

Der Gastrointestinaltrakt als Eintrittspforte für fremde Makromoleküle: DNA und Proteine

Inaugural — Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Beryl Schwarz-Herzke, geb. Herzke
aus Köln

Köln, Juli 2003

Berichtersteller

Professor Dr. Walter Doerfler

Professor Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung

18. November 2003

Meinem Mann und meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	DNA-Methylierung in eukaryotischen Zellen	2
1.2	Aufnahme fremder DNA über den Gastrointestinaltrakt . . .	3
1.2.1	Aufbau und Funktion des Verdauungstraktes	3
1.3	Die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes	7
1.4	Aufnahme von Substanzen über das Darmepithel	8
1.5	M-Zellen als Eintrittspforte für Antigene und Mikroorganismen	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material	17
2.1	Tiere	17
2.2	Zelllinien, Bakterien und Plasmide	17
2.2.1	Zelllinien	17
2.3	Enzyme	17
2.3.1	Restriktionsendonukleasen	17
2.3.2	Sonstige Enzyme	17
2.3.3	Kits	18
2.4	Nukleinsäuren	18
2.4.1	Radioaktiv markierte Nukleotide	18
2.4.2	Sonstige Nukleinsäuren	18
2.5	Antikörper und Konjugate	18
2.6	Chemikalien	19
2.7	Puffer und Lösungen	21
2.8	Labor- und Verbrauchsmaterialien	26
2.9	Laborgeräte	27
2.10	Das pEGFP-C1 Plasmid	28
2.11	Sequenzen und Lage der verwendeten synthetischen Oligonukleotide	29
3	Methoden	31
3.1	Arbeiten mit Zellkultur	31
3.2	Passagieren von Zellen	31
3.3	Kultivierung primärer Milzzellen	31
3.4	Passage primärer Milzzellen	32
3.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	32

3.6	Transfektion von Zellen	33
3.6.1	Inkubation von primären Milzzellen mit Plasmid-DNA	33
3.6.2	Extraktion der Zellkerne	33
3.7	Arbeiten mit Bakterien	34
3.7.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien	34
3.7.2	Herstellung kompetenter Bakterien	34
3.7.3	Transformation kompetenter Bakterien	35
3.8	Präparation von Plasmid DNA	35
3.8.1	Schnellpräparation von Plasmid DNA durch Kochlyse	35
3.8.2	CsCl Präparation von Plasmid DNA	36
3.9	Quantitative Bestimmung von DNA	37
3.10	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
3.11	Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten . . .	39
3.12	Southern-Transfer-Hybridisierung	39
3.12.1	Transfer	39
3.12.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	40
3.12.3	Hybridisierung mit [α - ³² P]-markierten Sonden . . .	41
3.13	Analyse der DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	41
3.14	Tierexperimenteller Teil	42
3.14.1	Tierhaltung	42
3.14.2	Verfütterung des Plasmids pEGFP-C1	42
3.14.3	Verfütterung des Proteins Glutathion-S-Transferase	43
3.14.4	Injektion des Plasmids pEGFP-C1 in die verschiedenen Darmabschnitte	43
3.14.5	Entnahme der Organe und Darminhalte	43
3.14.6	Präparation genomischer DNA	44
3.14.7	DNA-Extraktion aus Organen und Darminhalten . .	44
3.14.8	Ethanol-fällung	45
3.15	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
3.16	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	46
3.16.1	Herstellung von biotinylierten Hybridisierungsproben	46
3.16.2	Dot-blot Analyse der biotinylierten DNA	47
3.16.3	Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten	47
3.16.4	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten	48

3.16.5	Floureszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an Metaphasechromosomen	49
3.17	Resistenztest der <i>E.coli</i> -Bakterien des Darms nach Fütterung	50
3.17.1	Koloniehybridisierung von Bakterien	51
3.18	Nachweis der Glutathion-S-Transferase in Mäusen	51
3.18.1	Überexpression in BL21-Zellen	51
3.18.2	Reinigung des Proteingemisches	52
3.18.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	52
3.18.4	Präparation eines Polyacrylamidgeles	53
3.18.5	Western-Transfer	53
3.18.6	Transfer	54
3.18.7	Nachweis der Proteine	54
3.18.8	ECL-Lichtreaktion	54
3.18.9	Fütterung des Proteins GST an Mäuse	55
3.18.10	Anreicherung des GST Proteins	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Schicksal von oral verabreichter DNA	56
4.1.1	Das pEGFP-C1 Plasmid zeigt keine Homologie zum Mausgenom	56
4.1.2	Persistenz des pEGFP-C1 Plasmids im GI-Trakt der Maus	60
4.1.3	Orale Applikation des Plasmids pEGFP-C1 für einen längeren Zeitraum	67
4.2	PCR-Analysen der persistierten DNA-Fragmente der Darminhalte	69
4.2.1	Aufnahme von oral applizierter fremder DNA in Körperzellen	76
4.3	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Analysen von Blinddarmwänden	81
4.3.1	Persistenz oral aufgenommener DNA nach Komplexierung mit einem Protein	83
4.3.2	Aufnahme oral applizierter DNA-Protein-Komplexe in Körperzellen	88
4.3.3	Orale Applikation des Proteins Glutathion-S-Transferase	91
4.3.4	Aufnahme fremder, mit der Nahrung aufgenommener DNA in die Darmbakterien	95

4.4	Schicksal injizierter DNA in GI-Trakt	97
4.4.1	Degradierung fremder DNA im GI-Trakt	97
4.4.2	Injektion des DNA-Protamin-Komplexes in den GI-Trakt	101
4.5	DNA-Aufnahme primärer Milzzellen	106
5	Diskussion	108
5.1	Schicksal fremder DNA im Gastrointestinaltrakt	108
5.1.1	Untersuchung einer Homologie zwischen dem pEGFP-C1 Plasmids und dem Mausgenom	108
5.1.2	Oral verabreichte DNA kann im Gastrointestinaltrakt in fragmentierter Form persistieren	109
5.1.3	Aufnahme fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA in den Säugerorganismus	112
5.1.4	Aktivierung des Immunsystems nach oraler Applikation fremder DNA	116
5.2	Schicksal fremder oral verabreichter Proteine im Säugersystem	117
5.3	Injektion fremder DNA in den Gastrointestinaltrakt	119
5.4	Aufnahme fremder DNA in Kultur	120
6	Zusammenfassung	123
6.1	Orale Applikation von fremder DNA	123
6.2	Orale Applikation fremder Proteine	124
6.3	Aufnahme oral applizierter DNA in Darmbakterien	125
6.4	Injektion des pEGFP-C1 Plasmids in die verschiedenen Darmabschnitte	125
	Literatur	127
	Abkürzungsverzeichnis	156
	Erklärung	158
	Danke	159
	Kurzzusammenfassung	160

Abstract

161

Abbildungsverzeichnis

1	Konzentration der Darmbakterien in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes	8
2	Das Plasmid pEGFP-C1	28
3	Lage aller verwendeten Primerpaare	30
4	Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach Southern-Transfer-Analysen . . .	57
5	Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach PCR-Analysen	58
6	Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach PCR-Analysen	59
7	PCR-Analysen des homologen 274bp-Fragmentes des Mausgenoms	60
8	Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen	61
9	Fütterung des Plasmids pEGFP-C1	63
10	Fütterung des Plasmids pEGFP-C1	64
11	Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen	65
12	Fütterung des Plasmids pEGFP-C1	66
13	Fütterung des Plasmids pEGFP-C1	66
14	Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen	68
15	PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen .	70
16	PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen .	71
17	PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen .	72
18	PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen .	73
19	Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut	77
20	Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut	78
21	Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut	79
22	Fragmentierung fremder DNA im GI Trakt von Mäusen nach Komplexierung mit Protamin	84
23	Fütterung des gfp/Protamin-Komplexes	84
24	PCR-Analysen der gfp-spezifischen Fragmente im GI Trakt von Mäusen nach Komplexierung der DNA mit Protamin . .	86

25	PCR-Analysen der gfp-spezifischen Fragmente im GI Trakt von Mäusen nach Komplexierung der DNA mit Protamin . .	87
26	Prüfung der Stabilität der Glutathion-S-Transferase	92
27	Nachweis des GST Proteins nach Protein-Anreicherung . .	94
28	Injektion des gfp Plasmids in verschiedene Darmabschnitte	99
29	Injektion des Plasmids pEGFP-C1 in die verschiedenen Darmabschnitte	99
30	PCR-Analysen der injizierten gfp DNA	100
31	Injektion von gfp-Protamin-Komplexen	102
32	Injektion des gfp/Protamin-Komplexes in die verschiedenen Darmabschnitte	103
33	PCR-Analysen der injizierten Komplexe	105

Tabellenverzeichnis

1	Sequenzen der verwendeten Primer	29
2	Programm der PCR	42
3	Orale Applikation fremder DNA	67
4	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	74
5	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	75
6	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	75
7	PCR-Analysen der DNA aus den Organen	80
8	PCR-Analysen der DNA aus den Organen	80
9	PCR-Analysen der DNA aus den Organen	81
10	Aufnahme der pEGFP-C1 DNA in Zellen der Villi des Caecums	81
11	FISH-Analyse der Blinddarmwände	82
12	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	87
13	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	88
14	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	88
15	Aufnahme der DNA-Protamin-Komplexe in Zellen der Villi des Caecums	89
16	FISH-Analyse der Blinddarmwände	90
17	Aufnahme fremder DNA in die Darmbakterien	96
18	Antibiotika-Test	97
19	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	101
20	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	104
21	PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten	104
22	FISH-Analyse der Kerne primärer Milzzellen	107

1 Einleitung

Seit Beginn des Lebens vor mehreren Millionen Jahren sind die Organismen großen Mengen von fremder DNA ausgesetzt. Nukleinsäuren werden ständig an die Umwelt abgegeben; Pollen im Frühjahr, Früchte im Herbst, sich zersetzende Organismen, um nur einige zu nennen. Was mit dieser DNA passiert ist weitgehend ungeklärt. Wird ein Organismus konserviert, sei es durch Zufall im Moor oder im Eis wie der Tiroler Eis-Mann Ötzi, können Nukleinsäuren in fragmentierter Form persistieren. Dies beweisen Untersuchungen an dem Eis-Mann Ötzi, der vor über 5000 Jahren verstorben ist (Handt et al., 1994).

Aber nicht nur durch die Zersetzung von anderen Organismen kommen Organismen mit fremder DNA in Kontakt, sondern auch durch Nahrungsaufnahme. Durch den Verzehr von Obst, Gemüse und Fleisch ist der Gastrointestinaltrakt der Säuger, und natürlich auch der aller anderen Arten, großen Mengen fremder DNA ausgesetzt. Die Konfrontation mit fremder DNA gehört deshalb zum Tagesablauf eines Menschen.

Die Frage, wie sich diese fremde DNA in den Zellen eines Körpers verhält, ist daher von grundlegender biologischer Bedeutung. Sie spielt auch eine zentrale Rolle bei der Tumorinduktion durch Viren, bei der Erzeugung transgener Organismen, in der somatischen Gentherapie und bei der DNA-Vakzinierung.

Die Persistenz fremder DNA ist besonders gut bei viralen Genomen erforscht. Nachdem die Viren ihre DNA in die Säugerzellen eingebracht haben, wird die DNA in den Kern transportiert und kann dort entweder in episomaler Form persistieren oder in das Wirtsgenom integriert werden. Die Genome der Papillomaviren und Epstein-Barr-Viren zum Beispiel, persistieren im Nukleus weitgehend in episomaler Form, als zirkuläre Superhelices. Im Gegensatz dazu ist für die retrovirale DNA die Integration ins Wirtsgenom eine Voraussetzung für die eigene Transkription.

Die Integration viraler DNA in ein etabliertes Genom kann weitreichende Folgen haben. Zunächst kann das Integrationsereignis *per se* über den Mechanismus der insertionellen Mutagenese zur Aktivierung von Protoonkogenen oder zur Inhibierung von Tumorsuppressorgenen führen. Desweiteren werden integrierte virale Genome nach der Integration in etablierte Säuger- und Pflanzengenome *de novo* methyliert. Diese Methylierung fin-

det in spezifischen Mustern statt und führt zu Veränderungen im Expressionsmuster zellulärer Gene (Sutter et al., 1978; Sutter and Doerfler, 1980; Toth et al., 1989; Selker et al., 1993; Meyer et al., 1994; Hertz et al., 1999). Die Existenz dieser *de novo* Methylierung wurde intensiv untersucht und kann als zellulärer Abwehrmechanismus gegen die Integration und Aktivität fremder DNA interpretiert werden (Doerfler et al., 1991; Yoder et al., 1997).

1.1 DNA-Methylierung in eukaryotischen Zellen

Es ist schon lange bekannt, dass neben den vier Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin noch eine weitere Form des Cytosins existiert, das „5-Methylcytosin“ (Hotchkiss, 1948). Diese modifizierte Base findet sich häufig als Desoxycytosin im 5'-CpG-3'-Dinukleotid und wird von zelleigenen Methyltransferasen methyliert (Doerfler, 1981; Riggs und Jones, 1983). Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, werden die Cytosine in einem bestimmten Muster methyliert. Das bedeutet, dass nicht jedes in einer 5'-CpG-3'-Kombination vorliegende Cytosin methyliert wird. Im Säuger genom sind zwischen 2 und 7% aller 5'-CpG-3'-Dinukleotide methyliert, im Pflanzengenom liegt der Anteil wesentlich höher. Die Verteilung der 5-Methylcytosine in der DNA verschiedener Gewebe ist unterschiedlich. Die Methylierungsmuster der DNA dagegen können in einem Zellsystem bei unterschiedlichen Individuen identisch sein (Kochanek et al., 1990; Behn-Krappa et al., 1991).

Es sind zwei Formen der Methylierung bekannt: Die *de novo* Methylierung und die „maintenance“ Methylierung. Beide Methylierungsarten werden wahrscheinlich von verschiedenen Methyltransferasen katalysiert (Doerfler, 1981, 1983, 1993). Bei der *de novo* Methylierung handelt es sich um eine sequenzspezifische Methylierung unmethylierter DNA, zum Beispiel nach Eintritt fremder DNA in den Nukleus. Ein solcher Mechanismus wurde eingehend bei integrierter Virus DNA und bei Transgenen untersucht (Sutter und Doerfler, 1980; Vardimon et al., 1980; Kruczek und Doerfler, 1982; Hertz et al., 1999). Die DNA des Adenovirus Typ 12 (Ad12) ist im Virion und während der Replikation in infizierten menschlichen Zellen nicht methyliert (Sutter und Doerfler, 1980). Wird die virale DNA jedoch in die genomische DNA von Hamstern integriert, wird die integrierte DNA in spe-

zifischen Mustern *de novo* methyliert und dadurch inaktiviert (Orend et al., 1995). Deshalb wird der *de novo* Methylierung eine wichtige Funktion bei der Steuerung der transkriptionellen Aktivität zugesprochen (Doerfler, 1983). Häufig führt die Methylierung eines Promotors zur Inaktivierung des betreffenden Gens, wie es bei der gewebespezifischen Expression von Globin Genen beobachtet wurde (Verdimon et al., 1982; Langer et al., 1984; McGhee et al., 1979; Murray und Grosveet, 1987). Es kommt bei diesem Mechanismus zur Ausbildung neuer Methylierungsmuster, wodurch sich Zellen vor der Transkription fremder Gene schützen können. Der Mechanismus, der zur Inaktivierung von Genen, bzw. deren Promotoren führt, ist noch nicht vollständig verstanden. In Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Methylierung von DNA möglicherweise mit einer Deacetylierung von Histonen einhergeht (Eden et al, 1998). Dies könnte möglicherweise zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führen.

Die maintenance Methylierung dagegen ist für die Vererbung schon bestehender Methylierungsmuster von einer Generation zur nächsten verantwortlich.

Die Existenz dieser Mechanismen, die zur Methylierung fremder DNA führen, lässt die Frage nach den Möglichkeiten zur Aufnahme fremder DNA in einen Organismus aufkommen. Ein natürlicher Weg ist die Aufnahme fremder DNA über die Nahrung. So besteht die Möglichkeit, dass mit der Nahrung aufgenommene DNA über das Darmepithel in den Organismus gelangen kann.

1.2 Aufnahme fremder DNA über den Gastrointestinaltrakt

1.2.1 Aufbau und Funktion des Verdauungstraktes

Bei nicht wiederkäuenden Säugetieren beginnt der Gastrointestinaltrakt mit dem Magen. Im Magen wird die aufgenommene Nahrung mit dem Magensaft vermischt, homogenisiert und damit in den Speisebrei (Chymus) umgewandelt. Die Schleimhautoberfläche des Magens ist stark gefaltet. In den Falten liegen viele salzsäure- und enzymproduzierende Drüsen. Diese Magendrüsen, die im Fundus und im Corpus des Magens besonders zahlreich vorkommen, sind gestreckt und enthalten drei Zellarten. Die Ne-

benzellen produzieren den Mucus und sind teilungsfähig. Die Hauptzellen bilden eine Vorstufe des Enzyms Pepsin, das Pepsinogen, welches durch die in den Belegzellen gebildete Salzsäure aktiviert wird (Übersicht in Faller, 1999).

Der Darm stellt den nächsten Abschnitt des Verdauungstraktes dar. Der Darm an sich wird wiederum in das kleine Intestinum (Dünndarm) und das große Intestinum (Dickdarm) unterteilt. Sowohl das kleine als auch das große Intestinum können weiter differenziert werden. Das kleine Intestinum beginnt mit dem Duodenum (Zwölffingerdarm), welches die Bauchspeicheldrüse umfasst. Das Duodenum endet mit dem Hauptausführungsgang des *Ductus pancreaticus*, der zusammen mit dem *Ductus choledochus* in den Dünndarm mündet. Auf das Duodenum folgen Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm), die beide ohne scharfe Grenze ineinander übergehen und das sogenannte Dünndarmkonvolut bilden (ca. 3/5 Jejunum und 2/5 Ileum). Beide Darmabschnitte sind über das Mesenterium an der hinteren Bauchhöhlenwand befestigt. Das Mesenterium dient der Blut- und Nervenversorgung des Dünndarms. Im Dünndarm findet die Resorption statt. Die Nährstoffe werden durch Enzyme des Pankreas zu resorbierbaren Bestandteilen abgebaut. Um die Resorption der Nahrungsstoffe zu erleichtern, ist die Schleimhautoberfläche, besonders im Jejunum, in Falten gelegt und weist eine beträchtliche Oberflächenvergrößerung auf, die durch die Zotten und Krypten verursacht wird. Die Oberfläche des Dünndarms wird so auf ca. 1 m² vergrößert. Die Einsenkungen zwischen den Zotten werden als Krypten bezeichnet. Das Zottenepithel ist einschichtig und besteht aus hochprismatischen Saumzellen und schleimbildenden Becherzellen. Saumzellen sind zur Resorption fähig und besitzen auf ihrer apikalen Oberfläche Mikrovilli, die ebenfalls der Oberflächenvergrößerung dienen. So kann der Darm beim Menschen eine Gesamtoberfläche von über 120 m² aufweisen (Übersicht in Faller, 1999).

Zur Ermöglichung der Verdauung werden dreierlei Sekrete in das Darm-lumen abgegeben, der Pankreassaft, der zahlreiche Verdauungsenzyme enthält, die Galle und der Darmsaft. Als Darmsaft werden Sekrete zusammengefasst, die einerseits von den in der Submucosa angelegten Duodenaldrüsen (Brunnersche Drüsen) und andererseits von den in der Mucosa lokalisierten Lieberkünschen Drüsen gebildet werden (Übersicht in Pfeffer, 1987). Die aus diesen Spaltungen resultierenden Verdauungspro-

dukte können absorbiert und damit dem Stoffwechsel des Tieres zugefügt werden.

Die Absorption wichtiger Stoffgruppen erfolgt über verschiedene Mechanismen. Die mit der Nahrung aufgenommenen Fette bestehen zum größten Teil aus Triglyceriden, Cholesterin, Cholesterinestern, Phospholipiden und fettlöslichen Vitaminen. Die Triglyceride werden vor der Absorption zunächst mit Hilfe von Lipasen zu freien Fettsäuren und Monoglyceriden gespalten. Im Darm wird die Fettverdauung von Pancreaslipasen sowie der Phospholipase A₂ fortgesetzt. Diese Substanzen können durch passive Diffusion in die Zellen gelangen (Übersicht Faller 1999).

Kohlehydrate werden bereits in der Mundhöhle von α -Amylasen in Mono- und Disaccharide enzymatisch gespalten. Im Dünndarm wird die Verdauung der Kohlehydrate in Gegenwart der Pancreasamylase sowie zahlreicher anderer zuckerspaltender Enzyme (Glycosidasen, Disaccharidasen) fortgesetzt. Die Endprodukte (Glucose, Galaktose, Fruktose) werden mit Hilfe aktiver und passiver Transportmechanismen in die Darmzellen absorbiert.

Die Eiweissverdauung beginnt bereits im Magen. Durch das saure Milieu des Magensaftes werden die Proteine denaturiert. Dadurch können sie von Pepsin, einer Endopeptidase, leichter abgebaut werden. Im Duodenum werden die Proteinfragmente durch Trypsin und Chymotrypsin, die aus dem Pankreas sezerniert werden, weiter zu Tri- und Dipeptiden abgebaut. Carboxypeptidasen und Aminopeptidasen bauen die kurzen Aminosäureketten weiter zu einzelnen Aminosäuren ab. Die Aminosäuren, aber auch Tri- und Dipeptide werden über spezielle Rezeptoren aktiv in die Zellen des Darms transportiert und in den Blutkreislauf aufgenommen. Die aufgenommenen Nährstoffe gelangen ins Blut und werden über die Venen der Pfortader und schliesslich der Leber zugeführt.

Das große Intestinum ist ebenfalls noch einmal differenziert. Der Dickdarm besteht aus Caecum (Blinddarm), Kolon (Grimmdarm) und Rectum (Mastdarm). Hauptaufgabe des Dickdarms ist die Rückresorption von Wasser und Salzen. Die Schleimhaut des Dickdarms weist eine wesentlich geringere Oberfläche auf. Sie ist zottenlos, kann aber ebenfalls Substanzen absorbieren. Die Oberfläche wird in diesem Teil des Darms durch Einsenkungen (Lieberkühn-Krypten) vergrößert. Es werden dort vor allem Cellulose und Hemicellulose verdaut, welches die Bestandteile der Zell-

wände und der Intercellularsubstanz der Pflanzen sind. Da der Mensch und höhere Wirbeltiere nicht über Enzyme verfügen, die diese Polysaccharide spalten können, gelangen die aufgenommenen Pflanzenteile unangegriffen bis in den unteren Teil des Darms, wo sie vor allem im Blinddarm von Bakterien aufgespalten und zu niedrigen Fettsäuren, Milchsäure und Gasen (H_2 , CO_2 , Methan) metabolisiert werden (Gieseke und Hendrichx, 1973). Dieser Prozeß wird auch als Gärung bezeichnet. Ein Teil dieser Spaltprodukte wird dann je nach Größe im Blinddarm resorbiert. Pflanzenfresser, die über einen gut ausgebildeten Blinddarm verfügen, können pflanzliche Substanzen wesentlich besser verwerten als Carnivoren und der Mensch. Kaninchen nutzen die Syntheseleistung der Mikroorganismen des eigenen Dickdarms in besonderer Weise, indem sie die eigenen Exkremente verzehren. Dies wird als Koprophagie bezeichnet und ist für die Versorgung des Tieres mit wasserlöslichen Vitaminen wichtig (Fuller, 1984). Aufgrund der morphologischen Struktur des Kolons bei diesen Tieren kommt es zu einer Phasentrennung. Die Passage der flüssigen Phase, in der die kleinen Partikel enthalten sind, verzögert sich im Gegensatz zu der der groben Partikeln (Übersicht in Hörnicke, 1984).

Im Dickdarm findet bei allen Tieren eine Absorption von Wasser und einwertigen Elektrolyten statt, während der endgültige Kot eingedickt wird (Kay und Pfeffer, 1969). Für die Passage durch den Dickdarm brauchen kotpflichtige Partikel mindestens die dreifache Zeit gegenüber der Passage durch den Dünndarm. Mit der unterschiedlichen Nahrungsaufnahme verschiedener Tierarten hat sich im Laufe der Evolution auch die Ausbildung einzelner Abschnitte des Verdauungstraktes geändert. So befindet sich im Gastrointestinaltrakt von Herbivoren ein Bereich, in dem für Bakterien besonders günstige Lebensbedingungen herrschen. Diesem Bereich können entweder Verdauungsprozesse vorgeschaltet sein wie im Vormagen des Wiederkäuers oder auch nachgeschaltet, wie der stark ausgebildete Enddarm des Pferdes (Meyer, 1982; Übersicht in Pfeffer, 1987).

1.3 Die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes

Die Bakterienarten des tierischen Gastrointestinaltraktes stellen ein komplexes Ökosystem dar. Mehr als 400 Bakterienarten wurden im Kot eines Menschen identifiziert. Dabei überwiegen die anaeroben Bakterien. Der Magen, Duodenum, Jejunum und das obere Ileum enthalten normalerweise, d. h. wenn keine Infektion vorliegt, eine eher geringe Anzahl an Bakterien. Beim Menschen befinden sich weniger als 10^4 Organismen/ml in diesem Abschnitt. Die meisten dieser Bakterien werden mit jeder Mahlzeit aus dem Pharynx mit hinuntergespült.

Im Dickdarm dagegen befinden sich 10^{11} Bakterien/g Kot. Abbildung ?? gibt eine Übersicht über die Bakterienanzahl in den einzelnen Abschnitten des Verdauungstraktes. Bakterien des Verdauungstraktes befinden sich im Lumen und an den Zellen des Gastrointestinaltraktes, aber werden nicht über die Mucosa aufgenommen. Bakterien, die durch die Nahrungsaufnahme hinuntergeschluckt werden, gehen normalerweise im sauren Milieu des Magens zugrunde. Dadurch wird die normale Darmflora aufrechterhalten (Übersicht in Baron, 1996).

Enzyme, die von den intestinalen Bakterien produziert werden, spielen eine zentrale Rolle im enterohepatischen Kreislauf. Substanzen werden über diesen Kreislauf aufgenommen, in der Leber metabolisiert und in die Gallenblase transportiert. Danach werden sie zurück in das intestinale Lumen transportiert, wo sie entweder reabsorbiert werden und wieder in die Leber gelangen können oder ausgeschieden werden. Dabei können Substanzen mit polaren Gruppen, wie zum Beispiel Glucuronsäuren, Sulfate, Taurine, Glycine oder Glutathion so gut wie gar nicht mehr vom Darmepithel absorbiert werden. Enzyme, wie die β -Glucuronidase, die Sulfatase und verschiedene Glycosidasen dekonjugieren diese Substanzen. Die dabei entstehenden Produkte können dann wiederum absorbiert werden. Die Enzyme, die die Darmbakterien produzieren sind zum Beispiel wichtig für den Metabolismus von Vitaminen (Übersicht in Baron, 1996).

Bakterien können Nukleinsäuren absorbieren. Bei der großen Anzahl von Bakterien im tierischen Intestinum liegt daher die Vermutung nahe, dass die Darmbakterien in der Lage sein könnten, die in der Nahrung enthaltene fremde DNA, sowie andere Substanzen, aufzunehmen.

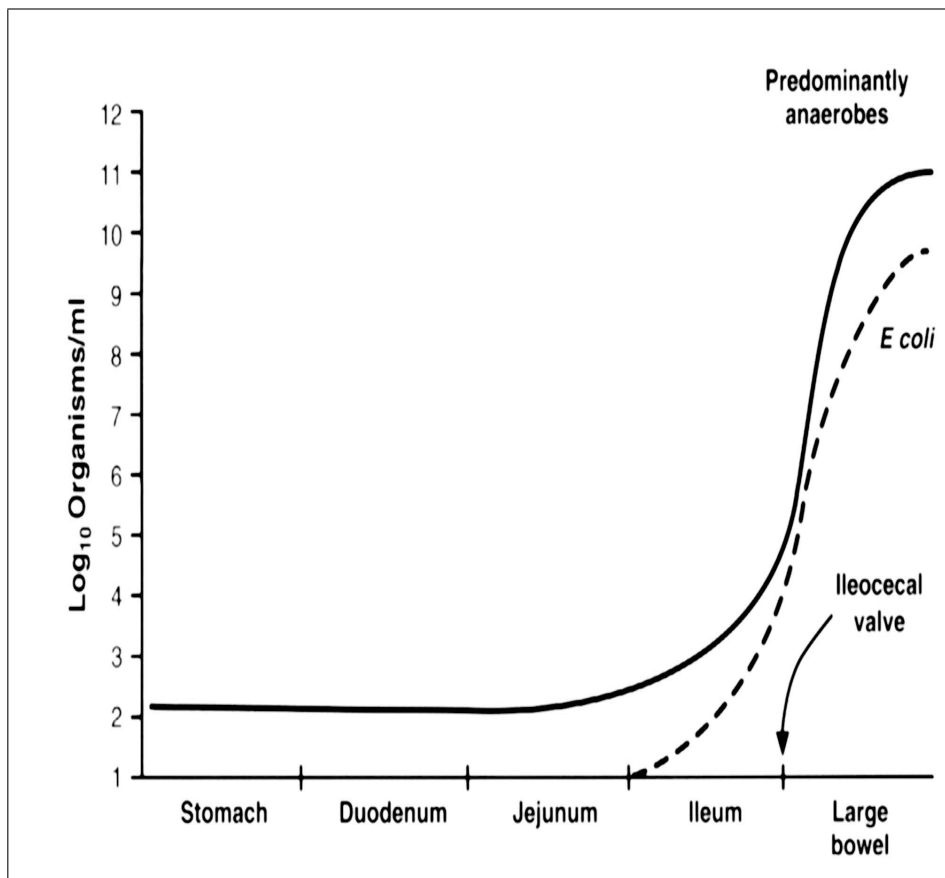


Abbildung 1: Konzentration der Darmbakterien in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes

aus: S. Baron, Medical Microbiology; fourth edition, 1996

1.4 Aufnahme von Substanzen über das Darmepithel

Wie im Abschnitt ?? auf Seite ?? schon erwähnt, werden gelöste, aber auch nicht gelöste Substanzen über das Darmepithel resorbiert. Schon im 19. Jahrhundert wurde beschrieben, dass von einem Hund aufgenommene Stärke in den ersten 3 Stunden unverändert bleibt. Diese unveränderten Stärkekörner wurden sowohl im Chymus, als auch im Blut gefunden (Herbst, 1844). Zu diesem Zeitpunkt wurde zum ersten Mal der Übertritt von festen, ungelösten Partikeln aus dem Darmlumen in den Organismus beobachtet (Herbst-Effekt). Diese Beobachtung wurde einige Jahre später von anderen Gruppen bestätigt (Oesterlen, 1846; Eberhardt, 1851). Diese Ergebnisse blieben ein halbes Jahrhundert vergessen, bis die Berlinerin Hirsch sie wieder aufgriff. Sie war die erste, die auch beim Menschen bewies, dass nach oraler Verabreichung von Stärkekörnern diese unverän-

dert im peripheren Blut nachweisbar waren (Hirsch, 1906). Darüber hinaus beobachtete sie die Ausscheidung von oral applizierten Stärkekörnern im Harn (Hirsch, 1908). Mit besseren Methoden wurden in jüngeren Untersuchungen oral verabreichte Stärkekörner zwischen den Enterocyten des Darmepithels, in Lymphgefäßen der Mucosa, der Submucosa und des Mesenteriums, sowie in Venen nachgewiesen (Volkheimer, 1964). Auch andere verfütterte Partikel wie Pollen, Sporen, Diatomeen, gefärbte Zellosepartikel, Asbestfasern, Eisenpulver und Holzschliff wurden im Chylus des *Ductus thoracicus* gefunden. Als Durchtrittsmechanismus für solide Mikropartikel wird die parazelluläre Passage durch das Darmepithel diskutiert (Übersicht in Volkheimer, 1993).

Man ging lange Zeit davon aus, dass Nukleinsäuren im Darm, die mit der Nahrung aufgenommen wurden, vollständig abgebaut würden. In den siebziger Jahren wurde eine vollständige Degradierung oral verabreichter DNA im Pansen von Stieren beschrieben (McAllan, 1982). Auch *in vitro* wurde ein schneller Abbau von Nukleinsäuren beobachtet. Dazu wurde DNA mit Extrakten aus den Pansen von Kühen, Schafen oder Stieren inkubiert. Die Abbauprodukte wurden säulenchromatographisch getrennt und die verschiedenen Eluate photometrisch quantifiziert. Innerhalb von 4 Stunden wurden die Nukleinsäuren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu nur noch ultrafiltrierbaren Oligo- und Mononukleotiden abgebaut (McAllan und Smith, 1973a, 1973b). Ebenso liessen sich nach Anwendung derselben Methode Oligonukleotide und Nukleoside im oberen Abschnitt des Dünndarms von Stieren, allerdings nicht mehr im terminalen Ileum nachweisen (McAllan, 1980). Der Autor ging damals davon aus, dass die im Darm abgebauten Nukleinsäuren entweder als Nukleotide absorbiert oder weiter katabolisiert würden. Es wurde angenommen, dass die Nukleotide durch entsprechende Phosphatasen im Darm dephosphoryliert und als Nukleoside über das Darmepithel transportiert würden (Centar und Behal, 1966; McAllan, 1980).

In den 60er Jahren wurde angenommen, dass die im Darm absorbierten Purine zur Nukleinsäuresynthese in den Geweben dienen könnten (Ellis und Bleichner, 1969). Nach Fütterung von Schafen mit ^{14}C markierter DNA wurden nach 48 Stunden fast 50% der absorbierten markierten Kohlenstoffatome in Geweben, hauptsächlich in der Leber, Milz, Blut, Thy-mus und Pankreas wiedergefunden. Über 40 % der Kohlenstoffatome wur-

den über den Urin als Harnsäure, Allantoin und Harnstoff ausgeschieden. Ebenso wurde ein Teil der Radioaktivität in anderen Stoffwechselprodukten nachgewiesen, zum Beispiel im ausgeatmeten CO₂ (Razzaque et al., 1981).

Die Frage nach dem Schicksal der mit der Nahrung aufgenommenen DNA wurde wiederum Ende der 80er Jahre in unserem Labor aufgegriffen. Es wurden neue und sensitivere Untersuchungsmethoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion und die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung angewandt. Als Modell-DNA wurde die DNA des Bakteriophagen M13mp18 an Mäuse verfüttert. Die DNA zeigte keine Homologie zum Mausgenom und war so im Mausorganismus gut detektierbar. Durch PCR-Analysen wurde festgestellt, dass Fragmente bis zu 1700 bp 8 Stunden lang im Dünndarm und bis zu 18 Stunden lang im Blinddarm nachweisbar waren. Ebenso konnten Fragmente bis zu 1692 bp im Kot detektiert werden (Schubbert, 1994). Im peripheren Blut der mit M13mp18 DNA gefütterten Mäuse wurden mittels Dot blot-Hybridisierungen etwa 0,01% der Modell-DNA nachgewiesen (Schubbert et al., 1994, 1997).

Durch FISH-Analysen konnte gezeigt werden, dass die verfütterte fremde DNA in Zellkernen des Darmepithels und Leukozyten in den Peyer'schen Plaques bis maximal 8 Stunden, in den Nuklei von Milz- und Leberzellen bis zu 24 Stunden nach Verabreichung detektierbar war. Dies liess vermuten, dass fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA über das Darmepithel in den peripheren Blutkreislauf und damit in die Organe gelangen kann. In der Milz konnten weiterhin Fragmente der M13mp18 DNA in kovalenter Bindung an genomische DNA der Maus gefunden werden. Es könnte sich in diesem Fall bei den der fremd DNA benachbarten genomischen Sequenzen der Maus um Pseudogene der Maus handeln (Schubbert et al., 1997). Nach Fütterung trächtiger Mäuse mit der Test-DNA konnte mit Hilfe der PCR- und der FISH-Technik die DNA in den verschiedenen Organen der Föten oder der neugeborenen Mäuse detektiert werden. In einigen Föten konnte die M13mp18 DNA in Assoziation mit Chromosomen und in einigen seltenen Fällen sogar mit beiden Chromatiden eines Chromosoms gefunden werden (Schubbert et al., 1998). Die an die Mutter oral verabreichte DNA konnte nicht in allen Zellen des Fötus gefunden werden, sondern nur in einigen Zellgruppen. Diese Ergebnisse wurden als Hinweis auf einen diaplazentaren Übertragungsmechanismus

der verfütterten DNA gedeutet und nicht als einen Transfer über die Keimbahn.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach oraler Verabreichung des Plasmids pEGFP-C1 an Mäuse erzielt. Dieses Plasmid besitzt ebenfalls keine homologen Sequenzen zum Mausgenom. Nach Southern-Transfer konnten Fragmente bis zu 700 bp in einer Zeitspanne von bis zu 8 Stunden detektiert werden. Mittels PCR-Analysen konnten Fragmente bis zu 1277 bp in Leber, Milz und Niere bis zu 8 Stunden nachgewiesen werden. Im peripheren Blut wurden mit Hilfe dieser Methode gfp-spezifische Fragmente mit einer Länge von bis zu 398 bp innerhalb von 3 Stunden detektiert. Durch FISH-Analysen konnten Fragmente des verfütterten Plasmids bis zu 8 Stunden in der Darmwand, der Leber, der Milz und der Niere nachgewiesen werden. Bei Expressionstudien in den Organen der gefütterten Tiere wurden keine Hinweise auf eine Expression des „green fluorescent protein“ gefunden. Wie schon in vorherigen Versuchen gezeigt, fand auch nach Fütterung des gfp Plasmids über acht Generationen kein Transfer über die Keimbahn statt (Hohlweg und Doerfler, 2001).

Nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern wurden Fragmente des pflanzenspezifischen Gens für die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) in Fragmentgrößen bis zu 2100 bp in den oberen Darminhalten nach Southern-Transfer-Analysen nachgewiesen. In Kotproben konnten bis zu 3 Stunden nach Fütterung noch Fragmente mit einer Größe von 1516 bp mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion detektiert werden (Hohlweg und Doerfler, 2001). Der Nachteil bei diesen Versuchen verglichen mit der Verabreichung der Plasmid DNA ist allerdings, dass sowohl die aufgenommene Menge des speziellen Gens, als auch der Aufnahmezeitpunkt nicht genau bestimmt werden konnten. Auch in verschiedenen Organen konnte das Rubisco-Gen nachgewiesen werden. Die Detektion des Rubisco-Gens war nicht in allen Experimenten möglich, da eine viel kleinere Menge des Gens aufgenommen werden konnte als nach Fütterung des Plasmids pEGFP-C1. Ein 337 bp großes Fragment konnte mit Hilfe der PCR-Methode in Leber und Milz nach viertägiger Fütterung und in der Milz nach zweitägiger Fütterung mit Sojablättern amplifiziert werden. Größere Fragmente waren nicht amplifizierbar. Auch mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten keine Rubisco spezifischen Fragmente im Darmepithel detektiert werden (Hohlweg und Doerfler, 2001). Diese Er-

gebnisse zeigen, dass über verspeistes Obst und Gemüse aufgenommene DNA beispielsweise einen längeren Zeitraum benötigt, um in den Organen angereichert und so detektierbar zu werden als in Puffer gelöste oral verabreichte DNA, da diese in größeren Mengen verabreichbar war.

1.5 M-Zellen als Eintrittspforte für Antigene und Mikroorganismen in den Organismus

Der Gastrointestinaltrakt der Säuger besitzt ein eigenes Immunsystem, so dass der Darm einer ständigen Kontrolle unterzogen ist. Durch die Nahrungsaufnahme wird Pathogenen das Eindringen in den Organismus sehr leicht gemacht. Eine Schutzfunktion ist demnach von großer Bedeutung, da der Darm mit seiner großen Oberfläche ständig Kontakt zu Mikroorganismen sowie anderen Antigenen, Nahrungsstoffen und Toxinen hat. Das sogenannte „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) ist das größte lymphatische Organ des Organismus und bildet das immunkompetente Lymphgewebe der Mucosa des Darms. Es wird aus Lymphozyten und Makrophagen der Peyerschen Plaques, sowie einzelnen Lymphfollikeln gebildet (Bienenstock et al, 1978). Die nach ihrem Entdecker Johann Konrad Peyer benannten Peyerschen Plaques wurden schon vor über 300 Jahren als Ansammlung von Lymphfollikeln im Darm beschrieben. Die offizielle anatomische Bezeichnung lautet „folliculi lymphatici aggregati“, in der zum Ausdruck kommt, dass ein Peyerscher Plaque von mindestens zwei, aber häufig bis zu 100 Lymphfollikeln gebildet wird (Kraehenbuhl und Neutra, 1992).

Antigene, die mit der Nahrung in das Darmlumen gelangen, sind vom GALT durch eine dünn-schichtig epitheliale Barriere getrennt. Um eine Immunantwort auslösen zu können, müssen die Antigene erst durch das Epithel transportiert werden, bevor sie den Zellen des Immunsystems präsentiert werden können. Die Immunantwort wird von immunkompetenten Zellen im lymphoiden Gewebe initiiert, den sogenannten M-Zellen. Diese Zellen sind ausschliesslich im Epithel über dem Mucosa assoziiertem Lymphgewebe (FAE: „follicle associated epithelium“) lokalisiert (Owen, 1977; Rosner und Keren, 1984; Lowden und Heath, 1995).

M-Zellen wurden erstmals im Appendix von Kaninchen (Bockmann und Cooper, 1973) und in menschlichen Peyerschen Plaques beobachtet (Owen

und Jones, 1974). Die Bezeichnung der M-Zellen kommt von der Struktur der gefalteten (= microfold) Oberflächenmembran. Auf der apikalen Membran besitzt dieser Zelltyp sowohl eine geringere Anzahl und kürzere Mikrovilli als auch eine dünnere Glycocalyx als die benachbarten Enterozyten. Dadurch unterscheiden sich M-Zellen morphologisch von Enterozyten (Ermak und Giannasca, 1998). Die basolaterale Membran ist eingestülpt und bildet so eine taschenartige Struktur, in die Lymphozyten und Makrophagen einwandern können (Neutra und Kraehenbuhl, 1996). Da der cytoplasmatische Bereich zwischen der taschenartigen Struktur und der apikalen Membran im Lichtmikroskop nur sehr dünn und deswegen fast nicht erkennbar war, wurde die Bezeichnung der M-Zellen 1977 von „microfold“ in „membranöse“ Zellen geändert (Owen, 1977). Aufgrund der phagozytierenden Eigenschaften der M-Zellen ging man davon aus, dass es sich um mesenchymale Zellen handelt. M-Zellen sind später als epitheliale Zellen charakterisiert worden, die „Tight Junctions“ und Desmosomen zu ihren benachbarten Enterocyten ausbilden (Madara et al., 1984; Gebert und Bartels, 1991).

Wie bzw. wann M-Zellen gebildet werden, ist nicht bekannt und wird noch diskutiert. Es gibt zwei Hypothesen: Entweder differenzieren sich M-Zellen wie alle Zellen von multipotenten Stammzellen oder Zellen aus den Krypten wandern zum Follikel assoziiertem Epithelium (FAE). Diese Zellen bilden dann die für M-Zellen typischen Charakteristika aus (Ermak und Giannasca, 1998). Es gibt noch keine universellen M-Zell-Marker (Sierro et al., 2000). Allerdings ist es in einigen Spezies möglich M-Zellen durch die Expression von mesenchymalen intermediären Filamenten zu detektieren (Jepson et al., 1992; Gebert et al., 1992, 1994). Die Hypothese, dass M-Zellen von Zellen initiiert werden, die von den Krypten ins FAE wandern wird durch Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass Zellen in den Villi zu Enterocyten und endokrinen Zellen differenzieren. Zellen auf der Seite des „mucosal associated lymphoid tissue“ (MALT) differenzieren zu Enterocyten und M-Zellen (Bye et al., 1984; Savidge et al., 1995; Karneis et al., 1996; Gebert et al., 1999; Kraehenbuhl et al., 2000). Weiterhin ist festgestellt worden, dass die Anzahl der M-Zellen nach Antigen Kontakt zunimmt (Borghesi et al., 1996; Kernéis et al., 1997). Mesenchymale Zellen sind bekannt dafür, dass sie eine große Rolle bei der Differenzierung von epithelialen Zellen in den Villi spielen (Kedinger et al., 1998).

Auch andere Experimente unterstützen die These, dass M-Zellen von aus den Krypten ins FAE gewanderten Zellen initiiert werden durch die Beobachtung, dass M-Zellen bei einer Infektion leichter im Follikel assoziiertem Epithelium detektierbar sind (Clark et al., 1993; Bye et al., 1984; Gebert et al., 1999). Die Anzahl der M-Zellen variiert stark bei unterschiedlichen Spezies. Beim Menschen sind etwa 5% des FAE M-Zellen, bei der Maus ca. 10%.

Die Aufgabe der M-Zellen ist die endozytotische Aufnahme, der transcytotische Transport und die exocytotische Freilassung der luminalen Substanzen in den interzellulären Raum. Mikroorganismen wie Bakterien, Hefe oder Protozoen werden von den M-Zellen phagozytiert, in die Tasche entlassen und von den in dieser Tasche befindlichen mononuklearen Zellen „angegriffen“. Viren werden durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und ebenfalls in der Tasche den Lymphozyten präsentiert (Ermak und Giannasca, 1998). Lösliche Substanzen werden von den M-Zellen pinocytiert (Owen, 1977; Liebler et al., 1995). Die kleinsten Partikel, die von diesem Zelltyp aufgenommen werden können, besitzen eine Größe zwischen 20 nm und 200 nm; die größten Partikel sind bis zu 10 μm groß (Ermak und Giannasca, 1998). An der Bindung der Partikel an M-Zellen scheinen sowohl unspezifische als auch spezifische Mechanismen beteiligt zu sein. Da bei diesen Zellen sowohl die Schleimschicht als auch die Glycocalyx im Vergleich zu benachbarten Enterocyten deutlich reduziert ist, wird der Kontakt von luminalen Partikeln zu M-Zellen vereinfacht (Kato und Owen, 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass inerte Partikel wie Kohle- und Latexpartikel, vorzugsweise an M-Zellen binden und von diesen aufgenommen werden (Pappo und Ermak, 1989; Jepson et al., 1996). Der Mechanismus der Antigen-M-Zell-Bindung ist in den meisten Fällen unbekannt. Wahrscheinlich spielen bei diesen Interaktionen die Glycosylierungsmuster auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen eine wichtige Rolle, die sowohl von Spezies zu Spezies als auch in unterschiedlichen Darmabschnitten variieren (Lelouard et al., 1999). Nur die rezeptorvermittelte Bindung von Viren ist teilweise untersucht. Einige Reovirustypen zum Beispiel vermögen über das virale Hämagglutinin (σ_1 Protein) an M-Zellen der Maus *in vivo* zu binden (Wolf et al., 1983).

Der Transport von Partikeln durch M-Zellen wurde *in vitro* untersucht. Gullberg und seiner Arbeitsgruppe ist die Stimulation von CaCo-2-Zellen

zu M-Zellen in Kultur gelungen (Gullberg et al., 2000). Durch Kokultivierung von CaCo-2-Zellen mit humanen B-Lymphocyten (Raji-Zellen) können Zelltypen induziert werden, die morphologisch und funktional ähnlich den M-Zellen sind (Gullberg et al., 2000; van der Lubben et al., 2002). Bei Untersuchungen der Transportgeschwindigkeit von Partikeln durch M-Zellen verglichen mit den CaCo-2-Zellen wurde festgestellt, dass der Transport temperatur- und größenabhängig ist. Allerdings verlief der Transport, auch von großen Molekülen, durch Monolayer, die M-Zellen enthielten, sehr viel schneller verglichen mit Monolayern, in denen nur CaCo-2-Zellen enthalten waren (Liang et al., 2001).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Aufnahme und das Verhalten fremder DNA in Zellen höherer Eukaryonten ist von grundlegender biologischer Bedeutung. Fremde DNA spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorinduktion durch Viren, bei der Erzeugung transgener Organismen und natürlich in der Evolution. Es gibt dabei verschiedene Wege für die fremde DNA in einen Organismus einzudringen. Ein sehr intensiv untersuchter Weg ist die Infektion mit Mikroorganismen. Ein weiterer natürlicher Weg für fremde DNA in den Organismus zu gelangen ist mit der Nahrungsaufnahme. Weitere Möglichkeiten DNA in fremde Organismen einzubringen ist die Transfektion von Zellen in Kultur, durch Injektion von somatischen und generativen Zellen und durch Transplantationen.

In dieser Arbeit sind verschiedene sensible Methoden angewandt worden, um das Schicksal von mit der Nahrung aufgenommener DNA im Säugerorganismus zu untersuchen.

Anfang der neunziger Jahre konnte erstmals gezeigt werden, dass fremde mit der Nahrung aufgenommene M13mp18 DNA nicht vollständig im Gastrointestinaltrakt von Mäusen degradiert wird. Vielmehr wird sie fragmentiert. Von den Fragmenten gelangten ca. 2% über das Darmepithel in den Blutkreislauf und so in die Organe (Schubbert et al., 1994, 1997).

Nach Fütterung trächtiger Mäuse kann mit der Nahrung aufgenommene DNA über die Plazenta in die Föten gelangen (Schubbert et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden nach oraler Applikation des Plasmids pEGFP-C1 erzielt (Hohlweg und Doerfler, 2000).

Die Persistenz oral applizierter fremder DNA wie M13mp18, pEGFP-C1, Ad12-DNA und dem Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase Gen war ähnlich. Die Fragmentierung und Aufnahme der fremden DNA ist demnach völlig unabhängig von der Form und Größe der DNA.

Aus diesen Beobachtungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Sind frühere Ergebnisse (Schubbert et al., 1994, 1998; Hohlweg und Doerfler, 2000) reproduzierbar?
- Kann fremde oral applizierte DNA in den Organismus aufgenommen werden?
- Wie verläuft die Persistenz oral applizierter Proteine im Gastrointestinaltrakt?

Diese Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene sensible Methoden geklärt werden. Dazu wurden die Restriktions- und Southern-Transfer-Methode, die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und die Western-transfer-Methode angewandt.

2 Material

2.1 Tiere

C57Bl6/J	Harlan-Winkelmann
CB20	hauseigene Zucht

2.2 Zelllinien, Bakterien und Plasmide

2.2.1 Zelllinien

BHK21 (Nierenzellen neugeborener Hamster)	American Type Culture Collection
CaCo 2	ATCC, Nr. CCL 10 Rockville, USA
Hela	ATCC, Nr. CCL 2 Rockville, USA

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsendonukleasen

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche Diagnostics, Mannheim, New England Biolabs Inc., USA und Fermentas MBI, St. Leon-Roth bezogen. Der Restriktionsverdau erfolgte nach den Angaben des Herstellers in den entsprechenden Reaktionspuffern.

2.3.2 Sonstige Enzyme

DNA-Ligase (aus T4 Phagen)	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
DNaseI (RNase frei)	Qiagen, Hilden
Klenow Polymerase (aus <i>E. Coli</i>)	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Calbiochem-Behring Corp. La Jolla, USA
Proteinase K (<i>Tritirachium album</i>)	Sigma, Deisenhofen
RNaseA	Sigma, Deisenhofen
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Trypsin	United States Biochemical Corporation, USA

2.3.3 Kits

Biotin-Nicktranslation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Blood-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick spin Gelextraction-Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Nukleinsäuren**2.4.1 Radioaktiv markierte Nukleotide**

Desoxyribonukleosid-5´	New England Nuclear,
[$\alpha^{32}\text{P}$]Triphosphat	Du Pont, Dreieich
([$\alpha^{32}\text{P}$]-dNTPs)	
spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mM	

2.4.2 Sonstige Nukleinsäuren

Desoxyribonukleosid-5-Phosphate	Promega, Mannheim
Desoxyribooligonukleotid-Primer	Gibco, Paisley, Schottland
	Sigma, Deisenhofen
Hexa-Oligonukleotide (dN ₆)	Roche Diagnostics, Mannheim
Heringsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
pUC-Mix	Fermentas MBI, St. Leon-Roth
DNA-Basepairladder	Fermentas MBI, St. Leon-Roth

2.5 Antikörper und Konjugate

Alkalische Phosphatase Avidin D	Roche Diagnostics, Mannheim
Avidin-FITC	Vector Laboratories, Burlingham, USA
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector Laboratories, Burlingham, USA

2.6 Chemikalien

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma Chemicals, Deisenhofen in den Reinheitsgraden „p.a.“ bzw. „reinst“ bezogen.

Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Seakem, Biozym Diagnostik, Hameln
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA Merck, Darmstadt
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit
Bacto-Yeast Extract	Difco, Detroit, USA Gibco, Paisley, Schottland
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Baker, Deventer, NL
Cäsiumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DABCO (1,4-Diazobicyclo(2.2.2)octan)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs AG, Basel, Schweiz
Dextransulfat	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dodecylsulfat-Na-Salz(SDS)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Calbiochem, Los Angeles, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Cytogen, Berlin
Ficoll Isopaque ^R	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin (95%)	Merck, Darmstadt

Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan- sulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Glücksklee, Hamburg
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride)	Roche, Diagnostics, Mannheim
Phenol	Merck, Darmstadt Fluka, Buchs AG, Basel, Schweiz
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Sehadex, G-50 (medium)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Silikonlösung	Sigma, Deisenhofen
Siliziumoxid	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N-Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Wasser, HPLC-grade	Merck, Darmstadt
x-Phosphat (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylencyanol-Blau	Fluka, Buchs AG, Basel, Schweiz

2.7 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (dH₂O) aus einer Millipore-Super-Q-Filtrationsanlage angesetzt und im Anschluss autoklaviert oder steril filtriert.

Aufschlusspuffer zur DNA Präparation	10 mM Tris-HCL, pH 8 0,2 mM EDTA, pH 7,5 10 mM NaCl 1% SDS 1,33Proteinase K/ml
Blocking-Lösung zur <i>in-situ</i> -Hybridisierung	3% Milchpulver 4×SSC
Chloroform	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
Denaturierungslösung für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	70% Formamid in 2×SSC
Denaturierungslösung für Southern Transfer	0,4 M NaOH
Denhardt´s Reagenz (50×)	1% Ficoll 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA
Depurinierungslösung für Southern Transfer	0,2 M HCl
Desoxyribonukleosid-5´-triphosphate	10 mM in dH ₂ O
Dot-Blot Blocking-Lösung	0,5% Milchpulver in Puffer 1
Dot-Blot Puffer 1	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 mM MgCl ₂
Dot-Blot Puffer 2	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-Hcl, pH 9,5
Dot-Blot Verdünnungspuffer	0,1 mg/ml Lachsspermien-DNA in 6×SSC

Einfrriermedium für Zellen	15% Glycerin 10% FCS 75% Dulbeccos Medium
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml in dH ₂ O
Fixierlösung	Methanol/Essigsäure 3:1
Hybridisierungspuffer für <i>in-situ</i> - Hybridisierung von Gewebeschnitten	50% Formamid (deionisiert) Dextransulfat 1× Denhardt´s Lösung 10 mg/ml Ls-DNA in 4×SSC
Hybridisierungspuffer für <i>in-situ</i> - Hybridisierung von Zellpräparationen	10%Dextransulfat 0,1% SDS 2×SSC, pH 7,0 50% Formamid (deionisiert) 0,17 mg/ml Ls-DNA
Hybridisierungspuffer für Southern Transfer	2% Dextransulfat 10% Milchpulver 2×SSC, pH 7,0 0,17 mg/ml Ls-DNA
IPTG-Stammlösung	0,1 M IPTG in H ₂ O
Konservierungslösung für <i>in-situ</i> - Hybridisierung	90% Glycerin 10% PBS 2,3% DABCO
LB-Agar	LB-Medium mit 12,5 g/l Bacto-Agar
LB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto Yeast-Extract 5 g/l NaCl
Lysozym-Lösung	12,5 mg/ml in dH ₂ O
Milchpulver Mix (10×)	5% Magermilchpulver 10% SDS

Oligo-Labeling-buffer (5×OLB)	50 mM Tris-HCL, pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 5 mM DDT 0,2 M HEPES, pH 7,0 1,25 mg/ml Hexanukleotide d(N) ₆
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl ₂ 1 mM KCl 8 mM NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O 1 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O 1 mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O
PBS-d	PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
Phenol	gesättigt mit 100 mM Tris-HCL, pH 8,0
Prähybridisierungslösung für Southern Transfer	2×SSC 1×SDS 0,5% Magermilchpulver 0,5 mg/ml Ls-DNA
Proteinase K-Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
4×Proteinladepuffer	260 mM Tris-HCl, pH 6,8 45,6% Glycerin 8% SDS 150 mM β-Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau
Probenauftragspuffer für Agarose Gele	10 mM EDTA 50% Glycerin 1% SDS 1% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
RNase A	10 mg/ml RNase A 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 15 mM NaCl ₂

Saccharose	25% Saccharose in 0,05 M Tris-HCl, pH 5
SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel)	17,5% Acrylamid (30%) 123 mM Tris-HCl, pH 6,8 1% SDS 0,8% APS 0,08% TEMED
SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel)	41,3% Acrylamid (30%) 370 mM Tris-HCl, pH 8,8 1% SDS 0,7% APS 0,07% TEMED
Silizionoxidlösung	10 g Siliziumoxid in 50 ml d H ₂ O suspendieren
Siliziumoxid-Lösungspuffer	12 g Guanidiniumthiocyanat 10 ml 0,1 mM Tris-HCL, pH 6,4 2,2 ml 0,2 M EDTA, pH 8,0 0,26 g Triton X-100
Siliziumoxid-Waschpuffer	12 g Guanidiniumthiocyanat in 10 ml 0,1 M Tris-HCL, pH 6,4
SSC (20×)	150 mM NaCl ₂ 15 mM Na-Citrat
STET-Lösung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 0,5% Triton X-100 8% Saccharose
Sucrose-Lösung	25% Sucrose 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0
TBE (1×)	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 70 mM Borsäure 25 mM EDTA
1×TBS	10 mM tris-HCl, pH 8,0 0,15 mM NaCl
TE	10 mM Tris-HCL, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0

TES-Puffer	100 mM NaCl ₂ 10 mM Tris-HCL, pH 8,0 1 mM EDTA
Tris-Saline	14 mM NaCl ₂ 5 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,1% Glukose (w/v) 0,03% Penicillin (w/V) 0,02% Streptomycin (w/v)
Trypsin-Lösung	0,25% Trypsin in PBS-d 1,35 mM EDTA 0,03% Penicillin 0,02% Streptomycin
TSM-Puffer	0,5% NP40 (w/v) 100 mM NaCl ₂ 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 mM MgCl ₂
Western-Blockpuffer (pro 250 ml)	5% Magermilchpulver 1×TBS 0,1% Tween 20
Western-Bltpuffer, pH 8,3	144,19 g Glycin 30,29 g Tris
Western-Waschpuffer	1×TBS 0,1% Tween 20

2.8 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Medicell, London, UK
Einweggefäße, 10 ml	Greiner, Frickenhausen
Einweggefäße, 15 ml	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Einweggefäße, 50 ml	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Färbeküvetten	Glaswerk-Wertheim, Wertheim
Filterpipettenspitzen	SLG, Gaufing
Fix-O-Gum	Marabu, Tamm
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Gewebekulturschalen (60 × 15 cm)	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Kimwipes, Papierücher	Kimberly Clark, EEC
Kleinbilddiafilme (24 × 36), EPL 400 x	Kodak, Stuttgart
Küvetten, (Quarz)	Hellma; vonGebr. Faust, Köln
Leucosep ^R -Zentrifugengefäße	Greiner, Frickenhausen
Nylonmembran (positiv geladen)	Qiagen, Hilden Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger (Super Frost)	Roth, Karlsruhe
Parafilm „M“	American Can Comp., Greenwich, USA
PCR Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Petrischalen (Polystyrol)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen

Präparationsbestecke	Bayha, Tuttlingen
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, X-OMATTMAR 5	Kodak, Stuttgart
Skalpellsklingen	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter-Aufsätze (0,22 µm und 0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim
Zentrifugengefäße	Nalge, Rochester, USA

2.9 Laborgeräte

Alle hier nicht näher bezeichneten Geräte entsprechen der Standard-Laboraausstattung.

Entwicklermaschine, AGFA Curix 60	AGFA-Gavaert, Mortsel, Belgien
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Inkubator für Bakterienkulturen	Nex Brunswick Scientific, Edison, USA
Inkubator, Cytoperm Typ 8080	Heraeus, Düsseldorf
Mikroskop Typ BHS	Olympus, Hamburg
PCR-Maschinen	Perkin Elmer Cetus DNA Thermal cyclers
Phasenkontrastmikroskop	Leitz, Wetzlar
Photometer, Beckmann DU 640	Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Villier-le-Bel, Frankreich
Rotationsmikrotom	Microm, Heidelberg
Sonificator, Branson Sonifier, Modell B-12	Branson Sonic Power, Danbury, USA

Sterilbank, Bio Gard Hood, antair BSK 4	Baker Company, Stanford, USA
Video-Dokumentationssystem (CS1)	Cybertech, Berlin
Zentrifugen:	Heraeus, Düsseldorf
Cryofuge 5000	
Cytozentrifuge	Shandon, Pittsburg, USA
GLC-2B	Sorvall Instruments, Bad Homburg
Labofuge GL	Heraeus, Düsseldorf
MC 13	Sorvall Instruments, Bad Homburg
TC 6	Sorvall Instruments, Bad Homburg
Ultrazentrifuge L8 55	Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, USA

2.10 Das pEGFP-C1 Plasmid

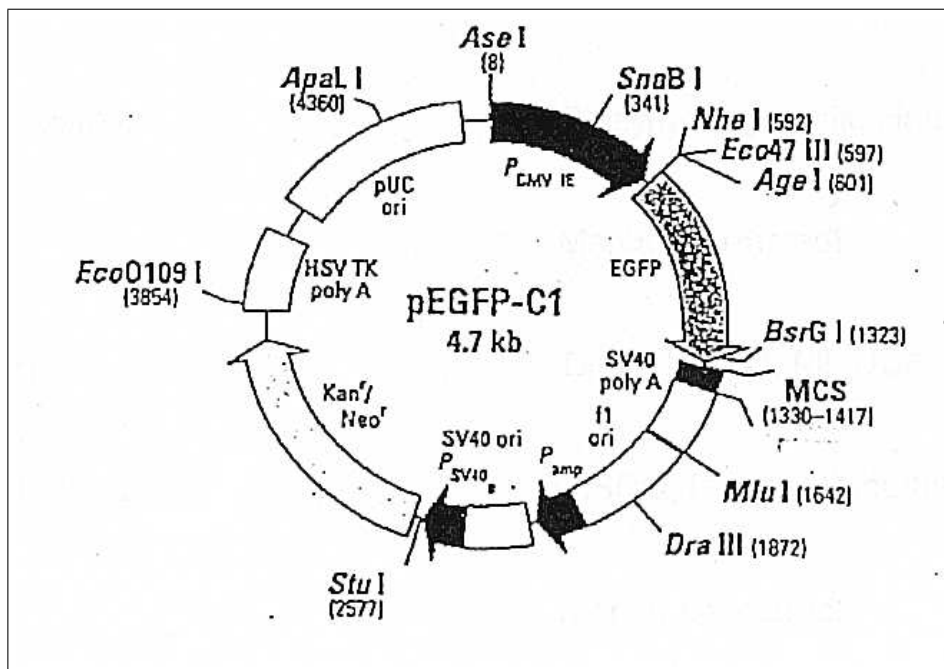


Abbildung 2: Das Plasmid pEGFP-C1

Für die Experimente wurde das Plasmid pEGFP-C1 verwendet. Es ist eine Variante des Wildtyp GFP. Dieses Plasmid zeigt ein breites Fluoreszenzspektrum unter UV-Licht und lässt sich in Säugerzellen gut exprimieren.

ren. Das Plasmid ist 4,7 kb groß, doppelsträngig und trägt das Gen für das „green fluorescent protein“ der Qualle *Aequorea victoria* unter der Kontrolle des Cytomegalie (CMV) Promotors. Die „multiple cloning site“ liegt zwischen der GFP-codierenden Sequenz und dem Simian Virus 40 (SV40) poly A-Gen. Das Plasmid enthält weiterhin ein Kanamycin-Resistenzgen. Ein bakterieller Promotor 5' dieses Gens exprimiert die Resistenz in *E.coli*-Bakterien. Zur Replikation in *E.coli*-Bakterien enthält das Plasmid den pUC 19 origin und einen f1 origin zur Einzelstrang-DNA-Synthese.

2.11 Sequenzen und Lage der verwendeten synthetischen Oligonukleotide im Gen des „green fluorescent protein“

Die hier aufgeführten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL und Sigma Ark bezogen. Sie wurden in 5' → 3' Richtung notiert und als PCR-Primer verwendet.

Primer 42 sense	CCC ATA TAT GGA GTT CCG
Primer 1319 anti-sense	CGT CCA TGC CGA GAG TGA TCC
Primer 530 sense	CGG TAG GCG TGT ACG GTG GG
Primer 611 sense	CCA TGG TGA GCA AGG GCG AG
Primer 1077 anti-sense	GGC CAT GAT ATA GAC GTT GTG G
Primer 581 sense	CGT CAG ATC CGC TAG CGC TAC
Primer 1299 anti-sense	CCC GGC GGC GGT CAC GAA CTC C
Primer 724 sense	GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC C
Primer 924 anti-sense	GCG CGG GTC TTG TAG TTG CCG

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

Für PCR-Analysen wurden die in Tabelle ?? angegebenen Primer verwendet. Die Primer für den sense-Strang und den antisense-Strang wurden untereinander gemischt. Die dadurch entstandenen Primerpaare und die amplifizierten Fragmentlängen sind in Abbildung ?? angegeben. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde ein großes, ein mittleres und ein kleines Primerpaar ausgewählt.

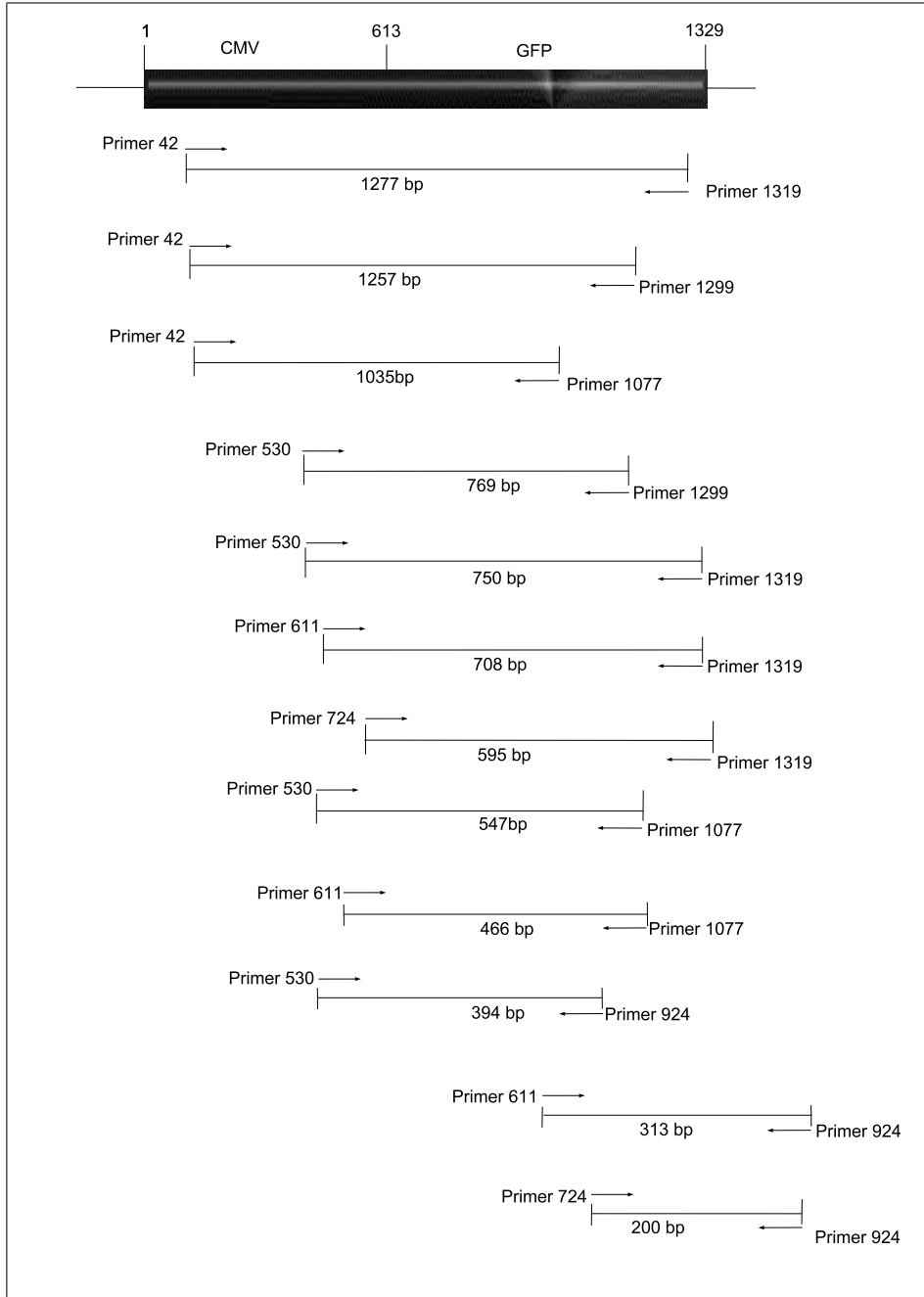


Abbildung 3: Lage aller verwendeten Primerpaare

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die für diese Arbeiten verwendeten Medien wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Benutzung auf 37°C bzw. Raumtemperatur erwärmt.

3.2 Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien waren ausschliesslich adhärent wachsende Zellen, die als „Monolayer“-Kulturen in Dulbecco´s modifiziertem Medium (Bablanian et al., 1965) mit 10% v/v fötalem Kälberserum (FCS) in Gewebekulturflaschen kultiviert wurden. Je nach Art der Zelllinie wuchsen die Zellen bei 37°C in zwei bis drei Tagen zu einem konfluenten Zellrasen und wurden dann auf neue Gewebekulturflaschen verteilt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS-d gewaschen und durch Zugabe von 2 ml einer 25%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend im Verhältnis 1:2 bis 1:10 in neue Gewebekulturflaschen mit frischem Medium überführt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.3 Kultivierung primärer Milzzellen

Zur Kultivierung primärer Milzzellen wurde eine Maus (Stamm C57Bl6/J) in einer CO₂-Atmosphäre getötet. Unter einer Sterilbank wurde das Abdomen geöffnet und die Milz herauspräpariert. Das Organ wurde in PBS-d gewaschen und die Kapsel mit einer Rasierklinge zerstört. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden die Organe vorsichtig durch ein Zellsieb mit einer Porengrösse von 7 µm in eine Petrischale, die 10 ml Dulbecco´s Medium mit 10% FCS enthielt, gedrückt. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren weiter vereinzelt. Die Zellsuspension wurde dann in eine Gewebekulturschale mit Dulbecco´s Medium, welches 10% FCS enthielt, überführt und bei 37°C 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.4 Passage primärer Milzzellen

Primäre Milzzellen sind keine adhärenenten Zellen, sondern verbleiben als eine Zellsuspension. Nach einer Inkubation von 12 Stunden bei 37°C hatte sich die Anzahl der Zellen verdoppelt. Um zu testen, wieviele Zellen noch lebten, wurden 10 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trypanblau diffundiert durch die Zellmembranen toter Zellen und färbt diese blau. Es findet keine Diffusion durch die Zellmembranen lebender Zellen statt. Unter dem Mikroskop konnte so die Anzahl der lebenden Zellen ermittelt werden. Betrug die Anzahl der lebenden Zellen noch mehr als die Hälfte, wurden die Zellen 10 Minuten bei 1.300 rpm bei Raumtemperatur pelletiert. Das alte Medium wurde verworfen und das Zellpellet in PBS-d resuspendiert. Die Zellen wurden erneut, wie oben beschrieben, pelletiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine frische Gewebekulturschale mit neuem Medium überführt und erneut bei 37°C inkubiert. Primäre Milzzellen konnten so bis zu 14 Tagen überleben.

3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen eines konfluent gewachsenen Monolayers zweimal mit PBS-d gewaschen und mit einer 25%igen Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 2 ml FCS gemischt, um die Trypsinwirkung zu inhibieren, und 10 Minuten bei 1.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in verschraubbare Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde 1 ml 37°C warmes Medium mit 20% FCS zu den gefrorenen Zellen pipettiert und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufgetaut. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in frisches Medium mit 20% FCS überführt und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Glycerin-haltige Medium gegen frisches Medium ausgetauscht, dem nur noch 10% FCS zugesetzt wurden.

3.6 Transfektion von Zellen

(Graham und van der Eb, 1973; Southern und Berg, 1982)

Für alle Transfektionsexperimente wurden ausschliesslich gut gewachsene Zellen verwendet, die zum Zeitpunkt der Transfektion semikonfluent gewachsen waren. Einen Tag vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 60 mm Gewebekulturschalen ausgesät. Zur Transfektion wurden 15 μg des zu testenden Plasmids in sterilem Wasser gelöst. Das Endvolumen betrug 64 μl . Danach wurden 36 μl einer 2 M CaCl_2 -Lösung dazupipettiert und gut gemischt. Die DNA-Lösung wurde in 200 μl HBS-Lösung getropfelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bildeten die DNA und das CaCl_2 in Anwesenheit des Phosphats Komplexe, die über die Zellmembranen endozytiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung in das Medium getropfelt. Zwei bis drei Stunden danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen mindestens 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden je eine negative Kontrolle (nicht-transfizierte Zellen) und eine positive Kontrolle (dazu wurden Zellen mit schon getestetem Plasmid transfiziert) angesetzt.

3.6.1 Inkubation von primären Milzzellen mit Plasmid-DNA

Um die Bereitschaft von primären Milzzellen zur Aufnahme fremder DNA zu testen, wurden 25 μg des Plasmids pEGFP-C1 zu 5 ml Medium pipettiert. Alle 30 Minuten wurde der Monolayer vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmässige Verteilung der DNA zu gewährleisten. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen bei 1.300 rpm 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase zugesetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die DNase mit 20 mM EDTA inhibiert und die Zellen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde direkt eine Kernextraktion durchgeführt.

3.6.2 Extraktion der Zellkerne

Zur Extraktion der Zellkerne aus den Milzzellen wurden diese 5 Minuten bei RT und 1.300 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 ml Tris-saline resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C bei 1.300 rpm zentrifugiert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen

in 10 ml TSM-Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. NP40, das dem TSM-Puffer zugesetzt war, wirkt als Detergens und zerstört Lipid-schichten. Dabei werden ausschliesslich die Zellmembranen, aber nicht die Kernmembranen angegriffen. Während der Inkubationszeit wurde das Reaktionsröhrchen mehrere Male invertiert, um zu gewährleisten, dass alle Zellen gleichmässig von Puffer umgeben sind. Nachdem die Zellmembranen zerstört waren, wurde das Gemisch 5 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellkerne wurden in 1 ml TES-Puffer resuspendiert. Durch den hohen Salzgehalt in dem Puffer wurden die Kerne stabilisiert. Zur Analyse wurden die Kerne auf einen Objektträger aufgespritzt und mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Abschnitt ?? auf Seite ??) untersucht.

3.7 Arbeiten mit Bakterien

3.7.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-transformierten Bakterien wurden Einzelkolonien oder wenige Mikroliter einer Glycerinkultur in 2 ml LB-Medium, welches das zur Selektion notwendige Antibiotikum enthielt (30 µg/ml Kanamycin) angeimpft und 16 Stunden lang bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur konnte eine Glycerinkultur angelegt werden, indem die Bakterienkultur mit 80% Glycerin im Verhältnis 1:1 versetzt und in Cryoröhrchen bei -80°C über Monate hinweg aufbewahrt wurde.

3.7.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1983)

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden 1 bis 2 ml einer Übernachtskultur in 25 ml vorgewärmtem SOB-Medium angeimpft und solange bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte bei $\lambda=600$ nm von 0,7 erreicht wurde. Dann wurde die Bakteriensuspension 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 2.500 rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Labfuge GL). Das Bakteriensediment wurde in 8,3 ml kaltem TFB-Puffer aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert und in 2 ml kaltem

TFB-Puffer aufgenommen, so dass etwa eine Konzentration von 1×10^9 Bakterien pro ml erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 70 μ l DnD-Lösung versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor nochmals 70 μ l DnD-Lösung hinzugefügt wurde, um eine Endkonzentration der DnD-Lösung von 7% zu erreichen. Entweder wurden die Bakterien direkt zur Transformation verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.7.3 Transformation kompetenter Bakterien

Unter einer Transformation versteht man das Einbringen nackter DNA in kompetente Bakterien. 100 pg Plasmid-DNA wurden mit 200 μ l kompetenten Bakterien 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 Sekunden auf 42°C erwärmt (Hitzeschock) und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden dann mit 800 μ l 37°C warmen SOC-Medium versetzt und 45 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 200 μ l des Transformationsansatzes wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.8 Präparation von Plasmid DNA

3.8.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA durch Kochlyse

(Holmes und Quigley, 1981)

Um zu testen, ob Bakterien, die auf einer älteren LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum immer noch das zuvor transformierte Plasmid enthielten, wurde ein schneller Test durchgeführt. Dazu wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 1,5 ml LB-Medium mit dem Antibiotikum (25 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 1 Minute in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde zum Zellaufschluss in 400 μ l STET-Lösung und 30 μ l Lysozym-Lösung (10 mg/ml) vollständig resuspendiert. Nach dreiminütiger Inkubation bei 96°C im Wasserbad wurde die Zellsuspension bei 13.000 rpm für 10 Minuten bei RT zentrifugiert, um chromosomale DNA und Zelltrümmer von der Plasmid DNA zu trennen. Die im Überstand enthaltene DNA wurde

mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 0,6 Vol. 100% Isopropanol präzipitiert. Das Gemisch wurde bei 13.000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 μ l Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die DNA wurde zum Test mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die gereinigten Plasmide konnten dann bei 4°C gelagert werden.

3.8.2 Präparation von Plasmid DNA über CsCl-Dichtegradienten

(Clewell und Helsinki, 1972)

Wenn die oben beschriebene Kochlyse bestätigte, dass die Bakterien noch das gewünschte Plasmid enthielten, wurde eine Plasmidpräparation mit Hilfe eines CsCl-Gradienten durchgeführt. Diese Methode erlaubte es, eine grössere Menge Plasmid DNA zu isolieren, als durch die Kochlyse möglich war. Zur Plasmidpräparation wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 30 ml LB-Medium, dem 30 μ g/ml Kanamycin zugesetzt war, 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 10 ml in 1 L LB-Flüssigkultur mit 30 μ g/ml Kanamycin überführt und erneut 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation in einer Sorvall RC 3 B Plus sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 30 ml TE-Puffer, pH 7,5 gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 11 ml eiskalter 25% Saccharoselösung und 2 ml Lysozymbilösung (20 mg/ml) resuspendiert. Das Gemisch wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Saccharose wurde ein osmotischer Gradient aufgebaut, wodurch Wasser in die Bakterien diffundiert und sie platzen liess. Das Lysozym, eine Muramidase, baut die Bakterienwände durch Hydrolyse des Mureinsacculus ab. Im Anschluss wurden 5 ml einer 0,25 M EDTA-Lösung, pH 8,0 zugesetzt und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 17 ml Tritonlösung hinzupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dadurch wurden die zellulären Proteine denaturiert und konnten mit der bakteriellen DNA durch 45-minütige Zentrifugation in einem SW-28 Rotor bei 25.000 rpm bei 4°C sedimentiert werden. Die Plasmid DNA befand sich danach im Überstand. Das Volumen des Überstandes wurde bestimmt und mit 0,94 g/ml CsCl versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde der Ansatz in ein VTI-50-Röhrchen überführt und

in dem dazugehörigen Rotor bei 40.000 rpm 18 bis 22 Stunden lang zentrifugiert. Hierbei bildete das CsCl einen Dichtegradienten, der die noch verbliebene Bakterien DNA von den Plasmiden trennte. Nach Beendigung der Zentrifugation hatten sich zwei DNA-Banden gebildet. Unter UV-Licht wurde die untere Bande, die die geschlossenen Plasmide enthielt, nach Anstechen des Röhrchens mit einer 0,9 x 40 mm Kanüle in eine 5 ml Spritze abgezogen. In der oberen Bande befanden sich genickte Plasmide, d. h. zirkuläre Plasmide mit Einzel- oder Doppelstrangbrüchen. Da sich in der abgenommenen Fraktion noch Bakterien DNA mit dem gleichen spezifischen Gewicht befinden konnte, wurde diese in einem VTI-65-Rotor bei 45.000 rpm bei 20°C 18 bis 22 Stunden lang zentrifugiert. Es wurde wiederum die untere Bande unter UV-Licht abgezogen. Zum Entfernen des Ethidiumbromids wurde die DNA-haltige Lösung zwei- bis dreimal mit einer CsCl-gesättigten Isopropanol-Lösung ausgeschüttelt. Zur Entfernung von Salzresten wurde die DNA-haltige Lösung abschliessend mindestens 48 Stunden lang gegen TE-Puffer, pH 7,5 dialysiert. Der TE-Puffer wurde zwei- bis dreimal ausgetauscht. Nach Präzipitation (Abschnitt ?? auf Seite ??) wurde die DNA in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt, nachdem sie in einem Agarosegel nach Restriktion mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen auf ihre Reinheit getestet worden war.

3.9 Quantitative Bestimmung von DNA

Die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA absorbieren ultraviolettes Licht bei einem Maximum von $\lambda = 258$ bis $\lambda = 260$ nm. Diese Eigenschaft wurde für die quantitative Bestimmung von Nucleinsäuren benutzt. Bei einer Messung in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke der DNA-Lösung von 1 cm gilt: eine $OD_{260} = 1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (Kaiser und Hogness, 1960). Proteine absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Der Reinheitsgrad der Nucleinsäure-haltigen Lösung kann daher durch den Extinktionsquotienten $R = OD_{260} : OD_{280}$ ermittelt werden. Reine Nucleinsäurepräparationen besitzen einen Quotienten von $R = 1,8$ bis $2,0$ in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Bei diesem Quotienten kann man von einer nahezu proteinfreien Lösung ausgehen.

3.10 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

(Nathans und Smith, 1975)

Restriktionsendonukleasen (RE) sind Enzyme, die aus Bakterien isoliert werden und deren Funktion in der Zerstörung artfremder DNA liegt. Diese Enzyme werden in der Molekularbiologie zum gezielten Spalten von DNA verwendet. Die Spaltung der DNA erfolgt durch gezielte Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen. Man unterscheidet drei Arten von RE: Typ I, II und III. Typ I besitzt sowohl hydrolysierende als auch methylierende Aktivität und schneidet nicht direkt an der Erkennungssequenz des Enzyms, sondern an einer in der Nähe gelegenen Sequenz. Typ III Enzyme schneiden eine spezifische Sequenz, die nicht mit der Erkennungssequenz des Enzyms übereinstimmt. Typ II Enzyme sind der am häufigsten verwendete Typ. Er erkennt Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen in Form von Palindromen und schneidet innerhalb der von ihm erkannten Sequenz. Dabei können „blunt ends“ oder „sticki ends“ entstehen. Die Aktivität von RE wird in Units (U) angegeben, wobei 1 U eines Enzyms 1 µg Lambda DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde fragmentiert. Wie in Abschnitt ?? auf Seite ?? und Abschnitt ?? auf Seite ?? bereits erwähnt, wurden die aufgereinigten Plasmide zur Charakterisierung mit RE gespalten. Dazu wurden die RE so gewählt, dass sie das Plasmid entweder linearisierten oder es in ein charakteristisches Fragmentmuster spalteten. Pro Ansatz wurden 1 µg Plasmid DNA mit 10 U RE und 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die RE durch Zugabe von 2 mM EDTA (pH 7,5) oder fünfzehnminütiger Inkubation bei 68°C inaktiviert.

In den Versuchen wurde genomische DNA nicht gespalten. Um genomische DNA zu spalten, können 10 µg bis 30 µg mit 7 U bis 10 U der jeweiligen RE pro µg genomischer DNA 5 bis 8 Stunden lang bei 37°C inkubiert werden.

3.11 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Nach der Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die entstandenen DNA-Fragmente zur Trennung, Identifizierung und Reinigung elektrophoretisch in einem Agarosegel getrennt. Dabei wurden je nach Grösse der zu erwartenden DNA-Fragmente Agarosegele unterschiedlicher Prozentigkeit gewählt. Höhere Agarosekonzentrationen ermöglichten hierbei eine bessere Trennung von DNA-Fragmenten im niedermolekularen Bereich. Die Elektrophoresen wurden entweder in Minigelkammern (86,3 cm x 10 cm) oder in Flachbettkammern („Submarines“ (20 cm x 20 cm)), mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenauftragspuffer versehen und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei genomischer DNA bei 20–40 Volt 16 Stunden lang, bei Plasmid DNA in Minigelkammern bei 70–90 Volt für 1–2 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel drei bis fünf Minuten in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert und anschließend gewässert. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen der Nukleinsäure und emittiert nach Anregung im UV-Bereich orangefarbenes Licht. Die gefärbten Gele wurden im UV -Licht fotografiert.

3.12 Southern-Transfer-Hybridisierung

(Southern, 1975; Kotsier *et al.*, 1993)

Beim DNA-Transfer nach Southern werden die gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente auf eine geeignete Matrix, wie beispielsweise auf eine Nylonmembran, übertragen. Die fixierte DNA wird dann mit einer einzelsträngigen oder denaturierten Probe hybridisiert. Somit können gelelektrophoretisch getrennte DNA-Sequenzen identifiziert werden. Die Technik kombiniert das Auflösungsvermögen der Agarose-Gelelektrophorese und die Nachweisempfindlichkeit der Nukleinsäure-Hybridisierung.

3.12.1 Transfer

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurde das Gel zunächst 20 Minuten unter leichtem Schwenken in 0,25 M HCl-Lösung inkubiert. Dieser Schritt erhöhte die Transfargeschwindigkeit und Effizienz von großen DNA-Molekülen, da durch das partiel-

le Depurinieren Einzelstrangbrüche in die Doppelhelix eingeführt wurden. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung der DNA 20 Minuten unter leichtem Schwenken in 0,4 M NaOH inkubiert. Der DNA-Transfer wurde dann nach der von Kotsier et al. (1993) modifizierten Methode durchgeführt. Dabei wurde die DNA durch Kapillarkräfte mit Hilfe der Schwerkraft von oben nach unten auf die Membran transferiert. Nach 4 bis 16 stündigem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC geschwenkt und zur Fixierung der DNA je nach Herstellerangaben der Nylonmembranen 30 bis 60 Minuten bei 80°C oder 120°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei RT gelagert oder direkt prähybridisiert.

3.12.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Für die radioaktive Markierung von DNA wurde die Methode des „Oligolabeling“ angewendet. Hierbei wird die zu markierende DNA zunächst denaturiert. Anschließend werden Oligodesoxyribonukleotide mit „zufälliger“ Sequenz hinzugegeben. Diese Oligomere binden an „zufällige“ Stellen im jeweiligen DNA-Molekül und dienen als Primer für die DNA-Synthese des Gegenstranges durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Bei der Gegenstrangsynthese kommt es zum Einbau der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), wobei radioaktiv markierte DNA-Moleküle entstehen. Zunächst wurden 50 ng der zu markierenden DNA in einem Volumen von 10 µl Wasser gelöst, 2 Minuten bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, um ein Renaturieren zu verhindern. Durch Zugabe von 5 x OLB-Puffer, 400 µg/ml BSA, 50 µCi [α 32 P]-dCTP, je 400 µM der unmarkierten dATP, dGTP, dTTP sowie 2 U Klenow-Polymerase wurde die Synthese von komplementärer radioaktiver DNA begonnen. Dabei dienten die im OLB-Puffer enthaltenen Hexanukleotide statistischer Zusammensetzung als Primer für die DNA-Synthese des Gegenstranges. Der Ansatz wurde 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Sephadex-Säule zentrifugiert, um die nicht eingebauten radioaktiv markierten Desoxyribonukleosidtriphosphate durch Gelfiltration abzutrennen. Die markierte DNA, die sich im Eluat befand, wurde dann der Hybridisierungslösung zugesetzt.

3.12.3 Hybridisierung mit [α - ^{32}P]-markierten Sonden

(nach Rigby *et al.*, 1922)

Die an eine positiv geladene Membran gebundene einzelsträngige DNA konnte durch Hybridisierung mit homologer radioaktiv markierter DNA charakterisiert werden. Zunächst wurde die Membran prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dazu wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre mit 15 ml Prähybridisierungslösung 1 bis 3 Stunden lang in einem Rollschrank bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung ersetzt, die die radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt. Anschließend wurde die Membran 16 bis 22 Stunden lang bei 68°C im Rollschrank inkubiert. Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung wurden vor dem Gebrauch 10 Minuten gekocht und dann auf Eis 5 Minuten abgekühlt. Um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wurde die Membran nach der Inkubation mit der radioaktiv markierten DNA zweimal 20 Minuten in 2 x SSC/0,1% SDS und zweimal 20 Minuten in 0,2 x SSC/0,1% SDS bei 68°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie verpackt und in Röntgenfilmkassetten bei -80°C auf Kodak X-OMAT-Filmen exponiert.

3.13 Analyse der DNA mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die PCR ist es möglich, ein DNA-Fragment enzymatisch *in vitro* zu vermehren. Man nutzt dabei die Eigenschaft von DNA-Polymerasen aus, DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen zu synthetisieren, sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Dabei wurde die Polymerase des thermostabilen Bakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt, deren Aktivität bei ca. 72°C ihr Maximum hat und die auch bei 95°C noch aktiv ist. Für jeden Reaktionsansatz wurden 100 bis 300 ng genomische DNA mit 100 ng der beiden Oligonukleotidprimer (21–22 bp), 1,5 mM MgCl₂, 2 U Taq-Polymerase (Promega, Mannheim), vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffers in einem Volumen von 50 µl (Perkin Elmer DNA Thermal cycler PE 480, mit Mineralöl beschichtet) eingesetzt. Die Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1:	Denaturierung	bei 95°C	4 Minuten
Schritt 2:	Denaturierung	bei 95°C	90 Sekunden
Schritt 3:	Primerannealing	bei 67°C	1 Minute
Schritt 4:	Elongation	bei 72°C	1 Minute
Schritt 5:	Elongation	bei 72°C	5 Minuten
Schritt 6:		4°C	

Tabelle 2: Programm der PCR

Die Schritte 2–4 wurden 30 bis 35 mal wiederholt. Anschließend wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch auf einem Agarosegel (1-1,5%) getrennt.

3.14 Tierexperimenteller Teil

3.14.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden weibliche und männliche C57Bl/6 und CB20 Mäuse im Alter von 8 Wochen verwendet. Die C57Bl/6 wurden bei der Firma Harlan und Winkelmann, Mannheim bestellt, die CB20 stammten aus der hauseigenen Zucht und wurden in Makrolonkäfigen der Normgröße Typ II (bis zu 4 Tiere) oder Typ III (bis zu 12 Tiere) unter sterilen Bedingungen gehalten. Die Mäuse erhielten bestrahlte Mausfutterpellets (Altromin 1314, Lage) und hatten während der gesamten Versuchszeit freien Zugang zu Wasser.

3.14.2 Verfütterung des Plasmids pEGFP-C1

Den Mäusen wurde jeweils 50 µg Plasmid DNA, die in 20 µg Wasser gelöst war, mit Hilfe einer Gilson Pipette oral appliziert. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge DNA-freies Wasser. Um die Effekte, die während der Darmpassage einwirken, zu untersuchen, wurde nackte DNA verfüttert. Zu definierten Zeitpunkten nach Verabreichung der fremden DNA wurden die Tiere in einer CO₂-Atmosphäre getötet und die Organe und die Inhalte des Gastrointestinaltraktes entnommen.

3.14.3 Verfütterung des Proteins Glutathion-S-Transferase

CB20 Mäusen wurden je 300 µg des „green fluorescent protein“, das in 70 µl Tris, pH 8 gelöst war oral appliziert. Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge proteinfreien Tris-Puffer. Nach definierten Zeitspannen wurden die Tiere durch CO₂-Begasung getötet und die Organe und Inhalte des Magen-Darmtraktes entnommen.

3.14.4 Injektion des Plasmids pEGFP-C1 in die verschiedenen Darmabschnitte

C57Bl/6 Mäuse wurden in einer CO₂-Atmosphäre getötet und das Abdomen geöffnet (Abschnitt ?? auf Seite ??). Die einzelnen Darmabschnitte Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon wurden mit einem Stück Bindfaden abgebunden. 2 µg des Plasmids wurden in 50 µl Wasser gelöst und mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze in die verschiedenen Darmabschnitte injiziert. Das Abdomen wurde wieder geschlossen und die Tiere für 1 Stunde, 3 und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Inhalte der Darmabschnitte extrahiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um Nukleasen zu inhibieren. Danach wurden die Proben bis zur DNA-Präparation bei -80°C gelagert.

3.14.5 Entnahme der Organe und Darminhalte

Nachdem die Tiere durch CO₂-Begasung getötet worden waren, wurden sie in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert und das Fell mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die Bauchhaut geöffnet und von der Abdominalmuskulatur getrennt. Nach Absetzen der Haut wurde das Abdomen mit einem neuen Satz steriler Präparationsbestecke vollständig geöffnet. Danach wurde das Zwerchfell durchtrennt und das Blut durch Punktion des Herzens mit einer 0,9 x 40 mm Einmalkanüle in eine 5 ml Einmalspritze entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde vor der Punktion des Herzens 10 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 vorgelegt. Im Anschluss wurden die anderen Organe in folgender Reihenfolge entnommen: Leber (ohne Gallenblase), Milz und Niere. Auch die Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, um die nach dem Zelltod einsetzenden Abbauvorgänge durch zelleigene

DNasen zu verhindern. Anschließend wurden die Inhalte des Gastrointestinaltraktes (Magen, Dünn-, Blind- und Enddarm) mit jeweils frischen sterilen Einmalskalpellklingen durch Herauspressen aus den Darmhüllen extrahiert und ebenfalls sofort schockgefroren. Dünn- und Blinddarmwände wurden in Wasser gewaschen und dann in 4% Formaldehyd-Lösung über Nacht bei RT fixiert. Das fixierte Gewebe wurde in der Pathologie in Paraffin gegossen und konnte so mittels der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Abschnitt ?? auf Seite ??) analysiert werden.

3.14.6 Präparation genomischer DNA

(modifiziert nach Stafford, 1976, Boom *et al.*, 1989, Höss *et al.*, 1992)

Die extrahierten Organe und Inhalte der Gastrointestinaltrakte nach Fütterung und nach Injektion des Plasmids wurden auf die gleiche Weise behandelt, wie in Abschnitt ?? auf Seite ?? beschrieben. Um die Zellen aufzuschließen wurden die einzelnen Proben 16 Stunden lang in je 3 ml Aufschlusspuffer bei 37°C auf einem Rotor zentrifugiert. Die in dem Puffer enthaltene Proteinase K baute die Proteine ab und das enthaltene SDS zerstörte die Zellmembranen und die Kernhüllen.

3.14.7 DNA-Extraktion aus Organen und Darminhalten

Nachdem die Zellen der Organe und aus den Darminhalten mit Hilfe des Aufschlusspuffers zerstört worden waren, konnten die Nukleinsäuren extrahiert werden. Zur Entfernung der Proteine wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Das Prinzip basiert auf einer Trennung in eine organische proteinhaltige und eine wässrige nukleinsäurehaltige Phase. Das Volumen der zu reinigenden DNA-Lösung wurde dabei einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, einmal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. In jedem Schritt wurde das Gemisch 20 Minuten unter Rotation bei RT inkubiert und anschließend zur Phasentrennung bei 4.000 rpm und RT 10 Minuten lang zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach dieser ersten Extraktion wurde die wässrige Phase mit RNase A behandelt, um die noch in der Phase befindlichen RNA abzubauen. Dazu wurden 1/10 Volumen RNase A (10 mg/ml) zugesetzt und

30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden noch eine weitere Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Chloroform-Extraktion durchgeführt, um sowohl die RNase A als auch die freigewordenen Ribonukleotide aus der wässrigen Lösung zu extrahieren. Dann wurde die in der wässrigen Phase befindliche DNA mit Ethanol gefällt (Abschnitt ?? auf Seite ??) und anschließend in Wasser aufgenommen. Nach der Phenol/Chloroform-Extraktion befanden sich immer noch Verunreinigungen in den DNA-Proben der Gastrointestinaltrakte, die eine Untersuchung der DNA durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verhinderten. Deswegen wurde die DNA zusätzlich über Siliziumoxid gereinigt (Boom et al., 1989). Dabei binden sich Nukleinsäuren an Silikaoberflächen in Gegenwart von hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen, wie z. B. Guanidiniumsalz. Die DNA (30 µg) wurde mit 900 µl Lösungspuffer gemischt und nach Zugabe von 40 µl wässriger Siliziumoxid-Lösung 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand mit den Verunreinigungen verworfen und das Sediment einmal mit Waschpuffer und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Sediment in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und die DNA bei 56°C 10 Minuten lang eluiert. Nach einer Zentrifugation wurde die wässrige DNA-haltige Lösung abgenommen und die DNA mit Ethanol gefällt (Abschnitt ?? auf Seite ??).

3.14.8 Ethanolfällung

Die in einer Lösung enthaltene DNA wurde präzipitiert, indem die Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und dem 3-fachen Volumen an absolutem eiskaltem Ethanol versetzt und anschließend über Nacht bei -20°C inkubiert wurde. Der Alkohol entzieht dabei den Nukleinsäuren die Hydrathülle und setzt damit das Löslichkeitsprodukt des entstandenen Salzes herab. Die DNA fällt dann als Natriumsalz aus. Das Präzipitat wurde bei 4°C und 13.000 rpm 30 Minuten lang zentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA in Wasser resuspendiert und konnte bei -20°C gelagert werden.

3.15 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nachdem die genomische DNA aus den Darminhalten präzipitiert worden war, wurden 20 μg mit Stoppuffer versetzt und elektrophoretisch getrennt. Zur Charakterisierung der DNA wurde diese auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das *gfp*-Gen hybridisiert. Dazu wurde das Gen mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (Abschnitt ?? auf Seite ??) amplifiziert und aus dem Agarosegel eluiert. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch getrennt und mit einer Skalpellklinge aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe von QIAquick Zentrifugationssäulchen nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) gereinigt. Das Prinzip beruht dabei auf der Auflösung der Agarose mittels NaI und der anschließenden pH-abhängigen Bindung der DNA an eine elektrisch geladene Matrix. Die DNA wurde schliesslich in 30 μl Wasser eluiert und bei -20°C gelagert, bis sie zur radioaktiven Markierung eingesetzt wurde.

3.16 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

3.16.1 Herstellung von biotinylierten Hybridisierungsproben

(Rigby *et al.*, 1977)

Die biotinylierten Hybridisierungsproben wurden mittels der Nick- translations-Reaktion unter Verwendung des Biotin-Nick-Translation-Mix der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) hergestellt. In einer Standardreaktion wurden 2 μg DNA markiert, indem die entsprechende DNA-Menge mit Wasser auf ein Volumen von 16 μl gebracht wurde. Nach Zugabe von 4 μl Biotin-Nick-Translation-Mix wurde der Ansatz 60 bis 90 Minuten bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Grösse der entstandenen Fragmente auf einem 1,5% Agarosegel kontrolliert. Hierzu wurden 2 μl des Ansatzes mit Probenauftragspuffer versetzt, 2 Minuten bei 100°C denaturiert und auf das Minigel aufgetragen. Betrug die Grösse der Fragmente 200 bis 500 bp, so wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA, pH 8,0 abgestoppt. Waren die Fragmente noch zu groß, wurde der Reaktionsansatz weitere 20 Minuten bei 16°C inkubiert. Die markierte DNA wurde durch Zugabe der 50fachen Menge an tRNA und hochreiner gescherter unspezifischer DNA (Lachsspermien-DNA) mit Ethanol präzipitiert und nach dem Trocknen des DNA-Pellets in 20 μl Wasser resuspendiert.

3.16.2 Dot-blot Analyse der biotinylierten DNA

Die Effizienz des Biotineinbaus in die DNA-Sonde wurde durch einen Dot-blot quantifiziert. Von der markierten DNA wurden zunächst vier Verdünnungen in 10er Schritten (1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 1 pg/ μ l) hergestellt. Je 1 μ l der Verdünnungen wurde auf eine ungeladene Nitrozellulosemembran aufgetropft, die zur Fixierung der DNA anschließend 1 Stunde lang bei 80°C inkubiert wurde. Die Membran wurde dann 30 Minuten in Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzudecken. Nach kurzem Waschen der Membran in Dot-blot Puffer 1 wurde die Membran 30 Minuten mit dem Antikörper Anti-Biotin alkalische Phosphatase hybridisiert, der 1:5000 in Dot-blot Puffer 1 verdünnt war. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 Minuten in Dot-blot Puffer 1 gewaschen und 2 Minuten in Dot-blot Puffer 2 äquilibriert. Für die anschließende Farbreaktion wurde die Membran in Farblösung (200 μ l NBT in Dot-blot Puffer 2) einige Stunden im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde das NBT von einem Enzym, das an den Antikörper gekoppelt war, gespalten und verursachte eine blaue Färbung. Bei erfolgreicher Biotinylierung sollten sämtliche Verdünnungen auf der Membran zu erkennen sein.

3.16.3 Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten

Wie schon in Abschnitt ?? auf Seite ?? erwähnt, wurden die Dünn- und Blinddarmwände in 4%iger Formaldehyd-Lösung für 24 Stunden fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe mit Hilfe eines vollautomatischen Fixierungsautomaten (Tissue Tek VIP, Vogel) wie folgt behandelt: Zunächst wurde das Gewebe in Formalin (4%iges Formaldehyd) 1 Stunde bei 40°C fixiert, dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, mit Xylol erneut fixiert und schliesslich in flüssigem Paraffin eingebettet. Das flüssige Paraffin lagert sich dabei überall dort ins Gewebe ein, wo vorher Wasser war, so dass die ursprüngliche Morphologie des Gewebes erhalten bleibt. Zuletzt wurde das Gewebe in frischen Paraffin ausgegossen und auf einer Kühlplatte bei -15°C erhärtet. Von dem in Paraffin-Blöckchen eingebetteten Gewebe wurden dann mit einem Rotationsmikrotom 3 μ m dicke Schnitte gefertigt. Die Schnitte wurden zunächst auf einem Wasserbad (55°C) gestreckt und dann auf einen Polylysinbeschichteten Objektträger aufgezogen.

3.16.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst 30 Minuten bei 58°C getrocknet. Durch die folgende 10-minütige Xylolbehandlung wurde das Paraffin aus dem Gewebe entfernt. Dann wurde das Gewebe durch jeweils 2-minütige Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%) rehydriert und anschließend je 5 Minuten in einer 0,86%igen NaCl-Lösung und in einer 1 x PBS-Lösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung 20 Minuten fixiert, zweimal 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und 35 Minuten mit Proteinase K-Lösung (20 µg/ml) behandelt. Die Proteinase K baute dabei Proteine der Zellmembran ab, so dass die Hybridisierungssonde in die Zellen gelangen konnte. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und dann 5 Minuten in Paraformaldehyd fixiert. Das Gewebe wurde dann wiederum in 1 x PBS gewaschen, in 0,86%iger NaCl-Lösung inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) jeweils 2 Minuten dehydriert. Nachdem das Gewebe an der Luft getrocknet war, wurden 50 bis 100 ng der biotinylierten Sonde, die zuvor in Hybridisierungspuffer aufgenommen worden war, in einem Volumen von 20 µl aufgetragen. Auf das Gewebe wurden silikonisierte Deckgläser luftblasenfrei aufgelegt und die genomische DNA zusammen mit der DNA-Sonde auf einem Heizblock 6 Minuten bei 96°C denaturiert. Anschließend wurden die Präparate sofort auf einer -20°C kalten Platte abgekühlt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe nach Entfernen der Deckgläschen zweimal 5 Minuten in 2xSSC bei 20°C und einmal 5 Minuten in 0,1 x SSC bei 42°C gewaschen. Um unspezifische Bindungen der nachfolgend verwendeten Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte mit 100 µl „Blocking“-Lösung unter einem Deckgläschen bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde 30 Minuten unter gleichen Bedingungen mit Avidin-DCS-FITC inkubiert, der 1:400 in „Blocking-Lösung“ verdünnt wurde. Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die Schnitte dreimal je 5 Minuten in 4 x SSC/0,1% Tween bei 42°C gewaschen. Zur Signalverstärkung wurde zunächst 1:40 verdünntes biotinyliertes Anti-Avidin in Blocking-Lösung aufgetragen und die Präparate 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kam-

mer inkubiert. Nach den gleichen Waschsritten wie oben wurde erneut 1:400 verdünntes Avidin-DCS-FITC aufgetragen und das Gewebe erneut inkubiert. Nachdem ein letztes Mal wie oben beschrieben gewaschen wurde, wurden 20 μ l Konservierungslösung (DABCO) auf die Gewebeschnitte aufgebracht, die dann mit einem Deckgläschen und Nagellack luftdicht verschlossen wurden. Der Konservierungslösung wurde zuvor Propidiumiodid (200 μ g/ μ l) zugesetzt, das ähnlich wie Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und nach Anregung orangefarbenes Licht emittiert. Es diente hier zur Gegenfärbung der Zellkerne. Die Gewebeschnitte wurden in einem Olympus BH-2 Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filterblocks oder in einem LSM- Mikroskop betrachtet und fotografiert.

3.16.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Metaphasechromosomen

Die Zellkerne der gefütterten Milzzellen (Abschnitt ?? auf Seite ??) wurden 2 Stunden bei 58°C getrocknet und anschließend 1 Stunde mit 150 μ l RNaseA-Lösung (100 μ g/ml in 2 \times SSC) unter einem Deckgläschen bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger viermal in 2 \times SSC je 3 Minuten bei RT gewaschen und durch jeweils 3-minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90% und 100%) dehydriert. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurde die DNA denaturiert, indem die Objektträger in einer 70%igen Formamidlösung (in 2 \times SSC) 2 Minuten bei 80°C inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Kerne in einer aufsteigenden Ethanolreihe (s. o.) dehydriert und wieder an der Luft getrocknet. Gleichzeitig wurde die Hybridisierungsprobe vorbereitet, indem 20 μ l der biotinylierten DNA-Sonde in der entsprechenden Menge Hybridisierungspuffer aufgenommen wurden, so dass die biotinylierte Probe in einer Konzentration von 50-100 ng/20 μ l Hybridisierungspuffer vorlag. Nachdem die Hybridisierungslösung 10 Minuten bei 100°C denaturiert worden war, wurde sie nach kurzem Abkühlen auf Eis auf die getrockneten Objektträger pipettiert und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Kerne nach Entfernen der Deckgläschen dreimal in 50%iger Formamidlösung (in 2 \times SSC) bei 42°C 5 Minuten lang gewaschen. Der pH-Wert der

Waschlösung wurde zuvor mit HCl auf pH 7,0 eingestellt. Im Anschluss wurden die Objektträger dreimal in 2 x SSC bei 42°C 5 Minuten lang gewaschen. Nach Inkubation mit der Blocking-Lösung erfolgte die weitere Behandlung parallel zur *in-situ*-Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten, wie unter Abschnitt ?? auf Seite ?? beschrieben.

3.17 Resistenztest der *E.coli*-Bakterien des Darms nach Fütterung

Im Laufe der Arbeit stellte sich die Frage, ob die Bakterien der Darmflora von Mäusen das Plasmid ebenfalls aufnahmen und so eventuell gegen ein oder mehrere bestimmte Antibiotika resistent wurden. In dem Plasmid, das an Mäuse des Stammes C57Bl6/J verfüttert wurde, war ein Kanamycin-Resistenzgen integriert, das in *E.coli*-Bakterien exprimiert werden konnte. Nachdem die Mäuse gefüttert und getötet worden waren (Abschnitt ?? auf Seite ?? und Abschnitt ?? auf Seite ??), wurden die Inhalte des Gastrointestinaltraktes präpariert. Eine Hälfte des Dünndarms, des Blinddarms und des Enddarms wurde je in 1 ml LB-Medium aufgenommen, gemischt und ein paar Minuten auf Eis inkubiert. 200 µl des Gemisches wurde dann auf LB-Agarplatten, die 30 µg/ml Kanamycin enthielten ausgestrichen und mindestens 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Bakterienkolonien gezählt. Anschließend wurden vermeintlich resistente Kolonien sowohl auf frische LB-Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin überführt, als auch Filterabzüge gemacht (Abschnitt ?? auf Seite ??). Die frischen LB-Agarplatten wurden erneut mind. 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Waren wiederum Bakterienkolonien gewachsen, wurden diese in LB-Medium, das ebenfalls 30 µg/ml Kanamycin enthielt, verdünnt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die andere Hälfte der Darminhalte wurde wie in Kapitel behandelt. Nach DNA-Extraktion wurde diese auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

3.17.1 Koloniehybridisierung von Bakterien

Um zu analysieren, ob die Bakterien, die auf den kanamycinhaltigen Platten gewachsen waren, auch das Kanamycingen enthielten, wurden Filterabzüge gemacht. Dazu wurde eine ungeladene Nylonmembran in der Größe der Petrischale 2 Minuten lang auf die Bakterien gelegt. In der Zwischenzeit wurden Saugpapiere mit 2 x SSC/5% SDS getränkt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Nylonmembranen vorsichtig abgezogen und mit der bakterienbehafteten Seite nach oben 5 Minuten lang auf die feuchten Saugpapiere gelegt. In dieser Zeit wurden die Bakterienmembranen durch das SDS aufgebrochen. Um die genomische DNA der Bakterien zu fixieren, wurde die Membran 1 Minute in der Mikrowelle bei 450 Watt inkubiert. Danach konnten die Filter zur Hybridisierung verwendet werden. Dazu wurden die Membranen in 2 x SSC angefeuchtet und in eine Hybridisierungsröhre gebracht. Die Hybridisierung erfolgte wie in Abschnitt ?? auf Seite ?? und in Abschnitt ?? auf Seite ?? beschrieben. Als radioaktiv markierte Sonde diente hier das Kanamycingen, das zuvor durch Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid herausgeschnitten worden waren. Nach einer elektrophoretischen Trennung erfolgte eine Extraktion des DNA Fragmentes aus dem Agarosegel (Abschnitt ?? auf Seite ??).

3.18 Nachweis der Glutathion-S-Transferase in Mäusen

3.18.1 Überexpression in BL21-Zellen

Zur Überexpression der Glutathion-S-Transferase wurde der Vektor pGEX-3X in kompetente BL21-Bakterien transformiert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Nachdem die Zellen auf LB-Platten, denen das Antibiotikum Ampicillin zugesetzt worden war, gewachsen waren, wurde eine Kolonie des *E.coli*-Stammes BL21-Zellen gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Medium, das Ampicillin (100 µg/ml) enthielt, bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:10 in LB-Medium, ebenfalls mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, verdünnt. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C auf dem Bakterien-schüttler inkubiert und danach mit 5 mM IPTG 2,5 Stunden lang ebenfalls bei 37°C induziert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und 10 Minuten lang bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und konnte dann entweder bei -80°C gelagert oder direkt einer Proteinreinigung unterzogen werden.

3.18.2 Reinigung des Proteingemisches

Das Protein wurde mit Hilfe von Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) gereinigt. Das Prinzip beruht hierbei auf der Bindung des GST an die Sepharose. Das geschieht während eines Inkubationsschrittes 30 Minuten lang bei RT. Danach wurde die Säule 5 Minuten lang bei $500 \times g$ zentrifugiert, um die bakterieneigenen Proteine zu entfernen. Das Protein wurde dann dreimal mit PBS gewaschen und zwischen den Waschschritten wie oben beschrieben zentrifugiert. Um das GST zu eluieren, wurde der vom Hersteller mitgelieferte Puffer (10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) verwendet. Während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT konnte sich das GST dann an das Glutathion in dem Puffer binden und wurde bei einer Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 Minuten von der Säule lösen. Der Elutionsschritt wurde ebenfalls insgesamt dreimal durchgeführt. Danach konnte die Konzentration, wie im Abschnitt ?? auf Seite ?? beschrieben, gemessen werden.

3.18.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

(Bradford, 1976)

Wie Nukleinsäuren absorbieren auch Proteine UV-Licht. So kann die Konzentration einer Proteinlösung ermittelt werden. Dazu wurden $5 \mu\text{l}$ der Proteinlösung in $795 \mu\text{l}$ Wasser verdünnt und mit $200 \mu\text{l}$ Bradfordlösung versetzt. Durch Invertierung des Reaktionsgefäßes wurde das Gemisch homogenisiert und 5 Minuten lang bei RT inkubiert. Als Nullwert diente eine Probe, die anstelle des Proteins 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 enthielt. Die Messung der Extinktionswerte erfolgte bei $\lambda=595 \text{ nm}$. Da die gemessenen Werte nicht identisch zur Proteinmenge sind, musste vorher eine Eichkurve erstellt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von BSA erstellt, die in einem Bereich von $0,5$ bis $25 \mu\text{g}$ pro Ansatz lag. Aus der erstellten Eichkurve konnten dann die ermittelten Extinktionen eingetragen und so die Proteinmengen abgelesen werden.

3.18.4 Präparation eines Polyacrylamidgeles

Proteinfragmente können je nach Fragmentgröße in Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentrationen getrennt werden. Zur Auftrennung der Fragmente des GST-Proteins wurde ein 12,5%iges Gel gegossen. Dazu wurden zwei Glasplatten, eine 18 cm lang, die andere 23 cm lang, mit 70%igem Ethanol gesäubert. Zwischen die beiden Glasplatten wurden drei 1 mm dicke Abstandshalter gelegt und mittels Klemmspangen fixiert. Die Ränder wurden mit einer Mischung aus 8 ml 30%igem Acrylamid, 100 µl Ammoniumpersulfat und 10 µl TEMED abgedichtet. Zur Trennung der Proteinfragmente wurde zunächst nach Polymerisieren des Abdichtungsgemisches ein Trenngel (siehe Abschnitt ?? auf Seite ??) luftblasenfrei bis zu 2/3 der Plattenlänge vorsichtig eingefüllt. Um eine Abgrenzung des Trenngels zu erreichen, wurde die Lösung nach dem Einfüllen vorsichtig mit einem dünnen Wasserfilm überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgeschüttet und ein Sammelgel (siehe Abschnitt ?? auf Seite ??) vorsichtig bis zum Rand der kleineren Glasplatte eingefüllt. Danach wurde der Gelkamm luftblasenfrei eingesteckt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurden die Klammern und der untere Abstandshalter entfernt. Danach wurden die Platten mit dem Gel in die Gelkammer eingespannt und die obere Kammer mit Laufpuffer gefüllt. War die Kammer dicht, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die untere Kammer der Gelkammer ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt. Die sich dabei bildenden Luftblasen wurden vorsichtig mit Hilfe einer Einzelspritze entfernt. Nachdem die Proteinproben mit Probenauftragspuffer versetzt worden waren, wurden sie 10 Minuten gekocht, um die Proteine zu denaturieren, und in die Taschen pipettiert.

3.18.5 Western-Transfer

Wie Nukleinsäuren können ebenfalls Proteinfragmente auf eine positiv geladene PVDF-Membran mit Hilfe elektrischer Spannung transferiert werden. Durch eine Antikörperreaktion können die Proteinfragmente dann identifiziert werden.

3.18.6 Transfer

Der Westernblot-Transfer fand bei 4°C statt. Dazu wurde eine Schaumstoffunterlage in Westernblotpuffer getränkt und in eine Halterung gelegt. Danach wurde ein Saugpapier in der Größe des Gels ebenfalls in Westernblotpuffer angefeuchtet und auf die Schaumstoffunterlage gelegt. Darauf wurde das Gel plaziert. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt, die zuvor 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend 5 Minuten in Wasser inkubiert wurde. Danach wurde ein weiteres Saugpapier und eine zweite Schaumstoffunterlage aufgelegt. Die Halterung wurde geschlossen und in eine Kammer gehängt, die mit Westernblotpuffer gefüllt war. Die Blotdauer betrug 3 bis 4 Stunden bei einer Spannung von 30 bis 40 Volt. Das in dem Blotpuffer enthaltene SDS setzte sich dabei an die Proteine, die dadurch eine negative Ladung erhielten. So erfolgte der Transfer in Richtung Kathode. In der Blotkammer war ein Magnetrührstab enthalten, der während des Blotvorgangs die Pufferkonzentration homogen hielt.

3.18.7 Nachweis der Proteine

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran 1 Stunde in einem Puffer, der Milchpulver enthielt, inkubiert. Das Milchpulver sättigte unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers ab. Der Anti-GST-HRP Antikörper (Amersham Pharmacia Biotech) wurde 1:5000 in Blockinglösung verdünnt und die Membran 30 Minuten in dieser Lösung inkubiert. Damit alle Bindungsstellen abgedeckt werden konnten, wurde die Inkubation auf einem Schüttler durchgeführt. Danach wurde die Membran 3 mal in Waschpuffer (siehe Material) gewaschen, wobei der Puffer alle 30 Minuten gewechselt wurde. Nach Beendigung der Waschschrte wurde die Membran in Frischhaltefolie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette geklebt. Danach wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Proteine konnten durch eine ECL-Lichtreaktion (Abschnitt ?? auf Seite ??) sichtbar gemacht werden.

3.18.8 ECL-Lichtreaktion

Um die zu identifizierenden Proteine durch die ECL-Lichtreaktion sichtbar zu machen, wurde die Membran 5 Minuten lang in einem Puffer nach Angaben des Herstellers inkubiert. Danach wurde die Membran, wie im

Abschnitt ?? auf Seite ?? bereits erwähnt, in Frischhaltefolie eingepackt. Für die dann folgende Lichtreaktion ist eine Peroxidase notwendig, die bereits an den Anti-GST-HRP Antikörper gebunden war. Peroxidasen sind Hämenzyme und katalysieren eine Reaktion, bei der Wasserstoffperoxid durch ein Reduktionsmittel (AH_2) zu Wasser reduziert wird. Die bei der Peroxidasereaktion freigesetzten Ionen schossen durch den aufgelegten Röntgenfilm und machten so die zu identifizierenden Proteine erkennbar.

3.18.9 Fütterung des Proteins GST an Mäuse

Wie schon in Abschnitt ?? auf Seite ?? beschrieben, wurden den Tieren 300 μ g des GST Proteins oral appliziert. Nach 10, 15 und 30 Minuten wurden die Mäuse durch CO_2 -Begasung getötet und die Organe Leber, Milz, Niere und Gehirn, sowie das Blut und die Inhalte aus Magen, Dünndarm, Blinddarm und Enddarm extrahiert. Die Organe und Darminhalte wurden sofort nach der Präparation in flüssigem Stickstoff gefroren, um die körpereigenen Proteasen zu inhibieren. Um die Proteine zu extrahieren, wurden die Organe zu einem feinen Pulver gemörsert, das dann mit Lysispuffer gemischt und 30 Minuten lang bei $0^\circ C$ inkubiert wurde. Das Blut wurde direkt mit Lysispuffer versetzt und sonifiziert. Mit den Darminhalten wurde ebenfalls so verfahren. Nach der Inkubation wurde das Gemisch 10 Minuten lang bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Proteine befanden sich danach im Überstand, der entweder direkt auf ein Polyacrylamidgel (Abschnitt ?? auf Seite ??) geladen und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurde oder erneut gereinigt wurde, um das GST Protein anzureichern.

3.18.10 Anreicherung des GST Proteins

Nach Fütterung des GST Proteins wurden die gesamten Proteine der Organe und der Inhalte des Gastrointestinaltraktes gereinigt. Um unspezifische Bindungen des später verwendeten Antikörpers (Abschnitt ?? auf Seite ??) zu vermeiden, wurde das schon gereinigte GST Protein noch einmal angereichert. Dazu wurde die Fähigkeit des GST zur Bindung an Glutathione Sepharose 4B genutzt (Abschnitt ?? auf Seite ??). Nachdem das Protein wieder eluiert war, wurde es auf ein Polyacrylamidgel (Abschnitt ?? auf Seite ??) geladen und auf eine PVDF-Membran transferiert (Abschnitt ?? auf Seite ??).

4 Ergebnisse

4.1 Schicksal von oral verabreichter DNA

4.1.1 Das pEGFP-C1 Plasmid zeigt keine Homologie zum Mausgenom

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil wurde die Persistenz von oral verabreichter DNA in Mäusen untersucht. Frühere Untersuchungen mit der DNA des Bakteriophagen M13mp18 zeigten, dass verfütterte DNA während der Passage durch den Gastrointestinaltrakt nicht komplett degradiert wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass die DNA über das Darmepithel und die Peyerschen Plaques aufgenommen wird und in periphere Lymphozyten und innere Organe gelangen kann (Schubbert et al., 1994, 1997).

Neuere Ergebnisse mit einer anderen Test DNA, dem Plasmid pEGFP-C1 bestätigen dies. Das Plasmid wurde wie in vorangegangenen Experimenten oral an Mäuse verabreicht. Auch hier konnten bis zu 1277 bp große Fragmente der DNA im Gastrointestinaltrakt und in einigen Organen detektiert werden (Hohlweg und Doerfler, 2001).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls das pEGFP-C1 Plasmid als Test DNA gewählt. Dieses Plasmid trägt das Gen für das „green fluorescent protein“ der Qualle *Aequorea victoria*. Für die Experimente wurde dieses Gen gewählt, um nach Fragmenten des verfütterten Plasmids zu suchen.

Vorraussetzung zur Durchführung der Experimente war, dass die zu verfütternde DNA weder Homologien zum Mausgenom (*Mus musculus*) noch zu den Genomen der Darmbakterien, z. B. *E. coli*, aufwies. Seit Oktober 1999 wurde das Mausgenom sequenziert. Ein Vergleich von NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen (Altschul et al., 1997) mit diesen Sequenzen und der Sequenz des „green fluorescent protein“ (750 bp), konnten keine signifikanten Homologien zwischen der Sequenz des Gens aus der Qualle *Aequorea victoria* und dem Mausgenom zeigen. Vergleicht man jedoch die Sequenz des Gens des „green fluorescent protein“ mit EST-Mausdatenbanken (GeneBank Mouse EST entries), so ist eine Sequenz von 274 bp mit einer Ähnlichkeit von 99% zu finden. Als Referenz diente der Mausstamm C57Bl6/J, welcher ebenfalls für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurde. Die Arbeitsgruppe (Dr. M. Bento Soares, Univer-

sity of Iowa), die die Sequenz für die GeneBank Mouse EST-Datenbank (Altschul et al., 1997) zur Verfügung gestellt hatte, arbeitet ausschliesslich mit GFP-transgenen Mäusen. Es ist demnach denkbar, dass es sich bei der Sequenz um eine eventuelle Kontamination mit dem gfp-tragenden Vektor handelt oder GFP-transgenes Gewebe zur Sequenzierung verwendet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Mausgenom mit verschiedenen Methoden auf diese Ähnlichkeit hin untersucht. Die angebliche Homologie zwischen dem Gen des „green fluorescent protein“ und dem Mausgenom des Stammes C57Bl6/J konnte jedoch nicht bestätigt werden. Zur Analyse dieser Homologie wurden Southern-Transfer-Analysen durchgeführt, bei denen das gfp Gen gegen genomische Maus-DNA hybridisiert wurde (Abbildung ??). Mit Hilfe dieser Autoradiographien konnten keine Homologien nachgewiesen werden.

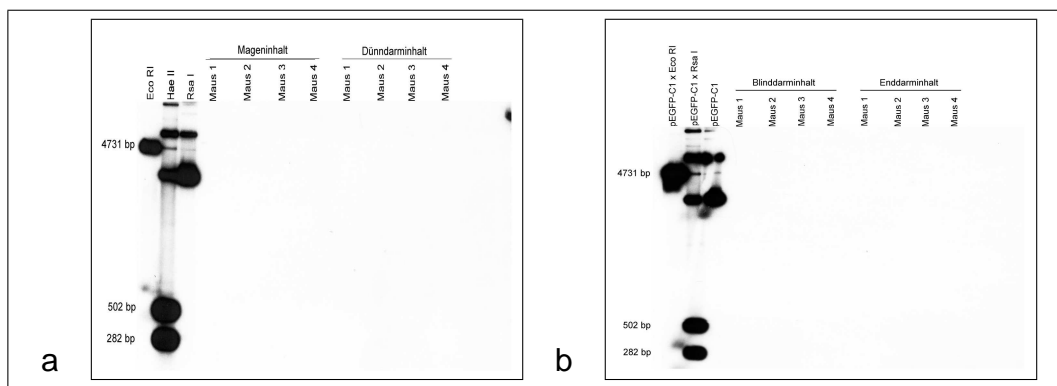


Abbildung 4: Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach Southern-Transfer-Analysen

C57Bl6/J Mäuse wurden mit TE-Puffer gefüttert. Die Tiere wurden nach Fütterung getötet und die DNA aus den Darminhalten extrahiert. Nach Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurden sie gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gesplante pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente werden jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben.

Weiterhin wurden PCR-Analysen (Abschnitt ?? auf Seite ??) durchgeführt, wobei genomische DNA der Mäuse aus den Magen- und Darminhalten (Abbildung ??) und den Organen (Abbildung ??) als Target und Primer für das *gfp* Gen verwendet wurden (Abbildung ?? auf Seite ??). Zur weiteren Kontrolle wurde auch dieses Ergebnis auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Abschnitt ?? auf Seite ??) (Abbildungen ?? und ?? auf Seite ??). Nach Hybridisierung der Membran mit dem radioaktiv markierten Gen des „green fluorescent protein“ konnten keine Homologien entdeckt werden.

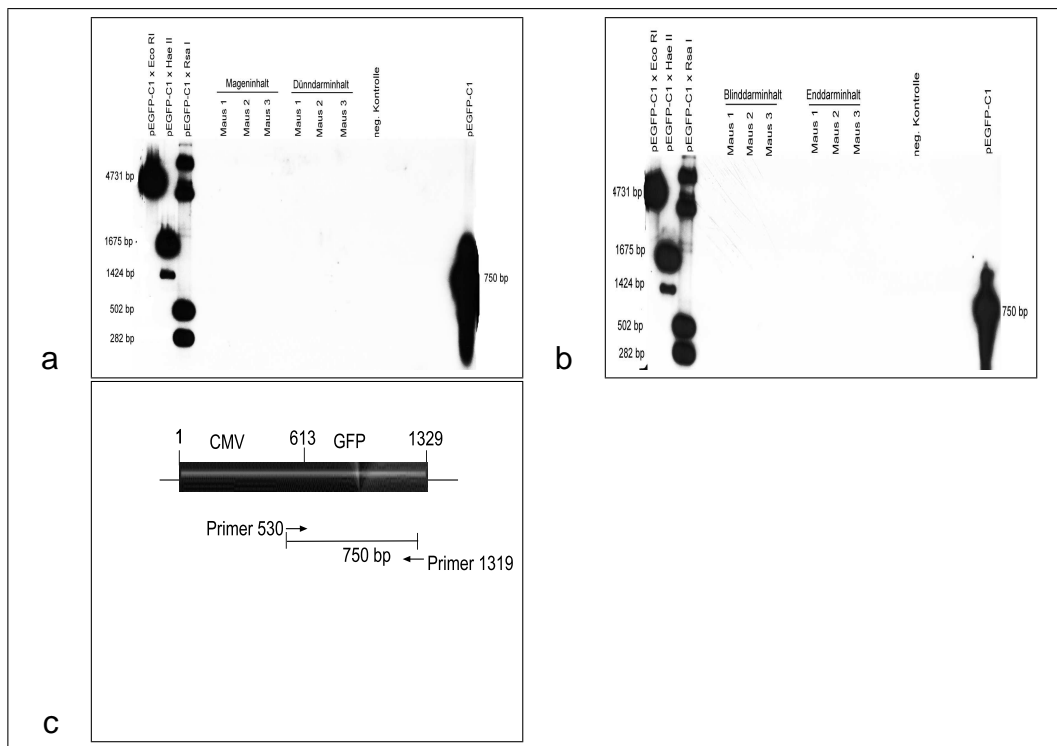


Abbildung 5: Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach PCR-Analysen

Mit der extrahierten DNA der Kontrollmäuse wurden PCR-Analysen durchgeführt. Das Ergebnis wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte *gfp* Gen hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gesplattene pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente werden jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben.

- (a) und (b) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes (entspricht der kompletten Länge des *gfp* Gens)
- (c) Lage der verwendeten Primer im *gfp* Gen

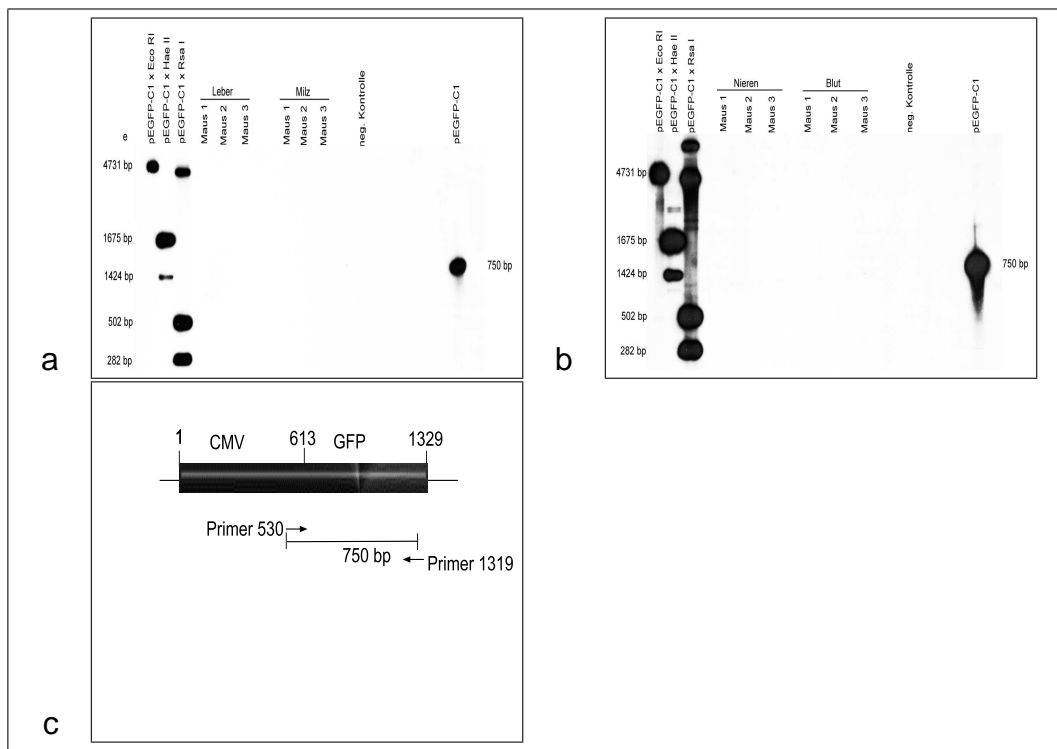


Abbildung 6: Fehlende Homologie zwischen dem Maus-Genom und dem Plasmid pEGFP-C1 nach PCR-Analysen

Zu dieser Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??

- (a) und (b) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes
- (c) Lage der verwendeten Primer im gfp Gen

Zur Vervollständigung dieser Tests wurden mehrere PCR-Analysen durchgeführt, bei denen als Target ebenfalls genomische Maus-DNA eingesetzt wurde. Die Primer waren so konstruiert worden, dass sie genau das Fragment amplifizierten, welches die Homologie aufweisen sollte. Auch hier konnten im Agarosegel keine DNA-Amplifikationen detektiert werden (Abbildung ?? auf Seite ??). Diese Tests wurden freundlicherweise von Holger Brondke durchgeführt.

Auch nach Transfer der eventuell nicht sichtbaren PCR-Produkte auf eine positiv geladene Nylonmembran und anschließender Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Gen des „green fluorescent protein“, wurden keine gfp-spezifischen Fragmente nachgewiesen (Ergebnis nicht dargestellt). Eine Ähnlichkeit von 274 bp zwischen dem Gen des GFP und dem Mausgenom ist lang genug, dass sie mit Hilfe der angewendeten Methoden detektiert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Homologie zwischen der Sequenz des Gens des „green fluorescent protein“ und der

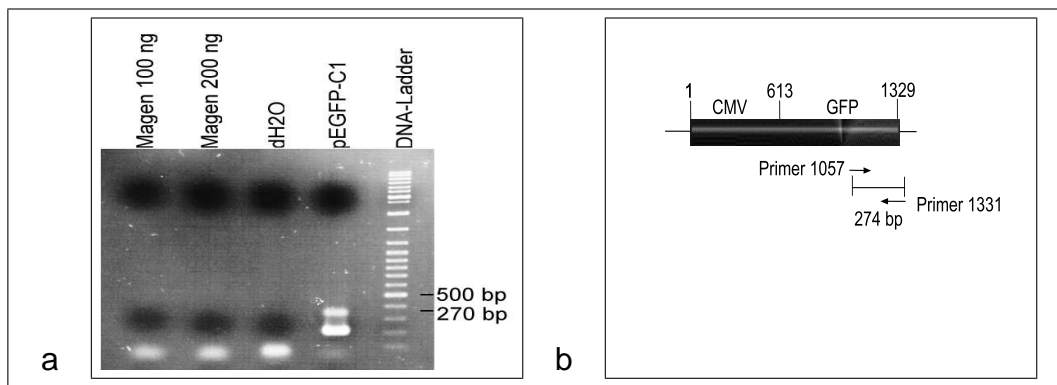


Abbildung 7: PCR-Analysen des homologen 274bp-Fragmentes des Mausgenoms

Zur Untersuchung, ob das in der EST-Mausdatenbank aufgeführte homologe Fragment zum gfp Gen tatsächlich existierte, wurden PCR-Analysen von DNA ungefütterter Tiere durchgeführt. Dazu wurden Primer verwendet, die genau das eventuell homologe Fragment amplifizierten.

(b) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

genomischen Sequenz der Mäuse des Stammes C57Bl6/J ausgeschlossen werden.

Zwischen dem E.coli-Genom und dem gfp Gen fanden sich bei NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen Homologien von weniger als 20 bp (Altschul et al., 1997). Homologien dieser Größenordnung sind weit verbreitet und sollten keinen Einfluß auf die folgenden Untersuchungen haben. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte das gfp Plasmid nach Fütterung eindeutig als Fremd-DNA im Mausorganismus erkannt werden.

4.1.2 Persistenz des pEGFP-C1 Plasmids im GI-Trakt der Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, in welchen Fragmentgrößen mit der Nahrung aufgenommene DNA im Säugerorganismus persistieren konnte. Für die Experimente wurden 8 Wochen alte C57Bl6/J-Mäuse einmal mit 50 µg des Plasmids pEGFP-C1 gefüttert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung wurden die Inhalte des GI-Traktes entnommen, die DNA durch eine Phenol/Chloroform Behandlung extrahiert und 20 µg der gesamten DNA elektrophoretisch getrennt. Die DNA wurde nicht mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, um die Fragmentgrößen der Plasmid DNA, die natürlicherweise im Darm entstanden waren, nicht zu verändern. Nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel wurden

die DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte Gen des „green fluorescent protein“ hybridisiert. In den Abbildungen ?? und ?? (Seite ??) sind die Ergebnisse einer einmaligen Fütterung mit 50 µg Plasmid DNA dargestellt. Die Tiere wurden 1 Stunde, 3 Stunden (Abbildung ??) sowie 6 Stunden und 18 Stunden (Abbildung ?? auf Seite ??) nach oraler Applikation der fremden DNA getötet. Die Ergebnisse der Southern-Transfer-Analysen sind noch einmal in den Abbildungen ?? auf Seite ?? (1 Stunde nach Fütterung) und ?? auf Seite ?? (3 Stunden nach Fütterung), sowie in den Abbildungen ?? auf Seite ?? (6 Stunden nach Fütterung) und ?? auf Seite ?? (18 Stunden nach Fütterung) zusammengefasst.

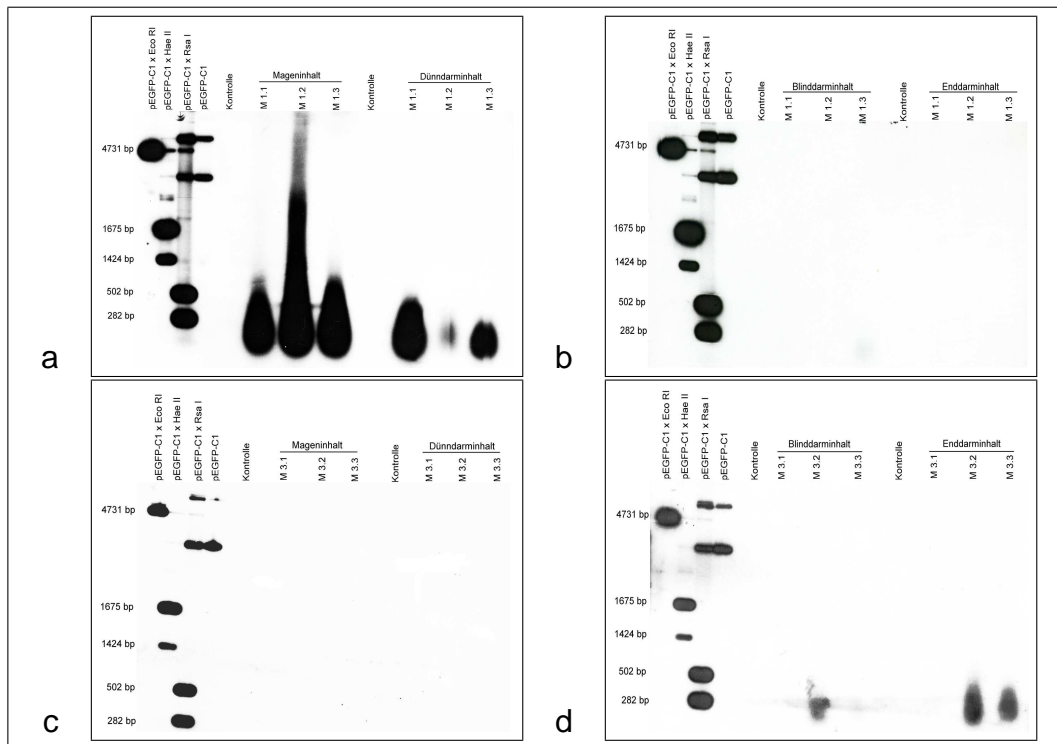


Abbildung 8: Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen

C57Bl6/J Mäuse wurden mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert. Die Tiere wurden 1 h (a und b) und 3 h (c und d) nach Fütterung getötet und die DNA aus den Darminhalten extrahiert. Nach Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurden sie gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gespaltene pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente werden jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben. Kontrolltiere hatten nur DNA-freie Pufferlösung erhalten.

Abbildungen ?? a und ?? b zeigen die Degradierung der Plasmid DNA eine Stunde nach oraler Applikation. Es wurden mehrere Tiere gefüttert und jeweils nach der gleichen Zeitspanne getötet. Fragmente des verfütterten Plasmids konnten bei allen Tieren in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden. Im Magen der Maus M 1.1 in Abbildung ?? a konnten Fragmente entdeckt werden, die eine Größe zwischen 100 bp und 800 bp aufwiesen. Ähnliche Fragmentgrößen wurden im Mageninhalt der Maus M 1.3 gefunden. Hier zeigten sich Fragmente der fremden DNA mit einer Größe bis zu 1000 bp. Bei Maus M 1.2 allerdings konnten Fragmente zwischen 100 bp und bis zu mehr als 4731 bp persistieren. Im darauffolgenden Abschnitt des Verdauungstraktes der Tiere, dem Dünndarm, konnten ebenfalls gfp-spezifische Fragmente nachgewiesen werden. In Maus M 1.1 wurden Fragmente mit einer Größe zwischen 100 bp und 500 bp, in Maus M 1.2 bis zu 400 bp und in Maus M 1.3 bis zu 300 bp der verfütterten Fremd-DNA detektiert.

Die bei der Persistenz durch den Gastrointestinaltrakt entstandenen Fragmente sind in Abbildung ?? auf Seite ?? zusammengefasst. Bei dem direkten Vergleich der Fragmentlängen, die in den verschiedenen Tieren nach Fütterung gefunden werden konnten, wird die Variabilität der Fragmentierung deutlich.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Hauptanteil der DNA schon im Magen degradiert wurde. Die Degradierung der fremden DNA im Magen kann auf dessen saures Milieu zurückgeführt werden, das je nach Nahrungszusammensetzung zwischen pH 1,8 und 4 liegt (Pfeffer, 1987). Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse wurde deutlich, dass die Menge der fremden DNA in den verschiedenen Tieren erheblich variierte. Maus M 1.1 wies im Magen den geringsten Anteil der Plasmid DNA auf, im Dünndarm dagegen den größten. Maus M 1.2 wies den höchsten Anteil der gfp-spezifischen DNA im Magen auf, im Dünndarm den niedrigsten. Bei Maus M 1.3 befand sich mehr fremde DNA im Magen als bei Maus M 1.1, aber weniger als bei Maus M 1.2. Im Dünndarm wiesen die Ergebnisse weniger DNA-Fragmente auf als bei Maus M 1.1 und erheblich mehr als bei Maus M 1.2. Im Blinddarm (Abbildung ?? b auf Seite ??) der Tiere konnten nur noch sehr wenige Fragmente bei Maus M 1.3 nachgewiesen werden. Im Enddarm waren keine Fragmente der fremden DNA zu finden. Nach einer längeren Zeitspanne zwischen oraler Verabreichung und Töten der Tiere wurde die mit der Nahrung aufgenommene DNA sehr oft in

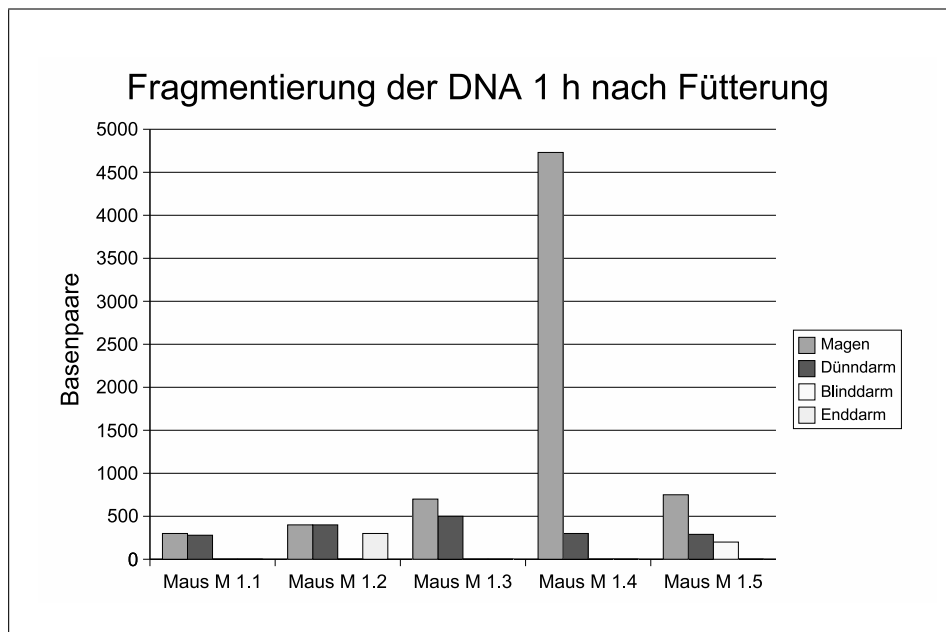


Abbildung 9: Fütterung des Plasmids pEGFP-C1

Zu dieser Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung???. Die 1 h nach Fütterung entstandenen Fragmentlängen sind im Diagramm durch die Länge der Balken wiedergegeben. In mit TE-Puffer gefütterten Mäusen konnten keine Fragmente der applizierten DNA detektiert werden.

Blind- und Enddarm nachgewiesen.

Im Magen- und im Dünndarminhalt konnten 3 Stunden nach Applikation der gfp DNA bei allen drei Tieren keine Fragmente der fremden DNA gefunden werden (Abbildung ?? c und ?? d auf Seite ??). Auch im Blinddarm zeigten sich nur in einer der gefütterten Mäuse die fremde DNA. In Maus M 3.2 wurden wenige Fragmente mit einer Größe zwischen 100 bp bis 200 bp detektiert. Im Enddarm überlebten bei Maus M 3.2 Fragmente der verfütterten DNA zwischen 100 bp und 400 bp (Abbildung ?? c auf Seite ??). Weitere gfp-spezifische Fragmente persistierten im Enddarm der Maus M 3.3 mit einer Größe zwischen 100 bp und 300 bp. Die nach der Fütterung im Gastrointestinaltrakt entstandenen Fragmentlängen sind in Abbildung ?? auf Seite ?? zusammengefasst. Bei einem Vergleich der Abbildungen ?? auf Seite ??, ?? auf Seite ?? und den Abbildungen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ?? ist erkennbar, daß die Degradierung der oral verabreichten DNA drei Stunden nach Applikation sehr viel weiter fortgeschritten war als eine Stunde nach Fütterung.

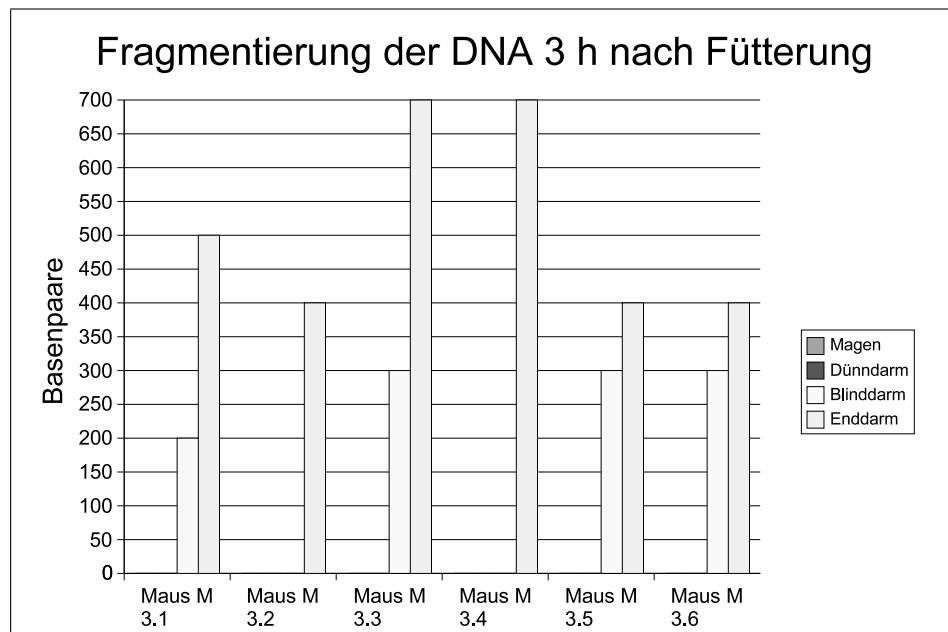


Abbildung 10: Fütterung des Plasmids pEGFP-C1

Für dieses Diagramm trifft die Legende zu Abbildung ?? ebenfalls zu.

Die Persistenz des Plasmids pEGFP-C1 im Gastrointestinaltrakt der Mäuse wurde weiterhin sechs Stunden nach Verabreichung untersucht (Abbildung ?? a und b auf Seite ??). Das Autoradiogramm der DNA aus den Mageninhalten zeigte, dass sich sehr wenig gfp-spezifische DNA mit einer Größe von 200 bp bei den Mäusen M 6.1 und M 6.4 nachweisen ließ (Abbildung ?? auf Seite ??). Ebenfalls im Dünndarminhalt der Maus M 6.2 ließen sich noch wenige Fragmente mit einer Größe bis zu 200 bp entdecken. Eine größere Menge an fremder DNA ließ sich, genau wie 3 Stunden nach Applikation der fremden DNA, in den Blind- und Enddarminhalten zeigen (Abbildung ?? b auf Seite ??). Im Blinddarm der Maus M 6.2 wurden Fragmente bis zu 400 bp autoradiographisch nachgewiesen, im Blinddarm der Maus M 6.4 Fragmente bis zu 200 bp. Im Enddarminhalt der Maus M 6.1 konnten gfp-spezifische Fragmente bis zu 200 bp persistieren, während im Enddarminhalt der Maus M 6.2 Fragmente bis zu 700 bp überlebten. Im Magen- und Dünndarminhalt der Maus M 6.2 konnte keine fremde DNA entdeckt werden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus Blinddarm und Enddarm allerdings ließ sich eine Anreicherung der DNA im Enddarm feststellen.

Bei Mäusen, die 18 Stunden nach Verfütterung des Plasmids getötet

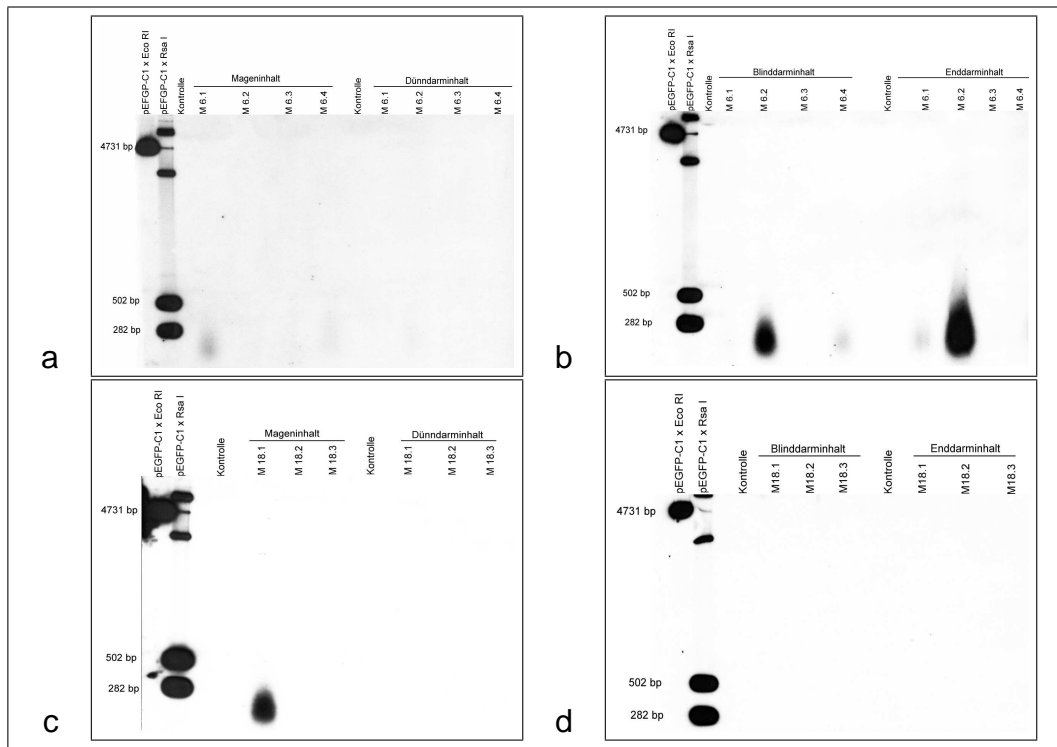


Abbildung 11: Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen

Zu dieser Abbildung gilt die Legende wie zu Abbildung ?? Die Tiere wurden 6 h (a und b) und 18 h (c und d) nach Fütterung getötet.

worden waren, konnte nur in einer einzigen Maus (M 18.2) die fremde DNA im Mageninhalt nachgewiesen werden. Die DNA war hier auf Fragmentgrößen von bis zu 300 bp degradiert worden (Abbildung ?? c). In anderen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes konnte keine gfp-spezifische DNA nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Diagramme wird auch hier eine Variation der Fragmentgrößen, die in den Gastrointestinaltrakten der Tiere entstanden sind, deutlich. Die Ergebnisse der Southern-transfer-Analysen sind noch einmal in den Abbildungen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ?? zusammengefasst.

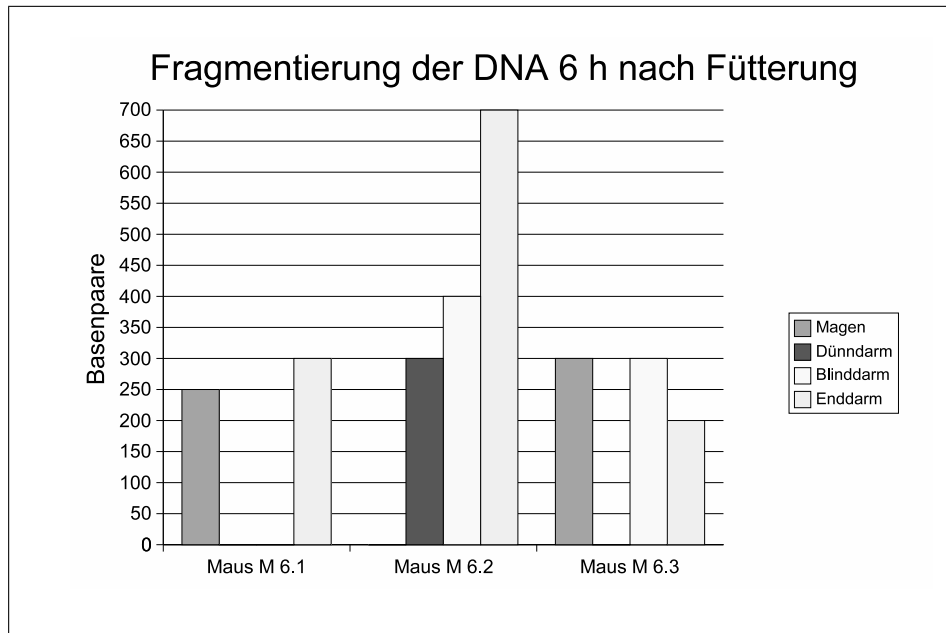


Abbildung 12: Fütterung des Plasmids pEGFP-C1
Für dieses Diagramm trifft die Legende zu Abbildung ?? ebenfalls zu.

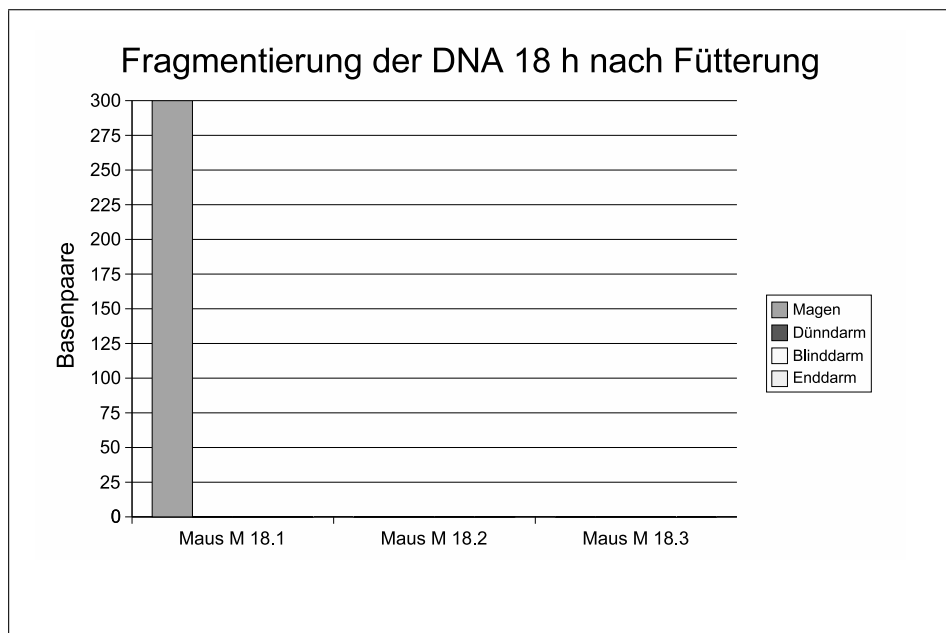


Abbildung 13: Fütterung des Plasmids pEGFP-C1
Für dieses Diagramm trifft die Legende zu Abbildung ?? ebenfalls zu.

4.1.3 Orale Applikation des Plasmids pEGFP-C1 für einen längeren Zeitraum

Während der Experimente kam die Frage auf, wie sich fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA verhielt, wenn diese mehr als einmal appliziert wurde. Daraufhin wurden Mäuse wie folgt gefüttert:

24 h-Maus:	einmalige Gabe von 50 µg gfp DNA Tötung nach 24 h
48 h-Maus:	zweimalige Gabe von 50 µg gfp DNA 2. Applikation 24 h nach der ersten Tötung 24 h nach 2. Applikation
3 Tage-Maus:	dreimalige Gabe von 50 µg gfp DNA Applikation je 24 h nach der vorherigen Tötung 24 h nach letzter Applikation
4 Tage-Maus:	viermalige Gabe von 50 µg gfp DNA Applikation je 24 h nach der vorherigen Tötung 24 h nach letzter Applikation
5 Tage-Maus:	fünfmalige Gabe von 50 µg gfp DNA Applikation je 24 h nach der vorherigen Tötung 24 h nach letzter Applikation

Tabelle 3: Orale Applikation fremder DNA

Mit Hilfe von Southern-Transfer-Analysen konnte nicht ermittelt werden, ob die fremde DNA in den Gastrointestinaltrakten der Tiere persistieren konnte (Abbildung ?? auf Seite ??). In Kontrollmäusen, die mit DNA-freier Pufferlösung gefüttert worden waren, konnte die gfp DNA zu keiner Zeit und in keinem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes gefunden werden.

Die in Abschnitt ?? ab Seite ?? dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Fragmente des oral applizierten Plasmids pEGFP-C1 DNA bis zu 6 Stunden im Blinddarminhalt und Enddarminhalt nachweisbar waren. Die gezeigten Fragmente wiesen Größen von bis zu 700 bp auf. Demzufolge wurde die DNA im Blinddarm nicht wesentlich weiter degradiert. Diese Beobachtung korrelierte mit *in vitro* Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass im Dickdarminhalt von Ratten über mehrere Stunden inkubierte DNA nur noch zu 90% abgebaut wird (Maturin und Curtiss, 1977). Im Gegensatz zum Blinddarm des Menschen ist der einer Maus, wie allgemein bei Herbivoren, gut ausgebildet. In ihm werden große Teile pflanzlichen

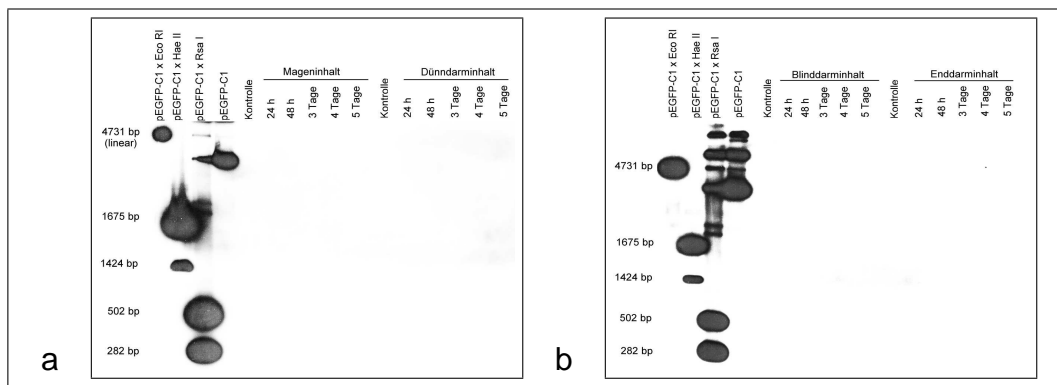


Abbildung 14: Fragmentierung fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA im GI-Trakt von Mäusen

C57Bl6/J Mäuse wurden mit 50 μg pEGFP-C1 DNA gefüttert. Die Tiere wurden 24 h bis 5 Tage nach Fütterung getötet und die DNA aus den Darminhalten extrahiert. Nach Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurden sie gegen das radioaktiv markierte *gfp* Gen hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gesplante pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente werden jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben. Kontrolltiere hatten nur DNA-freie Pufferlösung erhalten.

Materials von Mikroorganismen abgebaut. Etwa 85% der aus dem gesamten Darm extrahierten DNA wurden aus dem Blinddarm isoliert. Vielleicht scheint der Blinddarm eine Art Speicherfunktion zu erfüllen.

Insgesamt wurden die Inhalte des Gastrointestinaltraktes von 32 Tieren, die mit dem Plasmid pEGFP-C1 gefüttert worden waren, untersucht. Die Degradierung der verfütterten Fremd-DNA sowie die Darmpassagezeit variierten dabei von Maus zu Maus (Abbildungen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ??). Geschlecht, Alter und Stamm der Tiere sowie Tageszeit der DNA-Verabreichung hatten keinen sichtbaren Einfluß auf die Ergebnisse.

Bei einem Vergleich der Autoradiographien wurde deutlich, dass die DNA im Laufe der Zeit mehr und mehr in Blind- und Enddarm persistieren konnte. Die Fragmentgrößen in Blind- und Enddarm zeigten 3 Stunden und 6 Stunden nach oraler Applikation keine erkennbaren Unterschiede.

Ein sehr gutes Beispiel für die natürliche Variabilität bei diesen Experimenten mit lebenden Organismen gab der Vergleich der Abbildungen ?? c auf Seite ?? und ?? a auf Seite ?. Abbildung ?? c auf Seite ?? zeigt, dass 3 Stunden nach Verabreichung der *gfp* DNA keine DNA in den Magen- und Dünndarminhalten detektierbar war. Jedoch konnten wenige

Fragmente 6 Stunden nach oraler Applikation in den Magen- und Dünndarminhalten zweier gefütterter Tiere gefunden werden. Später als 6 Stunden nach Fütterung konnte die Test-DNA nur in einem untersuchten Tier, 18 Stunden nach Fütterung im Inhalt des Magens mittels der Southern-Transfer-Analyse nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die DNA zu späteren Zeitpunkten komplett degradiert und/oder ausgeschieden worden war, oder ob die Methode des Southern-Transfers nicht sensitiv genug war, um die verbliebene fremde DNA nachzuweisen, wurden sensitivere Methoden wie z. B. die PCR-Analyse (Abschnitt ?? auf Seite ??) durchgeführt.

4.2 PCR-Analysen der persistierten DNA-Fragmente der Darminhalte

Um die Degradierung der fremden, mit der Nahrung aufgenommenen DNA weiter zu analysieren, wurde die aus den Darminhalten extrahierte DNA mit Hilfe der PCR-Methode untersucht. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die extrahierte DNA aus den Darminhalten noch Substanzen aus den Inhalten des Gastrointestinaltraktes enthalten konnte, die die PCR inhibieren konnten. Um dies zu vermeiden wurde die DNA zunächst über Siliziumoxid aufgereinigt (Abschnitt ?? auf Seite ??).

Für die PCR-Analysen wurden Primer gewählt, die Fragmente des Gens des „green fluorescent protein“ unterschiedlicher Größe amplifizierten (siehe Tabelle ?? auf Seite ?? und Abbildung ?? auf Seite ??). Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert, um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu bestätigen.

Die extrahierte genomische DNA wurde auf das Vorhandensein großer gfp-spezifischer Fragmente getestet. Dazu wurden Primer gewählt, die ein 1277 bp großes Fragment amplifizierten (Abbildung ?? auf Seite ??). Es wurden Fragmente dieser Größe in den Inhalten des Magens 3 und 6 Stunden, sowie im Dünndarminhalt 3 Stunden nach Fütterung gefunden. Weitere Fragmente mit einer Größe von 1277 bp konnten nicht amplifiziert werden. Daraus ließ sich schließen, dass das 4731 bp große Plasmid schon innerhalb der ersten 3 bis 4 Stunden zu kleineren Fragmenten degradiert wurde.

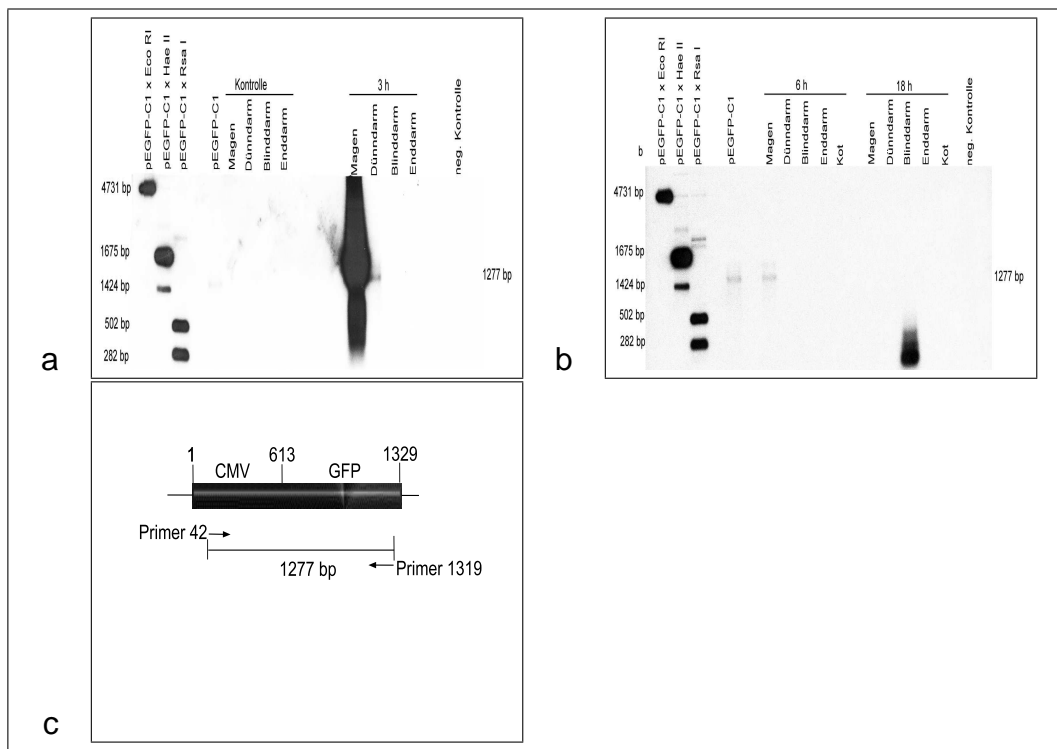


Abbildung 15: PCR-Analysen des *gfp* Plasmids im GI-Trakt von Mäusen
 Die aus zu den angegebenen Zeitpunkten extrahierte DNA aus den entnommenen Darminhalten wurde mittels der PCR-Methode untersucht. Die Tiere wurden mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert. Die amplifizierten Produkte wurden gegen das radioaktiv markierte Gen des „green fluorescent protein“ hybridisiert. Die DNA der TE-Puffer gefütterten Tiere wurde ebenfalls analysiert. Es konnten keine *gfp*-spezifische Fragmente amplifiziert werden. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurden einem Ansatz statt der genomischen DNA 20 pg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt. Als Größenmarker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I geschnittene Plasmid pEGFP-C1.

(a) und (b) Amplifikation des 1277 bp Fragmentes

(c) Lage des verwendeten Primerpaares im *gfp* Gen

Um die Fragmentgrößen besser einschätzen zu können, wurden Primer eingesetzt, die kleinere Fragmente des Gens des „green fluorescent protein“ amplifizierten. *Gfp*-spezifische Fragmente mit einer Größe von 750 bp wurden 3 Stunden nach Verfütterung des fremden Plasmids in den Inhalten des Magens, des Dünndarms und des Kots amplifiziert. Weitere Fragmente derselben Größe konnten 6 Stunden nach Applikation der fremden DNA im Inhalt des Magens und nach einer weiteren PCR-Analyse im Blinddarm und Enddarm (Abbildung ?? auf Seite ??) gefunden werden.

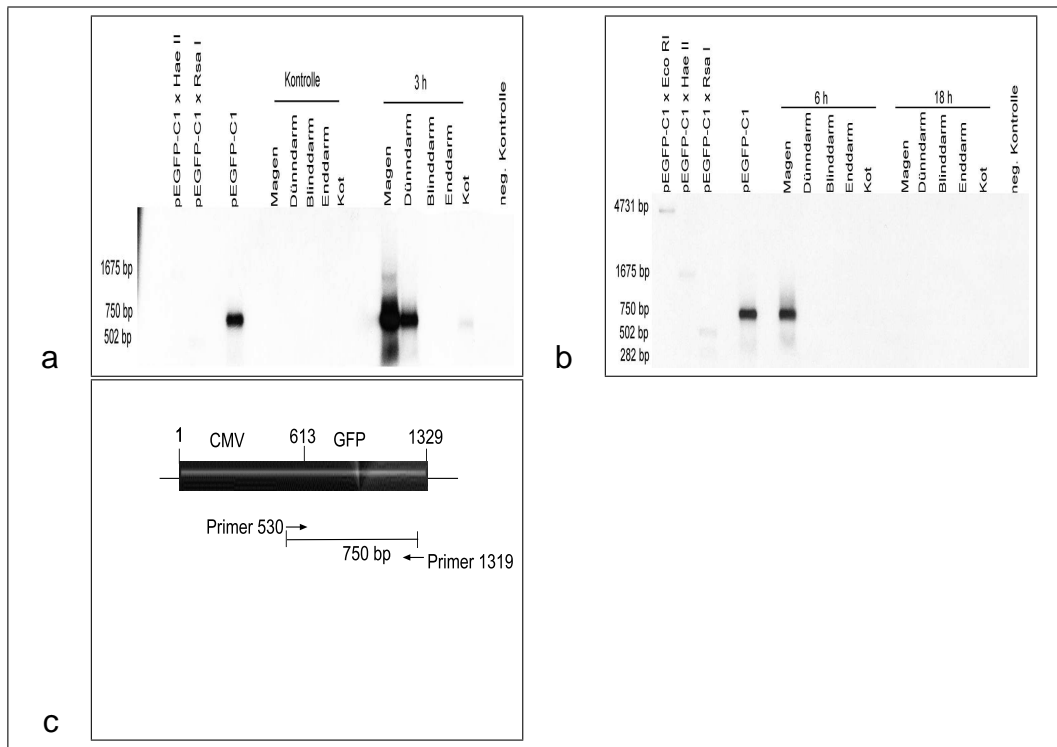


Abbildung 16: PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen
Es gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??.

- (a) und (b) Amplifikation des 750 bp Fragments
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

Diese Ergebnisse korrelierten mit der Detektion der fremden DNA nach Southern-Transfer-Analysen (Abbildung ?? b auf Seite ??). Ebenfalls konnte ein 750 bp großes Fragment im Blinddarm nach 5 Tagen (Abbildung ?? auf Seite ??) amplifiziert werden.

Es wurde ein weiteres Primerpaar gewählt, welches ein gfp-spezifisches Fragment in einer Größe von 466 bp amplifizieren konnte. Es konnten bei dieser PCR-Amplifikation Fragmente in den Inhalten des Magens, des Dünndarms und des Enddarms sowie im Kot 3 Stunden nach Fütterung nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Fragmente dieser Größe 6 Stunden nach Applikation im Magen- und im Dünndarminhalt gefunden (Abbildung ?? auf Seite ??). In den Darminhalten der mit TE-Puffer gefütterten Kontrollmäuse konnten zu keiner Zeit und mit keinem der benutzten Primerpaare Fragmente amplifiziert werden.

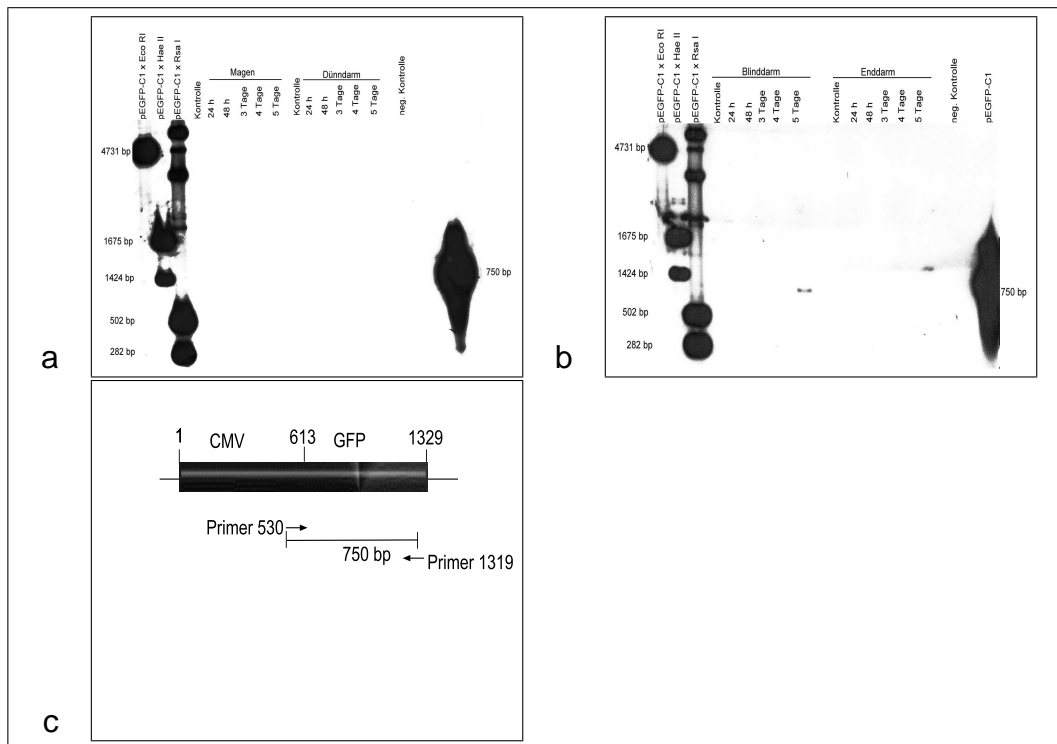


Abbildung 17: PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen
Es gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ?? beschrieben.

- (a) amplifizierte Produkte der DNA extrahiert aus Magen und Dünndarm
- (b) amplifizierte Produkte der DNA extrahiert aus Blinddarm und Enddarm
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

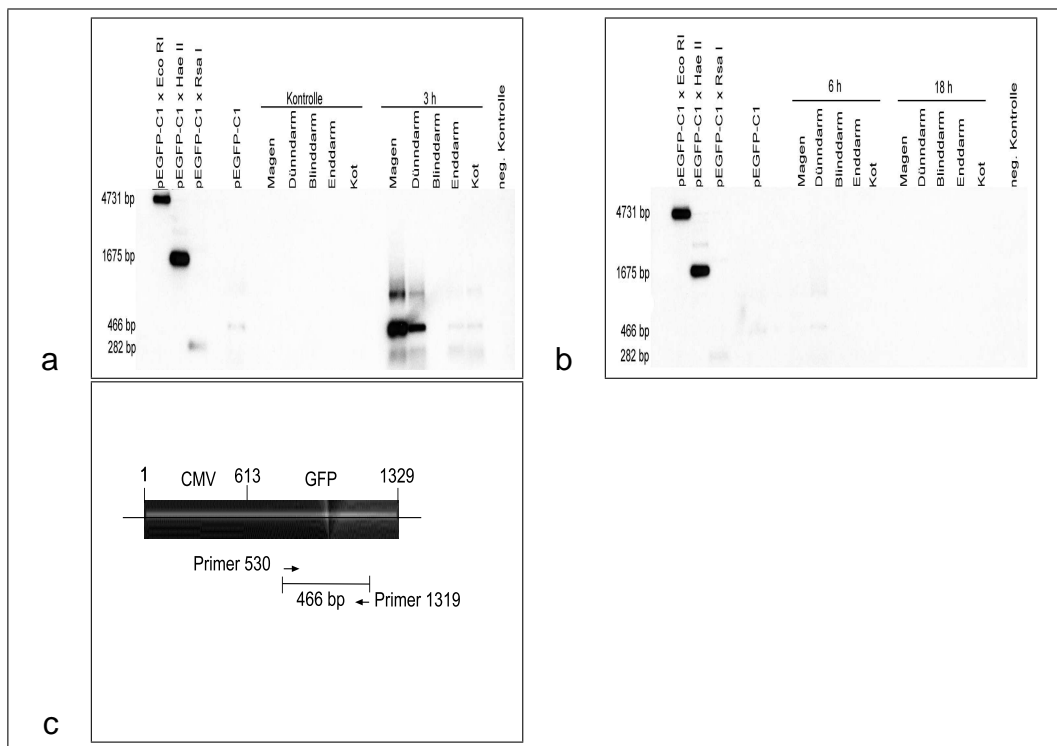


Abbildung 18: PCR-Analysen des gfp Plasmids im GI-Trakt von Mäusen
Es gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??.

- (a) und (b) Amplifikation des 466 bp Fragmentes
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

Die Ergebnisse zeigten, dass oral verabreichte pEGFP-C1 DNA im Gastrointestinaltrakt der Mäuse nicht vollständig zu niedermolekularen Mononukleotiden abgebaut wurde, sondern dass Fragmente von bis zu 1277 bp (28% der Plasmidgröße) noch 3 Stunden nach oraler Applikation im Gastrointestinaltrakt der Mäuse persistiert haben (siehe auch Tabelle ??).

Fragmente von 466 bp konnten bis zu 6 Stunden nach Fütterung nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle ?? auf Seite ??).

Amplifikationen von gfp-spezifischen Fragmenten 18 Stunden nach Verabreichung der fremden DNA konnten nicht detektiert werden. Daraus ließ sich schließen, dass die DNA wahrscheinlich schon zu kleineren Fragmenten degradiert worden war. Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind in den Tabellen ?? auf Seite ?? bis ?? auf Seite ?? zusammengefasst. Die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse früherer Arbeiten (Schubbert et al., 1994, 1997; Hohlweg, 2001).

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
1 h	–	–	–	–	–
3 h	+	+	–	–	–
6 h	+	–	–	–	–
18 h	–	–	–	–	–
24 h	–	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–	–
3 Tage	–	–	–	–	–
4 Tage	–	–	–	–	–
5 Tage	–	–	–	–	–

Tabelle 4: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 1277 bp.

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
1 h	-	-	-	-	-
3 h	+	+	-	-	+
6 h	+	-	+	+	-
18 h	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-
48 h	-	-	-	-	-
3 Tage	-	-	-	-	-
4 Tage	-	-	-	-	-
5 Tage	-	-	+	-	-

Tabelle 5: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 750 bp.

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
1 h	-	-	-	-	-
3 h	+	+	-	+	+
6 h	-	-	-	-	-
18 h	-	-	-	-	-
24 h	-	-	-	-	-
48 h	-	-	-	-	-
3 Tage	-	-	-	-	-
4 Tage	-	-	-	-	-
5 Tage	-	-	-	-	-

Tabelle 6: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 466 bp.

4.2.1 Aufnahme von oral applizierter fremder DNA in Körperzellen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA in den Organismus aufgenommen und zu Organen transportiert werden kann. Da im Gastrointestinaltrakt der Mäuse noch Fragmente (466 bp bis 1277 bp) des Plasmids pEGFP-C1 nachweisbar waren, wurde die DNA der Leber, Milz, der Nieren und des Blutes extrahiert und mit Hilfe der PCR-Methode (Abschnitt ?? auf Seite ??) analysiert.

Abbildung ?? auf Seite ?? zeigt PCR-Analysen der genomischen DNA aus den Organen Leber, Milz und Nieren sowie aus dem entnommenen Blut. Bei diesen Experimenten wurden die schon erwähnten Primerpaare (Abschnitt ?? ab Seite ??) eingesetzt. Nach Einsetzen des Primerpaares, welches ein 1277 bp großes Fragment amplifizieren konnte, wurden in der Leber 3, 6 und 18 Stunden nach Fütterung gfp-spezifische DNA gefunden. Diese Fragmente enthielten sowohl den CMV Promotor als auch das gfp Gen. Die Intensität der Banden impliziert, dass die Menge der DNA in der Leber im Laufe der Zeit abnimmt. Desweiteren wurden Fragmente der entsprechenden Größe in der Milz 6 Stunden und im Blut 3 und 6 Stunden nach oraler Applikation nachgewiesen (Abbildung ?? b).

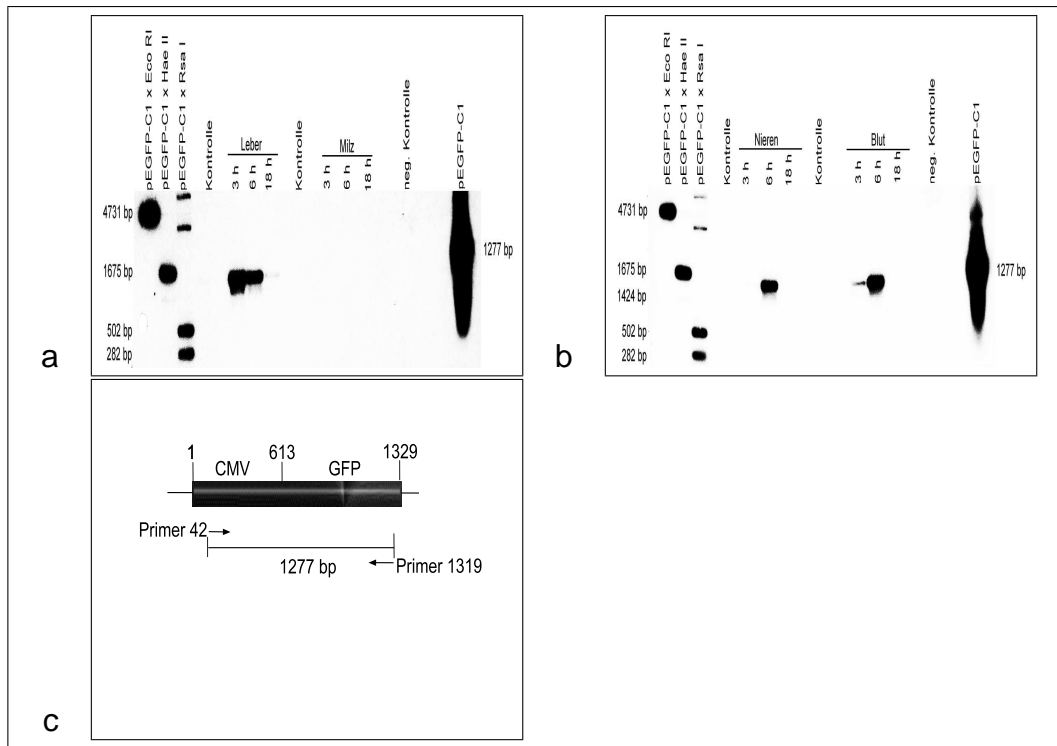


Abbildung 19: Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut
 Mäuse des Stammes C57Bl6/J wurden mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten extrahierte DNA aus den Organen und dem entnommenen Blut wurde mittels der PCR-Methode untersucht. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurde einem Ansatz statt der genomischen Maus-DNA 20 pg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt. Die amplifizierten Produkte wurden gegen das radioaktiv markierte Gen des „green fluorescent protein“ hybridisiert. Die DNA der mit TE-Puffer gefütterten Tiere wurde ebenfalls analysiert. Als Größenmarker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I

(a), (b) Amplifikation eines 1277 bp Fragmentes 3 h bis 18 h nach Fütterung

(c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

Ein 750 bp großes Fragment konnte in Leber, Milz und Niere 3 Stunden nach Verabreichung der gfp DNA amplifiziert werden (Abbildung ??). In dieser Autoradiographie wurde ebenfalls eine Abnahme der DNA-Menge von Leber zu Nieren innerhalb derselben Maus beobachtet. Abbildung ?? b zeigt, dass die DNA mit einer Größe von 750 bp, das nur das gfp Gen beinhaltet, in den Nieren noch nach 48 Stunden nachweisbar war. Ebenfalls konnte im Blut fünf verschiedener Tiere, die 24 Stunden bis 5 Tage lang gefüttert worden waren, ein 750 bp Fragment amplifiziert werden. Die Intensität dieser Banden nahm bis zu 3 Tagen zu und danach wieder ab. Auch hier wurde wiederum die Individualität der Tiere und demnach die Variabilität des Verbleibs der mit der Nahrung aufgenommenen DNA deutlich. Die Ergebnisse zeigten, dass oral verabreichte DNA über die Blutbahn in den Organismus gelangen und nach mehrmaliger Applikation länger im Körper nachweisbar war.

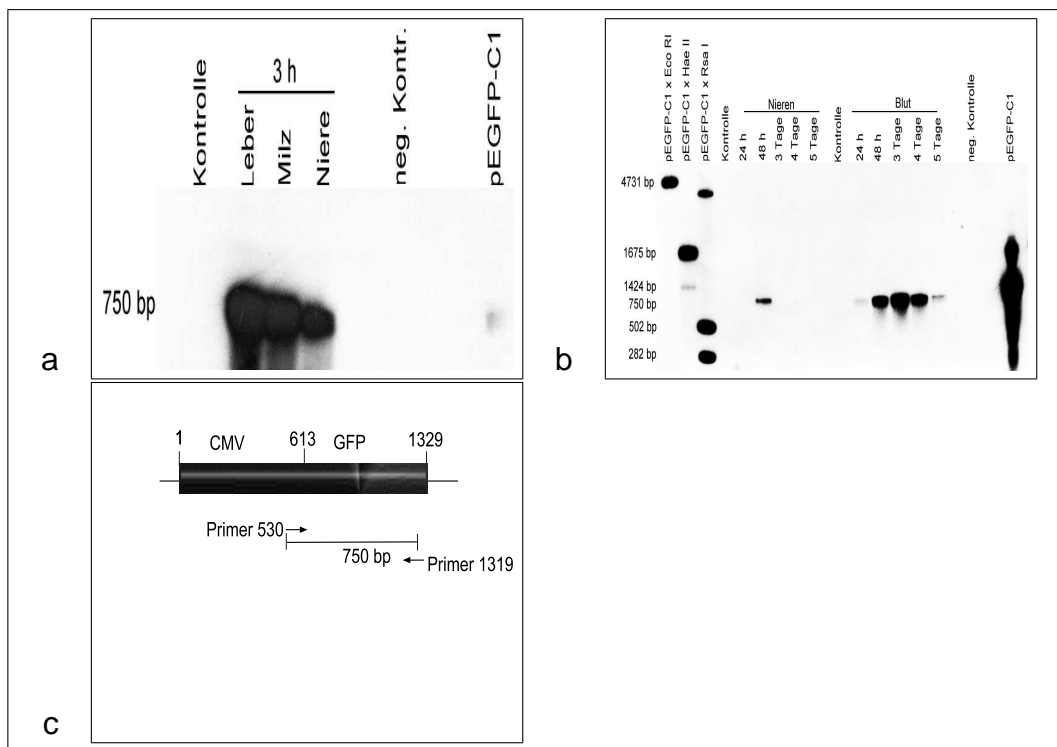


Abbildung 20: Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut
Zu dieser Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??.

- (a) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes 3 h nach Fütterung
- (b) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes nach mehrmaliger Applikation von 50 µg des pEGFP-C1 Plasmids
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares

Ein kleineres Fragment mit einer Größe von 466 bp, welches ein Teil des Gens des „green fluorescent protein“ darstellte, konnte in Leber, Milz, Nieren und im entnommenen Blut 3 Stunden nach Fütterung nachgewiesen werden (Abbildung ??). Weiterhin zeigt diese Abbildung eine Amplifikation eines Fragments derselben Größe sowohl in Milz und Blut 6 Stunden nach Gabe der fremden DNA, als auch in Nieren und Blut 18 Stunden nach Verabreichung. Außer dem oben schon erwähnten Fragment (1277 bp, Abbildung ?? auf Seite ??) in der Leber ist das 466 bp große Fragment in den Nieren das einzige gfp-spezifische Fragment, welches 18 Stunden nach Fütterung in einem Organ nachgewiesen werden konnte.

In der aus Organen extrahierten DNA von mit TE-Puffer gefütterten Tieren konnte keine DNA amplifiziert werden.

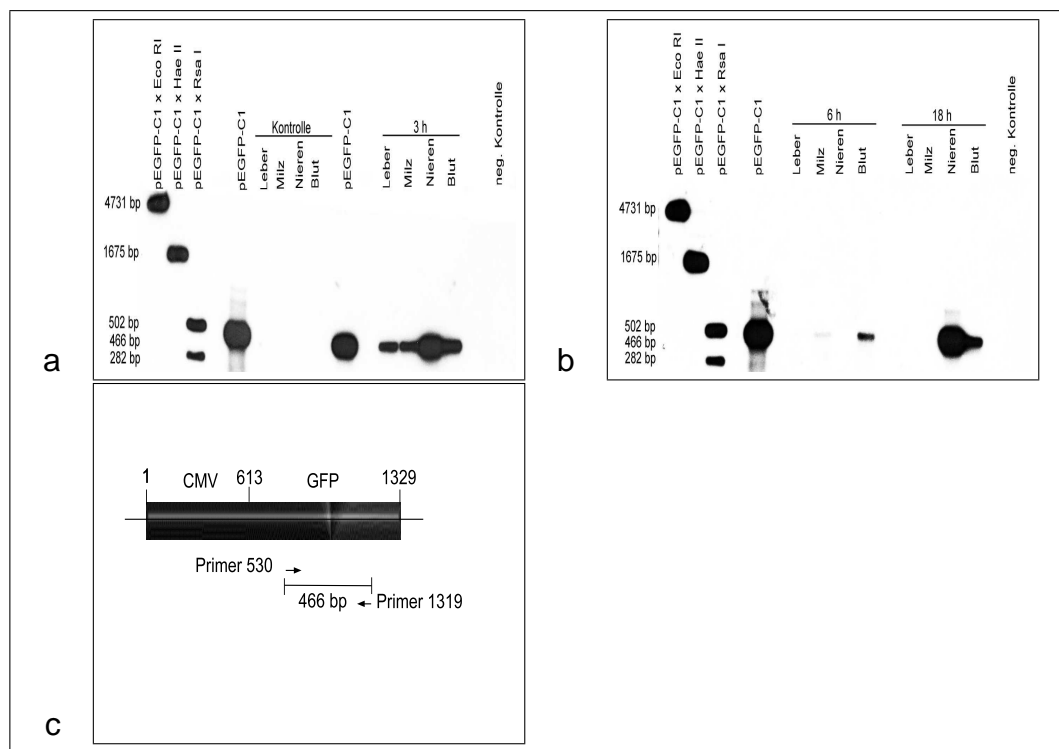


Abbildung 21: Nachweis des gfp Plasmids in Organen und im Blut
Für diese Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??.

- (a), (b) Amplifikation eines 466 bp Fragmentes 3 h bis 18 h nach Fütterung
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares

Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind noch einmal in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

	Leber	Milz	Niere	Blut
1 h	–	–	–	–
3 h	+	–	–	+
6 h	+	–	+	+
18 h	+	–	–	–
24 h	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–
3 Tage	–	–	–	–
4 Tage	–	–	–	–
5 Tage	–	–	–	–

Tabelle 7: PCR-Analysen der DNA aus den Organen
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 1277 bp.

	Leber	Milz	Niere	Blut
1 h	–	–	–	–
3 h	+	+	+	+
6 h	+	–	+	–
18 h	+	–	–	–
24 h	–	–	–	+
48 h	–	–	+	+
3 Tage	–	–	–	+
4 Tage	–	–	–	+
5 Tage	–	–	–	+

Tabelle 8: PCR-Analysen der DNA aus den Organen
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 750 bp.

	Leber	Milz	Niere	Blut
1 h	–	–	–	–
3 h	+	+	+	+
6 h	–	+	–	+
18 h	–	–	+	+
24 h	–	–	–	–
48 h	–	–	–	–
3 Tage	–	–	–	–
4 Tage	–	–	–	–
5 Tage	–	–	–	–

Tabelle 9: PCR-Analysen der DNA aus den Organen
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 466 bp.

4.3 Fluoreszenz-*in situ*-Analysen von Blinddarmwänden

Um den Weg der DNA-Aufnahme in den Organismus zu rekonstruieren, wurde die Darmwand als möglicher Eintrittsort für die fremde DNA mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungsmethode (FISH) analysiert. Dazu wurde die Blinddarmwand von gfp gefütterten Tieren zu unterschiedlichen Zeiten nach Applikation entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 3 µm dicken Gewebeschnitte wurden mit Biotin-markierter gfp DNA hybridisiert. Parallel dazu wurden Gewebeschnitte durch die Darmwand von Kontrolltieren, die mit TE-Puffer gefüttert worden waren, analysiert (Tabelle ?? auf Seite ??). In den mit gfp DNA gefütterten Tieren zeigten einzelne Zellen des Darmepithels, das direkt an das Darmlumen grenzte, spezifische Signale der Test-DNA. Dabei ist die nachgewiesene DNA als gelb-fluoreszierendes Signal in den mit Propidiumiodid gefärbten Zellkernen erkennbar. In Gewebeschnitten von Kontrolltieren konnten derartige Signale nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind nochmals in Tabelle ?? zusammengefasst.

3 h	6 h	18 h	24 h
2	1	0	1

Tabelle 10: Aufnahme der pEGFP-C1 DNA in Zellen der Villi des Caecums
Die gelb fluoreszierenden Signale des an den Antikörper gekoppelten FITC wurden gezählt und sind durch die Zahlen in der Tabelle angegeben. Die Zahlen zeigen die Anzahl der gfp-spezifischen Signale innerhalb von 2100 Okularfeldern.

Tabelle 11: FISH-Analyse der Blinddarmwände

Histologische Schnitte durch die Blinddarmwand von Mäusen, die mit 50 µg pEGFP-C1 DNA (a-c) oder DNA-freiem Puffer (d) gefüttert wurden. Als Hybridisierungssonde wurde das Plasmid pEGFP-C1 mit Biotin markiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. Die nachgewiesene DNA ist als gelbes Signal in den mit Propidiumiodid gefärbten Nuklei zu erkennen.

- (a) Blinddarmepithel 3 h,
- (b) Blinddarmepithel 6 h,
- (c) Blinddarmepithel 24 h nach oraler Applikation der DNA.
- (d) Blinddarmepithel einer mit TE-Puffer gefütterten Maus; Vergrößerung: 1200 x

4.3.1 Persistenz oral aufgenommener DNA nach Komplexierung mit einem Protein

Nach Verabreichung nackter gfp DNA konnten ist zu 1277 bp lange Fragmente mit der PCR-Methode im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Nun stellte sich die Frage, wie weit DNA-Protein-Komplexe im Gastrointestinaltrakt degradiert werden. Unterliegt diese DNA der gleichen Degradierung oder können größere Fragmente im GI-Trakt persistieren?

Zur Komplexierung der DNA wurde das Protein „Protamin“ gewählt, welches Nukleinsäuren unspezifisch und gut bindet. Protamin ist ein 4,2 kDa großes Protein. Es beinhaltet sehr viel Arginin und komplexiert die DNA in Spermien vieler Spezies. Das Protein ist kleiner als Histone. Die Protein-DNA-Bindung wurde in HNDG-Puffer (H. Deissler et al., 1996) durchgeführt. Dabei wurden 10 µg der gfp DNA mit 1 mg Protamin gemischt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei RT inkubiert, so dass das Protamin an die fremde DNA binden konnte und mit einer Pipette oral an C57Bl6/J Mäuse verabreicht. Die Tiere wurden 3, 6 und 18 Stunden nach Gabe der Komplexe in einer CO₂-Atmosphäre getötet. Die Organe und Darminhalte wurden entnommen, und die DNA extrahiert. Zur Analyse wurden 20 µg der genomischen DNA in einem Agarosegel getrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Um feststellen zu können, in welchem Verhältnis das Protein sämtliche DNA komplexieren kann, wurde eine Gelretardierungs Analyse (nicht gezeigt) durchgeführt.

Abbildung ?? auf Seite ?? zeigt die Autoradiographie der Southern-Transfer-Analysen. Es konnten bei diesen Analysen Fragmente 3 Stunden nach Fütterung gezeigt werden. Im Inhalt des Magens fanden sich Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis hin zu 4731 bp Fragmenten. Weiterhin ist eine Bande von einer wahrscheinlichen Größe von 5000 bp zu erkennen. Diese Bande läßt vermuten, dass sich das Protamin im Magen mit DNA, die sich in den Futterpellets befand, komplexiert hat. Im Dünndarminhalt konnten Fragmente von 100 bp bis zu 1700 bp nachgewiesen werden. Weder in anderen Darmabschnitten noch nach weiteren Zeitpunkten konnte gfp-spezifische DNA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Southern-Blot-Analysen sind noch einmal in dem nachstehenden Diagramm (Abbildung ?? auf Seite ??) zusammengefasst.

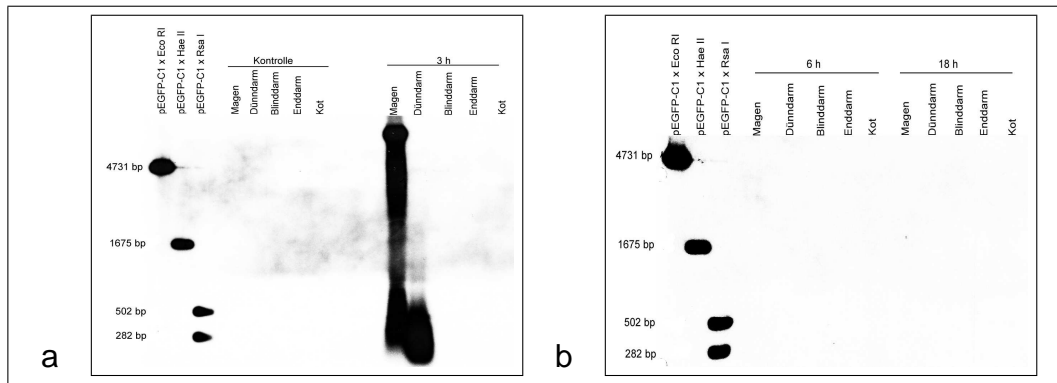


Abbildung 22: Fragmentierung fremder DNA im GI Trakt von Mäusen nach Komplexierung mit Protamin

C57Bl6/J Mäuse wurden mit 10 μg pEGFP-C1 DNA, die mit 1 mg Protamin komplexiert wurde, gefüttert. Die Tiere wurden 3 h, 6 h und 18 h nach Fütterung getötet, und die DNA aus den Darminhalten extrahiert. Nach Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurden sie gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gesplante pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente sind jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben. Kontrolltiere hatten nur DNA-freie Pufferlösung erhalten.

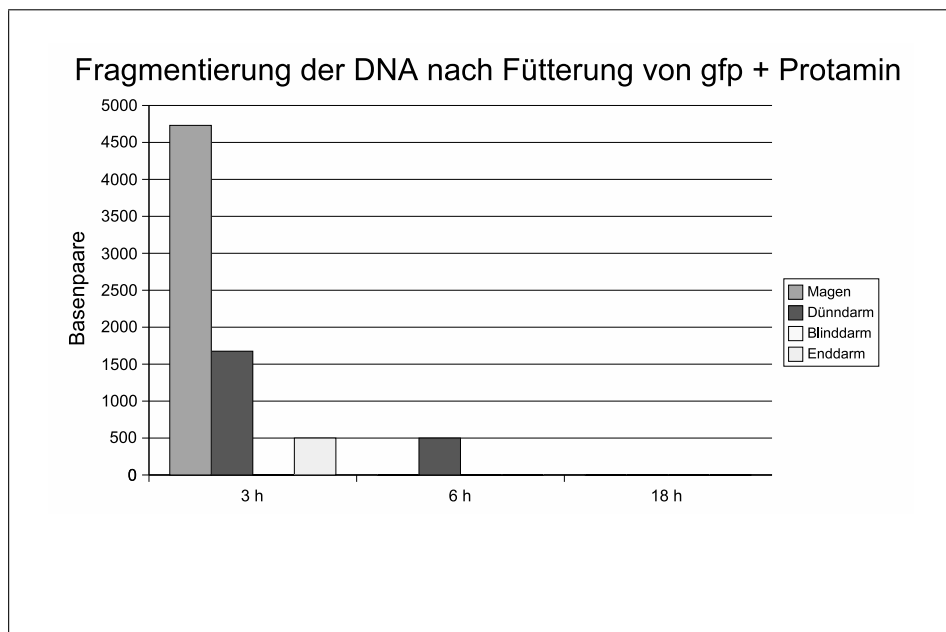


Abbildung 23: Fütterung des gfp/Protamin-Komplexes

ZU dieser Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ???. Die Fragmentlängen sind im Diagramm durch die Länge der Balken angegeben. In mit TE-Puffer gefütterten Mäusen konnten keine Fragmente der pEGFP-C1 DNA detektiert werden.

Nach Applikation des unkomplexierten Plasmids pEGFP-C1 waren kleinere Fragmente mit Hilfe der Southern-Transfer-Analyse zu finden. Um die Darmabschnitte weitergehend zu untersuchen, wurden PCR-Analysen durchgeführt (Abbildung ?? auf Seite ??). Dazu wurden die gleichen Primerpaare gewählt, die schon in den vorherigen Versuchen eingesetzt worden waren.

In Abbildung ?? a ist zu erkennen, dass ein Fragment mit einer Größe von 1277 bp nur im Mageninhalt 3 Stunden nach oraler Applikation detektierbar war.

Nach einer Amplifikation eines 750 bp großen Fragments waren Fragmente des Gens des „green fluorescent protein“ in den Inhalten des Magens, des Blinddarms und des Kots 3 Stunden nach Fütterung amplifizierbar (Abbildungen ?? c und d).

Weiterhin konnten Fragmente im Magen 6 Stunden nach Applikation und im Magen- und Enddarminhalt 18 Stunden nach Verabreichung der Plasmid DNA amplifiziert werden.

Zuletzt wurde ein 466 bp großes Fragment im Magen- und Blinddarminhalt sowie im Kot 3 Stunden nach Aufnahme der verfütterten DNA amplifiziert. Ebenso konnten sowohl im Mageninhalt 6 Stunden und 18 Stunden, als auch im Dünndarminhalt 18 Stunden nach Applikation Fragmente derselben Größe nachgewiesen werden (Abbildung ?? auf Seite ??).

In mit TE-Puffer gefütterten Tieren konnte weder nach Southern-Transfer-Analysen noch nach PCR-Analysen gfp-spezifische DNA gefunden werden.

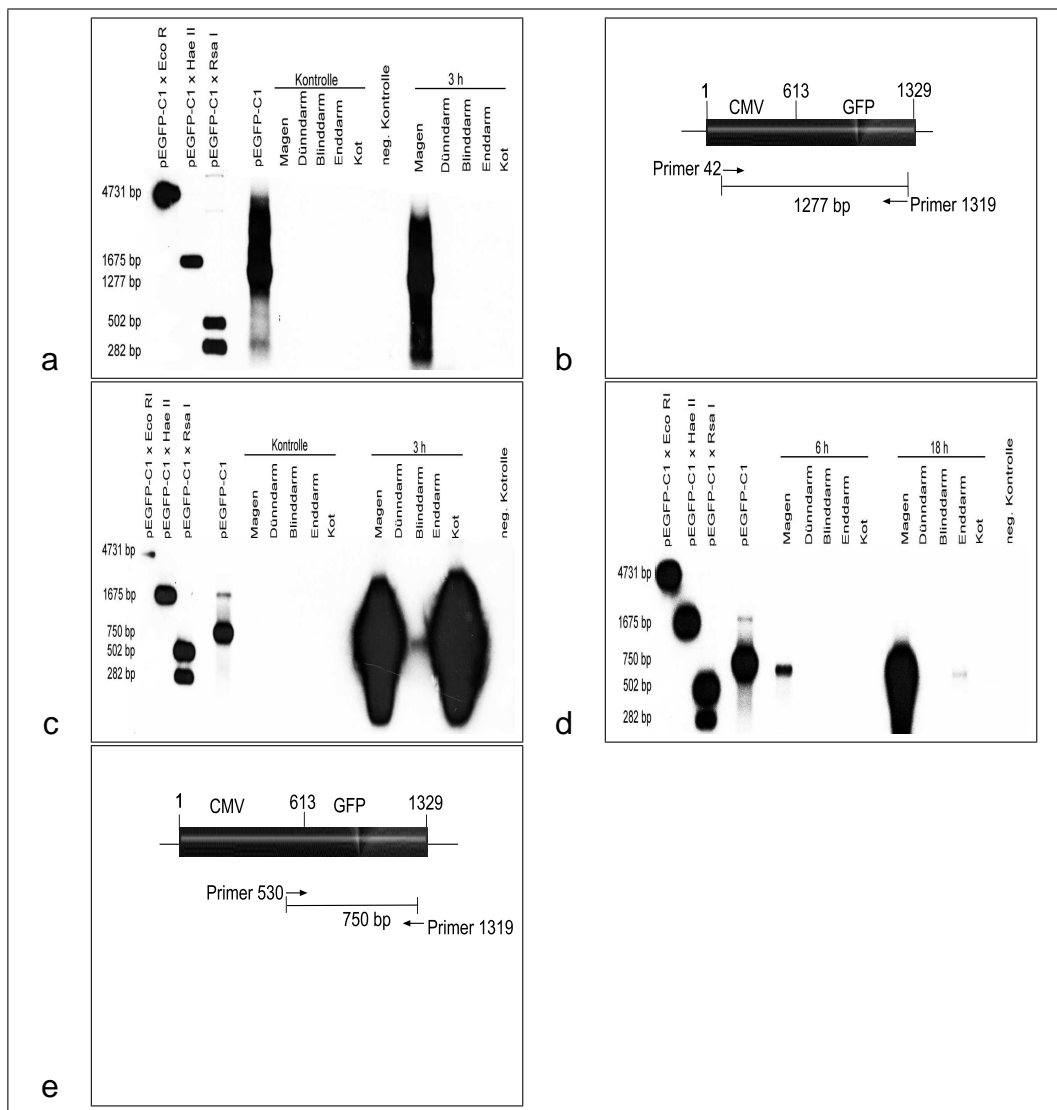


Abbildung 24: PCR-Analysen der gfp-spezifischen Fragmente im GI Trakt von Mäusen nach Komplexierung der DNA mit Protamin

Mäuse des Stammes C57Bl6/J wurden mit 10 µg pEGFP-C1 DNA, die mit 1 mg Protamin komplexiert wurde, gefüttert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten extrahierte DNA aus den Organen und dem entnommenen Blut wurde mittels der PCR-Methode untersucht. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurden einem Ansatz statt der genomischen DNA der Mäuse 20 pg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt. Die amplifizierten Produkte wurden gegen das radioaktiv markierte Gen des "green fluorescent protein" hybridisiert. Die DNA der mit TE-Puffer gefütterten Tiere wurde ebenfalls analysiert. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurden einem Ansatz statt genomischer Maus DNA 20 pg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt. Als Größenmarker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I geschnittene Plasmid pEGFP-C1.

- (a) Amplifikation eines 1277 bp Fragmentes 3 h nach Applikation
- (b) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen
- (c),(d) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes 3 h, 6 h und 18 h nach Applikation
- (e) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

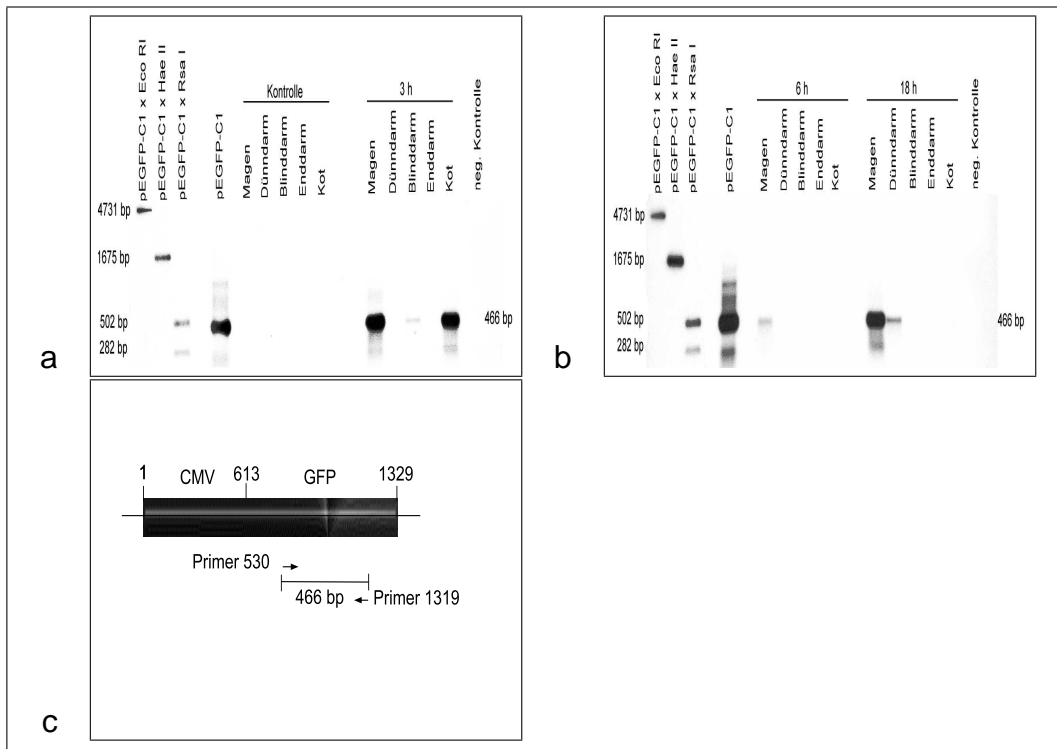


Abbildung 25: PCR-Analysen der gfp-spezifischen Fragmente im GI Trakt von Mäusen nach Komplettierung der DNA mit Protamin

Für diese Abbildung gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ??.

- (a),(b) Amplifikation eines 466 bp Fragmentes 3 h, 6 h und 18 h nach Applikation
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

Die Ergebnisse der PCR Analysen sind noch einmal in den Tabellen ??– ?? zusammengefasst.

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
3 h	+	–	–	–	–
6 h	–	–	–	–	–
18 h	–	–	–	–	–

Tabelle 12: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten

Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 1277 bp.

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
3 h	+	+	+	+	+
6 h	+	-	-	-	-
18 h	+	-	-	+	-

Tabelle 13: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 750 bp.

	Magen	Dünndarm	Blinddarm	Enddarm	Kot
3 h	+	-	+	-	+
6 h	+	-	-	-	-
18 h	+	+	-	-	-

Tabelle 14: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 466 bp.

4.3.2 Aufnahme oral applizierter DNA-Protein-Komplexe in Körperzellen

Nach oraler Verabreichung des Plasmids pEGFP-C1, welches mit dem Protein Protamin komplexiert war, wurden ebenfalls Leber, Milz, Niere sowie das Blut auf das Vorhandensein von Fragmenten des Gens des „green fluorescent protein“ untersucht. Es konnte jedoch keine gfp-spezifische DNA in den Organen nachgewiesen werden. Bei diesen Experimenten wurde ebenfalls das Darmepithel als möglicher Eintrittsort der Komplexe in den Organismus untersucht. Wie bei vorherigen Versuchen wurden die Blinddarmwand in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und zu 3 µm dicken Schnitten verarbeitet. Als Sonde wurde das mit Biotin markierte Plasmid pEGFP-C1 eingesetzt und gegen die DNA in den Gewebeschnitten hybridisiert (Tabelle ?? auf Seite ??). Zur Kontrolle wurden ebenfalls Gewebeschnitte von TE-gefütterten Tieren analysiert.

Tabelle ?? zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse, die mit der FISH-Methode erzielt worden sind. Außer 6 Stunden nach Verabreichung von 50 µg des gfp Plasmids konnten nach Gabe der Komplexe in mehreren Schnitten Signale detektiert werden. Sogar 18 Stunden nach Applikation zeigten sich Signale in Form einer gelben Fluoreszenz in den Kernen des Gewebes, das an das Lumen des Blinddarms grenzte. Bei dem Gewebe handelte es sich um die Villi des Darms, die die Oberfläche des Darmepi-

thels vergrößern, um eine hohe Substrataufnahme zu gewährleisten.

Die Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle ?? zusammengefasst.

3 h	6 h	18 h	24 h
1	0	3	0

Tabelle 15: Aufnahme der DNA-Protamin-Komplexe in Zellen der Villi des Caecums

Die gelb fluoreszierenden Signale des an den Antikörper gekoppelten FITC wurden gezählt und sind durch die Zahlen in der Tabelle angegeben. Die Zahlen zeigen die Anzahl der gfp-spezifischen Signale innerhalb von 2100 Okularfeldern.

Tabelle 16: FISH-Analyse der Blinddarmwände

Histologische Schnitte durch die Blinddarmwand von Mäusen, die mit 10 µg pEGFP-C1 DNA, die mit Protamin in einem Verhältnis 1:100 komplexiert wurde oder DNA-freiem Puffer (d) gefüttert wurden. Als Hybridisierungssonde wurde das Plasmid pEGFP-C1 mit Biotin markiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. Die nachgewiesene DNA ist als gelbes Signal in den mit Propidiumiodid gefärbten Nuklei zu erkennen.

- (a) Blinddarmepithel 3 h,
- (b) Blinddarmepithel 6 h,
- (c) Blinddarmepithel 18 h nach oraler Applikation der DNA
- (d) Blinddarmwand einer mit TE-Puffer gefütterten Maus; Vergrößerung: 1200 x

4.3.3 Orale Applikation des Proteins Glutathion-S-Transferase

Nachdem die Persistenz fremder, mit der Nahrung aufgenommener DNA im Säugerorganismus in dieser und in früheren Arbeiten (Schubbert et al., 1994, 1997; Hohlweg, 2001) untersucht worden war, stellte sich die Frage nach der Persistenz von mit der Nahrung aufgenommenen Proteinen im Gastrointestinaltrakt. Durch die Nahrungsaufnahme ist der Verdauungstrakt neben vielen anderen Substanzen auch einer großen Anzahl körperfremder Proteine ausgesetzt.

Eine gute Detektierung des fremden oral applizierten Proteins wurde mit der Glutathion-S-Transferase (GST) festgestellt. GST ist ein 26 kDa großes Protein, welches häufig zur Herstellung von Expressionsmarkern verschiedener Fusionsproteine verwendet wird. Das Protein wurde ursprünglich aus dem Organismus *Shistosoma japonicum* extrahiert, was freundlicherweise von Marianna Hösel durchgeführt wurde. Das GST wurde durch Transformation des pGEX-3X-Vektors in BL21 Bakterien überexprimiert und mit Hilfe von Glutathione Sepharose 4 B (Abschnitt ?? auf Seite ??) gereinigt. Dabei wurde eine Gesamtkonzentration des Proteins von 25 mg aus einer 750 ml Bakterienkultur gewonnen. Das Protein wurde dann in Tris-Puffer, pH 8,0 aufgenommen, und wies eine Endkonzentration von 3 bis 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ auf. Nach Reinigung des GST wurden 300 μg des Proteins an 8 Wochen alte Männchen des Stammes CB20 verabreicht (Abschnitt ?? auf Seite ??). Die gefütterten Tiere wurden dann nach 10, 15, 30, 40 und 60 Minuten in einer CO_2 -Atmosphäre getötet und sowohl die Darminhalte als auch einige Organe (Leber, Milz, Niere und Gehirn) entnommen. Das GST wurde gereinigt, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Hilfe eines Western-Transfers (Abschnitt ?? auf Seite ??) analysiert.

Um die Stabilität des GST zu prüfen, wurde ein Trypsinverdau durchgeführt. Dazu wurde das Protein mit Trypsin in folgenden Verhältnissen gemischt: 1:100, 1:10 und 1:1. Die Gemische wurde 5 und 15 Minuten lang bei RT inkubiert, danach auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich 50 ng des GST Proteins aufgetragen. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit Trypsin in einem Verhältnis von 1:10 konnte das GST noch nachgewiesen werden (Abbildung ?? auf Seite ??).

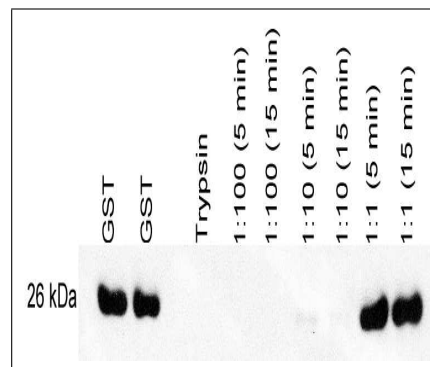


Abbildung 26: Prüfung der Stabilität der Glutathion-S-Transferase

Das Protein GST wurde mit Trypsin in den Verhältnissen 1:100, 1:10 und 1:1 gemischt und 5 und 15 Minuten lang bei RT inkubiert. Die Gemische wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurden 50 ng des Proteins aufgetragen.

Dadurch wurde gezeigt, dass das GST ein sehr stabiles Protein ist. NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen ergaben, dass die Nukleotidsequenz des zu verfütternden GST keine Homologien zum Mausgenom aufwies. Zur Detektion des GST in den Darminhalten und Organen gefütterter Tiere wurde der HRP (= horse radish peroxidase)-Antikörper eingesetzt und die Proteine auf einem Röntgenfilm durch eine ECL-Lichtreaktion sichtbar gemacht (Abschnitt ?? auf Seite ??).

Zur Durchführung der Versuche wurden 300 μg des Proteins an Mäuse des Stammes CB20 verfüttert. Diese Konzentration wurde in einem Volumen von 70 μl verabreicht. Dieses Volumen konnte nur langsam appliziert werden, so dass die zu verabreichenden 300 μg nicht auf einmal in den Magen gelangen. Bei Vorversuchen konnte das Protein mit Hilfe des HRP-Antikörpers nicht eindeutig identifiziert werden. Daraufhin wurde aus den schon extrahierten Proteinen aus den Inhalten des Gastrointestinaltraktes und der Organe das GST über Glutathione Sepharose angereichert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Abbildung ?? auf Seite ?? zeigt, dass das mit der Nahrung verabreichte GST Protein nach dieser Behandlung nachweisbar war. Das oral applizierte GST konnte im Dünndarm 10, 15, und 30 Minuten nach Fütterung in fragmentierter Form überleben (Abbildung ?? a). Es ist zu erkennen, dass die Größen der Fragmente im Laufe der Zeit in geringem Maß abnehmen. Durch die Fragmentierung des oral applizierten Proteins im Dünndarm wird impliziert, dass das Protein schon im

Dünndarm stark abgebaut wird. Dieser Befund wird ebenfalls dadurch unterstützt, dass in den nachfolgenden Darmabschnitten wie Blinddarm und Enddarm keine GST-spezifischen Fragmente nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse konnten in 3 anderen Versuchen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung ?? b auf Seite ?? zeigt die Detektierbarkeit des fremden Proteins im Magen nach 10, 15 und 30 Minuten. Im Mageninhalt ist noch deutlich eine zweite Bande geringerer Größe erkennbar. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um ein Abbauprodukt des GST. Sowohl im Mageninhalt als auch im Dünndarminhalt ist eine deutliche Zunahme der GST-Menge 15 Minuten nach oraler Applikation erkennbar.

Um den Proteinabbau *in vitro* zu untersuchen, wurden Mageninhalte frisch getöteter Mäuse mit 300 µg GST gemischt und 15 und 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Abbildung ?? b auf Seite ??). Die Proteine wurden wie oben beschrieben extrahiert und analysiert. Bei einem Vergleich mit der Degradierung *in vivo* ist deutlich erkennbar, dass der Verdau des fremden Proteins *in vitro* schneller verläuft, da ausschliesslich GST Fragmente geringerer Größe als 26 kDa zu erkennen waren. Bei allen Versuchen wurden ebenfalls 50 ng des GST Proteins zur Kontrolle aufgetragen. Nach einer Wartezeit von 40 und 60 Minuten nach Verabreichung des Proteins waren keine Fragmente der Glutathion S Transferase mehr detektierbar. Kontrolltiere wurden mit der gleichen Menge Tris-Puffer, pH 8,0 gefüttert. In den Inhalten des Gastrointestinaltraktes dieser Tiere wurden keine GST-spezifischen Fragmente nachgewiesen.

Nachdem nach 30 Minuten noch GST-spezifische Fragmente nachgewiesen werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass das Protein wie die verfütterte DNA in den Organismus gelangen könnte. Abbildung ?? c zeigt, dass Fragmente des GST 15 und 30 Minuten nach Applikation in den Nieren nachweisbar waren. Die Intensität der Banden lassen auf eine Anreicherung des Proteins in den Nieren schließen, da die GST-Konzentration nach 30 Minuten ein wenig höher zu sein scheint. Die Organe der Kontrolltiere wiesen keine GST-spezifischen Fragmente auf.

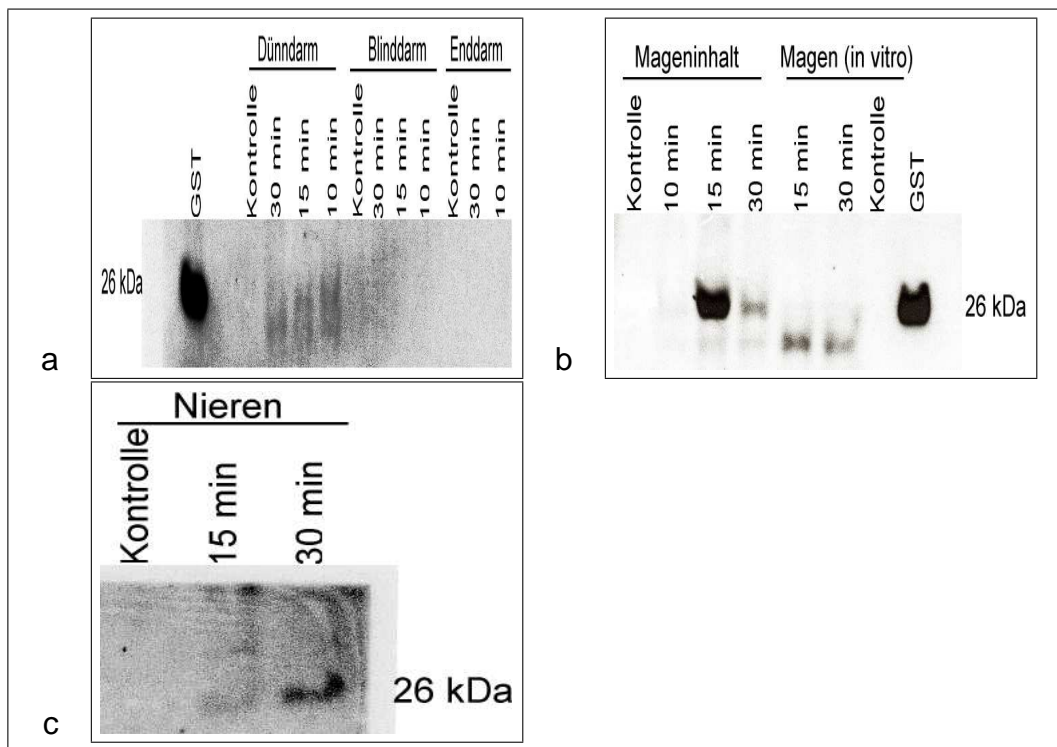


Abbildung 27: Nachweis des GST Proteins nach Protein-Anreicherung CB20 Mäuse wurden mit 300 µg GST gefüttert und zu den angegebenen Zeitpunkten getötet. Nach Proteinextraktion wurde das GST Protein angereichert, um die Detektion zu erleichtern. Die extrahierten Proteine aus den Darminhalten und Organen, sowie dem entnommenen Blut wurden in einem Polyacrylamidgel getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zum Nachweis der Persistenz der Proteine wurde der HRP-Antikörper eingesetzt. Als Größenmarker wurde das 26 kDa große GST Protein aufgetragen.

4.3.4 Aufnahme fremder, mit der Nahrung aufgenommener DNA in die Darmbakterien

Wie im Abschnitt ?? auf Seite ?? bereits erwähnt, kann oral applizierte fremde DNA über die Darmwand in den Organismus gelangen. Durch diese Tatsache kommt folgende Frage auf: Kann die in der Nahrung vorkommende DNA ebenso von den Darmbakterien aufgenommen und auch eventuell integriert und exprimiert werden?

Das pEGFP-C1 Plasmid beinhaltet ein Kanamycinresistenzgen, das in *E.coli* Bakterien exprimiert werden kann. Deshalb wurden nach Fütterung der fremden DNA die Darminhalte entnommen, in 1 ml LB-Medium aufgenommen und gemischt. Ein Teil des LB-Mediums wurde dann auf LB-Kanamycin-Platten ausgestrichen (Abschnitt ?? auf Seite ??). Nachdem die Platten bei 37°C inkubiert worden waren, wurden die Bakterienkolonien gezählt.

Die Tabellen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ?? fassen die Ergebnisse zusammen. Tabelle ?? zeigt die Anzahl der Kolonien, nachdem die Inhalte von Gastrointestinaltrakten ungefütterter Tiere auf LB-Platten ausgestrichen worden waren, die verschiedene Antibiotika enthielten.

In Tabelle ?? ist zu erkennen, dass auf den Platten, die kein Kanamycin enthielten, mehr Kolonien gewachsen waren. Auch auf den Platten, die Kanamycin enthielten, waren Kolonien gewachsen, was aber keine Folge einer durch die Aufnahme des pEGFP-C1 Plasmids erworbene Resistenz der Bakterien gegen das Antibiotikum sein musste. Daher wurden Filterabzüge gemacht, die gegen das radioaktiv markierte Kanamycingen hybridisiert wurden. Zusätzlich wurden Stempelabzüge gemacht und auf frische LB-Kanamycin-Platten überstempelt. Zuletzt wurden die vermeintlich positiven Kolonien isoliert und in flüssigem LB-Medium, dem, wie den LB Platten, ebenfalls 30 µg/µl Kanamycin zugesetzt war, inkubiert. Ebenso wurde mit den Inhalten des Gastrointestinaltraktes TE-Puffer gefütterter Tiere verfahren. Bei einigen Versuchen waren auf den kanamycinhaltigen Platten auch Kolonien gewachsen, auf denen die Inhalte des Gastrointestinaltraktes ungefütterter Tiere ausgestrichen worden waren (Tabelle ?? auf Seite ??).

Die Hybridisierung der Filter mit dem radioaktiv markierten Kanamycingen ergab kein hilfreiches Ergebnis. Es ist also wahrscheinlich, dass das Kanamycingen in den Bakterien nicht vorhanden war (Ergebnisse nicht

Mäuse	Dünndarm		Blinddarm		Enddarm	
	-Kan	+Kan	-Kan	+Kan	-Kan	+Kan
3 h	47	0	500	50	500	71
6 h	18	0	500	0	300	0
18 h	200	0	50	20	100	2
24 h	200	5	100	31	102	0
24 h	110	10	110	5	100	15
48 h	50	1	20	0	10	4
48 h	113	16	141	100	4	1
3 Tage	10	1	552	106	150	40
3 Tage	1000	100	300	10	23	0
4 Tage	0	0	4000	1000	250	100
4 Tage	21	0	732	200	15	7
5 Tage	100	10	0	0	200	50
5 Tage	71	39	168	100	2	1

Tabelle 17: Aufnahme fremder DNA in die Darmbakterien

Die Bakterien aus dem Darm gefütterter Mäuse wurden auf LB-Platten, denen 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt worden waren, ausgestrichen. Die Kolonien wurden gezählt und die Anzahl in der Tabelle angegeben. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Bakterien auf LB-Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen.

dargestellt). Auch nach den Stempelabzügen wuchsen nur noch sehr wenige Kolonien. Nachdem die Kolonien gepickt und in Flüssigkulturen übertragen worden waren, gab es keine Vermehrung der Bakterien während der Inkubationszeit. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Kanamycingen entweder nicht endozytiert oder nicht exprimiert wurde.

Antibiotikum	Dünndarm		Blinddarm		Enddarm	
	-AB	+AB	-AB	+AB	-AB	+AB
Kanamycin 30 µg/ml	200	109	50	4	500	0
Kanamycin 30 µg/ml	41	0	129	1	1	0
Kanamycin 30 µg/ml	34	6	57	13	13	0
Kanamycin 30 µg/ml	100	0	1	0	200	0
Kanamycin 30 µg/ml	0	0	228	0	35	0
Kanamycin 30 µg/ml	150	0	19	0	55	0
Chloramphenicol 30 µg/ml	53	0	159	0	2	0
Penicillin 30 µg/ml	0	0	800	0	1000	3
Streptomycin 30 µg/ml	50	0	130	0	70	0
Ampicillin 30 µg/ml	2	1	200	0	72	0
Neomycin 30 µg/ml	45	0	552	106	52	40

Tabelle 18: Antibiotika-Test

Die Bakterien aus dem Darm ungenüßter Mäuse wurden auf LB-Platten, denen 30 µg/ml Antibiotikum zugesetzt waren, ausgestrichen, um zu testen, ob nach Zusatz eines bestimmten Antibiotikums Bakterien wuchsen. Die Kolonien wurden gezählt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Bakterien auf LB-Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen.

4.4 Schicksal injizierter DNA in GI-Trakt

4.4.1 Degradierung fremder DNA im GI-Trakt

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde folgende Fragestellung untersucht: Wie hoch ist der Einfluss der Nukleasen im Gastrointestinaltrakt von Säugern auf fremde DNA?

Dazu wurden 2 µg des gfp-Plasmids in die folgenden Darmabschnitte injiziert: Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon. Zuvor wurden die verschiedenen Darmabschnitte nach Eintreten des Todes durch CO₂-Begasung der Mäuse mit einem Bindfaden abgebunden. Das Abdomen wurde nach der Injektion wieder geschlossen und die Tiere in Dulbecco's Medium bei 37°C inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Inhalte des Magen- Darmtraktes präpariert, die DNA durch eine Phenol/Chloroform-Behandlung extrahiert und 10 µg der genomischen DNA in einem Agarosegel getrennt. Die separierten DNA Frag-

mente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markiertem gfp Gen hybridisiert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Durch die Ergebnisse nach Verfütterung von fremder DNA wurde durch frühere Arbeiten (Schubbert et al., 1994, 1997; Hohlweg 2001) und diese Arbeit gezeigt, dass in der Nahrung vorkommende Nukleinsäuren nicht vollständig zu niedermolekularen Nukleotiden degradiert werden.

Die Abbildungen ?? a und b auf Seite ?? stellen die Ergebnisse nach Southern Transfer und anschließender Hybridisierung der extrahierten DNA gegen das radioaktiv markierte gfp Gen dar. Es konnten gfp-spezifische Fragmente im Mageninhalt eine Stunde nach Injektion detektiert werden. Die Fragmente weisen Größen zwischen 100 bp und bis zu über 4731 bp auf. Weitere Fragmente bis zu 200 bp konnten im Duodenum, Caecum und Kolon nachgewiesen werden. Weiterhin waren Fragmente des injizierten Plasmids 3 Stunden nach Injektion im Mageninhalt nachweisbar. Sowohl in nachfolgenden Darmabschnitten des gleichen Zeitpunktes nach Applikation, als auch im Magen und den Darmabschnitten 5 Stunden nach Injektion, war keine fremde DNA zu finden. Wahrscheinlich ist, dass im Magen nur eine Degradierung durch den sauren pH-Wert des Magens stattfindet (Pfeffer, 1987). Ab dem Duodenum allerdings scheint *in vitro* eine starke Degradierung der Nukleinsäuren durch körpereigene Nukleasen stattzufinden. Der Dünndarm ist derjenige Abschnitt des Verdauungstraktes, in dem der größte Teil der durch tiereigene Verdauungsenzyme bewirkten hydrolytischen Spaltung stattfindet (Pfeffer, 1987). DNA Fragmente scheinen im Caecum und Kolon nicht weiter degradiert zu werden, da ihre Größe nicht weiter abnimmt.

Die Fragmentlängen sind noch einmal im Diagramm Abbildung ?? auf Seite ?? zusammengefasst.

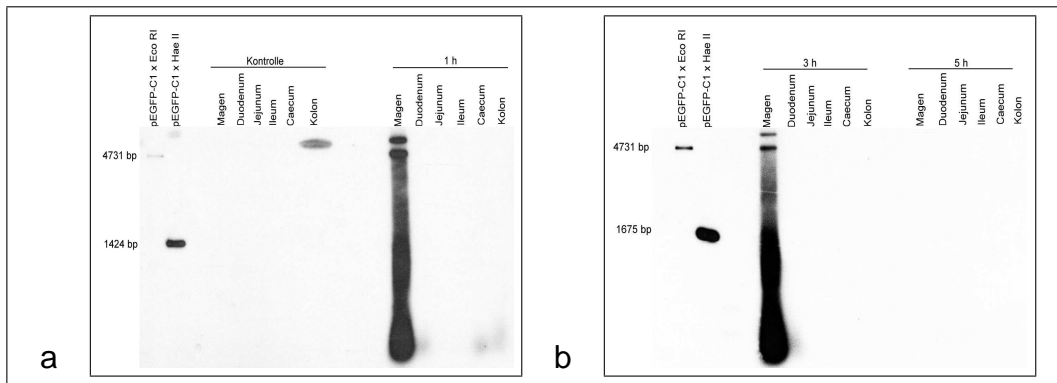


Abbildung 28: Injektion des *gfp* Plasmids in verschiedene Darmabschnitte
 In die abgebundenen Darmabschnitte (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon) wurden 2 µg des pEGFP-C1 Plasmids injiziert. Die Tiere wurden bei 37°C in Dulbecco's Medium inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Inhalte der Darmabschnitte präpariert und die DNA extrahiert. Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markierten Gen des „green fluorescent protein“ hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI und *Hae* II gespaltene pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Markerfragmente sind links neben dem Autoradiogramm angegeben. In die verschiedenen Darmabschnitte der Kontrolltiere wurde DNA freie Puffer-Lösung injiziert.

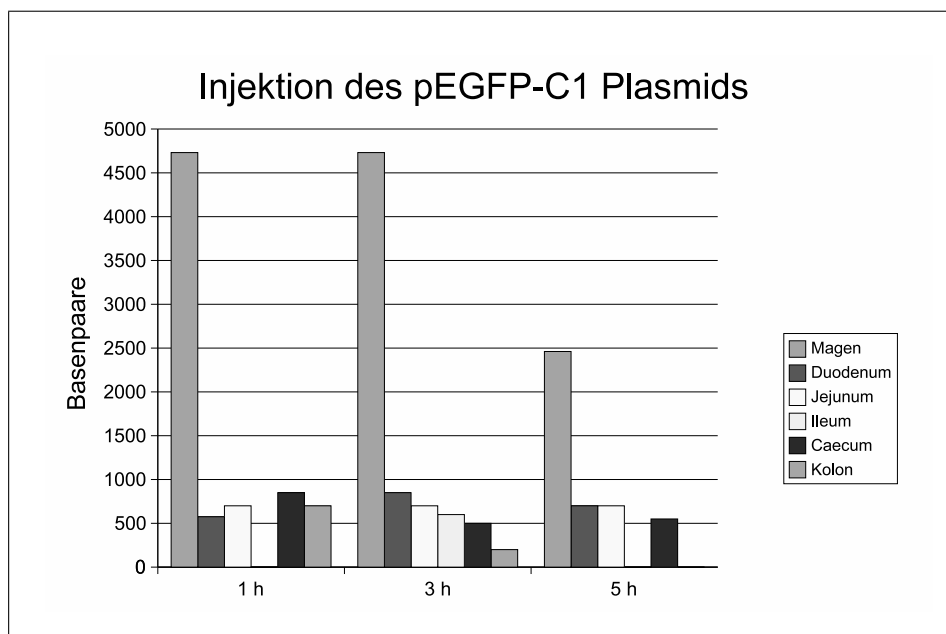


Abbildung 29: Injektion des Plasmids pEGFP-C1 in die verschiedenen Darmabschnitte

Für dieses Diagramm gilt die Legende zu Abbildung ???. Zum Vergleich wurden die entstandenen Fragmentlängen noch einmal in dem Diagramm zusammengefasst.

Zur weiteren Analyse der Fragmente des Plasmids pEGFP-C1, die während der Inkubation entstanden waren, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR-Analysen (Abbildungen ?? a und b) mit dem Primerpaar, welches das 1277 bp große Fragment amplifiziert, zeigten, dass sich DNA Fragmente im Kolon 1 Stunde nach Injektion befunden haben, welche durch die Southern-Transfer-Analyse nicht detektierbar waren. Weiterhin konnte ein PCR Fragment derselben Größe im Dünndarm 5 Stunden nach Injektion amplifiziert werden.

In Kontrolltiere wurde DNA-freier TE-Puffer injiziert. In keinem Darmabschnitt dieser Tiere konnte das Plasmid nachgewiesen werden.

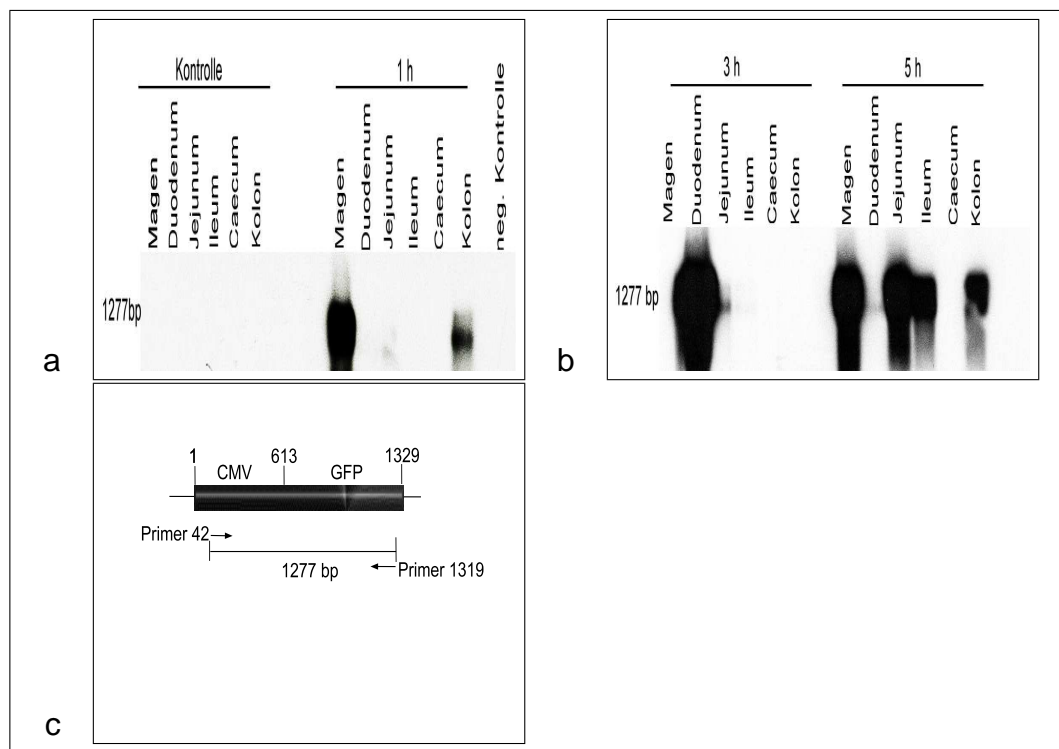


Abbildung 30: PCR-Analysen der injizierten gfp DNA

In die abgebundenen Darmabschnitte Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon wurden 2 μ g des pEGFP-C1 Plasmids injiziert. Die zu den angegebenen Zeitpunkten extrahierte DNA aus den Inhalten der Darmabschnitte wurde mit Hilfe von PCR-Analysen untersucht. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurden einem Ansatz statt genomischer Maus DNA 20 pg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt. Die amplifizierten Produkte wurden gegen das radioaktiv markierte Gen des "green fluorescent protein" hybridisiert. Die DNA der mit TE-Puffer gefütterten Tiere wurde ebenfalls analysiert.

- (a) und (b) Amplifikation eines 1277 bp Fragmentes
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind noch einmal in der Tabelle ?? zusammengefasst.

	Magen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Kolon
1 h	+	-	+	-	-	+
3 h	-	+	+	-	-	-
5 h	+	+	+	+	-	+

Tabelle 19: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten
Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 1277 bp.

4.4.2 Injektion des DNA-Protamin-Komplexes in den GI-Trakt

Nachdem festgestellt worden war, dass injizierte DNA in den verschiedenen Darmabschnitten stark degradiert wurde, stellte sich die Frage, inwieweit die DNA, welche mit Protamin komplexiert war, vor den Angriffen der organismuseigenen Nukleasen geschützt war. Es wurden 2 µg des Plasmids pEGFP-C1 mit Protamin in einem Verhältnis 1:100 komplexiert und nach Abbinden des Magens, des Duodenums, des Jejunums, des Ileums, des Caecums und des Kolons in die jeweiligen Darmabschnitte injiziert. Die zuvor durch CO₂-Begasung getöteten Tiere wurden, wie im oberen Kapitel bereits erwähnt, in Dulbecco's Medium bei 37°C inkubiert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Nach Präparation der Darminhalte zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Extraktion der DNA, wurden 10 µg in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde lässt sich gfp-spezifische DNA im Duodenum mit einer Fragmentgröße zwischen 100 bp und bis zu mehr als 4731 bp nachweisen (Abbildung ?? auf Seite ??). Im Ileum waren nur noch Fragmente bis zu 200 bp zu finden, während im Caecum und Kolon wie im Duodenum Fragmente zwischen 100 und mehr als 4731 bp nachweisbar sind. Das Duodenum ist derjenige Abschnitt, der vom Pylorus bis zum Eingang des Ductus choledochus verläuft. Nukleasen werden mittels Gallenflüssigkeit durch den Gallengang in den Dünndarm sezerniert. Durch die Ergebnisse wird impliziert, dass im Duodenum getöteter Tiere keine Nukleaseaktivität statt zu finden scheint. Danach allerdings ist eine starke Degradierung der DNA im Jejunum und Ileum nachweisbar.

Nach einer Inkubation von 3 Stunden wurde die Persistenz von Fragmenten mit einer Größe zwischen 100 bp bis zu mehr als 4731 bp der injizierten DNA im Magen, Duodenum und Kolon nachgewiesen.

In einem weiteren Experiment konnten Fragmente der fremden DNA derselben Größen im Magen, Duodenum, Jejunum und Kolon 5 Stunden nach Applikation nachgewiesen werden. Vergleiche dieser Ergebnisse mit denen nach *gfp*-Injektion ergeben, dass mit Protamin komplexierte DNA vor den Angriffen von Nukleasen geschützt wurde. Die Fragmentlängen wurden in dem folgenden Diagramm (Abbildung ?? auf Seite ??) zusammengefasst.

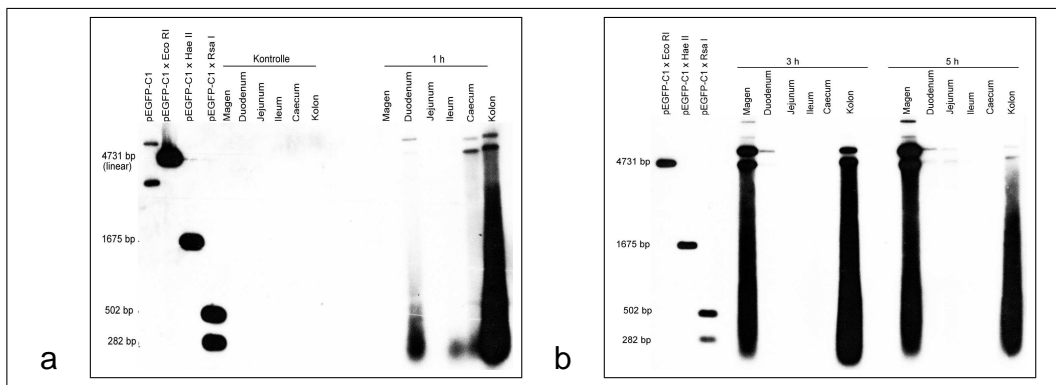


Abbildung 31: Injektion von *gfp*-Protamin-Komplexen

In die abgebundenen Darmabschnitte (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon) wurden 2 µg des pEGFP-C1 Plasmids, das mit 200 µg Protamin komplexiert wurde, injiziert. Der Gastrointestinaltrakt wurde bei 37°C in Dulbecco's Medium inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Inhalte der Darmabschnitte präpariert und die DNA extrahiert. Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit dem radioaktiv markierten Gen des „green fluorescent protein“ hybridisiert. Als Marker diente das mit *Eco* RI, *Hae* II und *Rsa* I gesplante pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Markerfragmente sind links neben dem Autoradiogramm angegeben. In die verschiedenen Darmabschnitte der Kontrolltiere wurde DNA freie Puffer-Lösung injiziert.

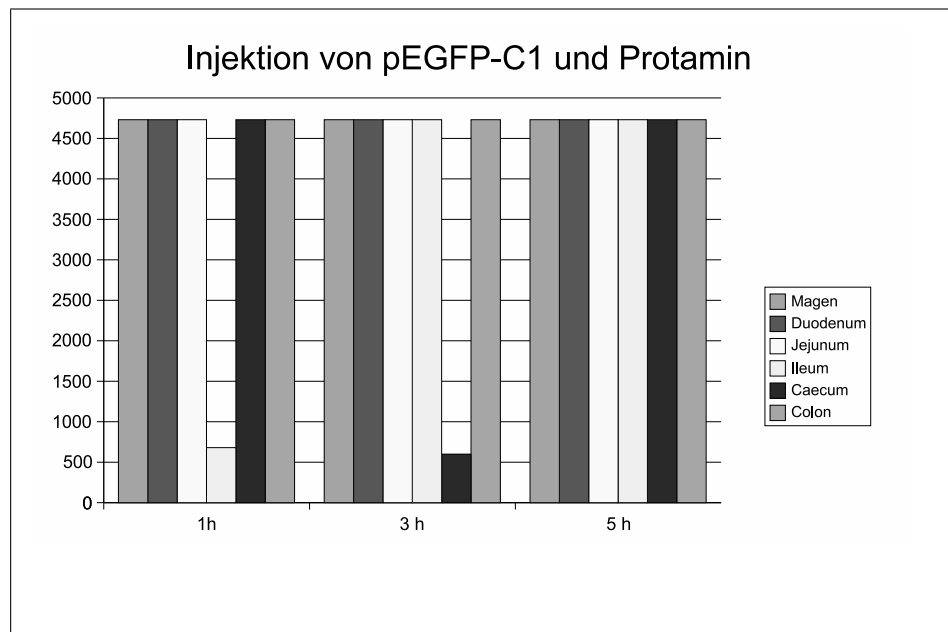


Abbildung 32: Injektion des gfp/Protamin-Komplexes in die verschiedenen Darmabschnitte

Für dieses Diagramm gilt die gleiche Legende wie zu Abbildung ???. Zum Vergleich wurden die entstandenen Fragmentlängen noch einmal im Diagramm zusammengefasst.

Southern-Transfer-Analysen zeigten, dass an ein Protein komplexierte DNA vor Nukleasen geschützt werden kann. Dieses Ergebnis wurde durch PCR-Analysen bestätigt. Bei Amplifikation des 1277 bp großen Fragmentes 1 Stunde nach Injektion konnten Fragmente im Duodenum, Caecum und Kolon detektiert werden (Abbildung ?? a auf Seite ??). Weitere Fragmente dieser Größe wurden 3 Stunden nach Injektion im Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon nachgewiesen. Die Intensität der PCR-Fragmente im Jejunum und Ileum sind sehr viel schwächer als im Magen und Duodenum. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die DNA-Konzentration in diesen Abschnitten weitaus geringer ist als im Magen, Duodenum und Kolon. Nach Southern-Transfer-Analysen konnten in Jejunum und Ileum keine gfp-spezifischen Fragmente nachgewiesen werden. Fünf Stunden nach Injektion der gfp DNA konnten in allen Abschnitten, außer im Caecum, Fragmente nachgewiesen werden (Abbildung ?? b auf Seite ??). Wie bei vorherigen Versuchen konnte in Kontrolltieren, denen TE-Puffer injiziert worden war, keine gfp-spezifische DNA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind in den Tabellen ?? und ?? zusammengefasst.

	Magen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Kolon
1 h	–	+	–	–	+	+
3 h	+	+	+	+	–	+
5 h	+	+	+	+	–	+

Tabelle 20: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten

Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 1277 bp.

	Magen	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Kolon
1 h	–	+	–	+	+	+
3 h	+	+	+	+	–	+
5 h	+	+	+	+	–	+

Tabelle 21: PCR-Analysen der DNA aus den Darminhalten

Die amplifizierten Produkte haben eine Größe von 750 bp.

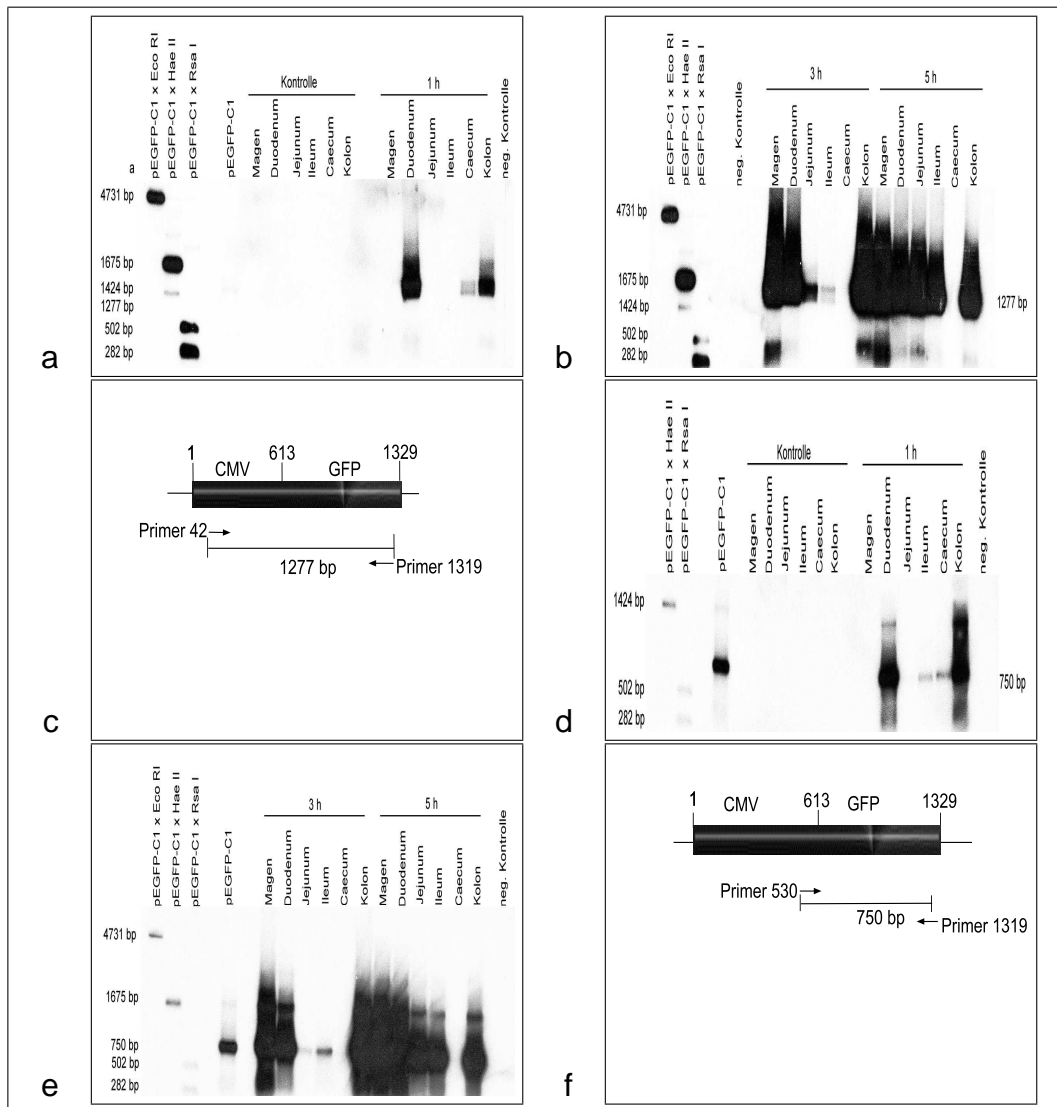


Abbildung 33: PCR-Analysen der injizierten Komplexe

Die zu den angegebenen Zeiten extrahierte DNA aus den Inhalten der Darmabschnitte wurde mit Hilfe von PCR-Analysen untersucht. In die abgebandenen Darmabschnitte Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und Kolon wurden 2 µg des pEGFP-C1 Plasmids, nachdem es mit 200 µg Protamin komplexiert worden war, injiziert. Die amplifizierten Produkte wurden gegen das radioaktiv markierte Gen des "green fluorescent protein" hybridisiert. Die DNA der mit TE-Puffer gefütterten Tiere wurde ebenfalls analysiert. Als Positivkontrolle (pEGFP-C1) wurden dem Ansatz 20 µg des pEGFP-C1 Plasmids zugesetzt.

- (a), (b) Amplifikation eines 1277 bp Fragmentes
- (c) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen
- (d), (e) Amplifikation eines 750 bp Fragmentes
- (f) Lage des verwendeten Primerpaares im gfp Gen

4.5 DNA-Aufnahme primärer Milzzellen

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme fremder DNA durch primäre Milzzellen in Kultur untersucht. Es sollte folgende Fragestellung analysiert werden: Wie hoch ist die Aufnahmefähigkeit von fremder DNA in primäre Zellen?

In vorherigen Arbeiten (Schubbert et al., 1994, 1997) wurde gezeigt, dass oral applizierte DNA des Bakteriophagen M13mp18 sehr oft in den Milzen zu finden war. Daher sollte die Aufnahmefähigkeit primärer Milzzellen untersucht werden.

Dazu wurden Mäuse des Stammes C57Bl6/J in einer CO₂-Atmosphäre getötet und die Milzen entfernt. Das Organ wurde vorsichtig durch ein Zellsieb gedrückt, so dass die Zellen isoliert wurden. Die Zellen wurden in Dulbecco's Medium aufgenommen und bei 37°C inkubiert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Nach einer Erholungszeit der Zellen von 24 Stunden, wurden 5 µg/ml des gfp Plasmids in das Medium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1, 3, 5, 6, 12 und 18 Stunden wurden die Zellen gewaschen, mit DNase behandelt, und die Kerne wurden präpariert. Mit Hilfe der FISH-Methode wurden die Zellkerne auf das Vorhandensein der fremden DNA untersucht. Der DNase-Verdau sollte gewährleisten, dass auf der Oberfläche der Zellen möglichst keine fremde DNA gebunden war und die Ergebnisse verfälschen konnte.

Tabelle ?? auf Seite ?? zeigt die Ergebnisse der FISH-Analysen 5 Stunden nach Zugabe der gfp DNA zum Medium. Die fremde DNA wird auch hier durch die gelbe Fluoreszenz in dem mit Propidiumiodid rot gefärbten Zellkern sichtbar gemacht. Zu keinem anderen Zeitpunkt konnten derartige Signale detektiert werden. In Zellkernen von Zellen, zu denen nur TE-Puffer gegeben wurde, konnten keine Signale nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in Zellkultur gehaltene Milzzellen die DNA innerhalb der ersten 5 Stunden aufnehmen können. Southern-Transfer-Analysen (hier nicht gezeigt) zeigen, dass die DNA in den Zellen degradiert war. Daher ist anzunehmen, dass die DNA nach 5 Stunden aufgrund der Degradierung zu zu kleinen Fragmenten nicht mehr nachweisbar war. Die Zellkerne wurde zur Kontrolle unter einem Laser scan Mikroskop untersucht. Durch ein Scannen durch die Nuklei hindurch wurde gewährleistet, dass sich die Signale wirklich im Kern befanden.

Tabelle 22: FISH-Analyse der Kerne primärer Milzzellen

Die Nuklei primärer Mausmilzzellen, die 5 Stunden lang mit 5 μg des Plasmids pEGFP-C1 bei 37°C inkubiert worden waren, wurden fixiert und mit biotinylierter Plasmid DNA hybridisiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. Die nachgewiesene DNA des Plasmids pEGFP-C1 ist als gelbes Signal in den Propidiumiodid rot gefärbten Zellkernen zu erkennen.

(c) Nuklei von mit TE-Puffer inkubierten Zellen Vergrößerung: 1200 x

5 Diskussion

5.1 Schicksal fremder DNA im Gastrointestinaltrakt von Mäusen nach oraler Applikation

5.1.1 Untersuchung einer Homologie zwischen dem pEGFP-C1 Plasmids und dem Mausgenom

Mit jeder Mahlzeit nehmen wir fremde DNA mit der für uns notwendigen Nahrung auf. Schätzungsweise verzehren wir täglich je nach Nahrungszusammensetzung 1 g DNA mit der Nahrung. Um das Schicksal von DNA-Molekülen im GI Trakt zu untersuchen, wurden Mäuse als Modellorganismen mit 50 µg fremder DNA gefüttert. Es wurde zunächst ungeschützte DNA verwendet, um diese den Faktoren auszusetzen, die auf die in der Nahrung enthaltene DNA einwirken.

Als Modell-DNA wurde das Plasmid pEGFP-C1 gewählt. Zunächst wurden Experimente durchgeführt, die klären sollten, ob dieses Plasmid eine Homologie zum Mausgenom aufwies. So wurden Mäuse des Stammes C57Bl6/J mit DNA-freiem TE-Puffer gefüttert, in einer CO₂-Atmosphäre getötet, und die DNA der Darminhalte und der Leber, Nieren und Milz wurde extrahiert. Nach der DNA-Extraktion wurden 20 µg in einem 1%igen Agarosegel getrennt (Abschnitt ?? auf Seite ??), auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert (Abschnitt ?? auf Seite ??). Wie Abbildung ?? auf Seite ?? zeigt, konnte keine Homologie detektiert werden.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurden sensitivere PCR-Analysen (Abschnitt ?? auf Seite ??) durchgeführt, das Ergebnis ebenfalls auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte gfp Gen hybridisiert. Abbildungen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ?? beweisen, dass auch hier keine Homologie zu finden war.

Bei einem Vergleich der Sequenz des gfp Gens mit NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen (Altschul et al., 1997) der EST-Bank (Maus-Datenbank) wurde ein Hinweis auf eine 99%ige Homologie zwischen dem gfp Gen und dem Mausgenom mit einer Länge von 274 Basenpaaren entdeckt. Durch PCR-Analysen dieser Region konnte die Homologie jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung ?? auf Seite ??), so dass das Plasmid pEGFP-C1 als

Fremd-DNA geeignet war. Die PCR-Analysen dieses Fragmentes wurden an genomischer DNA vorgenommen, die aus verschiedenen Inhalten des GI-Traktes und Organen TE-Puffer gefütterter Mäuse extrahiert worden war. Es konnten jedoch nach keiner der Analysen homologe Fragmente zwischen dem Mausgenom und den gfp Gen nachgewiesen werden.

Bei einem Vergleich anderer NCBI-Sequenzdatenbanken mit dem gfp Gen wurden keine signifikanten Homologien entdeckt, so dass die Homologie der Maus-EST-Datenbank der einzige Hinweis blieb.

Wie in Abschnitt ?? auf Seite ?? bereits erwähnt, wurde das 274 bp Fragment, welches die Homologie zum gfp Gen besitzen sollte, von einer Gruppe entdeckt, die mit gfp-transgenen Tieren arbeitete. Daher ist eine Kontamination der Probe bei der Sequenzierung nicht ausgeschlossen. Weiterhin ist es möglich, dass ein Gewebe einer gfp transgenen Maus mit dem Gewebe einer nicht-transgenen Maus vertauscht wurde und so eine Homologie zum gfp Gen angenommen wurde.

Bei den Experimenten in der vorliegenden Arbeit sollte ein Fragment dieser Größenordnung durch eine PCR-Analyse wie sie Abbildung ?? auf Seite ?? zeigt, detektierbar sein. Da aber eine bestehende Homologie zwischen dem Mausgenom und dem Plasmid pEGFP-C1 von uns nicht bestätigt werden konnte, konnten die Experimente weitergeführt werden.

5.1.2 Oral verabreichte DNA kann im Gastrointestinaltrakt in fragmentierter Form persistieren

Die Menge der verabreichten DNA wurde so gewählt, dass sie die natürlichen Abbaumechanismen im Darm der Maus nicht übersättigte. Eine Maus nimmt je nach Größe 4 bis 5 g Futterpellets zu sich, in denen etwa 15 bis 19 mg DNA enthalten sind (Charles River, 1993). Demnach entsprechen 50 µg Plasmid DNA weniger als 1% der normalerweise von einer Maus am Tag aufgenommenen DNA-Menge.

Nach einmaliger Fütterung von Mäusen mit 50 µg pEGFP-C1 DNA konnten Fragmente der Test-DNA im Darm durch Southern-Transfer-Analysen bis zu 18 Stunden (Abbildungen ?? auf Seite ?? und ?? auf Seite ??) und mit Hilfe der PCR-Technik bis zu 5 Tagen nachgewiesen werden (Abbildungen ?? bis ?? auf den Seiten ?? bis ??).

Nach Fütterung von fremder DNA waren der Blinddarm und der Enddarm diejenigen Abschnitte, in denen diese am längsten persistierte. Dieses Ergebnis deutet auf eine Speicherfunktion des Blinddarms der Maus sowie auf eine geringe Nukleaseaktivität in den beiden Darmabschnitten hin. Im Darm vorkommende Nucleasen werden entweder aus Zellen des Darmepithels sezerniert oder gelangen zusammen mit anderen proteolytischen Enzymen über den *Ductus pancreaticus* aus dem Pankreas in den Darm (Price et al., 1969; Azhar et al., 1974). Da der *Ductus pancreaticus* in das Duodenum mündet, ist anzunehmen, dass dort *in vivo* die höchste Nukleaseaktivität stattfindet, die dann im weiteren Verlauf des Darms abnimmt. Somit wird im Dünndarm die fremde DNA schnell abgebaut. Da aber noch Fragmente im Blinddarm und auch im Enddarm nachweisbar waren, schien die gfp DNA den enzymatisch hoch aktiven Dünndarm der Mäuse entweder schnell zu passieren oder durch unspezifische Bindung an Proteine aus der Nahrung geschützt zu sein. Durch die geringe Nukleaseaktivität im Blinddarm werden die Fragmente dann nicht weiter degradiert und sind so im Blind- und Enddarm länger nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden durch *in vitro* Experimente erzielt. Wurde nackte DNA mit Extrakten des Dünndarms von Ratten inkubiert, so war die DNA innerhalb von 15 Minuten komplett abgebaut. Im Gegensatz dazu konnten nach 4 Stunden 10% der mit dem Dickdarminhalt inkubierten DNA noch nachgewiesen werden (Maturin und Curtis, 1977).

Die Abbildungen ?? a und ?? b auf Seite ?? zeigen, dass die fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA schon innerhalb von einer Stunde im Dünndarm sehr stark abgebaut wird. Nach einer Zeitspanne von 3 Stunden nach Fütterung können die meisten Fragmente der applizierten DNA nur noch in den Inhalten des Blind- und des Enddarms nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse bestätigen und vervollständigen die früheren Untersuchungen. Die DNA des Bakteriophagen M13mp18 wurde an Mäuse verfüttert und konnte mit Hilfe der PCR-Technik in Fragmentgrößen von 1700 bp bis zu 18 Stunden im Blinddarm nachgewiesen werden (Schubbert et al., 1994).

Auch in früheren Experimenten konnten nach Fütterungen des Plasmids pEGFP-C1 Fragmente der DNA nach PCR-Analysen in Fragmentgrößen bis zu 1277 bp 8 Stunden nach Fütterung im Gastrointestinaltrakt

von Mäusen detektiert werden (Hohlweg und Doerfler, 2001).

Im Vergleich zu nackter DNA konnte an ein Protein gebundene DNA wesentlich besser nachgewiesen werden. Dazu wurden 10 µg des gfp Plasmids mit 1 mg Protamin, ein 4,2 kDa großes Protein, komplexiert und oral appliziert. Die Proben wurden wie nach der Fütterung unkomplexierter DNA behandelt.

Abbildung ?? auf Seite ?? stellt das Ergebnis der Southern-Transfer-Analysen dar. Das Plasmid pEGFP-C1 wurde bis zu 3 Stunden nach Verabreichung nachgewiesen. Zum Vergleich wurden in anderen Experimenten 10 µg des Plasmids pEGFP-C1 an Mäuse verfüttert und zu den gleichen Zeitpunkten nach Verabreichung analysiert (Daten nicht gezeigt). Die fremde DNA konnte mit Hilfe der angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden. Nach oraler Applikation der pEGFP-C1-Protamin-Komplexe konnte diese Menge der DNA sehr gut nachgewiesen werden. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass komplexierte DNA gegen die Angriffe der organismuseigenen Nukleasen geschützt ist als unkomplexierte DNA, da noch eine sehr geringe Menge nachweisbar war.

In weiteren Versuchen wurden 2 µg des Plasmids pEGFP-C1 an Lipofektin gebunden. Diese Komplexe wurden an Mäuse verfüttert und die DNA der Darminhalte und Organe wie schon beschrieben (Abschnitte ?? ab Seite ??) analysiert (Daten nicht gezeigt). Es wurden Fragmente bis zu 500 bp 3 Stunden nach Applikation in den Blind- und Enddarmhalten nachgewiesen.

Diese und die zuvor genannten Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass mit der Nahrung aufgenommene unkomplexierte DNA, obwohl sie den Verdauungsprozessen im Gastrointestinaltrakt von Säugern ausgesetzt ist, in Fragmenten persistieren kann. Nach Komplexierung der fremden DNA mit einem Protein ist diese noch geschützt. Die Fragmente, die nach der Passage der Komplexe durch den Verdauungstrakt entstanden waren, entsprachen in ihrer Größe denen, die nach Verabreichung des ungeschützten Plasmids detektiert wurden.

Die bei der Verfütterung von DNA-Protein-Komplexen erzielten Ergebnisse korrelieren mit früheren Ergebnissen. Mit SuperFect komplexierte DNA konnte bis zu 18 Stunden im Magen wiedergefunden werden (Übersicht Hohlweg, 2000). Auch hier zeigte sich eine starke Protektion der oral applizierten DNA durch Proteine.

Es konnte weiterhin eine ähnliche Persistenz im Magen nach oraler Applikation von in Mikrosphären verpackter DNA beobachtet werden, was mit einer hohen Adhäsion der Moleküle an das Magenepithel erklärt wurde (Chickering et al., 1995; Mathiowitz et al., 1997). Dabei war die Degradierung der DNA im Magen von der chemischen Zusammensetzung der Mikrosphären abhängig.

PCR-Analysen ergaben, dass die fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA im Gastrointestinaltrakt von Mäusen nicht vollständig abgebaut wird (Abbildungen ?? bis ?? auf den Seiten ?? bis ??). Nach einer mehrmaligen Fütterung von DNA ist diese sogar noch nach 5 Tagen im Blinddarm zu finden (Abbildung ?? auf Seite ??). Dieses Ergebnis kann die Vermutung bestätigen, dass der Blinddarm der Mäuse eine Speicherfunktion übernimmt.

5.1.3 Aufnahme fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA in den Säugerorganismus

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass oral verabreichte DNA in den Organismus eines Säugers aufgenommen werden kann. Durch PCR-Analysen der DNA aus den Organen und dem Blut wurde bewiesen, dass die oral applizierte DNA in die Organe gelangen kann (Abbildungen ?? bis ?? auf den Seiten ?? bis ??). Es konnten Fragmente bis zu 1277 bp in Leber, Nieren und Blut bis zu 18 Stunden nach Fütterung nachgewiesen werden. Diese Fragmente enthielten die komplette Promotor-gfp-Sequenz (Abbildung ?? auf Seite ??). In früheren Arbeiten konnte die fremde DNA nur bis zu 8 Stunden in den Organen nachgewiesen werden (Schubbert, 1994; 1997; Hohlweg und Doerfler, 2001).

Durch die Intensität der Banden in den Abbildungen ??a und ??a wird bestätigt, dass der Weg der DNA zunächst durch die Leber, dann durch die Milz und dann durch die Nieren verläuft. Wahrscheinlich wird ein Teil der DNA mit anderen Stoffen mit dem Entero-hepatischen-Kreislauf zunächst in die Leber und dann mit dem Blutkreislauf in andere Organe (hier: Milz und Nieren) transportiert. Die Nieren sind diejenigen Organe, in denen gfp-spezifische Fragmente am häufigsten nachgewiesen werden konnten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass fremde, mit der Nahrung aufgenommene DNA, die in den Organismus gelangt, auf keinen speziellen Trans-

portmechanismus angewiesen ist, um aus dem Körper ausgeschieden zu werden. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass bei den Experimenten von Rainer Schubbert (Schubbert, 1994;1997) die Milz dasjenige Organ war, in dem die oral applizierte DNA oft nachweisbar war.

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen beweisen, dass die fremde DNA in die Zellen des Blinddarms aufgenommen werden kann (Abbildung ?? auf Seite ??). Die gfp DNA wurde dabei immer in den Kernen der Zellen nachgewiesen, was durch die Laser scan Mikroskopie bestätigt wurde. Diese Beobachtung deutet auf einen Transportmechanismus hin, der die fremde DNA in den Nukleus transportieren kann. Zusätzlich könnten auch intrazelluläre Desoxyribonukleasen für einen raschen Abbau der fremden DNA während des Transports zum Nukleus im Cytoplasma verantwortlich sein, die ebenfalls eine große Rolle bei apoptotischen Prozessen spielen (Übersicht in Counis und Torriglia, 2000) und durch die lebende Zellen vor dem Eindringen fremder, z. B. viraler DNA, geschützt werden.

Die gfp DNA wurde sowohl in den Kryptenzellen als auch in Zellen gefunden, die direkt an das Darmlumen grenzen. Es könnte sich dabei um Enterocyten handeln. Nach dem Eintreten der verabreichten DNA in die Zellen des Darmepithels kann diese mit dem Blutkreislauf in den Organismus transportiert werden. Das sehr umfangreiche Lymphsystem des Darms ist direkt über den *Ductus thoracicus* mit dem Blutkreislauf verbunden.

Die mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs-Methode erzielten Ergebnisse bestätigen und vervollständigen wiederum frühere Ergebnisse. Sowohl die verfütterte DNA des Bakteriophagen M13mp18 als auch das Plasmid pEGFP-C1 konnten mit Hilfe derselben Technik bis maximal 8 Stunden in den Nuklei der Darmzellen detektiert werden (Schubbert, 1994, 1997). In Leberzellen konnte das pEGFP-C1 Plasmid bis zu 24 Stunden nachgewiesen werden (Hohlweg und Doerfler, 2001). In dieser Arbeit konnte die verfütterte DNA bis zu 18 Stunden nach Komplexierung mit Protamin (Abbildung ?? auf Seite ??) und bis zu 24 Stunden nach Verabreichung des unkomplexierten Plasmids in den Zellen des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden (Abbildung ?? auf Seite ??).

Weiterführende Experimente sollten die Aufnahme der oral applizierten DNA in die Zellen des Darmepithels untersuchen. Über den Mechanismus, der zur DNA-Aufnahme über das Darmepithel führt, ist bisher nichts

bekannt. Bei Untersuchungen von Peyerschen Plaques (Schubbert et al., 1997) konnte auch hier die fremde DNA gefunden werden. Diese Beobachtung führt zu der Frage, ob ein bestimmter Zelltyp für die Aufnahme von Nukleinsäuren aus dem Darmlumen verantwortlich ist oder ob alle Zellen des Darms die Fähigkeit haben, Nukleinsäuren zu endozytieren.

Die Detektierung der verfütterten DNA in den Peyerschen Plaques ist ein möglicher Hinweis auf die Beteiligung von M-Zellen an der Aufnahme fremder DNA. M-Zellen sind bekannt für die endozytotische Aufnahme, den transcytotischen Transport und die Exocytose von Substanzen. In den letzten Jahren ist es gelungen M-Zell-ähnliche Zelltypen zu kultivieren (Gullberg et al., 2001; Liang et al., 2001; van der Lubben et al., 2001, 2002; Tyrer et al., 2002; Yamanaka et al., 2003). Dabei wurden CaCo-2 Zellen mit humanen B-Lymphocyten, sog. Raji-Zellen, kokultiviert und so Zellen induziert, die morphologisch und funktional M-Zellen sehr ähnlich sind. Durch diese Möglichkeiten wurde die Untersuchung der DNA-Aufnahme über M-Zellen etwas vereinfacht. Die späteren Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen könnten dann einen Hinweis auf den Aufnahme-mechanismus *in vivo* geben.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass M-Zellen weniger und kürzere Mikrovilli besitzen als die benachbarten CaCo-2 Zellen. Durch frühere Arbeiten ist bekannt, dass dieser Zelltyp ebenfalls eine wenig ausgebildete Glykocalyx und keine schützende Schleimschicht besitzt. Daher wird verschiedenen Substanzen, wie Makromolekülen, z. B. Nukleinsäuren oder Proteinen, die Bindung an diese Zellen erleichtert. Bei Versuchen, die die Aufnahmefähigkeit der Zellen *in vitro* testen sollten, wurde festgestellt, dass die Aufnahme von Polycystren-Molekülen und Dextranen bei physiologischer Temperatur von der Größe der Moleküle abhing und schneller stattfand als bei den CaCo-2 Zellen. Der Transport des Dextrans durch die M-Zellen war ebenfalls temperatur- und konzentrationsabhängig (Liang et al., 2001). M-Zellen können Mikropartikel kleiner als 10 Mikrom aufnehmen (van der Lubben, 2001). Das gfp Plasmid ist wesentlich kleiner und wird wahrscheinlich nur in fragmentierter Form aufgenommen. Dadurch kommt die Frage auf, ob es durch die Fragmentierung der DNA wahrscheinlicher wird, dass diese von M-Zellen aufgenommen werden kann. Alle Signale, die in dieser Arbeit detektiert wurden, wurden in den Nuklei von Enterozyten oder Kryptenzellen nachgewiesen.

Um die Aufnahme fremder DNA über M-Zellen *in vivo* besser untersuchen zu können, müssen die M-Zellen eindeutig und leicht identifizierbar sein. Dies könnte durch spezielle M-Zell-Marker geschehen. Lektine sind Moleküle, die sehr gut an M-Zellen binden können. Durch die Expression des Adhäsionsmolekuls-1 und dem Vasculer Cell Adhäsionsmolekül auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen können Lektine wie das WGA (wheat germ agglutinin) und das Lektin aus der Erdnuß an diesen Zelltyp binden. Durch diese Bindung der Lektine wurde ein Anstieg des Partikeltransports um das 40-fache beobachtet. Der Transport konnte durch Abkühlung der Temperatur auf 4°C oder durch den Austausch der Raji-Zellen durch Jurkat T-Zellen inhibiert werden (Gullberg et al., 2001). Durch diese Ergebnisse kann es möglich werden, die Aufnahme von Makromolekülen über das Darmepithel *in vivo* zu untersuchen. Man könnte z.B. stabil markierte Lektine füttern und sie in M-Zellen *in situ* auffindbar machen. So könnte man feststellen, ob vermehrt DNA oder Proteine durch diesen Zelltyp endozytiert werden.

Einen weiteren Hinweis auf den Aufnahmemechanismus der DNA in die Darmzellen zeigen frühere Arbeiten. Sowohl unkomplexierte als auch mit Proteinen komplexierte DNA kann über Rezeptoren auf der Zellmembran in die Zelle hineintransportiert werden. Es wird vermutet, dass die fremde DNA nach Bindung an Anti-DNA-IgG Antikörper in B-Zellen aufgenommen werden können (Bankhurst and Williams, 1975). Okudaira und Mitarbeiter haben dokumentiert, dass anti-DNA Antikörper der Maus DNA-Moleküle auf der Oberfläche von Thymocyten der Maus und humanen Lymphocyten binden können und dass dieser Komplex durch eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden kann (Okudaira et al., 1987). Fremde Plasmide konnten in kultivierten DC2.4 Zellen, dendritische Zellen von Mäusen, aufgenommen werden, indem die DNA an Rezeptoren bindet. Dadurch wird die fremde DNA über einen Mechanismus aufgenommen, der typisch für die Aufnahme von Polyanionen ist (Yoshinaga et al., 2002).

Weiterhin wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, dass fluoreszierende Plasmid DNA in Endosomen und Lysosomen in Makrophagen nachgewiesen werden kann.

Durch die oben angesprochenen Versuchsergebnisse werden die Ergebnisse und Hinweise dieser Arbeit unterstützt. Es werden sehr viele Zell-

typen aufgezählt, die zur Aufnahme organismusfremder DNA fähig sind. In dieser Arbeit wurden ebenfalls mehrere Zelltypen untersucht, die Enterozyten und Kryptenzellen des Darmepithels, Milz-, Leber- und Nierenzellen und Leukozyten (Daten nicht gezeigt), die zur Aufnahme fremder DNA fähig sind. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es verschiedene Mechanismen geben kann, die zur Endozytose fremder, nicht viraler DNA beitragen können.

5.1.4 Aktivierung des Immunsystems nach oraler Applikation fremder DNA

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit gfp erzielt wurden mit den Ergebnissen nach Verfütterung von der DNA des Bakteriophagen M13mp18 und DNA des Adenovirus Typ 12, korrelieren alle Ergebnisse sehr gut miteinander. Das Plasmid pEGFP-C1 hat eine Größe von 4,7 kb, die DNA des Bakteriophagen M13mp18 7,2 kb und die DNA des Adenovirus Typ 12 35,9 kb (Palka-Santini et al. 2003, MGG in press). Trotzdem sind die Fragmentgrößen nach oraler Applikation der DNA an Mäusen sehr ähnlich. Demzufolge scheint das Schicksal von fremder mit der Nahrung verabreichter DNA im Gastrointestinaltrakt von Mäusen unabhängig von der Größe der Modell-DNA zu sein. Diese Folgerung trifft dann ebenfalls auf die Aufnahme der fremden DNA in Zellen des Darmepithels und in Zellen von Organen zu.

Im Rahmen dieses Projekts konnte die fremde oral applizierte DNA nach einmaliger Gabe 24 Stunden nach Fütterung nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die fremde DNA, die sich noch im Organismus befand, unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die applizierte DNA wurde in Leukozyten und Zellen der Leber, Milz und Nieren gefunden. Da alle drei Organe eine Rolle bei der Immunabwehr spielen, kann man schließen, dass das Immunsystem bei der Eliminierung der DNA beteiligt sein könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deswegen immundefiziente Mäuse von zwei verschiedenen Stämmen auf die gleiche Weise wie in dieser Arbeit beschrieben gefüttert (Daten nicht gezeigt). Es wurden Mäuse gefüttert, bei denen das „recombination activation gene 1“ (RAG 1) deletiert wurde. Dieses Gen kodiert für einen Teil einer Rekombinase, die die Rekombination der V(D)J-Segmente katalysiert. Der zweite Teil der Rekombinase wird vom „recombination activation

gene 2“ codiert, so dass nur die beiden Genprodukte zusammen eine aktive Rekombinase bilden können (Mombaerts et al., 1992; Kim et al., 1999). Durch die Deletion des RAG-1-Gens wurde die Reifung der Lymphozyten unterdrückt und so das Immunsystem ausgeschaltet.

Der zweite immundefiziente Mausstamm, bei dem die Persistenz oral verabreichter DNA untersucht wurde, ist ein Stamm alymphoider Tiere. Diese Tiere können keine Lymphknoten und deshalb auch keine Peyerschen Plaques entwickeln.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten allerdings keinen Unterschied zu denen, die in dieser Arbeit beschrieben werden. Sowohl die Fragmentgrößen als auch die DNA-Menge waren nach Southern-Transfer- und PCR-Analysen ähnlich. Auch nach Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurde die DNA in den Enterozyten des Darmepithels detektiert. Es deutet nichts darauf hin, dass das Immunsystem bei der Eliminierung der DNA eine Rolle spielt.

Allerdings ist bekannt, dass CpG-Dinukleotid-reiche Sequenzen immunstimulierende Wirkungen im Säugerorganismus haben (Übersicht Krieg et al., 2000). CpG-Dinukleotid enthaltende Motive können B-Zellen zur Proliferation und Antikörpersekretion aktivieren (Cardon et al., 1994; Krieg et al., 1995). Diese Sequenzen können darüber hinaus Antigen-präsentierende Zellen, wie z. B. Makrophagen und dendritische Zellen, stimulieren. Diese sezernieren Cytokine, was zur Aktivierung von Killerzellen führen kann (Stacey et al., 1996; Jakob et al., 1998; Cowdery et al., 1996). Möglicherweise spielt die Menge der aufgenommenen DNA eine Rolle, wobei die verabreichte Menge von 50 µg vielleicht zu gering war, um eine Stimulation des Immunsystems hervorzurufen.

5.2 Schicksal fremder oral verabreichter Proteine im Säugersystem

Der Verdauungstrakt ist mit der täglichen Nahrung auch einer großen Anzahl fremder Proteine ausgesetzt. Um die Persistenz von mit der Nahrung aufgenommenen Proteinen zu untersuchen, wurde das Protein Glutathion-S-Transferase des Nematoden *Shistosoma japonicum* als Test-Protein gewählt. Bei der Durchführung der Experimente wurden 300 µg des GST oral an Mäuse verabreicht. Die Tiere wurden 10, 15, 30, 40 und 60 Mi-

nuten später getötet. Spuren des 26 kDa großen Proteins konnten nach Anreicherung des GST in den Inhalten des Magens und des Dünndarms bis zu 30 Minuten detektiert werden. Darüber hinaus wurde das oral verabreichte Protein 15 und 30 Minuten nach Fütterung in den Nieren einiger Tiere nachgewiesen (Abbildung ?? auf Seite ??).

Das GST wird nach oraler Verabreichung im intestinalen System sehr schnell abgebaut. Schon innerhalb von 40 Minuten liegt die Menge des GST in den Inhalten des Gastrointestinaltraktes unter der Nachweisgrenze.

Durch *in vitro* Rekonstitutionsversuche, bei denen frischer Mageninhalt mit 300 µg GST gemischt wurde und 15 und 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurde, wurde gezeigt, dass das Protein schneller abgebaut wird als *in vivo* (Abbildung ?? b auf Seite ??). Zur Durchführung dieses Versuchs wurde die Maus getötet, wodurch möglicherweise schon sehr viele Nucleasen und Proteasen aktiviert wurden, was zu einem schnelleren Abbau des Proteins *in vitro* führte.

Wie oben schon erwähnt, wurde das Protein außer im Magen- und Dünndarminhalten 15 und 30 Minuten nach Fütterung auch in den Nieren gefunden (Abbildung ?? c auf Seite ??). 30 Minuten nach Fütterung ist das Signal stärker, was bedeutet, dass sich das mit der Nahrung aufgenommene Protein wahrscheinlich in den Nieren anreichert.

Durch diese Ergebnisse wurde wahrscheinlich gemacht, dass fremde Proteine wie mit der Nahrung aufgenommene DNA über das Darmepithel in den Körper aufgenommen werden und andere Organe erreichen können. Im Blut und in anderen Organen gefütterter Tiere konnte das oral verabreichte GST bisher nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde kein GST in den Inhalten des Blind- und Enddarms gefunden. Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass das Protein nach 30 Minuten nicht mehr zu finden war, deuten darauf hin, dass mit der Nahrung aufgenommene Proteine im Gastrointestinaltrakt von Mäusen sehr schnell abgebaut werden.

Durch Vorversuche wurde gezeigt, dass GST ein relativ stabiles Protein ist (Abbildung ?? auf Seite ??). Dazu wurde das Protein mit Trypsin in verschiedenen Verhältnissen für verschiedene Zeitspannen bei 37°C inkubiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Protein nach einer Inkubation von 10 Minuten in einem Verhältnis 1:10 mit Trypsin noch detektierbar war. Ob diese Konzentration allerdings der Säurekonzentration im Magen na-

he kommt, ist fraglich. Allerdings wird die Aussage, dass GST ein stabiles Protein ist, dadurch bestätigt, dass das GST bis zu 30 Minuten nachweisbar bleibt.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass noch viel stabilere Proteine, wie z. B. Prione viel länger im Gastrointestinaltrakt und nach über das Darmepithel im Organismus persistieren können.

5.3 Injektion fremder DNA in den Gastrointestinaltrakt

Mit der Nahrung aufgenommene Nukleinsäuren und Proteine sind im Magen- und Darmtrakt der Spaltung durch in den Duodenum sezernierte Nukleasen unterworfen. Um die Nukleaseaktivität *in situ* zu untersuchen, wurden 2 µg der Plasmid DNA oder 10 µg der gfp DNA komplexiert mit 1 mg Protamin in die abgebundenen Darmabschnitte (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon) injiziert und 1 bis 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierungen zeigen, dass die DNA im Duodenum, im Jejunum, im Ileum, im Caecum und im Kolon sehr schnell abgebaut wird. Im Magen dagegen sind Fragmente von 100 bp bis zu 4731 bp detektierbar. Dies deutet daraufhin, dass fremde DNA im Magen nur durch dessen sauren pH-Wert degradiert wird.

Über den *Ductus pancreaticus* werden Nukleasen in das Duodenum sezerniert. Im Vergleich zu den Fragmenten im Magen ist nach einer Stunde Inkubation kaum noch gfp-spezifische DNA detektierbar (Abbildung ?? auf Seite ??). Zu späteren Zeitpunkten ist die Plasmid DNA nur noch im Magen nachweisbar, was auf eine sehr starke Nukleaseaktivität in den restlichen Darmabschnitten *in situ* hinweist (Abbildung ?? b auf Seite ??). PCR-Analysen zeigen, dass auch hier Fragmente von bis zu 1277 bp bis zu 5 Stunden in den meisten Darmabschnitten nachweisbar sind. Die gfp-spezifische DNA ist in sämtlichen Darmabschnitten, ausgenommen im Blinddarm, zu finden (Abbildung ?? auf Seite ??). Dieses Ergebnis könnte auf eine sehr hohe Nukleaseaktivität im Blinddarm nach dem Tod einer Maus hinweisen.

Bei den Southern-Blot-Hybridisierungen nach Injektion der Komplexe ist deutlich zu erkennen, dass die gfp DNA durch das Protamin gegen den Nukleaseangriff geschützt ist (Abbildung ?? auf Seite ??). Es sind Fragmente bis zu 4731 bp im Duodenum, Caecum und Kolon 1 Stunde

nach Inkubation, im Magen und Kolon 3 und 5 Stunden nach Inkubation detektierbar. Das Ileum und das Jejunum sind diejenigen Abschnitte, in denen mit der Southern-Transfer-Methode keine gfp-spezifische DNA mehr nachweisbar ist. Demnach scheint in diesen beiden Darmabschnitten die Nukleaseaktivität am stärksten. Auch nach PCR-Analysen ist im Jejunum und Ileum die geringste DNA-Menge zu finden. Maturin und Curtiss zeigten in *in vitro* Experimenten, dass mit dem Dickdarminhalt von Ratten über mehrere Stunden inkubierte DNA nur zu 90% abgebaut wurde (Maturin und Curtiss, 1977). Auch im Kolon der Mäuse konnte nackte DNA bis zu 5 Stunden und wahrscheinlich noch länger persistieren. Durch Vergleich der Fragmentierung der DNA *in vivo* und *in situ* wird deutlich, dass die Fragmentierung *in situ* wesentlich schneller abläuft als *in vivo*. Diese Beobachtung wurde auch schon bei der Fragmentierung des Proteins Glutathion S Transferase gemacht. Sie unterstützt die Vermutung, dass möglicherweise eine größere Anzahl an Nukleasen und Proteasen aktiviert werden, sobald ein Organismus durch experimentelle Bedingungen gestresst wird.

5.4 Aufnahme fremder DNA in Kultur

Sowohl durch frühere Arbeiten, die die Aufnahme fremder DNA mit der Nahrung charakterisierten, als auch durch diese Arbeit wurde gezeigt, dass DNA über das Darmepithel in den Blutkreislauf aufgenommen und so in die Organe des Modelltieres transportiert werden kann (Schubbert et al., 1994, 1997; Hohlweg und Doerfler 2001). Sowohl nach Fütterung der 7,2 kb großen DNA des Bakteriophagen M13mp18 (Schubbert et al., 1994, 1997) als auch nach oraler Verabreichung des 4,7 kb großen Plasmids pEGFP-C1 (Hohlweg und Doerfler, 2001) konnten Fragmente der DNA häufig in der Milz nachgewiesen werden.

Durch die häufige Detektion der M13mp18 DNA in der Milz wurde angenommen, dass diese Zellen besonders prädestiniert sind, fremde DNA aufzunehmen. Daher wurden Milzen von C57Bl/6J Mäusen präpariert, durch ein Zellsieb gepresst, um die Milzzellen zu vereinzeln und in Dulbecco's Medium mit 20 % FCS bei 37°C inkubiert. 24 Stunden später wurde das Volumen des Mediums reduziert und 5 µg/ml des pEGFP-C1 Plasmids hinzupipettiert.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurden die präparierten Nuklei analysiert. Es wurden nur FITC-spezifische Signale nach einer fünfstündigen Inkubation nachgewiesen (Abbildung ?? auf Seite ??). Vor und nach dieser Zeit konnten keine Signale nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Laser scan Mikroskopie wurde überprüft, ob die Signale im Nukleus und nicht eventuell auf der Kernmembran zu finden waren.

Durch die Southern-Transfer-Methode (hier nicht gezeigt) wurde festgestellt, dass schon innerhalb von 30 Minuten die DNA im Medium stark degradiert wird. Nach dieser Zeit konnte, wie schon erwähnt, ebenfalls keine gfp-spezifische DNA detektiert werden. Dies könnte auf einen raschen intrazellularen Abbau fremder DNA in primären Milzzellen hinweisen.

Es ist schon gezeigt worden, dass sowohl nackte als auch an das terminale Protein gebundene Ad12 DNA in Zellen etablierter Zellkulturen aufgenommen wurden (Schröer, 1997). Die Aufnahme der DNA mit dem terminalen Protein war sehr viel effizienter als die Aufnahme nackter DNA.

Die Endozytose fremder DNA in Kulturen kann bei primären Zellen anders ablaufen, so dass die Ergebnisse, die Jörg Schröer (Schröer, 1997) erzielte, nicht vergleichbar sind. Bei den Ergebnissen dieser Arbeit deutet alles auf eine sehr gute Aufnahme des Plasmids pEGFP-C1 durch die primären Milzzellen hin. Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten die gfp-spezifischen Signale gut detektiert werden. Es wurden 5 Signale in 500 Nuklei nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden detektiert.

Weiterhin wurde nach Expression der gfp DNA gesucht. Es konnte keine Expression der gfp DNA festgestellt werden. Wie schon erwähnt, wurde dem Medium zugegebene DNA sehr schnell degradiert, so dass nur Fragmente von den Zellen aufgenommen werden konnten. Mit diesen Fragmenten war vermutlich keine Expression möglich. Weiterhin könnte es sein, dass zu wenig DNA aufgenommen wurde, um die Expression des „green fluorescent protein“ im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Durch die Untersuchungen, die in Kultur möglich sind, kann auch auf die DNA-Aufnahme *in vivo* geschlossen werden. Häufig wird die Aufnahme von Substanzen an schon etablierten Zellkulturen analysiert. Vielleicht kommen aber die Untersuchungen der Aufnahme fremder DNA in primäre Zellen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, den Bedingungen *in vivo* weitaus näher.

Durch die erzielten Ergebnisse wird deutlich, dass die Zellen der Milz fremde DNA gut endozytieren können.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass oral applizierte Plasmid DNA, wie die lineare DNA des Bakteriophagen M13mp18 und des Adenovirus Typ 12, in fragmentierter Form die Passage durch den Gastrointestinaltrakt von Säugern übersteht. Dabei spielt auch der Zustand des Magens (voll - leer) eine Rolle. Je gefüllter der Magen, desto länger dauert natürlich die Passage durch den Darmtrakt und desto langsamer wird die DNA fragmentiert. Allerdings hat die Fülle des Magens keinen Einfluss auf die Fragmentgrößen. Die Fragmente können in Zellen des Darmepithels aufgenommen und durch den Blutkreislauf in andere Organe transportiert werden. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit werden frühere Arbeiten bestätigt und ergänzt.

Auch Proteine werden im Gastrointestinaltrakt fragmentiert und in den Organismus aufgenommen. Weiterführende Experimente sollten analysieren, ob auch Proteine in den Zellen des Darmepithels nachweisbar sind.

Zusätzlich sollten die Aufnahmemechanismen fremder DNA und Proteine in die Zellen untersucht werden. Das Augenmerk sollte dabei auch auf die Beteiligung der M-Zellen an der DNA-, bzw. Protein-Aufnahme gerichtet werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schicksal fremder mit der Nahrung aufgenommener DNA und Proteine in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht: Nach oraler Applikation in Mäusen sowie nach Injektion von Plasmid DNA in die verschiedenen Darmabschnitte *in situ*.

6.1 Orale Applikation von fremder DNA

Die Persistenz und Verteilung fremder oral applizierter DNA wurde im Mausorganismus analysiert. Das Plasmid pEGFP-C1 wurde als Modell-DNA gewählt. Bei einem Vergleich der genomischen Maus-DNA mit dem Plasmid in EST-Mausdatenbanken ergab sich ein Hinweis auf eine 99%ige Homologie zwischen der genomischen DNA und der Sequenz des Gens des „green fluorescent protein“. Diese Homologie konnte durch Vorversuche nicht bestätigt werden. Weiterhin konnte eine Homologie zu der DNA der Darmbakterien ausgeschlossen werden und das verfütterte Plasmid konnte als „fremd“ erkannt werden.

Das Schicksal der verabreichten pEGFP-C1-DNA wurde mit verschiedenen Standardmethoden der Molekularbiologie in den Tieren verfolgt. Mit Hilfe der PCR-Analysen konnten Fragmente bis zu 1277 bp des oral applizierten Plasmids im Magen- und Dünndarminhalt 3 Stunden und im Mageninhalt 6 Stunden nach Verabreichung amplifiziert werden. Ein 750 bp großes Fragment der verfütterten DNA konnte bis zu 5 Tagen im Blinddarminhalt nachgewiesen werden. Dies gibt einen Hinweis auf eine nicht vollständige Degradierung der DNA im Gastrointestinaltrakt der Maus.

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen von Blinddarmgewebeschnitten zeigten Signale der verfütterten DNA in den Nuklei von Epithelzellen (Kryptenzellen und Enterozyten) bis zu 24 Stunden nach Applikation. Bei der Analyse der DNA aus Leber, Milz, Niere und Blut mit Hilfe der PCR-Technik wurden Fragmente der gfp DNA bis zu 1277 bp in der Leber bis 18 Stunden und in Niere und Blut bis zu 6 Stunden nach Verabreichung detektiert. Ein 750 bp großes Fragment des Gens des „green fluorescent protein“ konnte bis zu 5 Tagen im Blut und in der Niere nachgewiesen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass oral aufgenommene DNA über das Darmepithel in verschiedene Organe gelangen kann.

In Kontrollmäusen, die mit DNA-freiem Puffer gefüttert worden waren, konnte zu keinem Zeitpunkt und mit keiner der verwendeten Methoden die gfp DNA nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde die Verteilung und Persistenz von DNA-Protein-Komplexen im Mausorganismus untersucht. Dazu wurde das Plasmid pEGFP-C1 mit dem Protein Protamin komplexiert, oral appliziert und mit Hilfe der gleichen Methoden wie nach Fütterung unkomplexierter DNA analysiert.

Dabei konnten mit Hilfe der PCR-Technik Fragmente des Plasmids bis zu 1277 bp im Mageninhalt 3 Stunden nach Fütterung detektiert werden. Fragmente bis zu 750 bp konnten im Magen- und Enddarminhalt bis zu 18 Stunden nach Fütterung amplifiziert werden. In den Inhalten des Dünndarms, des Blinddarms und des Kots konnten Fragmente dieser Größe bis zu 3 Stunden detektiert werden. Bei diesen Experimenten wurde 1/5 der Menge der DNA verfüttert, die bei Fütterung unkomplexierter DNA appliziert worden war. Es wurden keine großen Unterschiede zu den vorherigen Ergebnissen entdeckt. Dies beweist, dass die DNA durch die Komplexbildung stark geschützt wurde.

Bei Analysen von Gewebeschnitten des Blinddarms mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten Signale der fremden DNA bis zu 18 Stunden nach oraler Applikation nachgewiesen werden. In Kontrolltieren, die mit DNA-freiem Puffer gefüttert worden waren, konnte die fremde DNA nicht nachgewiesen werden.

6.2 Orale Applikation fremder Proteine

Mit der Nahrungsaufnahme ist der Gastrointestinaltrakt auch einer Vielzahl fremder Proteine ausgesetzt. Um die Verteilung und Persistenz fremder Proteine zu untersuchen, wurde das Protein Glutathion S Transferase oral an Mäuse appliziert.

Die Proteine wurde aus den Darminhalten sowie Organen extrahiert und mit Hilfe der Western-blot-Methode analysiert. Das GST Protein konnte bis zu 30 Minuten im Inhalt des Magens und des Dünndarms detektiert werden. Weiterhin konnte das oral applizierte Protein in Nieren 15 und 30 Minuten nach Verabreichung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch mit der Nahrung aufgenommene Proteine fähig sind, in

den Organismus aufgenommen zu werden.

Sowohl zu späteren Zeitpunkten nach Verabreichung des Proteins als auch in Kontrollmäusen, die mit Protein-freiem Puffer gefüttert worden waren, konnten keine Fragmente des GST nachgewiesen werden.

6.3 Aufnahme oral applizierter DNA in Darmbakterien

Um das Schicksal oral applizierter DNA weiter zu analysieren wurden die Bakterien des Gastrointestinaltraktes von Mäusen untersucht. Das Plasmid pEGFP-C1 trug das Kanamycinresistenzgen, welches in *E.coli*-Bakterien exprimiert werden kann. Die Bakterien wurden daher auf eine Kanamycinresistenz analysiert. Mit Hilfe der Southern Blot- Analyse konnte in den Bakterien keine Kanamycinresistenz nachgewiesen werden.

6.4 Injektion des pEGFP-C1 Plasmids in die verschiedenen Darmabschnitte

Um die Degradierung der in anderen Experimenten oral applizierten DNA besser analysieren zu können, wurde das Plasmid pEGFP-C1 in die verschiedenen abge bundenen Darmabschnitte von Mäusen injiziert. Mit Hilfe von Southern-Transfer- und PCR-Analysen wurde die DNA nach verschiedenen Inkubationszeiten *in situ* analysiert.

Mit Hilfe der PCR-Methode konnten Fragmente bis zu 1277 bp im Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon bis zu 5 Stunden detektiert werden. Dies zeigt, dass auch *in situ* fremde DNA nicht direkt zu niedermolekularen Nukleotiden abgebaut wird.

Desweiteren wurde die Degradierung der DNA nach Komplexierung an Protamin untersucht. Durch die PCR-Methode konnten Fragmente des Plasmids mit einer Größe von 1277 bp in sämtlichen Darmabschnitten amplifiziert werden. Dies zeigt eine sehr starke Protektion der fremden DNA durch die Komplexierung an Protamin.

Auch in diesen Experimenten wurden in Kontrolltieren, in deren Darmabschnitte DNA-freier Puffer injiziert worden war, keine gfp spezifische DNA detektiert.

6.4 Injektion des pEGFP-C1 Plasmids in die verschiedenen Darmabschnitte 126

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass DNA im Gastrointestinaltrakt von Mäusen nicht vollständig abgebaut wird. Sowohl fremde mit der Nahrung aufgenommene DNA als auch Proteine können die Darmwand passieren und in den Organismus gelangen.

Literatur

Abe, K. and Ito, T. (1977)

A qualitative and quantitative morphologic study of Peyer's patches of the mouse. *Arch. Histol. Jpn.* 40, 407–420.

Allan, C. H., Mendrick, C. L., and Trier, J. S., . (1993)

Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class I major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 104, 698–708.

Alpan, O., Rudomen, G., and Matzinger, P. (2001)

The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune responses. *J. of Immunology* 166, 4843–4852.

Altschul, S. F., Madden, T. F., Schäffer, A. A., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., . (1997)

Gapped BLAST and PSI BLAST: A new generation of protein database search programmes. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389–3402.

Aubin, J. E. (1979)

Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem.* 27, 36–43.

Autenrieth, I. B. and Firsching, R. (1996)

Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica* an ultrastructural and histological study. *J. Med. Microbiol.* 44, 268–294.

Azhar, S., Mukthar, H., Dutta, G. P., and Mohan Rao, V. K. (1974)

Changes in the level of the hydrolytic enzymes in the cecum and intestine of virulent strains of *Entamoeba histolytica* intracecally. *Indian J. Med. Microbiol.* 44, 285–294.

Bablanian, R., Eggers, H. J., and Tamm, I. (1965)

Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage. I. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphological alterations in cultured cells. *Virology* 26, 10–113.

Bankhurst, A. D. and Williams, R. C. (1975)

Identification of DNA binding lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus, journal = *J. Clin. Invest.* 56, 1378–1385.

Behn-Krappa, A., Sandura, I., Sandaradure de Silva, U., and Doerfler, W. (1991)

Pattern of DNA methylation are indistinguishable in different individuals over a wide range of human DNA sequences. *Genomics* 11, 1–7.

Beier, R. and Gebert, A. (1998)

Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches, journal = *Am. J. Physiology* 275, G130–G137.

Bendig, M. M. (1988)

The production of foreign proteins in mammalian cells. *Gent. Eng.* 7, 91–127.

Bennet, R., Garbor, G., and Merritt, M. (1985)

DNA binding to human leucocytes. *J. Clin. Invest.* 76, 2182–2190.

Bennet, R., Hefeneider, S. H., Bakke, A., Merritt, M., Smith, C. A., Mourich, D., and Heinrich, M. C. (1988)

The production and characterization of murine monoclonal antibodies to a DNA receptor on human leucocytes. *J. Immunol.* 140, 2937–2942.

Benson, R. C., Meyer, R. A., Zaruba, M. E., and McKhann, G. M. (1979)

Cellular autofluorescence- is it due to flavins?, journal = *J. Histochem Cytochem.* 27, 44–48.

Bestor, T. H. and Verdine, G. L. (1994)

DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 380–389.

Bienenstock, J., McDermont, M., Befus, D., and O'Neill, M. (1978)

A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107, 53–59.

Bjarnson, I., McPherson, A., and Hollander, D. (1995)

Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108, 1566–1581.

Black, P. H. (1966)

Transformation of mouse cell line 3T3 by SV40: Dose response relationship and correlation with SV40 tumor antigen production. *Virology* 28, 760–763.

Bockmann, D. E. and Cooper, M. D. (1973)

Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius appendix and Peyer's patches- An electron microscopy study. *Am J. Anat.* 136, 455–478.

Boom, R., Sol, J. A., Salimans, M. M. M., Jasen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., and van der Noorda, J. (1989)

Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495–503.

Borghesi, C., Regoli, M., Bertelli, E., and Nicoletti, C. (1996)

Modifications of the follicle-associated epithelium by short-term exposure to a non-intestinal bacterium. *J. Pathol.* 180, 326.

Budger, V., Zhang, G., Knechtle, S., and Wolff, J. A. (1996)

Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Therapy* 3, 593–598.

Bye, W. A., Allan, C. H., and Trier, J. S. (1984)

Structure, distribution and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86, 789–801.

Cardon, L. R., Burge, C., Clayton, D. A., and Karlin, S. (1994)

Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3799–3803.

Centar, M. S. and Behal, F. J. (1966)

Calf intestinal 5'-Nucleotidase. *Archs. biochem. Biophys.* 114, 414–421.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994)

Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.

Chen, S. C., Jones, D. H., Fynan, E. F., Farrar, G. H., Clegg, J. C. S., Greenberg, H. B., and Herrmann, J. E. (1998)

Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J. Virol.* 72, 5757–5761.

Chickering, D. E., Harris, W. P., and Mathiowitz, E. (1995)

A microtensiometer for the analyses of bioadhesive microspheres. *Biomed. Instrum. Technol.* 29, 501–512.

Chishima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Yamaoka, H., Shimada, H., Moossa, A. R., and Hoffmann, R. M. (1997)

Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.* 57, 2042–2047.

Clark, M. A. and Hirst, B. H. (2002)

Expression of junction-associated proteins differentiates mouse intestinal M cells from enterocytes. *Histochem. Cell Biol.* 118, 137–147.

Clark, M. A., Hirst, B. H., and Jepson, M. A. (1998)

M cell surface $\beta 1$ integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect. Immun.* 66, 1237–1244.

Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L., Booth, T. A., and Hirst, B. H. (1993)

Differential expression of lectin binding sites defines mouse intestinal M cells. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1679–1687.

Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L., and Hirst, B. H. (1994a)

Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal Peyer's patches and caecal patches. *Histochem. J.* 26, 271–280.

Clark, M. A., Jepson, M. A., Simmons, N. L., and Hirst, B. H. (1994b)

Prefential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* 145, 543–552.

Clegg, M. T. (1993)

Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 363–367.

Clewell, D. B. and Helsinki, D. R. (1972)

Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled COL E1 deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 110, 1135–1146.

Condon, R. J., Hall, G., and Hatfield, E. E. (1970)

Metabolism of abomasally infused ¹⁴C labeled ribonucleic acid, adenin, uracil and glycine. *J. Anim. Sci.* 31, 1037.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996)

FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38.

Counis, M. F. and Torriglia, A. (2000)

DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 78, 405–414.

Cowdery, J. S., Chace, J. H., Yi, A. K., and Krieg, A. M. (1996)

Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- γ in vivo and increases the toxicity of liposaccharides. *J. Immunol.* 156, 4570–4575.

Crossman, M. W., Hauff, S. M., and Gordon, J. I. (1994)

The mouse ileal lipid-binding protein gene: A model for studying axial patterning during gut morphogenesis. *J. Cell Biol.* 126, 1547–1564.

Crystal, R. G. (1995)

Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success. *Science*.

Davis, H. L., Demeneix, B. A., Quantin, B., Coulombe, J., and Whalen, R. G. (1993)

Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer in adult mouse skeletal muscle. *Human Gene Therapie* 4, 733–740.

Davis, H. L., Michel, M.-L., and Whalen, R. G. (1995)

Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 21-29.

Debard, N. and Sierro, F. and Kraehenbuhl, J.-P. (1999)

Development of Peyer's patches, follicle-associated epithelium and M cell: Lessons from immunodeficient and knock out mice. *Immunology* 11, 183–191.

Deissler, H., Behn-Krappa, A., and Doerfler, W. (1996)

Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)_n in the human FMR1 gene. *Journal of Biological Chemistry* 271, 4327–4334.

DiBenedetto, G., Naidze, I. S., Stenico, M., Nigro, L., Krings, M., Lanzinger, M., Vigilant, L., Stoneking, M., Pääbo, S., and Barbujani, G. (2000)

Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the alps. *European J. Human Genet.* 8, 669–677.

Doerfler, W. (1968)

The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 636–643.

Doerfler, W. (1969)

Non-productive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* 38, 587–606.

Doerfler, W. (1970)

Integration of the DNA of adenovirus type 12 in BHK21 cells. *J. Virology* 6, 652–666.

Doerfler, W. (1975)

Integration of viral DNA into the host genome, Current topics in Microbiology and Immunology. *Immunology* 71, 1–78.

Doerfler, W. (1982)

Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: The organization of integrated adenovirus sequences. *Current topics Microbiol. Immunol.* 101, 127–194.

Doerfler, W. (1983)

DNA methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 93–124.

Doerfler, W. (1984)

DNA methylation and its functional significance: Studies on the adenovirus system. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 108, 79–98.

Doerfler, W. (1991a)

DNA methylation and gene function. *Current Topics Microbiol. Immunol.* 108, 79–98.

Doerfler, W. (1991b)

The abortive infection and malignant transformation by adenoviruses: Integration of viral DNA and control of viral gene expression by specific patterns of DNA methylation. *Adv. Virus Res.* 39, 89–128.

Doerfler, W. (1993)

Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutagenesis. *Prog. Nucleic Res. Mol. Biol.* 46, 1–36.

Doerfler, W. (2000)

Foreign DNA in mammalian systems. *Wiley-VCH.*

Dowty, J. J., Williams, P., Zhang, G., and Wolff, J. (1993)

Plasmid DNA entry into post-mitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4572–4576.

Eberhardt, R. F. (1851)

Versuche über den Übergang fester Stoffe von Darm und Haut in die Säftemasse des Körpers. *Z. Rat. Med.* 1, 405–415.

Eden, S., Hashimshony, T., Keshet, I., Cedar, H., and Thorne, A. W. (1998)

DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394, 842.

Emlen, W. and Burdick, G. (1988)

Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice. *J. Immunol.* 140, 1816–1822.

Emlen, W., Rifai, A., Magilavy, D., and Mannik, M. (1988)

Hepatic binding of DNA is mediated by a receptor on nonparenchymal cells. *Am. J. Pathol.* 133, 54–60.

Ermak, T. H., Dougherty, E. P., Bhagat, h. R., Kabok, Z., and Pappo, J. (1995)

Uptake and transport of copolymer biodegradable microspheres by rabbit Peyer's patch M cells. *J. Cell Tissue Res.* 279, 433–436.

Ermak, T. H. and Giannasca, P. J. (1998)

Microparticle targeting to M cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 34, 261–283.

Ermak, T. H. and Owen, R. L. (1987)

Phenotype and distribution of T lymphocytes in Peyer's patches of athymic mice. *Histochemistry* 87, 321–325.

Fasano, A. (1998)

Novel approaches for oral delivery of macromolecules. *J. Pharmaceutical Sci.* 87, 1351–1356.

Faulk, W. P., McCormick, J. N., Goodman, J. R., Yoffey, J. M., and Fundenberg, H. H. (1970)

Peyer's patches: Morphologic studies. *Cell Immunol.* 1, 500–520.

Featherstone, C., Darby, M. K., and Gerace, L. (1988)

A monoclonal antibody against the nuclear pore complex inhibits nucleocytoplasmic transport of protein and RNA in vivo. *J. Cell Biol.* 107, 1289–1297.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983)

Addendum: „A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to specific activity“. *Anal. Biochem.* 132, 6–13.

Feldherr, C. M. and Akin, D. (1990)

The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cells in culture. *J. Cell Biol.* 111, 1–8.

Ferkol, T., Perales, J. C., Mularo, F., and Hanson, R. W. (1996)

Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 101–105.

Fisherman, D. M. and Patterson, G. D. (1996)

Light scattering studies of supercoiled and nicked DNA. *Biopolymers* 38, 535–552.

Foster, N., Clark, M. A., Jepson, M. A., and Hirst, B. H. (1998)

Ulex europaeus 1 lectin targets microspheres to mouse Peyer's patch M-cells in vivo. *Vaccine* 16, 536–541.

Franzini-Armstrong, C., Ferguson, D. G., Castellani, L., and Kenney, L. (1986)

The density and disposition of Ca-ATPase in in situ and isolated sarcoplasmic reticulum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 483, 44–56.

Fraser, R., Bowler, L. M., Day, W. A., Dobbs, B., Johnson, H. D., and Lee, D. (1980)

High perfusion pressure damages the sieving ability of sinusoidal endothelium in rat livers. *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 222–228.

Fujimura, Y., Kihara, T., and Mine, H. (1992)

Membranous cells as portal of *Yersinia pseudotuberculosis* entry in rabbit ileum. *J. Clin. Electron. Microsc.* 25, 35–45.

Fuller (1984)

Microbial activity in the alimentary tract of birds. *Proc. Nutr. Soc.* 43, 55–61.

Gebert, A. and Bartels, H. (1991)

Occluding junctions in the epithelium of the gut associated lymphoid tissue (GALT) of the rabbit ileum and caecum. *Cell Tissue Res.* 266, 301–314.

Gebert, A., Fasbender, S., Werner, K., and Weissferdt, A. (1999)

The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am. J. Pathol.* 154, 1573–1582.

Gebert, A. and Hach, G. (1993)

Differential binding of lectins to M cells and enterocytes in the rabbit caecum. *Gastroenterology* 105, 1350–1361.

Gebert, A., Hach, G., and Bartels, H. (1992)

Colocalization of vimentin and cytokeratins in M cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GALT). *Cell Tissue Res.* 269, 331–340.

Gebert, A. and Pabst, R. (1999)

M cells at locations outside the gut. *Immunology* 11, 165–170.

Gebert, A., Rohkötter, H. J., and Pabst, R. (1994)

Cytokeratin 18 is an M cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res.* 276, 213–221.

Gebert, A., Rothkötter, H. J., and R., P. (1996)

M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cyt.* 167, 91–159.

Griebel, P. J. and Hein, W. R. (1996)

Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol. Today* 17, 30–39.

Grutzkau, A., Hanski, C., Hahn, H., and Riecken, E. O. (1990)

Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: A common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 3, 1011–1015.

Gullberg, E., Leonard, M., Karlsson, J., Hopkins, A. M., Brayden, D., Bird, W., and Artursson, P. (2000)

Expression of specific markers and particle transport in a new human intestinal M cell model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 803–813.

Gurunathan, S., Klinmann, D. M., and Seder, R. A. (2000)

DNA vaccines: Immunology, application and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927–974.

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.

Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, M., Kilger, K., Simanainen, J., Georgiev, O., Bauer, K., Hedges, R., , and Schaffner, W. (1994)

Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264, 1775–1778.

Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Worth, P., Umeda, P. K., and Chang, K. C. (1991)

Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett.* 290, 73–76.

Harrison, F. A., , and Leat, W. M. F. (1975)

Digestion and absorption of lipids in non-ruminant and ruminant animals: A comparison. *Proc. Nutr. Soc.* 34, 203–210.

Herbst, G. (1844)

Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtung. *Vandenhoek & Rupprecht, Göttingen*, 333–337.

Hertz, J., Schell, G., and Doerfler, W. (1999)

Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 274, 24232–24240.

Hickman, M. A., Malone, R. W., Lehmann-Bruinsma, K., Sih, T. R., Knoell, D., Szoka, F. C., Walzem, R., Carlson, D. M., and Powell, J. S. (1994)

Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Human Gene Therapy* 5, 1477–1483.

Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T. (1989)

Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal permeability. *Gastroenterology* 96, 736–749.

Hilleman, M. R. and Werner, J. H. (1994)

Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85, 185–188.

Hillery, A. M., Jani, P., and Florence, A. T. (1994)

Comparative, quantitative study of lymphoid and non-lymphoid uptake of 60 nm polystyrene particles. *J. Drug Target* 2, 151–156.

Hirsch, R. (1906)

Über das Vorkommen von Stärkekörnern im Blut und im Urin. *Z. Exp. Pathol. Ther.* 3, 390.

Hirsch, R. (1908)

Über das Übergehen corpusculärer Elemente in den Harn. *Berl. Klin. Wschr.* 45, 331.

Hohlweg, U. and Doerfler, W. (2001)

On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981)

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193–197.

Horkovics-Kovats, S. (1999)

Efficiency of enterohepatic circulation, its determination and influence on drug bioavailability. *Arzneimittelforschung* 49, 805–815.

Hotchkiss, R. D. (1948)

The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* 175, 315–327.

Jepson, M. A. and Clark, M. A. (1998)

Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol.* 6, 359–365.

Jepson, M. A., Foster, N., Mason, C. M., Bennet, M. K., Simmons, N. L., and Hirst, B. H. (1996)

Targeting to intestinal M cells. *J. Anat.* 189, 507–516.

Jepson, M. A., Mason, C. M., Bennett, M. K., Simmons, M. L., and Hirst, B. H. (1992)

Coexpression of vimentin and cytokeratins in M cells of rabbits in intestinal lymphoid follicle-associated epithelium. *Histochem. J.* 24, 33–39.

Jepson, M. A., Simmons, N. L., Savidge, T. C., James, P. S., and Hirst, B. H. (1993)

Selective binding and transcytosis of latex microsphere by rabbit intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* 271, 399–405.

Jiao, S., Williams, P., Berg, R. K., Hodgeman, B. A., Liu, L., Repetto, G., and Wolff, J. A. (1992)

Direct gene transfer into non-human primate myofibers in vivo. *Human Gene Therapy* 3, 21–33.

Jones, B., Pascopella, L., and Falkow, S. (1995)

Entry of microbes into the host: Using M cells to break the mucosal barrier. *Current Opinion in Immunology* 7, 474–478.

Just, A. (1983)

The role of the large intestine in the digestion of nutrients and amino acid utilization in monogastrics. *In: Protein metabolism and nutrition, Proc. 4th Int. Symb.*, 289–309.

Kaiser, A. D. and Hogness, D. S. (1960)

The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage I_{dg}. *J. Mol. Biol.* 2, 392–415.

Kato, T. (1990)

A study of secretory immunoglobulin-A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterology Jpn.* 25, 15–23.

Kato, T. and Owen, R. L. (1999)

Structure and function of intestinal mucosal epithelium in mucosal immunology. *In: Ogra, R. et al. Academic Press, San Diego, CA.*

Kay, R. N. B. and Pfeffer, E. (1969)

Movements of water and electrolytes into and from the intestine of sheep. *In: Phillipson, A. T.: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant, Proc. 3rd Int. Symp., Cambridge*, 390–402.

Kerneis, A., Bogdanova, A., Colucci-Guyon, E., Kraehenbuhl, J.-P., and Pringault, E. (1996)

Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. *Gastroenterology* 110, 515–521.

Kernéis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J.-P., and Pringault, E. (1997)

Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* 210, 948–952.

Kernéis, S. and Pringault, E. (1999)

Plasticity of the gastrointestinal epithelium: The M cell paradigm and opportunism of pathogenic microorganisms. *Immunology* 11, 205–215.

Koetsier, P. A., Schorr, J., and Doerfler, W. (1993)

A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern Blotting of DNA. *Bio. Techniques* 15,260–261.

Kraehenbuhl, J.-P. and Neutra, M. R. (1992)

Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* 72, 853–879.

Kraehenbuhl, J.-P. and Neutra, M. R. (2000)

Epithelial M cells: Structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 301–302.

Kraehenbuhl, J.-P., Pringault, E., and Neutra, M. R. (1997)

Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol. Ther.* 11, 3–9.

Krieg, A. M., Hartmann, G., and Yi, A. K. (2000)

Mechanism of action of CpG DNA. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Kretzky, G. A., and Klinmann, D. M. (1995)

CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549.

Kruzel, M. L., Yael, H., Chung-Ying, C., and Castro, G. A. (1998)

The gut: A key metabolic organ protected by lactoferrin during experimental systemic inflammation in mice. *Plenum Press, New York*, 167–173.

Lavelle, E. C., Sharif, N. W., Thomas, N. W., Holland, J., and Davis, S. S. (1995)

The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems. *Adv. Drug Del.* 18, 5–22.

Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., and Spadafora, C. (1989)

Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell* 57, 717–723.

Lelouard, H., Reggio, H., Mangeat, P., Neutra, M., and Montcourrier, P. (1999)

Mucin-related epitopes distinguish M cells and enterocytes in rabbit appendix and Peyer's patches. *Infect. Immun.* 67, 357–367.

Leonetti, J. P., Mechti, N., Degols, G., Gagnor, C., and Lebleu, B. (1991)

Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2702–2706.

Lettman, C. and Schmitz, B. nad Doerfler, W. (1991)

Persistence or loss of preimposed methylation patterns and de novo methylation of foreign DNA integrated in transgenic mice. *Nuc. Acid Res.* 19, 7131–7137.

Liang, E., Kabcenell, A. K., Coleman, J. R., Robson, J., Ruffles, R., and Yazdanian, M. (2002)

Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 46, 93–101.

Liebler, E. M., Lemke, C., and Pohlenz, J. F. (1995)

Ultrastructurally study of uptake of ferritin by M cells in the follicle-associated epithelium in the small and large intestines of pigs. *Am. J. Vet. Res* 56, 725–730.

Lowden, S. and Heath, T. (1995)

Lymphoid tissues of the ileum in young horses: distribution, structure and epithelium. *Anat. Embryol.* 192, 172–179.

Madara, J. L., Bye, W. A., and Trier, J. S. (1984)

Structural features of and cholesterol distribution in M cell membranes in guinea pig, rat and mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* 87, 1091–1103.

Maeda, T., Yamada, Y., Moriuchi, R., Sugahara, K., Tsuruda, K., Joh, T., Atogami, S., Tsukasa, T., Tomonaga, M., and Kamihira, S. (1999)
Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* 189, 1063–1071.

Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., and Dwarki, V. (1993)
Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: Studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Human Gene Therapy* 4, 419–431.

Mason, V. C. (1984)
Metabolism of nitrogenous compounds in the large gut. *Proc. Nutr. Soc.* 43, 45–53.

Mathiowitz, E., Jacob, J. S., Jong, Y. S., Carino, G. P., Chickinger, D. E., Chaturvedi, P., Santos, C. A., Vijayaraghavan, K., Montgomery, S., Basset, M., and Morell, C. (1997)
Biological erodable microsphere as potential oral drug delivery systems. *Nature* 386, 410–414.

Maturin Sr., L. and Curtiss III., R. (1977)
Degradation of DNA by nucleases in intestinal tract of rats. *Science* 196, 216–218.

McAllan, A. B. (1980)
Degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestine of steers. *British J. Nutr.* 44, 99–112.

McAllan, A. B. (1982)
The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 41, 309–317.

McAllan, A. B. and Smith, R. H. (1969)
Nucleic acid metabolism in the ruminant - Determination of nucleic acids in digesta. *British J. Nutr.* 23, 671–682.

McAllan, A. B. and Smith, R. H. (1973a)
Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. *British J. Nutr.* 29, 467–474.

McAllan, A. B. and Smith, R. H. (1973b)

Degradation of nucleic acids in the rumen. *British J. Nutr.* 29, 331–345.

McGhee, J. D. and Ginder, G. D. (1979)

Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken β -globin genes. *Nature* 280, 419–420.

Mellerick, D. M. and Fraser, N. W. (1987)

Physical state of latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158, 265–275.

Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B., and Hofschneider, P. H. (1978)

Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a Hind III Fragment of lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3642–3646.

Meyer, K. B., Thompson, M. M., Levy, M. Y., Barron, L. G., and Szoka Jr., F. C. (1995)

Intratracheal gene delivery in the mouse airway: Characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Therapy* 2, 450–460.

Minagawa, K., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K., Masubuchi, Y., Matsumoto, M., Doi, M., Nishimura, C., and Meada, M. (1993)

Change of the higher order structure of DNA induced by the complexation with intercalating synthetic polymer, as is visualized by fluorescence microscopy. *Nucleic Acids Res.* 21, 37–40.

Murray, E. J. and Grosveld, F. (1987)

Site specific demethylation in the promoter of human c-globin gene does not alleviate methylation mediated suppression. *EMBO J.* 6, 2329–2335.

Nabel, E., Gordon, D., Yang, Z.-Y., Xu, L., San, H., Plautz, G., Wu, B.-Y., Gao, X., Huang, L., and Nabel, G. (1992)

Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: Lack of autoimmunity and gonadal localization. *Human Gene Therapy* 3, 649–656.

**Najfeld, V., Ballard, S. G., Menninger, J., Ward, D. C., Bouhassira, E. F.,
Schwart, R. S., Nagel, R., and Rybicki, A. C. (1992)**

The gene of human erythrocyte protein 4.2 maps to chromosome 15q15. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 71–75.

Nakanishi, A. and Iritani, A. (1993)

Gene transfer in the chicken by sperm mediated methods. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 258–261.

Nemerew, G. R. (2000)

Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 276, 1–4.

Neutra, M. R. and Kraehenbuhl, J.-P. (1992a)

Transepithelial transport and mucosal defense I: The role of M cells. *Trends in Cell Biology* 2, 134–138.

Neutra, M. R. and Kraehenbuhl, J.-P. (1992b)

Transepithelial transport and mucosal defense II: Secretion of IgA. *Trends in Cell Biology* 2, 170–174.

Neutra, M. R. and Kraehenbuhl, J.-P. (1996)

Antigen uptake by M cells for effective mucosal vaccines. *in: Kiyona, H. and Ogra, P. L. and McGhee, J. R. (eds), Mucosal vaccines, Academic Press.*

Neutra, M. R., Mantis, N. J., Frey, A., and Giannasca, j. (1999)

The composition and function of m cell apical membranes: Implications for microbial pathogenesis. *Immunology* 11, 171–181.

**Neuwelt, E. A., Specht, H.-D., Barnett, P.-A., Dahlborg, S. A., Miley, A.,
Larson, S. M., Brown, P., Eck Hellstrom, K. E., and Hellstrom, I.
(1987)**

Increased delivery of tumor-specific monoclonal antibodies to brains after osmotic blood-brain barrier modification in patients with melanoma metastatic to the central nervous system. *Neurosurgery* 20, 885–895.

Niswender, K. D., Blackman, S. M., Rohde, L., Magnuson, M. A., and Piston, D. W. (1995)

Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: Comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *Journal of Microscopy* 180, 109–116.

Oesterlen, F. (1846)

Über den Eintritt von Kohle und anderen unlöslichen Stoffen vom Darmkanal aus in die Blutmasse. *Z. Rat. Med.* 5, 434–439.

Ohrend, G., Knoblauch, M., and Doerfler, W. (1995)

Selective loss of unmethylated segments of integrated Ad12 genomes in revertants of the adenovirus type 12-transformed cell line T637. *Virus Res.* 38, 261–267.

Ohrend, G., Kuhlmann, I., and Doerfler, W. (1994)

Spreading of DNA methylation across foreign (adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. *J. Virol.* 65, 4301–4308.

Okudaira, K., Yoshizawa, H., and Williams, R. C. (1987)

Monoclonal murine anti-DNA antibody reacts with living mononuclear cells. *Arthritis Rheum.* 30, 669–674.

Ouzilou, L., Caliot, E., Pelletier, I., Prevost, M. C., Pringault, E., and Colbere, F. (2002)

Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J. Gen. Virol.* 83, 2177–2182.

Overbeek, P. A., Sing-Ping, L., van Quill, K. R., and Westphal, H. (1986)

Tissue specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequences. *Science* 231, 1574–1577.

Owen, R. L. (1977)

Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine. *Gastroenterology* 72, 440–451.

Owen, R. L. (1999)

Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches – A personal and historical perspective. *Immunology* 11, 157–163.

Owen, R. L., Apple, R. T., and Bhalla, D. K. (1986)

Morphometric and cytochemical analyses of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: Their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat. Rec.* 216, 521-527.

Owen, R. L. and Ermak, T. H. (1990)

Structural specification of antigen uptake and processing in the digestive tract. *Springer Semin. Immunopathol.* 12, 139–152.

Owen, R. L. and Jones, A. L. (1974)

Epithelial cell specialization with human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66, 189–203.

P., B. A. and Southern, E. M. (1978)

Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 118, 27–47.

Pappo, J. (1989a)

Generation and characterization of monoclonal antibodies recognizing follicle epithelial M cells in rabbit gut-associated lymphoid tissues. *Cell Immunol.* 120, 31-41.

Pappo, J. und Ermak, T. H. (1989b)

Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patches follicles epithelium. A quantitative model for M cell uptake. *Clin. Exp. Immunol.* 76, 144–148.

Pääbo, S., Gifford, J. A., and Wilson, A. C. (1988)

Mitochondrial DNA sequences from a 7000 year old brain. *Nucleic Acid Res.* 16, 9775–9787.

Pfeffer, E. (1987)

Lehrbuch der Veterinärphysiologie. 7. Auflage, 29–56.

Pines, J. (1995)

GFP in mammalian cells. *Trends Genet.* 11, 326–327.

Porta, C., James, P. S., Phillips, A. D., Savidge, T. C., Smith, M. W., and Cremaschi, D. (1992)

Confocal analysis of fluorescent bead uptake by mouse Peyer's patches follicle associated M cells. *Exp. Physiol.* 77, 929–932.

Price, p. A., Liu, T. Y., Stein, W. H., and Moore, S. (1969)

Properties of chromatographically purified bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 244, 917–923.

Quantin, B., Perricaudet, L. D., Tajbakhsh, S., and Mandel, J.-L. (1992)

Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2581–2584.

Rassool, F. V., Mceithan, T. W., Neilly, M. E., Espinosa III, R., and Le Beau, M. M. (1991)

Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: An approach to cloning fragile sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6657–6661.

Razzaque, M. A., Topps, J. H., Kay, R. N. B., and Brockway, J. M. (1981)

Metabolism of the nucleic acids of ruman bacteria by preruminant and ruminant lambs. *British J. Nutr.* 45, 517-527.

Rerat, A. A. (1980)

Some quantitative aspects of protein and carbohydrate absorption in the pig. *Proc. Nutr. Soc.* 39, 177–184.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Graucci, F., Kreambuhl, J.-P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001)

Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.* 2(4), 361–367.

- Rigby, P. W. J., Diekmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977)**
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237–251.
- Riggs, A. D. and Jones, P. A. (1983)**
5-methylcytosine, gene regulation and cancer. *Adv. Cancer Research* 40, 1–30.
- River, . (1993)**
Informationsblätter über Inzuchtmäuse.
- Robinson, P. J. and Rapport, S. I. (1987)**
Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various times after osmotic opening. *Am. J. Phys.* 253, 459–466.
- Rosenfeld, M. A., Yoshimura, K., trapnell, B. C., Yoneyma, K., Rosenthal, E. R., Dalemans, W., Fukayama, M., Bargon, J., and Stier, L. E. und Stratford-Perricaudet, I. (1992)**
In vivo transfer to the human cystic fibrosis transmembrane conductance regular gene to the airway epithelium. *Cell* 68, 143–155.
- Rosner, A. J. and Keren, D. F. (1984)**
Demonstration in the specialized follicle-associated epithelium overlying isolated lymphoid follicles in the gut. *J. Leukocyte Biol.* 35, 397–404.
- Roy, K., Mao, H. Q., Huang, S. K., and Leong, K. W. (1999)**
Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* 5, 387–391.
- Rozenberg-Arska, M., Salters, E. C., van Strijp, J. A., Hoekstra, W. P. M., and Verhoef, J. (1984)**
Degradation of Escherichia coli chromosomal and plasmid DNA in serum. *Journal of General Microbiology* 130, 217–222.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and ehrlich, H. (1988)**
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

Sansonetti, P. J. and Phapilon, A. (1999)

M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Immunology* 11, 193–203.

Savidge, T. C. and Smith, M. W. (1995)

Evidence that membranous (M) cell genesis is immunoregulated. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371, 239–241.

Schellander, K., Schmall, F., and Brem, G. (1995)

Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Animal Biotechnol.* 6, 41–50.

Schubbert, R., Hohlweg, U., Renz, D., and Doerfler, W. (1997)

On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: Chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 961–966.

Schubbert, R., Lettmann, C., and Doerfler, W. (1994)

Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genetics* 242, 495–504.

Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B., and Doerfler, W. (1998)

Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Mol. Gen. Genetics* 259, 569–576.

Schulz, M., Freisem-Rabien, U., Jessberger, R., and Doerfler, W. (1987)

Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. *J. Virol.* 61, 344–353.

Sharma, R., Schumacher, U., and Adam, E. (1998)

Lectin histochemistry reveals the appearance of M cells in Peyer's patches of scid mice after syngeneic normal bone marrow transplantation. *J. Hist. Cyt.* 46(2), 143–148.

Siebers, A. and Finlay, B. B. (1996)

M cell and the pathogens of mucosal and systemic infections. *Trends in Microbiology* 4, 22–29.

Sierro, F., Pringault, E., Simon Assman, P., Kraehenbuhl, J.-P., and Debard, N. (2000)

Transient expression of M cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* 119, 734–743.

Sikes, M. L., O'Malley Jr., B. W., Finegold, M. F., and Ledley, F. D. (1994)

In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Human Gene Therapy* 5, 837–844.

Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988)

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40.

Southern, E. M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.

Sperandio, S., Lulli, V., Bacci, M. L., Forni, M., Maione, B., Spadafora, C., and Lavotrano, M. (1996)

Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Animal Biotechnol.* 7, 59–77.

Stacey, K. J., Sweet, M. J., and Hume, D. A. (1996)

Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 2116–2122.

Sutter, D. and Doerfler, W. (1980)

Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 253–256.

Sutter, D., Westphal, M., and Doerfler, W. (1978)

Patterns of integration of viral DNA sequences in the genome of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* 14, 569–585.

Takeshita, H., Mogi, K., Nakajima, Y., Nakashima, Y., Mori, S. and Hoshino, T., and Kishi, K. (2000)

Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 481–484.

Tsukamoto, M., Ochiya, T., Yoshida, S., Sugimura, T., and Terada, M. (1995)

Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nature Genet.* 9, 243–248.

Tyrer, P., Ruth Foxwell, A., Kyd, J., Harvey, M., Sizer, P., and Cripps, A. (2002)

Validation and quantitation of an in vitro M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 299, 377–383.

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedmann, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., and Liu, M. A. (1993)

Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745–1749.

van der Eb, A. J., van Ormondt, H., Schrier, P. J., Lupker, J. H., Jochemsen, H., van der Elsen, P. J., Deley, R. J., Maat, J., van Beveren, C. P., Dijkema, R., and Ward, A. (1979)

Structure and function on the transforming genes of human adenovirus and SV 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 444, 383–399.

van der Lubben, I. M., Kersten, G., Beuvery, C., Verhoef, J. C., and Junginger, H. E. (2003)

Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: Oral and nasal efficacy studies in mice. *Vaccine* 21, 1400–1408.

van der Lubben, I. M., Konings, F. A. J., Borchard, G., Verhoef, J. C., and Junginger, H. E. (2001a)

In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: Visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunochemistry. *J. drug Target.* 9, 39–47.

van der Lubben, I. M., van Opdorp, F. A. C., Hengeveld, M. R., onderwater, J. J. M., Koerten, H. K., Verhoef, J. C., Borchard, G., and Junginger, H. E. (2002)

Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M cell model. *Journal of Drug Targeting* 10, 449–456.

van der Lubben, I. M., Verhoef, J. C., Van Aelst, A., Borchard, G., and Junginger, H. E. (2001b)

Chitosan particles for oral vaccination: Preparation and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22, 687–694.

van der Vliet, P. C. and Levin, A. J. (1973)

DNA-binding proteins specific for cells infected by adenovirus. *Nature new Biol.* 246, 170–173.

Vardimon, L., Neumann, R., Kuhlmann, I., Sutter, D., and Doerfler, W. (1980)

DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells. *Nucl. Acids Res.* 8, 2461–2473.

Volkheimer, G. (1993a)

Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente (Herbst-Effekt). *Gastroenterology* 2, 57–64.

Volkheimer, G. (1993b)

Persorption von Mikropartikeln. *Pathology* 14, 247–252.

Weinberg, R. A. (1980)

Integrated genomes of animal viruses. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 197–226.

Wells, D. J. and Goldspink, G. (1992)

Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *FEBS Lett.* 306, 203–205.

Wenneras, C., Neeser, J. R., and Svennerholm, A. M. (1995)

Binding of the fibrillar CS3 adhesin of enterotoxigenic Escherichia coli to rabbit intestinal glycoproteins is competitively prevented by Ga1NAc β 1-4Gal-containing glycoconjugates. *Infect. Immun.* 63, 640–646.

Whalen, R. G., Harris, J. B., Butler-Brown, G. S., and Sesodia, S. (1990)

Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev. Biol.* 141, 24–40.

Wolf, J. L., Kauffmann, R. S., Finberg, R., Drambauskas, R. Fields, B. N., and Trier, J. S. (1983)

Determinants of reovirus interaction with the intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine. *Gastroenterology* 85, 291–300.

Wolff, J. A. (1997)

Naked DNA transport and expression in mammalian cells. *Neuromuscular Disorders* 7, 314–318.

Wolff, J. A., Dowty, M. E., Jiao, S., Repetto, G., Berg, R. K., Ludtke, J. J., and Williams, P. (1992a)

Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T-tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 103, 1249–1259.

Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Ascadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992b)

Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1, 363–369.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990)

Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465–1468.

Wolff, J. A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A., and Chong, W. (1991)

Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 11, 474–485.

Wolff, J. A., Yee, J. K., Skelly, H. F., Moores, J. C., Respass, J. G., Friedmann, T., and Leffert, H. (1987)

Expression of retrovirally transduced genes in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 84, 3444–3448.

Yamanaka, T., Helgeland, L., Farstad, I. N., Fukushima, H., Midtvedt, T., and Brandtzaeg, P. (2003)

Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J. Immunol.* 170, 816–822.

Yasuda, T., Nadano, D., Awasu, S., and Kishi, K. (1992)

Human urine deoxyribonuclease-II: DNase II. isoenzymes: A novel immunaffinity purification, biochemical multiplicity, genetic heterogeneity and broad distribution among tissue body fluids. *Biochem. Biophys. Acta* 1119, 185–193.

Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. (1997)

Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335–340.

Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Yamaizumi, M., and Uchida, T. (1987)

Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp. Cell. Res.* 173, 586–595.

Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S., and Spadafora, C. (1995)

The mechanism of binding and exogenous DNA to sperm cells: Factors controlling the DNA uptake. *Exp. Cell Res.* 217, 57–64.

Zhang, g., Vargo, D., Budker, V., Armstrong, N., Knechtle, S., and Wolff, J. A. (1997)

Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Human Gene Therapy* 8, 1763–1772.

Zimmermann, S. B. and Sardeen, G. (1966)

The ribonuclease activity of crystallized pancreatic deoxyribinuclease. *Anal. Biochem.* 14, 269–277.

Zoraqi, G. and Spadafora, C. (1997)

Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA and Cell Biology* 16, 291–300.

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
d.h.	das heisst
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
et al	und andere
g	Gramm
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GFP	green fluorescent protein
gfp	Gen für der „green fluorescent protein“
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

M	Mol
m	milli
μ	mikro
ng	nanogramm
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit — einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen —, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie — abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen — noch nicht veröffentlicht worden ist sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Professor Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Teilpublikation (im Druck)

Palka-Santini, M., Schwarz-Herzke, B., Hösel, M., Renz, D., Auerochs, S., Brondtke, H. and Doerfler, W., 2003

The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins

Ich versichere, daß ich alle Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den 22. Juli 2003

Beryl Schwarz-Herzke

Danke

Mein Dank gilt in erster Linie und ganz besonderer Weise Professor Dr. Walter Doerfler für die interessante Aufgabenstellung und sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie für die Unterstützung und zahlreichen Anregungen, die maßgeblich zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Sabrina Auerochs, die immer sehr gute Arbeit für mich geleistet hat und immer für mich da war. Gerade in der Schlußphase dieser Arbeit hat sie dafür gesorgt, dass das Projekt weiterlief, wodurch sie mich sehr unterstützt hat.

Die Geduld und Mühe, die sich Andreas Kremer mit der Korrektur und Kommentieren dieser Arbeit gegeben hat weiß ich sehr zu schätzen. Er half mir meine Daten auch aus vielen anderen Blickwinkeln zu sehen.

Für die zahlreichen Diskussionen danke ich besonders Otilia Viera Breitwieser, sowie allen anderen Mitarbeitern der 4. Etage. Ein großer Dank gilt auch Hanna Mansi-Wothke für die Herstellung der Zellkulturmedien sowie den verlässlichen und immer freundlichen Damen in der Spülküche, Frau Bläser und Frau Schmidt ohne deren Reinigung von Geräten und Autoklavieren der Lösungen die Arbeit viel mühsamer gewesen wäre. Weiterhin möchte ich mich bei Marianna Hösel bedanken, die mir sehr mit der Reinigung der Proteine und den Western Blot-Analysen behilflich war. Holger Brondke danke ich für die Durchführung vieler PCR-Kontrollen. Dennis Webb gilt mein Dank, weil er immer für mich da war, wenn der Computer mal wieder nicht wollte. Den Mitarbeitern der Tierställe danke ich für die hervorragende Pflege der Tiere.

Meinem Tanzpartner Sascha Harden danke ich ganz besonders. Er hat mir mit den Computerprogrammen und der Formatierung der Arbeit zu jeder Zeit sehr geholfen und war sehr verständnisvoll.

Zum Schluß möchte ich mich bei meinem Mann und bei meiner Mutter für das Korrigieren der Rechtschreibung, das große Verständnis und die Unterstützung in jeder Situation bedanken.

Kurzzusammenfassung

Nach oraler Applikation des Plasmids pEGFP-C1 an Mäuse persistieren kleine Mengen dieser DNA in Form von Fragmenten im Gastrointestinaltrakt. Die fremde DNA kann mit Hilfe der PCR-Methode in Leber, Milz, Niere und Blut nachgewiesen werden.

FISH-Analysen weisen die fremde DNA in Zellen des Blinddarmepithels nach und zeigen so einen möglichen Eintrittsort für die fremde DNA in den Organismus.

Nach Komplexierung des Plasmids mit Protamin konnten im Gastrointestinaltrakt die gleichen Fragmentgrößen detektiert werden wie nach Fütterung unkomplexierter DNA. Eine Protektion der fremden mit der Nahrung aufgenommenen DNA durch Protamin gegen organismuseigene Nucleasen konnte durch die Detektion der geringeren applizierten Mengen nachgewiesen werden.

FISH-Analysen der Blinddarmwände zeigen eine Aufnahme der Plasmid DNA in die Zellen der Villi.

Eine Aufnahme der verfütterten DNA in die Darmbakterien wurde nicht nachgewiesen.

Das Protein Glutathion S Transferase konnte nach oraler Applikation an Mäuse im Magen- und Dünndarminhalt detektiert werden. Weitere Analysen der extrahierten Proteine aus Organen zeigten, dass das Protein in den Organismus aufgenommen wurde. Das GST Protein konnte in den Nieren nachgewiesen werden.

Nach Injektion des Plasmids pEGFP-C1 in die verschiedenen Darmabschnitte *in situ* wurde das Plasmid wie bei den *in vivo*-Versuchen nicht vollständig abgebaut. Die Versuche zeigen eine hohe Nukleaseaktivität in Jejunum, Ileum und Caecum. Verglichen mit den Versuchen *in vivo* wurde im Caecum keine so hohe Nukleaseaktivität festgestellt.

Eine starke Protektion des Plasmids wurde nach Injektion von gfp-Protamin-Komplexen in die verschiedenen Darmabschnitte festgestellt. Die starke Nukleaseaktivität im Caecum wurde bei diesen Experimenten bestätigt.

Abstract

The uptake and distribution of food-ingested foreign DNA have been investigated in model experiments with mice. The DNA of the cloned gene for the green fluorescent protein (GFP) from the jelly fish *Aequorea victoria* was used as a test gene. Fragments of the DNA could be traced from the intestinal contents, via the gut wall and the blood circulation to liver, spleen and kidney. FISH-analysis detected the orally applied DNA in the nuclei of crypt cells and enterocytes of the cecum wall.

Complexation of the DNA with protamine revealed the same fragment sizes compared to unprotected DNA. With these experiments a protection of the foreign DNA has been proved, especially smaller amount of DNA was detectable.

An uptake of the food ingested DNA into gut bacteria could not be detected with the used techniques.

Furthermore the uptake and distribution of food ingested proteins have been investigated. The glutathione S transferase have been chosen as test protein. Traces of this protein were detectable in the contents of stomach and small intestine as well as in kidneys. These results have shown the ability of proteins to enter the organism.

The influence of gut nucleases was ingested DNA was investigated *in situ* by injection of the plasmid into the different gut segments. A high nuclease activity was detectable in Jejunum, Ileum and Cecum. Similar results were obtained by injecting DNA-Protamine complexes in the same way. A high nuclease activity in the cecum could be detected.