel-Herkunft, ohne die Intervention eines Immortalisierungsmittels oder eines chemischen Transformationsverfahrens von außen. Man kann so willkürlich die frühen Proliferationsphasen von diesen Zellen, die während der ersten Passagen (von Passage 1 bis Passage 20) beobachtet werden, und die späteren Proliferationsphasen (Passagen >20) unterscheiden. Diese Stammzellen werden mit den verschiedenen Rekombinationsvektoren, die die cDNAs von In-

teresse enthalten, transfiziert.

[0148] Die Tabelle 6 oben und die Tabelle 7 unten veranschaulichen die Ergebnisse, die mit verschiedenen Vektoren erhalten worden sind. Es erweist sich, dass diese Stammzellen an verschiedenen Genorten durch einen Ansatz von homologer Rekombination modifizierbar sind.

Tabelle 7: Transfektion von CECs-Zellen mit verschiedenen einfachen Expressionvektoren

[0149] $0,8 \times 10^6$ S86N16-Zellen in verschiedenen Passagen werden mit 5 µg pCINéo-Vektor mit 15 µg Fugène 6 (Roche) in seiner zirkulären Form transfiziert. Nach Anwendung der Selektion mit Neomycin durch Zugabe von G418 (250 µg/ml) während 5 bis 8 Tagen werden Klone erhalten. Die Schalen werden mit Methanol (100%) fixiert und eine Anfärbung mit Giemsa erlaubt, die Klone schnell zu zählen. Dieses Beispiel zeigt in unabhängigen Versuchen, dass die Zellen stabil mit einfachen Vektoren transfizierbar und selektionierbar sind und dass die Klone amplifiziert werden können. Gleichwohl sind die Niveaus der Expression der Transgene von einem Klon zum anderen sehr variabel, wie man dies leicht sichtbar machen kann, indem beispielsweise die Fluoreszenzintensität des Markers E-GFP ausgewertet wird.

Versuche	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	Standardabweichung
Anzahl von Klonen	75	90	135	124	146	106	113	27

6.4 Physiologischer Zustand der Zellen

[0150] Unter physiologischem Zustand versteht man den Differenzierungs-, Transkriptions- und Aktivierungszustand der eingesetzten Zellen. Da sie im Bereich der durch die einfachen Vektoren und die homologen Rekombinationsvektoren zielgerichtet angesteuerten Genorte modifiziert sind, zeigen die Zellen eine Reaktion auf physiologischer Ebene. Es erweist sich folglich als nützlich, diese abhängig von ihrer zukünftigen Verwendung zu verfolgen, von denen die hauptsächlichsten die folgenden sind:

- die Injektion der modifizierten Zellen in Empfänger-Embryos, um deren Beitrag in den Embryos und später auf der Ebene der Küken und der erwachsenen Tiere zu verfolgen,
- die in vitro-Produktion von Molekülen von Interesse, die in den Vektoren zugeführt werden, durch die modifizierten Zellen insbesondere, aber nicht ausschließlich in dem Falle der LMH- und HD11-Zellen.

6.5 Klonierung und Nachweis der Rekombinationsereignisse

6.5.1 Klonierung

[0151] Die makroskopisch und mikroskopisch beobachteten Klone werden entnommen und direkt in eine Platte mit 24 Vertiefungen gegeben. Es ist wichtig, die Klone so früh wie möglich zu entnehmen, um die Mischungseffekte zwischen Klonen zu begrenzen. Die Herkunft der Klone gemäß den verschiedenen Schalen wird erwähnt, um beispielsweise das Unabhängigkeitsniveau von zwei positiven Klonen zu kontrollieren. Die Proliferationsbedingungen der Klone sind ungefähr die gleichen wie jene, die für die Ausgangszellen eingesetzt wurden.

[0152] Die Klone werden, einmal entnommen, täglich beobachtet und sobald die Dichte der Zellen dies erlaubt, werden die Klone dissoziiert und für eine Analyse amplifiziert.

6.5.2 Screening der Klone durch PCR

[0153] Die Zellen der in Proliferation befindlichen Klone in den Vertiefungen werden gewaschen, dissoziiert und vorbereitet, um einerseits für eine Amplifizierung erneut ausgesät zu werden und andererseits analysiert zu werden. Die DNA wird prinzipiell mit Hilfe von klassischen Techniken, darunter kommerzielle Kits, extrahiert. Es werden verschiedene Nachweise vorgenommen, um die Rekombinationsereignisse zu screenen. Die Entwicklung von PCR-Bedingungen erfolgt für jedes Paar von Oligonukleotiden mit aus transfizierten, selektionierten und nicht individuell klonierten Zellen extrahierter DNA. Dieser „Pool“-Ansatz erlaubt, schnell zu

testendes Material zu erhalten. Allgemein wird eine erste PCR ausgeführt, um den zielgerichtet angesteuerten endogenen Genort nachzuweisen, um sich der Qualität der Extraktionen und der DNA zu versichern. Es wird eine zweite PCR ausgeführt, um ein Rekombinationsereignis zwischen einem bezüglich des Konstrukts externen Oligonukleotid und einer allen Vektoren aus ein und derselben Familie gemeinsamen Sequenz, beispielsweise der Signalpeptidsequenz lyso 1–18, nachzuweisen. Diese PCR wird als unterscheidend für die Rekombinationsereignisse angesehen. An den positiven Klonen in dieser letzteren PCR werden neue Reihen von PCR stets mit dem gleichen externen Oligonukleotid, aber mit einem anderen, für jede cDNA spezifischen Oligonukleotid derart ausgeführt, dass man sich des Vorhandenseins und der allgemeinen fehlenden Modifizierung der inserierten cDNA versichert. Diese PCR wird als unterscheidend angesehen und erlaubt, die Beobachtung der positiven Klone zu verstärken.

[0154] Die [Fig. 6](#) veranschaulicht diesen Nachweis von Klonen durch PCR. Die Hauptanzahl der Klone wird als negativ nachgewiesen, bestimmte werden als positive rekombinierte nachgewiesen. Diese letztere Auslesung erlaubt, lediglich einige wenige Klone zurückzubehalten, die amplifiziert, eingefroren und durch Southern-Blot analysiert werden.

Legenden [Fig. 6](#): Nachweis der positiven rekombinanten Klone durch PCR

[0155] Als Beispiel wird die DNA mit dem Promega-Kit (Madison, WS) extrahiert. Der zelluläre Bodensatz von jedem Klon wird in 300 µl Lysepuffer (Nuclei Lysis Solution, NLS) in Gegenwart von 20 µg/ml RNase wieder aufgenommen. Das Lysat wird homogenisiert, 30 min bei 37°C inkubiert und es werden 100 µl Proteinpräzipitationspuffer (Protein Precipitation solution, PPS) zugesetzt. Das Ganze wird nach kräftigem Mischen bei 4°C inkubiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation abgenommen und 400 µl Isopropanol werden zugesetzt. Nach Präzipitation und Zentrifugation wird der Bodensatz in 70°C Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE (10.1) wieder aufgenommen. Die Volumen können auf proportionale Weise für Extraktionen mit mehr Zellen eingesetzt werden. Die erhaltene DNA-Menge wird durch spektrophotometrische Quantifizierung abgeschätzt. Die Extraktion eines zu einer Vertiefung einer Platte mit 24 Vertiefungen äquivalenten Bodensatzes liefert etwa 0,5 bis 2 µg DNA je nach der Dichte der Zellen in der Vertiefung. Die PCRs werden an etwa 100 bis 500 ng ausgeführt.

- Eine erste PCR wird an 38 Proben (Nr. 1 bis 39) ausgeführt, um den endogenen Ovalbumin-Genort nachzuweisen und sich der Qualität der Extraktionen und der DNAs zu versichern. Diese Reaktion setzt zwei Oligonukleotide ein, was eine amplifizierte Bande mit einer Größe von 2950 bp ergibt (Bahnen 1 bis 39, oberer Abschnitt des Gels).
- Eine zweite PCR wird ausgeführt, um ein Rekombinationsereignis zwischen einem externen Oligonukleotid und der allen Vektoren gemeinsamen Sequenz, hier der Signalpeptidsequenz lyso 1–18, nachzuweisen. Die in diesem Falle erwartete Größe ist 2900 bp (Bahnen 1 bis 39, unterer Abschnitt des Gels).
- M: Größenmarker
- C, Kontroll-DNA (erhalten aus einer Mischung von Klonen),
- Cn, Negativkontrolle der PCR ohne DNA.

[0156] Eine andere PCR wird ausgeführt, um durch Ausschluss das Geschlecht der positiven Klone mit für eine wiederholte Region des Chromosoms W spezifischen Oligonukleotiden zu bestimmen. Nur die weiblichen Klone (ZW) werden nachgewiesen werden können, die männlichen (ZZ) werden dies nicht. Die [Fig. 7](#) veranschaulicht diesen unterscheidenden Nachweis an einigen Klonen.

Legende der [Fig. 7](#). Nachweis des Geschlechts von verschiedenen identifizierten, anhand von PCR positiven Klonen

[0157] Die DNAs von verschiedenen Klonen, die anhand von PCR hinsichtlich eines homologen Rekombinationsereignisses als positiv nachgewiesen worden sind, werden einer genomischen PCR unterworfen, um das Geschlecht der Klone zu bestimmen. Die eingesetzten Oligonukleotide sind spezifisch für das Chromosom W des Huhns. Sie können lediglich weibliche Klone nachweisen. In der Figur sind die Klone hauptsächlich männlich, wie die eingesetzten Zellen (S85N16) mit der Ausnahme des Klons A5-1, der von frühen Zellen einer anderen Herkunft stammt (Zellen S86N 48).

Mit pOvaRH Hélio erhaltene Klone: C10, D21, C44, A5, A21, A5-1

Mit pOvaRH lacZ erhaltene Klone: A 5-2, A25, A28, B28, B36

Ausgangszellen: SN86N 16

Positivkontrolle: DNA aus weiblichem Blut

Negativkontrolle: DNA aus männlichem Blut

M: Marker.

6.5.3 Southern Blot

[0158] Um die Ergebnisse zu verifizieren, die im Rahmen einer genomischen PCR an den positiven Klonen mit den beiden hinsichtlich des Nachweises eines Rekombinationsereignisses unterscheidenden PCRs erhalten worden sind, wird eine Southern-Blot-Analyse mit aus den Klonen extrahierter DNA ausgeführt. Diese Analyse erlaubt zu verifizieren, dass:

die Größen des zielgerichtet angesteuerten Genorts erhalten geblieben sind und dass es keine bedeutendere Deletion gibt,

ein einziges Rekombinationsereignis stattgefunden hat und dass das Genom keine anderen zufälligen Integrationen enthält.

[0159] Die DNA der Klone wird gemäß einer klassischen Methode mit Proteinase K-SDS mit phenolischer Extraktion oder mit Hilfe eines kommerziellen Extraktionskits (Qiagen, Promega) extrahiert. In einem klassischen Ansatz der Molekularbiologie wird eine variable DNA-Menge der Hydrolyse durch verschiedene Enzyme unterworfen, um zu erlauben, die Fragmente ausfindig zu machen, deren Größe abhängig von dem Rekombinationsereignis unterschiedlich ist.

[0160] Die Tabelle 8 veranschaulicht den Nachweis der Rekombinationsereignisse durch Southern-Blot abhängig von den verschiedenen eingesetzten Sonden.

Tabelle 8: Nachweis von Rekombinationsereignissen durch Southern-Blot

[0161] Die hydrolysierten DNAs werden einer elektrophoretischen Wanderung, die die Fragmente nach ihrer Größe auftrennt, unterworfen. Es wird das klassische Southern-Blot-Verfahren angewendet mit einem Transfer auf eine Hybond N+-Membran (Amersham Pharmacia biotech, Vereinigtes Königreich). Die für die Hybridisierung eingesetzten Sonden werden entweder durch PCR oder durch Reinigung eines Plasmidfragments, das die verschiedenen Gene von Interesse enthält, erhalten. Als Beispiel werden die Sonden lacZ (1159 bp) und Néo (354 bp) durch PCR ausgehend von Plasmid-Matrix erhalten. Die Sonde Ovalbumin 3' ist eine Intron-Sonde von 800 bp, erhalten ausgehend von genomischer DNA. Die Sonde Ovalbumin 5' ist eine Intron-Sonde von 870 bp. Diese Sonden werden durch PCR erhalten.

[0162] Die gereinigten Sonden werden mit alkalischer Phosphatase mit Hilfe des Kits AlkPhos (Amersham Pharmacia Biotech, Vereinigtes Königreich) markiert und können mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Für den Nachweis werden die Membranen unter Bewegung in einer Menge von 1 ml/cm^2 in einem Hybridisierungspuffer vorhybridisiert und dann bei 55°C durch Zugabe der markierten Sonde (5 ng/ml) hybridisiert. Die Membranen werden dann bei 65°C in dem primären Puffer, der 2 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 50 mM Na-Phosphat, 1 mM MgCl_2 , $0,1\%$ SDS und $0,2\%$ „blocking agent“, das durch den Kit bereitgestellt wird, enthält, dann in dem sekundären Puffer, welcher 50 mM Tris-HCl, pH 10,0, 100 mM NaCl enthält, bei Umgebungstemperatur gewaschen.

[0163] Das einsatzfertige Sichtbarmachungssystem durch Chemolumineszenz wird zu der gewaschenen Membran hinzugesetzt (1 ml/cm^2) und die Intensität der Banden wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Größe der nachgewiesenen Banden wird mit der erwarteten Größe verglichen.

[0164] Das Kriterium, um die Klone beizubehalten, ist eine gute Entsprechung zwischen der erwarteten Größe und jener, die beobachtet wird. Es wurden ergänzende Hybridisierungen ausgeführt (Ergebnis nicht gezeigt).

Verdau	BamHI		ScaI	
	-RH	RH Hélio	-RH	RH Hélio
Ovalbumin 3'	18,5 kb	7 kb	12 kb	12,7 kb
Ovalbumin 5'	18,5	9,5	12	12,7
Neomycin	/	2	/	12

[0165] Die Fig. 8 veranschaulicht diese Analyse abhängig von den erwarteten Größen.

6.6 Charakterisierung der Klone

[0166] Die verschiedenen Kriterien, die eingesetzt wurden, um die Ausgangszellen zu charakterisieren, wer-

den eingesetzt, um die klonierten Zellen zu charakterisieren.

6.6.1 Verifizierung des Karyotyps

[0167] Der Karyotyp der Zellen wird an den Metaphasen der Zellen, die gemäß einem klassischen Protokoll nach einer Behandlung der in Proliferation befindlichen Zellen mit Colcemid (Puls von einigen Stunden mit 0,05 bis 0,15 µg/ml Endkonzentration, vorzugsweise 0,08 µg/ml) erhalten worden sind, analysiert. Die ausgebreiteten Metaphasen werden unter dem Mikroskop beobachtet und die Anzahl von Makrochromosomen gezählt. Die Zählung der Minichromosome ist machbar, aber delikater und eine detailliertere Auswertung durch in situ-Hybridisierung kann gleichfalls ins Auge gefasst werden. Außerdem unterstützt die Verifizierung des Vorhandenseins des Transgens durch FISH (in situ-Hybridisierung mit einer fluoreszierenden Sonde) die durch Southern-Blot vorgenommenen Beobachtungen, was die Einmaligkeit des Ereignisses angeht.

6.6.2 Endogene alkalische Phosphatase-Aktivität

[0168] Der erste eingesetzte immunzytochemische Test ist der Nachweis der endogenen alkalische Phosphatase-Aktivität. Alle in der PCR positiven und durch Southern-Blot Analyse validierten Klone werden im Vergleich zu den Ausgangszellen untersucht.

6.6.3 Oberflächenantikörper

[0169] Wenn die Ausgangszellen positiv sind, wird das Vorhandensein der für Stammzellen spezifischen Oberflächenantigene gleichfalls auf der Ebene der erhaltenen rekombinierten Klone untersucht. Die Reaktionen mit den Antikörpern SSEA-1, TEC-01 und EMA-1 werden systematisch ausgeführt.

6.6.4 Telomerase-Aktivität

[0170] Die Telomerase-Aktivität erweist sich als eines der guten Kriterien, um den undifferenzierten Zustand von Stammzellen zu beurteilen. Auch wird wie bei den Ausgangszellen die Telomerase-Aktivität der verschiedenen rekombinierten Klone analysiert. Während der Passage der Klone zu deren Amplifizierung und Einfrieren wird ein kleines Aliquot von 5×10^3 bis 5×10^5 Zellen in Form von zellulärem Bodensatz hergestellt und die Telomerase-Aktivität von diesen Zellen wird mit Hilfe des Kits „Telo TAGGGTélomerase PCR Elisa“ (Roche) ausgewertet. Das Niveau der Telomerase-Aktivität scheint eine gute Widerspiegelung der Qualität der Klone insbesondere nach dem durch das Arzneimittel ausgeübten Selektionsdruck zu sein.

[0171] Die nachfolgende Tabelle 9 veranschaulicht einige von diesen Eigenschaften an rekombinierten Klonen:

Tabelle 9: Charakterisierung von pOvaRH Hélio-Klonen, die aus dem Screening durch PCR hervorgegangen sind

Zellen	AP-Nachweis*		Antikörper TEC01 (%)		Antikörper EMA-1 (%)		Telomerase (Leerwert = 0,07)	
	-RA	+RA	-RA	+RA	-RA	+RA	-RA	+RA
S86N16*	++++	-	90	< 10	90	10	> 1,5	< 0,2
C10	+++	-	70	< 10	90	< 10	1,23	0,282
C44	+++	-	70	< 10	90	< 10	1,13	0,20
D21	+++	-	90	< 10	90	< 10	1,04	0,15
A5-1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1,08	0,257
A21	+++	+	NT	NT	NT	NT	1,13	0,62
A 37	+++	+/-	NT	NT	NT	NT	1,09	0,566

[0172] Die Zellen werden in Vertiefungen einer Platte mit 12 Vertiefungen zu im Mittel 10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die verschiedenen Charakterisierungen erfolgen nach Fixierung im Falle des AP- und Antikörper-Nachweises und an trockenem Bodensatz, der gemäß dem in dem Roche-Kit etablierten Protokoll lysiert wird, in dem Falle der Telomerase-Aktivität (NT = nicht getestet).

Schlussfolgerung: die Klone sind in ihrer Gänze den Ausgangszellen (*S86N16) ähnlich, was die verschiede-

nen Marker, die eingesetzt wurden, um den Zustand der Zellen zu charakterisieren, angeht.

6.7 Allelkonservierung

[0173] Die erhaltenen und nach PCR- und Southern-Blot-Analyse selektierten Klone sind a priori auf einem einzigen Allel modifiziert (Nachweis des wilden Allels im Rahmen einer Southern-Blot-Analyse). Die Gewinnung von zwei modifizierten Allelen kann in vivo und in vitro ausgeführt werden. In vivo werden die hinsichtlich der Modifizierung homozygoten Tiere erhalten nach Kreuzung der heterozygoten Tiere, die ihrerseits von chimären Tieren, die direkt nach Injektion der modifizierten Zellen erhalten werden, abstammen. In vitro ist die Allelkonservierung des zweiten, noch nicht modifizierten Allels insbesondere möglich durch die Anwendung einer Selektion mit hohen Dosen des Arzneimittels G418 (0,5 bis 5 mg/ml) an den Klonen. Dieser Ansatz erlaubt, interessante Mengen von Proteinen zugleich in vitro als auch in vivo zu erhalten.

Beispiel 7: In vitro-Test der Rekombinationsvektoren hinsichtlich der Produktion der Proteine von Interesse

[0174] Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Moleküle in der physiologischen Flüssigkeit des Tiers, insbesondere im Blut und Eiweiß, zu produzieren. Um diesen Ansatz zu realisieren, werden die Vektoren, insbesondere die homologen Rekombinationsvektoren gemäß den zuvor beschriebenen Schemata konstruiert. Diese Rekombinationsvektoren steuern zielgerichtet verschiedenen Genorte, darunter hauptsächlich den Genort des Ovalbumins und jenen des Lysozyms an. Ein wichtiger Punkt ist die Validierung dieser Vektoren durch einen in vitro-Ansatz. Insbesondere ist es wichtig, die Faltung des herzustellenden Proteins, die in vitro in einem Vogel-System erhaltenen posttranslationalen Modifizierungen und den Einfluss des homozygoten Zustands des modifizierten Genorts auf die Expression des Moleküls von Interesse zu verfolgen. Die Sekretionsstrategien werden gleichfalls über ein in vitro-Modell mit je nach Konstrukt unterschiedlichen Signalpeptiden und Spleißstrategien untersucht.

[0175] Es wurden zwei komplementäre Systeme entwickelt, um jede der hauptsächlichsten Klassen von Vektoren zu untersuchen.

7.1 In vitro-Differenzierung der rekombinierten Klone

[0176] In einem ersten Ansatz kann die in vitro-Differenzierung der Klone von Stammzellen mit Erfolg eingesetzt werden, um die Produktion der Moleküle im Überstand der Kulturen zu verfolgen. Die eingesetzten Bedingungen von Medien sind auf die Bildung von „embryoid bodies“ gerichtet, die der Anwesenheit von verschiedenen Mitteln, wie Induktoren, wie beispielsweise Dimethylsulfoxid, Retinsäure, TPA, PMA, LIPS, Faktoren, wie beispielsweise FGF, TGF β , MCSF, cMGF, Hormonen, wie Steroiden, Östradiol, Dexamethason, Progesteron oder anderen Familien von Hormonen, ausgesetzt werden.

7.2 Stimulation der Zellen in rekombinierten Linien

7.2.1 Validierung der pOvaRH-Vektoren

[0177] Die LMH-Zellen sind Vogel-Zellen, die von einem hepatischen Tumor stammen. Nach einigen Beispielen, die der Literatur entnommen werden können, scheint das Gen des Ovalbumins in der LMH-Linie gemäß unterschiedlichen hormonalen Stimulationsbedingungen aktivierbar zu sein. Insbesondere erlaubt eine Kombination von Insulin, Östradiol und Dexamethason (Steroid, welches die Wirkung der Glucocorticoide nachahmt) eine mehr oder weniger bedeutende Induktion des Gens des Ovalbumins. Diese Stimulation kann an den rekombinierten Klonen der LMH-Zellen eingesetzt werden. Cotransfektionen mit den nukleären Rezeptoren ER und COU1 werden gleichfalls ins Auge gefasst, um die Konzentration von diesen Rezeptoren in den Zellen zu erhöhen und so eine bessere Induktion des Gens des Ovalbumins unter der Wirkung der verschiedenen eingesetzten Induktoren zu erlauben. Die Vektoren der Familie pOvaRH werden in diesem Ansatz bevorzugt eingesetzt.

7.2.2 Validierung der pLysoRH-Vektoren

[0178] Es erscheint möglich, die Differenzierung der HD11-Linie, einer Linie von Monozyten vom Huhn, zu Makrophagenzellen durch verschiedene Behandlungen, darunter eine Wirkung durch die Lipopolysaccharide, zu induzieren (Goethe et al., 1994; Goethe und Phi-Van, 1998). In einem Ansatz einer Stimulation durch diese Substanzen wird der Überstand der insbesondere mit den Vektoren aus der Familie pLysoRH rekombinierten Klone untersucht und erlaubt, bedeutende Mengen von Proteinen von Interesse zu erhalten.

[0179] Die nachfolgende Tabelle 10 veranschaulicht diese Produktion von Molekülen von Interesse ausgehend von mit einem der Vektoren aus der pLysoRH-Familie rekombinierten HD11-Zellen spezifisch unter der Wirkung von Induktor, darunter den LPS.

Tabelle 10: Stimulation von mit dem Vektor pLysoRH Epo transfizierten HD11-Zellen

[0180] Die HD11-Zellen werden transfiziert und rekombinierte Klone mit dem Vektor pLysoRH Epo erhalten. An den durch LPS (5 µg/ml) stimulierten Klonen werden zwei Analysen ausgeführt:

A: eine RT-PCR-Reaktion, um die mRNAs des endogenen Lysozyms in den induzierten nicht-transfizierten Zellen und die mRNAs des Erythropoietins in den rekombinierten Zellklonen nachzuweisen.

B: ein Nachweis durch Elisa-Reaktion (Kit Roche) des Überstands der stimulierten oder nicht stimulierten Klone erlaubt, das Vorhandensein von Erythropoetin zu titrieren

		O. D. bei 450	Konzentration
Standard	S1	0	0
	S2	0,12	11
	S3	0,26	20
	S4	0,46	41
	S5	0,86	86
	S6	2,00	179
Positive Kontrolle		0,79	71,4
Negative Kontrolle		0,09	1,2
HD11-Ausgangszellen	-LPS	0	<0,5
Nicht-rekombinierte Klone	+LPS	0	<0,5
Klon 1 pLysoRH Epo	-LPS	0,67	61,3
	+LPS	2,22	199

Schlussfolgerung: der Klon 1 produziert große Mengen von Erythropoietin im Kulturüberstand.

Beispiel 8: Injektion von modifizierten Zellen in Empfänger-Embryos und Gewinnung von Tieren

[0181] Die Klone von modifizierten Stammzellen werden mit Hilfe der verschiedenen zuvor beschriebenen Immunzytochemie-Marker wie die Ausgangszellen charakterisiert. Am Ende von diesen Kontrollen werden bestimmte Klone eingesetzt, um modifizierte Tiere zu erzeugen, die dazu bestimmt sind, das Molekül von Interesse zu produzieren. Unter den verschiedenen Strategien, die eingesetzt werden, um diese Tiere zu produzieren, kann man unterscheiden:

8.1 Intrablastodermale Injektion

[0182] Die modifizierten Zellen werden in die Keimhöhle eines Empfänger-Embryos im Blastula-Stadium gemäß einem zuvor beschriebenen Protokoll (Pain et al., 1996. U.S.-Patente 6,114,168; WO 96/12793) injiziert. Die im Rahmen dieses Ansatzes eingesetzten Embryos sind nicht bebrütet oder gerade bebrütet. Die Zellen werden an der Besiedlung der Embryos teilnehmen. Verschiedene ergänzende Methoden erlauben, das Ausmaß an Beteiligung der injizierten Zellen auszuwerten; beispielsweise basiert eine Methode auf einem phänotypischen Unterschied zwischen einem nicht-pigmentierten weißen Empfänger-Stamm und einem gefärbten Donor-Stamm (von dem die eingesetzten Zellen stammen). Eine andere Methode ist das Verfolgen des Vorhandenseins des Transgens durch genomische PCR mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden.

[0183] Die [Fig. 9](#) veranschaulicht den phänotypischen Beitrag eines mit einem einfachen Expressionsvektor modifizierten Klons (Vergleichsbeispiel).

Legende der [Fig. 9](#): Gewinnung von Chimären mit den modifizierten Klonen

[0184] Mit durch den einfachen Vektor pEGFP-SV40 Néo modifizierten Zellen erhaltene Chimäre.

[0185] Die auf biastodermalem Wege injizierten Eier werden in verschiedenen Stadien geöffnet und die Embryos entnommen, um analysiert zu werden. Die extrahierte DNA wird einer genomischen PCR-Reaktion mit verschiedenen Oligonukleotiden unterzogen, um das Vorhandensein des Transgens (hier E-GFP) nachzuweisen. Der obere Abschnitt des Gels zeigt so 21 analysierte Proben, darunter unter den 15 analysierten injizierten Embryos **11** positiv detektierte. Der untere Abschnitt zeigt die Analyse, die mit einem anderen Paar von Oligonukleotiden, welches erlaubt, die Qualität der DNA und der Extraktion zu validieren, ausgeführt worden ist. Schlussfolgerung: die durch einen einfachen Expressionsvektor modifizierten embryonalen Zellen können zu den Embryos auf wirksame Weise beitragen und diese besiedeln.

[0186] Die nachfolgende Tabelle 11 veranschaulicht die Gewinnung von Chimären mit einem rekombinierten Klon.

Tabelle 11: Verschiedene phänotypische Chimäre, die mit einem durch den Vektor pOvaRH Hélio rekombinierten Klon, injiziert auf intra-blastodermalem Wege, erhalten werden. Das offensichtliche Ausmaß des chimären Charakters ist variabel.

Injizierte Zellen	Vektor	Lebende Tiere	Chimäre (%)
S86N 66(p5)*	x	13	1 (8%)
S86N 48 Klon A5	pOvaRH Hélio	37	1 (3%)
S86N 48 Klon A5	pOvaRH hélio	43	3 (7%)**

* Nicht-modifizierte Zellen zur Kontrolle

** 6 andere chimäre Tiere wurden im embryonalen Zustand erhalten.

[0187] Die DNA der lebenden chimären Tiere wurde aus einer Gefiederbiopsie extrahiert und ein PCR-Nachweis bestätigt das Vorhandensein des Transgens in den Proben (Ergebnis nicht gezeigt).

8.2. Intrakardiale Injektion

[0188] Die modifizierten Zellen werden in den Blutkreislauf eines Embryos mit 48 bis 72 h Bebrütung über den intrakardialen Weg injiziert. In diesem Entwicklungsstadium erlaubt die Morphogenese des Embryos eine bedeutende Zugänglichkeit der in Bildung befindlichen Herzhöhle. Mit Hilfe von feinen Kapillaren werden die Zellen direkt injiziert. Die Entwicklung geht normalerweise ihren Gang bis zum Schlüpfen.

[0189] Die nachfolgende Tabelle 12 veranschaulicht den phänotypischen Beitrag von modifizierten Klonen in den Geweben von Embryos durch intrakardiale Injektion.

Tabelle 12: Gewinnung von phänotypischen Chimären durch intrakardiale Infektion

[0190] Die Zellen eines mit einem einfachen Vektor modifizierten Klons (in dem Beispiel wird der Klon 14A mit dem Vektor pWS65, welcher pCMV E-GFP SV40 Néo enthält, erhalten) oder eines mit einem Rekombinationsvektor modifizierten Klons werden intrakardial direkt in den Blutkreislauf eines einige Stunden (36 bis 72 h) bebrüteten Embryos injiziert. In dem Beispiel werden die Gewebe je nach Fall Embryos von 5 bis 21 Tage entnommen. Eine genomische PCR erlaubt, das Vorhandensein des Transgens nachzuweisen, wohingegen eine andere PCR an einem endogenen Gen die Qualität der analysierten DNA validiert.

Zellen	Embryos mit Injektion	Analysierte Embryos	Positive Embryos	%
Bsp. 1	40	16	2	12,5
Bsp. 2	40	18	3	16,7
Bsp. 3*	50	14	2	14,3
Bsp. 4*	50	18	2	11,1
Bsp. 5*	50	22	1	4,5

* Verschiedene Gewebe werden Küken beim Schlüpfen entnommen und analysiert. Die PCR-Nachweise sind im Allgemeinen an mehreren unterschiedlichen Geweben positiv.

8.3 Verwendung der modifizierten Kerne als Quelle für Kerne in einem nukleären Transferverfahren (Vergleichsbeispiel)

[0191] Die modifizierten Zellen sind Quellen für modifizierte Kerne, die im Rahmen von nukleären Transfer-techniken in eine Empfänger-Oocyte eingesetzt werden können, um einen Embryo zu rekonstituieren. In diesem Falle trägt das Tier in seinem genetischen Erbgut direkt die durch den Kern beigetragene Modifizierung und diese wird folglich an alle seine Nachkommen weitergegeben. Die aktuellen Fusionstechniken der Zelle und/oder allein des Kerns mit der vorbereiteten Oocyte erlauben, einen solchen Ansatz ins Auge zu fassen. Die Aktivierungsphasen erlauben dann eine wirksame Reprogrammierung des Donor-Kerns anstelle des haploiden Genmaterials der Empfänger-Oocyte.

REFERENZEN

- Ahne, B. and W. H. Stratling (1994). Characterization of a myeloid-specific enhancer of the chicken lysozyme gene. Major role for an Ets transcription factor-binding site. *J Biol Chem* 269: 17794–17801.
- Altschmied, J., M. Muller, et al. (1989). Cooperative interaction of chicken lysozyme enhancer sub-domains partially overlapping with a steroid receptor binding site. *Nucleic Acids Res* 17: 4975–4991.
- Mao, Y., E. Yamamoto, et al. (1996a). Steroid hormone-induced expression of the chicken ovalbumin gene and the levels of nuclear steroid hormone receptors in chick oviduct. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 493–495.
- Arao, Y., N. Miyatake, et al. (1996b). Steroid hormones differentially induce transcription of the chicken ovalbumin gene, but stabilize the mRNA with the same half-life. *J. Biochem* 120: 710–715.
- Arnold, R., M. Burcin, et al. (1996). DNA bending by the silencer protein NeP1 is modulated by TR and RXR. *Nucleic Acids Res* 24: 2640–2647.
- Baba TW et al. (1988). Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144: 139–151.
- Baldacci, P., A. Royal, et al. (1981). DNA organisation in the chicken lysozyme gene region. *Nucleic Acids Res* 9: 3575–3588.
- Baniahmad, A., C. Steiner, et al. (1990). Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 61: 505–514.
- Baniahmad, A., M. Muller, et al. (1987). Activity of two different silencer elements of the chicken lysozyme gene can be compensated by enhancer elements. *Embo J.* 6: 2297–2303.
- Bell, D. W., D. C. Wahrer, et al. (1999). Common nonsense mutations in RAD52. *Cancer Res* 59: 3883–3888.
- Bellard, M., G. Dretzen, et al. (1982). Disruption of the typical chromatin structure in a 2500 base-pair region at the 5' end of the actively transcribed ovalbumin gene. *Embo J* 1: 223–230.
- Bellard, M., G. Dretzen, et al. (1986). Hormonally induced alterations of chromatin structure in the polyadenylation and transcription termination region of the chicken ovalbumin gene. *Embo J* 5: 567–574.
- Berinstein, N., N. Pennell, et al. (1992). Gene replacement with one-sided homologous recombination. *Mol Cell Biol* 12: 360–367.
- Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T. (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 18: 375–390.
- Bezzubova, O. Y. and J. M. Buerstedde (1994). Gene conversion in the chicken immunoglobulin locus: a paradigm of homologous recombination in higher eukaryotes. *Experientia* 50: 270–276.
- Bezzubova, O., A. Shinohara, et al. (1993). A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res* 21: 1577–1580.
- Bezzubova, O., A. Silbergleit, et al. (1997). Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell* 89: 185–193.

- Bhat, M. K., K. Ashizawa, et al. (1994). Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7927–7931.
- Bibikova, M., D. Carroll, et al. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21: 289–297.
- Bonifer, C., U. Jagle, et al. (1997). The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eukaryotic gene loci. *J Biol Chem* 272: 26075–26078.
- Brenneman, M., F. S. Gimble, et al. (1996). Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in human cells by electroporation with site-specific endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3608–3612.
- Buerstedde JM and Takeda S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67: 179–188.
- Buerstedde JM et al. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *Embo J* 9: 921–927.
- Burcin, M., R. Arnold, et al. (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. *Mol Cell Biol* 17: 1281–1288.
- Ciejek, E. M., M. J. Tsai, et al. (1983). Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature* 306: 607–609.
- Cochet, M., F. Perrin, et al. (1979). Cloning of an almost full-length chicken conalbumin double-stranded cDNA. *Nucleic Acids Res* 6: 2435–2452.
- Cohen-Tannoudji, M., S. Robin, et al. (1998). I-SceI-induced gene replacement at a natural locus in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 18: 1444–1448.
- Darling, D. S., R. L. Carter, et al. (1993). Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268: 10221–10227.
- Dean, D. C., B. J. Knoll, et al. (1983). A 5'-flanking sequence essential for progesterone regulation of an ovalbumin fusion gene. *Nature* 305: 551–554.
- Dean, D. C., R. Gope, et al. (1984). A similar 5'-flanking region is required for estrogen and progesterone induction of ovalbumin gene expression. *J Biol Chem* 259: 9967–9970.
- Dean, D. M., P. S. Jones, et al. (1996). Regulation of the chicken ovalbumin gene by estrogen and corticosterone requires a novel DNA element that binds a labile protein, Chirp-1. *Mol Cell Biol* 16: 2015–2024.
- Dean, D. M., R. R. Berger, et al. (1998). A winged-helix family member is involved in a steroid hormone-triggered regulatory circuit. *Endocrinology* 139: 4967–4975.
- Dean, D. M., Jones, P. S. et al. (2001). Alterations in chromatin structure are implicated in the activation of the steroid hormone response unit of the ovalbumin gene. *DNA & Cell Biology* 20: 27–39.
- Dierich, A., M. P. Gaub, et al. (1987). Cell-specificity of the chicken ovalbumin and conalbumin promoters. *Embo J* 6: 2305–2312.
- Dolle, A. and W. H. Stratling (1990). Genomic footprinting of proteins interacting with the chicken lysozyme promoter. *Gene* 95: 187–193.
- Dominguez-Steglich, M., J. M. Jeltsch, et al. (1992). In situ mapping of the chicken progesterone receptor gene and the ovalbumin gene. *Genomics* 13: 1343–1344.
- Donoho, G., M. Jasin, et al. (1998). Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 18: 4070–4078.
- Dronkert, M. L., H. B. Beverloo, et al. (2000). Mouse RAD54 affects DNA doublestrand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 20: 3147–3156.
- Elliott, B. and M. Jasin (2001). Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 2671–2682.
- Essers, J., R. W. Hendriks, et al. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* 89: 195–204.
- Evans, M. I. and G. S. McKnight (1984). Regulation of the ovalbumin gene: effects of insulin, adenosine 3',5'-monophosphate, and estrogen. *Endocrinology* 115: 368–377.
- Faust, N., C. Bonifer, et al. (1999). Differential activity of the –2.7 kb chicken lysozyme enhancer in macrophages of different ontogenic origins is regulated by C/EBP and PU.1 transcription factors. *DNA Cell Biol* 18: 631–642.
- Fritton, H. P., A. E. Sippel, et al. (1983). Nuclease-hypersensitive sites in the chromatin domain of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res* 11: 3467–3485.
- Fritton, H. P., T. Igo-Kemenes, et al. (1987). DNase I-hypersensitive sites in the chromatin structure of the lysozyme gene in steroid hormone target and non-target cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* 368: 111–119.
- Fujitani, Y., K. Yamamoto, et al. (1995). Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length. *Genetics* 140: 797–809.
- Gannon, F., K. O'Hare, et al. (1979). Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature* 278: 428–434.

- Goethe, R. and P. V. Loc (1994). The far upstream chicken lysozyme enhancer at -6.1 kilobase, by interacting with NF-M, mediates lipopolysaccharide-induced expression of the chicken lysozyme gene in chicken myelomonocytic cells. *J Biol Chem* 269: 31302-31309.
- Goethe, R. and L. Phi-van (1998). Posttranscriptional lipopolysaccharide regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11 cells. *J Immunol* 160: 4970-4978.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547-5551.
- Grajer, K. H., A. Horlein, et al. (1993). Hepatic nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) is expressed in the oviduct of hens and interacts with regulatory elements of the lysozyme gene. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374: 319-326.
- Grewal, T., M. Theisen, et al. (1992). The -6.1-kilobase chicken lysozyme enhancer is a multifactorial complex containing several cell-type-specific elements. *Mol Cell Biol* 12: 2339-2350.
- Haecker, S. A., T. Muramatsu, et al. (1995). Repression of the ovalbumin gene involves multiple negative elements including a ubiquitous transcriptional silencer. *Mol Endocrinol* 9: 1113-1126.
- Hasty, P., M. Crist, et al. (1994). Efficiency of insertion versus replacement vector targeting varies at different chromosomal loci. *Mol Cell Biol* 14: 8385-8890.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* 11: 5586-5591.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1992). The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 12: 2464-2474.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1995). Gene conversion during vector insertion in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 23: 2058-2064.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, et al. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11: 4509-4517.
- Hecht, A., A. Berkenstam, et al. (1988). A progesterone responsive element maps to the far upstream steroid dependent DNase hypersensitive site of chicken lysozyme chromatin. *Embo J* 7: 2063-2073.
- Himly M, DN Foster et al. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248: 295-304.
- Huber, M. C., T. Graf, et al. (1995). Dynamic changes in the chromatin of the chicken lysozyme gene domain during differentiation of multipotent progenitors to macrophages. *DNA Cell Biol* 14: 397-402.
- Hwung, Y. P., D. T. Crowe, et al. (1988a). The COUP transcription factor binds to an upstream promoter element of the rat insulin II gene. *Mol Cell Biol* 8: 2070-2077.
- Hwung, Y. P., L. H. Wang, et al. (1988b). Differential binding of the chicken ovalbumin upstream promoter (COUP) transcription factor to two different promoters. *J Biol Chem* 263: 13470-13474.
- Indra A. K., Warot X. Et al., (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 27: 4324-4327.
- Ivanov, E. L. and J. E. Haber (1997). DNA repair: RAD alert. *Curr Biol* 7: R492-495.
- Jantzen, K., H. P. Fritton, et al. (1986). The DNase I sensitive domain of the chicken lysozyme gene spans 24 kb. *Nucleic Acids Res* 14: 6085-6099.
- Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* 12: 224-228.
- Jeltsch, J. M. and P. Chambon (1982). The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA. *Eur J Biochem* 122: 291-295.
- Jeltsch, J. M., R. Hen, et al. (1987). Sequence of the chicken ovotransferrin gene. *Nucleic Acids Res* 15: 7643-7645.
- Kato, S., L. Tora, et al. (1992). A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 68: 731-742.
- Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. (1987). Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res*. 47: 4460-4463.
- Kida, S., Y. Miura, et al. (1995). Effects of insulin-like growth factor-I, estrogen, glucocorticoid, and transferrin on the mRNA contents of ovalbumin and conalbumin in primary cultures of quail (*Coturnix coturnix japonica*) oviduct cells. *Corp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 110: 157-164.
- Kim S et al. (1990). Ongoing diversification of the rearranged immunoglobulin lightchain gene in a bursal lymphoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3224-3231.
- Kim H., You S. et al. (2001). Increased mitochondrial-encoded gene transcription in immortal DF-1 cells. *Exp Cell Res* 265: 339-347.
- Kimura, A., A. Nishiyori, et al. (1993). Chicken ovalbumin upstream promotertranscription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *J Biol Chem* 268: 11125-11133.
- Klinge, C. M., B. F. Silver, et al. (1997). Chicken ovalbumin upstream promotertranscription factor interacts with

- estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression. *J Biol Chem* 272: 31465–31474.
- Knoll, B. J., T. Zarucki-Schulz, et al. (1983). Definition of the ovalbumin gene promoter by transfer of an oval-globin fusion gene into cultured cells. *Nucleic Acids Res* 11: 6733–6754.
- Kohne, A. C., A. Baniahmad, et al. (1993). NeP1. A ubiquitous transcription factor synergizes with v-ERBA in transcriptional silencing. *J Mol Biol* 232: 747–755.
- Kontaraki, J., H. H. Chef, et al. (2000). Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before transactivator binding and gene expression. *Genes Dev* 14: 2106–2122.
- Kumar, S. and J. P. Simon (1993). The effects of terminal heterologies on gene targeting by insertion vectors in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 21: 1541–1548.
- Leblanc P., Dastugue B. et al. (1999). The integration machinery of ZAM, a retroelement from *Drosophila melanogaster*, acts as a sequence-specific endonuclease. *J Virol* 73: 7061–7064.
- Leblanc, P., Desset S. et al. (1997). Invertebrate retroviruses: ZAM a new candidate in *D. melanogaster*. *Embo J.*, 16: 7521–7531.
- Ledermann, B. (2000). Embryonic stem cells and gene targeting. *Exp Physiol* 85: 603–613.
- LeMeur, M., N. Glanville, et al. (1981). The ovalbumin gene family: hormonal control of X and Y gene transcription and mRNA accumulation. *Cell* 23: 561–571.
- Li-Chan E. and S. Nakai. (1989). Critical reviews: Biochemical basis for the properties of egg white. *Poultry Biology* 2, 21–58.
- Loc, P. V. and W. H. Stratling (1988). The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *Embo J* 7: 655–664.
- Lukacsovich, T. and A. S. Waldman (1999). Suppression of intrachromosomal gene conversion in mammalian cells by small degrees of sequence divergence. *Genetics* 151: 1559–1568.
- McReynolds, L., B. W. O'Malley, et al. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature* 273: 723–728.
- Metzger, D. and P. Chambon (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24: 71–80.
- Metzger, D., J. Clifford, et al. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6991–6995.
- Mink, S., B. Mutschler, et al. (1996). A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6635–6640.
- Mohammed, S. M., S. Morrison, et al. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4: 115–125.
- Monroe, D. G. and M. M. Sanders (2000). The COUP-adjacent repressor (CAR) element participates in the tissue-specific expression of the ovalbumin gene. *Biochim Biophys Acta* 1517: 27–32.
- Morrison, C., A. Shinohara, et al. (1999). The essential functions of human Rad51 are independent of ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol* 19: 6891–6897.
- Morrison, C., E. Sonoda, et al. (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo J* 19: 463–471.
- Morrison, C. and S. Takeda (2000). Genetic analysis of homologous DNA recombination in vertebrate somatic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 817–831.
- Moynahan, M. E., J. W. Chiu, et al. (1999). Brcal controls homology-directed DNA repair. *Mol Cell* 4: 511–518.
- Muramatsu, T., H. Hiramatsu, et al. (1995). Induction of ovalbumin mRNA by ascorbic acid in primary cultures of tubular gland cells of the chicken oviduct. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112: 209–216.
- Nguyen-Huu, M. C., M. Stratmann, et al. (1979). Chicken lysozyme gene contains several intervening sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 76–80.
- Nau F. (1987). Synthèse bibliographique, Le jaune d'oeuf, ENSA, INRA,.
- Nowock, J. and A. E. Sippel (1982). Specific protein-DNA interaction at four sites flanking the chicken lysozyme gene. *Cell* 30: 607–615.
- Pain B, Chenevier P, Samarut J (1999). Chicken embryonic stem cells and transgenic strategies. *Cell Tissues Organs* 165: 212–219.
- Pain, B., M. E. Clark, et al. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122: 2339–2348.
- Palmiter, R. D., E. R. Mulvihill, et al. (1981). Steroid hormone regulation of ovalbumin and conalbumin gene transcription. A model based upon multiple regulatory sites and intermediary proteins. *J Biol Chem* 256: 7910–7916.
- Phillips, J. E. and M. P. Calos (1999). Effects of homology length and donor vector arrangement on the efficiency of double-strand break-mediated recombination in human cells. *Somat Cell Mol Genet* 25: 91–100.
- Phi-Van, L., J. P. von Kries, et al. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 10: 2302–2307.

- Phi-van, L., C. Sellke, et al. (1998). An initiation zone of chromosomal DNA replication at the chicken lysozyme gene locus. *J Biol Chem* 273: 18300–18307.
- Phi-Van, L. and W. H. Stratling (1996). Dissection of the ability of the chicken lysozyme gene 5' matrix attachment region to stimulate transgene expression and to dampen position effects. *Biochemistry* 35: 10735–10742.
- Phi van, L. (1996). Transcriptional activation of the chicken lysozyme gene by NF-kappa Bp65 (RelA) and c-Rel, but not by NF-kappa Bp50. *Biochem J* 313: 39–44.
- Phi-van, L. and W. H. Stratling (1999). An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res* 27: 3009–3017.
- Porter, G., J. Westmoreland, et al. (1996). Homologous and homeologous intermolecular gene conversion are not differentially affected by mutations in the DNA damage or the mismatch repair genes RAD1, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, PMS1 and MSH2. *Genetics* 143: 755–767.
- Pereira, F. A., Y. Qiu, et al. (1995). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 503–508.
- Ramirez-Solis, R., A. C. Davis, et al. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 225: 855–878.
- Regenhard, P., R. Goethe, et al. (2001). Involvement of PKA, PKC, and Ca²⁺ in LPS-activated expression of the chicken lysozyme gene. *J Leukoc Biol* 69: 651–658.
- Renkawitz, R., G. Schutz, et al. (1984a). Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding. *Cell* 37: 503–510.
- Renkawitz, R., H. Beug, et al. (1982). Expression of a chicken lysozyme recombinant gene is regulated by progesterone and dexamethasone after microinjection into oviduct cells. *Cell* 31: 167–176.
- Renkawitz, R., U. Danesch, et al. (1984b). Steroid controlled expression of the chicken lysozyme and the rat tryptophan oxygenase gene after transfer into eukaryotic cells. *J Steroid Biochem* 20: 99–104.
- Robin, S., F. Jaisser, et al. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. IV. Controlled spatiotemporal expression of transgenes: new tools to study normal and pathological states. *Am J Physiol* 273: G759–762.
- Robinson, C. E., X. Wu, et al. (1999). A corepressor and chicken ovalbumin upstream promoter transcriptional factor proteins modulate peroxisome proliferator-activated receptor- gamma2/retinoid X receptor alpha-activated transcription from the murine lipoprotein lipase promoter. *Endocrinology* 140: 1586–1593.
- Sanders, M. M. and G. S. McKnight (1988). Positive and negative regulatory elements control the steroid-responsive ovalbumin promoter. *Biochemistry* 27: 6550–6557.
- Sargent, R. G., M. A. Brenneman, et al. (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol Cell Biol* 17: 267–277.
- Sargent, R. G., J. L. Meservy, et al. (2000). Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 28: 3771–3778.
- Sang, R., V. Mezger-Lallemand, et al. (2000). Increased efficiency of homologous recombination in ES cells by cleavage at both ends of homology in the targeting vector. *Transgenic Res* 9: 79–80.
- Sauveur B. (1988). Reproduction des volailles et production d'ceufs. INRA eds Sawaya, B. E., O. Rohr, et al. (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, a transcriptional activator of HIV-1 gene expression in human brain cells. *J Biol Chem* 271: 23572–23576.
- Sawicki, J. A., B. Monks, et al. (1998). Cell-specific ecdysone-inducible expression of FLP recombinase in mammalian cells. *Biotechniques* 25: 868–870, 872–875.
- Schaeffer, E., M. A. Lucero, et al. (1987). Complete structure of the human transferrin gene. Comparison with analogous chicken gene and human pseudogene. *Gene* 56: 109–116.
- Schweers, L. A., D. E. Frank, et al. (1990). The steroid-dependent regulatory element in the ovalbumin gene does not function as a typical steroid response element. *J Biol Chem* 265: 7590–7595.
- Schweers, L. A. and M. M. Sanders (1991). A protein with a binding specificity similar to NF-kappa B binds to a steroid-dependent regulatory element in the ovalbumin gene. *J Biol Chem* 266: 10490–10497.
- Sensenbaugh, K. R. and M. M. Sanders (1999). Multiple promoter elements including a novel repressor site modulate expression of the chick ovalbumin gene. *DNA Cell Biol* 18: 147–156.
- Shcherbakova, O. G., V. A. Lanzov, et al. (2000). Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells. *Mutat Res* 459: 65–71.
- Shibata, H., Z. Nawaz, et al. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol Endocrinol* 11: 714–724.
- Shinohara, M., E. Shita-Yamaguchi, et al. (1997). Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics* 147: 1545–1556.
- Short, M. L., J. Nickel, et al. (1996). Lysozyme gene expression and regulation. *Exs* 75: 243–257.
- Short, M. L., J. Nickel, et al. (1996). In vivo protein interaction with the mouse Mlysozyme gene downstream enhancer correlates with demethylation and gene expression. *Cell Growth Differ* 7: 1545–1550.

- Sippel, A. E., H. Land, et al. (1978). Cloning of chicken lysozyme structural gene sequences synthesized in vitro. *Nucleic Acids Res* 5: 3275–3294.
- Skafar, D. F. and S. S. Seaver (1985). Desensitization of the chick oviduct to estrogen: mediation at different levels of gene expression. *Endocrinology* 116: 1755–1762.
- Skoufos, E. and M. M. Sanders (1992). Regulation of expression of the chicken ovalbumin gene: interactions between steroid hormones and second messenger systems. *Mol Endocrinol* 6: 1412–1417.
- Steiner, C., M. Muller, et al. (1987). Lysozyme gene activity in chicken macrophages is controlled by positive and negative regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 15: 4163–4178.
- Stevens L. (1991). Egg white proteins. *Corp. Biochem. Physiol.* 100B, 1–9.
- Stief, A., D. M. Winter, et al. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341: 343–345.
- Takata, M., M. S. Sasaki, et al. (2000). The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* 20: 6476–6482.
- Takata, M., M. S. Sasald, et al. (1998). Homologous recombination and nonhomologous end joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17: 5497–5508.
- Templeton, N. S. (2000). Strategies for improving the frequency and assessment of homologous recombination. *Methods Mol Biol* 133: 45–60.
- Te Riele, H., E. R. Maandag, et al. (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5128–5132.
- Thompson, S., A. R. Clarke, et al. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56: 313–321.
- Theisen, M., A. Stief, et al. (1986). The lysozyme enhancer: cell-specific activation of the chicken lysozyme gene by a far-upstream DNA element. *Embo J* 5: 719–724.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503–512.
- Vallier, L., J. Mancip, et al. (2001). An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2467–2472.
- von der Ahe, D., J. M. Renoir, et al. (1986). Receptors for glucocorticosteroid and progesterone recognize distinct features of a DNA regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2817–2821.
- von Kries, J. P. and W. H. Stratling (1988). Lysozyme gene specific transcription in isolated hen oviduct nuclei. *Int J Biochem* 20: 633–637.
- Wang, L. H., S. Y. Tsai, et al. (1987). Purification and characterization of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor from HeLa cells. *J Biol Chem* 262: 16080–16086.
- Woo, S. L., W. G. Beattie, et al. (1981). Complete nucleotide sequence of the chicken chromosomal ovalbumin gene and its biological significance. *Biochemistry* 20: 6437–6446.
- Yagi T, Y. Ikawa, et al. (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9918–9922.
- Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, et al. (1998). Homologous recombination, but not DNA repair, is reduced in vertebrate cells deficient in RAD52. *Mol Cell Biol* 18: 6430–6435.
- Yamaguchi-Iwai, Y., E. Sonoda, et al. (1999). Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *Embo J* 18: 6619–6629.
- Yanagawa, Y., T. Kobayashi, et al. (1999). Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res* 8: 215–221.
- Yancey-Wrona, J. E. and R. D. Camerini-Otero (1995). The search for DNA homology does not limit stable homologous pairing promoted by RecA protein. *Curr Biol* 5: 1149–1158.
- Yanez, R. J. and A. C. Porter (2000). Uracil incorporation into a gene targeting construct reduces the frequency of homologous and nonhomologous recombinants in human cells. *Mutat Res* 461: 157–62.
- Yanez, R. J. and A. C. Porter (1999). Influence of DNA delivery method on gene targeting frequencies in human cells. *Somat Cell Mol Genet* 25: 27–31.
- Zheng, H., P. Hasty, et al. (1991). Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8067–8071.

[0192]

SEQUENZPROTOKOLL

<110> VIVALIS

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS
 ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON - ENS

<120> System für die Expression von exogenen Proteinen in einem Vogel-System

<130> D 19 900

<150> FR 01/15 111

<151> 2001-11-22

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 161

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Sequenz des künstlichen Introns der Vektoren pOvaRH und pLysoRH

<400> 1

```

gtaagtatca aggttacaag aattcgcggc cgctctagaa ctagtggatc ccccgggctg 60
caggaattcg atatcaagct tataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatcccat 120
cattggtcct actgacatcc actttgcctt tctctccaca g 161

```

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Sekretionssignalpeptid des Lysozyms

<220>

<221> CDS (kodierende Sequenz)

<222> (1) .. (54)

<400> 2

```

atg agg tct ttg cta atc ttg gtg ctt tgc ttc ctg ccc ctt gct gct 48
Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala
  1           5           10           15
ctt ggt 54
Leu Gly

```

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid IL-11 (-ATG) S

<400> 7

ctgaagcttg ttaactgtgt ttgccgctg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid IL-11 3' ncRevAS

<400> 8

cgctctagat gtatgacaca tttaatcccc

30

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid Lyso 1-18 S

<400> 9

ggggaattcc atgggtatga ggtctttgct aat

33

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid Lyso 1789 S

<400> 10

actatgacta ctggcaggag aatgaggaac

30

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid Lyso 2859 S

<400> 11

acttgcacac ggaatatgga agggcatt

28

<210> 12

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Oligonukleotid Lyso 3185 AS

 <400> 12
 gtttgcgtat agtcgtttta atgagggatg cgt 33

<210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Oligonukleotid OvaL 1657 S

 <400> 13
 cgcgctctcga gccagagagc tcatcaattc ctgggtagaa 40

<210> 14
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Oligonukleotid OvaL 7707 AS

 <400> 14
 cgcgctctcga gttctatatg ggggtgtggg acagagcaat 40

<210> 15
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Oligonukleotid OvaL 80 AS

 <400> 15
 aattcggatc ccatgatggc aatggggcag tagaagatg 39

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Oligonukleotid Oval-2995 S

 <400> 16

aattcggatc caacatttac tgggaagcac atctatcatc

40

<210> 17

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid SmaI3' in cDNA S

<220>

<221> div. Merkmal

<222> (50) .. (57)

<223> n bezeichnet a, t, c oder g

<400> 17

ataccggga ttggtottac tgacatccac ttgaccttc tctccacagn nnnnnn 57

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung einer embryonalen Stammzelle (ES) von Vögeln, welche durch homologe Rekombination modifiziert ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- A) die Einführung eines homologe Rekombination ermöglichenden Vektors in die ES-Zelle von Vögeln durch ein Transfektionsverfahren;
- B) die Selektion der Zellen durch die Zugabe eines Selektionsmittels in das Kulturmedium; und
- C) das Screenen der resistenten Klone und Amplifizierung,

dadurch gekennzeichnet, dass:

der eine homologe Rekombination ermöglichende Vektor, der in Schritt A) eingeführt wird, in einer Plasmid-Grundstruktur eine Aneinanderreihung von mindestens einem Element umfasst, welches nacheinander ausgewählt wird unter:

- a) einem genomischen DNA-Fragment, enthaltend den 5' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitt des Zielgens, fusioniert mit
 - b) einer Sekretionssignal-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
 - c) einer kurzen Intron-Nukleotidsequenz, fusioniert mit
 - d) einer Nukleotidsequenz, welche ein exogenes Protein von Interesse kodiert, fusioniert mit
 - e) einer poly A-Transkriptionsterminationssequenz, fusioniert mit
 - f) einer positiven Selektion ermöglichenden Kasette, umfassend einen Promotor, ein Resistenz gegen ein Selektionsmittel verleihendes Gen und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz, wobei die Kasette fusioniert sein kann mit
 - g) einem genomischen DNA-Fragment, welches den 3' gelegenen Homologie-Sequenzabschnitt des Zielgens enthält,
 - h) einer negativen Selektion ermöglichenden Kasette, umfassend einen Promotor, ein Gen, welches die Umwandlung eines in dem Kulturmedium vorhandenen Substrats zu einer für die Zelle, die das Gen exprimiert, toxischen Substanz sicherstellt, und eine poly A-Transkriptionsterminationssequenz und
- dadurch gekennzeichnet, dass:
- der Genort, der zielgerichtet durch den Rekombinationsvektor angesteuert wird, der Genort von Ovalbumin oder der Genort von Lysozym ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor d) die das exogene Protein kodierende Sequenz fusioniert an ihrem 5'-Ende mit c) einer kurzen Intron-Sequenz, umfassend insbesondere die Sequenz SEQ ID No. 1, welche ihrerseits fusioniert ist mit b) einer Peptidsekretionssignalsequenz, insbesondere der das Signalpeptid von Lysozym kodierenden Sequenz, welche die Sequenz SEQ ID No. 2 umfasst, umfasst.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor d) die das exogene Protein kodierende Sequenz fusioniert an ihrem 3'-Ende mit einer poly A-Sequenz umfasst.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor mindestens eine interne Ribosomeneintrittssequenz IRES fusioniert mit mindestens zwei Sequenzen, welche das exogene Protein von Interesse kodieren, umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor mindestens eine IRES-Sequenz fusioniert mit mindestens zwei Sequenzen, welche unterschiedliche Ketten, welche ein Protein von Interesse bilden, insbesondere die schwere und die leichte Kette eines Antikörpers unabhängig von dessen Natur, insbesondere einen monoklonalen Antikörper, ein Fab-Fragment, kodieren, umfasst.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass die IRES-Sequenz aus der Gruppe der IRES-Sequenzen der Gruppe I oder der Gruppe II, insbesondere den Sequenzen V130, Idemfix, Zam ausgewählt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt A) das Transfektionsverfahren unter den Transfektionsverfahren mit Hilfe eines Liposoms, eines Polykations oder durch Elektroporation ausgewählt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt A) das Transfektionsverfahren unter den Verfahren durch Elektroporation ausgewählt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ES-Zellen von Vögeln sind, welche aus dem Inkulturnehmen von Blastodermen stammen.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ES-Zellen von Vögeln sind, die spezifisch mit mindestens einem unter ECMA-7, SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, EMA-1 und EMA-6 ausgewählten Antikörper reagieren.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Kulturüberstand der rekombinierten Klone das exogene Protein von Interesse enthält, insbesondere nach Induktion des Klons mit Hilfe von verschiedenen Induktoren, insbesondere Retinsäure, Dimethylsulfoxid, TPA oder speziellen Kulturbedingungen, insbesondere durch die Bildung von „embryoid bodies“.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden Allele des Ziel-Genorts modifiziert sind.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die ES-Zellen Zellen sind, die einen alkalische Phosphatase-positiven Phänotyp aufweisen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte Medium ein Zytokin, welches in der aus LIF, IL-11, IL-6 und deren verschiedenen Mischungen gebildeten Gruppe ausgewählt wird, umfasst.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte Medium verschiedene Faktoren, insbesondere SCF, IGF-1, bFGF, CNTF und Oncostatin, umfasst.

16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse, umfassend die Extraktion des in den Überstand der Zellen, die aus dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 stammen, exprimierten exogenen Proteins.

17. Verwendung einer Vogel-Zelle, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erhalten worden ist, für die Herstellung des exogenen Proteins von Interesse.

18. Verfahren zur Gewinnung eines Tiers, das zu der Spezies der Vögel gehört, welches in der Lage ist, ein exogenes Protein von Interesse zu exprimieren, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- a) Gewinnung von Vogel-Zellen, die durch das gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 definierte Verfahren modifiziert worden sind,
- b) Einführung der in Schritt a) erhaltenen Zelle in die Keimhöhle eines Embryos oder in den Blutkreislauf des Embryos und
- c) Inkubation des in Schritt b) erhaltenen Embryos.

19. Verfahren zur Gewinnung eines Tiers, das zu der Spezies gehört, nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der in Schritt a) zur Gewinnung von modifizierten Vogel-Zellen eingesetzte Vektor eine gewebespezifische Expression erlaubt.

20. Verfahren zur Gewinnung eines Tiers nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der in Schritt a) eingesetzte Vektor eine gewebespezifische Expression des exogenen Proteins in der Leber, im Blut, im Knochenmark, in den lymphatischen Organen oder dem Eileiter erlaubt.

21. Verfahren zur Herstellung eines Proteins von Interesse, umfassend die Extraktion des in den Geweben eines Tiers, das ausgehend von dem Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20 erhalten worden ist, exprimierten exogenen Proteins.

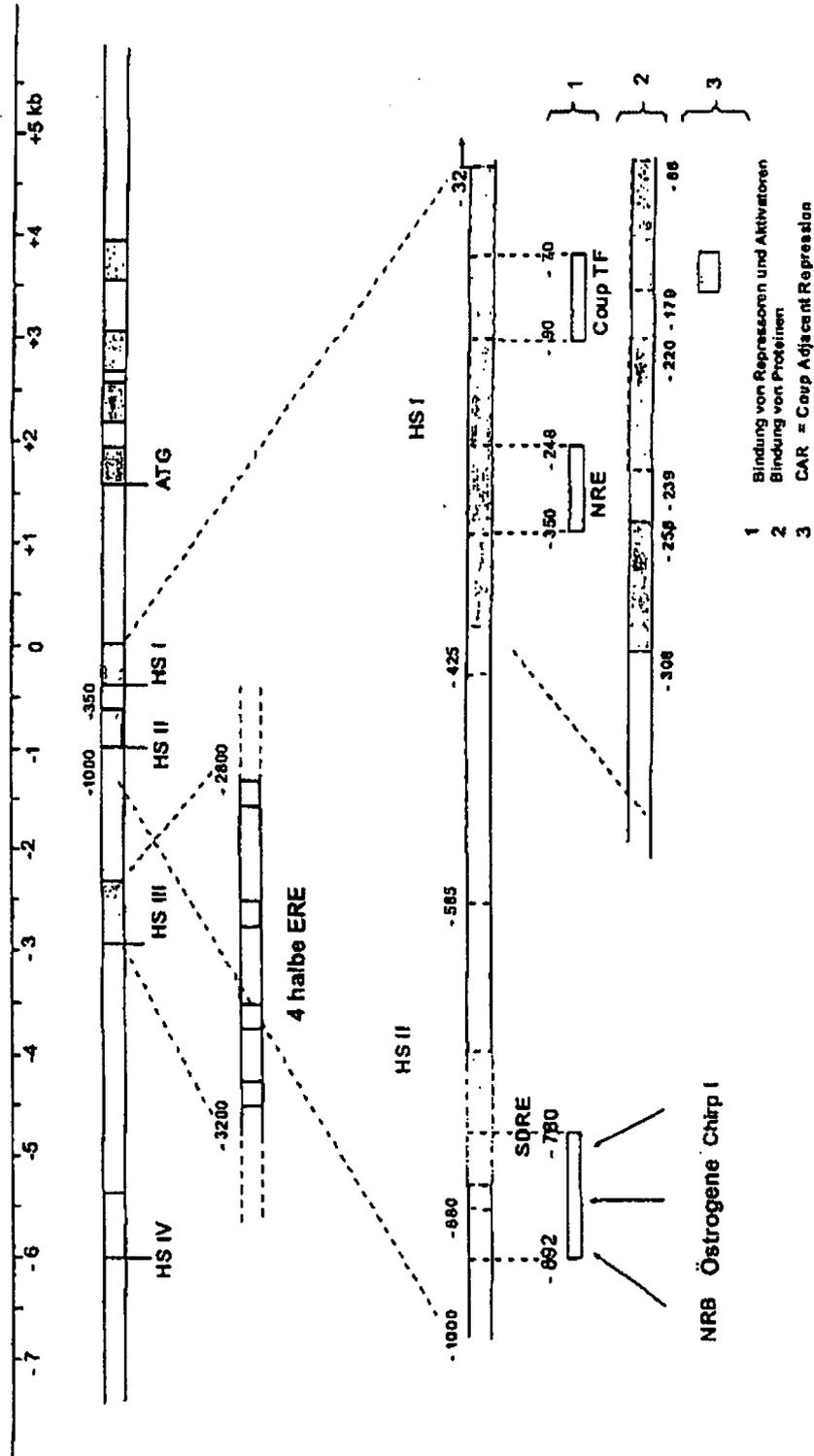
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein aus dem Blut, dem Eigelb oder dem Eiweiß extrahiert wird.

23. Ei, welches ausgehend von einem durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20 erhaltenen Tier erhalten werden kann, dadurch gekennzeichnet, dass ein Teil des Ovalbumins oder des Lysozyms teilweise oder vollständig durch das exogene Protein von Interesse ersetzt ist.

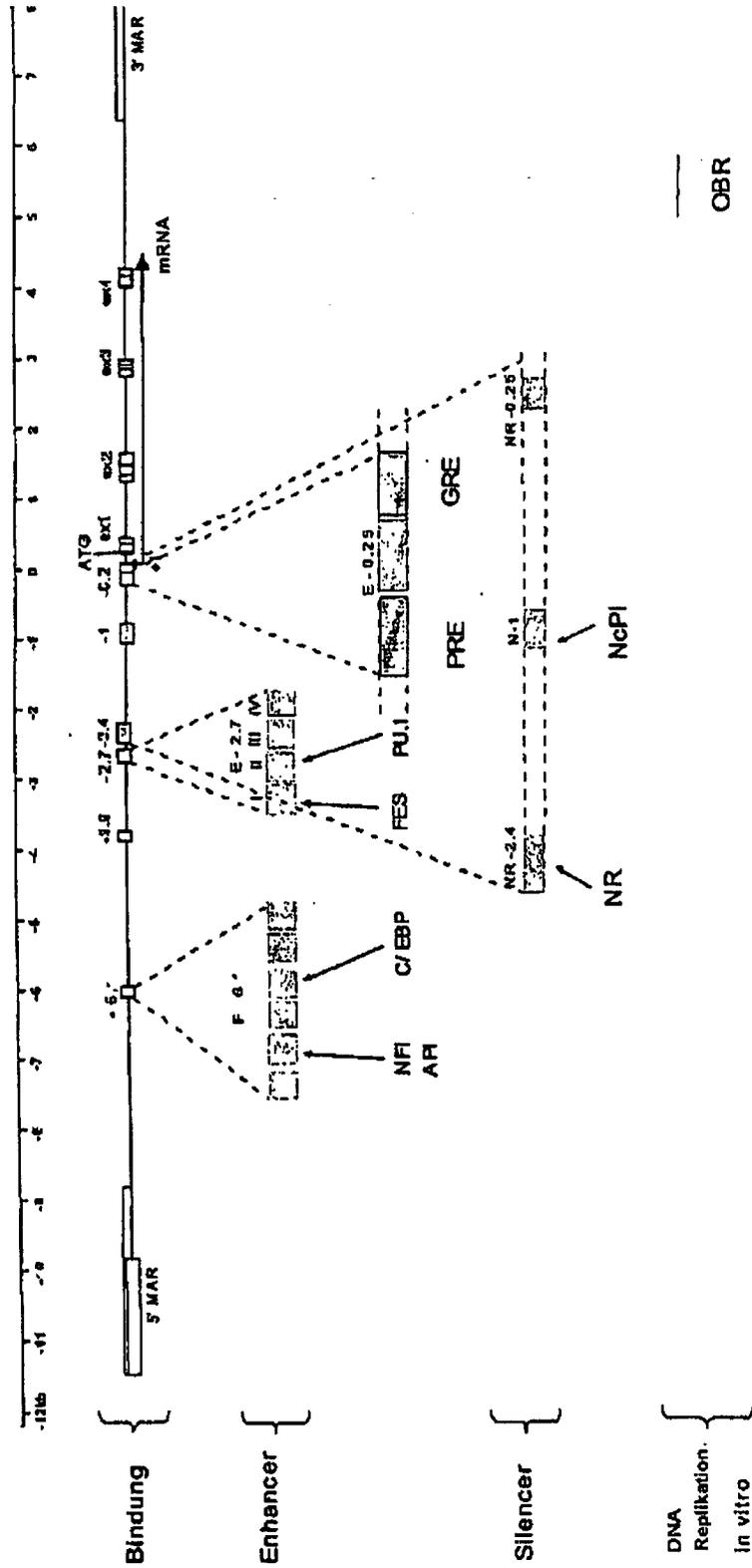
24. Ei nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das exogene Protein von Interesse unter den Peptiden von therapeutischem Interesse, den Interleukinen, den Zytokinen, den Hormonen und den Antikörpern ausgewählt wird.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

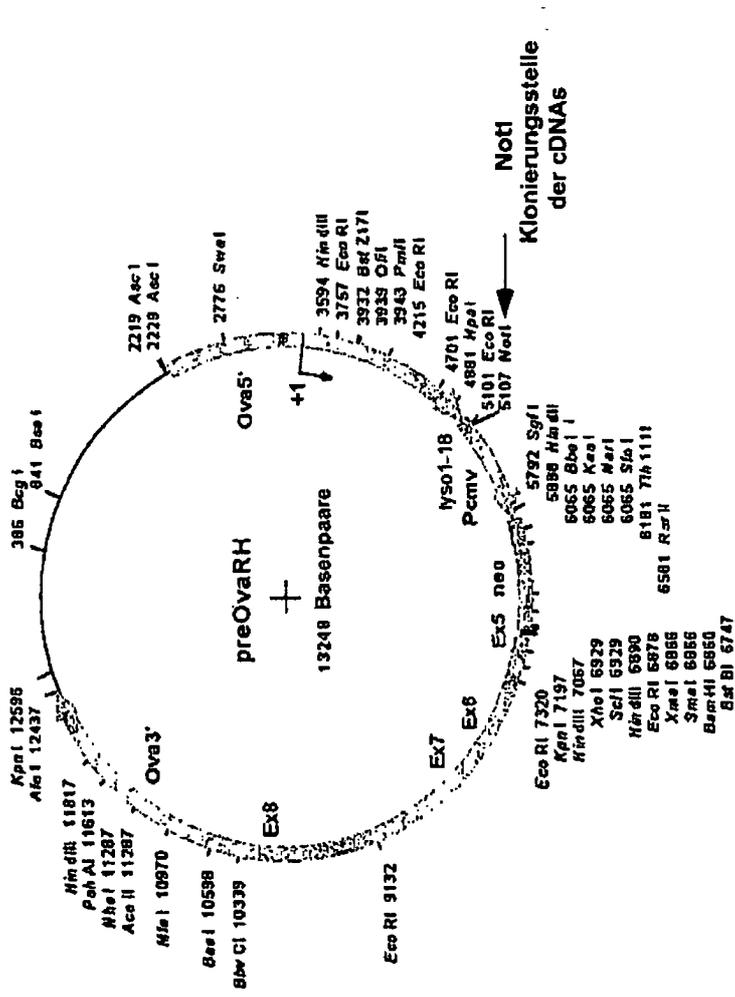
Anhängende Zeichnungen



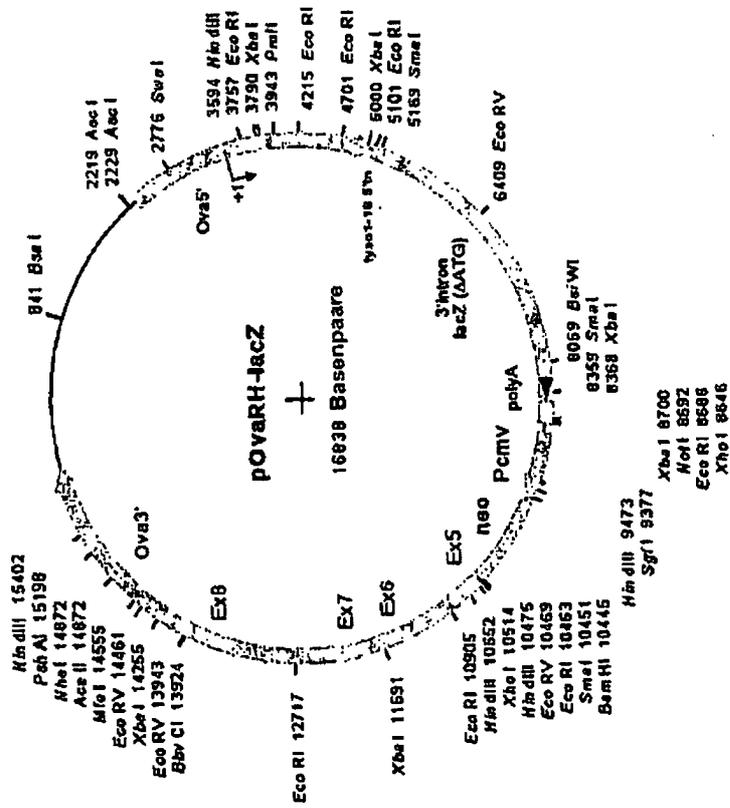
FIGUR 1



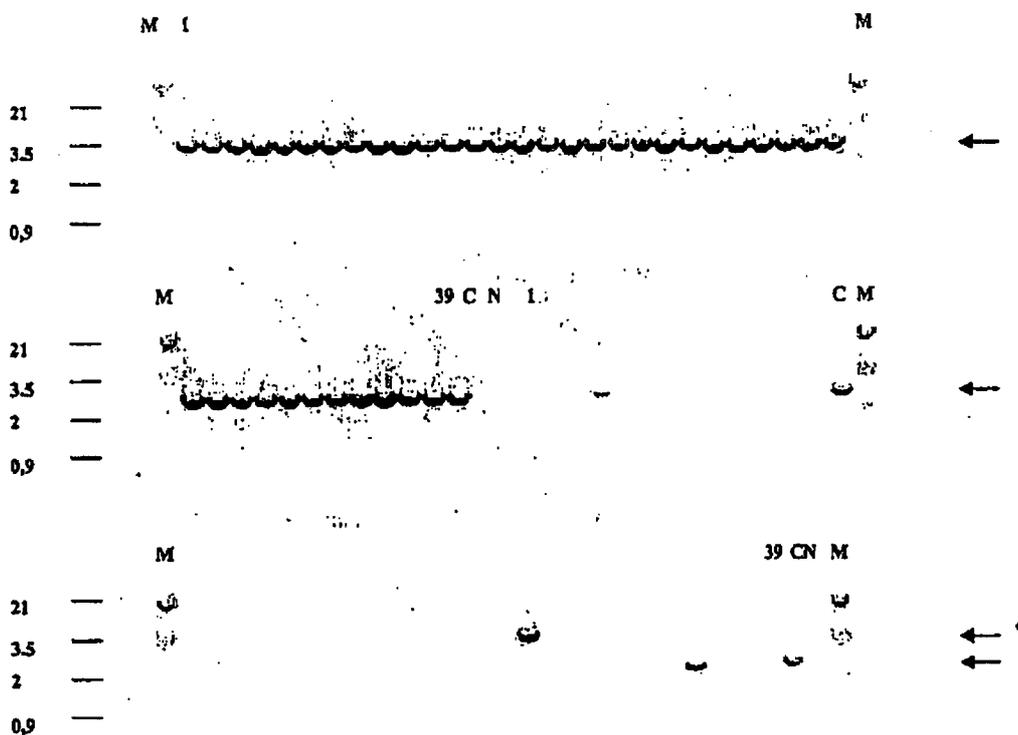
FIGUR 2



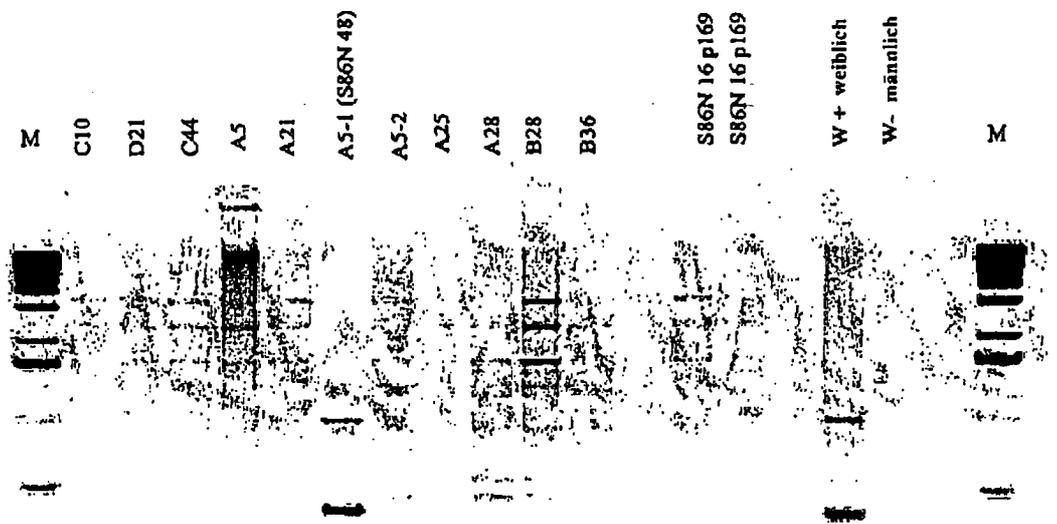
FIGUR 3



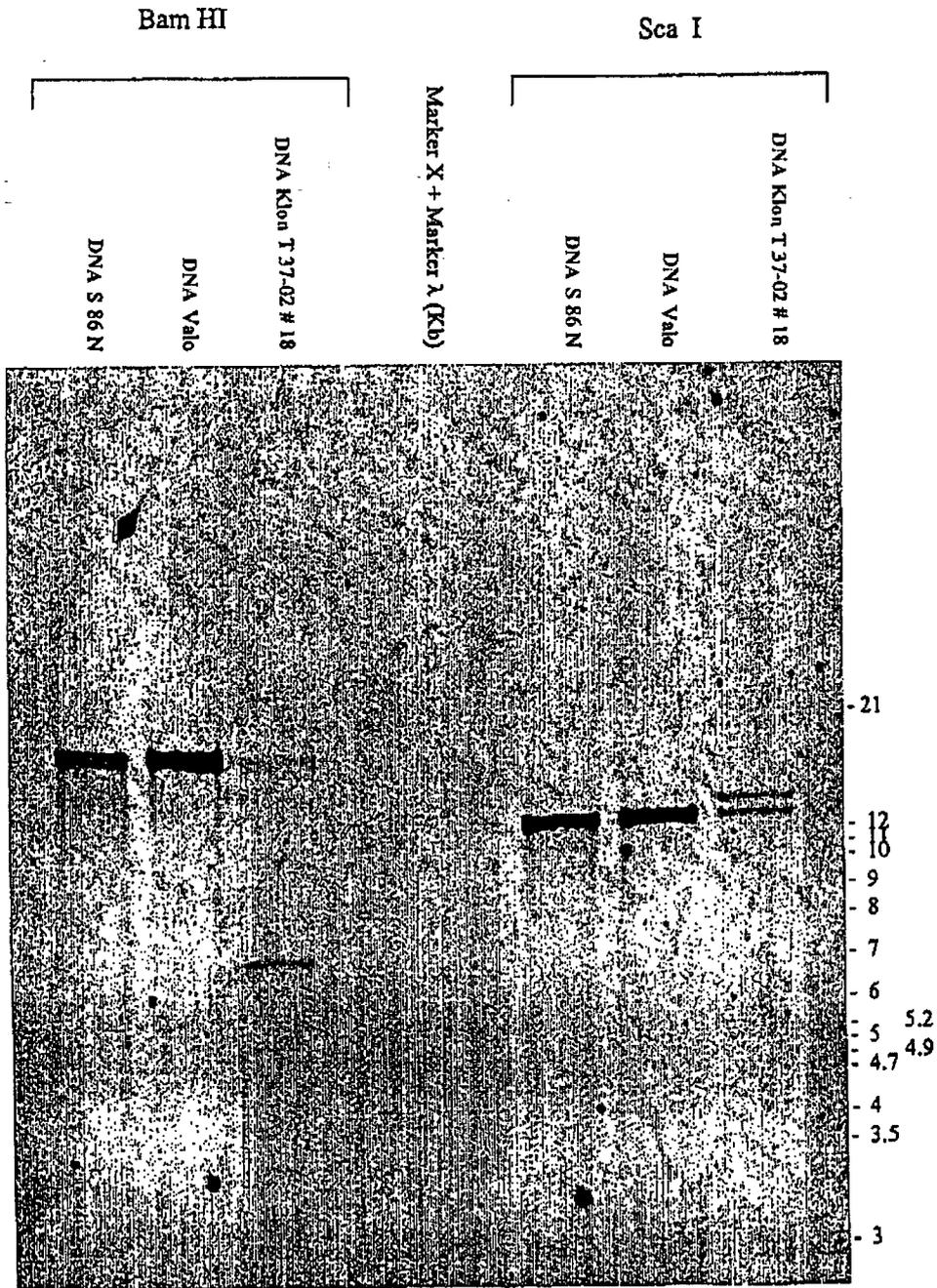
FIGUR 4



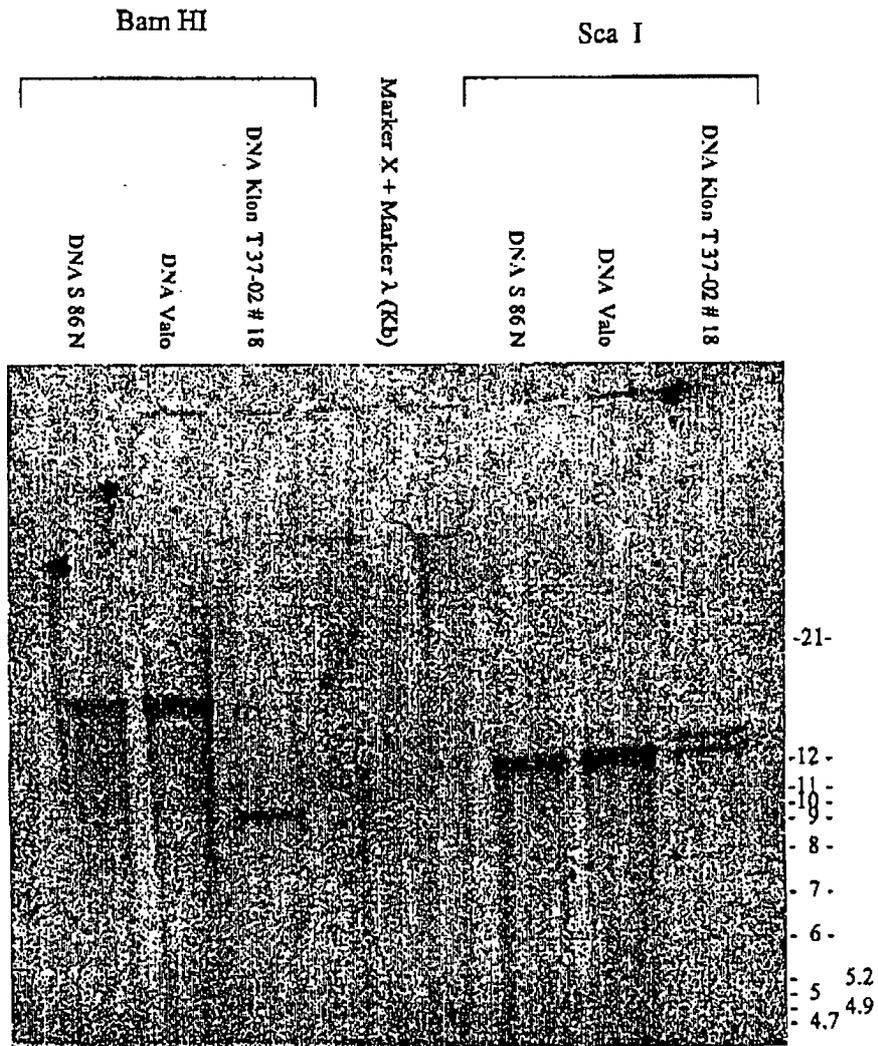
FIGUR 6



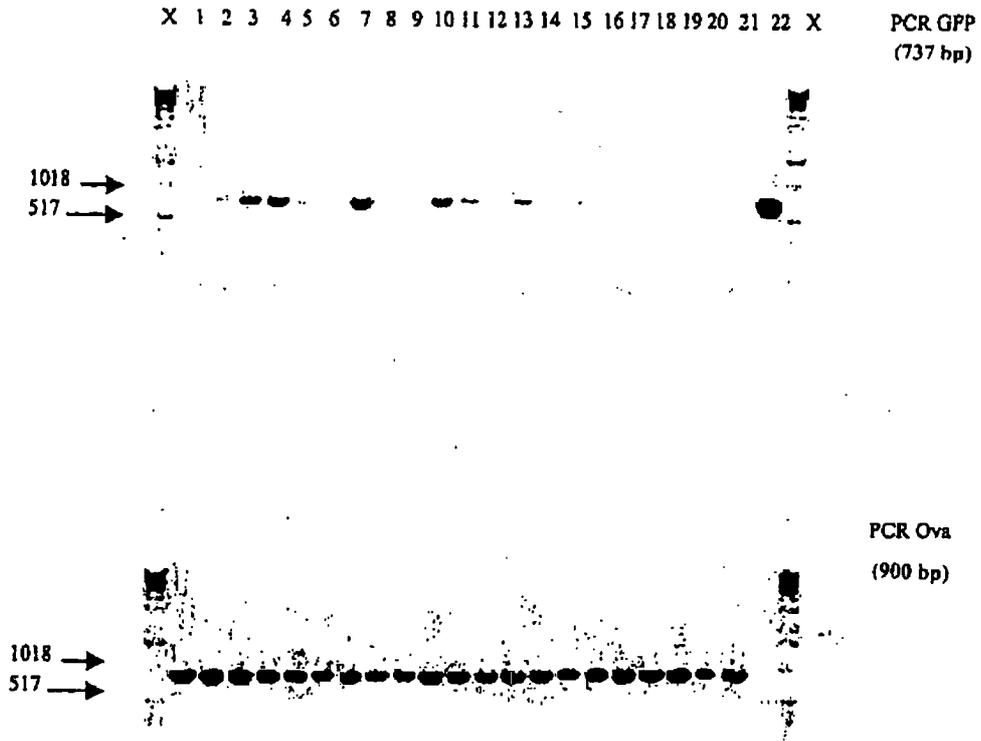
FIGUR 7



FIGUR 8A



FIGUR 8B



- X: Größenmarker**
- 1: Negative Vergleichsprobe: DNA aus Hühnerblut**
- 22: Positive Vergleichsprobe: Plasmid pVVS65lin**
- 2-16 : Embryos mit Injektion**
- 17-21: Embryos ohne Injektion**

FIGUR 9