

**Fremde DNA im Säugerorganismus:  
Schicksal von fremder DNA nach oraler und parenteraler  
Applikation in Mäusen sowie nach Injektion von  
Adenovirus Typ 12 in neugeborenen Hamstern**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Urte Hohlweg, geb. Gerhardt

aus Göttingen

2001

**Berichtersteller:**

Professor Dr. Walter Doerfler

Professor Dr. Bőrries Kemper

**Tag der mündlichen Prüfung:**

28. Februar 2001

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Überblick	1
1.2	DNA-Methylierung in eukaryontischen Zellen	2
1.3	Der Gastrointestinal-Trakt als Eintrittspforte für fremde DNA	3
1.3.1	Aufbau und Funktion des Verdauungstrakts	3
1.3.2	Aufnahme fremder DNA über das Darmepithel	5
1.3.3	M-Zellen als Zugang für Antigene und Mikroorganismen in den Organismus	8
1.4	Fremde DNA nach parenteraler Applikation	11
1.5	Das Adenovirussystem	13
1.5.1	Aufbau von Adenoviren	14
1.5.2	Umgang verschiedener Zellsysteme mit der viralen DNA	16
1.5.3	Integration viraler DNA in das Wirtsgenom	18
1.5.4	Transformation und Onkogenese	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit	20
1.6.1	Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach oraler Applikation	20
1.6.2	Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach parenteraler Applikation	21
1.6.3	Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster	21
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
2.1	Tiere	22
2.2	Pflanzen	22
2.3	Zelllinien, Viren, Bakterien und Plasmide	22
2.3.1	Zelllinien	22
2.3.2	Viren	22
2.3.3	Bakterien	22
2.3.4	Plasmide	23
2.4	Enzyme	23
2.4.1	Restriktionsendonukleasen	23
2.4.2	Sonstige Enzyme	23
2.4.3	Kits	24

---

2.5	Nukleinsäuren	24
2.5.1	Radioaktiv markierte Nukleotide	24
2.5.2	Sonstige Nukleinsäuren	24
2.6	Antikörper und Konjugate	25
2.7	Chemikalien	25
2.8	Puffer und Lösungen	27
2.9	Labor- und Verbrauchsmaterialien	31
2.10	Laborgeräte	33
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
3.1	Arbeiten mit Zellkultur	34
3.1.1	Passagieren von Zellen	34
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	34
3.1.3	Transfektion von DNA in Säugerzellen	35
3.1.4	Etablierung von Zelllinien aus Ad12-induzierten Hamstertumoren	35
3.2	Arbeiten mit Bakterien	36
3.2.1	Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien	36
3.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	36
3.2.3	Transformation kompetenter Bakterien	36
3.3	Virusvermehrung und Virusisolierung	37
3.3.1	Virusvermehrung in Einzelschichtkulturen	37
3.3.2	Virusisolierung	37
3.3.3	Bestimmung der Konzentration und Infektiösität des Virus	38
3.4	Extraktion und Reinigung von genomischer DNA	38
3.4.1	Präparation genomischer DNA aus Zellen	38
3.4.2	DNA-Extraktion aus Organen und Tumoren	39
3.4.3	DNA-Extraktion aus gereinigten Leukocyten	39
3.4.4	DNA-Extraktion aus Darminhalten und Kot	40
3.4.5	DNA-Extraktion aus Pflanzen	40
3.4.6	Ethanol-fällung	41
3.5	Präparation von Virus DNA	41
3.6	Präparation von Plasmid DNA	42

---

3.6.1	Schnellpräparation von Plasmid DNA durch Kochlyse	42
3.6.2	Präparation von Plasmid DNA über CsCl-Dichtegradienten	42
3.7	Präparation von RNA	43
3.7.1	Präparation von gesamtzellulärer RNA aus Zellen	43
3.7.2	Präparation von gesamtzellulärer RNA aus Organen	44
3.8	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	44
3.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
3.10	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.11	Southern Transfer-Hybridisierung	45
3.11.1	Transfer (Blotting)	46
3.11.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	46
3.11.3	Hybridisierung mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierten Sonden	47
3.12	Polymerase-Kettenreaktion	47
3.13	RT-PCR	48
3.14	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.15	Klonierung von DNA	49
3.15.1	Dephosphorylierung des Vektors	49
3.15.2	Ligasierung von DNA	50
3.15.3	T-Vektor Klonierungs-System	50
3.16	DNA-Sequenzierung	50
3.17	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	50
3.17.1	Herstellung von biotinylierten Hybridisierungsproben	50
3.17.2	Dot-Blot-Analyse der biotinylierten DNA	51
3.17.3	Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten	51
3.17.4	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten	52
3.17.5	Chromosomenpräparationen	53
3.17.6	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Metaphasechromosomen	54
3.18	Tierexperimenteller Teil	55
3.18.1	Tierhaltung	55
3.18.2	Fütterung von Mäusen mit Plasmid DNA	55
3.18.3	Fütterung von Mäusen mit Sojablättern	55
3.18.4	Injektion von Mäusen mit Plasmid DNA	55

3.18.5 Entnahme der Organe und der Darminhalte	56
3.18.6 Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster	56
3.18.7 Isolierung der Ad12-induzierten Tumoren	57
3.19 Züchtung von Sojapflanzen	57
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>58</b>
4.1 Schicksal von oral verabreichter DNA in Mäusen	58
4.1.1 Persistenz und Expression des pEGFP-C1 Plasmids in Mäusen	58
4.1.1.1 pEGFP-C1 Plasmid zeigt keine Homologie zur Maus-DNA und wird in Mauszellen exprimiert	58
4.1.1.2 Persistenz des pEGFP-C1 Plasmids im GI-Trakt der Maus	61
4.1.1.3 Aufnahme von oral verabreichter gfp DNA in Körperzellen	66
4.1.1.4 Expressionstudien der oral aufgenommenen DNA	70
4.1.1.5 Langzeitfütterungsexperiment	72
4.1.2 Persistenz von mit natürlicher Nahrung aufgenommener DNA im Mausorganismus	74
4.1.2.1 Nukleäres Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase Gen zeigt keine Homologie zur Maus-DNA.	74
4.1.2.2 Passage des Rubisco Gens durch den GI-Trakt der Maus	76
4.1.2.3 "Pulse-Chase"-Experiment: Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus.	78
4.1.2.4 Aufnahme der Pflanzen-DNA in innere Organe	79
4.2 Schicksal von parenteral applizierter DNA in Mäusen	82
4.2.1 Persistenz und Verteilung von fremder DNA nach intramuskulärer Injektion.	82
4.2.2 Ausscheidung der injizierten DNA über den Leber-Gallen-Darmweg	86
4.2.3 Expression der injizierten DNA	88
4.2.3.1 Detektion von grün-fluoreszierenden Muskelfasern	88
4.2.3.2 RT-PCR-Analysen zum Nachweis der Transkription der injizierten DNA.	90
4.3 Injektion von Adenovirus Typ 12 in neugeborene Hamster	93
4.3.1 Einfluß der Menge von Ad12-Virionen auf die Tumorinduktion.	93
4.3.2 Einfluß der Menge der injizierten Ad12-Virionen auf die Anzahl der in das Hamstergenom integrierten Ad12 Genome	95
4.3.3 Injektionen von Ad12-Virionen in unterschiedliche Gewebe	99

---

4.3.4	Integrationsmuster der Ad12 DNA in intramuskulär induzierten Ad12-Tumoren. . . . .	101
4.3.5	Chromosomale Lokalisation der integrierten Ad12 DNA . . . . .	105
4.3.6	Klassifikation der Adenovirus Typ 12 induzierten Tumoren . . . . .	106
<b>5</b>	<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>110</b>
5.1	Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach oraler Applikation . . . . .	110
5.1.1	Expression der verfütterten DNA. . . . .	115
5.1.2	DNA-Transfer über die Keimbahn . . . . .	115
5.1.3	Schicksal von mit der natürlichen Nahrung aufgenommener DNA im Mausorganismus . . . . .	117
5.2	Parenterale Applikation von fremder DNA . . . . .	119
5.3	Induktion von Tumoren durch Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster . . . . .	123
5.3.1	Tumorinduktion durch s.c. Injektion von Ad12-Virionen . . . . .	124
5.3.2	Tumorbildung in unterschiedlichen Geweben . . . . .	125
5.3.3	Klassifikation der durch Ad12-Virionen induzierten Tumoren . . . . .	127
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung . . . . .</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>Literatur . . . . .</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen . . . . .</b>	<b>162</b>
<b>9</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>165</b>
9.1	Berechnung der Zellzahl eines Sojablattes . . . . .	165
9.2	Sequenzen der verwendeten synthetischen Oligonukleotide . . . . .	166
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis . . . . .</b>	<b>167</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis . . . . .</b>	<b>169</b>
<b>12</b>	<b>Kurzzusammenfassung . . . . .</b>	<b>172</b>
<b>13</b>	<b>Abstract . . . . .</b>	<b>173</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

Seit Millionen von Jahren ist die Umwelt aller Lebewesen großen Mengen fremder DNA ausgesetzt. Fremde DNA wird ständig an die Umwelt abgegeben, Pollen im Frühjahr, Laub und Früchte im Herbst, um nur einige zu nennen. Was mit dieser DNA geschieht, ist bisher ungewiß. Bekannt ist hingegen, daß die DNA ein sehr stabiles Molekül ist, das selbst über 5.000 Jahre, weit über den Tod des Organismus hinaus, zumindest in fragmentierter Form persistieren kann, wie archäologische Funde biologischer Herkunft, z.B. des Tyroler Eis-Mannes "Ötzi", gezeigt haben (Handt et al., 1994).

Nicht nur alle Säuger nehmen täglich große Mengen fremder DNA mit der Nahrung in ihren Gastrointestinal-Trakt auf und werden mit viralen und Genomen anderer Mikroorganismen infiziert. Die tägliche Konfrontation mit fremder DNA gehört daher zum natürlichen Umfeld des Menschen und seiner Vorfahren. Die Frage, wie sich fremde DNA in Zellen höherer Eukaryonten verhält, ist von grundlegender biologischer Bedeutung und spielt eine zentrale Rolle bei der Tumorinduktion durch Viren, bei der Erzeugung von transgenen Organismen, in der somatischen Gentherapie und bei der DNA-Vakzinierung. Unter natürlichen Bedingungen hat fremde DNA Zugang zu Säugerzellen, von denen sie aufgenommen und in den Kern transportiert werden kann. Im Kern kann die fremde DNA dann entweder in episomaler Form persistieren oder in das Wirtsgenom integriert werden. Es ist nur schwer vorhersehbar, welchen dieser beiden Wege die fremde DNA gehen wird. Die Persistenz von fremder DNA ist besonders gut bei viralen Genomen erforscht. Verschiedene Papillomviren und das Epstein-Barr-Virus persistieren im Nukleus weitestgehend in episomaler Form als zirkuläre Superhelices. Im Gegensatz dazu ist für die retrovirale DNA die Integration ein Teil des Replikationszyklus und eine Voraussetzung für die Transkription (Übersicht in Modrow und Falke, 1997). Die Integration von fremder 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 Tumorsuppressor Genen führen. Als weitere Folgen der Insertion fremder DNA in ein etabliertes Säuger genom spielen die *de novo* Methylierung der integrierten fremden DNA und Veränderungen in den Methylierungs- und Expressionsmuster zellulärer Gene eine wichtige Rolle. Die *de novo* Methylierung der integrierten fremden DNA in spezifischen Mustern, die in vielen eukaryontischen Systemen, auch in Pflanzen vorkommt, wird als alter zellulärer Abwehrmechanismus

gegen die Integration und Aktivität fremder DNA interpretiert (Übersichten in Doerfler, 1991, 2000).

## 1.2 DNA-Methylierung in eukaryontischen Zellen

Bereits vor über 50 Jahren wurde in der DNA höherer Eukaryonten neben den vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin eine 5. modifizierte Base "5-Methylcytosin" identifiziert (Hotchkiss, 1948). Das häufig im 5'-CpG-3'-Dinukleotid vorliegende Deoxycytosin wird von zelleigenen Methyltransferasen symmetrisch methyliert (Doerfler, 1981; Riggs und Jones, 1983). Allerdings ist nicht jedes der in dieser Dinukleotid-Kombination vorliegende Cytosin der DNA methyliert, vielmehr findet die Methylierung nach einem bestimmten, bis heute noch nicht erklärbaren Muster statt. Im Säugergenom sind zwischen 2 - 7% aller vorkommender 5'-CpG-3'-Dinukleotide methyliert, bei Pflanzen liegt dieser Anteil bei bis zu 30%. Die Verteilung von 5-Methylcytosinen im menschlichen wie in anderen Genomen ist spezifisch unterschiedlich in verschiedenen Zellsystem. Im Gegensatz dazu können die Methylierungsmuster in der DNA der gleichen Zellart beim Vergleich verschiedener Individuen auf das Nukleotid identisch sein (Kochanek et al., 1990; Behn-Krappa et al., 1991). Diese Übereinstimmung im Methylierungsmuster bei Individuen, selbst unterschiedlicher ethnischer Abstammung, ist ein Hinweis auf die funktionelle Bedeutung der Methylierung.

Man unterscheidet zwei Formen der Methylierung, die *de novo* Methylierung und die "maintenance" Methylierung, die beide höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Methyltransferasen katalysiert werden (Übersichten in Doerfler, 1981, 1983, 1993). Die "maintenance" Methylierung ist für die Vererbung bestehender Methylierungsmuster verantwortlich. Bei der *de novo* Methylierung wird unmethylierte DNA sequenzspezifisch methyliert, wodurch es zur Ausbildung neuer DNA-Methylierungsmuster kommt. Die *de novo* Methylierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Steuerung der transkriptionellen Aktivität (Doerfler, 1983). Häufig führt die Methylierung eines Promotors zur Inaktivierung des betreffenden Gens, wie beispielsweise bei der gewebespezifischen Expression von Globin Genen beobachtet wurde (McGhee et al., 1979; Murray und Grosveet, 1987). Auch fremde DNA wird nach Integration in das Wirtsgenom durch zelluläre Methyltransferasen methyliert. Eine solche *de novo* Methylierung wurde eingehend bei integrierter Virus DNA und bei Transgenen untersucht (Sutter und Doerfler, 1980; Vardimon et al., 1980; Kruczek und Doerfler, 1982; Lettmann et al., 1991; 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 Hamsterzellen in das Wirtsgenom integriert, so wird die virale DNA in spezifischen Mustern *de novo* methyliert und dadurch inaktiviert (Orend et al., 1995). Es besteht also eine inverse Korrelation zwischen der Methylierung eines Gens bzw. seines Promotors und seiner transkriptionellen Aktivität (Übersicht in Doerfler, 1983). Demnach können sich Zellen durch die *de novo* Methylierung vor der Expression von integrierten fremden Genen schützen. Der Mechanismus, der zur Inaktivierung von methylierten Genen bzw. deren Promotoren führt, ist noch nicht vollständig verstanden. Die Beobachtung, daß die Methylierung von DNA mit einer Deacetylierung von Histonen einhergeht, gibt Anlaß zu der Annahme, daß die Methylierung möglicherweise zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führt (Eden et al., 1998).

Wenn die Methylierung fremder DNA ein zellulärer Verteidigungsmechanismus gegen die Aktivität fremder Gene ist, dann stellt sich die Frage, auf welchem Weg die fremde DNA in das Säugergenom gelangen kann. Bei Säugetieren ist der Gastrointestinal-Trakt die Haupteintrittspforte für große Mengen fremder DNA, die mit der täglichen Nahrung aufgenommen werden.

## **1.3 Der Gastrointestinal-Trakt als Eintrittspforte für fremde DNA**

### **1.3.1 Aufbau und Funktion des Verdauungstrakts**

Der Gastrointestinal (GI)-Trakt untergliedert sich bei nicht wiederkäuenden Säugetieren in den Magen, in dem die aufgenommene Nahrung mit dem Magensaft gemischt, homogenisiert und damit in den Speisebrei (Chymus) umgewandelt wird, und in den Darm. Der Darm wird unterteilt in den Dünndarm (kleines Intestinum) und den Dickdarm (großes Intestinum). Beim Dünndarm sind weiter zu differenzieren die Abschnitte Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Krummdarm (Ileum). Als Abschnitte des Dickdarms sind Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Kolon) und Enddarm (Rektum) zu unterscheiden (Übersicht in Pfeffer, 1987).

Der Dünndarm ist derjenige Abschnitt des Verdauungstrakts, in dem der größte Teil der durch tiereigene Verdauungsenzyme bewirkten hydrolytischen Spaltungen stattfindet. Zur Ermöglichung der Verdauung im Darm werden dreierlei Sekrete in das Darmlumen 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 Verdauungsprodukte können

absorbiert und damit dem Stoffwechsel des Tieres zugefügt werden.

Die Absorption wichtiger Stoffgruppen erfolgt über verschiedene Mechanismen. Glukose und Galaktose, die Hauptbauprodukte der Kohlenhydrate, werden über einen Natrium-abhängigen aktiven Glukose-Transport in das Darmepithel aufgenommen. Auch die bei der Hydrolyse von Proteinen entstehenden Aminosäuren werden aktiv in die Mucosazellen transportiert (Armstrong, 1976; Rerat, 1980). In die Mucosazellen transportierte Peptide werden dort hydrolysiert, so daß nur freie Aminosäuren, für den Körper nicht als "fremd" erkennbar, mit dem Pfortaderblut zur Leber gelangen. Die Tryglyzeride der Nahrung werden im Magen-Darm-Trakt zu freien Fettsäuren und 2-Monoglyzeriden gespalten. Eingebettet in Mizellen erreichen sie den Bürstensaum des Dünndarms, wo sie durch einen passiven Prozeß in die Epithelzellen aufgenommen werden (Harrison und Leat, 1975). Über die Absorption von mit der Nahrung aufgenommenen Nukleinsäuren ist hingegen nur wenig bekannt. Zur Zeit wird eine Aufnahme der DNA über sog. M-Zellen im Darmepithel diskutiert (Kapitel 1.3.3).

Bei Carnivoren und Omnivoren werden die organischen Endprodukte der Verdauung fast ausschließlich im Dünndarm absorbiert. Die absorbierende Schleimhaut des Dünndarms ist so konstruiert, daß eine starke Vergrößerung der Oberfläche erzielt wird. Durch Ausbildung von Kerckringschen Falten, Zotten und Mikrovilli wird die lumenbegrenzende Oberfläche des Darms um den Faktor 600 vergrößert. Die Zottenspitzen werden laufend abgestoßen, während neue Zellen aus den Krypten nachwachsen. Dadurch wird das gesamte Dünndarmepithel innerhalb von etwa 2 Tagen ersetzt. Die abgestoßenen Epithelzellen zerfallen im Darmlumen und setzen dort Verdauungsenzyme frei.

Die Schleimhaut des Dickdarms ist zottenlos, vollbringt aber dennoch beachtliche Absorptionsleistungen. Insbesondere monogastrische Herbivoren verfügen über eine ausgeprägte Dickdarmverdauung (Mason, 1984; Just, 1983). Im Dickdarm werden vor allem Cellulose und Hemicellulose, die Bestandteile der Zellwände und der Interzellulärsubstanz der Pflanzen, verdaut. Da der Mensch sowie höhere Tiere über keine Enzyme zur Spaltung dieser Polysaccharide verfügen, gelangen die aufgenommenen Pflanzenteile unangegriffen bis in den unteren Teil des Darms, wo sie dann vor allem im Blinddarm von Bakterien aufgespalten und zu niedrigen Fettsäuren, Milchsäure und Gasen ( $H_2$ ,  $CO_2$ , Methan) metabolisiert werden (Giesecke und Hendrichx, 1973). Dieser Prozeß wird auch als Gärung bezeichnet. Ein Teil dieser Spaltprodukte wird dann je nach Größe des Blinddarms resorbiert. Pflanzenfresser, die über einen gut ausgebildeten Blinddarm verfügen, können somit pflanzliche Substanzen wesentlich besser verwerten als andere Tiere und der Mensch. Das Huhn nutzt die

Syntheseleistungen der Mikroorganismen des eigenen Dickdarms in besonderer Weise, indem es die eigenen Exkremente aufpickt. Diesem als Koprophagie bezeichneten Vorgang wird vor allem unter dem Aspekt der Versorgung mit wasserlöslichen Vitaminen eine Bedeutung beigemessen. Dabei werden die Vitamine teils im Dickdarm, teils aber auch außerhalb des Körpers nach der Darmentleerung durch Mikroorganismen gebildet (Fuller, 1984). Verdauungsleistungen besonderer Art werden im Dickdarm von Kaninchen erbracht. Aufgrund der morphologischen Struktur des Colons kommt es zu einer Phasentrennung. Im Gegensatz zu allen anderen Tieren ist beim Kaninchen die Passage der flüssigen Phase, in der kleine Partikel enthalten sind, verzögert gegenüber groben Partikeln (Übersicht in Hörnicke, 1984).

Bei allen Tieren findet auf der gesamten Länge des Dickdarms eine umfangreiche Absorption von Wasser und von einwertigen Elektrolyten statt, während der endgültige Kot geformt wird (Kay und Pfeffer, 1969). Für die Passage durch den Dickdarm brauchen kotpflichtige Partikel mindestens die dreifache Zeit gegenüber der Passage durch den Dünndarm. Insgesamt ergeben sich mit der unterschiedlichen Beschaffenheit der Nahrung entsprechend typische Unterschiede in der Ausbildung einzelner Abschnitte des Verdauungstrakts. So befindet sich im Verdauungstrakt von Herbivoren ein gesonderter Bereich, in dem für Bakterien besonders günstige Lebensbedingungen herrschen. Eine derartige "Gärkammer" kann dem Ort der Verdauung durch eigene Enzyme vorgeschaltet sein, wie der Vormagen des Wiederkäuers, oder nachgeschaltet, wie der stark ausgebildete Enddarm des Pferdes (Meyer, 1982; Übersicht in Pfeffer, 1987).

### **1.3.2 Aufnahme fremder DNA über das Darmepithel**

Bei dem normalen Verdauungsvorgang werden nicht nur gelöste Stoffe resorbiert. Am 31. Dezember 1843 flößte der Göttinger Kliniker G. Herbst einem Hund Stärke ein und fand 3 h später unveränderte Stärkekörner im Chylus und im Blut wieder (Herbst, 1844). Mit diesem Versuch war zum erstenmal der Übertritt von festen, ungelösten Partikeln aus dem Darmlumen in den Organismus beobachtet worden (Herbst-Effekt). Andere Autoren bestätigten einige Jahre später die Herbstsche Beobachtung und entschuldigten sich gleichzeitig, daß sie sich mit einer derart unmöglich erscheinenden Versuchsanordnung befaßten (Oesterlen, 1846; Eberhardt, 1851). Ein halbes Jahrhundert blieben diese Ergebnisse vergessen, bis 1905 die Berlinerin Hirsch diese Untersuchungen wieder aufgriff. Sie konnte ebenfalls beim Hund und erstmals auch beim Menschen nach oraler Verabreichung von Stärkemehl unveränderte Stärkekörner im peripheren Blut nachweisen (Hirsch, 1906). Darüber hinaus beobachtete sie die

Ausscheidung von oral verabreichten Stärkekörnern in den Harn (Hirsch, 1908). In neueren Studien wurden die verfütterten, polarisationsoptisch leicht identifizierbaren Stärkekörner zwischen den Enterocyten des Darmepithels, in Lymphgefäßen der Mucosa, der Submucosa und des Mesenteriums sowie in Venen beobachtet (Volkheimer, 1964). Auch andere verfütterte Mikropartikel wie Pollen, Sporen, Diatomeen, gefärbte Zellulosepartikel, 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).

Hinsichtlich der mit der Nahrung aufgenommenen Nukleinsäuren ging man hingegen lange Zeit davon aus, daß sie im GI-Trakt von Säugern vollständig abgebaut würden. So beschrieben McAllan und Kollegen in den siebziger Jahren eine vollständige Degradierung der oral verabreichten DNA im Pansen von Stieren (McAllan, 1982). Auch nach Inkubation von DNA oder gemahlenem Heu mit Extrakten aus den Pansen von Kühen, Schafen oder Stieren *in vitro* wurde ein schneller Abbau der DNA beobachtet. Die Abbauprodukte wurden säulenchromatographisch getrennt und die verschiedenen Eluate photometrisch quantifiziert. Nach 4 h wurden sowohl in den *in vivo* als auch *in vitro* Experimenten nur noch ultrafiltrierbare Oligo- und Mononukleotide sowie deren Abbauprodukte nachgewiesen (McAllan und Smith, 1973a, 1973b). Mit derselben Methode ließen sich Oligonukleotide und Nukleoside im oberen Abschnitt des Dünndarms von Stieren, aber nicht mehr im terminalen Ileum nachweisen (McAllan, 1980). Der Autor ging davon aus, daß die im Darm abgebauten Nukleinsäuren entweder als freie Nukleotide absorbiert oder weiter katabolisiert würden. Es schien wahrscheinlich, daß die Nukleotide durch entsprechende Phosphatasen im Darm dephosphoryliert und als Nukleoside über das Darmepithel transportiert würden (Centar und Behal, 1966; McAllan, 1980).

Ellis und Bleichner waren die ersten, die annahmen, daß die vom Darm absorbierten Purine zur Nukleinsäuresynthese in den Geweben dienen (Ellis und Bleichner, 1969). Nach Fütterung von Schafen mit  $^{14}\text{C}$  markierter DNA wurden nach 48 h fast 50% der absorbierten markierten Kohlenstoffatome in Geweben, hauptsächlich in Leber, Milz, Blut, Thymus und Pankreas, wiedergefunden. Über 40% der absorbierten Kohlenstoffatome wurden über den Urin als Harnsäure, Allantoin und Harnstoff ausgeschieden. Der Rest der absorbierten Radioaktivität wurde in anderen Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise dem ausgeatmeten Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), nachgewiesen (Razzaque et al., 1981). Die Vermutung, daß Purine aus der Nahrung über den "salvage pathway" als Vorstufen in der Nukleinsäuresynthese verwertet

werden, wurde unterstützt durch die Beobachtung, daß Glycin kaum in Nukleinsäuren der Gewebe inkorporiert wurde (Codon et al., 1970).

Anfang der neunziger Jahre wurde dann die Frage nach dem Schicksal von fremder DNA im GI-Trakt von Säugern wieder aufgegriffen und mit sensitiveren Nachweismethoden wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Als Modell-DNA wurde die DNA des Bakteriophagen M13mp18 an Mäuse verfüttert, die keine Homologie zu Maus-DNA hatte und somit eindeutig als "fremd" im Maus Organismus erkannt werden konnte. PCR-Analysen ergaben, daß Fragmente der M13mp18 DNA bis zu 8 h im Dünndarm und bis zu 18 h im Blinddarm verweilen und als maximal 1692 bp große Fragmente mit dem Kot ausgeschieden werden (Schubbert et al., 1994). Im peripheren Blut der mit M13mp18 DNA gefütterten Mäuse wurden mittels Dot-Blot-Hybridisierungen zwischen 0,01 - 0,1% der Test-DNA nachgewiesen. In Kontrollmäusen, die mit Pufferlösung ohne DNA gefüttert worden waren, wurde die Test-DNA nicht gefunden (Schubbert et al., 1994, 1997). FISH-Analysen zeigten die M13mp18 DNA in Zellkernen des Darmepithels und von Leukocyten in den Peyerschen Plaques bis maximal 8 h, in Milz- und Leberzellen bis 18 h nach der DNA-Verfütterung. Diese Beobachtungen wurden so interpretiert, daß die Test-DNA über das Darmepithel und die Peyerschen Plaques in Leukocyten und auf diesem Weg in verschiedene Organe gelangen kann. In der Milz konnten Fragmente der M13mp18 DNA in kovalenter Bindung an DNA gefunden werden, die ein hohes Maß an Homologie zu Mausgenen aufweist. Wahrscheinlich handelt es sich bei den identifizierten DNA Abschnitten um Pseudogene der Maus (Schubbert et al., 1997). Wurden trächtige Mäuse mit der M13mp18 DNA gefüttert, so wurde die Test-DNA mit Hilfe der PCR und der FISH-Methode in verschiedenen Organen der Foeten oder der neugeborenen Mäuse nachgewiesen. In einigen Foeten konnte die Test-DNA in Assoziation mit Chromosomen und in seltenen Fällen mit beiden Chromatiden eines Chromosoms gefunden werden (Schubbert et al., 1998). Die fremde DNA wurde nicht in allen Zellen eines Foeten oder einer neugeborenen Maus gefunden, sondern immer nur in einigen wenigen weit verstreut liegenden Zellgruppen. Diese Verteilungsmuster der fremden DNA in den Foeten wurden als Hinweis auf einen diaplazentaren Übertragungsmechanismus der fremden DNA und gegen einen Transfer über die Keimbahn gedeutet.

Die Verfütterung von in Mikropartikeln verpackter DNA kann im Vergleich zur nackten DNA zu einer verlängerten Darm-Passagezeit und einer Zunahme der DNA-Aufnahme über das Darmepithel führen (Chickering et al., 1995). In polymere Mikrosphären eingeschlossene DNA überwindet dabei das Darmepithel sowohl auf dem parazellulären

als auch auf dem transzellulären Weg und wird dann von dem Lymphgewebe, das mit den Peyerschen Plaques assoziiert ist, aufgenommen (Hillary et al., 1994; Ermak et al., 1995). In Leber- und Darmzellen konnte die Expression von in Mikrosphären verpackter und an Ratten verfütterter pCMVLacZ DNA nachgewiesen werden (Mathiowitz et al., 1997). Wurden Rotavirus VP6 bzw. VP4/VP7 DNA-Vakzine in poly(Lactid-co-Glycolid) (PLG) Mikropartikel verpackt und oral an Mäuse verabreicht, so wurde sowohl eine systemische als auch eine Immunantwort der Mucosa induziert. Die dabei im Blut und im Kot nachweisbaren spezifischen IgA Antikörper bewirkten einen effektiven Schutz vor Infektionen mit Rotaviren (Chen et al., 1998; Hermann et al., 1999). Zusätzlich zu der Induktion einer Immunität können oral verabreichte DNA-Vakzine in Zukunft möglicherweise eine Rolle bei der Behandlung von allergischen Erkrankungen spielen. Die Verfütterung von an Chitosan komplexierte DNA, die das Erdnussallergen Arah2 codierte, führte zu einer Abnahme von IgE Antikörpern und schützte Mäuse vor einem anaphylaktischen Schock (Roy et al., 1999). Bei der Aufnahme von in Mikropartikeln verpackter DNA und der anschließenden Induktion einer Immunantwort wird die Rolle von M-Zellen diskutiert, die direkt mit dem lymphatischen System des Darms assoziiert sind. Auch nackte verfütterte DNA wurde in Peyerschen Plaques gefunden (Schubbert et al., 1997), als möglicher Hinweis auf die Aufnahme der DNA über M-Zellen.

### **1.3.3 M-Zellen als Zugang für Antigene und Mikroorganismen in den Organismus**

Der Darm steht unter permanenter Überwachung durch das Immunsystem, um das Eindringen von Pathogenen in den Organismus zu verhindern. Diese Schutzfunktion ist von großer Bedeutung, da der Darm mit seiner riesigen Oberfläche ständig Kontakt zu Mikroorganismen sowie anderen Antigenen, wie Nahrungsstoffen und Toxinen, hat. Das immunkompetente Lymphgewebe der Mucosa im Darm, das auch als GALT ("gut associated lymphoid tissue") bezeichnet wird, ist das größte lymphatische Organ des Organismus und wird neben den Lymphocyten und Makrophagen aus den Peyerschen Plaques sowie einzelnen Lymphfollikeln gebildet (Bienenstock et al., 1978). Peyersche Plaques sind nach seinem Entdecker Johann Konrad Peyer benannt, der schon vor über 300 Jahren die Ansammlung von Lymphfollikeln im Darm beobachtete. 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 (Übersicht in Kraehenbuhl und Neutra, 1992).

Antigene im Darmlumen sind vom GALT durch eine dünnschichtige epitheliale Barriere

getrennt. Um eine Immunantwort auszulösen, müssen die Antigene durch das Epithel transportiert werden, bevor sie prozessiert und den Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Dieser Antigentransport wird von spezialisierten Zellen, den sog. M-Zellen vollzogen, die ausschließlich im Epithel über dem Mucosa assoziiertem Lymphgewebe (FAE: "follicle associated epithelium") lokalisiert sind (Owen, 1977; Rosner und Keren, 1984; Lowden und Heath, 1995). M-Zellen wurden erstmals im Appendix von Kaninchen (Bockman 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. M-Zellen unterscheiden sich morphologisch von benachbarten Enterocyten durch eine unregelmäßig geformte apikale Oberflächenstruktur mit sehr kurzen Mikrovilli. Die basolaterale Membran ist eingestülpt und bildet eine taschenartige Struktur, in die Lymphocyten und Makrophagen einwandern können (Neutra und Kraehenbühl, 1996). Der cytoplasmatische Bereich zwischen apikaler Membran und der taschenartigen Einstülpung ist meistens nur sehr dünn und im Lichtmikroskop nicht erkennbar, was später zu der Bezeichnung membranöse- anstatt "microfold"-Zelle führte (Owen, 1977). Die M-Zellen sind keine mesenchymalen Zellen, wie zunächst aufgrund ihrer phagozytierenden Eigenschaften angenommen wurde, sondern epitheliale Zellen, die zu benachbarten Enterocyten Tight Junctions und Desmosomen ausbilden und zahlreiche Cytokeratine sowie Villin exprimieren (Madara et al., 1984; Gebert und Bartels, 1991). Sie werden genauso wie alle anderen Darmepithelzellen aus Stammzellen in den Krypten gebildet, wobei kontrovers diskutiert wird, wann in der Entwicklung der FAE-Zellen die Differenzierung zu M-Zellen bzw. Enterocyten einsetzt. Entweder differenzieren Zellen in den Krypten direkt zu M-Zellen, oder Enterocyten differenzieren nach Stimulierung mit spezifischen Faktoren oder Zellen des lymphatischen Systems zu M-Zellen. Letzteres wird unterstützt durch die Beobachtungen, daß Zellen mit typischen Charakteristika beider Zelltypen, Enterocyten und M-Zellen, im FAE vorkommen (Bye et al., 1984; Kerneis et al., 1996) und daß die Anzahl der M-Zellen nach Antigen-Kontakt zunimmt (Borghesi et al., 1996). Die Anzahl der M-Zellen im FAE variiert stark abhängig von der Spezies und von dem Darmabschnitt. Im Menschen und in der Maus sind weniger als 10% der Zellen des FAE des Ileums M-Zellen (Owen und Ermak, 1990; Clark et al., 1994).

Die zentralen Aufgaben der M-Zellen sind die endocytotische Aufnahme, der transcytotische Transport und die exocytotische Freilassung der luminalen Substanzen in den interzellulären Raum. Nach Applikation von löslichen Indikatoren, wie beispielsweise der Meerrettich Peroxidase oder Ferritin in das Darmlumen, werden diese Partikel durch Pinocytose von den M-Zellen aufgenommen und in die

taschenartige Einstülpung transportiert, wo sie direkt von Lymphocyten aufgenommen werden (Owen, 1977; Liebler et al., 1995). Größere Partikel und Bakterien werden durch Phagozytose von den M-Zellen aufgenommen und nach Freilassung von Makrophagen phagozytiert, die dann in die Lymphfollikel der Peyerschen Plaques wandern und dort die Antigene den Lymphocyten präsentieren (Übersicht in Gebert et al., 1996).

Im Gegensatz zu Enterocyten haben M-Zellen nur sehr wenige Lysosomen, wie durch den histochemischen Nachweis der sauren Phosphatase gezeigt wurde (Owen et al., 1986). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die von M-Zellen aufgenommenen Antigene und Mikroorganismen nicht in Phagolysosomen zerstört werden, sondern mehr oder weniger intakt durch die Zelle in den interzellulären Raum transportiert werden. Durch die wenigen Lysosomen kann dennoch ein Teil des aufgenommenen Materials abgebaut und mit Hilfe von MHC II-Molekülen an der basolateralen Membran Lymphocyten präsentiert werden (Allan et al., 1993). Inwieweit dieser Mechanismus an der Stimulation des Immunsystems beteiligt ist, ist bisher unbekannt.

Verschiedene lösliche und partikuläre Tracer und auch zahlreiche Bakterien und Viren binden vorzugsweise an M-Zellen und nicht an Enterocyten des FAEs *in vivo* und *in vitro* (Übersicht in Siebers und Finlay, 1996). An dieser Bindung scheinen sowohl unspezifische als auch spezifische Mechanismen beteiligt zu sein. Da in M-Zellen sowohl die Schleimschicht als auch die Glykokalyx im Vergleich zu benachbarten Enterocyten deutlich reduziert ist, wird der Kontakt von luminalen Partikeln zu M-Zellen vereinfacht (Kato und Owen, 1999). Auch wenn für Mikroorganismen die spezifische Bindung an M-Zellen wahrscheinlich ist, so konnte dennoch gezeigt werden, daß auch inerte Partikel, wie Kohle- und Latexpartikel, vorzugsweise an M-Zellen binden und von diesen aufgenommen werden (Pappo und Ermak, 1989; Jepson et al., 1993; Jepson et al., 1996). Die Aufnahme von *Yersinia*, dem Erreger von diarrhöischen Erkrankungen, in M-Zellen wurde in zahlreichen Studien untersucht (Grutzkau et al., 1990; Fujimura et al., 1992; Autenrith und Firsching, 1996; Lelouard et al., 1999; Sansonetti und Phalipon, 1999). Verschiedene invasive *Yersinia* Typen binden mit einem Protein der äußeren Bakterienmembran (Invasin) an membranständige Integrine der  $\beta$ 1-Familie auf M-Zellen (Clark et al., 1998). Einige Reovirus Typen vermögen über das virale Hämagglutinin ( $\sigma_1$  Protein) an M-Zellen der Maus *in vivo* zu binden (Wolf et al., 1983). In den meisten Fällen ist jedoch die Antigen-M-Zell Interaktion unbekannt. Wahrscheinlich spielen bei diesen Interaktionen die Glykosylierungsmuster auf der Oberfläche von M-Zellen eine wichtige Rolle, die sowohl von Spezies zu Spezies als auch in unterschiedlichen Darmabschnitten variieren (Lelouard et al., 1999). Als mögliche an der Bindung beteiligten Mechanismen werden neben den Lektin-Zucker Interaktionen, IgA-

---

vermittelte Bindungen und M-Zell-spezifische Rezeptoren diskutiert (Kato, 1990; Porta et al., 1992; Wenneras et al., 1995).

## 1.4 Fremde DNA nach parenteraler Applikation

Fremde DNA kann durch einen direkten Transfer der DNA in Zellen *in vivo* oder indirekt durch Re-Implantation von genetisch-modifizierten Zellen postnatal in somatische Gewebe eingebracht werden. Die Transplantation von beispielsweise retroviral infizierten Hepatocyten ist aufwendig und teuer (Wolff et al., 1987; Chowdhury et al., 1991; Crossman et al., 1994). Der direkte Gen-Transfer ist hingegen einfach durchführbar und klinisch wenig riskant. Er kann entweder durch virale Vektoren oder durch nackte bzw. verpackte Plasmide erfolgen (Übersicht in Gurunathan et al., 2000). Als virale Vektoren werden hauptsächlich Vektoren von Retroviren, Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren und Herpesviren diskutiert (Übersicht in Miller 1992). In den letzten 10 Jahren hat jedoch der DNA-Transfer durch Plasmid DNA stark an Bedeutung gewonnen.

Wolff und Mitarbeiter zeigten 1990 die Aufnahme und Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in Skelettmuskelzellen von Mäusen nach intramuskulärer (i.m.) Injektion des pRSVLacZ Plasmids (Wolff et al., 1990). Sowohl die  $\beta$ -Galaktosidase als auch andere Reportergene, wie die Luciferase und die Chloramphenikol Acetyl Transferase (CAT), werden bis zu 19 Monate nach Injektion in Muskelfasern der Maus exprimiert (Wolff et al., 1992b). Dabei unterliegt die Expression einer hohen Variabilität, die nur bedingt durch verschiedene Faktoren erklärt werden kann. So hängt die Expressivität der injizierten DNA beispielsweise von dem Alter der Mäuse ab. Mäuse im Alter von 2 - 10 Wochen zeigten nach Injektion des pCAT Plasmids eine 5fach höhere CAT-Aktivität als ausgewachsene ältere Mäuse (Wells und Goldspink, 1992). Die Autoren ließen jedoch die Frage offen, ob die erhöhte Expressionsrate in den jungen Mäusen durch eine bessere Aufnahme der fremden DNA oder durch eine erhöhte Transkriptions-/Translationsrate induziert wurde. Darüber hinaus ist die Expression der fremden DNA entscheidend von der Wahl des Promotors abhängig. Die Expression des Luciferase Gens vom SV40 Promotor war in Muskelfasern niedrig und transient, während eine bis zu 1000fach höhere Expression vom RSV Promotor beobachtet wurde (Davis et al., 1993). Eine starke Zunahme der Expression der injizierten DNA wurde auch durch Injektion des Plasmids in regenerierende Muskelfasern erreicht (Davis et al., 1993). Skelettmuskelzellen sind multinuklear und permanent postmitotisch. Eine gewisse Regeneration von Muskeln ist jedoch durch wenige verbleibende Stammzellen, sog.

Satellitenzellen, möglich, die nach der Degeneration einer Muskelfaser schnell proliferieren, zu Myoblasten differenzieren, fusionieren und zu einer reifen Muskelfaser differenzieren. Der gesamte Regenerationsprozeß dauert etwa 3 Wochen (D'Albis et al., 1988; Whalen et al., 1990). Die höhere Aufnahmerate während dieser Regenerationszeit wird dabei durch eine höhere Diffusionsrate der injizierten DNA erklärt (Davis et al., 1995). Auch das Verhältnis zwischen Muskelgröße und Volumen der injizierten DNA scheint einen Einfluß auf die Aufnahme und somit Expression der fremden DNA zu haben. Wurden 100 µl der DNA Lösung in einen kleinen Muskel injiziert, so konnte eine stärkere Expression beobachtet werden als nach Applikation des gleichen Volumens in einen großen Muskel (Davis et al., 1995). Der extrazelluläre Raum zwischen den einzelnen Muskelfasern ist eng und kleiner als das Volumen der injizierten DNA-Lösung (Manthorpe et al., 1993). Somit könnte der durch die Injektion entstehende hydrostatische Druck zur Beschädigung der Muskelfasern und zu einer vereinfachten DNA Aufnahme führen. Die Aufnahme der DNA von den Muskelfasern läßt sich jedoch nicht generell durch eine Verletzung der Muskelfasern durch die Spritze oder den erhöhten Druck erklären, da auch unversehrte Muskelfasern die Fähigkeit haben, DNA aufzunehmen (Jiao et al., 1992). Der genaue Mechanismus, der zur Aufnahme der fremden DNA in Muskelfasern führt, ist bis heute unklar. Da aber nicht nur in Skelettmuskelzellen anderer Säuger, wie Ratten, Katzen, Hunden und nicht humanen Primaten, die Aufnahme und Expression von injizierter DNA beobachtet wurde, sondern auch in Skelettmuskelzellen von Fischen, liegt die Vermutung nahe, daß die Aufnahme von DNA in Skelettmuskelzellen ein uralter Mechanismus ist (Hansen et al., 1991; Jiao et al., 1992).

Neben Skelettmuskelzellen können auch Herzmuskelzellen (Myokardfasern) die fremde DNA exprimieren, wie die Injektion des pRSVLacZ Plasmids in das Herz von Ratten gezeigt hat (Ascadi et al., 1991b). Histochemische Analysen haben ergeben, daß die DNA ausschließlich in Herzmuskelzellen und nicht in endothelialen Zellen, Fibroblasten oder Blutzellen exprimiert wird. Im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen ist die DNA sowie deren Expression in injizierten Herzmuskelzellen nur über 3 Wochen nachweisbar. Eine stabile Luciferase Expression wird hingegen in Herzmuskeln von Ratten beobachtet, die entweder ein durch Cyclosporin geschwächtes Immunsystem oder keinen Thymus haben (Festing et al., 1978; Borel, 1986).

Entgegen früheren Untersuchungen von Wolff (Wolff et al., 1990, 1992a, b), Ascadi (Ascadi et al., 1991b) und Manthorpe (Manthorpe et al., 1993) wird die fremde DNA auch in anderen Geweben als im Muskelgewebe nach entsprechender Injektion exprimiert. Die Injektion von nackter Plasmid DNA in das Leberparenchym von Ratten führte zu

einer geringen Expression der DNA in Hepatocyten (Hickman et al., 1994). Eine 1.000fach stärkere Expression der DNA wurde in Hepatocyten erzielt nach Injektion einer hypertonischen DNA Lösung in die Pfortader von Tieren, deren Lebervenen kurzzeitig abgeklemmt wurden (Budker et al., 1996). Für die hohe Expressionsrate wurde sowohl der osmotische als auch der hydrostatische Druck in der Pfortader verantwortlich gemacht, die wahrscheinlich gemeinsam zu einer vorübergehenden Öffnung der endothelialen Barriere führten (Fraser et al., 1980; Neuwelt et al., 1987). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Hunden erzielt, als Hinweis auf die Expression von nackter Plasmid DNA auch in der Leber von größeren nicht-nagenden Säugetieren (Zhang et al., 1997). Die Injektion von nackter pCMVCAT DNA in die Schilddrüse von Kaninchen führte zu einer kurzzeitigen Luciferase Expression in Zellen der Schilddrüsenfollikel. Ab 3 Tagen nach Injektion nahm die Luciferase Aktivität ab, höchstwahrscheinlich als Folge der Elimination der Plasmid DNA, die nur bis zu 24 h nach Injektion in der Schilddrüse nachweisbar war (Sikes et al., 1994). In keinem Gewebe konnte jedoch eine so starke und lang anhaltende Expression der fremden DNA beobachtet werden wie in der Skelettmuskulatur (Übersicht in Wolff, 1997).

Die Anwendung des direkten DNA-Transfers durch Injektion von nackter Plasmid DNA in verschiedene Gewebe wird heutzutage vielfältig im Sinne der Gen Therapie diskutiert. Die möglichen Anwendungsgebiete liegen dabei in der Behandlung von vererbbaeren Krankheiten, wie z.B. der Duchenne Muskeldystrophie (DMD), in der Prophylaxe und Behandlung von Infektionskrankheiten, wie Hepatitis-C, Aids und Influenza sowie von Krebs (Übersicht in Gurunathan et al., 2000).

## **1.5 Das Adenovirussystem**

Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren und wurden 1953/54 unabhängig von W. Rowe und M. Hilleman als Erreger entzündlicher Erkrankungen des respiratorischen Trakts beim Menschen entdeckt (Rowe et al., 1953; Hilleman und Werner, 1954). Bis heute sind mehr als 100 serologisch unterschiedliche Adenovirus Typen bekannt, von denen mehr als die Hälfte humanpathogen sind. Diese Adenoviren verursachen beim Menschen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, infizieren aber auch die Bindehaut des Auges und den Gastrointestinal-Trakt. Mit der Entdeckung der Onkogenität der Adenoviren in neugeborenen Hamstern (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962) sowie der Fähigkeit dieser Viren, Hamsterzellen in Kultur zu transformieren (Pope und Rowe, 1964; Freeman et al., 1967), entwickelte sich das Adenovirussystem zu einem wertvollen Modellsystem für das Studium der viralen Onkogenese und der

Zelltransformation. Auch andere elementare Mechanismen, die für alle Organismen von Bedeutung sind, wurden durch Forschungsarbeiten an Adenoviren entdeckt, wie beispielsweise Spleißen von RNA, DNA-Replikation, *de novo* Methylierung, Rekombinationsprozesse und Genregulationen.

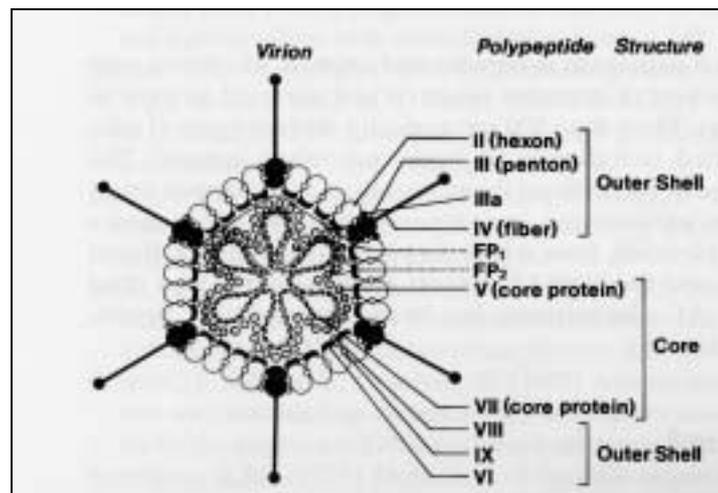
Die Familie der *Adenoviridae* ist unterteilt in 2 Gruppen: die Adenoviren der Säugetiere (Mastadenoviren) und die Adenoviren der Vögel (Aviadenoviren). Die humanpathogenen Adenoviren werden entsprechend ihrer Onkogenität in sechs Gruppen (A - F) eingeteilt. Neben der Onkogenität werden auch biophysikalische, biochemische, biologische und immunologische Charakteristika der Serotypen als Kriterien zur Einteilung in Subgenera herangezogen (Wadell et al., 1980; Wigand et al., 1982; Schnurr und Dondera, 1993). Als Beispiele seien hier der in dieser Arbeit erwähnte hochonkogene Serotyp 12 (Subgenera A) sowie der nicht onkogene Serotyp 2 (Subgenera C) angeführt.

### **1.5.1 Aufbau von Adenoviren**

Adenoviren sind ikosaedrische Partikel ohne Lipidmembran. Das Kapsid hat je nach Adenovirus Typ einen Durchmesser von 80 - 110 nm und wird von 252 Kapsomeren gebildet (Abbildung 1). Die 20 Flächen des Kapsids werden von 240 sechseckigen Kapsomeren, den Hexonen, gebildet. Die 12 Ecken des Kapsids werden von fünfeckigen Bausteinen (Pentonen) gebildet, die aus einem Pentonbasisprotein und einem Fiberprotein bestehen. Das Fiberprotein ermöglicht den Viren den Kontakt zur Wirtszelle.

Das Innere des Partikels enthält einen Nukleoproteinkomplex, der aus dem Genom und den Proteinen V, VII und  $\mu$  besteht. Die Proteine VII und  $\mu$  sind für die Kondensation der DNA verantwortlich (Anderson et al., 1989). An den beiden 5'-Enden der DNA ist über einen Serinrest je ein terminales Protein (pTP) kovalent gebunden. Beide terminalen Proteine können über nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander interagieren und halten so das DNA-Genom in einem quasi-zirkulären Zustand.

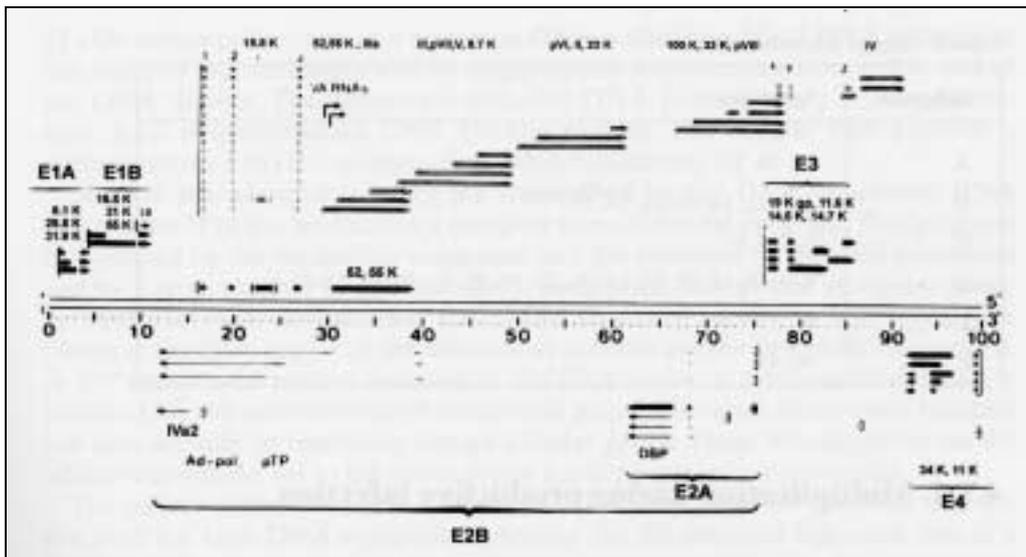
Die Genomgröße der Adenoviren variiert je nach Serotyp zwischen 32 und 36 kbp. Die Größe der Ad12 DNA beträgt 34.125 bp (Sprengel et al., 1994, 1995). Die Enden des Genoms weisen invertierte Sequenzwiederholungen ("inverted terminal repeats" ITR) auf, die bei der Ad12 DNA 164 bp lang sind und eine wichtige Funktion bei der DNA-Replikation für die Initiation der Doppelstrangsynthese einnehmen (Übersicht in Shenk, 1996).



**Abbildung 1:** Schematische Struktur eines Adenoviruspartikels

An den 12 Ecken des ikosaedrischen Partikels befinden sich Fiberproteine (IV), die von der Oberfläche hervorragen. Sie sind mit den Pentonbasisproteinen (III) assoziiert, die sich an den Ecken des Ikosaeders befinden. Die Seitenflächen werden von Hexonproteinen (II) gebildet. Im Inneren des Partikels befindet sich das lineare doppelsträngige DNA-Genom, das mit den Proteinen V und VII zu einer Core-Struktur komplexiert ist. Aus: Brown et al., 1975.

Eine Übersicht über die Organisation und Expression des Adenovirus Typ 2 (Ad2) Genoms ist in Abbildung 2 dargestellt. Beide DNA-Stränge codieren für Proteingruppen, deren Produkte zur gleichen Zeit im Infektionszyklus benötigt werden oder sich funktionell ergänzen, liegen in enger räumlicher Nähe. Das Genom lässt sich unterteilen in die frühen Gene (E1 - E4), die früh während der Infektion vor der Replikation transkribiert werden, und die späten Gene (L1 - L4), die mit der Ausnahme von L1 erst nach der Replikation exprimiert werden und hauptsächlich für Strukturproteine codieren (Akusjärvi et al., 1986). Drei Proteine für die virale DNA-Replikation sind auf dem Genom codiert, das DNA-bindende Protein (DBP), eine adenovirale DNA-Polymerase (DNA pol) und das 5'-terminale Protein (pTB) (Lichy et al., 1982). Für die Replikation der viralen DNA, die Synthese der mRNA und der Proteine nehmen Adenoviren nach der Infektion den zellulären Syntheseapparat in Anspruch. Infolgedessen besteht bei der viralen Replikation und Gen-Expression ein enges Zusammenspiel zwischen zellulären und viralen Faktoren.



**Abbildung 2:** Organisation des Adenovirus Typ 2 Genoms.

Die doppelsträngige DNA des Virusgenoms ist durch die doppelte Linie in der Mitte der Abbildung dargestellt und in Genomeinheiten unterteilt. Die Pfeile geben die verschiedenen, teilweise gespleißten mRNAs und die Transkriptionsrichtungen an. Aus: Akusjärvi et al., 1986.

### 1.5.2 Umgang verschiedener Zellsysteme mit der viralen DNA

Abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, die die Charakteristika des Virus und der Wirtszelle umfassen, führen virale Infektionen entweder zu einer produktiven oder abortiven Infektion oder zur Transformation der Wirtszelle.

Zellen variieren in ihrer Permissivität für verschiedene Adenovirus Typen. Humane Zellen, wie beispielweise KB oder HeLa Zellen, werden von Ad12 produktiv infiziert, wobei bis zu  $10^6$  Virionen pro Zelle gebildet werden (Green und Piña, 1964). Die Expression der adenoviralen Gene erfolgt im Rahmen eines lytischen Infektionszyklus in einer definierten, zeitlich genau kontrollierten Abfolge (Ginsberg, 1979; Flint 1982; Green et al., 1983; Akusjärvi et al., 1986). Der Infektionszyklus dauert bei Ad12 72 h. Während der frühen Infektionsphase innerhalb der ersten 6 bis 8 h werden die frühen Gene (E1 - E4) exprimiert, die für die Regulation der viralen Gen-Expression und für die virale DNA Replikation erforderlich sind. Als erste Gengruppe wird die E1A Region exprimiert. Das E1A-Genprodukt ist ein Transaktivator für alle anderen viralen Promotoren. Außerdem interagieren die E1A-Proteine mit verschiedenen zellulären Proteinen, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktoren YY1 und cJun, und aktivieren die Transkription zellulärer Gene, wie z.B. diejenigen des "heat shock protein 70" (hsp 70)

und des  $\beta$ -Globulins (Green et al., 1983; Gaynor et al., 1984; Lillie und Green, 1989; Lee et al., 1996). Die Genprodukte E2A (DBP) und E2B (pTB und DNA pol) sind an der Replikation der viralen DNA beteiligt. Erst nach der Replikation der viralen DNA setzt die Expression der späten Gene ein. Die Synthese von Wirtszell-Proteinen sowie die zelluläre Replikation werden in dieser Phase der Infektion gehemmt (Ginsberg et al., 1967; Babich et al., 1983; Khalili und Weinberg, 1984). Die Transkription der späten viralen Gene steht unter der Kontrolle des "Major Late Promotors" (MLP). Ausgehend vom MLP wird ein etwa 26 kb langes primäres Transkript synthetisiert, aus dem durch alternatives Spleißen etwa 20 verschiedene Proteine, meist Strukturproteine, entstehen.

Abweichungen von diesem produktiven Infektionsverlauf sind bei der Infektion von Zellen zu beobachten, die semipermissiv für Adenoviren sind. So kommt es beispielsweise bei der Infektion von Hamster- oder Rattenzellen mit Ad2 oder Ad5 zu einer stark verminderten Virusproduktion und zu einem verlangsamten Infektionsverlauf (Eggerding und Pierce, 1986). Die Adsorption und Aufnahme des Virus in die Zelle, die Quantität der DNA-Synthese und die Produktion früher viraler Proteine sind vergleichbar mit der produktiven Infektion (Feldman et al., 1966; van der Vliet und Levine, 1973). Im Gegensatz dazu ist die Synthese vieler später viraler Proteine reduziert (Farber und Baum, 1978).

Die Infektion von Syrischen Hamsterzellen mit Ad12 führt hingegen zu einer abortiven Infektion, bei der keine neusynthetisierten infektiösen Virionen freigesetzt werden. Ähnlich wie bei der produktiven Infektion gelangen die Virionen durch eine rezeptorvermittelte Endocytose in die Zelle, der DNA-Proteinkomplex wird dann in den Zellkern transportiert, wo die frühen Gene transkribiert und translatiert werden (Ortin und Doerfler, 1975; Esche et al., 1979; Orend et al., 1995). Im Vergleich zur produktiven Infektion ist die Menge der gebildeten frühen Proteine jedoch stark reduziert (Lucher, 1990, Lucher et al., 1992). In diesen Zellen findet keine Replikation der viralen DNA statt (Doerfler 1968, 1969, 1970; Fanning und Doerfler, 1976). Auch die Transkription der späten Gene ist vollständig blockiert (Ortin et al., 1976; Zock et al., 1993). Für die Inaktivierung des MLP in Zellen des Syrischen Hamsters wird ein 32 bp langes Mitigator-Element innerhalb des MLP von Ad12 verantwortlich gemacht. Der Ad2-MLP enthält keine vergleichbare Sequenz. Wahrscheinlich sind aber noch weitere Sequenzen im MLP an der Inaktivierung beteiligt (Zock und Doerfler, 1990; Zock et al., 1993). In abortiv infizierten Zellen kann es zur Integration der viralen DNA und somit zur Transformation dieser Zellen kommen (Doerfler, 1970; 1975; 1982, 1991; Sutter et al., 1978; Stabel et al., 1980; Doerfler et al., 1983).

### 1.5.3 Integration viraler DNA in das Wirtsgenom

Integrierte Formen der adenoviralen DNA wurden in produktiv und in abortiv infizierten, in transformierten Zellen und in Ad12-induzierten Hamstertumorzellen beobachtet (Übersicht in Doerfler, 1982; Schröer et al., 1997). Die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom ist im Detail in Ad12-transformierten Hamsterzellen und in Ad12-induzierten Tumorzellen untersucht worden (Groneberg et al., 1978; Sutter et al., 1978; Groneberg und Doerfler, 1979; Stabel et al., 1980; Orend et al., 1991, 1994, 1995; Knoblauch et al., 1996; Hilger-Eversheim und Doerfler 1997). Die Insertion adenoviraler DNA erfolgt nicht sequenzspezifisch, wie Sequenzanalysen verschiedener Verbindungen zwischen viraler und zellulärer DNA gezeigt haben (Übersicht in Doerfler, 1983; Fechteler et al., 1995). Dabei sind häufig viele Kopien der Ad12 DNA an einer Stelle des Hamstergenoms integriert (Orend et al., 1995; Knoblauch et al., 1996; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Die integrierten Genome liegen meistens in kolinearer Orientierung vor, können jedoch auch untereinander rearrangiert oder durch zelluläre Sequenzen unterbrochen sein (Eick und Doerfler, 1982; Orend et al., 1995; Knoblauch et al., 1996). Viele Insertionsstellen von Adenovirus DNA sind in der Wirtszelle transkriptionell aktiv, auch schon vor der Insertion der viralen DNA (Gahlmann et al., 1984; Schulz et al., 1987). In den meisten Fällen sind die Ad12 DNA Sequenzen über viele Generationen stabil in das Hamstergenom integriert (Orend et al., 1994; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). In einigen Fällen wurden jedoch morphologische Revertanten von Ad12-transformierten oder Ad12-induzierten Tumorzelllinien beobachtet, die die gesamte oder einen Teil der multiplen Kopien viraler DNA verloren hatten. Diese Revertanten, wie beispielsweise die Tumorzelllinie T1111, zeigen in Tieren immer noch onkogenes Potential, sogar dann, wenn nur noch kleine Fragmente der Ad12 DNA in den Revertantengenomen persistieren (Kuhlmann et al., 1982; Pfeffer et al., 1999). Offensichtlich ist die Persistenz der viralen DNA keine absolute Bedingung für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps.

### 1.5.4 Transformation und Onkogenese

Adenoviren werden als DNA-Tumorviren eingestuft, da sie Zellen von Nagetieren in Kultur transformieren und Tumoren in Nagetieren induzieren können (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962; Pope und Rowe, 1964; Freeman et al., 1967; Starzinski-Powitz et al., 1982). Es werden mehrere Möglichkeiten diskutiert, wie eine Adenovirus-Infektion zu einer malignen Transformation führen kann. Die für die Transformation wichtigen Genprodukte wurden der E1A- und E1B-Region zugeschrieben (Graham et

al., 1974; van der Eb et al., 1977, 1979; Bos et al., 1981, Graham, 1984). Die E1A-Proteine können alleine primäre Nagerzellen in Kultur immortalisieren und zusammen mit den E1B-Proteinen stabil transformieren (Houweling et al., 1980; Stillman, 1986). Wie auch für andere virale Onkoproteine gezeigt, wird vermutet, daß ein stabiler Protein-Protein-Komplex zwischen den E1-Genprodukten und zellulären Faktoren eine wichtige Rolle bei der Transformation spielt. Das E1A-Protein interagiert mit der Familie der Retinoblastomproteine (Rb 105/107) (Whyte et al., 1988; 1989). Das Rb-Protein hat als Genprodukt eines Tumorsuppressor-Gens einen negativen Einfluß auf die Zellproliferation, indem es im Zellzyklus den Übergang in die G1-Phase kontrolliert. In der G1-Phase liegt das dephosphorylierte Rb-Protein komplexiert mit dem zellulären Transkriptionsfaktor E2F vor. Dieser Komplex wird durch das E1A-Protein dissoziiert (Bandara und LaThangue, 1991).

Eine stabile Transformation erfordert die zusätzliche Expression der E1B-Genprodukte 19 K und 54 K. Das 54 K-Genprodukt kann das p53-Protein, Genprodukt eines Tumorsuppressor-Gens, inaktivieren (Sarnow et al., 1990; van den Heuvel et al., 1993). Das 19 K-Protein scheint in infizierten Zellen den durch E1A induzierten Prozeß des programmierten Zelltods (Apoptose) inhibieren zu können (White et al., 1992; Rao et al., 1992). Anscheinend benutzen die Adenoviren und andere DNA-Tumoviren, wie z.B. die Simianviren oder die Hepatitis-B-Viren, den gleichen Mechanismus zur Transformation von Zellen, indem sie Genprodukte von zellulären Tumorsuppressor Genen inaktivieren, was zu einer unkontrollierten Proliferation der Zelle führt (Übersichten in Levine et al., 1991; Ludlow und Skuse, 1995).

Aber auch andere Regionen als die E1-Region der Adenoviren sind an der Transformation der Zelle beteiligt. So wurde beispielsweise gezeigt, daß an der östrogenabhängigen Tumorentstehung in der Brustdrüse weiblicher Ratten durch Adenovirus Typ 9 neben der Expression der E1-Region auch E4-Genprodukte erforderlich sind (Shiroki et al., 1984; Javier et al., 1992).

Das Integrationsereignis selbst könnte aber auch zur Transformation der Zelle beitragen. Zum einen könnte die Insertion im Sinne von der insertionellen Mutagenese zur Entstehung des transformierten Phänotyps führen (Doerfler, 1992). Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die Integration der fremden DNA zu Veränderungen des zellulären Methylierungsmusters und damit zu einem veränderten Transkriptionsprogramm der Zelle führt (Übersicht in Doerfler, 1996). Dabei werden sogar Veränderungen der DNA-Methylierung in zellulären DNA-Sequenzen beobachtet, die weit von der Insertionsstelle entfernt liegen (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Das Verhalten von 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 von transgenen Organismen und nicht zuletzt in der Evolution. Dabei kann fremde DNA auf verschiedenen Wegen in den Organismus gelangen. Auf dem normalen Weg gelangt fremde DNA durch Infektionen mit Viren oder anderen Mikroorganismen in den Organismus oder wird mit der natürlichen Nahrung in den Gastrointestinal (GI)-Trakt aufgenommen. Außerdem kann fremde DNA durch Transfektionen von Zellen in Kultur, durch Injektionen von somatischen und generativen Zellen oder durch Transplantationen in den Organismus eingebracht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind drei grundsätzlich verschiedene Ansätze verfolgt worden, um das Schicksal von fremder DNA im Säugerorganismus zu untersuchen.

### **1.6.1 Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach oraler Applikation**

Anfang der neunziger Jahre konnte erstmals gezeigt werden, daß oral verabreichte M13mp18 DNA nicht vollständig im GI-Trakt von Mäusen degradiert wird, sondern über das Darmepithel und das Blut in innere Organe gelangt (Schubbert et al., 1994, 1997). Nach Fütterung von trächtigen Mäusen werden Fragmente der verfütterten Test-DNA über die Plazenta auf Foeten übertragen (Schubbert et al., 1998). Aus diesen Beobachtungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Können ähnliche Ergebnisse mit einer anderen Test-DNA erzielt werden oder sind die erzielten Ergebnisse sequenzspezifisch?
- Wird die oral applizierte Test-DNA im Mausorganismus exprimiert?
- Kann auch ein DNA-Transfer in die und über die Keimbahn beobachtet werden?
- Wie verhält sich die mit der natürlichen Nahrung aufgenommene Pflanzen-DNA im GI-Trakt der Maus?

Diese Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene molekularbiologische Nachweisverfahren wie Restriktions- und Southern Transfer-Analyse, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Fluoreszenzmikroskopie, RT-PCR und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht werden.

### **1.6.2 Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach parenteraler Applikation**

Fremde DNA konnte nach oraler Applikation nur bis zu 18 h im Mausorganismus nachgewiesen werden (Schubbert et al., 1996). Daher sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, wie lange fremde DNA generell im Mausorganismus persistiert. Dazu sollten Mäuse mit unterschiedlichen Mengen einer Test-DNA in die Skelettmuskulatur injiziert werden und anschließend die Persistenz, Verteilung und Expression der fremden DNA untersucht werden. Auch für diese Untersuchungen sollten unterschiedliche Methoden der Molekularbiologie (s.o.) angewendet werden.

### **1.6.3 Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster**

Die subkutane Injektion von  $4,5 \times 10^7$  Ad12-Virionen induziert die Bildung von Tumoren klonalen Ursprungs, die häufig über 20 Kopien der Ad12 DNA in eine, für jeden Tumor spezifische, zelluläre Sequenz integriert haben (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Diese in der Nackenregion gebildeten Tumoren wurden als undifferenzierte Sarkome charakterisiert (Trentin et al., 1962).

Vor diesem Hintergrund ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Können auch weniger als  $4,5 \times 10^7$  Ad12-Virionen die Induktion von Tumoren auslösen? Enthalten diese Tumoren möglicherweise weniger Kopien der Ad12 DNA in integrierter Form?
- Können Ad12-Virionen anstatt undifferenzierter Sarkome auch die Ausbildung anderer Tumortypen induzieren?

Diese Fragen sollten durch Restriktions- und Southern Transfer-Analysen und durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen untersucht werden. Die Ausbildung von verschiedenen Tumortypen sollte nach Injektion der Ad12-Virionen in unterschiedliche Gewebe analysiert werden. Die anschließende Charakterisierung der Tumoren sollte durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen erfolgen.

---

## 2 Material

### 2.1 Tiere

C57Bl/6 Mäuse	hauseigene Zucht
CB20 Mäuse	hauseigene Zucht
Hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	Charles River, Sulzfeld

### 2.2 Pflanzen

Saatgut für Soja ( <i>Glycine max</i> )	Altromin, Lage
---	----------------

### 2.3 Zelllinien, Viren, Bakterien und Plasmide

#### 2.3.1 Zelllinien

BHK21 (Nierenzellen neugeborener (Hamster))	American Type Culture Collection ATCC, Nr. CCL 10 Rockville, USA
HeLa (Zellen eines menschlichen Gebärmutterkarzinoms)	ATCC, Nr. CCL 2
KB (Zellen eines menschlichen Mundhöhlenkarzinoms)	ATCC, Nr. CCL 17
3T3 Maus-Fibroblasten	ATCC, Nr. CCL 6577
T637 (Ad12-transformierte Hamsterzellen)	Strohl et al., 1970

#### 2.3.2 Viren

Adenovirus Typ 12 (Ad12)	ATCC, Nr. VR 863
--------------------------	------------------

#### 2.3.3 Bakterien

DH5 $\alpha$	Hanahan (1983)
XL1Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg

### 2.3.4 Plasmide

pBR322	Klonsammlung W. Doerfler
pBR322 Ad12-BamHI-E	Klonsammlung W. Doerfler
pBR322 Ad12-PstI-C	Klonsammlung W. Doerfler
pEGFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pRSVGFP	Geschenk von U. Müller (Basel)
pSVGFP	Klonsammlung W. Doerfler

## 2.4 Enzyme

### 2.4.1 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.

### 2.4.2 Sonstige Enzyme

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

### 2.4.3 Kits

Access RT-PCR-Kit	Promega, Mannheim
Biotin-Nicktranslation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Blood-Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T PCR Cloning-Kit	Promega, Mannheim
Plasmidaufreinigung (midi/maxi)	Qiagen, Hilden Genomed, Bad Oenhausen
QIAquick spin Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini- und Midi-Kit	Qiagen, Hilden
Taq Dye Deoxy Terminator Sequencing-Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

## 2.5 Nukleinsäuren

### 2.5.1 Radioaktiv markierte Nukleotide

Desoxyribonukleosid-5' [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-Triphosphate New England Nuclear, DuPont, Dreieich  
 ([ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dNTPs),  
 spezifische Aktivität: 3.000 Ci/mM

### 2.5.2 Sonstige Nukleinsäuren

Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Promega, Mannheim
Desoxyribooligonukleotid-Primer	Gibco, Paisley, Schottland
Hexa-Oligonukleotide (dN <sub>6</sub> )	Roche Diagnostics, Mannheim
Lachsspermien-DNA (Ls)	Sigma, Deisenhofen
$\lambda$ DNA/Eco 130I/MluI	Fermentas MBI, St. Leon-Roth
"Low Mass" DNA Größenstandard	Gibco, Paisley, Schottland
pUC-Mix, Nr. 8	Fermentas MBI, St. Leon-Roth

## 2.6 Antikörper und Konjugate

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

## 2.7 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
Ampicillin	Grünenthal GmbH, Stolberg
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA Merck, Darmstadt
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast Extract	Difco, Detroit, USA Gibco, Paisley, Schottland
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Baker, Deventer, NL
Cäsiumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Merck, Darmstadt
Colchizin (10 µg/ml)	Gibco, Paisley, Schottland
DABCO (1,4-Diazobicyclo (2.2.2) octan)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
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 <sup>R</sup>	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin (95%ig)	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 (PAA-Lsg 38% : 2%)	Roth GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Sigma, Deisenhofen
Sephadex, 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
Tween20	Sigma, Deisenhofen

---

Wasser, HPLC-grade	Merck, Darmstadt
X-Phosphat (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylencyanol-Blau FF	Fluka, Buchs AG, Basel, Schweiz

## 2.8 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) aus einer Millipore-Super Q-Filtrationsanlage angesetzt und im Anschluß autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in dH <sub>2</sub> O
APS	10% in dH <sub>2</sub> O
Aufschlußpuffer zur DNA-Präparation	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,2 mM EDTA, pH 7,5 10 mM NaCl 1% SDS 1,33 mg Proteinase K/ml
Blocking-Lösung für in-situ-Hybridisierung	3% Milchpulver 4 x SSC
Chloroform	Chloroform/Isoamylalkohol 24 : 1
CTAB-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 1,4 M NaCl 20 mM EDTA, pH 8,0 2% CTAB
Denaturierungslösung für in-situ-Hybridisierung	70% Formamid in 2 x SSC
Denaturierungslösung für Southern Transfer	0,4 M NaOH
Denhardt´s Reagenz (50x)	1% Ficoll 1% Polyvinylpyrrolidon 1% BSA
Depurinierungslösung für Southern Transfer	0,25 M HCl
Desoxyribonukleosid-5´-triphosphate	10 mM in dH <sub>2</sub> O

---

DnD-Lösung	1,53 g DTT 9 ml DMSO 100 µl 1 M Kaliumacetat
Dot-Blot Blocking-Lösung	0,5% Milchpulver in Puffer I
Dot-Blot-Puffer I	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Dot-Blot-Puffer II	100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM Tris/HCl pH 9,5
Dot-Blot Verdünnungspuffer	0,1 mg/ml Lachsspermien DNA in 6 x SSC
dYT-Medium	5 g/l NaCl 10 g/l Bacto-Yeast Extract 16 g/l Bacto-Trypton
Einfriermedium für Zellen	15% Glycerin 10% FCS 75% Dulbeccos Medium
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in dH <sub>2</sub> O
Fixierlösung	Methanol/Essigsäure 3 : 1
Hybridisierungspuffer für in-situ-Hybridisierung von Gewebeschnitten	50% Formamid (deionisiert) 1% Dextransulfat 1 x Denhardt's Lösung 10 mg/ml Ls-DNA in 4 x SSC
Hybridisierungspuffer für in-situ-Hybridisierung von Zellpräparationen	10% Dextransulfat 0,1% SDS 2 x SSC, pH 7,0 50% Formamid (deionisiert)
Hybridisierungspuffer für Southern Transfer	20% Dextransulfat 10% Milchpulver 2 x SSC 0,17 mg/ml Ls-DNA
Konservierungslösung für in-situ-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 <sub>2</sub> O
Mg <sup>2+</sup> -Mix	1 M MgCl <sub>2</sub> 1 M MgSO <sub>4</sub>
Milchpulver-Mix (10 x)	5% Magermilchpulver 10% SDS
NaCl-Lösung (gesättigt)	6 M NaCl
Oligo-Labeling-Puffer (5x OLB)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 5 mM MgCl 5 mM DDT 0,2 M HEPES pH 7,0 1,25 mg/ml Hexaoligonukleotide d(N) <sub>6</sub>
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl 1 mM KCl 8 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 1 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
PBS-d	PBS ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>
Phenol	gesättigt mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Prähybridisierungslösung für Southern Transfer	2 x SSC 1 x SDS 0,5 % Magermilchpulver 0,5 mg/ml Ls-DNA
Proteinase K-Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
Probenauftragungspuffer für Agarose-Gele	10 mM EDTA 50% Glycerin 1% SDS 1% Bromphenolblau

---

RNaseA	10 mg/ml RNaseA 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 15 mM NaCl
Säulenpuffer	1 mM EDTA, pH 8,0 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1% SDS
SE-Puffer	75 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0
Siliziumoxidlösung	10 g Siliziumoxid in 50 ml H <sub>2</sub> 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
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Tryptone 5 g/l Bacto-Yeast Extract 0,5 g/l NaCl
SOC-Medium	SOB-Medium mit 1% Mg <sup>2+</sup> -Mix 1% Glukose (2 M)
SSC (20 x)	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat
STET-Lösung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 0,5% Triton X-100 8% Saccharose
Stop-Lösung für Nick-Translation	300 mM EDTA, pH 8,0 1,25% SDS
Sucroselösung	25% Sucrose 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0
TBE (1 x)	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 70 mM Borsäure 25 mM EDTA

---

TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
TES-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TFB-Puffer	10 mM K-MES, pH 6,3 45 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 3 mM Hexamincobalt-Chlorid
Tris-Saline	14 mM NaCl 5 mM KCl 0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl pH 7,4 0,1% Glucose (w/v) 0,03% Penicillin (w/v) 0,02% Streptomycin (w/v)
Tritonlösung	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 62,5 mM EDTA, pH 8,0 0,1% Triton X-100
TSM-Puffer	0,5% NP40 (w/v) 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 2 mM MgCl <sub>2</sub>
X-Gal Stammlösung	50 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid

## 2.9 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Cryo-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser (0,17 mm dick)	AL, Mainz
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, Gauting
Fix-O-Gum	Marabu, Tamm
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Gewebekulturschalen (60 x 15 mm)	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Glaswaren	Schott, Mainz
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Kimwipes, Papiertücher	Kimberly Clark, EEC
Kleinbildfilme (24 x 36), EPL 400 X	Kodak, Stuttgart
Küvetten (Quarz)	Hellma; von Gebr. Faust, Köln
Leucosep <sup>R</sup> -Zentrifugengefäße	Greiner, Frickenhausen
Nitrozellulosemembran, Hybond-ECL	Amershan Buchler Life Science, Braunschweig
Nylonmembran (positiv geladen)	Qiagen, Hilden Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger, "Super Frost"	Manzel-Gläser, Mainz
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 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, X-OMAT <sup>TM</sup> AR 5	Kodak, Stuttgart
Skalpellklingen	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter-Aufsätze (0,22 µm und 0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim

---

Zentrifugengefäße	Nalge, Rochester, USA
Zentrifugenröhrchen, Ultra Clear (SW 60)	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA

## 2.10 Laborgeräte

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

Entwicklermaschine, AGFA Curix 60	AGFA-Gavaert, Mortsels, Belgien
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Inkubator für Bakterienkulturen	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inkubator, Cytoperm Typ 8080	Heraeus, Düsseldorf
Mikroskop Typ BHS	Olympus, Hamburg
PCR-Maschinen, PE 480, PE 2400/9600	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Phasenkontrastmikroskop	Leitz, Wetzlar
Photometer, Beckmann DU 640	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gillson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Rotationsmikrotom	Microm, Heidelberg
Sonicator, Branson Sonifier, Modell B-12	Branson Sonic Power, Danbury, USA
Sterilbank, Bio Gard Hood, antair BSK 4	Baker Company, Stanford, USA
Szintillationszähler, LS 1801	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Video-Dokumentationssystem (CS1)	Cybertech, Berlin
Zentrifugen:	
Cryofuge 5000	Heraeus, Düsseldorf
Cytozentrifuge 3	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	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA

## **3 Methoden**

### **3.1 Arbeiten mit Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die für diese Arbeiten verwendeten Medien, Waschpuffer und Enzymlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

#### **3.1.1 Passagieren von Zellen**

Die verwendeten Zelllinien waren ausschließlich adhärent wachsende Zellen, die als "Monolayer"-Kulturen in Dulbeccos modifiziertem Eagles 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 2 - 3 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 1/5 bis 1/10 in neue Gewebekulturflaschen mit frischem Medium überführt und bei 37°C inkubiert.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -195°C 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 0,5 ml FCS gemischt und kurz abzentrifugiert (Sorvall GLC-2B, 2.000 rpm, 5 min, RT). Das Zellsediment wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in verschraubbare Cryoröhrchen überführt und über Nacht bei -20°C tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C bzw. -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryoröhrchen kurz bei 37°C erwärmt und die Zellsuspension wie beschrieben abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Dulbecco Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine mit Dulbecco Medium und 20% FCS vorbereitete Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, dem nur noch 10% FCS zugesetzt wurden.

### 3.1.3 Transfektion von DNA in Säugerzellen

Die Transfektionen von Säugerzellen in Kultur wurden mittels SuperFect durchgeführt, das von der Firma Qiagen (Hilden) zur Verfügung gestellt wurde. Das SuperFect Transfektions-Reagenz ist ein Polykation, das mit DNA komplexiert. Diese DNA-SuperFect-Komplexe, die eine positive Nettoladung besitzen, können an negativ geladene Rezeptoren auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen binden und in die Zellen endocytiert werden.

Für alle Transfektionsexperimente wurden ausschließlich vitale gut wachsende Zellen verwendet, die zum Zeitpunkt der Transfektion semikonfluent gewachsen waren. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro 60 mm Gewebekulturschale ausgesät. Die Gewebekulturschalen enthielten zur späteren Fixierung der Zellen sterile Deckgläschen, auf denen die Zellen wuchsen. Die Transfektion mittels SuperFect wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS-d gewaschen und 10 min in 2%igem Paraformaldehyd (in PBS) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten mit einem Tropfen DABCO-Lösung auf einem Objektträger gebettet und mit Fixogum versiegelt. Die Zellen wurden in einem Olympus BH-2 Fluoreszenzmikroskop mit FITC-Filterblock betrachtet und mit einer SC-35 Typ 12-Kamera photographiert.

### 3.1.4 Etablierung von Zelllinien aus Ad12-induzierten Hamstertumoren

Um Zelllinien aus Ad12-induzierten Hamstertumoren zu etablieren, wurde ein Teil des isolierten Tumors durch ein Milzsiebchen mit einer Maschenweite von 200  $\mu\text{m}$  in eine sterile Petrischale gepreßt. Das Siebchen wurde mehrmals mit 5 ml Dulbecco Medium gespült, das schließlich mit 20% FCS versetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen in eine 12,5 ml Gewebekulturflasche mit Filterdeckel überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden täglich mit PBS gewaschen. Nach 2 - 3 Tagen gingen die Zellen wieder in die Wachstumsphase über und wurden auf größere Gewebekulturflaschen verteilt, sobald sie konfluent gewachsen waren. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

## **3.2 Arbeiten mit Bakterien**

### **3.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien**

Zur Vermehrung von Plasmid-transformierten Bakterien wurden Einzelkolonien oder wenige Mikroliter einer Glycerinkultur in 2 ml LB-Medium, das das zur Selektion notwendige Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin) enthielt, angeimpft und 16 h bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur konnte eine Glycerinkultur angelegt werden, indem die Bakterienkultur mit Glycerin im Verhältnis 1 : 1 versetzt und in Cryoröhrchen bei -20°C über Monate hinweg aufbewahrt wurde.

### **3.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien**

(Hanahan, 1983)

Zur Herstellung von kompetenten Bakterien wurden 1 - 2 ml einer Übernachtskultur in 25 ml vorgewärmtem SOB-Medium angeimpft und solange bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte bei  $\lambda = 600$  von 0,7 erreicht wurde. Dann wurde die Bakterien-suspension 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2.500 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert (Heraeus Labofuge GL). Das Bakteriensediment wurde in 8,3 ml kaltem TFB-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien unter denselben Bedingungen zentrifugiert und in 2 ml kaltem TFB-Puffer aufgenommen, so daß etwa eine Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^9$  Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurde die Bakterien-suspension mit 70 µl DnD-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, bevor nochmals 70 µl DnD-Lösung hinzugefügt wurde, um eine Endkonzentration der DnD-Lösung von 7% zu erreichen. Entweder wurden dann die Bakterien direkt zur Transformation verwendet oder aliquotiert bei -80°C gelagert.

### **3.2.3 Transformation kompetenter Bakterien**

Unter einer Transformation versteht man das Einbringen nackter DNA in vorbehandelte d.h. kompetente Zellen. Jeweils 5 µl eines Ligationsansatzes oder 100 pg Plasmid DNA wurden mit 200 µl kompetenten Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 s auf 42°C erwärmt (Hitzeschock) und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden dann mit 800 µl 37°C warmen SOC-Medium versetzt und 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jeweils 200 µl des Transformationsansatzes

wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten, die gegebenenfalls mit IPTG und X-Gal versetzt waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.3 Virusvermehrung und Virusisolierung**

#### **3.3.1 Virusvermehrung in Einzelschichtkulturen**

Adenovirus Typ 12 (Ad12) wurde entweder auf HeLa oder auf KB Zellen vermehrt. Zunächst wurde das Medium der 1/2- bis 1/3-konfluent gewachsenen Zellen bis auf 1/5 seines Ausgangsvolumens verworfen. Die Zellen wurden dann mit 20 - 30 plaque forming units (pfu) Ad12-Virionen pro Zelle infiziert und zur Adsorption der Viruspartikel an die Zellen 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Dulbecco Medium gewaschen und dann mit frischem Medium bei 37°C inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet. Eine erfolgreiche Infektion war am cytopathischen Effekt (cpe) erkennbar. Der cytopathische Effekt ist dadurch gekennzeichnet, daß sich die Zellen abrunden und kettenförmig vom Boden ablösen.

Zur Ernte wurden die Zellen vorsichtig vom Gefäßboden abgeklopft und in einer Sorvall-Zentrifuge (GSA-Rotor) bei 8.000 rpm und 4°C 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde bei 4°C in 2 ml Tris-Saline resuspendiert und die Zellen entweder direkt zur Virusisolierung weiter aufgearbeitet, wie unter 3.5 beschrieben, oder bei -20°C als Rohextrakt gelagert.

#### **3.3.2 Virusisolierung**

Die Virionen wurden aus den Zellen isoliert, indem die Zellen zweimal 3 min bei 80 Watt in einem Eisbad sonifiziert wurden. Nachdem mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops sichergestellt worden war, daß alle Zellen aufgebrochen waren, wurden die Zelltrümmer sedimentiert (Labofuge GL, 5.000 rpm, 10 min, 4°C). Die im Überstand enthaltenen Virionen wurden durch eine Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt. Dazu wurde der Überstand in Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen (SW60) überführt und mit 0,5 g/ml CsCl (Refraktionsindex  $n = 1,3668$ ) versetzt. Die anschließende Gleichgewichtszentrifugation wurde in einer Ultrazentrifuge 16 - 24 h bei 40.000 rpm und 4°C durchgeführt. Die Virionen bildeten eine Bande, die mit Hilfe eines Halogen-Punktstrahlers gut sichtbar war. Diese Virus-Bande wurde ausgetropft, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4°C gelagert.

### 3.3.3 Bestimmung der Konzentration und Infektiösität des Virus

Die Konzentration von Viruspartikeln in Lösung wurde durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  mit einem Spektralphotometer bestimmt. Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 etwa  $2 \times 10^{10}$  pfu/ml (Burlingham und Doerfler, 1971). Die so berechnete Infektiösität gilt jedoch nur für frisch präparierte Virusinokula, da mit der Zeit die Infektiösität bei gleichbleibender  $OD_{260}$  sinkt. Aus diesem Grund wurden Virussuspensionen vor Gebrauch auf ihre Infektiösität getestet, indem Zellen mit verschiedenen Mengen des Inokulums infiziert wurden.

## 3.4 Extraktion und Reinigung von genomischer DNA

Zur Isolierung von Nukleinsäuren wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die gewählte Methode war dabei von der Art der zu isolierenden Nukleinsäuren und ihrem späteren Verwendungszweck abhängig.

### 3.4.1 Präparation genomischer DNA aus Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden dreimal mit Tris-Saline gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 2 - 3 ml TSM-Puffer aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde bei RT 5 - 10 min inkubiert und anschließend 5 min lang bei 3.000 rpm zentrifugiert (Heraeus Labofuge GL). Das Zellsediment wurde in 2 ml TES-Puffer resuspendiert, mit jeweils 1/10 Volumen Proteinase K (10 mg/ml) und SDS (10%) versetzt und über Nacht unter Rotation bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K durch 20 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen RNaseA (10 mg/ml) und 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die RNA abgebaut. Zur Entfernung der Proteine wurde anschließend eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Das Prinzip basiert dabei 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, zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1 : 1) und einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. In jedem Schritt wurde das Gemisch 10 - 20 min unter Rotation bei RT inkubiert und anschließend zur Phasentrennung bei 3.000 rpm und RT 5 min zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige wäßrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Ethanolfällung wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA photometrisch bestimmt (3.8).

### 3.4.2 DNA-Extraktion aus Organen und Tumoren

Die Organe und die Tumorgewebe wurden nach der Entnahme aus den Versuchstieren sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

Die Organe wurden mit sterilen Einmalskalpellen in Kunststoffpetrischalen zerkleinert. Dadurch wurde die Oberfläche des aufzuschließenden Gewebes vergrößert und somit gewährleistet, daß die Zellen direkten Kontakt zum Aufschlußpuffer erhielten, um postmortale DNA-Abbauvorgänge zu reduzieren. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebeproben in 3 - 5 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und über Nacht unter Rotation bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion, wie unter 3.4.1 beschrieben, gereinigt, wobei je nach Gewebeart zusätzliche Extraktionsschritte durchgeführt wurden. Nach der letzten Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt (3.4.6).

Das Tumorgewebe wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser pulverisiert und anschließend in 3 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und wie die Organe weiter behandelt.

### 3.4.3 DNA-Extraktion aus gereinigten Leukocyten

Die unterschiedlichen Blutzellen wurden durch Zentrifugation in einem Ficoll-Dichtegradienten getrennt. Hierzu wurden zunächst 3 ml Ficoll-Isopaque<sup>R</sup> in ein 10 ml Leucosep<sup>R</sup>-Röhrchen gegeben und 30 sec bei 1.700 rpm zentrifugiert (Sorvall TC6). Die Leucosep<sup>R</sup>-Röhrchen enthalten eine Filterscheibe, die die Entnahme der Leukocytenfraktion vereinfacht. Das mit EDTA versetzte Vollblut wurde bis zu einem Gesamtvolumen von 3 ml mit PBS verdünnt und über das Ficoll-Isopaque<sup>R</sup> geschichtet. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1.700 rpm bildete sich im Leucosep<sup>R</sup>-Röhrchen folgende Schichtung von oben nach unten: Plasma-Leukocyten-Filterscheibe-Ficoll-Erythrocyten. Zuerst wurde das Plasma mit einer Pasteurpipette abgenommen und anschließend die Leukocytenfraktion, die noch zweimal mit PBS gewaschen wurde.

Die DNA wurde anschließend aus der Leukocytenfraktion extrahiert, indem zunächst, wie unter 3.4.2 beschrieben, ein Zellaufschluß durch Proteinase K-Lösung und SDS und anschließend eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt wurden. Alternativ wurde die DNA über das Blood-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert.

### 3.4.4 DNA-Extraktion aus Darminhalten und Kot

Die einzelnen Darminhalte und Kotproben wurden über Nacht in jeweils 3 - 5 ml Aufschlußpuffer bei 37°C unter Rotation inkubiert. Da Darminhalte und Kotproben viel mehr verunreinigt waren als Organproben, wurde bereits vor der RNaseA-Behandlung eine erste Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die aus folgenden Schritten bestand: zweimal Phenol, zweimal Phenol/Chloroform und einmal Chloroform. Nach dieser ersten Extraktion sollte die wäßrige Lösung klar geworden sein und wurde erst dann mit RNaseA, wie unter 3.4.1 beschrieben, behandelt. Anschließend wurden noch ein Phenol/Chloroform- sowie zwei weitere Chloroformschritte durchgeführt, um sowohl die RNaseA als auch die freigewordenen Ribonukleotide aus der wäßrigen Phase zu extrahieren. Dann wurde die in der wäßrigen Phase befindliche DNA mit Ethanol gefällt (3.4.6) und anschließend in 200 µl TE aufgenommen.

Trotz der erweiterten Phenol/Chloroform-Extraktion befanden sich immer noch Verunreinigungen in den DNA-Proben, die eine weitere Untersuchung der DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verhinderten. Deswegen wurde die DNA noch zusätzlich über Siliziumoxid aufgereinigt (Boom et al., 1989). Das Prinzip basiert auf einer Bindung von Nukleinsäuren an Silikaoberflächen in Gegenwart von hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen, wie z.B. von Guanidiniumsalz. Die DNA (50 µl) wurde mit 900 µl Lösungspuffer gemischt und nach Zugabe von 40 µl wäßriger Siliziumoxidlösung 10 min 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%igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Sediment getrocknet war, wurde es in 1 ml TE resuspendiert und die DNA bei 56°C 10 min eluiert. Nach Zentrifugation wurde die DNA-haltige wäßrige Phase abgenommen und die DNA mit Ethanol gefällt (3.4.6).

### 3.4.5 DNA-Extraktion aus Pflanzen

(Doyle und Doyle, 1990)

Zur Extraktion von DNA aus Pflanzen, wurden 10 g pflanzlichen Ausgangsmaterials in kleine Stücke geschnitten und anschließend mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Nachdem der flüssige Stickstoff vollständig verdampft war, wurde das Pulver in 50 ml CTAB-Puffer aufgenommen, der vorher mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,2%) versetzt worden war. Die Suspension wurde bei 60°C 30 min inkubiert und dabei gelegentlich geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat mit gleichem Volumen Chloroform versetzt und für 20 min unter Rotation inkubiert. Zur

Phasentrennung wurde das Gemisch bei 4.000 rpm 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 0,8 Volumen Isopropanol gefällt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA bei 4.000 rpm 20 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 500 µl TE/RNaseA-Lösung (20 µg/ml RNaseA) aufgenommen und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion der DNA (3.4.1). Zum Schluß wurde die DNA in 500 - 1000 µl TE resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### **3.4.6 Ethanolfällung**

Die in einer Lösung enthaltene DNA wurde präzipitiert, indem die Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2 - 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 min abzentrifugiert, einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE resuspendiert und bei 4°C gelagert. Sollte die DNA in Ligations- oder DNA Sequenzierungsreaktionen eingesetzt werden, so wurde sie in Wasser resuspendiert.

## **3.5 Präparation von Virus DNA**

Zur Extraktion der Virus DNA wurde zunächst das bereits einmal im CsCl-Gradienten gereinigte Virus noch zweimal einer CsCl-Gleichgewichtszentrifugation unterzogen (3.3.2). Die isolierte Virussuspension wurde zur Entfernung des CsCl bei 4°C gegen TE dialysiert. Zum Aufschluß der Virushülle wurde die Lösung mit 1/10 Volumen Proteinase K (10 mg/ml) und 1/20 Volumen SDS (20%) versetzt und 2 - 3 h bei 37°C unter Rotation inkubiert. Danach wurde die DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Nach einer Ethanolfällung wurden die Konzentration und die Reinheit der Virus DNA photometrisch bestimmt (3.4.6 und 3.8).

## **3.6 Präparation von Plasmid DNA**

### **3.6.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA durch Kochlyse**

(Holmes und Quigley, 1981)

Eine Bakterienkolonie wurde in 3 ml dYT Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml abgenommen und die Bakterien 1 min bei 13.000 rpm in einer Standard Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde zum Zellaufschluß in 400 µl STET-Lösung und 30 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) vollständig resuspendiert. Nach dreiminütiger Inkubation bei 96°C im Wasserbad wurde die Zellsuspension zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, RT), um chromosomale DNA und Zelltrümmer von der Plasmid DNA abzutrennen. Die im Überstand enthaltene Plasmid DNA wurde mit 30 µl Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl Isopropanol versetzt und anschließend bei 13.000 rpm 12 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 30 µl RNase-Wasser (0,3 µg/µl) aufgenommen. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die DNA bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

### **3.6.2 Präparation von Plasmid DNA über CsCl-Dichtegradienten**

(Clewell und Helinski, 1972)

Mit Hilfe einer sterilen Pipette wurde eine Bakterienkolonie in 50 ml LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, überimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in einen Erlenmeyerkolben mit 1 Liter LB-Medium (mit Antibiotikum) überführt und wiederum unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 30 min bei 3.000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Cryofuge 5.000). Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskaltem TE resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 11 ml einer kalten Sucroslösung resuspendiert und nach Zugabe von 3 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) 5 min lang unter mehrmaligem Schütteln auf Eis inkubiert. Lysozym hydrolysiert als Muramidase den Mureinsacculus der Bakterienzellwand und bewirkt so den Aufschluß der Bakterienzelle. Im Anschluß wurde nach Zugabe von 5 ml einer 250 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) der Ansatz weitere 5 min auf Eis inkubiert. Der vollständige Aufschluß der Bakterienzellen wurde durch den Zusatz von 17 ml Tritonlösung und 15 minütiger Inkubation auf Eis erreicht. Danach wurden die

Zelltrümmer und die genomische DNA bei 4°C und 25.000 rpm in einer Beckmann-Zentrifuge (SW28-Rotor) abzentrifugiert. Der klare, teilweise viskose Überstand, der die Plasmid DNA und Teile der zellulären DNA enthielt, wurde mit 0,949 g/ml Cäsiumchlorid versetzt ( $n = 1,395$ ). Nach Zugabe von 1 ml Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) wurde der Ansatz in ein VTi-50-Röhrchen überführt und 20 - 24 h in einer Ultrazentrifuge bei 40.000 rpm und 20°C zentrifugiert. Über den sich bildenden Dichtegradienten erfolgte eine erste Trennung der Plasmid DNA von der verbliebenen Bakterien DNA. Die Plasmid DNA hatte während der Zentrifugation entsprechend ihrer Schwebedichte eine Bande im Gradienten gebildet, die unter UV-Licht gut sichtbar war und unterhalb der zellulären DNA-Bande lag. Manchmal wurden neben der Hauptbande zusätzlich eine oder zwei dünnere Banden sichtbar, die auf die unterschiedlichen Plasmid-Formen (ccc, nickt, linearisiert) zurückzuführen sind. Die Hauptbande (ccc-Form) wurde mit einer Spritze abgezogen. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Plasmid DNA in ein VTi-65 Röhrchen überführt und erneut bei 40.000 rpm 20 - 24 h zentrifugiert. Die Plasmid-Bande des zweiten Gradienten wurde unter UV-Licht ausgetropft und zur Entfernung des Ethidiumbromids drei- bis viermal mit Isopropanol (gesättigt mit 5 M NaCl) extrahiert. Um die Plasmid DNA von den Salzen zu reinigen, wurde die DNA-haltige Lösung mehrere Tage gegen TE dialysiert, wobei der Dialysepuffer täglich gewechselt wurde. Die erhaltene DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **3.7 Präparation von RNA**

#### **3.7.1 Präparation von gesamtzellulärer RNA aus Zellen**

Zur Reinigung von gesamtzellulärer RNA wurde das RNeasy Mini- oder Midi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Prinzip basiert auf einer Guanidiniumisothiocyanat-Extraktion, bei der die RNA durch Affinitätschromatographie an eine anionische Matrix gebunden wird. Zur Mini(Midi)-Präparation wurden entsprechend  $3 \times 10^6$  Zellen ( $3 \times 10^7$  Zellen) eingesetzt, die nach zweimaligem Waschen mit PBS-d mittels Trypsin vom Gewebeschalensboden abgelöst und, wie unter 3.1.1 beschrieben, abzentrifugiert wurden. Das Zellsediment wurde nach Herstellerangaben verarbeitet und zuletzt die RNA in 30  $\mu$ l (200  $\mu$ l) RNase-freiem Wasser eluiert. Hierbei wurden RNA-Konzentrationen von 1 - 5  $\mu$ g/ $\mu$ l (150 - 400  $\mu$ g/ $\mu$ l) erreicht.

### 3.7.2 Präparation von gesamtzellulärer RNA aus Organen

Die Extraktion von gesamtzellulärer RNA aus Organen unterscheidet sich von der Isolierung aus Zellen nur darin, daß die Organe zunächst im Porzellanmörser pulverisiert wurden. Zur Mini(Midi)-Präparation wurden 20 mg (200 mg) Gewebe eingesetzt, die zunächst unter flüssigem Stickstoff pulverisiert wurden. Nach Zugabe des mitgelieferten Lysispuffers wurde die Lösung homogenisiert, indem sie mehrfach durch eine Kanüle (21 Gauge) gezogen wurde. Dadurch wurde die hochmolekulare DNA geschert und die Lösung verlor an Viskosität, als wichtige Voraussetzung für die weitere Präparation. Muskelgewebe wurde zusätzlich mit Proteinase K (200 µg/ml) 20 min bei 55°C verdaut, um die zahlreichen kontraktilen Proteine abzubauen, die die RNA Extraktion störten. Zuletzt wurde die RNA in 30 µl (200 µl) RNase-freiem Wasser eluiert. Hierbei wurden RNA-Konzentrationen von 0,8 - 3 µg/µl (100 - 400 µg/µl) erreicht.

### 3.8 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260$  nm ( $OD_{260}$ ) und  $\lambda = 280$  nm ( $OD_{280}$ ). Dabei wurde die Nukleinsäure-haltige Lösung in TE pH 7,5 verdünnt, da die Absorption vom pH-Wert abhängig ist.

Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht: 50 µg/ml doppelsträngige DNA, oder

40 µg/ml RNA (Kaiser und Hogness, 1960)

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-haltigen Lösung wurde durch den Extinktionsquotienten  $R = OD_{260}:OD_{280}$  ermittelt. Reine Nukleinsäure Präparationen besitzen einen Quotienten  $R = 1,8 - 2,0$  in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5. Lag der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, konnte man von einer nahezu proteinfreien DNA-Lösung ausgehen.

### 3.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung der aufgereinigten Plasmide wurden diese mit Restriktionsendonukleasen (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 Units RE und 2 µl des vom

Hersteller mitgelieferten 10 x Puffers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die RE durch Zugabe von 2 mM EDTA (pH 7,5) und Inkubation bei 75°C 10 min inaktiviert.

Genomische DNA wurde mit RE gespalten, indem 10 - 30 µg DNA mit 7 - 10 Units der jeweiligen RE pro Mikrogramm genomischer DNA 5 - 8 h bei 37°C inkubiert wurden. Das Volumen des Restriktionsansatzes betrug dabei mindestens das 10fache der eingesetzten Enzym-Menge.

### **3.10 Agarose-Gelelektrophorese**

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 dabei eine bessere Trennung von DNA-Fragmenten im niedermolekularen Bereich. Die Elektrophoresen wurden entweder in Mini-Gelkammern (86,3 x 10 cm) oder in Flachbett-Kammern, sog. „Submarines“ (20 x 20 cm), mit 1 x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenauftragungspuffer versehen und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei genomischer DNA bei 20 - 40 Volt 16 h lang, bei Plasmid DNA in Mini-Gelkammern bei 70 - 90 Volt 1 - 2 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) gefärbt und in Wasser entfärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen der Nukleinsäure und emittiert im UV-Bereich orangefarbenes Licht. Die so gefärbten Gele wurden im UV-Licht photographiert.

### **3.11 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 doppelsträngigen Probe hybridisiert. Somit können gelelektrophoretisch getrennte DNA-Sequenzen identifiziert werden. Die Technik kombiniert das Auflösungsvermögen der Agarose-Gelelektrophorese und die Nachweisempfindlichkeit der Nukleinsäure-Hybridisierung.

### 3.11.1 Transfer (Blotting)

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurde das Gel zunächst unter leichtem Schwenken in 0,25 M HCl-Lösung inkubiert, bis die Farbe des Bromphenolblauamarkers nach gelb umschlug. Dieser Schritt erhöhte die Transfargeschwindigkeit und Effizienz von großen DNA-Molekülen, da durch das partielle Depurinieren Einzelstrangbrüche in die Doppelhelix eingeführt wurden. Anschließend wurde das Gel zur Denaturierung der DNA unter leichtem Schwenken solange in 0,4 M NaOH inkubiert, bis der Bromphenolblauamarker wieder seine ursprüngliche blaue Farbe hatte. 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 6 - 16 stündigem Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 2 x SSC geschwenkt und zur Fixierung der DNA 2 h bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran entweder bei RT gelagert oder prähybridisiert.

### 3.11.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Für die radioaktive Markierung von DNA wurde die Methode des "Oligo-labeling" angewendet. Hierbei wird die zu markierende DNA zunächst denaturiert, anschließend werden Oligodesoxyribonukleotide mit "zufälliger" Sequenz hinzugegeben. Diese Oligomere binden an "zufälligen" Stellen im jeweiligen DNA-Molekül und dienen als Primer für die DNA-Synthese des Gegenstrangs 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 min bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, um ein Renaturieren der Einzelstränge zu verhindern. Durch Zugabe von 5 x OLB-Puffer, 400 µg/ml BSA, 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, je 400 µM der unmarkierten dATP, dGTP, dTTP sowie 2 Units 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 Gegenstrangs. Der Ansatz wurde 2 - 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend über eine Sephadex G-50 Säule abzentrifugiert, um die nicht eingebauten radioaktiv markierten Desoxyribonukleosid-

Triphosphate durch Gelfiltration abzutrennen. Die markierte DNA, die sich im Eluat befand, wurde dann der Hybridisierungslösung zugesetzt.

### 3.11.3 Hybridisierung mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-markierten Sonden

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 - 3 h in einem Rollschrank bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch Hybridisierungslösung ersetzt, die die radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt, und die Membran 16 - 20 h bei 68°C im Rollschrank inkubiert. Prähybridierungs- und Hybridisierungslösung wurden vor dem Gebrauch 10 min aufgekocht und dann auf Eis 5 - 10 min abgekühlt. Um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wurde die Membran nach der Inkubation mit der radioaktiv markierten DNA zweimal 20 min in 2 x SSC/0,1% SDS sowie zweimal 30 min 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.

## 3.12 Polymerase-Kettenreaktion

(Saiki et al., 1988)

Zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 100 - 800 ng genomische DNA mit 100 ng der beiden Oligonukleotidprimer (Länge 19 - 21 bp), 1 - 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 Units Taq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffers in einem Volumen von 50 µl (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler PE 480, mit Mineralöl überschichtet) bzw. 25 µl (Perkin Elmer GeneAmp 2400/9600) aufgenommen. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	94°C	5 min
2	Denaturierung	94°C	0,5 min
3	Primer-Bindung	59 - 61°C	1 min
4	Polymerisation	72°C	0,5 - 1 min
5	Polymerisation	72°C	5 - 10 min
6		4°C	

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

### 3.13 RT-PCR

Die RT-PCR wurde zum Nachweis der Transkription bestimmter Gene eingesetzt. Bei der RT-PCR erfolgt zuerst durch die Reverse Transkriptase eine cDNA-Erststrangsynthese mit RNA als Matrize. Das Produkt dieses ersten Reaktionsschrittes, ein DNA/RNA-Doppelstrang, wird in der sich anschließenden PCR als Matrize verwendet. Zur RT-PCR Amplifikation wurde das Access RT-PCR System (Promega, Mannheim) verwendet. Hierzu wurden 100 - 200 ng Gesamt RNA in Pufferbedingungen nach Herstellerangaben mit je 10 mM dNTP, 100 ng je Primer, 1 - 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 Units AMV Reverse Transkriptase und 5 Units Tfl DNA-Polymerase versetzt.

In einem Perkin Elmer GeneAmp 9600 wurde zunächst 45 min bei 48°C der erste cDNA-Strang durch den rückwärts gerichteten Primer synthetisiert. Hierbei wurde ein Primer verwendet, der neben einem Oligo (dT)-Schwanz auch noch 4 spezifische Basen des entsprechenden Transkriptes enthielt, um sicherzustellen, daß ausschließlich RNA als Matrize diente und zusätzlich selektiv das gewünschte Transkript in cDNA umgeschrieben wurde. Im Anschluß wurde im gleichen Reaktionsgefäß eine PCR nach dem unten aufgeführten Programm durchgeführt. Als Kontrolle wurde jede Reaktion auch ohne die Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt, um zu untersuchen, ob möglicherweise auch DNA als Matrize diente und falsch positive Ergebnisse lieferte. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert. Zur Identifikation der cDNA wurden die entsprechenden Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten, eluiert und in einen pGEM-T Vektor subkloniert und sequenziert.

Schritt Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	cDNA-Synthese	48°C	45 min
2	Denaturierung	94°C	2 min
3	Denaturierung	94°C	0,5 min
4	Primer-Bindung	58°C	1 min
5	Polymerisation	68°C	2 min
6	Polymerisation	68°C	7 min
7		4°C	

Die Schritte 3 – 5 wurden 40 – 45 mal wiederholt.

### 3.14 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der elektrophoretischen Trennung im Agarosegel mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und 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 in Ligations-, Sequenzierungs- oder Markierungsreaktionen eingesetzt.

### 3.15 Klonierung von DNA

#### 3.15.1 Dephosphorylierung des Vektors

Die für Klonierungen verwendeten DNA-Moleküle, insbesondere die Vektoren, wurden zunächst dephosphoryliert, um deren Religasierung zu vermeiden. Nach Spaltung der Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen wurde dem Reaktionsansatz 10 Units alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIP) zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die nun dephosphorylierte Vektor DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und das getrocknete Pellet in Wasser aufgenommen.

### **3.15.2 Ligasierung von DNA**

Die dephosphorylierte Vektor DNA und das zu klonierende DNA-Fragment wurden im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 10 gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 8 µl gebracht. Nachdem der Ansatz mit 1 µl 10 x Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase versetzt worden war, wurde er über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **3.15.3 T-Vektor Klonierungs-System**

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das T-Vektor Klonierungs-System der Firma Promega (Mannheim) eingesetzt. Der dabei verwendete pGEM-T Vektor lag linearisiert vor und trug überhängende Thymidinreste an den Enden. Da die Taq DNA-Polymerase üblicherweise bei einem Überschuß an freien dNTPs einen Adenosinrest an die synthetisierten DNA-Stränge bindet, kommt es zu einer Basenpaarung zwischen dem PCR-Produkt und dem Vektor. Die Ligation fand nach Angaben des Herstellers statt.

## **3.16 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchsmethode (Sanger et al., 1977) mit Fluorochrom markierten-ddNTPs durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurden 1 µg Plasmid DNA bzw. 100 - 200 ng aufgereinigter PCR-Produkte, 50 ng Primer und 4 µl "Big Dye Terminator Mix" (Applied Biosystems) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Angaben des Herstellers. Nach Beendigung der Reaktionen wurden 50% der Sequenzreaktionen auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels eines ABI 377 Sequenzierungsautomaten (Perkin Elmer) mit zugehöriger Datenverarbeitung analysiert.

## **3.17 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

### **3.17.1 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 Standard Reaktion 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 je nach Größe der eingesetzten DNA 70 - 90 min bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Größe der entstandenen Fragmente kontrolliert. Hierzu wurden 2 µl des Ansatzes mit Probenauftragungspuffer versetzt, 3 min bei 95°C denaturiert und auf ein 1,2%iges Agarose-Minigel aufgetragen. Betrug die Größe der Fragmente 200 - 500 bp, so wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 10 minütiger Inkubation bei 65°C abgestoppt. Waren die Fragmente noch größer als 500 bp, so wurde der Reaktionsansatz für weitere 5 - 10 min bei 16°C inkubiert. Die markierte DNA wurde nach Zugabe der 50fachen Mengen an t-RNA und hochreiner gescherter unspezifischer DNA (Lachsspermien-DNA) mit Ethanol präzipitiert und nach dem Trocknen des DNA-Pellets in 20 µl Wasser aufgenommen.

### **3.17.2 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 4 Verdünnungen in Zehnerschritten (1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl und 1 pg/µl) in Dot-Blot-Verdünnungspuffer hergestellt. Je 1 µl der verdünnten DNA wurde auf eine ungeladene Nitrozellulose-Membran aufgetropft, die anschließend zur Fixierung der DNA 1 h bei 80°C inkubiert wurde. Die Membran wurde dann in Blocking-Lösung 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Nach kurzem Waschen der Membran in Dot-Blot-Puffer I wurde die Membran 30 min mit dem Antikörper Anti-Biotin Alkalische Phosphatase hybridisiert, der 1 : 500 in Dot-Blot-Puffer I verdünnt war. Die Membran wurde anschließend zweimal 15 min in Dot-Blot-Puffer I gewaschen und 2 min in Dot-Blot-Puffer II äquilibriert. Für die abschließende Farbreaktion wurde die Membran in Farblösung (200 µl NBT in Dot-Blot-Puffer II) einige Stunden im Dunkeln inkubiert. Bei erfolgreicher Biotinylierung sollten sämtliche DNA-Verdünnungen auf der Membran zu erkennen sein.

### **3.17.3 Anfertigung von Paraffin Gewebeschnitten**

Das frisch entnommene Gewebe wurde zunächst in 4%iger Formaldehyd-Lösung (in PBS) für mindestens 12 h bei RT fixiert. Im Anschluß wurde das Gewebe mit Hilfe eines vollautomatischen Fixierungsautomaten (Tissue Tek VIP, Vogel) folgendermaßen behandelt: Zunächst wurde das Gewebe in Formalin (4%iges Formaldehyd) 1 h bei 40°C fixiert, dann in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe 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 frischem Paraffin ausgegossen und auf einer Kühlplatte bei  $-15^{\circ}\text{C}$  erhärtet.

Von den in Paraffin-Blöckchen eingebetteten Geweben wurden dann mit einem Rotationsmikrotom 1 - 3  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst auf einem Wasserbad ( $55^{\circ}\text{C}$ ) gestreckt und dann auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger aufgezogen.

#### **3.17.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten**

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst 30 min bei  $58^{\circ}\text{C}$  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 Ethanol-Reihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30%) rehydriert und anschließend je 5 min in einer 0,86%igen NaCl-Lösung bzw. in 1 x PBS inkubiert. Danach wurden die Schnitte in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung 20 min fixiert, zweimal 5 min in PBS gewaschen und 35 min mit Proteinase K-Lösung (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Die Proteinase K baute dabei Proteine der Zellmembran ab, so daß die Hybridisierungssonde in die Zellen gelangen konnte. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in 1 x PBS gewaschen und dann 5 min in Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Das Gewebe wurde dann nochmal in 1 x PBS gewaschen, in 0,86%iger NaCl-Lösung inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% und 100%) jeweils 2 min dehydriert.

Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurden 50 - 100 ng der biotinylierten Hybridisierungssonde, die zuvor in Hybridisierungspuffer aufgenommen worden war, in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  auf den Objektträger aufgetragen. Auf die Objektträger wurden silikonisierte Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt und die genomische DNA zusammen mit der DNA-Sonde auf einem Heizblock 6 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Anschließend wurden die Präparate sofort auf einer  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Glasplatte abgekühlt, mit Fixogum versiegelt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach Entfernen der Deckgläschen zweimal in 2 x SSC bei  $20^{\circ}\text{C}$  und einmal in 0,1 x SSC bei  $42^{\circ}\text{C}$  jeweils 5 min gewaschen. Um unspezifische Bindungen der im nachfolgenden verwendeten Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte mit 50  $\mu\text{l}$  Blocking-Lösung unter einem Deckgläschen bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluß wurde 30 min unter gleichen Bedingungen mit Avidin-DCS-FITC inkubiert, das 1 : 400 in 50  $\mu\text{l}$  Blocking-Lösung verdünnt wurde. Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die

Schnitte dreimal jeweils 5 min in 4 x SSC/0,1% Tween bei 42°C gewaschen.

Zur Signalverstärkung wurde zunächst 1 : 40 verdünntes biotinyliertes Anti-Avidin in 50 µl Blocking-Lösung aufgetragen und die Präparate 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde wiederum dreimal in 4 x SSC/0,1% Tween bei 42°C gewaschen, bevor erneut mit 1 : 400 verdünntem Avidin-DCS-FITC inkubiert wurde. Nachdem ein letztes Mal wie beschrieben gewaschen wurde, wurden 20 µl Konservierungslösung (DABCO) auf die Gewebeschnitte aufgebracht, die dann mit einem Deckgläschen und Fixogum luftdicht versiegelt wurden. Der Konservierungslösung wurde zuvor Propidiumiodid (200 ng/ml) zugesetzt, das ähnlich wie Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und nach Anregung orange farbenes Licht emittiert. Es diente hier zur Gegenfärbung der Zellkerne. Die Gewebeschnitte wurden in einem Olympus BH-2 Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filterblocks betrachtet und mit einer SC-35 Typ 12-Kamera photographiert.

### **3.17.5 Chromosomenpräparationen**

Der Zellzyklus der kultivierten Zellen wurde in der Metaphase der Mitose durch Colcemid gehemmt. Colcemid verhindert als Spindelgift die Ausbildung des Spindelapparates und inhibiert somit die weitere Zellteilung.

Das Medium der 1/2- bis 1/3-konfluent gewachsenen Zellen eines Monolayers (75 cm<sup>2</sup>) wurde bis auf 10 ml verworfen, die Zellen wurden mit Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) und Colcemidlösung (50 ng/ml) versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Ethidiumbromidlösung verhinderte dabei ein zu starkes Kondensieren der in der Metaphase arretierten Chromosomen. Anschließend wurde das Medium in ein 10 ml Falcon-Röhrchen abgegossen, die Zellen wurden gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in dasselbe Röhrchen überführt und bei 1.000 rpm 5 min abzentrifugiert (Sorvall TC6). Der Überstand wurde bis auf 1 ml verworfen, in dem das Zellpellet durch vorsichtiges Klopfen resuspendiert wurde. Danach wurden 10 ml einer auf 37°C vorgewärmten KCl-Lösung (0,075 mM) zugefügt und die Zellen in dieser hypotonen Lösung 20 - 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde durch die sehr geringe Salzkonzentration die Zellmembran zerstört. Es wurden 1 - 2 ml eiskalte Fixierlösung (Methanol/Eisessig 3 : 1) hinzugefügt, die eine Adhäsion der aufgequollenen Zellen verhinderte. Dann wurden die Zellkerne bei 1.000 rpm 10 min sedimentiert, der Überstand wurde bis auf 1 ml entfernt, in dem das Zellkernpellet resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 8 ml Fixierlösung wurden die Zellkerne 30 min auf Eis inkubiert und anschließend, wie beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder bis auf 1 ml verworfen, das Zellkernpellet vorsichtig

resuspendiert, mit 8 ml Fixierlösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen je nach Zelldichte in 1 - 3 ml Fixierlösung resuspendiert und mit Hilfe eines Hawoka-Balls aus einer Pasteurpipette kräftig auf einen im Ultraschallbad gereinigten Objektträger aufgespritzt.

### **3.17.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Metaphasechromosomen**

Die Chromosomen und Zellkerne auf den Objektträgern wurden 2 h bei 58°C getrocknet und anschließend 1 h mit 150 µl RNaseA-Lösung (100 µg/ml in 2 x SSC) unter einem Deckgläschen bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger viermal in 2 x SSC je 3 min bei RT gewaschen und durch jeweils 3 minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (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 x SSC) 2 min bei 80°C inkubiert wurden. Im Anschluß wurden die Chromosomen in einer eisgekühlten aufsteigenden Ethanol-Reihe (s.o.) dehydriert und wieder an der Luft getrocknet. Gleichzeitig wurde die Hybridisierungsprobe vorbereitet, indem 20 µl der biotinylierten DNA-Sonde in der entsprechenden Menge Hybridisierungspuffer aufgenommen wurden, so daß die biotinylierte Probe in einer Konzentration von 50 - 100 ng/20 µl Hybridisierungspuffer vorlag. Nachdem die Hybridisierungslösung 10 min bei 100°C denaturiert worden war, wurde sie nach kurzem Abkühlen auf Eis auf die getrockneten Objektträger pipettiert und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen und Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Am nächsten Tag wurden die Chromosomenpräparationen nach Entfernen der Deckgläschen dreimal in 50%iger Formamidlösung (in 2 x SSC) bei 42°C 5 min 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 min gewaschen. Nach der Inkubation mit der Blocking-Lösung erfolgte die weitere Behandlung parallel zur in-situ-Hybridisierung an Dünnschnittpräparaten wie unter 3.17.4 beschrieben.

---

## **3.18 Tierexperimenteller Teil**

### **3.18.1 Tierhaltung**

Für die Versuche wurden weibliche und männliche C57Bl/6 und CB20 Mäuse im Alter zwischen 1,5 und 6 Monaten verwendet. Die Tiere stammten aus hauseigener 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 Maus-Futterpellets (Altromin #1314, Lage) und hatten während der gesamten Versuchszeit freien Zugang zu Wasser.

Die Hamster der Gattung *Mesocricetus auratus* wurden zeitlich angepaart bei Charles River (Sulzfeld) bezogen und einzeln in Makrolonkäfigen der Normgröße Typ III gehalten. Die Tiere erhielten Hamster-Futterpellets (Altromin, Lage) und zusätzliches handelsübliches Körnerfutter.

### **3.18.2 Fütterung von Mäusen mit Plasmid DNA**

Den Mäusen wurde jeweils 50 µg Plasmid DNA, die in 20 µl TE gelöst war, mit Hilfe einer Gilson Pipette oral in die Mundhöhle appliziert. Kontroll-Tiere erhielten die gleiche Menge DNA-freie Pufferlösung. Zu definierten Zeitpunkten nach Verabreichung der Fremd-DNA wurden die Tiere getötet und die Organe sowie die Inhalte des Gastrointestinal-Trakts entnommen (3.18.5).

### **3.18.3 Fütterung von Mäusen mit Sojablättern**

Die Mäuse wurden 3 h vor Versuchsbeginn auf Diät gesetzt, indem ihnen die Futterpellets entzogen wurden. Anschließend wurden die Mäuse in saubere Makrolonkäfige gesetzt und mit Sojablättern als einziger Nahrungsquelle versorgt. Während der gesamten Versuchszeit hatten die Tiere Zugang zu ihrer üblichen Wasserquelle. Zu definierten Zeitpunkten während und nach der Soja Fütterung wurden die Tiere getötet und die Organe und Darminhalte entnommen (siehe 3.18.5).

### **3.18.4 Injektion von Mäusen mit Plasmid DNA**

Den Mäusen wurde jeweils 5 - 500 µg pEGFP-C1, pSVGFP oder pRSVGFP Plasmid DNA in einem Endvolumen von 50 µl intramusulär (i.m.) in die linke und/oder rechte Oberschenkelmuskulatur mittels einer 1 ml Einmalspritze mit fixierter Kanüle (12 Gauge)

injiziert. Dabei wurde die DNA entweder in Wasser, PBS, 15 mM NaCl-Lösung oder TE verdünnt. Kontroll-Tiere wurden mit entsprechenden DNA-freien Lösungen injiziert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion getötet und die Organe und Darminhalte entnommen (3.18.5).

### **3.18.5 Entnahme der Organe und der Darminhalte**

Nachdem die Tiere durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet worden waren, wurden sie in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und das Fell mit Wasser und Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die Bauchhaut geöffnet und stumpf von der Abdominalmuskulatur getrennt. Nach Absetzen der Haut wurde die Bauchhöhle mit einem neuen Satz steriler Präparationsbestecke 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 auf Eis gestellt. In die Spritze wurden 10 µl EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0) vorgelegt, um die Blutgerinnung zu hemmen.

Im Anschluß wurden die anderen Organe in folgender Reihenfolge entnommen: Leber (ohne Gallenblase), Milz, Niere, kontralateraler Muskel und injizierter Muskel. Die Organe wurden, sofern sie zur DNA-Präparation (3.4.2) verwendet werden sollten, nach Entnahme zweimal in PBS gewaschen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die nach dem Zelltod einsetzenden Abbauvorgänge durch zelleigene DNasen zu verhindern. Die Organe, die mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (3.17.4) untersucht werden sollten, wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann in 4%iger Formaldehyd-Lösung über Nacht bei RT fixiert.

Anschließend wurden die Inhalte des Gastrointestinal-Trakts (End-, Blind-, Dünndarm und Magen) mit jeweils einer sterilen Einmalskalpellklinge extrahiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **3.18.6 Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster**

Innerhalb der ersten 24 h nach der Geburt wurden die neugeborenen Hamster mit  $4,5 \times 10^3$  -  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen injiziert. Das Virus wurde dabei mit Hilfe einer Mikrotiter-Spritze (Hamilton) in einem Volumen von 10 µl subkutan, intramuskulär oder in die Leber der neugeborenen Tiere injiziert. Kontroll-Tiere wurden mit der gleichen Menge Puffer injiziert. Wegen der schlechten Markierbarkeit der Jungtiere wurde immer ein ganzer Wurf mit der gleichen Virus-Menge an den gleichen Ort injiziert. Nach der

Injektion wurden die Tiere jeden zweiten Tag auf Tumoren untersucht. Nach dem ersten ertasten eines Tumors wurde der Hamster innerhalb von 5 Tagen durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet.

### **3.18.7 Isolierung der Ad12-induzierten Tumoren**

Die Entnahme der Ad12-induzierten Tumoren erfolgte unter einer Sterilbank. Nachdem ein oder mehrere Tumoren ertastet worden waren und der Hamster durch CO<sub>2</sub> Begasung getötet worden war, wurde das Fell mit Ethanol gereinigt und der Tumor bzw. die Tumoren mit je einem sterilen Präparationsbesteck isoliert. Je nach Verwendung der Tumorgewebe wurden die Tumoren entweder zur DNA-Präparation (3.4.2) in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder aber durch ein Milzsiebchen gepreßt und die Zellen anschließend in Kultur genommen (3.1.4). Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von Gewebeschnitten (3.17.3) wurden Teile der Tumoren in 4%iger Formaldehyd-Lösung über Nacht bei RT fixiert.

## **3.19 Züchtung von Sojapflanzen**

Samen der Soja Pflanzen der Art *Jubis* wurden von der Firma Altromin (Lage) bezogen. Die Samen wurden auf Watte ausgesät und 3 - 5 Tage im Dunkeln unter einer Frischhaltefolie gehalten. In dieser Zeit bildeten sich Keimlinge, die in sandhaltige Erde gesetzt und unter sehr feuchten Bedingungen gezüchtet wurden. Nach ca. 4 Wochen hatten sich 40 cm große Soja Pflanzen entwickelt, deren Blätter zur direkten DNA-Extraktion (3.4.5) oder zur Fütterung von Mäusen (3.18.3) verwendet wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Schicksal von oral verabreichter DNA in Mäusen

#### 4.1.1 Persistenz und Expression des pEGFP-C1 Plasmids in Mäusen

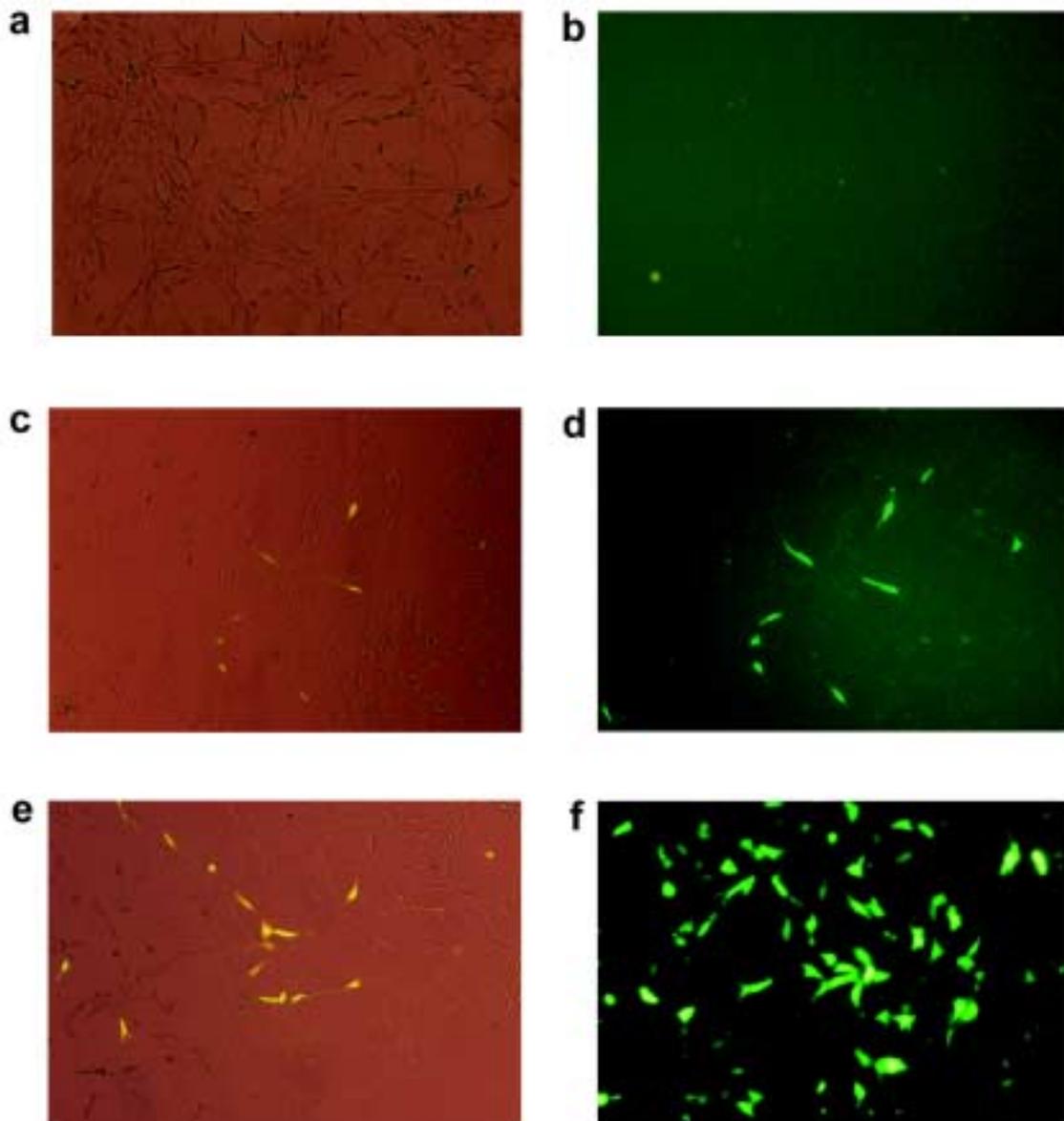
##### 4.1.1.1 pEGFP-C1 Plasmid zeigt keine Homologie zur Maus-DNA und wird in Mauszellen exprimiert

In diesem ersten Teil der Arbeit wurden die Persistenz und Expression von oral verabreichter Test-DNA in Mäusen untersucht. Frühere Untersuchungen mit der DNA des Bakteriophagen M13mp18 zeigten, daß verfütterte DNA die Passage durch den Magen-Darm-Trakt von Mäusen in fragmentierter Form überstehen kann und über das Darmepithel, Peyersche Plaques und periphere Leukocyten in innere Organe gelangen kann (Schubbert et al. 1994, 1997). In dieser Arbeit wurde eine andere Test-DNA für die Fütterungsexperimente gewählt, um zu untersuchen, ob ähnliche Ergebnisse mit anderer DNA erzielt werden können. Darüber hinaus wurde der Frage nach der Expression von oral verabreichter DNA im Mausorganismus nachgegangen.

Um die Persistenz und Expression von verfütterter DNA zu untersuchen, wurde eine Test-DNA gewählt, die keine Homologien zum Maus (*Mus musculus*) Genom und zur DNA von Darmbakterien, wie beispielsweise *E.coli*, aufweist. Zusätzlich sollte die Expression der Test-DNA möglichst einfach nachzuweisen sein. Das Gen aus der Qualle *Aequorea victoria*, das für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) codiert (Chalfie et al., 1994), erfüllte beide Kriterien. NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen ergaben, daß zwischen dem gfp Gen und dem Maus-Genom Homologien von weniger als 21 bp bestanden, die teilweise diskontinuierlich waren. Zwischen dem *E.coli* Genom und dem gfp Gen fanden sich 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. Es sei am Rande erwähnt, daß im November 2000 das Maus-Genom erst zu 5,8% publiziert war (NCBI "Mouse Genome Sequencing"). Aber auch Southern DNA-Transfer-Analysen, bei denen das gfp Gen gegen genomische Maus-DNA hybridisiert wurde, ließen keine größeren Homologien vermuten. Somit sollte die gfp DNA nach Fütterung eindeutig als Fremd-DNA im Mausorganismus erkannt werden.

Ein weiterer Vorteil des *gfp* Gens war, daß dessen Expression einfach durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu anderen Reportergenen, wie z.B.  $\beta$ -Galaktosidase oder Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT), kann die Expression von GFP ohne die Hilfe von Substratreaktionen gezeigt werden. Darüber hinaus wurde die Sensitivität des GFP-Nachweises durch den Einsatz des *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) erhöht, das sich im Vergleich zum Wildtyp GFP durch eine verstärkte Lichtemission auszeichnet (Cormack et al., 1996). Diese Mutante unterscheidet sich zum Wildtyp GFP durch den Austausch von nur zwei Aminosäuren: Phenylalanin (Position 64) ist durch Leucin und Serin (Position 65) ist durch Threonin substituiert. Im folgenden wird das verwendete EGFP Protein zur Vereinfachung als GFP Protein bezeichnet.

Die Expression des klonierten *gfp* Gens wurde zunächst in Zellkultur durch Transfektion von 3T3-Mausfibroblasten analysiert. Dazu wurden drei verschiedene *gfp*-Promotor-Konstrukte verwendet. Im pEGFP-C1 Plasmid stand das *gfp* Gen unter der Kontrolle des sehr frühen Promotors des humanen Cytomegalievirus (CMV-IE), im pRSVGFP Plasmid unter der Kontrolle des Rous Sarcomavirus (RSV)-Promotors und im pSVGFP Plasmid unterlag das *gfp* Gen der Kontrolle des Simianvirus 40 (SV40)-Promotors. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Transfektions-Experimenten, die mit DNA aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die früheste Expression von GFP wurde nach Transfektion mit dem pEGFP-C1 Plasmid (CMV-Promotor) beobachtet. Schon 4 h nach Transfektion zeigten etwa 2% der Zellen eine deutliche Fluoreszenz (Abbildung 3d), die nach Transfektion mit dem pRSVGFP Plasmid nach 6 h und mit dem pSVGFP Plasmid erst 8 h nach Transfektion beobachtet wurde. Nach 24 h zeigten wiederum diejenigen Zellen die stärkste Fluoreszenzintensität, die mit dem CMV-GFP-Konstrukt transfiziert worden waren (Abbildung 3f). Die Transfektionseffizienz hing im starken Maße von der Qualität der transfizierten DNA ab, war aber im Durchschnitt nach Transfektion mit dem CMV-GFP-Konstrukt am höchsten (Tabelle 1). Somit exprimieren zumindest die untersuchten Mauszellen in Kultur das *gfp* Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors am schnellsten und am stärksten. Diese Ergebnisse geben möglicherweise einen Hinweis auf die Stärke der Expression des *gfp* Gens in Abhängigkeit von den verschiedenen Promotoren im Mausorganismus *in vivo*. Es ist jedoch zu erwarten, daß die Expression von GFP *in vivo* stark vom jeweiligen Gewebe sowie zahlreichen anderen Faktoren, wie beispielsweise der Teilungsaktivität der Zelle, abhängt (Wolff et al., 1992b).



**Abbildung 3:** Expression von GFP in 3T3-Mausfibroblasten.

Auf Deckgläschen wachsende 3T3-Fibroblasten wurden mittels SuperFect mit dem pEGFP-C1 Plasmid transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Transfektion wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert und unter Durchlicht (a, c, e) bzw. Fluoreszenzlicht (b, d, f) betrachtet: (a, b) mock transfizierte Zellen, (c - f) transfizierte Zellen (c, d) 6 h, (e, f) 24 h nach Transfektion mit dem pEGFP-C1 Plasmid.

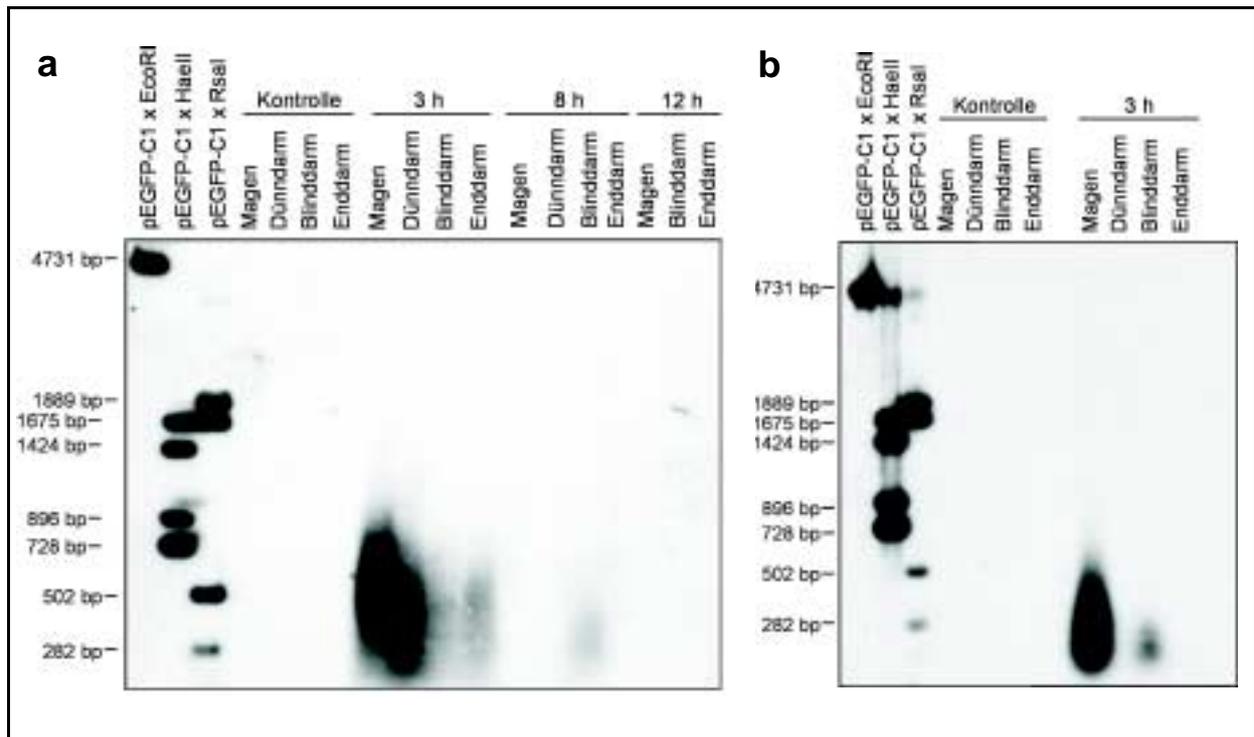
Promotor	CMV	SV	RSV
Zeit	Transfektions-effizienz	Transfektions-effizienz	Transfektions-effizienz
4 h	2%	0	0
6 h	18%	0	1%
8 h	51%	8%	23%
10 h	63%	43%	47%
24 h	83%	68%	74%

**Tabelle 1:** Expression des gfp Gens in 3T3-Mausfibroblasten in Abhängigkeit vom Promotor.

3T3-Mausfibroblasten wurden mit dem klonierten gfp Gen, das entweder unter der Kontrolle des CMV-, SV- oder RSV-Promotors stand, mittels SuperFect transfiziert. Die Prozentzahlen sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

#### 4.1.1.2 Persistenz des pEGFP-C1 Plasmids im GI-Trakt der Maus

Um zu untersuchen, ob und wie schnell oral verabreichte pEGFP-C1 DNA im Gastrointestinal (GI)-Trakt von Mäusen degradiert wird, wurden Mäuse einmal mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid gefüttert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Fütterung wurden die Inhalte des Magens, des Dünndarms, des Blinddarms und des Enddarms entnommen, die DNA extrahiert und 30 µg mit der Restriktionsendonuklease (RE) *PmlI* geschnitten. Die RE *PmlI* spaltet das pEGFP-C1 Plasmid nicht, da es keine Restriktionsschnittstelle enthält. Somit wurden die aus dem Darm extrahierten gfp-Fragmente *ex vivo* nicht weiter gespalten. Dennoch wurde durch die Fragmentierung der aus den Darminhalten isolierten DNA eine gute Auftrennung der DNA im Agarosegel gewährleistet. Nach elektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden die Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das radioaktiv markierte pEGFP-C1 Plasmid hybridisiert. Die Autoradiogramme von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten sind in Abbildung 4 dargestellt. Wie aus dem Autoradiogramm in Abbildung 4a ersichtlich wird, wurden Fragmente der verfütterten Plasmid DNA 3 h nach Applikation im Magen und in verschiedenen Abschnitten des Darm-Trakts nachgewiesen. Im Magen hatten die nachgewiesenen Fragmente eine Größe bis zu 1200 bp, wobei die meisten Fragmente bis zu 800 bp groß waren.



**Abbildung 4:** Nachweis der verfütterten pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt von Mäusen durch Southern Transfer-Analysen.

C57/Bl6 Mäuse wurden mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Fütterung wurde die DNA aus den Darminhalten extrahiert, gereinigt und mit *PmlI* geschnitten. Nach Trennung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Transfer auf eine Membran wurden sie gegen radioaktiv markierte pEGFP-C1 DNA hybridisiert. Als Marker diente das mit *EcoRI*, *HaeIII* oder *RsaI* gesplante pEGFP-C1 Plasmid. Die Größen der entstandenen Marker-Fragmente sind jeweils links neben dem Autoradiogramm angegeben. Kontrolltiere hatten DNA-freie Pufferlösung erhalten. (a) und (b) stellen die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

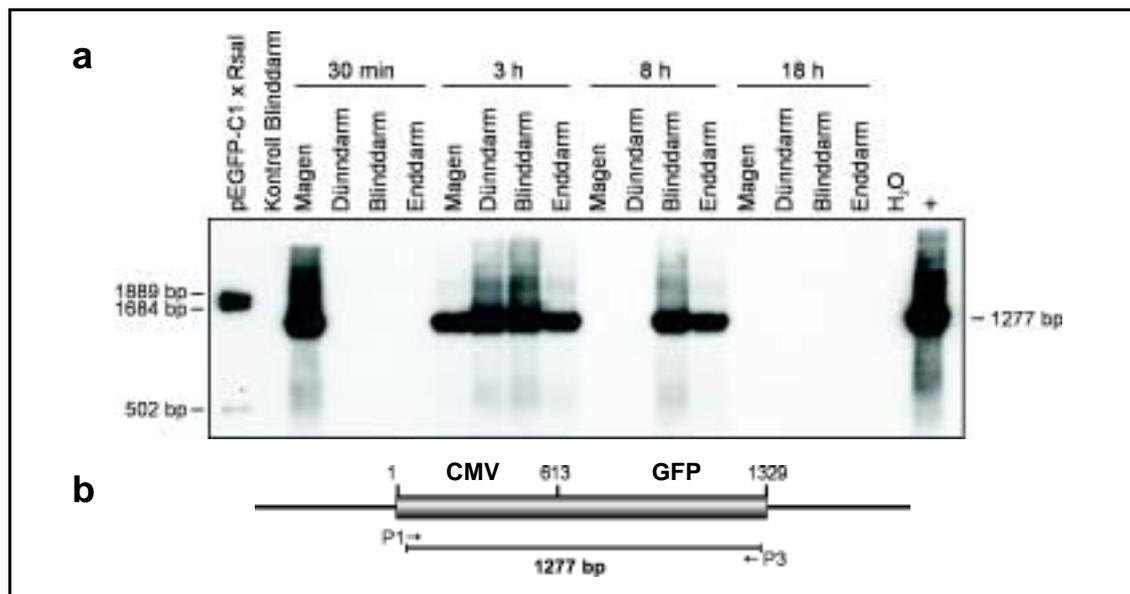
In den Darmabschnitten derselben Maus wurden 3 h nach Fütterung gfp-spezifische Fragmente mit einer Größe bis zu 700 bp detektiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Hauptanteil der DNA schon im Magen degradiert wird, höchstwahrscheinlich durch dessen saures Milieu, das je nach Nahrungszusammensetzung zwischen pH 1,8 und 4 liegt (Pfeffer, 1987). In Kontrollmäusen, die mit DNA-freier Pufferlösung gefüttert wurden, konnte die gfp DNA zu keiner Zeit und in keinem Abschnitt des GI-Trakts gefunden werden. Fragmente der Plasmid DNA waren 8 h nach Fütterung nur noch im Blinddarm nachweisbar. Die detektierten Fragmente wiesen dabei Größen bis zu etwa 550 bp auf. Demzufolge wurde die DNA im Blinddarm nicht wesentlich weiter degradiert. Diese Beobachtung korreliert mit *in vitro* Experimenten, in denen gezeigt wurde, daß mit dem Dickdarminhalt von Ratten über mehrere Stunden inkubierte DNA nur zu 90% abgebaut wird (Maturin und Curtiss, 1977).

Im Gegensatz zum Blinddarm eines Menschen ist der einer Maus, wie allgemein bei Herbivoren, gut ausgebildet. Er ist der Ort, wo große Teile pflanzlichen Materials von Mikroorganismen abgebaut werden. Etwa 85% der aus dem gesamten Darm extrahierten DNA wurden aus dem Blinddarm isoliert. Dementsprechend scheint der Blinddarm der Maus eine Art Speicherfunktion zu erfüllen. Insgesamt wurden die Darminhalte von 16 Tieren, die mit gfp DNA gefüttert wurden, mittels dieser Methode untersucht. Die Degradierung der verfütterten pEGFP-C1 DNA sowie die Darmpassagezeit variierten dabei von Maus zu Maus (Abbildung 4a, b). Im Autoradiogramm in der Abbildung 4b konnten 3 h nach Fütterung keine Fragmente im Dünndarm und Enddarm der Maus nachgewiesen werden. Ob die DNA den Enddarm noch nicht erreicht hatte oder vollständig abgebaut worden war, wird aus diesen Ergebnissen nicht deutlich. Da vergleichsweise viel Gesamt-DNA aus dem Dünndarm und Enddarm dieser Maus extrahiert wurden, könnte auch die Menge der in 30 µg Gesamt-DNA enthaltenen gfp DNA zu gering gewesen sein, um mit der Restriktions- und DNA-Transfer-Analyse nachgewiesen zu werden. Durch diese Beispiele soll auf die natürliche Variabilität bei Arbeiten mit lebenden Organismen hingewiesen werden. Geschlecht, Alter und Stamm der Tiere sowie Tageszeit der DNA-Verabreichung hatten keinen sichtbaren Einfluß auf die Ergebnisse. Später als 8 h nach Fütterung konnte die Test-DNA in keinem untersuchten Tier in den Darminhalten mittels der Southern DNA-Transfer-Analyse nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob die Test-DNA zu späteren Zeitpunkten komplett degradiert und/oder ausgeschieden war, oder ob die Methode des Southern Transfers nicht sensitiv genug war, um die verbliebene DNA im Darm nachzuweisen, wurden sensitivere PCR-Analysen durchgeführt.

Hierfür wurden die aus den Darminhalten extrahierten DNAs zunächst über Siliziumoxid gereinigt, da Vorversuche gezeigt hatten, daß die aus Darminhalten extrahierten DNA-Proben noch Substanzen enthielten, die die PCR inhibierten. Die Lage der für die PCR verwendeten Primer P2 und P3 innerhalb des pEGFP-C1 Plasmids ergibt sich aus Abbildung 5c und die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben. Die Primer P2 und P3 haben gfp-spezifische Fragmente mit einer Größe von 398 bp amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getrennt, auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und anschließend gegen das radioaktiv markierte pEGFP-C1 Plasmid hybridisiert, um die Spezifität der amplifizierten Produkte zu bestätigen.



Auch größere Fragmente der pEGFP-C1 DNA konnten die Passage durch den Magen-Darm-Trakt überstehen. Mit dem Primerpaar P1/P3 durchgeführte PCR-Analysen wiesen 1277 bp große Fragmente der verfütterten DNA bis zu 3 h nach der DNA Gabe im Magen und Dünndarm und bis zu 8 h im Blinddarm und Enddarm nach (Abbildung 6). Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe Nukleaseaktivität im Dünndarm hin. Im Gegensatz dazu scheinen in den Blinddarm gelangte Fragmente nicht so schnell degradiert zu werden, wie auch schon die Southern Transfer-Analysen gezeigt haben.



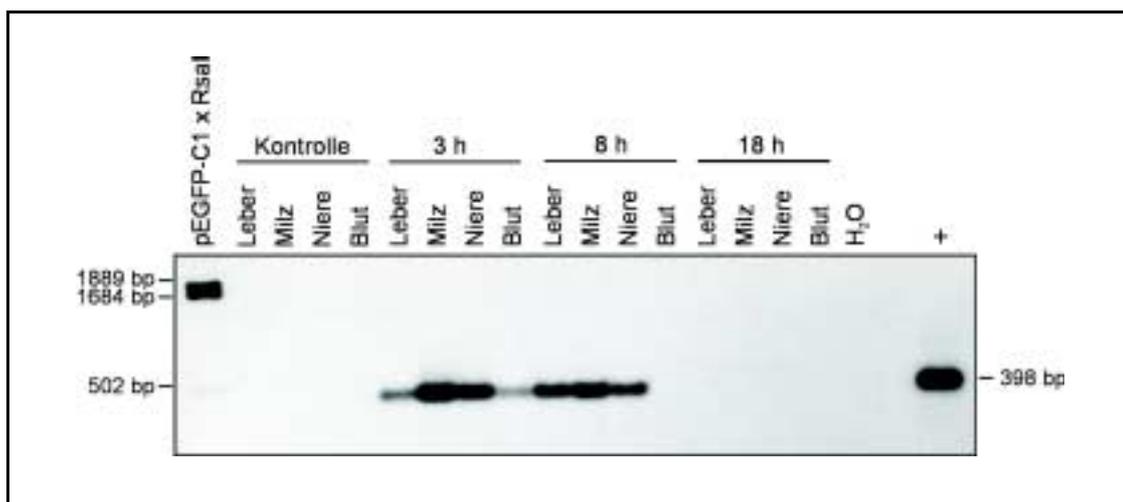
**Abbildung 6:** Nachweis von 1277 bp großen Fragmenten der verfütterten pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt von Mäusen

(a) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Fütterung der Mäuse mit 50 µg pEGFP-C1 DNA wurde die DNA aus den Darminhalten extrahiert und mittels PCR untersucht. Die mit dem Primerpaar P1/P3 amplifizierte PCR-Produkte wurden gegen radioaktiv markiertes pEGFP-C1 hybridisiert. (b) Lage der verwendeten Primer im pEGFP-C1 Plasmid.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß oral verabreichte pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt der Maus nicht vollständig zu niedermolekularen Mononukleotiden abgebaut wird, sondern daß Fragmente mit einer Größe von bis zu 1277 bp (28% der Plasmidgröße) mit dem Kot ausgeschieden werden. Dabei persistieren kleine Mengen dieser DNA bis zu 3 h nach Fütterung im Magen, zwischen 60 min 12 h im Darm und bis zu 24 h im Blinddarm. Die Ergebnisse korrelieren weitgehend mit denen, die in früheren Arbeiten mit M13mp18 als Test-DNA erzielt wurden (Schubbert et al., 1994, 1997).

#### 4.1.1.3 Aufnahme von oral verabreichter gfp DNA in Körperzellen

Die im Darm nachgewiesenen 1277 bp großen Fragmente der pEGFP-C1 DNA umfassen sowohl die CMV-Promotor Sequenz als auch die gfp codierende Region (Abbildung 6b). Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage, ob diese Fragmente über das Darmepithel in den Organismus aufgenommen werden und dort möglicherweise exprimiert werden. Zunächst wurde die Aufnahme kleiner Fragmente der pEGFP-C1 DNA in den Organismus untersucht. Durch PCR-Analysen konnten gfp-spezifische Fragmente mit einer Größe von 398 bp in einem Zeitraum von 3 - 8 h nach Fütterung in DNA-Proben aus Leber, Milz und Niere amplifiziert werden (Abbildung 7). Im Blut konnten Fragmente der Test-DNA nur nach 3 h, jedoch nicht 8 h nach Fütterung nachgewiesen werden. In Organen von mit Pufferlösung gefütterten Kontrolltieren konnte gfp DNA nicht gefunden werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß Fragmente der verfütterten DNA über die Blutbahn in innere Organe gelangen.

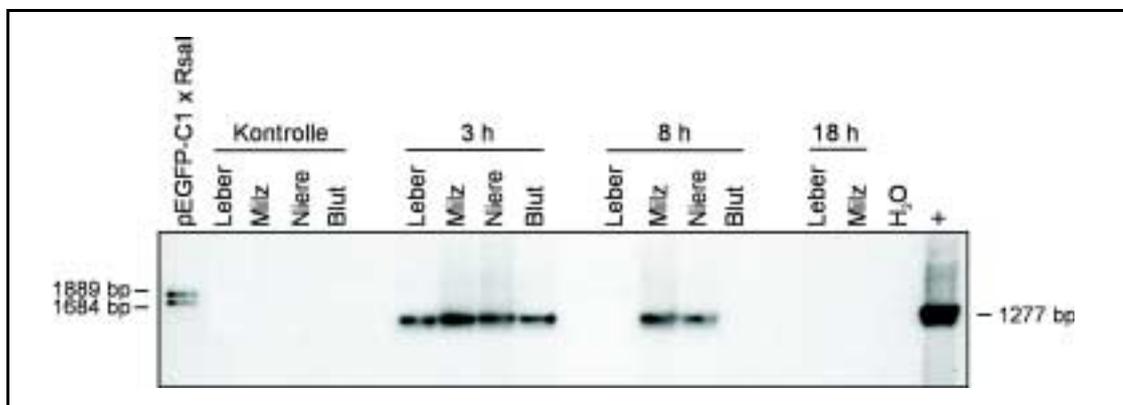


**Abbildung 7:** Nachweis der oral applizierten gfp DNA in verschiedenen Organen

C57/Bl6 Mäuse wurden einmal mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid DNA gefüttert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Fütterung wurden die Organe entnommen, DNA extrahiert und mittels der PCR-Methode unter Verwendung des Primerpaares P2/P3 untersucht (Abbildung 5). Der PCR Positivkontrolle (+) wurde 10 pg pEGFP-C1 Plasmid zugesetzt.

Unter Verwendung des Primerpaares P1/P3 (siehe Abbildung 6) konnten mit Hilfe von PCR-Analysen auch 1277 bp große Fragmente, die die komplette CMV-GFP-Region enthielten, in DNA aus verschiedenen Organen von gfp gefütterten Mäusen amplifiziert werden. Dabei wurden 1277 bp große Fragmente 3 h nach Fütterung in Leber und Blut und in einem Zeitraum von 3 - 8 h nach der gfp Verabreichung in Milz und Niere

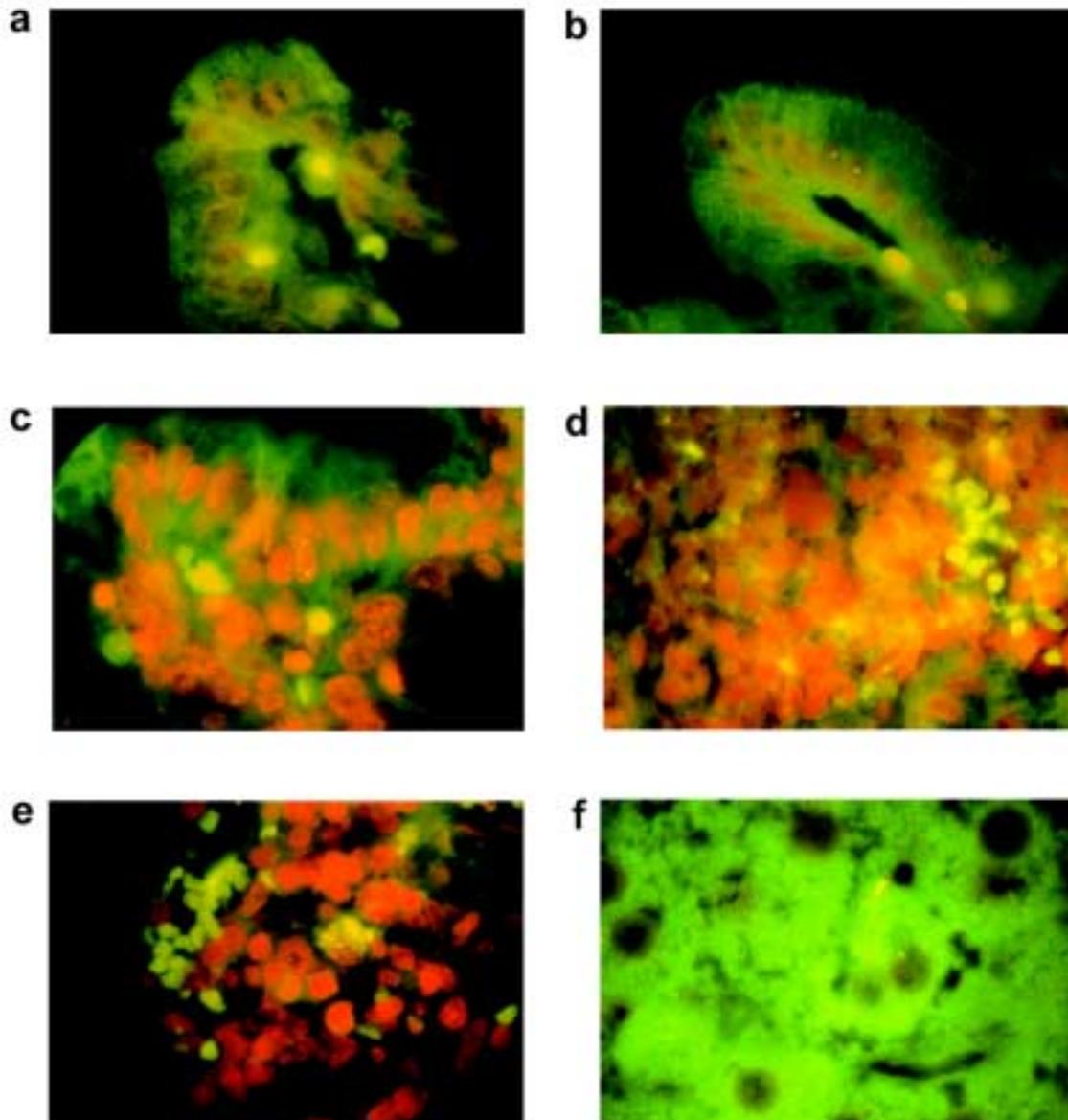
nachgewiesen (Abbildung 8). Um die Identität der aus den Organproben amplifizierten PCR-Produkte zu bestätigen, wurden diese in einen pGEM-T Vektor kloniert und mit Hilfe von Sp6 und T7 Primern sequenziert (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzen entsprachen dabei, von einigen wenigen Nukleotiden abgesehen, der authentischen gfp DNA. Die dargestellten Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß die gfp DNA nach Fütterung nicht in jedem Tier gefunden wurde. In der Milz konnte die verfütterte DNA am häufigsten nachgewiesen werden, als möglicher Hinweis auf die Beteiligung des Immunsystems an der Elimination der fremden DNA. In früheren Studien mit der M13mp18 DNA wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei Fragmente dieser Test-DNA in seltenen Leber Fällen bis zu 18 h nach Verfütterung in der Milz gefunden wurden (Schubbert et al., 1997).



**Abbildung 8:** Nachweis von Promotor-gfp-Fragmenten in Organen von Mäusen.

Zu den angegebenen Zeiten nach Fütterung der Mäuse mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid DNA wurde die DNA aus Leber, Milz, Niere und Blut extrahiert und mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares P1/P3 untersucht (Abbildung 6). Als Positivkontrolle (+) wurde dem PCR-Ansatz 10 pg pEGFP-C1 DNA zugesetzt.

Um den Weg der DNA-Aufnahme in den Organismus zu rekonstruieren, wurde die Darmwand als möglicher Eintrittsort mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsmethode (FISH) analysiert. Dazu wurde die Blinddarmwand von gfp gefütterten Tieren zu unterschiedlichen Zeiten nach Fütterung entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 1,5 - 3 µm dicken Gewebeschnitte wurden mit Biotin markierter gfp DNA hybridisiert. Parallel dazu wurden Gewebeschnitte durch die Darmwand von Kontrolltieren, die DNA-freie Pufferlösung erhalten hatten, analysiert. In den mit gfp DNA gefütterten Tieren zeigten einzelne Zellen des Darmepithels, das direkt an das Darmlumen grenzt, spezifische Signale der Test-DNA (Abbildung 9b, c). Dabei ist die nachgewiesene DNA als gelbliches Signal ausschließlich in den mit Propidiumiodid gefärbten Zellkernen zu erkennen. In Gewebeschnitten von Kontrolltieren konnten derartige Signale nicht beobachtet werden (Abbildung 9a).



**Abbildung 9:** Nachweis der verfütterten pEGFP-C1 DNA in Gewebeschnitten mittels FISH.

Histologische Schnitte durch (a - c) die Blinddarmwand, (d, e) die Milz und (f) die Leber von Mäusen die mit (b, c, e, f) 50 µg pEGFP-C1 DNA oder (a, d) DNA-freiem Puffer gefüttert wurden. Als Hybridisierungssonde wurde gfp DNA mit Biotin markiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. Die nachgewiesene DNA ist als gelbes Signal in den mit Propidiumiodid gefärbten Zellkernen zu erkennen: (b) Blinddarmepithel 3 h, (c) Blinddarmepithel 8 h, (d) Milzgewebe 8 h, (f) Lebergewebe 8 h nach Verabreichung der pEGFP-C1 DNA. Vergrößerung: 1200 x.

Die FISH-Methode zeigte gfp DNA auch in histologischen Schnitten von Milz- und Lebergewebe zwischen 3 und 8 h nach oraler Applikation der Plasmid DNA (Abbildung 9e, f, Tabelle 2). Dabei waren auch hier die Signale immer in den Zellkernen und niemals im Cytoplasma der Zellen lokalisiert. In der Leber enthielten vornehmlich die Zellen Signale, die in der Nähe von Blutgefäßen lagen. In der Milz wurde die gfp DNA ausschließlich in Zellen des lymphoretikulären Gewebes nachgewiesen. In Zellen von Kontrolltieren konnte zu keiner Zeit in keinem Gewebe gfp DNA gefunden werden. Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, daß die im GI-Trakt erhalten gebliebenen DNA-Fragmente über das Darmepithel aufgenommen werden und über das Blut und das Lymphsystem in innere Organe gelangen.

Methode	maximale Länge der Fragmente	Organe	Zeit nach der Fütterung	Anzahl der gefütterten Tiere	
				pEGFP-C1	TE
Southern-Blot	200 - 700 bp	Darminhalte “	3 h	5/5	0/8
			8 h	2/5	
PCR	1277 bp	Leber*	3 - 8 h	3/16	0/6
	1277 bp	Milz	3 - 8 h	6/16	0/6
	1277 bp	Niere	3 - 8 h	4/16	0/6
	398 bp	Blut	3 h	3/11	0/8
FISH	-	Darmwand	3 - 8 h	5/8	0/2
	-	Leber	3 - 8 h	2/7	0/3
	-	Milz	3 - 8 h	3/7	0/3
	-	Niere	3 - 8 h	2/6	0/3

**Tabelle 2:** Nachweis der verfütterten gfp DNA im Darm und in verschiedenen Organen von Mäusen

C57/Bl6 Mäuse wurden einmal mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert und die Darminhalte und Organe mit Hilfe der Southern DNA-Transfer-Analyse (Southern-Blot), PCR-Methode oder FISH-Technik untersucht. Kontrolltiere hatten DNA-freie Pufferlösung (TE) erhalten. \*In Lebergewebe konnten 8 h nach Fütterung nur 398 bp große gfp-Fragmente nachgewiesen werden.

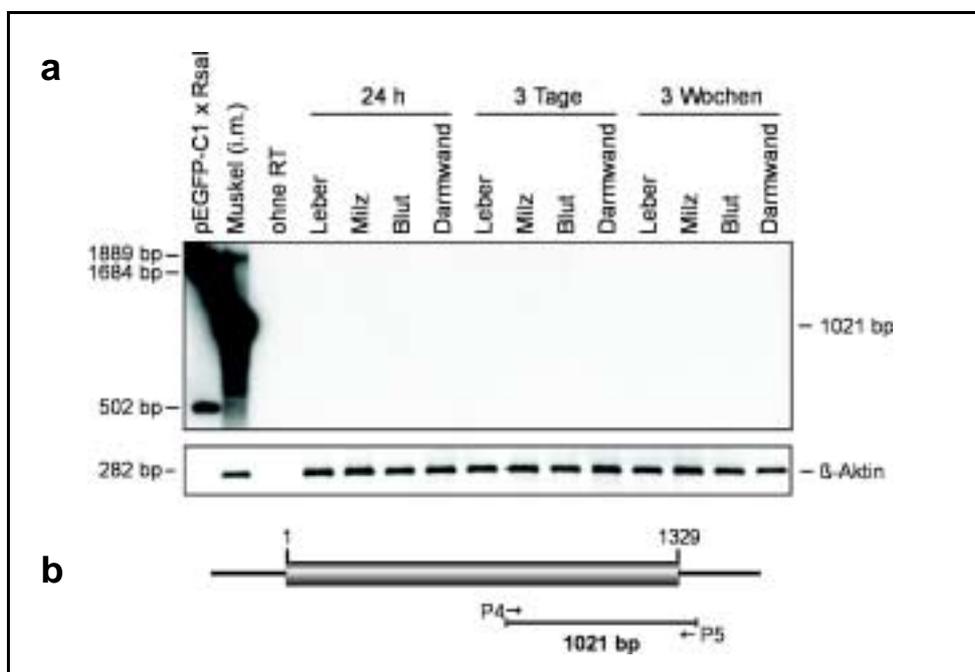
#### 4.1.1.4 Expressionstudien der oral aufgenommenen pEGFP-C1 DNA

Der Nachweis des gesamten CMV-GFP-Konstruktes in Organen von Mäusen nach Verfütterung führte zu der Frage, ob die fremde DNA auch im Mausorganismus exprimiert wird. Um die Expression der oral verabreichten gfp DNA im Mausorganismus zu untersuchen, wurden Mäuse bis zu 3 Wochen täglich mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid DNA gefüttert. Anschließend wurden die Organe entnommen und die Expression des GFP Proteins in 10 µm dicken Cryoschnitten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Weder in Schnitten der Darmwand noch des Leber-, Milz- oder Nierengewebes konnte GFP-abhängige Fluoreszenz beobachtet werden. Insgesamt wurden die Darmwände und Organe von 21 mit pEGFP-C1 Plasmid gefütterten Tieren untersucht. Nach Injektion des gfp Plasmids in die Skelettmuskulatur von Mäusen konnte hingegen gezeigt werden, daß das gfp Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors in Mausgewebe, zumindest in Muskelgewebe, exprimiert wird (Kapitel 4.2.3). Im Muskelgewebe konnten ab 3 Tagen nach Injektion von 50 µg pEGFP-C1 Plasmid DNA stark fluoreszierende Muskelfasern beobachtet werden (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu konnte auch nach Verfütterung von Konstrukten, bei denen das gfp Gen unter der Kontrolle des RSV- oder des SV-Promotors stand, keine fluoreszierenden Zellen beobachtet werden, weder im Darmepithel noch in der Leber noch in irgendeinem anderen untersuchten Organ. Möglicherweise war die Expression des GFP Proteins nicht stark genug, um direkt mittels der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden zu können. Deswegen wurde die Transkription der oral applizierten DNA durch die sensitivere RT-PCR-Methode analysiert.

Für die RT-PCR-Analysen wurden die aus verschiedenen Organen extrahierten mRNAs in einem ersten Schritt durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben, die dann mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase (Tfl) amplifiziert wurden. Die Lage der für die RT-PCR verwendeten Primer innerhalb des pEGFP-C1 Plasmids ergibt sich aus Abbildung 10. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang angegeben. Für die RT-PCR-Analysen wurden RNAs aus Leber-, Milz- und Nierengewebe sowie aus Blut und aus der Darmwand von Mäusen extrahiert, die bis zu 3 Wochen täglich mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid gefüttert worden waren. Zu keiner Zeit konnte in einem untersuchten Organ die Transkription der gfp DNA nachgewiesen werden (Abbildung 10). Als Positivkontrolle wurde RNA eingesetzt, die aus der Oberschenkelmuskulatur einer Maus 1 Woche nach Injektion von 50 µg pEGFP-C1 DNA extrahiert wurde. Nur in dieser Probe wurde ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von 1021 bp amplifiziert. Wurde dieselbe Probe im gleichen Ansatz ohne die Zugabe von RT analysiert, so wurde kein PCR-Produkt erhalten. Diese Kontrolle zeigt, daß das PCR-

Produkt nicht auf Verunreinigungen mit DNA zurückzuführen war. Auch kürzere Transkripte der verfütterten DNA, die unter Verwendung anderer Primerpaare analysiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte mittels  $\beta$ -Aktin-spezifischer Primer in allen Proben ein PCR-Produkt amplifiziert werden (Abbildung 10, unterer Teil). Diese Kontrolle wurde stets zum Nachweis der Qualität und Quantität der RNA-Präparationen durchgeführt.

Die dargestellten Ergebnisse geben somit keinen Hinweis auf die Expression von oral applizierter Fremd-DNA im Mausorganismus.



**Abbildung 10:** Analyse der Transkription von verfütterter DNA.

Mäuse des Stammes CB20 wurden über verschieden lange Zeiträume (24 h, 3 Tage, 3 Wochen) täglich mit 50  $\mu$ g pEGFP-C1 Plasmid gefüttert. Anschließend wurde die RNA aus Leber, Milz, Blut und Darmwand extrahiert und mittels RT-PCR analysiert. (a) Die unter Verwendung des Primerpaares P4/P5 amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getrennt und gegen radioaktiv markiertes pEGFP-C1 Plasmid hybridisiert. Als Positivkontrolle (Muskel i.m.) diente RNA, die 7 Tage nach i.m. Injektion von 50  $\mu$ g pEGFP-C1 DNA aus dem injizierten Muskel extrahiert wurde. Die Negativkontrolle (ohne RT) entsprach dem gleichen Reaktionsansatz ohne RT. Als endogene Kontrolle für die RNA-Qualität und Quantität wurde  $\beta$ -Aktin coamplifiziert. (b) Lage der verwendeten Primer innerhalb des pEGFP-C1 Plasmids.

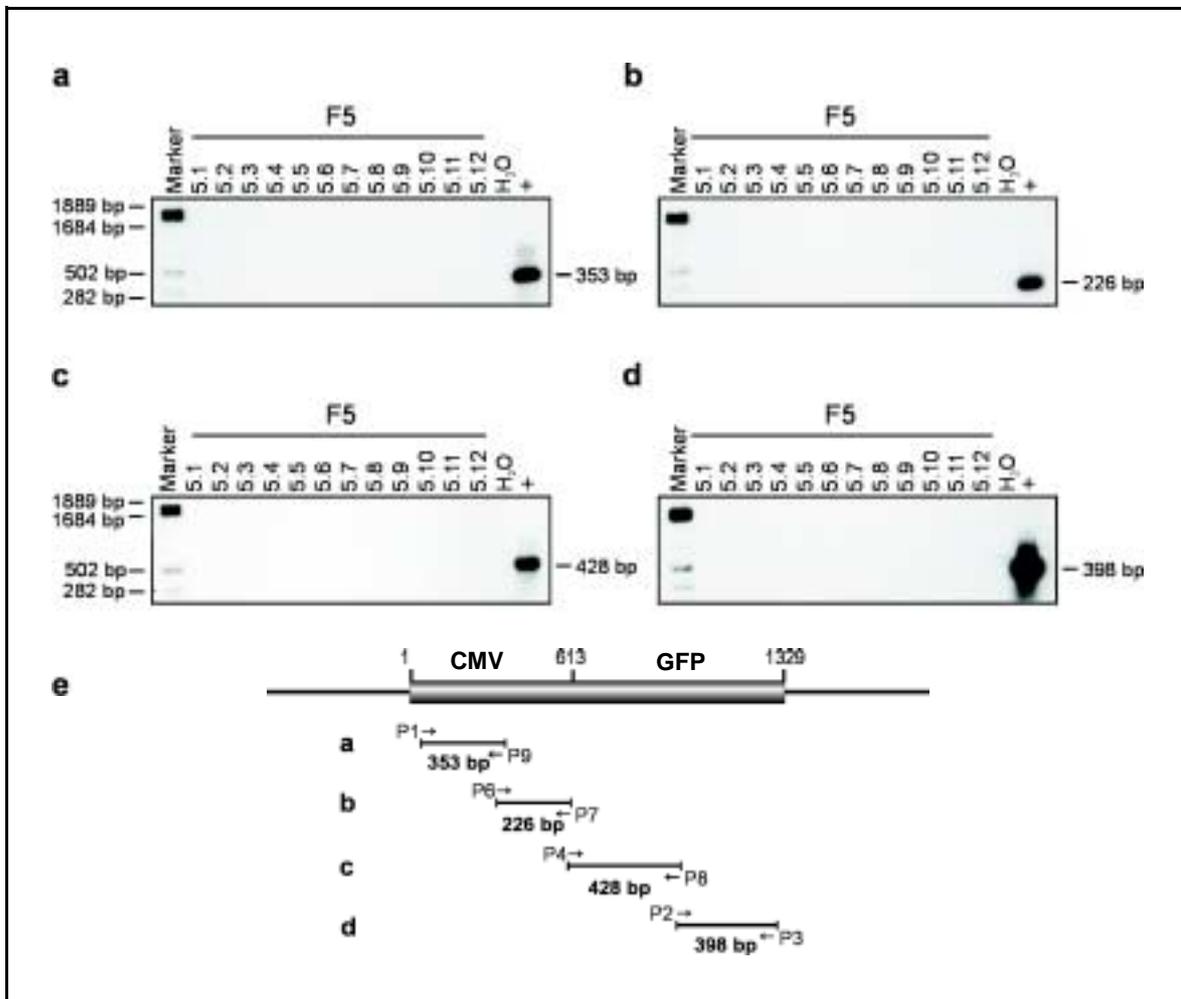
#### 4.1.1.5 Langzeitfütterungsexperiment

In früheren Studien wurde gezeigt, daß nach Fütterung von trächtigen Mäusen die fremde DNA auf Foeten übertragen wird (Schubbert et al., 1998). Dabei wurde die fremde DNA meist in Clustern von Zellen, in seltenen Fällen auf beiden Chromatiden eines Chromosoms nachgewiesen. Niemals wurde jedoch die verfütterte DNA in allen Zellen eines Foeten oder Jungtieres wiedergefunden. Diese Verteilungsmuster der fremden DNA sprechen für einen diaplazentaren Übertragungsmechanismus und gegen einen DNA-Transfer über die Keimbahn, der bei dem erfolgten Fütterungsmuster während der ersten 12 Tage der Trächtigkeit auch nicht als möglich erachtet wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein DNA-Transfer auch über die Keimbahn nachgewiesen werden kann, d.h. ob Nachkommen von Tieren, die mit Fremd-DNA (pEGFP-C1) gefütterten wurden, in allen Zellen fremde DNA integriert enthalten. Um transgene Mäuse nach Verabreichung von Fremd-DNA zu erhalten, müßte die fremde DNA in Ei- oder Spermienzellen bzw. in eine deren Vorläuferzellen integrieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden Mäuse über 8 Generationen täglich mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert, gekreuzt, die Nachkommen auf ihren transgenen Status untersucht und weiter untereinander gekreuzt und gefüttert. Der transgene Status wurde dabei durch Analyse der aus Schwanzspitzen extrahierten DNA durch Southern Transfer-Hybridisierungen und mit Hilfe von PCR untersucht.

Begonnen wurde das Experiment mit drei weiblichen und drei männlichen C57/Bl6 Mäusen im Alter von 7 Wochen, die paarweise gekreuzt und täglich mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid gefüttert wurden. Nach 20 - 22 Tagen wurden insgesamt 15 Jungtiere (F1-Generation) geworfen, die durch PCR-Analysen von DNA aus deren Schwanzspitzen hinsichtlich des Vorhandenseins der Fremd-DNA untersucht wurden. Da die Ergebnisse, wie nach bisherigen Studien erwartet (Schubbert et al., 1998), einheitlich negativ waren, wurden aus jedem Wurf willkürlich eine weibliche und männliche Maus zum Weiterkreuzen ausgewählt und täglich mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid gefüttert. Die nächste Generation (F2) wäre der frühest mögliche Zeitpunkt dafür, Nachkommen mit der Fremd-DNA in allen Zellen zu finden. Aber auch in der F2-Generation waren die PCR- sowie die Southern DNA-Transfer-Analysen der 12 untersuchten Nachkommen negativ, so daß wieder willkürlich 6 Mäuse zum Weiterkreuzen und Füttern ausgesucht wurden. Dieses Paarungs- und Fütterungsmuster wurde über weitere 5 Generationen durchgeführt. In keinem der 97 analysierten Nachkommen konnte dabei die Fremd-DNA in allen Zellen nachgewiesen werden. In Abbildung 11 ist exemplarisch die PCR-Analyse der F5-Generation dargestellt. Von einigen Mäusen wurden zusätzlich Leber-, Milz- und Nierengewebe untersucht, in denen aber auch keine gfp DNA gefunden wurde. Die

dargestellten Ergebnisse geben somit keinen Hinweis auf einen DNA-Transfer der mit der Nahrung aufgenommenen DNA über die Keimbahn. Möglicherweise ist die Keimbahn der Tiere vor dem Eindringen fremder DNA geschützt.



**Abbildung 11:** Analyse des transgenen Status der F5-Generation mittels PCR.

C57/Bl6 Mäuse wurden über acht Generationen täglich mit 50 µg pEGFP-C1 DNA gefüttert. (a - d) Die aus den Schwanzspitzen der F5-Generation extrahierte DNA wurde mittels PCR-Analysen unter Verwendung der angegebenen Primerkombinationen untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel getrennt, auf eine positive Nylonmembran transferiert und gegen gfp DNA hybridisiert. Als Marker dienen die RsaI-Fragmente des pEGFP-C1 Plasmids. (e) Lage der Primer im pEGFP-C1 Plasmid. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben.

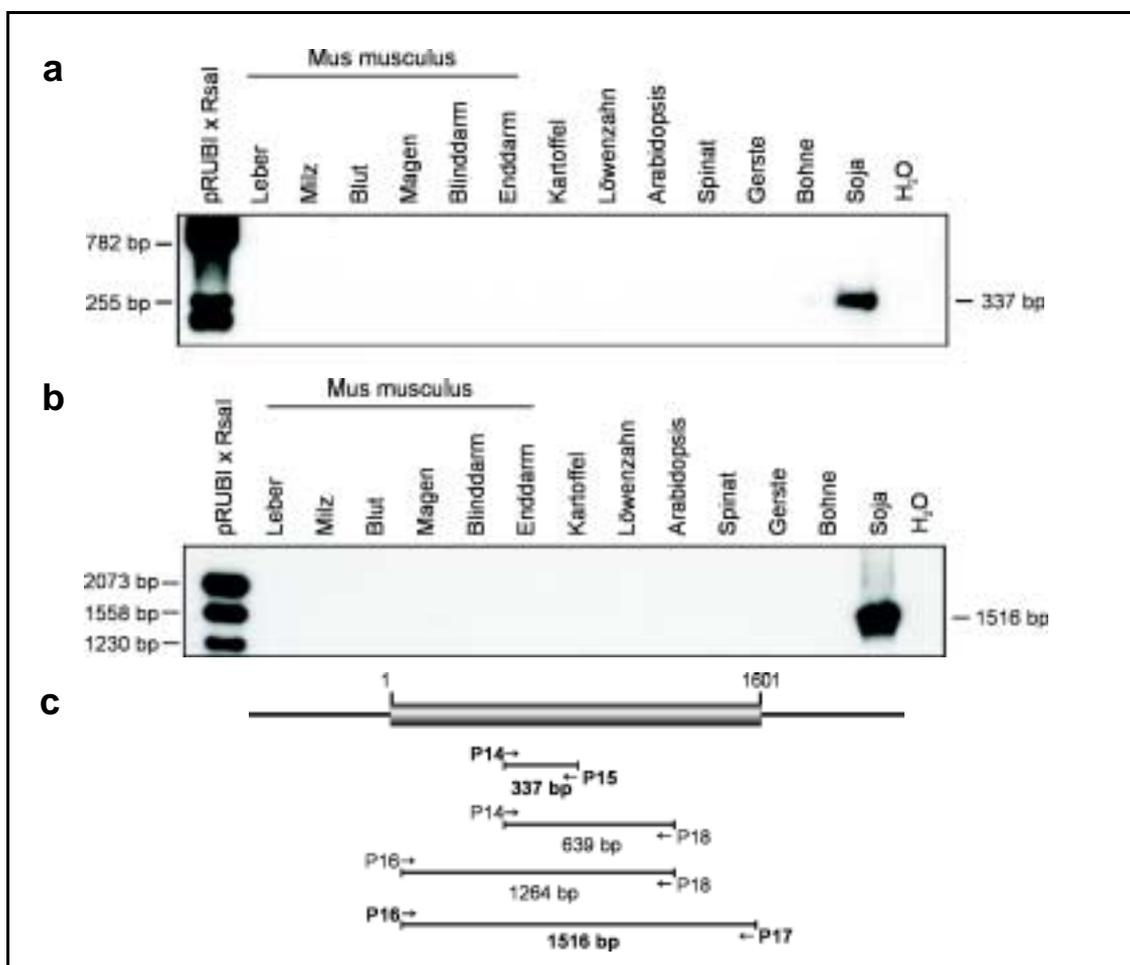
## 4.1.2 Persistenz von mit natürlicher Nahrung aufgenommener DNA im Mausorganismus

### 4.1.2.1 Nukleäres Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase Gen zeigt keine Homologie zur Maus-DNA

Die bisher beschriebenen Experimente waren ausschließlich mit nackter Plasmid DNA als Modell-DNA durchgeführt worden. Mit der täglichen Nahrung nehmen Säugetiere sowie auch alle anderen Tiere aber in aller Regel keine nackte DNA auf, sondern in Zellen von Pflanzen und Tieren geschützte DNA. Deswegen wurde in diesem Teil der Arbeit das Schicksal der in natürlicher Nahrung vorkommender DNA im Verdauungstrakt untersucht. Dazu wurden Mäuse mit Blättern von Sojapflanzen (*Glycine max*) gefüttert und die Persistenz eines pflanzenspezifischen Gens in der Maus analysiert. Hierfür wurde das Gen, das für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (Rubisco) codiert, gewählt. Die Rubisco besteht aus 8 großen L-Untereinheiten, deren Gen in den Chloroplasten lokalisiert ist, und aus 8 kleinen kerncodierten S-Untereinheiten. Das Enzym ist auf der Oberfläche der Stromaseite der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert und katalysiert die Kondensation von CO<sub>2</sub> mit Ribulose-1,5-bisphosphat unter Bildung einer intermediären C<sub>6</sub>-Verbindung, die schnell zu 2 Molekülen 3-Phosphoglycerat hydrolysiert wird. Das Gen für die kerncodierte kleine Untereinheit ist dabei spezifisch für jede Pflanzenart, während die Nukleotidsequenz für die Chloroplasten codierte große Untereinheit bis zu 100%ige Homologien zwischen verschiedenen Pflanzenarten aufweist (Clegg, 1993). Für die folgenden Experimente wurde das Gen für die kerncodierte kleine Untereinheit der Rubisco gewählt, das im folgenden nur noch als Rubisco Gen bezeichnet wird. NCBI-Datenbank-Sequenzanalysen ergaben, daß zwischen dem Rubisco Gen und dem Maus (*Mus Musculus*) Genom nach derzeitigem Wissensstand (November 2000) keine kontinuierlichen Homologien von mehr als 19 bp bestehen. Auch zu der DNA der Darmbakterien, beispielsweise *E.coli*, wurden keine größeren Homologien als 18 bp gefunden (Altschul et al., 1997). Derartige Homologien sind zwischen DNA Sequenzen vieler (fast aller) Spezies zu beobachten. Die Sequenzanalysen konnten durch Restriktions- und Southern Transfer-Analysen bestätigt werden, in denen Maus-DNA bzw. DNA aus den Darminhalten der Maus gegen Rubisco DNA hybridisiert wurde.

In Vorversuchen wurde die Spezifität verschiedener Rubisco Primer unter Verwendung mehrerer unterschiedlicher Template DNAs in PCR-Analysen untersucht. Die Lage der verwendeten Primer innerhalb des Rubisco Gens ergibt sich aus Abbildung 12. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel getrennt, auf eine positiv

geladene Nylonmembran transferiert und gegen ein 1516 bp großes Fragment der Rubisco DNA hybridisiert. In Abbildung 12 sind exemplarisch die Ergebnisse der PCR-Analysen dargestellt, die mit den Primerpaaren P14/P15 und P16/P17 durchgeführt wurden. Dabei konnten Fragmente der Rubisco DNA mit einer Größe von 337 bp bzw. 1516 bp ausschließlich mit DNA aus Sojapflanzen und weder mit DNA aus anderen Pflanzen noch mit DNA aus Organen und Darminhalten der Maus amplifiziert werden. Durch die verschiedenen Vorversuche konnte sichergestellt werden, daß die mit Sojablättern aufgenommene Rubisco DNA eindeutig als Fremd-DNA im Mausorganismus erkannt werden konnte.

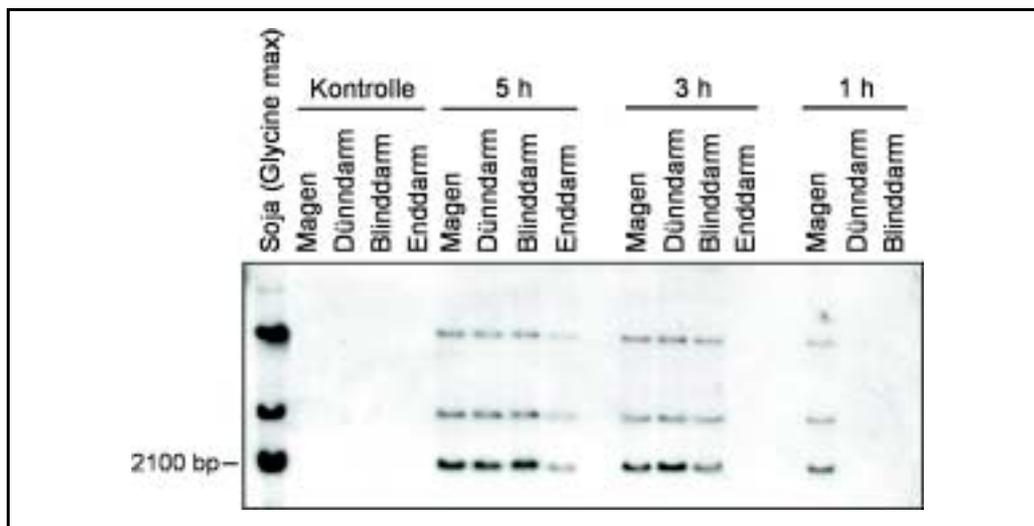


**Abbildung 12:** Analyse von Rubisco-spezifischen Primer.

Die aus Organen oder Darminhalten der Maus sowie aus Pflanzen extrahierte DNA wurden mit dem Primerpaar (a) P14/P15 bzw. (b) P16/P17 in PCR-Analysen untersucht. Die PCR-Produkte wurden gegen ein 1516 bp großes radioaktiv markiertes Rubisco-Fragment der Sojapflanze hybridisiert. (c) Lage der Primer innerhalb des Rubisco Gens. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben.

#### 4.1.2.2 Passage des Rubisco Gens durch den GI-Trakt der Maus

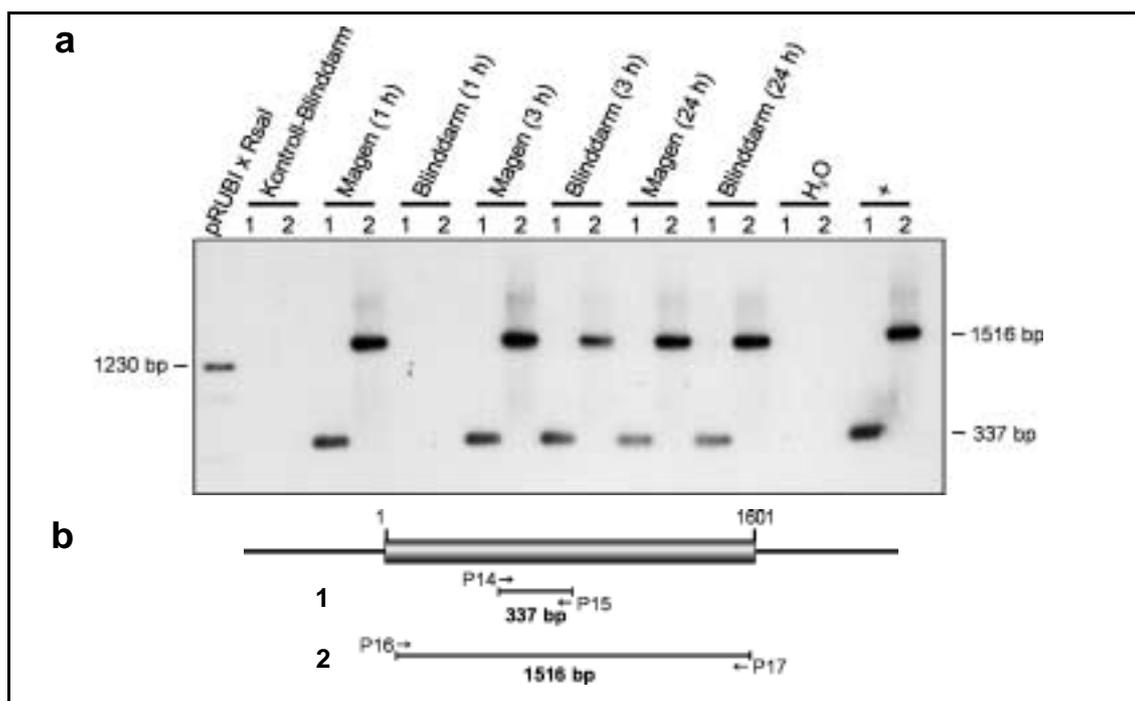
Zunächst wurde die Stabilität von in Pflanzenzellen geschützter DNA im GI-Trakt von Mäusen untersucht. Dazu wurden Mäuse mit Blättern der Sojapflanze gefüttert und zu unterschiedlichen Zeiten die DNA aus den Magen- und Darminhalten dieser Mäuse extrahiert und aufgereinigt. Die mit der RE *EcoRI* gespaltene DNA wurde auf einem 0,8%igen Agarosegel getrennt und nach dem DNA-Transfer gegen Rubisco DNA hybridisiert. Die Ergebnisse zeigen, daß das intakte *EcoRI*-Fragment des Rubisco Gens mit einer Größe von 2.100 bp 1 h nach Fütterung nur im Magen, in den verschiedenen Abschnitten des Darm-Trakts nach 3 h und im Enddarm 5 h nach Fütterung durch die DNA-Transfer-Hybridisierungsmethode nachgewiesen werden konnte (Abbildung 13). Jedoch konnte nicht in allen untersuchten Darminhalten das Rubisco Gen gefunden werden. In einigen Fällen wurde im Autoradiogramm eine Bande im hochmolekularen Bereich sichtbar, die ein Hinweis darauf sein könnte, daß die DNA im Darm möglicherweise noch teilweise komplexiert mit subzellulären Komponenten komplexiert vorliegt. In anderen Fällen wurde keine Rubisco DNA nachgewiesen, was auf einen stärkeren Abbau der pflanzlichen DNA im GI-Trakt dieser Mäuse hindeuten könnte.



**Abbildung 13:** Nachweis des Rubisco Gens im GI-Trakt mittels DNA-Transfer-Analyse nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Fütterung der Mäuse mit Sojablättern wurde die DNA aus verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts isoliert. Die extrahierte DNA (jeweils 30 µg) wurde mit der RE *EcoRI* gespalten und gegen das radioaktiv markierte *EcoRI*-Fragment des Rubisco Gens hybridisiert. Als Größenmarker dienten 2 µg aus Sojablättern isolierter DNA, die parallel zu den Darminhalten aufgereinigt und gespalten wurde.

Die mit der Southern Transfer-Hybridisierungsmethode erzielten Ergebnisse konnten durch PCR-Analysen bestätigt werden. Mit dem Primerpaar P16/P17 wurden Fragmente des sojaspezifischen Rubisco Gens mit einer Größe von 1516 bp 1 h nach Fütterung in DNA aus dem Magen und ab 3 h in DNA aus dem Blinddarm amplifiziert (Abbildung 14). In Kotproben konnten Fragmente der Rubisco DNA mit einer Größe von 1516 bp ab 3 h nach Fütterung durch PCR-Analysen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In einigen Mäusen wurde die Rubisco DNA auch schon nach 2 h im Blinddarm gefunden. In anderen Mäusen konnten Fragmente der Rubisco DNA 6 h nach Fütterung noch nicht bzw. nicht mehr aus DNA des Blinddarminhalts amplifiziert werden. Im Gegensatz zur direkten Applikation der Plasmid DNA in die Mundhöhle der Maus konnte bei diesen Fütterungsexperimenten nicht sichergestellt werden, daß die Mäuse direkt nach Bereitstellung der Sojablätter diese auch zu sich nahmen. Alle Mäuse wurden in den hier dargestellten Experimenten 3 h vor Fütterungsbeginn auf Diät gesetzt, indem ihnen die Futterpellets als Nahrungsquelle entzogen wurden.

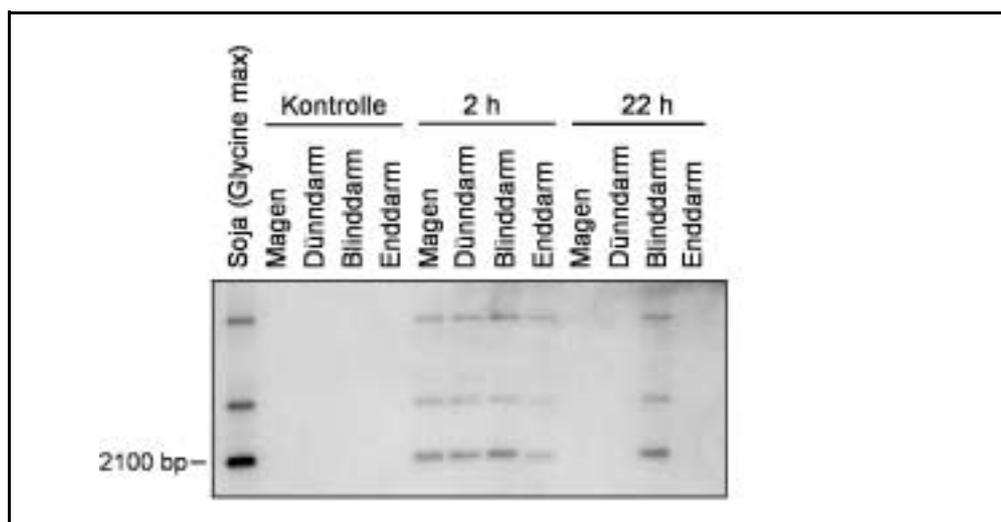


**Abbildung 14:** Nachweis von Fragmenten des Rubisco Gens im Magen-Darm-Trakt von Mäusen durch PCR-Analysen.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Fütterung der Mäuse mit Sojablättern wurde die DNA aus den Inhalten des GI-Trakts extrahiert und mittels der PCR-Methode analysiert. (a) Die mit den Primerpaaren 1: P14/P15 und 2: P16/P17 amplifizierten PCR-Produkte wurden gegen Rubisco DNA hybridisiert. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA aus Sojablättern in die PCR-Reaktion eingesetzt. (b) Lage der Primer innerhalb des Rubisco Gens.

#### 4.1.2.3 “Pulse-Chase“-Experiment: Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Mäuse über einen definierten Zeitraum mit Blättern der Sojapflanze gefüttert und anschließend wieder mit den normalen Futterpellets als Nahrungsquelle versorgt. Mit Hilfe dieses “Pulse-Chase“-Experiments sollte die Persistenz der mit der Nahrung aufgenommenen DNA im Magen-Darm-Trakt untersucht werden. Dazu wurden Mäuse 4 Tage mit Sojablättern gefüttert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abschluß der Sojafütterung (Zeitpunkt “0“) wurden die Darminhalte der Mäuse entnommen, die DNA extrahiert und zunächst durch Southern DNA Transfer-Analysen untersucht. In allen Abschnitten des GI-Trakts konnte dabei 2 h nach Abschluß der Sojafütterung das EcoRI-Fragment des Rubisco Gens nachgewiesen werden (Abbildung 15). Nach 22 h konnte das Rubisco Gen nur noch im Blinddarm wiedergefunden werden, und zu späteren Zeitpunkten war es in keinem Darmabschnitt der Maus mehr nachweisbar.

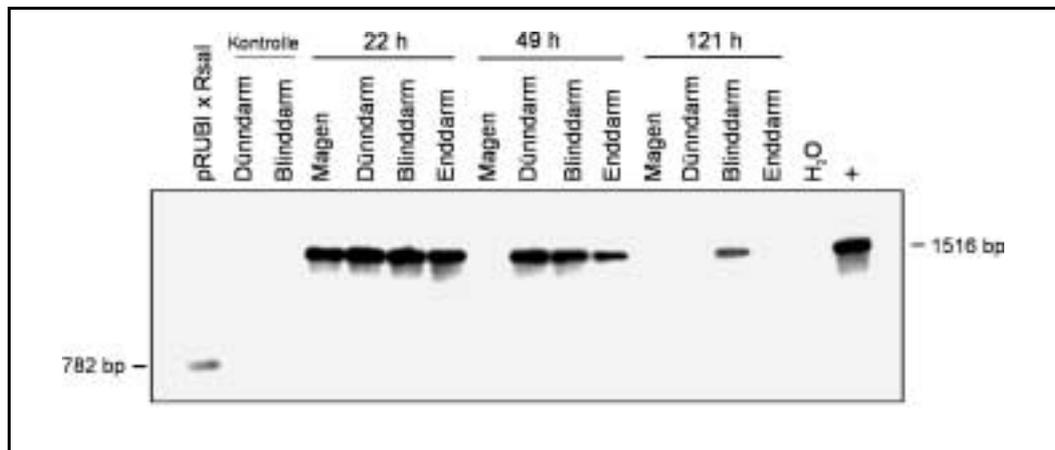


**Abbildung 15:** Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus.

CB20 Mäuse wurden 4 Tage mit Sojablättern gefüttert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Sojafütterung wurden die Inhalte des GI-Trakts entnommen, die DNA extrahiert und 30 µg mit *EcoRI* gespalten. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Membran wurden die Fragmente gegen Rubisco DNA hybridisiert. Als Größenmarker wurden 2 µg aus Sojablättern isolierte DNA mit *EcoRI* gespalten.

Um auch noch Restmengen der Rubisco DNA im GI-Trakt der Mäuse nachweisen zu können, wurden PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurden Rubisco-spezifische Fragmente mit einer Größe von 1516 bp in allen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts bis zu 22 h nach der Sojaverabreichung amplifiziert (Abbildung 16). Nach 49 h konnten

Fragmente des Rubisco Gens nur noch im Darm nachgewiesen werden. In seltenen Fällen wurden 121 h nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern Fragmente der Rubisco DNA noch im Blinddarm gefunden. Zu späteren Zeitpunkten konnten auch kleinere Fragmente des Rubisco Gens in den verschiedenen Darmabschnitten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

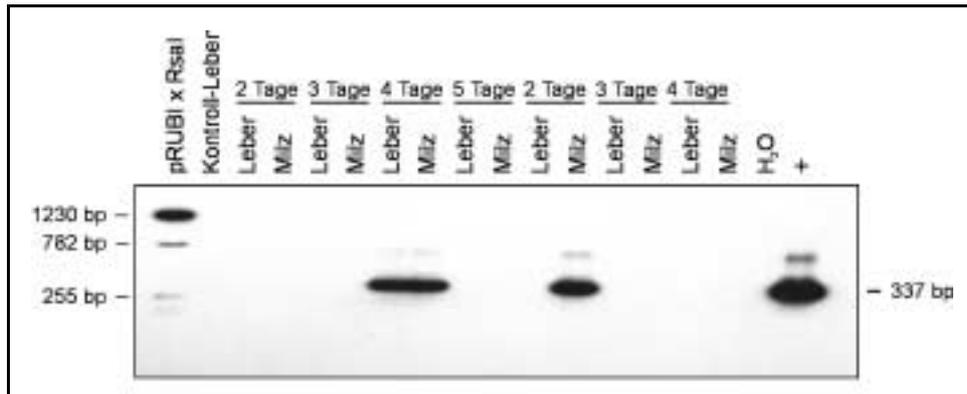


**Abbildung 16:** Untersuchung der Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus mittels der PCR-Methode

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern wurde die DNA aus den Darminhalten extrahiert und unter Einsatz des Primerpaares P16/P17 mittels der PCR-Methode analysiert (Abbildung 14). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden gegen Rubisco DNA hybridisiert. Als Positivkontrolle (+) wurde DNA aus Sojablättern in die PCR-Reaktion eingesetzt.

#### 4.1.2.4 Aufnahme der Pflanzen-DNA in innere Organe

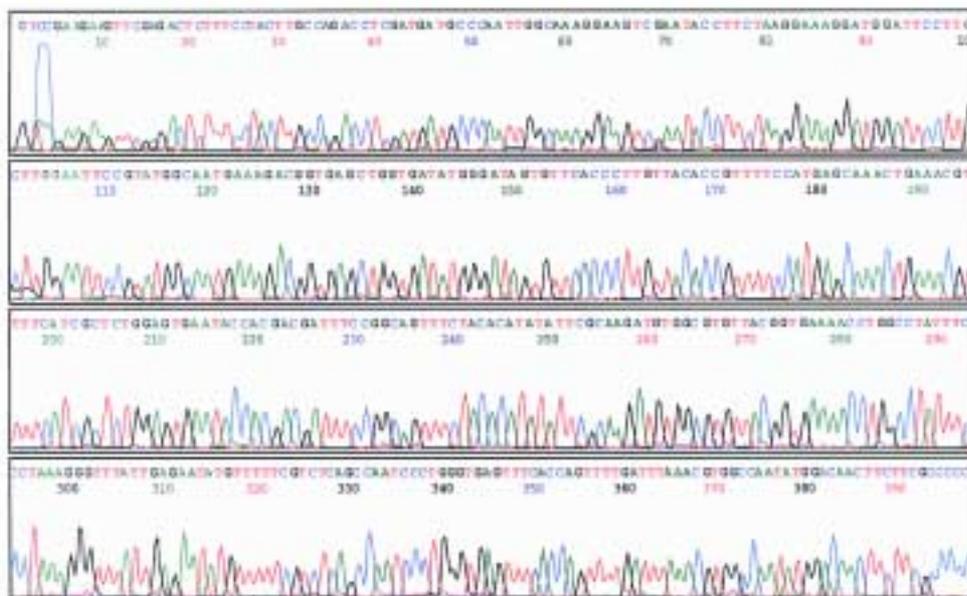
Um zu untersuchen, ob die Pflanzen-DNA, analog zu verfütterter Plasmid DNA, über das Darmepithel in innere Organe gelangt, wurden Organe von mit Sojablättern gefütterten Mäusen mittels PCR-Analysen untersucht. Nach Fütterung von Mäusen über unterschiedlich lange Zeiträume (2 bis 5 Tage) mit Sojablättern wurden die Organe der Mäuse entnommen und die DNA extrahiert. Unter Verwendung des Primerpaares P14/P15 wurden Fragmente der Rubisco DNA mit einer Größe von 337 bp in verschiedenen Organen unterschiedlicher Mäuse amplifiziert (Abbildung 17). Insgesamt wurden 96 Organe von 37 Tieren untersucht. Dabei konnten Fragmente des Rubisco Gens zweimal in DNA aus Milz und einmal in DNA aus Leber amplifiziert werden. Die nachgewiesenen Fragmente hatten eine maximale Größe von 337 bp. Größere Rubisco-spezifische Fragmente konnten in keinem Organ gefunden werden. Die dargestellten Ergebnisse lassen die Frage offen, ob kleinere Fragmente bei der Aufnahme durch das Darmepithel begünstigt werden oder ob die aufgenommenen DNA-Fragmente in den Organen zu kleineren Fragmenten abgebaut werden.



**Abbildung 17:** Nachweis der mit der Nahrung aufgenommenen DNA in Organen.

Die DNA aus Organen von Mäusen, die über unterschiedlich lange Zeiträume mit Sojablättern gefüttert worden waren, wurde durch PCR-Analysen unter Verwendung des Primerpaares P14/P15 untersucht (Abbildung 14).

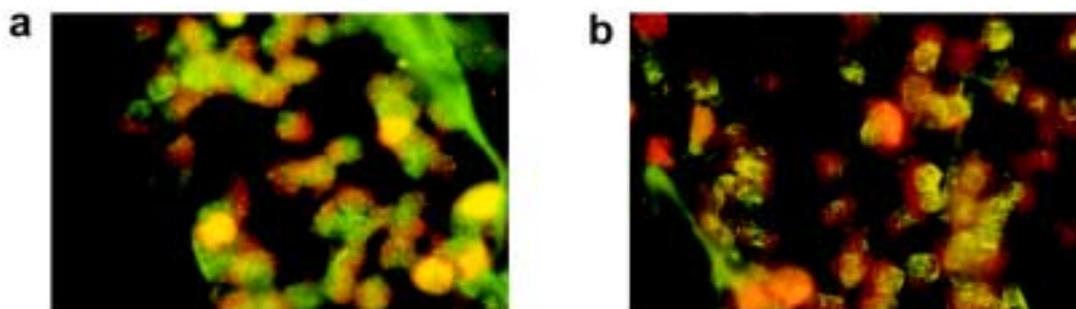
Um die Identität der aus den Organ-Proben amplifizierten PCR-Produkte zu bestätigen, wurden sie in einen pGEM-T Vektor kloniert und mit Hilfe von T7 und Sp6 Primern sequenziert (Abbildung 18). Die Sequenzen entsprachen dabei, von einigen wenigen Nukleotiden abgesehen, der in der Datenbank veröffentlichten Sequenz der soja-spezifischen Rubisco DNA (GenBank Accession Number J01307).



**Abbildung 18:** Sequenzierung der PCR-Produkte.

Die aus den Organen mit den Primern P14 und P15 amplifizierten PCR-Produkte (Abbildung 17) wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel getrennt, ausgeschnitten, gereinigt und in einen pGEM-T Vektor kloniert. Mit Hilfe von Sp6 Primern wurde die Sequenz des Rubisco Gens zwischen den Koordinaten 678 und 982 sequenziert.

Mit der FISH-Methode sollte in histologischen Schnitten der Darmwand und anderer Gewebe nach der Pflanzen-DNA gesucht werden, um den Weg der DNA-Aufnahme zu dokumentieren. Dazu wurde die Darmwand und Organe von mit Sojablättern gefütterten Mäusen nach der Entnahme direkt in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Als Positivkontrolle wurden Blätter der Sojapflanze ebenso fixiert und eingebettet und parallel mit den Organschnitten einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unterzogen. Zum Nachweis der Pflanzen-DNA wurde als Hybridisierungssonde biotinylierte Rubisco DNA verwendet, die durch FITC gekoppeltes Avidin sichtbar gemacht wurde. In den Schnitten durch Leber- und Milzgewebe konnten keine Signale der Rubisco DNA gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Auch in Schnitten durch die Blinddarmwand, die wahrscheinlich auch hier den Ort der DNA-Aufnahme darstellte, waren keine Signale erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigte fast jede Zelle des unverfütterten Sojablattes Rubisco-spezifische Signale in mit Propidiumiodid orange gefärbten Zellkernen (Abbildung 19). In mehreren Zellkernen sind 2 Signale zu erkennen, die auf den diploiden Zustand der verwendeten Sojapflanzen hindeuten. Die negativen FISH-Ergebnisse der Gewebeschnitte von mit Sojablättern gefütterten Mäusen korrelieren mit den PCR-Analysen, die nur kleine Fragmente der Rubisco DNA (337 bp) in Organen der Mäuse nachweisen konnten, deren Größen somit unterhalb der Detektionsgrenze der FISH-Technik (~ 1 kb) liegen.



**Abbildung 19:** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von Sojablättern.

Blätter von Sojapflanzen wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit biotinylierter Rubisco DNA als Sonde hybridisiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. (a, b) Die nachgewiesene Rubisco DNA ist in den Zellkernen vieler Zellen des Sojablattes als gelbes Signal zu erkennen. Die genomische DNA wurde mit Propidiumiodid gegengefärbt. Vergrößerung: 1200 x.

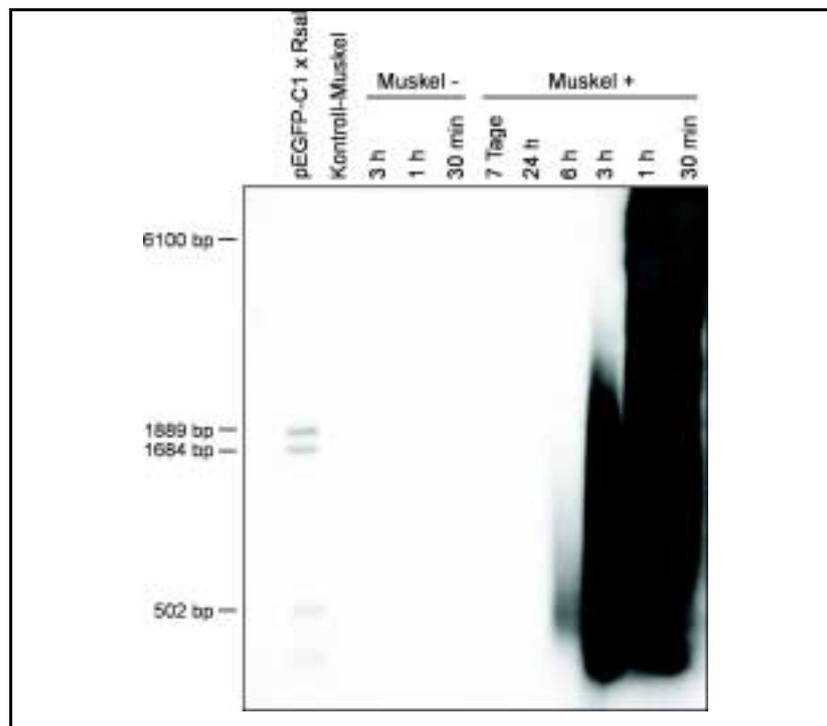
Die dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß mit der Nahrung aufgenommene in Pflanzenzellen vorkommende DNA wenigstens teilweise gegen den Angriff von Nukleasen im GI-Trakt der Mäuse geschützt ist. Nach Fütterung von Mäusen über mehrere Tage mit Blättern der Sojapflanze, konnten Fragmente der Pflanzen-DNA in seltenen Fällen im Leber- und Milzgewebe wiedergefunden werden. Die nachgewiesenen Fragmente hatten dabei eine maximale Größe von 337 bp.

## 4.2 Schicksal von parenteral applizierter DNA in Mäusen

### 4.2.1 Persistenz und Verteilung von fremder DNA nach intramuskulärer Injektion

Genomische DNA kann über Jahrhunderte, weit über den Tod des Organismus hinaus, unter bestimmten Bedingungen in Zellen überleben (Pääbo et al., 1988; Di Benedetto et al., 2000). Über die Stabilität fremder DNA im Säugerorganismus ist hingegen bisher wenig bekannt. An Mäuse oral applizierte Fremd-DNA, wie die DNA des Bakteriophagen M13mp18 oder das pEGFP-C1 Plasmid, konnte bis zu maximal 18 h nach Applikation in inneren Organen der Tiere nachgewiesen werden (Schubbert et al., 1997; diese Arbeit Kapitel 4.1.1). Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Fragestellung, wie lange generell fremde DNA im Säugerorganismus persistiert.

Um die Persistenz fremder DNA zu untersuchen, wurden Mäuse mit verschiedenen Mengen des pRSVGFP Plasmids intramuskulär (i.m.) in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion wurden verschiedene Organe, wie injizierter Muskel, kontralateraler Muskel, Leber, Milz, Niere sowie Blut, entnommen, die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt und mit Southern Transfer-Analysen untersucht. Dazu wurden 10 µg der extrahierten DNA mit der RE *PmlI* geschnitten, die keine Restriktionsschnittstelle im pRSVGFP Plasmid enthält, jedoch die genomische DNA in kleinere Fragmente spaltet, die somit gut im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt werden konnte. Nach dem DNA-Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde die DNA gegen das radioaktiv markierte pRSVGFP Plasmid hybridisiert. Nach einmaliger i.m. Injektion von 50 µg pRSVGFP Plasmid DNA wurde die injizierte DNA nur im injizierten Muskel, aber nicht im kontralateralen Muskel nachgewiesen (Abbildung 20). Auch in Leber, Milz und Niere konnte keine i.m. injizierte DNA gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Im injizierten Muskel war das Plasmid in seiner ursprünglichen Größe von 6.100 bp bis zu 3 h nach Injektion nachweisbar, kleinere Fragmente bis zu 6 h. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Injektion von 500 µg oder 5 µg pRSVGFP DNA erzielt. Nach Injektion von 500 µg pRSVGFP Plasmid DNA wurde die fremde DNA zusätzlich 24 h nach Applikation im injizierten Muskel sowie nach 30 min in Originalgröße in verschiedenen Organen, die entfernt von der Injektionsstelle lagen, durch Southern Transfer-Analysen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die in die Oberschenkelmuskulatur injizierte fremde DNA zum einen schnell durch zelleigene Nukleasen abgebaut und zum anderen im Organismus verteilt wird.



**Abbildung 20:** Nachweis der injizierten DNA durch Southern Transfer-Analyse.

CB20 Mäuse wurden mit 50 µg pRSVGFP Plasmid DNA in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der i.m. Injektion wurden die Organe entnommen, DNA aus den injizierten Muskeln (Muskel +) sowie aus den kontralateralen Muskeln (Muskel -) extrahiert, jeweils 10 µg mit *PmlI* gespalten, auf einem 0,8%igen Agarosegel getrennt und gegen radioaktiv markierte pRSVGFP DNA hybridisiert. Kontrolltieren wurde DNA-freie Pufferlösung injiziert (Kontroll-Muskel). Die *RsaI*-Fragmente des pEGFP-C1 Plasmids dienen als Größen-Marker.

Um auch geringe Mengen der injizierten DNA in den verschiedenen Organen nachweisen zu können, wurden sensitivere PCR-Analysen durchgeführt. Unter Verwendung der Primer P11 und P3 konnten 769 bp große gfp-spezifische Fragmente bis zu 24 h nach Injektion von 50 µg pRSVGFP Plasmid DNA im kontralateralen Muskel und bis zu 1 h in der Leber nachgewiesen werden (Abbildung 21a). Auch nach Injektion von 500 µg oder 5 µg Plasmid DNA wurde die gfp DNA bis zu maximal 24 h nach Injektion in Organen wiedergefunden, die entfernt von der Injektionsstelle lagen (Abbildung 21b, c). Im Gegensatz dazu persistierte die gfp DNA, unabhängig von der injizierten DNA Menge, bis zu 17 Monaten nach der parenteralen Applikation im injizierten Muskel (Abbildung 21d). Spätere Zeitpunkte nach Injektion wurden nicht untersucht, da die Mäuse im Alter von etwa 6 Wochen injiziert worden waren und über die 19 Monate hinaus keine wesentlich längere Lebenserwartung hatten. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß die fremde DNA bis an das Lebensende der Maus (maximal 21 Monate) im injizierten Muskel persistiert.



Die Ergebnisse der PCR-Analysen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß die Menge der injizierten DNA keinen wesentlichen Einfluß auf die Persistenz der injizierten fremden DNA im Mausorganismus hat. Die Ergebnisse sagen jedoch nichts darüber aus, wo und in welchem Zustand sich die DNA in der Zelle befindet, ob integriert in die genomische DNA oder in episomaler Form, ob im Cytoplasma oder im Zellkern.

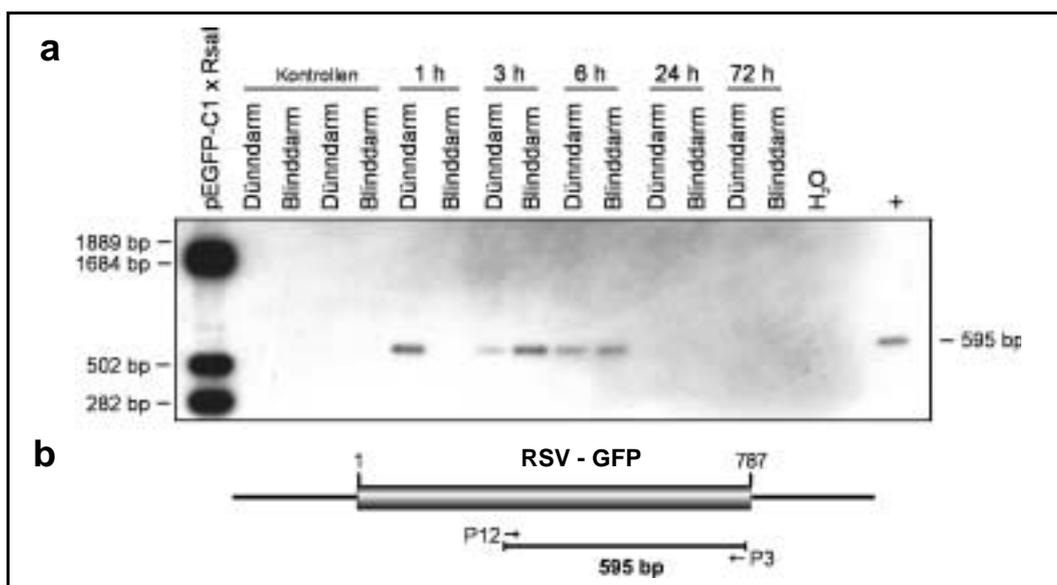
	30 min	1 h	3 h	6 h	24 h	3 T	7 T	21 T	4 M	17 M
										
Muskel +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ n.a.
Muskel -	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	-- n.a.
Leber	++-	++-	++-	++-	++-	---	---	---	---	-- n.a.
Niere	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	-- n.a.
Blut	+++	+++	++-	++-	++-	---	---	---	---	-- n.a.
Darm	+++	++-	++-	++-	---	---	---	---	---	-- n.a.

**Tabelle 3:** Persistenz und Verteilung der parenteral applizierten pRSVGFP DNA

Zu den angegebenen Zeiten (T: Tage; M: Monate) nach i.m. Injektion des pRSVGFP Plasmids wurde die DNA aus den Organen (Muskel +: injizierter Muskel; Muskel -: kontralateraler Muskel) extrahiert und mittels der PCR-Methode unter Verwendung der Primer P11 und P 3 (Abbildung 21) analysiert; n.a.: nicht analysiert.   
 Unterschiedliche Mengen der pRSVGFP DNA wurden injiziert: 500 µg, 50 µg, 5 µg: 

#### 4.2.2 Ausscheidung der injizierten DNA über den Leber-Gallen-Darmweg

Für den Körper nicht verwertbare Substanzen, wie beispielsweise das aus den Erythrocyten stammende Bilirubin, gelangen über den Blutkreislauf in die Leber, wo sie aktiv in Gallenkanälchen sezerniert und mit der Galle in den Darm ausgeschüttet werden. Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, daß injizierte Fremd-DNA für maximal 24 h im Blutkreislauf persistiert. Diese Beobachtung führte zu der Fragestellung, ob fremde DNA im Mausorganismus komplett zu niedermolekularen Mononukleotiden abgebaut wird oder möglicherweise zusätzlich über den Leber-Gallen-Darmweg aus dem Organismus eliminiert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde DNA aus den Darminhalten von i.m. injizierten Mäusen extrahiert und mittels der PCR-Methode unter Verwendung der gfp-spezifischen Primer P12 und P3 untersucht. Dabei konnten in einem Zeitraum zwischen 1 und 6 h nach der Injektion Fragmente der i.m. injizierten gfp DNA mit einer Größe von 595 bp aus unterschiedlichen Abschnitten des Darm-Trakts amplifiziert werden (Abbildung 22).

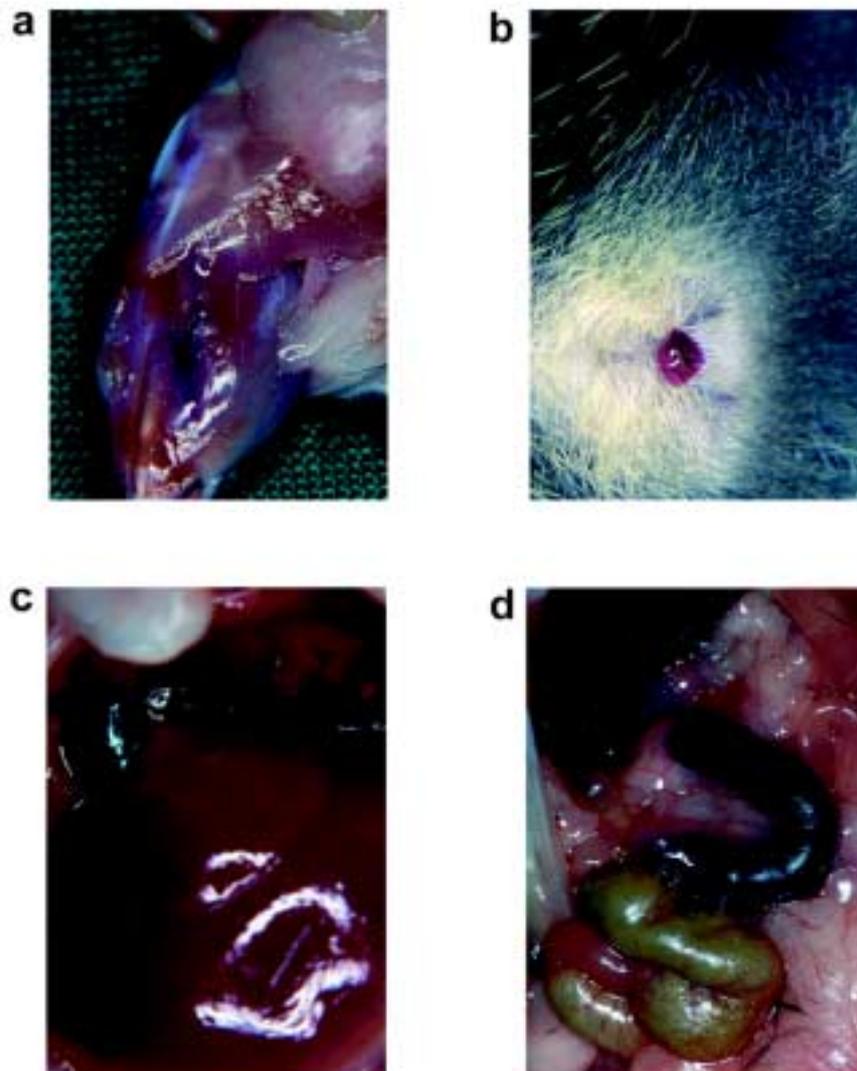


**Abbildung 22:** Ausscheidung der injizierten DNA über den Leber-Gallen-Darmweg.

Analyse der DNA aus Darminhalten von Mäusen, die mit 50 µg pRSVGFP Plasmid i.m. injiziert wurden. Die Darminhalte wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Injektion entnommen, DNA extrahiert und auf das Vorhandensein der gfp DNA mittels der PCR-Methode untersucht. (b) Lage der Primer P12 und P3 innerhalb des pRSVGFP Plasmids. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang angegeben.

In einigen Ansätzen wurde der zu injizierenden DNA-Lösung Bromphenolblau (2 mg/ml) zugesetzt, um einen groben Anhaltspunkt über die Verteilung der injizierten Lösung zu bekommen. Dabei konnte eine Blaufärbung des injizierten Muskels und des ausgeschiedenen Urins bis zu 6 h nach Injektion beobachtet werden (Abbildung 23a, b). Organe wie Leber, Milz und Niere sowie kontralaterale Muskel zeigten zu keiner Zeit eine blaue Färbung. Im Gegensatz dazu konnte bis zu 3 h nach Injektion eine starke

Blaufärbung der Gallenblase beobachtet werden (Abbildung 23c). Auch verschiedene Darmabschnitte, vor allem der Dünndarm, zeigten bis zu 6 h nach Injektion eine zunächst starke Blaufärbung, die mit der Zeit abnahm (Abbildung 23d). Dabei wurde der *Ductus choledochus*, der Endabschnitt des Gallengangs, der an der *Papilla Vateri* in den Dünndarm mündet, durch die blaue Färbung gut erkennbar. Oberhalb der *Papilla Vateri* war die Farbe des Darminhalts unauffällig, während sie unterhalb der *Papilla Vateri* eine bläuliche Färbung hatte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß nicht nur die injizierte Fremd-DNA wenigstens zum Teil über den Leber-Gallen-Darmweg aus dem Organismus eliminiert wird, sondern auch das Bromphenolblau, das ein Molekulargewicht von 670 Dalton hat.



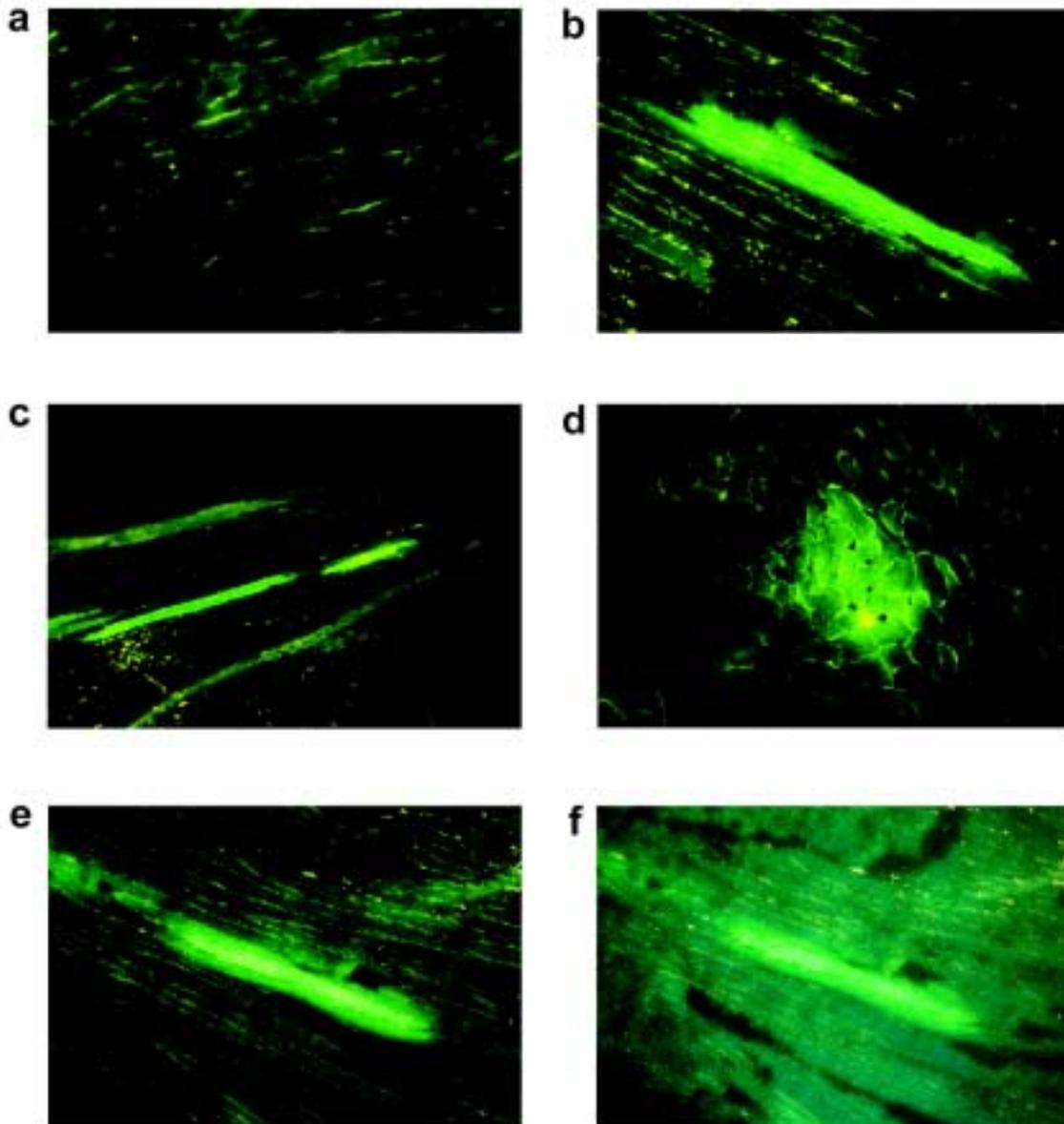
**Abbildung 23:** Ausscheidung des Bromphenolblaus aus dem Organismus.

Organe und Exkremente einer Maus *in situ* 3 h nach i.m. Injektion einer DNA-Bromphenolblau-Lösung: (a) injizierter Muskel, (b) ausgeschiedener Urin, (c) Leber mit Gallenblase, (d) Darmabschnitt.

### 4.2.3 Expression der injizierten DNA

#### 4.2.3.1 Detektion von grün-fluoreszierenden Muskelfasern

Die mit PCR erzielten Ergebnisse zeigen, daß injizierte Plasmid DNA bis zu 24 h in Geweben, die vom Injektionsort entfernt liegen, und bis zu mindestens 17 Monaten im injizierten Muskelgewebe persistiert. Hieraus ergaben sich die Fragestellungen, ob, wo und wie lange injizierte DNA im Mausorganismus exprimiert wird. Zunächst wurde durch Fluoreszenzmikroskopie die Expression des GFP Proteins in verschiedenen Geweben untersucht. Dazu wurden 50 µg des pEGFP-C1 Plasmids, das in Zellkultur die stärkste Expression von GFP in Mauszellen induzierte (Tabelle 1), in die Oberschenkelmuskulatur von Mäusen injiziert. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Injektion wurden die Organe entnommen, eingefroren und 5 - 10 µm dicke Cryoschnitte präpariert. Ab 3 Tagen nach Injektion konnten fluoreszierende Muskelfasern im injizierten Muskelgewebe beobachtet werden, je nach Schnittrichtung in längs- oder quergestreiften Muskelfasern (Abbildung 24). Dabei konnte die Fluoreszenz einer längsgestreiften Muskelfaser in etwa 20 aufeinander folgenden Schnitten gefunden werden. Bei einer Schnittdicke von 5 µm errechnet sich dann ein Dicke von 100 µm, die mit dem tatsächlichen mittleren Durchmesser einer Muskelfaser (50 - 150 µm) übereinstimmt (Wels, 1987). Häufig fluoreszierten mehrere Fasern in einem eng umgrenzten Bereich des Muskelgewebes, der höchstwahrscheinlich mit dem Injektionsort identisch war. In keinem Fall konnte innerhalb eines Faserbündels noch eine zweite Stelle mit fluoreszierenden Zellen gefunden werden, es sei denn, es wurde mehrfach in dasselbe Muskelgewebe injiziert. Darüber hinaus wurden zu frühen Zeitpunkten nach Injektion (1 - 2 Wochen) meist einzelne und selten benachbarte fluoreszierende Muskelfasern beobachtet. Im Gegensatz dazu fluoreszierten 6 Wochen nach Injektion viele benachbarte Fasern (Abbildung 24d). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß in einer primären Zelle GFP gebildet wird, das in benachbarte Zellen diffundiert. Die Expression wurde bis zu 6 Wochen nach Injektion beobachtet. Längere Zeiträume konnten bisher nicht untersucht werden. Die Spezifität der GFP-Fluoreszenz konnte durch den Einsatz des DAPI-Filterblocks verifiziert werden. Unter Verwendung des DAPI-Filterblocks erscheint GFP-abhängige Fluoreszenz grünblau, während sich die Autofluoreszenz des Gewebes in blauer Farbe darstellt (Abbildung 24f; Pines, 1995).



**Abbildung 24:** Expression von GFP in injizierten Muskelfasern.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des injizierten Muskelgewebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.m. Injektion von 50 µg pEGFP-C1 DNA. Kontrollmäuse wurden mit DNA-freier Pufferlösung injiziert. (a) Kontroll-Muskel, (b - e) injizierter Muskel (b, e, f) 7 Tage, (c) 14 Tage und (d) 6 Wochen nach der Injektion. (a - e) Verwendung des FITC-Filterblocks bzw. (f) des DAPI-Filterblocks. Vergrößerung: 50 x.

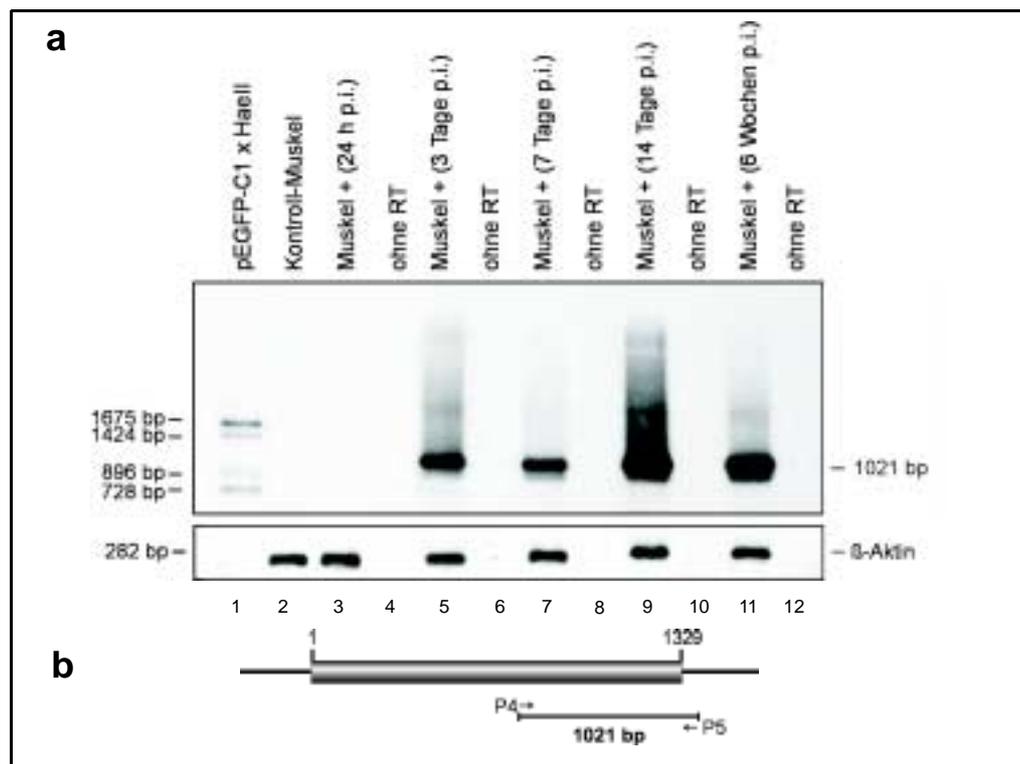
Eine Zunahme der injizierten DNA-Menge auf 200 µg, 500 µg oder 1 mg führte zu keiner merklichen Steigerung der Fluoreszenz im quantitativen Sinne; ebensowenig konnte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität der einzelnen Muskelfasern beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hatte der Puffer, in dem die DNA gelöst war, einen starken Einfluß auf die Expression von GFP. Wurde die DNA in TE, Wasser oder in einer

20%igen Sucroslösung injiziert, so konnte keine oder nur eine ganz schwache Expression der injizierten DNA beobachtet werden. Erst die Injektion von DNA, die in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gelöst war, induzierte eine starke Expression von GFP in Muskelfasern. Zusätzlich war die Expression der gfp DNA im injizierten Muskelgewebe von dem vorgeschalteten Promotor abhängig. Nach Injektion des pEGFP-C1 Plasmids, bei dem das gfp Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand, wurde die stärkste Fluoreszenzintensität sowie die meisten fluoreszierenden Fasern beobachtet. Der zweitstärkste Promotor im Muskelgewebe schien der RSV-Promotor zu sein. Nach Injektion des pSVGFP Plasmids, bei dem das gfp Gen unter der Kontrolle des SV40-Promotors stand, fluoreszierten die Muskelfasern nur ganz schwach. Die verschiedenen Promotoren hatten somit unterschiedlich starke Aktivitäten im Muskelgewebe.

In allen anderen untersuchten Geweben, die entfernt vom Injektionsort lagen, wie Leber, Milz und kontralateralem Muskel, konnte nach der i.m. Injektion zu keiner Zeit und mit keinem der Promotoren eine von GFP abhängige Fluoreszenz der Zellen beobachtet werden. Möglicherweise war in diesen Geweben die Expression des GFP Proteins zu schwach, um mikroskopisch nachgewiesen werden zu können. Aus diesem Grund wurden sensitivere RT-PCR-Analysen durchgeführt.

#### **4.2.3.2 RT-PCR-Analysen zum Nachweis der Transkription der injizierten DNA**

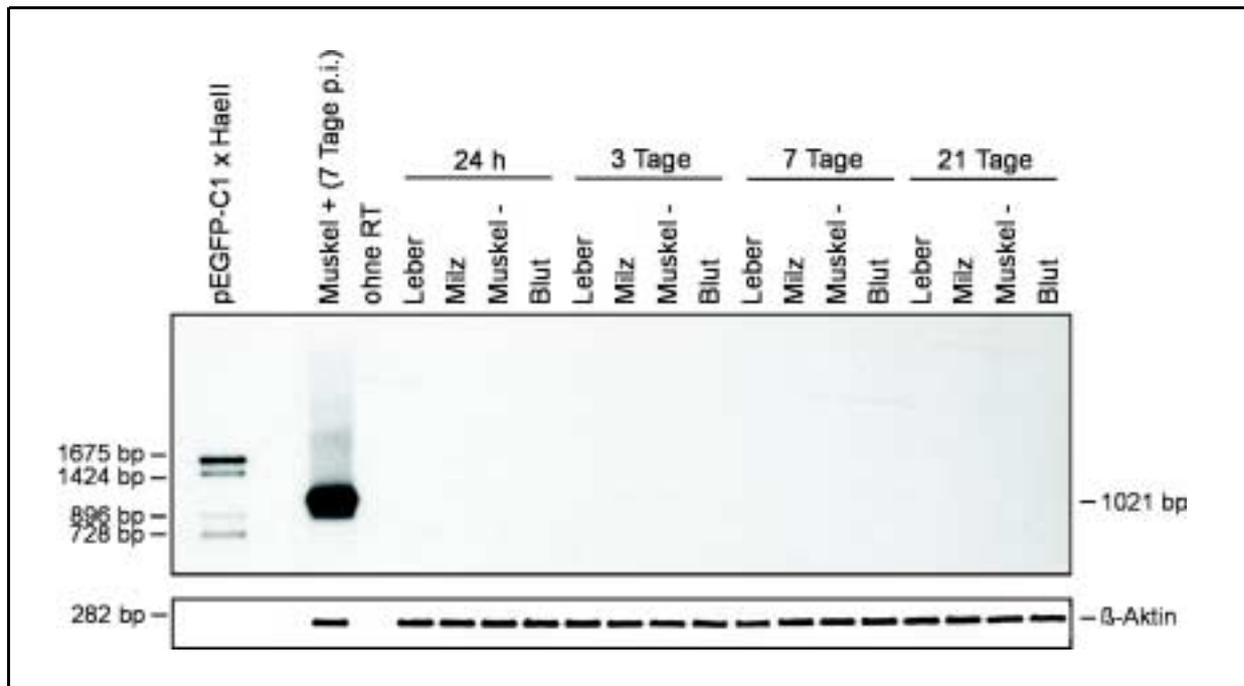
Zur Analyse der Transkription der injizierten DNA durch die RT-PCR-Methode wurden RNAs aus verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.m. Injektion von 50 µg pEGFP-C1 Plasmid extrahiert. Zunächst wurde die Transkription der gfp DNA im injizierten Muskel abhängig von der Zeit untersucht. Die Lage der für die RT-PCR verwendeten Primer innerhalb des pEGFP-C1 Plasmids ergibt sich aus Abbildung 25b. Die PCR-Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Trennung auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen das pEGFP-C1 Plasmid hybridisiert. Mit Hilfe der RT-PCR-Analysen konnten im injizierten Muskel in einem Zeitraum zwischen 3 Tagen und 6 Wochen nach Injektion Transkripte der gfp DNA nachgewiesen werden (Abbildung 25a). Kontrollen, die ohne Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt wurden, zeigten, daß die PCR-Produkte nicht auf Verunreinigungen mit DNA zurückzuführen waren (Abbildung 25, Spuren 4, 6, 8, 10, 12). Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der RNA Präparationen aus den unterschiedlichen Geweben, wurde parallel mit einem anderen Primerpaar ein Fragment des  $\beta$ -Aktin-Transkripts amplifiziert (Abbildung 25a, unterer Teil).



**Abbildung 25:** Nachweis der Transkription der injizierten DNA im kollateralen Muskel mittels der RT-PCR-Methode.

(a) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach i.m. Injektion von 50 µg pEGFP-C1 DNA wurden die RNAs aus den injizierten Muskelgeweben extrahiert und mittels RT-PCR analysiert. Kontrolltiere wurden mit DNA-freier Pufferlösung injiziert. Als Negativkontrollen dienten die identischen Ansätze ohne Reverse Transkriptase (ohne RT). Zur Kontrolle der Qualität und Quantität der RNA Präparationen wurde parallel ein Fragment des β-Aktin-Transkripts amplifiziert. (b) Lage der verwendeten Primer innerhalb des pEGFP-C1 Plasmids.

Im Gegensatz zum injizierten Muskel konnte in allen anderen untersuchten Geweben wie Leber, Milz, kontralateralem Muskel und Blut, weder früh nach Injektion (24 h, 72 h) noch zu späteren Zeitpunkten (1 Woche, 3 Wochen) die Transkription der injizierten DNA durch RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 26). Die β-Aktin-Kontrollen zeigten auch hier, daß die RNA-Präparationen die Amplifikation von Transkripten mittels der RT-PCR-Methode erlaubten. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die in die Oberschenkelmuskulatur von Mäusen injizierte DNA unter den angegebenen Bedingungen nur am Ort der Injektion und dort nur in einem eng umgrenzten Bereich exprimiert wird. In keinem vom Injektionsort entfernt liegenden Gewebe konnte die Expression der i.m. injizierten DNA weder durch Fluoreszenzmikroskopie noch durch die sensitivere RT-PCR-Methode nachgewiesen werden.



**Abbildung 26:** Analyse der Transkription der i.m. injizierten DNA in verschiedenen Organen.

Zu den angegebenen Zeitpunkten nach i.m. Injektion von 50 µg pEGFP-C1 DNA wurde die RNA aus der Leber, Milz, dem kontralateralen Muskel (Muskel -) sowie aus dem Blut extrahiert und mittels RT-PCR analysiert (Abbildung 25). Als Positivkontrolle wurde RNA eingesetzt, die 7 Tage nach i.m. Injektion von 50 µg pEGFP-C1 DNA aus dem injizierten Muskel extrahiert wurde (Muskel +). Die Negativkontrolle entsprach dem gleichen Reaktionsansatz ohne Zugabe der RT (ohne RT). Als endogene Kontrolle für die RNA-Qualität und Quantität wurde ein  $\beta$ -Aktin-Transkript amplifiziert.

Insgesamt zeigen die Injektionsexperimente, daß fremde DNA schnell durch Nukleasen abgebaut wird und mit dem Blut in verschiedene Organe gelangt. Im injizierten Muskel persistiert die fremde DNA für mindestens 17 Monate, während sie in allen anderen Organen nie später als 24 h nach Injektion nachgewiesen werden konnte. Die Expression der injizierten DNA wurde nur im injizierten Muskel beobachtet. Der Nachweis der injizierten DNA in Darminhalten läßt vermuten, daß die fremde DNA nicht komplett im Mausorganismus abgebaut wird, sondern wenigstens z.T. über den Leber-Gallen-Darmweg aus dem Organismus eliminiert.

### 4.3 Injektion von Adenovirus Typ 12 in neugeborene Hamster

In dem dritten Teil der Arbeit wurde das Verhalten von adenoviraler DNA nach Injektion von Adenovirus Typ 12 in neugeborene Hamster untersucht.

Bereits 1962 entdeckten Trentin, Yabe und Taylor, daß das humane Adenovirus Typ 12 (Ad12) in neugeborenen Hamstern die Bildung von Tumoren induzierte (Trentin et al., 1962). Wurden neugeborene Hamster der Gattung *Mesocricetus auratus*, auch Syrischer Goldhamster genannt, mit  $4,5 \times 10^7$  plaque forming units (pfu) Ad12-Virionen subkutan in die Nackenregion injiziert, so bildeten sich innerhalb von 4 bis 6 Wochen Tumoren an der Injektionsstelle mit einem Durchmesser von 0,5 - 4 cm. Untersuchungen zeigten, daß diese Tumoren klonalen Ursprungs waren und daß die Ad12 DNA nicht chromosomenspezifisch in unterschiedliche zelluläre Sequenzen des Hamstergenoms integrierte (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Dabei lag die virale DNA meist in multiplen Kopien, manchmal in rearrangierter Form, aber mit einer Ausnahme immer nur an einer Stelle im zellulären Genom vor (Knoblauch et al., 1996; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Die durch subkutane Injektionen von Ad12-Virionen induzierten Tumoren wurden als undifferenzierte Sarkome charakterisiert (Trentin et al., 1962).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Menge der injizierten Ad12-Virionen reduziert, um zu untersuchen, ob auch geringere Mengen Ad12-Virionen die Induktion von Tumoren in neugeborenen Hamstern auslösen können. In früheren Arbeiten wurden in den durch Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen induzierten Tumoren häufig bis zu 20 Kopien der Ad12 DNA integriert in das Hamstergenom nachgewiesen (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Möglicherweise besteht eine Korrelation zwischen der Menge der injizierten Ad12-Virionen und der Anzahl der in das Hamstergenom integrierten Kopien der Ad12 DNA. Darüber hinaus wurde durch Injektionsexperimente von Ad12-Virionen in andere Gewebe wie Muskel und Leber untersucht, ob Ad12 neben undifferenzierten Sarkomen auch die Bildung andersartiger Tumoren induzieren kann.

#### 4.3.1 Einfluß der Menge von Ad12-Virionen auf die Tumorinduktion

Nach der subkutanen Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen in neugeborene Hamster entwickelten diese in einem Zeitraum von 33 bis 47 Tagen 1 - 4 Tumoren an der Injektionsstelle (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Um den Einfluß der Ad12 Menge auf die Fähigkeit zur Tumorinduktion zu untersuchen, wurden neugeborene Hamster der Gattung *Mesocricetus auratus* in unterschiedlichen Experimenten mit Mengen zwischen

4,5 x 10<sup>7</sup> und 4,5 x 10<sup>3</sup> pfu Ad12-Virionen subkutan in die Nackenregion injiziert. Nach Injektion von 4,5 x 10<sup>7</sup> pfu Ad12-Virionen entwickelten 9 von 11 Tieren (82%) in einem Zeitraum von 37 bis 48 Tagen nach der Injektion Tumoren. Die Tumoren bildeten sich bei allen Tieren in der Nackenregion und hatten einen Durchmesser von 0,2 - 1,7 cm. Häufig bildeten sich in einem Tier bis zu 3 klar voneinander abgegrenzte Tumoren von teilweise sehr unterschiedlicher Größe (Abbildung 30). Die Tumoren wurden innerhalb von 5 Tagen nach der ersten Beobachtung aus den Tieren extrahiert. In keinem der Hamster konnten Metastasen makroskopisch in anderen Organen gefunden werden. Nach Injektion von 4,5 x 10<sup>6</sup> pfu Ad12-Virionen entwickelten noch 71% der Tiere (10/14) Tumoren im gleichen Zeitraum, nur bei 2 Tieren wurden die Tumoren erst 56 bzw. 64 Tage nach der Injektion beobachtet. Im Gegensatz dazu bildete nach Injektion von 4,5 x 10<sup>5</sup> pfu Ad12-Virionen nur noch einer von 12 überlebenden Hamstern (8,3%) Tumoren. Wurde die Menge der injizierten Ad12-Virionen weiter auf 4,5 x 10<sup>4</sup> pfu bzw. auf 4,5 x 10<sup>3</sup> pfu reduziert, konnte innerhalb von 16 Monaten bei keinem der 22 Tiere eine Tumorentwicklung beobachtet werden. Bei diesen Tieren konnten makroskopisch weder Tumoren in der Nackenregion noch in anderen Organen entdeckt werden. Somit scheint die Fähigkeit zur Tumorinduktion von der Menge der injizierten Ad12-Virionen abhängig zu sein. Mit reduzierter Menge von Ad12-Virionen sank die Anzahl der induzierten Tumoren pro Tier und die Anzahl der tumorbildenden Tiere insgesamt. Im Gegensatz dazu nahm die Zeit zu, bis Tumoren nach der Injektion gebildet wurden. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob die durch wenige pfu induzierten Tumoren langsamer wachsen oder ob erst zu einem späteren Zeitpunkt das Integrationsereignis, das zur Transformation der Zelle führte, stattgefunden hatte.

	Anzahl der injizierten Tiere	Anzahl der Hamster mit Tumoren	Tumorbildung (in Tagen)	Anzahl der Tumoren pro Tier	Größe der Tumoren (Durchmesser in cm)	Ort der Tumorbildung
4,5 x 10 <sup>7</sup>	14 (11) <sup>1</sup>	9 (82%) <sup>2</sup>	35 - 48	1 - 3	0,2 - 1,7	Nacken
4,5 x 10 <sup>6</sup>	15 (14) <sup>1</sup>	10 (71%) <sup>2</sup>	37 - 49, 56,64	1 - 5	0,2 - 2	Nacken
4,5 x 10 <sup>5</sup>	14 (12) <sup>1</sup>	1 (8,3%) <sup>2</sup>	63	2	1,5	Nacken
4,5 x 10 <sup>4</sup>	14 (11) <sup>1</sup>	0	/	/	/	
4,5 x 10 <sup>3</sup>	12 (11) <sup>1</sup>	0	/	/	/	

**Tabelle 4:** Tumorbildung nach subkutaner Injektion von Ad12-Virionen in Hamstern

()<sup>1</sup>: Anzahl der überlebenden Tiere bis Untersuchung.

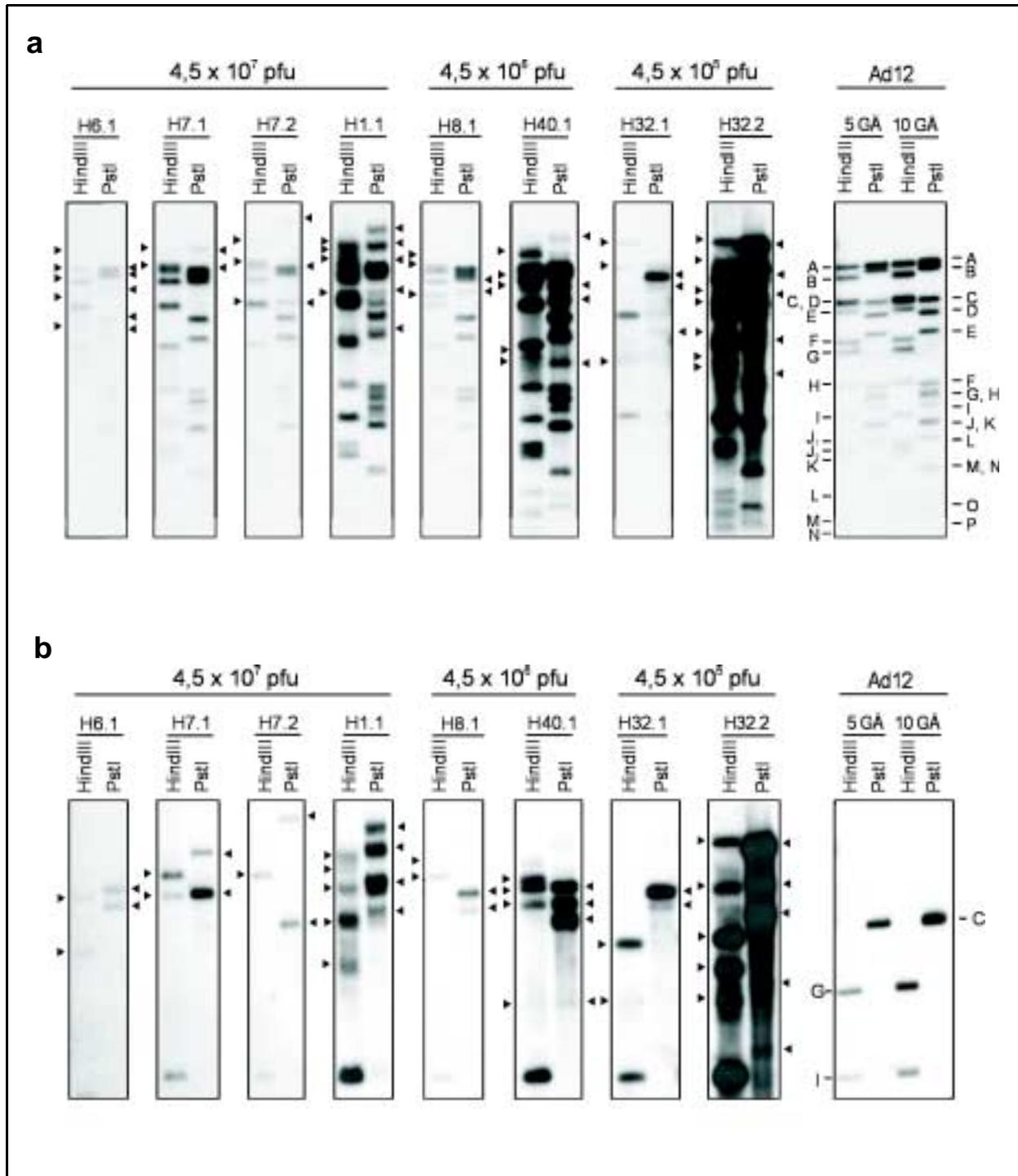
()<sup>2</sup>: Die Prozentzahl entspricht der Anzahl der tumorbildenden Tiere von den insgesamt bis zur Untersuchung überlebenden Tiere.

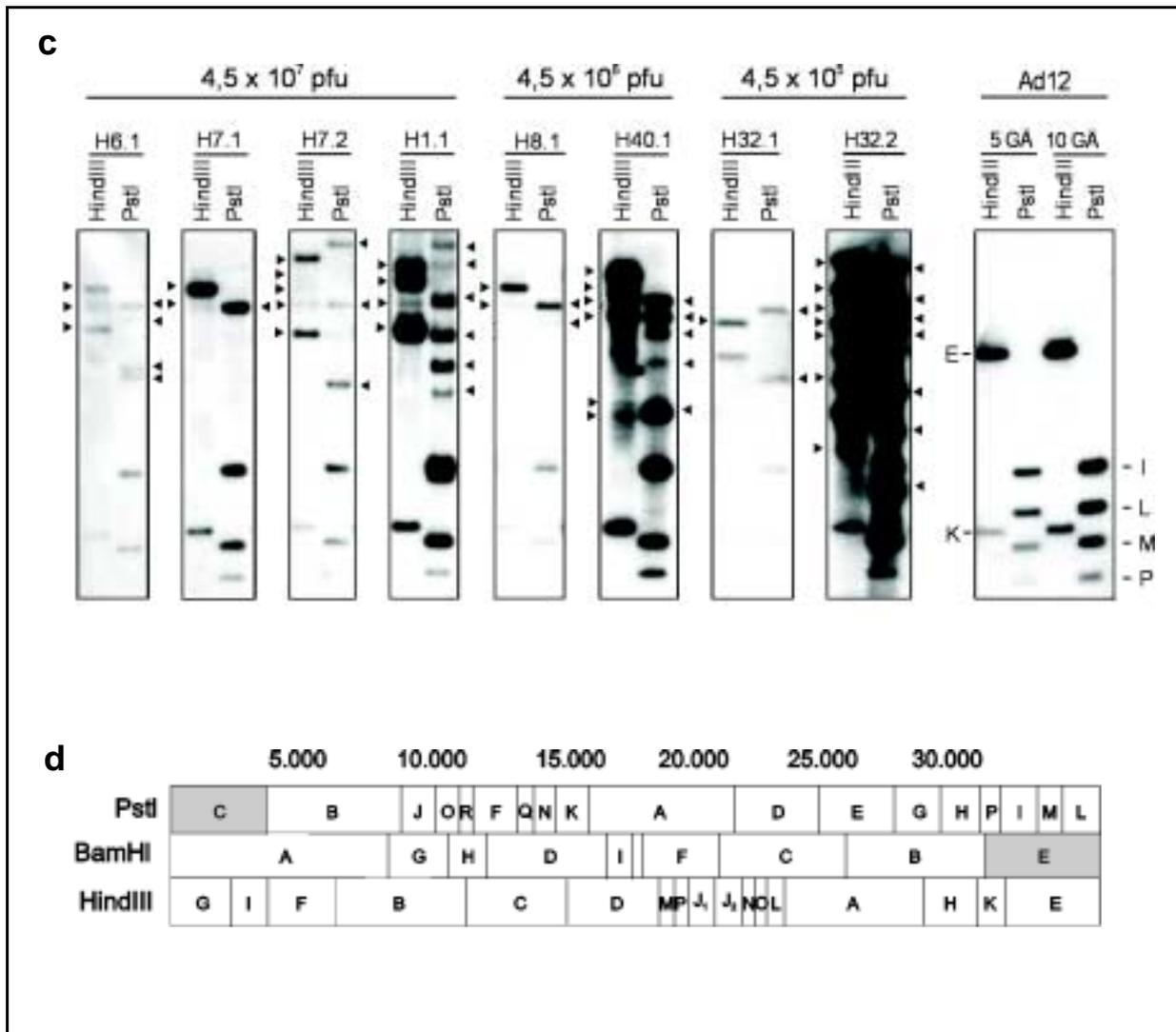
#### 4.3.2 Einfluß der Menge der injizierten Ad12-Virionen auf die Anzahl der in das Hamstergenom integrierten Ad12 Genome

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, daß die Fähigkeit zur Induktion von Tumoren abhängig von der Menge der injizierten Ad12-Virionen ist. Aus diesen Ergebnissen ergab sich die weitere Frage, ob mit abnehmender Menge von injizierten Ad12-Virionen die Anzahl der integrierten Ad12 Kopien sinkt. Um diese Frage zu beantworten, wurde DNA aus Tumoren, die durch unterschiedliche Mengen Ad12-Virionen induziert worden waren, durch Restriktions- und Southern Transfer-Analysen untersucht.

Die aus den Tumoren extrahierte DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *HindIII* oder *PstI* gespalten und auf einem 0,8%igen Agarosegel getrennt. Die Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und entweder gegen Ad12 Gesamt-DNA oder gegen die klonierten terminalen Fragmente des Ad12 Genoms, *PstI*-C oder *BamHI*-E hybridisiert (Abbildung 27d, grau unterlegte Abschnitte). Die Abbildung 27 zeigt das Integrationsmuster der Ad12 DNA in den Tumoren H6.1, H7.1, H7.2, H1.1, H8.1, H40.1, H32.1, H32.2. Bei der Bezeichnung der Tumoren steht die erste Zahl für das Tier, aus dem der Tumor isoliert wurde, und die zweite Zahl kennzeichnet den Tumor selbst. Wurden mehrere Tumoren aus einem Hamster isoliert, so wurden sie nach ihrer Größe geordnet (z.B. die Tumoren 7.2 und 7.3 wurden aus dem Hamster 7 isoliert, wobei der Tumor 7.2 der größere von beiden war). Die Tumoren H6.1, H7.1, H7.2 und H1.1 wurden durch Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu, die Tumoren H8.1 und H40.1 durch Injektion von  $4,5 \times 10^6$  pfu und die Tumoren H32.1 und H32.2 durch Injektion von  $4,5 \times 10^5$  pfu Ad12-Virionen induziert. Als Referenz-DNA wurden 5 bzw. 10 Genomäquivalente der Ad12 DNA mit denselben Restriktionsendonukleasen gespalten und parallel mit der Tumor-DNA im Agarosegel getrennt. Eine Restriktionskarte des Ad12 Genoms ist in Abbildung 27d dargestellt. Die nach dem Restriktionsverdau von Ad12 DNA mit *PstI*, *BamHI* oder *HindIII* entstandenen Restriktionsfragmente wurden entsprechend ihrer Lage im Ad12 Genom eingezeichnet und nach ihrer Größe alphabetisch bezeichnet.

In Abbildung 27a wurden die Fragmente gegen Ad12 Gesamt-DNA, in Abbildung 27b gegen das linke terminale Fragment der Ad12 DNA (*PstI*-C) und in Abbildung 27c gegen das rechte terminale Fragment (*BamHI*-E) hybridisiert. Beim Vergleich der Fragmente der Tumor-DNAs mit denen der Referenz-DNA wird deutlich, daß in allen Tumor-DNAs Fragmente vorhanden sind, die in ihrer Größe nicht mit Fragmenten der Referenz-DNA übereinstimmen und deshalb als sogenannte "Off-Size"-Fragmente bezeichnet werden. Die "Off-Size"-Fragmente sind in den Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet.





**Abbildung 27:** Integrationsmuster der Ad12 DNA in den durch subkutane Injektion von Ad12-Virionen induzierten Tumoren.

Die aus den verschiedenen Tumoren extrahierten DNAs (10 µg) wurden mit den Restriktionsendonukleasen (RE) *HindIII* oder *PstI* gespalten und die entstandenen Fragmente elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarosegel getrennt. Im Anschluß wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen (a) die Ad12 Gesamt-DNA (b) das linke klonierte Ende *PstI*-C (c) das rechte klonierte Ende *BamHI*-E hybridisiert. Als Größen- und Mengen-Referenz-Marker wurden 5 bzw. 10 Genomäquivalente der Ad12 DNA mit denselben RE gespalten. Die original *HindIII*- und *PstI*-Fragmente der Ad12-Marker-DNA wurden der Größe nach alphabetisch gekennzeichnet. Pfeile kennzeichnen "Off-Size"-Fragmente in den Tumor-DNAs. Die Restriktionskarte der Ad12 DNA für die RE *PstI*, *BamHI* und *HindIII* ist im Teil (d) der Abbildung dargestellt. Die terminalen Fragmente, die als Hybridisierungssonden verwendet wurden, sind in (d) grau unterlegt.

Die Klonierung und Sequenzierung mehrerer "Off-Size"-Fragmente aus verschiedenen Ad12-induzierten Tumorzellen ergab, daß diese "Off-Size"-Fragmente häufig sowohl terminale Ad12-Fragmente als auch zelluläre DNA enthalten (Übersicht in Doerfler et al., 1983; Gahlmann et al., 1983; Knoblauch et al., 1996). Aufgrund der Verbindung von terminalen Ad12 DNA-Fragmenten und zellulärer DNA fehlen die Endfragmente HindIII-G und PstI-L häufig in ihrer Originalgröße und erscheinen als Fragmente mit höherem Molekulargewicht ("Off-Size"-Fragmente), was besonders gut nach Hybridisierung gegen die terminalen Fragmente (PstI-C oder BamHI-E) zu erkennen ist. Darüber hinaus können einige dieser "Off-Size"-Fragmente auch durch ein Rearrangement der viralen DNA zustande gekommen sein. Stellen "Off-Size" Fragmente die Verbindung zweier Ad12 Genome dar, so ergibt sich beim Restriktionsverdau mit *HindIII* eine Verbindung des linken terminalen HindIII-G Fragments, das eine Größe von 2.319 bp hat, und des rechten terminalen HindIII-F Fragments, das 3.298 bp groß ist. Insgesamt ergibt sich dann eine Fragmentgröße von 5.617 bp. Nach dem Restriktionsverdau mit *PstI* würde man entsprechend ein Fragment von 4.708 bp erwarten. Fragmente dieser Größe sind im Tumor H8.1 zu erkennen, die gegen beide terminalen Ad12-Fragmente hybridisieren. Ob diese Fragmente zusätzlich noch durch kurze zelluläre Sequenzen unterbrochen sind, könnte durch Klonierung und anschließende Sequenzierung untersucht werden.

Wie aus der Abbildung 27a - c deutlich wird, hat jeder Tumor ein individuelles Ad12-Integrationsmuster mit einem spezifischen Muster an "Off-Size"-Fragmenten. Auch die DNA aus Tumoren, die aus demselben Versuchstier isoliert wurden, wie z.B. die DNA der Tumoren H7.1 und H7.2 haben unterschiedliche Restriktionsmuster nach dem Verdau mit *HindIII* oder *PstI*. Die unterschiedlichen Integrationsmuster der Ad12 DNA in den einzelnen Ad12-induzierten Tumoren sind ein Hinweis auf die Integration der Ad12 DNA in unterschiedliche zelluläre Sequenzen.

Beim Vergleich der Bandenintensitäten der Tumor-DNAs mit der Referenz-DNA wird deutlich, daß in einigen Tumoren (H40.1, H32.2) über 20 Kopien der Ad12 DNA integriert wurden. In anderen Tumoren (H6.1, H7.2, H8.1, H32.1) wurden hingegen weniger als 5 Kopien der Ad12 DNA nachgewiesen. Auf ähnliche Weise wurden durch Restriktions- und Southern DNA-Transfer-Analysen viele Tumoren untersucht, deren Ergebnisse in Tabelle 5 zusammengefaßt sind. Die angegebenen Kopienzahlen beruhen dabei auf dem Vergleich der Bandenintensitäten der Tumor-DNAs mit der Ad12-Referenz-DNA. Insgesamt konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der integrierten Ad12 Genome und der injizierten Ad12 Menge beobachtet werden. Aus dem Hamster H32, der mit  $4,5 \times 10^5$  pfu Ad12-Virionen injiziert worden war, wurden 2 Tumoren (H32.1 und H32.2) mit jeweils einem Durchmesser von 1,5 cm isoliert, von dem der Tumor H32.1 weniger

als 5 Kopien der Ad12 DNA enthielt, während in dem Tumor H32.2 über 20 Ad12 Genome nachgewiesen wurden. Somit bestand weder eine Korrelation zwischen der injizierten Ad12 Menge und der Anzahl der integrierten Ad12 Genome noch zwischen der Anzahl der integrierten Ad12 Genome und der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren. Alle 18 untersuchten Tumoren zeichneten sich durch ein individuelles Ad12 Integrationsmuster aus, als Hinweis für die Integration der Ad12 DNA an nicht spezifische Insertionsstellen in das zelluläre Hamstergenom.

pfu	Tumor	Kopienzahl	Größe (Durchmesser)	pfu	Tumor	Kopienzahl	Größe (Durchmesser)
$4,5 \times 10^7$	H1.1	>20	1,7 cm	$4,5 \times 10^7$	H7.3	3	0,5 cm
"	H1.2	7	1,2 cm	$4,5 \times 10^6$	H8.1	3	1,7 cm
"	H1.3	4	0,5 cm	"	H33.1	2	1,2
"	H3.1	3	2 cm	"	H34.3	15	0,5
"	H3.2	2	2 cm	"	H37.1	2	1,7
"	H3.3	6	0,2 cm	"	H38.2	5	0,8
"	H6.1	1	1 cm	"	H40.1	>20	2
"	H7.1	8	1,2	$4,5 \times 10^5$	H32.1	2	1,5
"	H7.2	3	0,7 cm		H32.2	>20	1,5

**Tabelle 5:** Anzahl der integrierten Ad12 Genome in subkutan induzierten Tumoren

Die Anzahl der Kopien der integrierten Ad12 Genome wurde durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Tumor-DNAs mit der Ad12-Referenz-DNA nach Restriktions- und DNA-Transfer-Analysen geschätzt.

#### 4.3.3 Injektionen von Ad12-Virionen in unterschiedliche Gewebe

Um zu untersuchen, ob und wie schnell Ad12-Virionen nach Injektion in Leber oder Skelettmuskulatur (i.m.) die Bildung von Tumoren induzieren können, wurden Ad12-Virionen in die entsprechenden Gewebe neugeborener Hamster injiziert. Nach Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen in die Oberschenkelmuskulatur bildeten sich innerhalb von 29 - 36 Tagen in 15 von 16 Tieren (94%) Tumoren (Tabelle 6). Dabei wurden aus den meisten Hamstern je 12 - 16 Tumoren isoliert, von denen der größte Tumor einen Durchmesser von 3 cm hatte. Nur in seltenen Fällen waren die Tumoren direkt mit der Muskulatur assoziiert. Die meisten Tumoren wurden aus der Bauchhöhle isoliert, wo sie häufig mit dem Peritoneum verbunden waren. In einzelnen Fällen waren die Tumoren auch mit dem Hodengewebe, dem Zwerchfell oder der Leber assoziiert. Auch nach Injektion der Ad12-Virionen ( $4,5 \times 10^7$  pfu) in die Leber bildeten sich nach spätestens

38 Tagen in 7 von 8 Hamstern (88%) Tumoren. Jedes Tier bildete mindestens 10 Tumoren, von denen der größte einen Durchmesser von 3 cm hatte. Auch diese Tumoren waren nicht alle mit der Leber assoziiert, sondern waren häufig über die gesamte Bauchhöhle verteilt. Im Vergleich zur subkutanen Injektion der Ad12-Virionen wurden bei der Injektion in Leber oder Muskel schneller Tumoren gebildet, die auch einen größeren Durchmesser aufwiesen. Außerdem entwickelten mehr Tiere Tumoren und die Anzahl der pro Tier gebildeten Tumoren lag im Durchschnitt mindestens viermal so hoch wie nach der subkutanen Injektion. Diese Beobachtungen deuten auf eine schnelle Verbreitung der Virionen nach Injektionen in Leber- und Muskelgewebe hin.

Wurde die Menge der intramuskulär injizierten Ad12-Virionen auf  $4,5 \times 10^5$  pfu reduziert, so konnte die Tumorbildung erst 63 bzw. 96 Tage nach Injektion festgestellt werden (Tabelle 6). Auch die Anzahl der tumorbildenden Tiere reduzierte sich auf 20% (3 von 15 Tieren) und die Anzahl der gebildeten Tumoren sank auf 1 - 2 pro Tier. Interessanterweise konnte auch hier, wie nach der subkutanen Injektion, keine Tumorbildung nach der Injektion von  $4,5 \times 10^4$  pfu oder weniger Ad12-Virionen beobachtet werden.

Ad12 pfu	Anzahl der injizierten Tiere	Anzahl der Hamster mit Tumoren	Tumorbildung (in Tagen)	Anzahl der Tumoren pro Tier	Größe der Tumoren (Durchmesser in cm)	Ort der Tumorbildung
$4,5 \times 10^7$ (i.m.) <sup>1</sup>	17 (16) <sup>2</sup>	15 (94%) <sup>3</sup>	29 - 36	12 - 16	0,5 - 3	Muskel Bauchhöhle Leber Zwerchfell Hoden
$4,5 \times 10^7$ (Leber) <sup>1</sup>	12 (8) <sup>2</sup>	7 (88%) <sup>3</sup>	38	10 - 15	0,5 - 3	Leber Bauchhöhle
$4,5 \times 10^6$ (i.m.) <sup>1</sup>	15 (11) <sup>2</sup>	7 (75%) <sup>3</sup>	32 - 39	10 - 12	0,2 - 3	Bauchhöhle Leber Zwerchfell
$4,5 \times 10^5$ (i.m.) <sup>1</sup>	20 (15) <sup>2</sup>	3 (20%) <sup>3</sup>	63, 96	1 - 2	2	Bauchhöhle Leber
$4,5 \times 10^4$ (i.m.) <sup>1</sup>	11 (10) <sup>2</sup>	0	/	/	/	/
$4,5 \times 10^3$ (i.m.) <sup>1</sup>	9 (8) <sup>2</sup>	0	/	/	/	/

**Tabelle 6:** Ad12-induzierte Tumorbildung in unterschiedlichen Geweben

( )<sup>1</sup>: Injektionsort (i.m.: Oberschenkelmuskulatur)

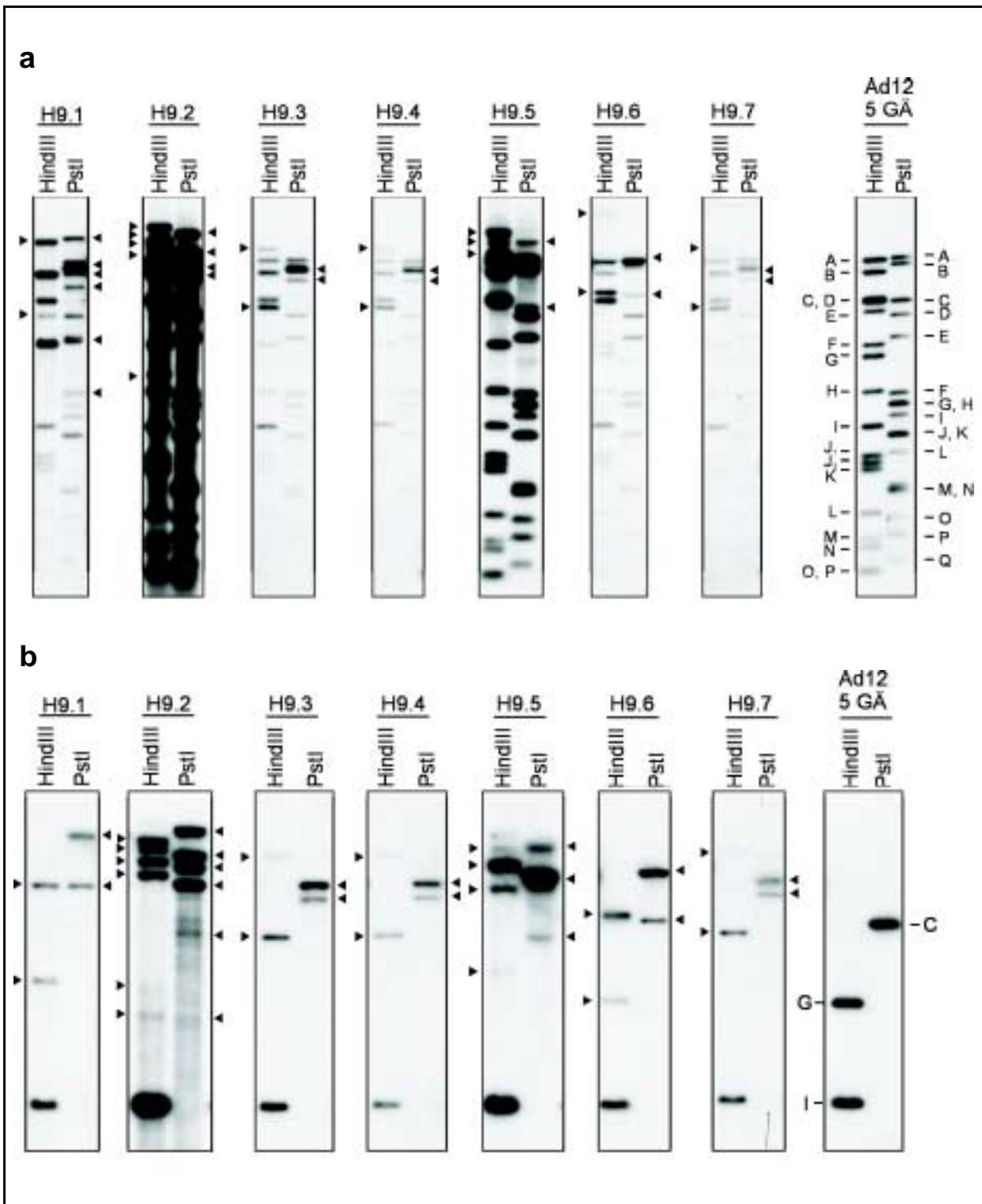
( )<sup>2</sup>: Anzahl der überlebenden Tiere bis zur Untersuchung

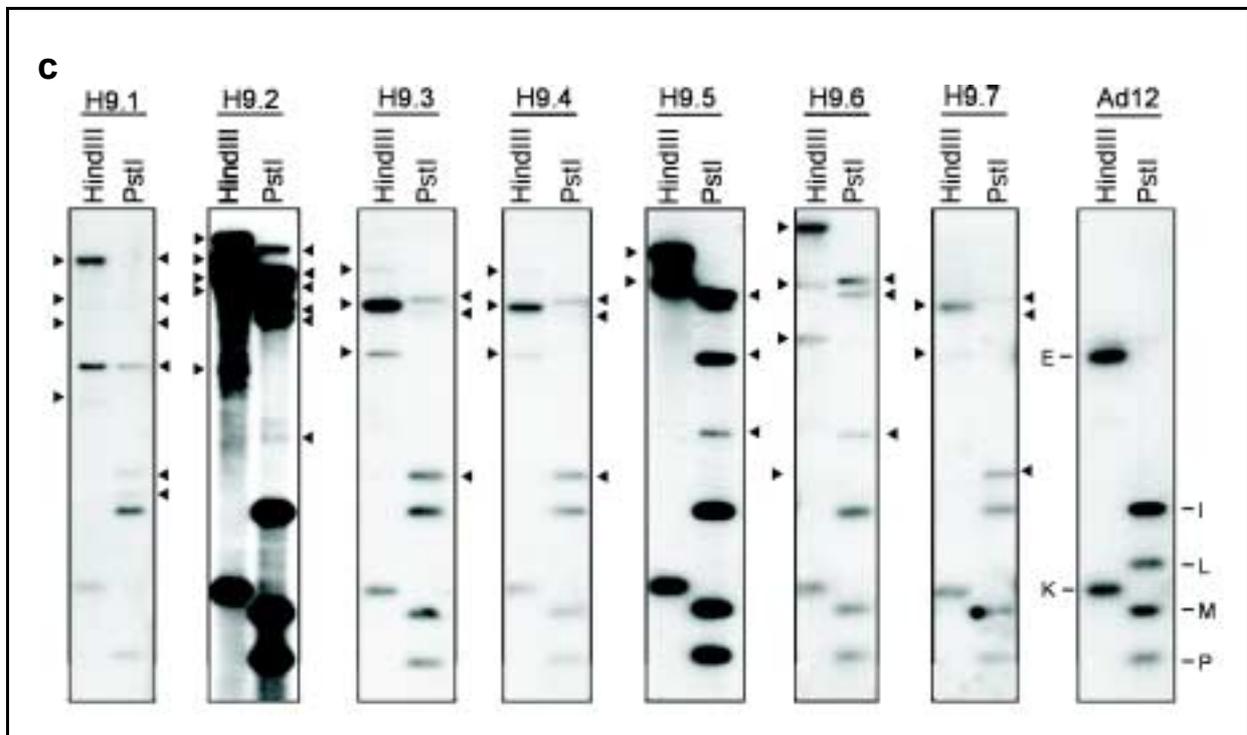
( )<sup>3</sup>: Die Prozentzahl entspricht der Anzahl der tumorbildenden Tiere von den insgesamt bis zur Untersuchung überlebenden Tieren.

#### 4.3.4 Integrationsmuster der Ad12 DNA in intramuskulär induzierten Ad12-Tumoren

Um der Frage nachzugehen, ob die zahlreichen in der Bauchhöhle gebildeten Tumoren eines Hamsters auf ein oder wenige Integrationsereignisse zurückzuführen sind, wurde das Integrationsmuster der Ad12 DNA in diesen Tumoren durch Southern Transfer-Analysen untersucht. Dazu wurde die aus den Tumoren extrahierte DNA mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* oder *PstI* gespalten, auf einem 0,8%igen Agarosegel getrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Fragmente wurde dann entweder gegen die Ad12 Gesamt-DNA, das linke terminale (*PstI*-C Fragment) oder das rechte terminale Ende (*BamHI*-E Fragment) der Ad12 DNA hybridisiert. Die Abbildung 28 zeigt das Integrationsmuster der Ad12 DNA in den Tumoren H9.1 - H9.7, die 39 Tage nach intramuskulärer Injektion von  $4,5 \times 10^6$  pfu Ad12-Virionen aus der Bauchhöhle des Hamsters H9 entnommen wurden. Wie zu erkennen ist, zeigen 3 der 8 untersuchten Tumoren identische Restriktionsmuster (Tumoren H9.3, H9.4 und H9.7), die auf einen identischen Integrationsort der Ad12 DNA hindeuten. Wahrscheinlich stammen diese Tumoren von einem einzigen Ad12 Integrationsereignis ab und sind durch Aussaat von Zellen eines Primärtumors entstanden (peritoneale Aussaat). Beim Vergleich der Bandenintensitäten dieser 3 Tumoren fällt auf, daß die Anzahl der integrierten Ad12 Genome variiert. Mit abnehmender Tumorgroße (H9.3 > H9.4 > H9.7) sinkt die Anzahl der injizierten Ad12 Kopien. Möglicherweise sind Kopien der Ad12 DNA bei der Ausbreitung verloren gegangen.

Auch aus einem anderen Hamster wurden zwei Tumoren (H15.2 und H15.9) extrahiert, die gleiche Restriktionsmuster nach dem Verdau mit *HindIII* oder *PstI* zeigten (siehe Tabelle 7). Diese beiden Tumoren enthielten nur terminale Fragmente der Ad12 DNA, wie nach Hybridisierung gegen Ad12 Gesamt-DNA deutlich wurde. Alle anderen 8 aus diesem Hamster extrahierten Tumoren zeigten individuelle Restriktionsmuster (Daten nicht gezeigt). Insgesamt scheint die peritoneale Aussaat von Zellen eines Ad12-induzierten Tumors keine Ausnahme nach i.m. Injektion von Ad12-Virionen zu sein. Dennoch muß noch durch Sequenzanalysen der identische Integrationsort der Ad12 DNA in diesen Tumoren bestätigt werden.





**Abbildung 28:** Integrationsmuster der Ad12 DNA in den durch i.m. Injektion von Ad12-Virionen induzierten Tumoren.

Die Tumoren H9.1 - H9.7 wurden durch i.m. Injektion von  $4,5 \times 10^6$  pfu Ad12-Virionen induziert. Die aus diesen Tumoren extrahierte DNA (jeweils  $10 \mu\text{g}$ ) wurde mit *HindIII* oder *PstI* gespalten und die entstandenen Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel getrennt. Im Anschluß wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und gegen (a) Ad12 Gesamt-DNA (b) das linke klonierte PstI-C Fragment (c) das rechte klonierte BamHI-E Fragment hybridisiert. Als Größen- und Mengen-Referenz-Marker wurden 5 Genomäquivalente (GÄ) der Ad12 DNA mit denselben RE gespalten.

pfu	Tumor	Kopienzahl	Größe (Durchmesser)	pfu	Tumor	Kopienzahl	Größe (Durchmesser)
$4,5 \times 10^7$ (Leber) <sup>1</sup>	H4.1	2	2,5 cm	$4,5 \times 10^7$ (i.m.) <sup>1</sup>	H15.1	10	2 cm
“	H4.3	1	2,2 cm	“	H15.2	<1 <sup>(2) (3)</sup>	2 cm
“	H4.9	3	0,4 cm	“	H15.3	2	2 cm
“	H5.1	4	3,3 cm	“	H15.4	3	1,7 cm
“	H5.2	1	3,2 cm	“	H15.5	3	0,9
“	H5.3	1	2,5 cm	“	H15.6	>20	0,9
$4,5 \times 10^7$ (i.m.) <sup>1</sup>	H13.1	>20	2,8 cm	“	H15.7	2	0,5
“	H13.2	8	2,8 cm	“	H15.8	2	< 0,5
“	H13.3	7	1,5 cm	“	H15.9	2	< 0,5
“	H13.4	3	1,3 cm	“	H15.10	<1 <sup>(2) (3)</sup>	< 0,5
“	H13.5	3	1 cm	“	H20.1	2	2 cm
“	H13.6	7	0,8 cm	“	H20.2	1	1,7 cm
“	H13.7	8	0,8 cm	“	H20.3	1	1,7 cm
“	H13.8	>20	0,6 cm	“	H22.1	1	~ 2 cm
“	H13.9	10	0,6 cm	“	H22.2	3	2 cm
“	H13.10	10	0,5 cm	$4,5 \times 10^6$ (i.m.) <sup>1</sup>	H9.1	2	3 cm
“	H13.11	>20	0,5 cm	“	H9.2	>20	2 cm
“	H13.12	8	< 0,5 cm	“	H9.3	2 <sup>(4)</sup>	1,7 cm
“	H13.13	2	< 0,5 cm	“	H9.4	1 <sup>(4)</sup>	1 cm
“	H14.2	5	2 cm	“	H9.5	15	0,8 cm
“	H14.2	2	1,4 cm	“	H9.6	2	0,5 cm
“	H14.4	2	1,2 cm	“	H9.7	1 <sup>(4)</sup>	0,5 cm
“	H14.5	2	1,1 cm	$4,5 \times 10^5$ (i.m.) <sup>1</sup>	H31.1	10	2,5 cm <sup>2</sup>
“	H14.6	7	0,7 cm	“	H31.2	7	2 cm

**Tabelle 7:** Anzahl der integrierten Ad12 Genome in Tumoren nach Injektion von Ad12-Virionen in Leber oder Muskel.

Die Anzahl der integrierten Ad12 Genome wurde durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Tumor-DNA-Fragmente mit denen der Ad12-Referenz-DNA nach Restriktions- und DNA-Transfer-Analysen geschätzt.

<sup>1</sup> Injektionsort (i.m.: Oberschenkelmuskulatur)

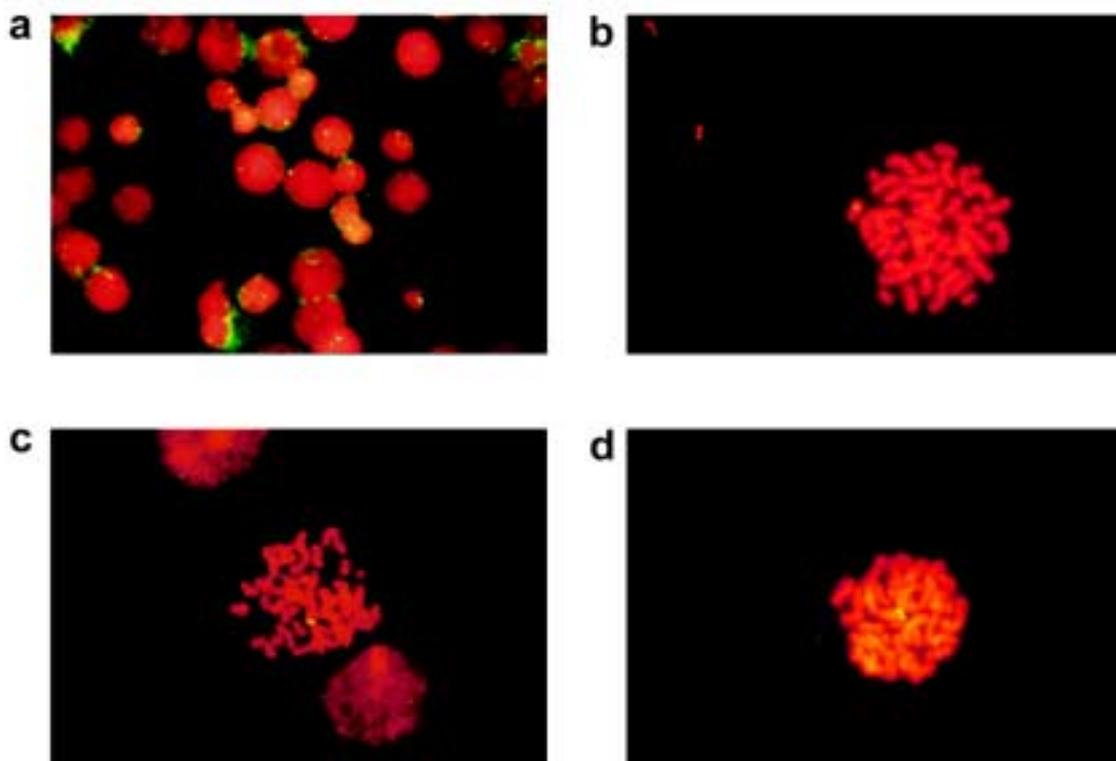
<sup>2</sup> Die Tumoren enthielten nur terminale Fragmente der Ad12 DNA.

<sup>3/4</sup> Restriktionsmuster der DNA-Fragmente war nach Spaltung mit *HindIII* oder *PstI* identisch.

#### 4.3.5 Chromosomale Lokalisation der integrierten Ad12 DNA

Um die chromosomale Lokalisation der integrierten Ad12 DNA in Tumorzellen, von in der Bauchhöhle gebildeten Tumoren, zu untersuchen, wurden FISH-Analysen von entsprechend etablierten Tumorzelllinien durchgeführt. Zum Nachweis der Ad12 DNA in den Tumorzellen wurde biotinylierte Ad12 DNA als Hybridisierungssonde verwendet.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen zeigen, daß in allen untersuchten Tumorzellen sämtliche Kopien der integrierten Ad12 DNA an einer Stelle eines Chromosoms lokalisiert sind (Abbildung 29), so wie es auch für subkutan induzierte Tumoren mehrfach gezeigt wurde (Knoblauch et al., 1996, Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Darüber hinaus wird deutlich, daß sich die Integrationsorte der Ad12 DNA in den verschiedenen Tumorzelllinien unterscheiden. In der Tumorzelllinie TZ H9.2 sind die Kopien der integrierten Ad12 DNA in der Umgebung des Zentromers eines mittelgroßen Chromosoms lokalisiert. Im Gegensatz dazu liegen die Integrationsorte der Ad12 DNA in



**Abbildung 29:** FISH-Analysen der integrierten Ad12 DNA in Ad12-induzierten Tumoren und Tumorzelllinien.

(a) Zellen des Tumors H20.1 bzw. der Tumorzelllinien (b) TZ 9.2 (c) TZ 13.2 (d) TZ 22.2 wurden fixiert und auf Objektträger aufgespritzt. Als Sonde wurde Ad12 DNA mit Biotin markiert, die mit FITC gekoppeltem Avidin sichtbar gemacht wurde. Die zelluläre DNA wurde mit Propidiumiodid angefärbt. Vergrößerung: 1200 x.

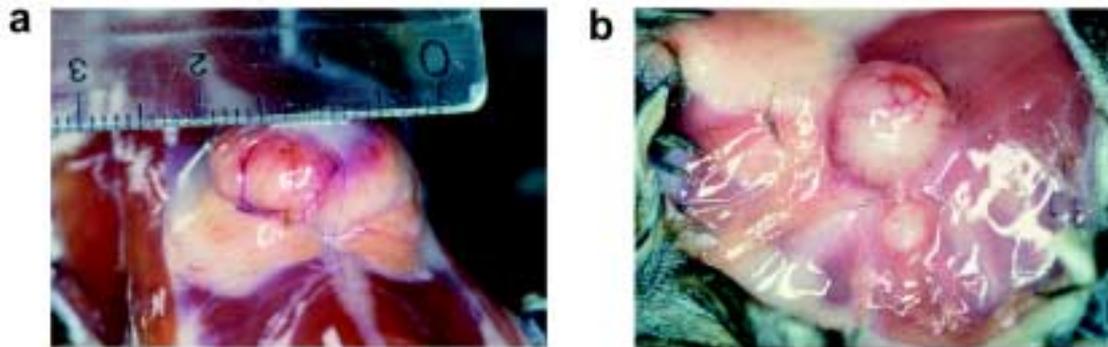
den Zelllinien TZ 13.2 und TZ 22.2 in der Nähe der telomeren Region eines kleinen (TZ 13.2) bzw. eines größeren Chromosoms (TZ 22.2). Möglicherweise sind kurze virale Fragmente auch noch an anderen Stellen des Genoms integriert, die aber aufgrund der Nachweisgrenze der FISH-Methode, die bei etwa 1 kb liegt, nicht detektiert werden konnten.

Von den Tumoren, die bei der Restriktions- und Southern Transfer-Analyse gleiche Integrationsmuster zeigten, wurden weder Tumorzelllinien etabliert noch Tumorzellen direkt auf Objektträger aufgespritzt. Deswegen konnte die vermutete identische Lokalisation der Ad12 DNA in den Tumoren H9.3, H9.4 und H9.7 an identischen Stellen gleicher Chromosomen bisher mit dieser Methode nicht bestätigt werden.

#### **4.3.6 Klassifikation der Adenovirus Typ 12 induzierten Tumoren**

Seitdem Trentin und Mitarbeiter 1962 entdeckten, daß Ad12 in neugeborenen Hamstern die Bildung von Tumoren auslöst, haben weltweit zahlreiche Pathologen versucht, die durch Ad12 induzierten Tumoren zu charakterisieren. In einigen Veröffentlichungen werden die Tumoren als undifferenzierte Sarkome beschrieben (Trentin et al., 1962; Huebner et al., 1962). Andere Autoren schlagen vor, daß die durch Ad12-induzierten Tumoren als undifferenzierte bösartige Tumoren klassifiziert werden sollten (Kirschstein et al., 1964; Spjut et al., 1967), und wiederum andere sprechen von Tumoren, die vom peripheren oder zentralen Nervensystem abgeleitet sind (Ogawa et al., 1965; Yabe et al., 1966).

Um zu untersuchen, ob Ad12 abhängig vom Injektionsort unterschiedliche Tumorarten induzieren kann, wurden die Tumoren, die nach Injektion der Ad12-Virionen in Leber, Muskel oder Nackenregion (s.c.) gebildet wurden, näher charakterisiert. Makroskopisch unterschieden sich die an der Leber oder am Muskel gebildeten Tumoren weder von denen, die nach i.m. Injektion im Bauchraum gebildet wurden, noch von denen, die nach subkutaner Injektion aus dem Nacken isoliert wurden. Die kugelförmigen Tumoren wiesen außen eine feste kapselartige Struktur auf, die mit einer halbflüssigen Ansammlung von Zellen gefüllt war (Abbildung 30).

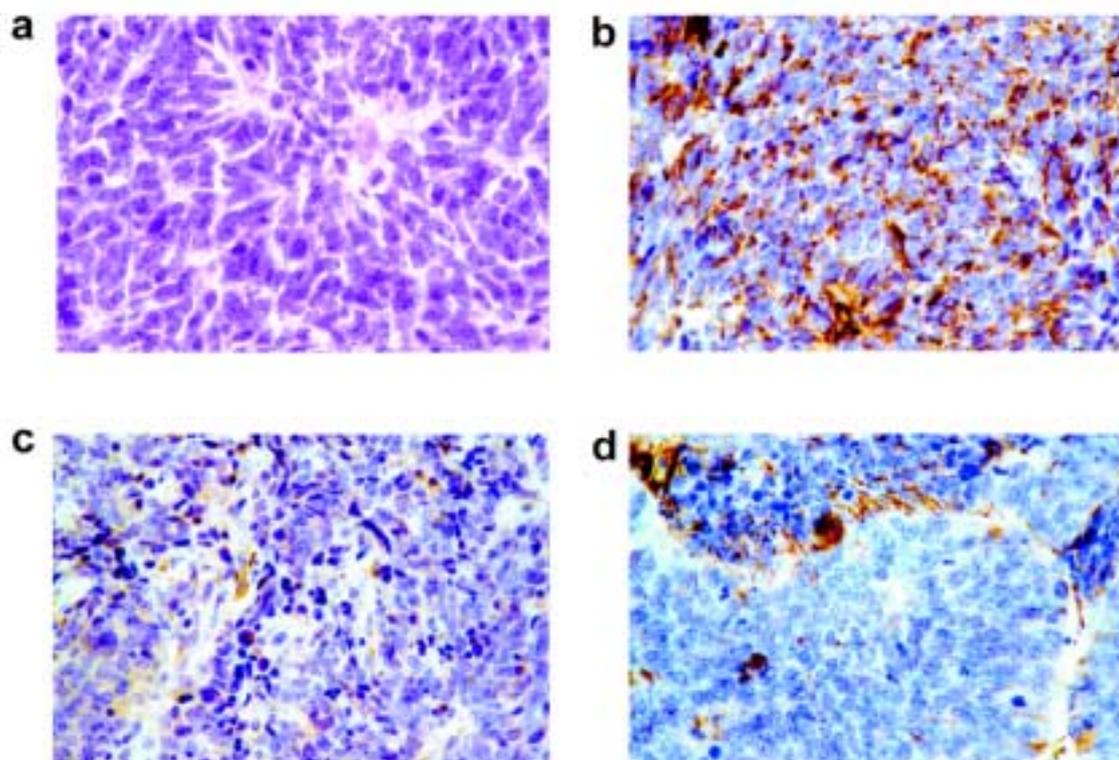


**Abbildung 30:** Ad12-induzierte Tumoren in der Nackenregion von Hamstern.

Tumoren der Hamster (a) H8 (b) H6, die durch die s.c. Injektion von (a)  $4,5 \times 10^6$  pfu (b)  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen induziert wurden.

Die folgenden histologischen und histochemischen Untersuchungen wurden am Institut für Neuropathologie der Universität Düsseldorf von Prof. Dr. Wechsler bzw. am Institut für Pathologie der Universität Aachen von Prof. Dr. Mittermaier durchgeführt. Gewebeschnitte von Tumoren, die nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion von Ad12-Virionen in Hamstern gebildet wurden, zeigten nach Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbungen unabhängig vom Ort der Injektion und der Stelle der Tumorbildung kleine abgerundete gleichmäßig gefärbte Tumorzellen (Abbildung 31). Die Tumorzellen hatten einen unnatürlich großen hyperchromatischen Kern und einen kaum sichtbaren Zytoplasmasaum. Man spricht in diesem Fall von nacktkernigen Tumorzellen. Diese Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns sowie die Vergrößerung von Nukleoli sind typische Charakteristika von Tumorzellen, die eine Zunahme des Proliferationsstoffwechsels zum Ausdruck bringen. Auch waren zahlreiche Mitosen zu beobachten. Die Tumorzellen bildeten ferner Pseudorosetten ähnliche Strukturen, die auch als Homer-Wright-Rosetten bezeichnet werden. Dabei sind die Tumorzellen radiär um leicht eosinophile Areale angeordnet. Von diesen Pseudorosetten werden die echten Rosetten unterschieden, bei denen die Tumorzellen rund um ein Lumen liegen, das dem Zentralkanal des Spinalkanals gleicht. Die Bildung einer echten Rosette ist charakteristisch für Retinoblastome, während die in Abbildung 31a dargestellten Homer-Wright-Rosetten im Zusammenhang mit primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) auftreten (Yanoff, 1991).

Immunhistochemisch konnte in den Tumorzellen eine starke Vimentin- und Synaptophysin-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 31b, c). Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein, das in Fibroblasten und Endothelzellen sowie in anderen nichtmuskulären Mesenchymzellen vorkommt. Der Nachweis der Vimentin-Expression in den Tumorzellen läßt auf einen mesenchymalen Ursprung dieser Zellen schließen. Im Gegensatz dazu gilt der immunhistochemische Synaptophysinnachweis als Beleg für eine neuronale Differenzierung der Zellen. Synaptophysin ist beim Aufbau von synaptischen Vesikeln innerhalb von chemischen Synapsen beteiligt. Eine leichte Zellfärbung konnte darüber hinaus beim Nachweis der Neuron-spezifischen Enolase (NSE) beobachtet werden (Abbildung 31d). Die NSE ist ein Isoenzym der Enolase, die in differenzierten Neuronen und neuroendokrinen Zellen gebildet wird. Da zwischen der NSE und nicht neuronalen Isoenzymen der Enolase keine immunologische Kreuzreaktivität besteht, kann die NSE spezifisch mittels immunhistochemischer Methoden in Anwesenheit



**Abbildung 31:** Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Ad12-induzierten Tumoren.

(a) Tumorgewebe mit kleinen undifferenzierten gleichförmigen Zellen, die Homer-Wright-Rosetten ausbilden (Hämatoxylin/Eosin-Färbung; Vergrößerung 400 x). Immunhistochemischer Nachweis von (b) Vimentin, (c) Synaptophysin und der (d) Neuron-spezifischen Enolase (NSE). Der Nachweis dieser drei Markerproteine erfolgte indirekt durch eine Peroxidase-Färbung.

anderer Enolasen nachgewiesen werden (Kaiser et al., 1989). Diese Nachweisreaktionen trafen auf alle durch Ad12-induzierten Tumoren zu.

Somit erscheint es naheliegend, daß Ad12 unabhängig von der Injektionsstelle der Ad12-Virionen und dem Ort der Tumorbildung die Entwicklung von wenig differenzierten Tumoren mit sowohl neuroektodermalen als auch mesenchymalen Merkmalen induziert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Schicksal von fremder DNA in Mäusen nach oraler Applikation

Es ist kaum etwas darüber bekannt, was mit den riesigen Mengen fremder DNA passiert, die wir Tag für Tag mit der notwendigen Nahrung aufnehmen. Auch gibt es bis heute keine genauen Angaben über den DNA-Gehalt in den verschiedenen Nahrungsmitteln. Aus 5 g frischem Spinat konnten wir etwa 5 mg DNA extrahieren. Je nach Nahrungszusammensetzung nehmen wir schätzungsweise etwa 1 g DNA am Tag mit der Nahrung auf. Um das Schicksal von DNA-Molekülen im GI-Trakt zu untersuchen, wurden Mäuse als Modell-Organismen mit 50 µg pEGFP-C1 Plasmid DNA gefüttert. Es wurde zunächst bewußt ungeschützte nackte DNA verwendet, um die DNA allen Faktoren auszusetzen, die im Verdauungstrakt auf die in der Nahrung enthaltenen DNA einwirken. Das pEGFP-C1 Plasmid wurde als Test-DNA gewählt, da es keine Homologien zur Maus-DNA und zur DNA der Darmbakterien, weder in Vorversuchen noch in Datenbank-Sequenzanalysen, zeigte. 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 ca. 4 bis 5 g Futterpellets täglich 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 Fütterung von Mäusen mit 50 µg pEGFP-C1 DNA konnten Fragmente der Test-DNA bis zu 8 h im Darm durch Southern Transfer-Analysen und bis zu 24 h mit Hilfe der PCR-Methode nachgewiesen werden (Abbildungen 4 - 6). Dabei war jeweils der Blinddarm der Darmabschnitt, in dem die DNA am längsten persistierte. Dies deutet auf eine Speicherfunktion des Blinddarms der Maus sowie auf eine geringe Nukleaseaktivität im Blinddarm hin. Im Darm vorkommende Nukleasen 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 dort die Nukleaseaktivität am höchsten, die im weiteren Darmverlauf abnimmt. Somit wird im Dünndarm verweilende DNA schnell abgebaut. Passiert die DNA jedoch schnell den enzymatisch hoch aktiven Dünndarm, so werden die in den Blinddarm gelangenden Fragmente durch die geringere Nukleasekonzentration nicht so schnell abgebaut und sind 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 min komplett abgebaut. Im Gegensatz dazu konnten nach 4 h fast 10% der mit dem Dickdarminhalt inkubierten DNA noch nachgewiesen werden (Maturin und Curtiss, 1977).

Im Vergleich zu nackter DNA konnte mit SuperFect komplexierte pEGFP-C1 DNA wesentlich länger im Magen-Darm-Kanal durch Southern Transfer-Analysen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die gfp-spezifischen Fragmente hatten im Magen 3 h und 7 h nach Verabreichung der DNA-Komplexe Größen von über 1900 bp. Auch 18 h nach Fütterung konnten Fragmente der gfp DNA mit dieser Methode noch im Magen wiedergefunden werden. Eine ähnlich lange Persistenz im Magen wurde nach oraler Applikation von in Mikrosphären verpackter DNA beobachtet, was mit einer hohen Adhäsion der Moleküle an das Magenepithel erklärt wurde (Chickering et al., 1995; Mathiowitz et al., 1997). Dabei war die Persistenz der DNA im Magen im starken Maße von der chemischen Zusammensetzung der Mikrosphären abhängig.

Mit PCR-Analysen konnte gezeigt werden, daß Fragmente der nackten verfütterten gfp DNA, die im GI-Trakt nicht vollständig abgebaut wurden, in innere Organe gelangen können. Dabei wurde die fremde DNA 3 h nach Fütterung im Blut und bis zu 8 h in Leber, Milz und Niere nachgewiesen (Abbildungen 7 und 8). Die amplifizierten Fragmente hatten eine Größe bis zu 1277 bp und enthielten die komplette Promotor-gfp-Sequenz. Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage nach der Expression der oral verabreichten DNA (s.u.). Die mittels PCR-Analysen erzielten Ergebnisse konnten durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen bestätigt werden, die darüber hinaus zeigten, daß die in Leber, Milz und Niere nachgewiesene Test-DNA nicht nur aus Blutzellen in den Geweben stammte, sondern von den entsprechenden Gewebezellen aufgenommen wurde (Abbildung 9). Die gfp DNA wurde dabei immer in den Kernen der Zellen nachgewiesen, als Hinweis auf einen Transportmechanismus der fremden DNA in den Kern. Zusätzlich könnten auch intrazelluläre Desoxyribonukleasen für einen raschen Abbau der DNA im Cytoplasma verantwortlich sein, die beispielsweise eine große Rolle bei apoptotischen Prozessen spielen (Übersicht in Counis und Torriglia, 2000). In der Milz wurde gfp DNA ausschließlich in Zellen des lymphoretikulären Gewebes nachgewiesen, nicht in Zellen des Bindegewebes. In der Leber lagen Zellen, die die fremde DNA aufgenommen hatten, meistens in der Nähe von Blutgefäßen. Diese Beobachtungen sowie der Nachweis der gfp DNA in Zellen des Säulenepithels der Darmwand lassen vermuten, daß die oral applizierte DNA vom Darmepithel aufgenommen wird und über das Blut in innere Organe gelangt. Das umfangreiche Lymphsystem des Darms ist direkt über den *Ductus thoracicus* mit dem Blutkreislauf verbunden.

Über den Mechanismus, der zur DNA-Aufnahme über das Darmepithel führt, ist bisher nichts bekannt. Die Beobachtung, daß fremde DNA in Zellen der Peyerschen Plaques gefunden wird (Schubbert et al., 1997), ist ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von M-Zellen an der Aufnahme von fremder DNA, ähnlich wie es für verschiedene Mikroorganismen und in Mikrosphären verpackte DNA beschrieben wird (Übersicht in Siebers und Finlay, 1996; Mathiowitz et al., 1997). M-Zellen besitzen, wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, im Gegensatz zu benachbarten Enterocyten eine wenig ausgebildete Glykokalyx und keine schützende Schleimschicht (Mucus), wodurch DNA-Molekülen der Kontakt zur apikalen Oberflächenmembran vereinfacht wird. Bemühungen M-Zell-spezifische Oberflächenmarker zu produzieren, führte zu der Bildung von monoklonalen Antikörpern, die verschiedene M-Zell-Domänen erkennen (Pappo, 1989). Die bisher isolierten Antikörper sind jedoch nicht vollständig M-Zell-spezifisch, erlauben aber mittels der Durchflußzytometrie eine Anreicherung und Isolierung von M-Zellen aus dem Follikel assoziiertem Epithel (FAE), das mit den Peyerschen Plaques assoziiert ist (Kapitel 1.3.3). Dagegen ist es bisher nicht möglich, eine immortalisierte M-Zelllinie herzustellen, da weder der Ursprung der M-Zellen noch Faktoren, die die M-Zelldifferenzierung induzieren, bekannt sind. Es wird derzeit diskutiert, ob M-Zellen direkt aus undifferenzierten Stammzellen in den Krypten gebildet werden oder aus differenzierten Enterocyten hervorgehen (Clark et al., 1993; Sansonetti und Phalipon, 1999). Somit kann die mögliche Aufnahme von fremder DNA durch M-Zellen *in vitro* zur Zeit nicht näher charakterisiert werden. Auch Untersuchungen von immundefizienten Mäusen könnten Hinweise auf den Mechanismus der DNA-Aufnahme liefern. Während immundefiziente Mäuse, die keine B- oder T-Lymphocyten enthalten, kleine Peyersche Plaques mit typischen M-Zellen bilden, konnten keine Peyerschen Plaques in RAG (Recombination Activation Gene) defizienten Mäusen beobachtet werden (Ermak und Owen, 1987; Debard et al., 1999).

Die Aufnahme von nackter DNA *in vitro* wurde in HeLa und BHK Zellen nach Zugabe von Ad12 DNA in das Kulturmedium untersucht (Schröder et al., 1997). Dabei verlief die Aufnahme von Ad12 DNA, die das terminale Protein (pTP) kovalent an den Enden gebunden hatte, 10 - 20 mal effizienter als die von nackter Ad12 DNA. Möglicherweise wird im Darm die DNA erst durch Bindung von Proteinen kompetent für die Aufnahme von M-Zellen oder auch anderer Zellen gemacht. Diese Vermutung könnte näher untersucht werden, indem nackte DNA zunächst mit Extrakten aus dem Darm inkubiert wird, bevor sie in das Kulturmedium von Zellen gegeben wird.

Viren und Bakterien gelangen meistens nach Bindung von spezifischen Oberflächenrezeptoren auf Zellmembranen in verschiedene Zellen. Einige Adenoviren

binden spezifisch an das CAR Protein (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor), an das, wie der Name schon sagt, auch Coxsackieviren binden können (Kapitel 5.3.3). Möglicherweise erfolgt auch die Aufnahme von nackter oder mit Proteinen komplexierter DNA über Rezeptoren. Diese Hypothese wird durch verschiedene Beobachtungen unterstützt. Bankhurst und Williams wiesen DNA-bindende Lymphocyten sowohl in Menschen mit als auch ohne systemischen Lupus erythematoses (SLE) nach (Bankhurst und Williams, 1975). Sie vermuteten, daß die DNA über anti-DNA-IgG Antikörper an die Oberflächenmembran von B-Zellen binden kann. Okudaira und Mitarbeiter haben beschrieben, daß anti-DNA Antikörper der Maus DNA-Moleküle auf der Oberfläche von Thymocyten der Maus und humanen Lymphocyten binden können und daß dieser Komplex vergleichbar mit einer Rezeptor vermittelten Endocytose in die Zelle aufgenommen wird (Okudaira et al., 1987). Ein weiterer Hinweis auf DNA-spezifische Rezeptoren ist die Beobachtung, daß das Serum von Patienten mit SLE die Bindung von  $^3\text{H}$ -DNA an B-Zellen supprimieren kann (Abdou et al., 1981). Hierbei gehen die Autoren davon aus, daß anti-Idiotyp Antikörper die Paratope von anti-DNA Antikörpern blockieren. Auch stöchiometrische Analysen geben Hinweise auf einen spezifischen DNA-Rezeptor. So wurde gezeigt, daß Leukocyten, aber nicht Erythrocyten,  $\lambda$  Phagen DNA über einen sättigbaren Prozeß binden können, als Hinweis auf Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen (Bennett et al., 1985). Spezifische DNA "scavenger" Rezeptoren wurden auf Makrophagen und Lymphocyten identifiziert, deren Funktion wohl hauptsächlich in der Aufnahme von DNA aus abgestorbenen Zellen gesehen wird (Bennett et al., 1985, 1988). Da auch in anderen Zellen als Leukocyten die Aufnahme und Expression von fremder DNA durch das anionische Polymer Dextransulfat inhibiert werden kann, wird angenommen, daß auch diese Zellen DNA spezifische Rezeptoren mit hoher Affinität zu polyanionischen Komponenten besitzen (Meyer et al., 1995).

Die mit pEGFP-C1 erzielten Ergebnisse korrelieren weitgehend mit den Ergebnissen, die nach Verfütterung von M13mp18 DNA beschrieben wurden (Schubbert et al., 1994, 1997). Demzufolge scheint das Schicksal von fremder DNA im Verdauungstrakt von Mäusen unabhängig von der Modell-DNA zu sein. Auch die Aufnahme über das Darmepithel und der Transport in Leber-, Milz- und Nierenzellen scheinen nicht M13mp18-spezifisch gewesen zu sein. Es wäre vorstellbar, daß die Aufnahme von der M13mp18 DNA durch das Vorhandensein von bakterienspezifischen Sequenzen begünstigt war. Die M13mp18 DNA enthält das bakterielle LacZ-Gen mit einer Größe von 789 bp (Messing et al., 1978), das eine mögliche homologe Rekombination zwischen bakterieller und M13mp18 DNA zuläßt. Somit konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, daß M13mp18-rekombinante Bakterien über das Darmepithel

aufgenommen werden und die Aufnahme von nackter DNA vortäuschen. Die gfp DNA enthielt hingegen keine bakterien-spezifischen Sequenzen. Darüber hinaus wurden die Aufnahme und die Amplifikation des gfp Plasmids in Darmbakterien durch Koloniehybridisierungen untersucht und als negativ nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte in DNA-Transfer-Analysen niemals das intakte pEGFP-C1 Plasmid in Darminhalten nachgewiesen werden, sondern immer nur Fragmente mit einer Größe bis zu 1.200 bp. Selbst nach Komplexierung der DNA mit SuperFect wurde nicht das ganze Plasmid im Darm wiedergefunden. Somit konnten eine Amplifikation und Aufnahme der Plasmid DNA von Darmbakterien weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Fütterungsexperimente mit pEGFP-C1 DNA konnten somit die mit M13mp18 DNA erzielten Ergebnisse bestätigen und darüber hinaus zeigen, daß die Aufnahme fremder DNA nicht von bakterienspezifischen Sequenzen abhängig ist.

Die Größe der Test-DNA schien keinen wesentlichen Einfluß auf die Ergebnisse zu haben. Die M13mp18 DNA ist mit 7250 bp um 35% größer als das pEGFP-C1 Plasmid (4730 bp). Im Gegensatz zur pEGFP-C1 Plasmid DNA, die nur bis zu maximal 8 h nach Fütterung in verschiedenen Organen nachgewiesen wurde, konnte die M13mp18 DNA bis zu 8 h im Blut und bis zu 18 h in Leber und Milz wiedergefunden werden. Diese vermeintlich längere Persistenz der M13mp18 DNA ist wahrscheinlich weder auf die Größe noch auf bestimmte Sequenzen der Test-DNA zurückzuführen, sondern hat eher statistische Ursachen. Im Rahmen der M13mp18 Fütterungsversuche wurden 237 Mäuse untersucht und nur in seltenen Ausnahmefällen konnte die Test-DNA bis zu 18 h nach Fütterung nachgewiesen werden (Schubbert et al., 1997). Die Ergebnisse beider Test-DNAs, M13mp18 und pEGFP-C1, deuten darauf hin, daß fremde DNA im Mausorganismus schnell eliminiert wird. Die Beobachtung, daß fremde DNA häufig in Zellen des Immunsystems, wie in Leukocyten, Milzzellen und Zellen der Peyerschen Plaques, gefunden wird, ist möglicherweise ein Hinweis auf die Beteiligung des Immunsystems an der Eliminierung der fremden DNA. Bisher ist jedoch wenig darüber bekannt, wie das Immunsystem mit fremder DNA umgeht. Bekannt ist hingegen, daß CpG-Dinukleotid-reiche Sequenzen immunstimulierende Wirkungen in Säugern haben (Übersicht in Krieg et al., 2000). Solche CpG-Dinukleotid enthaltende Motive sind in Bakterien zwanzigmal häufiger als in Säugern und können direkt B-Zellen zur Proliferation und Antikörper Sekretion aktivieren (Cardon et al., 1994; Krieg et al., 1995). Darüber hinaus können diese Sequenzen Antigen-präsentierende Zellen, wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen, stimulieren, die dann Cytokine sezernieren, was zur Aktivierung von Killerzellen führen kann (Stacey et al., 1996; Jakob et al., 1998; Cowdery et al., 1996). Ob DNA-Moleküle aus der Nahrung auf diese Weise das Immunsystem stimulieren können, könnte durch die orale Verabreichung von CpG-

---

Dinukleotid-reichen Sequenzen untersucht werden.

### 5.1.1 Expression der verfütterten DNA

Die Expression des verfütterten gfp Gens konnte in keinem der untersuchten Gewebe, weder durch RT-PCR noch durch Fluoreszenzmikroskopie, nachgewiesen werden. Kontroll-Experimente zeigten jedoch, daß die drei verfütterten Plasmide, pEGFP-C1, pRSVGFP und pSVGFP, sowohl Aktivität *in vitro* nach Transfektion in 3T3-Mausfibroblasten als auch in injizierten Muskelfasern, hatten. Auch konnte die Persistenz des gesamten Promotor-gfp-Fragments mit einer Größe von 1277 bp in verschiedenen Geweben durch PCR nachgewiesen werden (Abbildung 8). Die Expression von Genen in Säugern ist ein komplexer Mechanismus, abhängig von zahlreichen Faktoren (Übersicht in Bendig, 1988). Zunächst muß das Konstrukt aus Enhancer, Promotor, codierende Region und Poly(A) Signal vollständig intakt bleiben und den Zellkern einer Expressions-kompetenten Zelle erreichen. Darüber hinaus muß die Wirtszelle die richtige Kombination von Transkriptionsfaktoren besitzen. Und schließlich muß so viel Protein synthetisiert werden, daß es detektiert werden kann. Die fremde DNA wurde zwischen 3 h und 8 h nach Fütterung in verschiedenen Organen durch PCR- und FISH-Analysen nachgewiesen. Die früheste Expression wurde *in vivo* hingegen 3 Tage nach i.m. Injektion des pEGFP-C1 Plasmids beobachtet (Kapitel 4.2.3). Möglicherweise persistiert die fremde DNA nicht lange genug in den Wirtszellen, um effektiv exprimiert zu werden. Um der Frage nach der Expression von oral verabreichter DNA weiter nachzugehen, wäre möglicherweise die Verfütterung von Konstrukten, die für kleine immunmodulierende Antigene codieren, ein interessantes Experiment. Hierbei würde sich beispielsweise ein 9 Aminosäure langes Epitop des Hämagglutinins des Influenzavirus anbieten, dessen Expression die Bildung spezifischer Antikörper induziert, die dann nachgewiesen werden könnten.

### 5.1.2 DNA-Transfer über die Keimbahn

Fütterungsexperimente mit schwangeren Mäusen haben ergeben, daß die DNA auf Foeten und Jungtiere übertragen wird (Schubbert et al., 1998). Die verfütterte Test-DNA wurde dabei immer in Clustern von Zellen, nie in allen Zellen eines Jungtieres durch FISH nachgewiesen. Diese Verteilungsmuster sprechen für einen diaplazentaren Übertragungsmechanismus und gegen einen DNA-Transfer über die Keimbahn. Um zu untersuchen, ob auch ein DNA-Transfer über die Keimbahn stattfindet, wurden Mäuse in 8 Generationen täglich mit dem pEGFP-C1 Plasmid gefüttert. In keinem der 97

untersuchten Nachkommen konnte die Test-DNA in allen Zellen oder in Mosaiken nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, sofern die Analyse von 97 Tieren aus 8 Generationen Aussagekraft hat, daß die Keimbahn gegen das Eindringen von fremder DNA geschützt ist. Dabei muß eine Barriere postuliert werden, die die Keimbahn vor fremder DNA abschirmt. Denn ist diese Keimbahn-Barriere ersteinmal überquert, kann die DNA unter bestimmten Umständen von generativen Zellen aufgenommen werden, wie verschiedene *in vitro* Studien gezeigt haben. Im Jahr 1989 gelang es zum erstenmal durch die Befruchtung von Eizellen mit Spermazellen, die zuvor für 15 min mit klonierter DNA inkubiert wurden, transgene Mäuse zu erzeugen (Lavitrano et al., 1989). Dabei wurde in 30% der 250 untersuchten Nachkommen die fremde DNA durch Southern Transfer-Analysen nachgewiesen. Darüber hinaus konnte auch die Expression der fremden DNA in den Nachkommen beobachtet werden, als Hinweis darauf, daß die von Spermien aufgenommenen DNA-Sequenzen nicht nur an die F1-Generation weitergegeben werden, sondern auch funktionsfähig sind. In den letzten Jahren wurde der Gen-Transfer mittels *in vitro* inkubierter Spermien in verschiedenen Laboratorien mit einer Vielzahl verschiedener Tierarten, wie z.B. Schwein und Kuh, erfolgreich durchgeführt (Nakanishi und Iritani, 1993; Schellander et al., 1995; Habrova et al., 1996; Sperandio et al., 1996). Die Interaktion der fremden DNA mit den Spermazellen verläuft höchstwahrscheinlich über einen DNA-Rezeptor auf den Oberflächen von Spermazellen. Diese rezeptorvermittelte Aufnahme der fremden DNA kann durch einen Glykoproteinfaktor nahezu vollständig inhibiert werden, der aus der Samenflüssigkeit von Säugern isoliert wurde und an die Oberfläche von Spermazellen binden kann (Zani et al., 1995). Somit scheint die Aufnahme von fremder DNA in Spermazellen *in vivo* verhindert zu werden als weiterer Schutz der Keimbahn vor dem Eindringen fremder DNA. Im Gegensatz zu Spermazellen konnte in unbefruchteten Eizellen und in Embryonen unter keinen Umständen die Aufnahme von fremder DNA gezeigt werden (Lavitrano et al., 1989).

Auch in den Jungtieren, deren Mütter während der Schwangerschaft mit M13mp18 DNA gefüttert wurden, konnte die Test-DNA zwar in seltenen Fällen im Hodengewebe, aber nie in Spermazellen durch FISH nachgewiesen werden (Schubbert et al., 1998). Auch diese Beobachtung ist ein Hinweis auf einen Mechanismus, der die Keimbahn vor dem Eindringen von fremder DNA zu schützen scheint. Auch nach intravenöser Injektion von Plasmid-Lipopolyamin-Komplexen in trächtige Mäuse konnte ein DNA-Transfer in die Foeten beobachtet werden (Tsukamoto et al., 1995). Da die Expression der fremden DNA in der Plazenta der Mutter sowie in verschiedenen Organen der Foeten, hauptsächlich in Herz und Muskel, beobachtet wurde, wurde auch hier ein DNA-Transfer ausschließlich über die Plazenta postuliert.

### 5.1.3 Schicksal von mit der natürlichen Nahrung aufgenommener DNA im Mausorganismus

In der täglichen Nahrung kommt in der Regel keine nackte DNA vor, sondern DNA, die in tierischen und pflanzlichen Zellen geschützt ist. Um das Schicksal dieser DNA im GI-Trakt zu untersuchen, wurden Mäuse mit Sojablättern gefüttert und die Persistenz des pflanzenspezifischen nukleären Rubisco Gens untersucht.

Im Gegensatz zu nackter Plasmid DNA war die nukleäre Pflanzen-DNA im GI-Trakt von Mäusen gegen den Abbau durch Nukleasen geschützt. Bis zu 22 h nach Fütterung konnten Fragmente des Rubisco Gens im Magen, bis zu 49 h im Dünndarm und in seltenen Fällen bis zu 121 h im Blinddarm nachgewiesen werden (Abbildung 16). Auch bei diesen Experimenten persistierte die fremde DNA wieder am längsten im Blinddarm, übereinstimmend mit den Fütterungsexperimenten von nackter DNA. Darüber hinaus scheint ein großer Teil der pflanzlichen Substanz die Passage durch den Magen und Dünndarm relativ unbeschadet zu überstehen, bevor sie im Dickdarm abgebaut wird. Höhere Tiere sind beim Abbau der pflanzlichen Cellulose und Hemicellulose auf die Symbiose mit Mikroorganismen angewiesen, da sie die entsprechenden Enzyme nicht selbst synthetisieren können (Überblick in Pfeffer, 1987). Solch eine Gärkammer befindet sich bei monogastrischen Herbivoren wie auch bei der Maus häufig im Dickdarm. Somit kann die pflanzliche DNA im Vergleich zu nackter DNA lange im Nuklease-hoch-aktiven Dünndarm verweilen. Auch lichtmikroskopische Untersuchungen haben bestätigt, daß in den verschiedenen Darmabschnitten noch Überreste von Blättern vorhanden waren, die z.T. noch ganze Zellverbände enthielten. Kurz nach Fütterung waren bei einigen Mäusen auch im olivgrünen, weichen Kot noch Überreste von Blättern makroskopisch erkennbar. Diese Pflanzenteile schienen nach der Zerkleinerung in der Mundhöhle durch die Kauwerkzeuge (Mastikation) nicht weiter verdaut worden zu sein. Bei anderen Mäusen fand man hingegen 20 h nach Fütterung noch Blattreste im Magen. Es ist bekannt, daß bei monogastrischen Herbivoren schlechtverdauliche Nahrung länger im Magen verweilt als flüssige oder breiförmige Nahrung (Thews, 1989). Auch spielt sicherlich die Komplexierung der DNA mit Kernproteinen wie, z.B. Histonen, eine weitere Rolle, die dem Abbau der chromosomalen DNA entgegenwirkt. Demzufolge scheint die in Zellen verpackte DNA auf zwei Ebenen vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt zu sein.

Auch konnten nach Fütterung von Sojablättern Fragmente des Rubisco Gens in Leber- und Milzgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 17). Höchstwahrscheinlich wird die pflanzliche DNA, ähnliche wie die M13mp18 und die pEGFP-C1 Plasmid DNA, über das Darmepithel aufgenommen und gelangt über die Peyerschen Plaques und das Blut in

innere Organe. Der vermutete Weg der Aufnahme der Pflanzen-DNA konnte experimentell nicht direkt bestätigt werden, da durch FISH-Analysen keine Rubisco DNA in Darmzellen gefunden werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte als Positivkontrolle der FISH-Analysen in fast jedem Zellkern der Sojablätter die Rubisco DNA nachgewiesen werden (Abbildung 19). Die negativen Ergebnisse der in-situ-Hybridisierungen der Gewebeschnitte von gefütterten Tieren korrelieren hingegen mit den PCR-Analysen, die maximal 337 bp große Rubisco-spezifische Fragmente in verschiedenen Organen nachwies. Demnach scheint die Größe der aufgenommenen Rubisco DNA-Fragmente unter der Detektionsgrenze der in-situ-Hybridisierungen zu liegen, die bei etwa 1 kb angenommen wird (Najfeld et al., 1992). Im Gegensatz zu der pflanzlichen DNA wurden bei den beiden Modell-DNAs, M13mp18 und pEGFP-C1 etwa 1000 bp große Fragmente in den Organen durch PCR nachgewiesen, die somit auch durch die FISH-Technik detektierbar waren. Die Aufnahme von größeren Fragmenten der verfütterten nackten Plasmid DNA kann möglicherweise mit der höheren applizierten Kopienzahl zusammenhängen. In 50 µg Plasmid DNA sind bei einer Plasmidgröße von 4.730 bp etwa  $1 \times 10^{13}$  Kopien enthalten. Pro Tag frisst eine Maus etwa 15 Sojablätter mit einem durchschnittlichen Gewicht von je 120 mg und einer Oberfläche von  $4,5 \text{ cm}^2$ , die etwa aus je  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen bestehen (siehe Anhang). Da das Genom in diploider Form vorlag, nimmt die Maus im Durchschnitt etwa  $3 - 6 \times 10^8$  Kopien des Rubisco Gens am Tag zu sich, was ungefähr 4 - 5 Größenordnungen unter der Anzahl der aufgenommenen Plasmid Kopien liegt. Dem steht gegenüber, daß die Rubisco DNA z.T. gut geschützt in den Zellkernen von Pflanzenzellen den Darm passiert.

Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte kürzlich die Aufnahme von in der Nahrung enthaltener Pflanzen-DNA in den Mausorganismus bestätigen. Einspanier und Mitarbeiter fanden Fragmente der Chloroplasten DNA in verschiedenen Organen von Rindern, Schweinen und Hühnern (persönliche Mitteilung Einspanier, November 2000). Auch hier hatten die durch PCR nachgewiesenen Fragmente eine maximale Größe von 200 bp. Im Gegensatz zu zahlreichen Organen konnte in Eiern der Hühner die fremde DNA nicht wiedergefunden werden, als weiterer Hinweis auf den Schutz der Keimbahn vor dem Eindringen fremder DNA. Mit diesen Ergebnissen ist es auch einer anderen Arbeitsgruppe gelungen, zu zeigen, daß mit der Nahrung aufgenommene DNA nicht vollständig im GI-Trakt abgebaut wird, sondern daß kleine Fragmente dieser DNA in den Organismus gelangen.

Oral aufgenommene freie oder in Pflanzenzellkernen verpackte DNA wird im Magen-Darm-Trakt von Mäusen nicht vollständig abgebaut, sondern kann in geringen Mengen von Körperzellen aufgenommen werden. In den großen Mengen fremder DNA, die

täglich mit der Nahrung in tierische Organismen gelangen, sind alle natürlich vorkommenden Gene vorhanden, auch die, denen für die onkogene Transformation Bedeutung zugeschrieben wird, wie z.B. Onkogene und Tumorsuppressor-Gene. Möglicherweise muß der DNA aus der täglichen Nahrung neben Viren und anderen Mikroorganismen eine Rolle bei der Mutagenese und Onkogenese von Zellen im tierischen Organismus eingeräumt werden.

## 5.2 Parenterale Applikation von fremder DNA

Den Grundstein zur DNA-Vakzinierung legten 1990 Wolff und Mitarbeiter, als sie die Aufnahme und Expression von injizierter Plasmid DNA in Muskelfasern von Mäusen beobachteten (Wolff et al., 1990). Die nächste entscheidende Entdeckung war die Induktion einer zellulären und humoralen Immunantwort in Mäusen durch die i.m. Injektion einer DNA, die für ein Nukleoprotein des Influenzavirus codierte (Ulmer et al., 1993). Im Gegensatz zu zahlreichen Berichten über erfolgreiche Gen-Expression *in vivo* (Übersicht in Gurunathan et al., 2000) ist bisher wenig über Persistenz und Ausbreitung der injizierten DNA im gesamten Körper bekannt. Es ist daher eine wichtige Voraussetzung, das Schicksal fremder DNA *per se in vivo* zu verstehen, um effiziente und sichere Gen-Transfer-Systeme zu entwickeln.

Nach Injektion von 50 µg pRSVGFP DNA in die Oberschenkelmuskulatur von Mäusen konnte die fremde DNA im injizierten Muskel bis zu 6 h mittels Restriktions- und DNA-Transfer-Analysen und bis zu 17 Monaten durch die sensitivere PCR-Methode nachgewiesen werden (Abbildung 20, 21). PCR-Analysen konnten darüber hinaus die i.m. injizierte DNA in verschiedenen Organen detektieren. Dabei wurden Fragmente der gfp DNA in Leber, Niere, Blut und kontralateralem Muskel bis zu maximal 24 h nach Injektion wiedergefunden (Tabelle 3). Die Ergebnisse deuten auf eine schnelle Degradierung der injizierten DNA durch Nukleasen sowie auf eine Verteilung der DNA im Organismus hin.

Die lange Persistenz der injizierten DNA in Muskelfasern könnte auf den postmitotischen Zustand dieser Zellen zurückzuführen sein. Auch in *in vitro* Experimenten konnte eine längere Persistenz und damit Expression von Plasmid DNA in sich langsam teilenden konfluenten Fibroblasten im Vergleich zu schnell proliferierenden Fibroblasten nachgewiesen werden (Wolff et al., 1992b). Diese Beobachtung wurde so interpretiert, daß die fremde DNA bei der Zellteilung durch Auflösung der Membranen verloren geht. Da aber auch in anderen Zelltypen mit niedrigen Turnover-Raten, wie beispielsweise den Hepatocyten, direkt injizierte fremde DNA nur für wenige Tage nachgewiesen werden konnte, scheint die niedrige Turnover-Rate der Muskelzellen nicht alleine

ausschlaggebend für die lange Persistenz der fremden DNA zu sein (Hickman et al., 1994). Möglicherweise kann fremde DNA von Muskelfasern effektiv aufgenommen werden. Bisher ist jedoch kein Mechanismus bekannt, der an der Aufnahme von DNA in Muskelfasern oder in andere Gewebezellen beteiligt ist (Kapitel 5.1).

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen konnte die injizierte DNA in den Zellkernen von multinukleären Muskelfasern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Sarkoplasma, im extrazellulären Raum oder in Blutgefäßen, die das Muskelgewebe durchziehen, konnte die fremde DNA hingegen nicht detektiert werden. Diese Beobachtungen deuten auf einen effektiven DNA-Transfer in den Zellkern von Muskelfasern hin. Der elektronenmikroskopische Nachweis von markierter Plasmid DNA in oder in der Nähe von Kernporenkomplexen (Nuclear Pore Complex, NPC) in Muskelfasern führt zu der Annahme, daß die DNA über diese Komplexe in den Zellkern aufgenommen wird (Dowty et al., 1995). Oligonukleotide sowie kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 70 kDa können passiv durch die Kernporen diffundieren und im Zellkern von anderen, nicht diffundierenden Molekülen gebunden werden ("diffuse and bind"-Modell) (Featherstone et al., 1988; Leonetti et al., 1991). Im Gegensatz dazu werden große Proteine und RNA selektiv durch die Kernporen transportiert. *In vitro* Studien haben gezeigt, daß die Expression von injizierter Plasmid DNA durch die Co-Injektion des Lektins "Wheat Germ Agglutinin" (WGA) inhibiert werden kann (Dowty et al., 1995). WGA bindet spezifisch N-Acetyl-D-glucosamin-Gruppen von Kernporenproteinen und inhibiert somit den Kerntransport von großen Proteinen (Yoneda et al., 1987). Die Co-Injektionsexperimente führen zu der Annahme, daß fremde DNA, ähnlich wie RNA und große nukleäre (karyophile) Proteine, über einen WGA-Lektin-sensitiven Prozeß in den Kern gelangt. Daneben könnten aber auch cytoplasmatische Bindeproteine die Aufnahme der DNA in den Kern fördern, indem sie die DNA kondensieren und damit ihren Durchmesser von 12 nm auf einen minimalen Durchmesser von 4 nm reduzieren. Es ist bekannt, daß Moleküle mit einem Durchmesser von etwa 4 nm durch Kernporen diffundieren können (Miagawa et al., 1993).

Die Expression des GFP Proteins wurde im injizierten Muskel ab 3 Tagen nach Injektion der pEGFP-C1 Plasmid DNA beobachtet. Unter Verwendung des FITC-Filterblocks zeigte auch das Muskelgewebe von Kontrollmäusen je nach Schnittdicke eine mehr oder weniger starke Autofluoreszenz (Abbildung 24). Diese Autofluoreszenz wird in Säugern durch NADH-Moleküle und Flavine induziert (Aubin, 1979; Benson et al., 1979). Die Expression des GFP Proteins konnte jedoch unter Verwendung des DAPI-Filterblocks verifiziert werden, bei dem das gesamte Gewebe bläulich erscheint und GFP-

fluoreszierende Zellen sich durch eine blau-grünliche Färbung abheben (Abbildung 24). Dabei lagen die fluoreszierenden Muskelfasern in einem eng umgrenzten Bereich, der höchstwahrscheinlich mit dem Injektionsort übereinstimmte. Möglicherweise wird die Aufnahme und Expression des injizierten Plasmids durch Verletzung der Zellen mit der Injektionsnadel gefördert. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die Beobachtung, daß die Injektion der DNA in Lösungen wie Wasser, TE oder Sucrose, die eine Verletzung der Zelle bewirken können, zu einer verminderten Expression von GFP führte. Auch zusätzliche Nadeleinstiche inhibierten die Expression von i.m. injizierten Reportergenen (Wolff et al., 1991). Somit scheinen andere Faktoren für die räumlich eng umgrenzte Expression von GFP verantwortlich zu sein, möglicherweise die begrenzte Diffusion der DNA im Muskelgewebe. Das Muskelgewebe ist aus drei Schichten von Bindegeweben aufgebaut: das Endomysium umgibt individuelle Muskelfasern und ist mit der Basallamina assoziiert, das Mesomysium umgibt die Muskelfaserbündel und das Epimysium umschließt den gesamten Muskel (Übersicht in Ross et al., 1996). Die Vermutung, daß eine geringe Diffusion der DNA im Muskelgewebe zu einer räumlich begrenzten Expression der DNA führt, wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Zum einen konnte im Muskelgewebe von Primaten, das sich durch ein stark ausgebildetes Bindegewebe auszeichnet, nur eine im Vergleich zu Nagern geringe Expression von i.m. injizierter DNA nachgewiesen werden (Jiao et al., 1992). Zum anderen konnte im Muskelgewebe des Zwerchfells, das im Vergleich zur Skelettmuskulatur nicht so stark durch Bindegewebe untergliedert ist, eine hohe Expression von injizierten Reportergenen beobachtet werden (Davis et al., 1993).

In allen anderen Organen, die entfernt vom Injektionsort lagen, konnte keine Expression von GFP beobachtet werden. Möglicherweise war hier die Methode der Fluoreszenzmikroskopie nicht sensitiv genug, um geringe Mengen des exprimierten GFP Proteins nachweisen zu können. Aus diesem Grund wurde die Transkription der *gfp* DNA mittels RT-PCR-Analysen untersucht. Aber auch mit dieser sensitiveren Methode konnte die Expression der injizierten DNA nur im injizierten Muskel ab 3 Tagen nach Injektion, aber in keinem anderen Organ nachgewiesen werden. Auch nach Injektion von RSV-GFP- oder SV-GFP-Konstrukten konnte keine Expression von GFP in Organen beobachtet werden, die nicht mit dem Injektionsort übereinstimmten. Da mit der PCR-Methode die *gfp* DNA in Leber, Niere und kontralateralem Muskel nur bis zu maximal 24 h nach i.m. Injektion nachgewiesen wurde, scheint nicht die Inaktivierung des Promotors, sondern eher die Eliminierung der DNA für die nicht nachweisbare Expression der fremden DNA in diesen Organen verantwortlich zu sein. Ob die DNA von Nicht-Muskelzellen ineffektiv aufgenommen wird oder durch zelluläre Nukleasen schnell abgebaut wird, wird aus diesen Ergebnissen nicht deutlich. Es ist bekannt, daß

Nukleasen in verschiedenen Geweben unterschiedliche Aktivitäten zeigen. Dabei haben multinukleäre Muskelfasern eine sehr geringe Nukleaseaktivität und Leber- und Milzzellen eine hohe (Jiao et al., 1992; Yasuda et al., 1992; Takeshita et al., 2000). Die Vermutung, daß intrazelluläre Nukleasen einen limitierenden Faktor bei der Expression fremder DNA darstellen, wird durch folgende Beobachtung unterstützt: Wurde das pCMVCAT Plasmid zusammen mit einem Nuklease-Inhibitor, wie beispielsweise dem Polyketid Metaboliten DMI-2, das von verschiedenen Streptomyces Stämmen gebildet wird, in eine Zelle eingebracht, so konnte eine zehnfache Zunahme der CAT-Aktivität nachgewiesen werden (Ross et al., 1998). Darüber hinaus scheinen auch Nukleasen, die auf der extrazellulären Seite von Zellen lokalisiert sind, sowie im Serum vorhandene Nukleasen an der Degradierung der DNA beteiligt zu sein (Rozenberg-Arska et al., 1984; Emlen et al., 1988).

Darüber hinaus wird die fremde DNA nicht komplett im Organismus durch Nukleasen degradiert, sondern z.T. in fragmentierter Form über die Galle in den Darm ausgeschieden, wie der Nachweis von gfp Fragmenten in Darminhalten vermuten läßt (Abbildung 22). Bisher ist nichts über die Ausscheidung fremder oder körpereigener DNA über den Leber-Gallen-Darmweg in der Literatur beschrieben. Es ist hingegen bekannt, daß neben körpereigenen Stoffen, wie Bilirubin und Porphyrine, auch zahlreiche körperfremde Stoffe, wie p-Aminohipursäure (PAH), Penizillin, Röntgenkontrastmittel, mit der Galle aus dem Körper eliminiert werden (Übersichten in Silbernagl und Despopoulos, 1991; Horkovics-Kovats, 1999). Dabei werden schlecht wasserlösliche Stoffe, die im Blut an Albumin gebunden sind, zunächst von Leberzellen aufgenommen, wo sie am endoplasmatischen Retikulum mit z.B. Glukuronsäure oder Gluthation konjugiert werden. Der Übertritt aus den Leberzellen in die Gallenkapillaren erfolgt dann entweder durch Diffusion oder durch aktiven Transport. Da die DNA ein wasserlösliches Molekül ist, wäre denkbar, daß DNA-Fragmente direkt in Gallenkapillare sezerniert werden. Die Ausscheidung der DNA über die Galle muß jedoch noch weiter verifiziert werden. Da die Gallenblase der Maus nur einen Durchmesser von wenigen Millimetern hat, konnte die DNA bisher nie direkt in der Galle nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß i.m. injizierte DNA bis zu mindestens 17 Monaten im injizierten Muskel persistiert und bis zu höchstens 24 h in verschiedenen anderen Organen vorhanden ist. Ob die DNA von Nicht-Muskelzellen nicht effektiv aufgenommen oder durch zelluläre Nukleasen schnell abgebaut wird, kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen nicht entschieden werden. Auch die Expression der injizierten DNA konnte nur im injizierten Muskel, aber nicht in Leber, Milz, Niere oder kontralateralem Muskel beobachtet werden, übereinstimmend mit der Persistenz der DNA.

Die Ergebnisse geben somit einen ersten Hinweis darauf, daß fremde DNA, wie beispielsweise das Dystrophin-Gen, die im Zuge von Gentherapien in die Skelettmuskulatur von Mäusen injiziert wird, wohl auch nur dort exprimiert wird. Ob möglicherweise in die Leber injizierte DNA auch von Muskelzellen aufgenommen und exprimiert wird, müßte durch weiterführende Experimente untersucht werden. Immerhin scheint die Skelettmuskulatur ein Gewebe zu sein, das fremde DNA sehr effizient aufnehmen und exprimieren kann. Deswegen wäre es vielleicht in Zukunft interessant, auch im Muskelgewebe die Persistenz und Expression von oral aufgenommener fremder DNA zu untersuchen.

### **5.3 Induktion von Tumoren durch Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster**

Die Aufnahme fremder DNA in eukaryontische Zellen kann auch zur Entstehung von Tumoren führen. Schon früh wurde entdeckt, daß Viren bei Tieren und Menschen Tumorerkrankungen hervorrufen können. Bereits 1911 beschrieb Peyton Rous, daß Viren bei Hühnern Sarkome verursachen. Das verantwortliche tumorauslösende Virus wurde nach ihm Rous-Sarkom-Virus benannt. In den folgenden Jahrzehnten entdeckte man eine Vielzahl von Viren, die bei Geflügel, Nagetieren und Menschen unterschiedliche Krebserkrankungen wie Lymphome, Sarkome und Karzinome auslösen (Übersicht in Weinberg, 1980; zur Hausen, 1991).

Die meisten Viren, die mit Tumorerkrankungen beim Menschen assoziiert sind, haben ein DNA-Genom. Die zu den Papovaviridae gehörenden Papillomviren verursachen Karzinome vor allem in der Genitalschleimhaut sowie verschiedene maligne Hauttumoren. Die humanen Papillomvirus Typen 16 und 18 (HPV 16, HPV 18) treten in Verbindung mit dem Cervixkarzinom auf (Übersicht in Pfister, 1996). Bei den meisten malignen Tumoren des Genitalbereichs liegt hier das virale Genom nicht episomal im Kernplasma, sondern in die zelluläre DNA integriert vor. Auch das zu den Hepadnaviren gehörende Hepatitis-B-Virus (HBV) ist in malignen Zellen in die chromosomale DNA integriert (Dejean und de The, 1990; Wang et al., 1990). In infizierten Zellen befindet sich das HBV Genom als zirkulärer geschlossener DNA-Doppelstrang im Zellkern. In seltenen Einzelfällen werden in der Infektionsphase das ganze HBV Genom oder Teile davon in das Zellgenom integriert. Ähnlich verhält es sich beim Epstein-Barr-Virus, das als Vertreter der Herpesviren in enger kausaler Beziehung zum Burkitt-Lymphom und Nasopharynxkarzinom steht (Wolf et al., 1995; Jox et al., 1997). Bei vielen Tumolviren wird beobachtet, daß ihr Genom in infizierten Zellen überwiegend in episomaler Form im

Zellkern persistiert, während die Virus DNA in Tumorzellen häufig integriert in unspezifischen Stellen vorliegt. Möglicherweise ist die Integration der viralen DNA das Schlüsselereignis der zum Tumor führenden Kausalkette. Schätzungsweise sind etwa 15 - 20% aller humanen Krebserkrankungen ätiologisch mit Virusinfektionen verbunden. Adenoviren, deren Infektionen beim Menschen bisher nicht mit malignen Erkrankungen assoziiert werden, induzieren zumindest in neugeborenen Nagetieren Tumoren (Übersicht in Doerfler, 1999). Ihre Untersuchungen trugen viel zur Klärung der Mechanismen bei, die an der Zelltransformation und Tumorbildung beteiligt sind. Die Ergebnisse ließen sich auf etliche menschliche Krebserkrankungen übertragen.

### 5.3.1 Tumorinduktion durch s.c. Injektion von Ad12-Virionen

Die Fähigkeit von Ad12-Virionen, Tumoren in neugeborenen Hamstern zu induzieren, ist abhängig von der Menge der injizierten Ad12-Virionen. Nach s.c. Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen in die Nackenregion entwickelten 82% der Hamster Tumoren, während nach Injektion von  $4,5 \times 10^5$  pfu nur noch 8% der Hamster Tumoren bildeten (Tabelle 4). Wurde die Menge der Virionen weiter reduziert, so konnte in keinem der 26 injizierten Hamster die Bildung von Tumoren beobachtet werden, auch nicht nach 16 Monaten. Der Zeitraum, in dem sich Tumoren entwickelten, nahm mit abnehmender Virionen-Menge zu und die Anzahl der pro Tier gebildeten Tumoren ab. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß für die Induktion von Tumoren eine hohe Anzahl von Ad12-Virionen erforderlich ist. Ob die Aufnahme von Viren in die Zelle den limitierenden Faktor darstellt, oder ob eine gewisse Anzahl von Viren in der Zelle für die Tumorbildung Voraussetzung ist, wird aus diesen Ergebnissen nicht deutlich. Untersuchungen von Zellen am Injektionsort innerhalb der ersten 24 h nach Injektion von Ad12-Virionen könnten einen Hinweis auf die Anzahl der Zellen geben, die adenovirale DNA aufnehmen. Diese Experimente könnten beispielsweise durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen durchgeführt werden. Auch bei SV40 induzierten Tumoren in Hamstern wurde eine kritische Virusdosis beschrieben als Voraussetzung für die Induktion von Tumoren (Gerber und Kirschstein, 1962). *In vitro* Experimente mit SV40 haben darüber hinaus gezeigt, daß  $10^3$  infektiöse Einheiten erforderlich sind, um ein einzelnes Transformationsereignis zu induzieren (Todaro und Green, 1966a, b; Black, 1966). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß selbst ohne den hohen Selektionsdruck *in vivo* die Transformation von Zellen ausgesprochen selten ist und von einem hohen Virus-Wirtszell-Verhältnis abhängt.

Restriktions- und Southern Transfer-Analysen der Tumor DNAs sowie Fluoreszenz-in-

situ-Hybridisierungen der Tumorgewebe konnten frühere Ergebnisse bestätigen, die zeigten, daß jeder der durch die s.c. Injektion von Ad12-Virionen induzierten Tumoren ein individuelles Integrationsmuster und eine individuelle chromosomale Integrationsstelle hat. Auch Tumoren, die aus dem gleichen Versuchstier extrahiert wurden, wiesen ebenfalls individuelle Integrationsmuster auf. Klonierungs- und Sequenzanalysen der viralen und zellulären DNA ergaben keine Nukleotidsequenz, in die die Ad12 DNA bevorzugt integrierte (Doerfler et al., 1983; Fechteler et al., 1995). Es wäre aber denkbar, daß die zellulären Insertionsstellen bestimmte Charakteristika aufweisen, wie z.B. spezifische Chromatinstrukturen aufgrund transkriptioneller oder replikativer Aktivität. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß Insertionsstellen von Adenovirus DNA in der Wirtszelle häufig transkriptionell aktiv sind, auch schon vor der Insertion der viralen DNA (Gahlmann et al., 1984; Schulz et al., 1987). Auch Chromosomenbruchstellen könnten für die Integration der Ad12 DNA in Frage kommen. Chromosomenbruchstellen entsprechen Regionen, in denen das Chromatin nicht-kondensiert vorliegt. Aufgrund dieser Chromatinstruktur kann es zu Chromosomenbrüchen kommen, die ein hohes Rekombinationspotential besitzen (Glover und Stein, 1988). Eine erste Verbindung zwischen Integration viraler DNA und Chromosomenbruchstellen wurde durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von HeLa Zellen nach Infektion mit HPV18 beobachtet (Popescu et al., 1987). Auch Protoonkogene und Tumorsuppressor Gene sind häufig mit Chromosomenbruchstellen assoziiert (Yunis et al., 1987; Yunis, 1987). Somit könnte die Interaktion von viraler DNA mit bestimmten zellulären Genen innerhalb dieser Chromosomenbruchstellen einen wichtigen Faktor bei der Induktion von Tumoren darstellen.

### **5.3.2 Tumorbildung in unterschiedlichen Geweben**

Unabhängig von dem Ort der Injektion der Ad12-Virionen, in die Muskulatur oder in die Leber von neugeborenen Hamstern, bildeten sich häufig Tumoren in der Bauchhöhle. Die Vermutung liegt nahe, daß die Ad12-Virionen, analog zu der i.m. injizierten Plasmid DNA (siehe Kapitel 4.3.2), innerhalb von Minuten über das Blut im Organismus verteilt werden. Ähnlich wie nach der subkutanen Injektion konnte nach der i.m. Injektion von Ad12-Virionen ein Zusammenhang zwischen der Menge der injizierter Ad12-Virionen und der Anzahl der tumorbildenden Tiere, der Zeit bis zur Bildung der Tumoren bzw. der Anzahl der Tumoren pro Tier beobachtet werden. Im Vergleich zur subkutanen Injektion bildeten die Hamster jedoch schneller mehr (bis zu 15) und größere Tumoren. Auch die Anzahl der Hamster, die Tumoren bildeten, war nach i.m. Injektion höher als nach subkutaner Injektion. Die Bildung von mehr Tumoren in der Bauchhöhle könnte vielleicht

damit erklärt werden, daß über die Blutbahn oder auch die Peritonealflüssigkeit mehr Zellen erreicht werden, die kompetent für die Transformation durch Adenoviren sind. Adenoviren können *in vivo* postmitotische Zellen, wie beispielsweise Skelettmuskelzellen, infizieren (Quantin et al., 1992; Stratford-Perricaudet et al., 1992). Im Gegensatz dazu können Adenoviren sowie auch Retro- und Herpesviren nicht effizient in nicht replizierende Zellen integriert werden (Mellerick und Fraser, 1987; Miller et al., 1990). Somit scheint der Zellzyklus einen Einfluß auf die Integration der viralen DNA und somit auch auf die Transformation von Zellen zu haben.

Für die Bildung von größeren Tumoren in der Bauchhöhle im Vergleich zur Nackenregion könnte die bessere Nährstoffversorgung der Tumoren in der Bauchhöhle über das Blut oder die Peritonealflüssigkeit verantwortlich sein. Auch könnte die höhere Temperatur in der Bauchhöhle einen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren haben. Unter der Haut ist die Basaltemperatur etwa um 5°C niedriger als in der Bauchhöhle (Silbernagl und Despopoulos, 1991).

Restriktions- und Southern Transfer-Analysen von peritonealen Tumoren haben ergeben, daß die Integrationsmuster der Ad12 DNA in verschiedenen Tumoren eines Tieres nicht immer unterschiedlich waren (Abbildung 28). Der Hamster H9 bildete innerhalb von 39 Tagen nach i.m. Injektion von  $4,5 \times 10^6$  pfu 7 Tumoren, von denen 3 ähnliche Restriktionsmuster nach Verdau mit *HindIII* oder *PstI* zeigten. Die 3 Tumoren waren unterschiedlich groß (1,7 cm, 1 cm, 0,5 cm) und wurden als einzelne Tumoren, die nicht miteinander assoziiert waren, aus der Bauchhöhle isoliert. Höchstwahrscheinlich sind diese 3 Tumoren nicht auf unabhängige Transformationsereignisse zurückzuführen, sondern eher auf die Aussaat von Zellen eines Tumors über die Peritonealhöhle (peritoneale Aussaat). Beim Vergleich der Bandenintensitäten dieser drei Tumoren im Autoradiogramm in der Abbildung 28 fällt auf, daß die Anzahl der integrierten Ad12 Genome mit abnehmender Größe der Tumoren sinkt. Diese Unterschiede lassen vermuten, daß aus einem primären Tumor, höchstwahrscheinlich H9.3, die anderen beiden kleineren Tumoren H9.4 und H9.7 durch Dissemination (Aussaat) entstanden sind. Durch Sequenzanalysen müßte jedoch noch der identische Integrationsort der Ad12 DNA in das Hamstergenom bestätigt werden. Die durch s.c. Injektion von Ad12-induzierten Tumoren zeigten im Gegensatz dazu in keinem Fall Übereinstimmungen des Integrationsmusters der Ad12 DNA (Kuhlmann und Doerfler, 1982; Orend et al., 1994; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997).

Eine Metastasierung in andere Organe wurde hingegen weder nach s.c. noch nach i.m. Injektion von Ad12-Virionen beobachtet, mit der Ausnahme, daß nach s.c. Injektion einige Tumorzellen in lokalen Lymphknoten nachgewiesen werden konnten (Kuhlmann

et al., 1982). Nach der i.m. Injektion von Ad12-Virionen wurden Tumoren in verschiedenen Geweben, wie Muskel, Hoden, Zwerchfell und Leber, gebildet, die sich alle durch ein individuelles Integrationsmuster der Ad12 DNA auszeichneten, auch wenn sie in demselben Tier gebildet wurden. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß sich das Integrationsmuster der viralen DNA während der Metastasierung veränderte. Zellkulturexperimente haben allerdings gezeigt, daß die Ad12 DNA in den meisten Fällen stabil in das Hamstergenom integriert ist und die Integrationsmuster über einen langen Zeitraum und über viele Zellgenerationen meistens unverändert bleiben (Sutter et al., 1978; Orend et al., 1994; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997). Die Ad12-transformierte BHK Zelllinie T637 zeigt beispielsweise seit 22 Jahren ein unverändertes Integrationsmuster der viralen DNA.

Bei mehreren humanen Krebserkrankungen, die mit DNA-Tumorviren assoziiert sind, werden Metastasierungen beobachtet. So zeigten bei einem Patienten mit metastasierendem Leberzellkarzinom (HCC) mehrere Läsionen im Lebergewebe und Metastasen in der Lunge identische Integrationsmuster der Hepatitis-B-Virus DNA (Blum et al., 1987). Auch auftretende Rezidive des HCC wiesen manchmal identische Integrationsmuster wie der Primärtumor auf. Diese Beobachtungen sind ein starkes molekularbiologisches Indiz für den monoklonalen Ursprung und die Verbreitung von bösartigen transformierten Hepatocyten während des Tumorwachstums und der Metastasenbildung. Ähnliches wurde bei anderen humanen Krebserkrankungen, die mit DNA-Tumorviren assoziiert sind, beobachtet, wie z.B. bei der T-Zell-Leukämie (Maeda et al., 1999). Möglicherweise würden Ad12-induzierte Tumoren metastasieren, wenn die Tiere nicht kurz nach Beobachtung des Primärtumors getötet würden. Da in der Regel aber ein ersengroßer Tumor innerhalb von 4 Tagen auf das zwanzigfache Volumen wuchs, mußten die Tiere binnen kurzer Zeit nach Beobachtung des Primärtumors getötet werden. Um eine mögliche Metastasierung von Ad12-induzierten Tumoren zu untersuchen, könnte der Primärtumor operativ entfernt werden (Dissektion) und verschiedene Organe nach längeren Zeiträumen nach Metastasen untersucht werden.

### **5.3.3 Klassifikation der durch Ad12-Virionen induzierten Tumoren**

Wird das Polyomavirus der Maus auf neugeborene Mäuse übertragen, so bilden sich 24 verschiedene Tumortypen (Eddy et al., 1961). Der Name Polyoma leitet sich von der Eigenschaft ab, in verschiedenen Organen viele Tumoren erzeugen zu können. Auch Epstein-Barr-Viren können sowohl Leukocyten als auch epitheliale Zellen transformieren und entsprechend die Bildung von Lymphomen bzw. Karzinomen induzieren (zur Hausen et al., 1970; Popescu et al., 1993). Im Gegensatz dazu scheinen Adenoviren in

Hamstern nur einen einzigen Tumortyp induzieren zu können. Unabhängig von dem Injektionsort oder dem Ort der Tumorbildung ließen sich die Tumoren durch histologische und immunhistochemische Analysen nicht unterscheiden. Alle untersuchten Tumoren bestanden aus undifferenzierten kleinen nacktkernigen Zellelementen mit monotonen hyperchromatischen Kernen. Die Tumorzellen bildeten ferner Homer-Wright-Rosetten, die im Zusammenhang mit primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) auftreten (Yanoff, 1991). Die Expressionen von Synaptophysin und der Neuron-spezifischen Enolase in allen durch Ad12-induzierten Tumoren deuten auf einen neuronalen Charakter der Tumoren hin. Ein undifferenzierter neuronaler Tumor aus Neuroblasten, die Homer-Wright-Rosetten ausbilden, ist das Neuroblastom. Dieser hochmaligne Tumor gehört zu den häufigsten Tumoren im Kindesalter (Riede und Saeger, 1995). Bei etwa 90% aller humanen Neuroblastome sind die Katecholaminmetaboliten Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure im Serum und/oder Urin erhöht (Berthold et al., 1992, 1999). Der Nachweis dieser beiden Katecholaminmetaboliten war jedoch in Seren von Hamstern, die einen oder mehrere Tumoren gebildet hatten, negativ (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist dieser Befund auf eine geringe Sensitivität der Methode für die Untersuchung von Hamsterseren zurückzuführen. Die Methode war für menschliche, z.T. auch für neurogene Rattengeschwülste spezifisch und wurde in der Abteilung von Prof. Dr. Berthold, Kinderonkologie, Universität Köln, durchgeführt. Zusätzlich zu den neuroektodermalen Charakteristika wurde in den Tumoren auch eine Vimentin-Expression nachgewiesen, die auf einen mesenchymalen Ursprung der Zellen hindeutet. Es wäre somit denkbar, daß undifferenzierte Zellen von Ad12 transformiert werden, die im Zuge der Transformation sowohl neuroektodermale als auch mesenchymale Merkmale ausbilden.

Viele DNA-Viren zeigen eine stark ausgeprägte Gewebespezifität. Die Papillomviren befallen und transformieren ausschließlich epitheliale Zellen, entweder Keratinocyten der Haut oder Epithelzellen im Genitalbereich. Wahrscheinlich spielt der Rezeptor, der für die Aufnahme der Viren verantwortlich ist, eine entscheidende Rolle bei der Zellspezifität bestimmter Viren. Epstein-Barr-Viren (EBV), die sowohl mit Lymphomen als auch mit Nasopharynxkarzinomen assoziiert sind, binden mit ihrem Glykoproteinkomplex gp 220/350 an das Oberflächenprotein CD21 (Tanner et al., 1987, 1996). Dieses Membranprotein wurde sowohl auf B-Lymphocyten als auch auf Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx nachgewiesen, korrelierend mit den von EBV infizierbaren Zellen. Der zelluläre Rezeptor, der dem Adenovirus die Adsorption an die Zelle ermöglicht, wurde erst in den letzten Jahren identifiziert. Viele Adenovirus Typen binden an ein 46 kDa Glykoprotein, das zu der Immunglobulin Superfamilie gehört und als integrales Membranprotein auf zahlreichen humanen und Mauszelltypen exprimiert

---

wird. Da dieser Rezeptor auch von Coxsackie-B-Viren gebunden wird, wird er als CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor) bezeichnet (Bergelson et al., 1997). Eine starke Expression des CAR Gens wurde in Herz, Gehirn und Pankreas nachgewiesen, übereinstimmend mit Infektionen dieser Zellen durch Coxsackie-B-Viren (Übersicht in Rueckert, 1996). Darüber hinaus konnte in Leber und Lunge eine geringe und in Niere, Plazenta- sowie in Skelettmuskelzellen keine Expression des CAR Proteins bestimmt werden (Bergelson et al., 1997). Die Expression des CAR Proteins korreliert somit nicht mit den von verschiedenen Adenoviren hauptsächlich infizierten Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstrakts (Übersicht in Horwitz, 1996). Darüber hinaus ist bekannt, daß adenovirale Vektoren fremde Gene nicht nur effektiv in Herz-, Gehirn- und Pankreaszellen einbringen, sondern auch in Lungen-, Leber- und Skelettmuskelzellen (Rosenfeld et al., 1992; Crystal et al., 1995; Wilson, 1996; Worgall et al., 1997). Da das CAR Protein zusätzlich nicht von allen Adenovirus Typen erkannt wird, muß noch mindestens ein weiterer Rezeptor für die Aufnahme von Adenoviren postuliert werden (Roelvink et al., 1999; Arnberg, 2000). Die geringe Gewebe- und Zellspezifität der Adenoviren läßt somit keine Vermutung über den Ursprung der durch Ad12-induzierten Tumoren zu. Auf der anderen Seite sind Adenoviren durch ihre Fähigkeit, eine große Anzahl verschiedener mitotischer und postmitotischer Zelltypen infizieren zu können, und darüber hinaus noch einfach herzustellen und zu reinigen sind, bevorzugte Kandidaten für den Einsatz als Vektoren bei Gentherapien (Übersicht in Russell, 2000).

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Schicksal von fremder DNA im Säugerorganismus in drei konzeptionell unterschiedlichen Ansätzen untersucht: nach oraler und parenteraler Applikation in Mäusen sowie nach Injektion von Ad12-Virionen in neugeborenen Hamstern.

### **Orale Applikation von fremder DNA**

Zunächst wurde die Persistenz und Verteilung des ungeschützten pEGFP-C1 Plasmids als Test-DNA nach oraler Verabreichung im Mausorganismus analysiert. Dieses Plasmid zeigte weder in Vorversuchen noch in Datenbank-Sequenzanalysen Homologien zur Maus-DNA oder zur DNA von Darmbakterien und konnte somit nach Verfütterung eindeutig als "fremd" im Mausorganismus erkannt werden. Das Schicksal der verabreichten pEGFP-C1 DNA wurde mit verschiedenen Standardmethoden der Molekularbiologie in den Tieren verfolgt. Mit Hilfe von PCR-Analysen konnten Fragmente der Test-DNA bis zu 12 h nach Fütterung im Dünndarm und bis zu 24 h im Blinddarm nachgewiesen werden, als Hinweis auf eine nicht vollständige Degradierung der oral aufgenommenen DNA im GI-Trakt der Maus. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von Gewebeschnitten zeigten Signale der verfütterten fremden DNA in Epithelzellen der Darmwand und in Milz-, Leber- und Nierenzellen. Diese Ergebnisse konnten durch PCR-Analysen bestätigt werden, die gfp-spezifische Fragmente mit einer Größe bis zu 1277 bp 3 h nach Verabreichung im Blut und bis zu 8 h in Leber, Milz und Niere nachwies. In Kontrollmäusen, die mit DNA-freier Pufferlösung gefüttert worden waren, konnte weder durch PCR- noch durch FISH-Analysen gfp DNA gefunden werden. Es ist anzunehmen, daß Fragmente der verfütterten fremden DNA aus dem Darminhalt über das Darmepithel und das Blut in verschiedene Organe gelangen.

Im weiteren wurde die Expression der verfütterten DNA im Mausorganismus untersucht. Dazu wurden Mäuse bis zu 3 Wochen täglich mit der pEGFP-C1 Plasmid DNA gefüttert. In keinem der 21 untersuchten Tiere konnte die Expression des GFP Proteins in der Darmwand oder in inneren Organen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Auch sensitivere RT-PCR-Analysen ergaben keinen Hinweis auf die Transkription der oral verabreichten DNA im Mausorganismus.

Die tägliche Fütterung von Mäusen mit der Test-DNA über 8 Generationen führte zu keinem Hinweis, daß fremde DNA über die Keimbahn an Nachkommen weitergegeben wird. In keinem der 97 untersuchten Nachkommen konnte die gfp DNA in allen Zellen

eines Tieres durch Southern Transfer-Analyse oder mit Hilfe der PCR-Methode gefunden werden. Es ist anzunehmen, daß die Keimbahn im Gegensatz zu anderen Organsystemen vor dem Eindringen fremder DNA geschützt ist.

Um das Schicksal von in natürlicher Nahrung enthaltener DNA im Säugerorganismus zu analysieren, wurden Mäuse mit Sojablättern gefüttert und die Persistenz und Verteilung des pflanzenspezifischen nukleären Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (Rubisco) Gens untersucht. Durch Restriktions- und Southern Transfer-Analysen wurde das Rubisco Gen ab 3 h nach Fütterung in verschiedenen Abschnitten des GI-Trakts nachgewiesen. Mittels PCR-Analysen wurden Fragmente des Rubisco Gens bis zu 49 h nach Fütterung im Darm und in seltenen Fällen bis zu 121 h im Blinddarm wiedergefunden. Wurden Mäuse über mehrere Tage mit Sojablättern gefüttert, konnten kleine Fragmente (337 bp) des Rubisco Gens im Leber- und Milzgewebe gefunden werden. Durch Bestimmung der Nukleotidsequenz der re-isolierten DNA-Fragmente wurden diese eindeutig als Rubisco DNA identifiziert.

### **Parenterale Applikation von fremder DNA**

Um die Persistenz und Ausbreitung fremder DNA im allgemeinen im Säugerorganismus zu untersuchen, wurde das pRSVGFP Plasmid in die Skelettmuskulatur (i.m.) von Mäusen injiziert. Nach Injektion von 50 µg Plasmid DNA wurde die fremde DNA bis zu 6 h nach Injektion im injizierten Muskel mittels Southern Transfer-Hybridisierungen nachgewiesen. Durch sensitivere PCR-Analysen konnte die gfp DNA bis zu 24 h in Leber, Blut, Niere und kontralateralem Muskel und bis zu 17 Monaten im injizierten Muskel wiedergefunden werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß fremde DNA zum einen mit dem Blut in verschiedene Organe gelangt und zum anderen schnell durch Nukleasen abgebaut wird. Auch in Darminhalten wurden Fragmente der i.m. injizierten DNA gefunden: ein Hinweis, daß fremde DNA nicht nur im Körper durch Nukleasen abgebaut wird, sondern auch über den Leber-Gallen-Darmweg aus dem Organismus eliminiert wird.

Im weiteren konnte sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie als auch durch RT-PCR-Analysen gezeigt werden, daß fremde DNA ab 3 Tagen nach Injektion über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen in dem injizierten Muskelgewebe exprimiert wird. Dabei war die Expression von GFP auf einen kleinen Abschnitt des Muskelgewebes begrenzt, der wahrscheinlich mit dem Injektionsort übereinstimmte. In allen anderen Organen, die entfernt vom Injektionsort lagen, konnte weder durch fluoreszenzmikroskopische noch durch RT-PCR-Analysen eine Expression der fremden DNA nachgewiesen werden.

## Injektion von Ad12-Virionen

Die subkutane (s.c.) Injektion von Ad12-Virionen in neugeborene Hamster führte innerhalb von 35 - 48 Tagen zu der Bildung von 1 - 3 Tumoren an der Injektionsstelle, wie beispielsweise in der Nackenregion. Im Gegensatz dazu wurden nach i.m. Injektion von Ad12-Virionen Tumoren nicht nur in Assoziation mit dem injizierten Muskelgewebe, sondern auch mit Leber, Hoden, Zwerchfell sowie dem Peritoneum beobachtet. Die Ergebnisse deuten auf eine Verteilung der Virionen über die Blutbahn und die Peritonealflüssigkeit hin. Im Vergleich zu s.c. induzierten Tumoren bildeten sich nach i.m. Injektion von Ad12-Virionen schneller mehr (bis zu 15) und größere Tumoren. Restriktions- und Southern Transfer-Analysen zeigten, daß manchmal mehrere aus der Bauchhöhle eines Tieres isolierte Tumoren identische Integrationsmuster der Ad12 DNA aufwiesen. Es ist anzunehmen, daß diese Tumoren nicht durch unabhängige Transformationsereignisse, sondern eher durch peritoneale Aussaat von Zellen eines primären Tumors entstanden sind. Nach subkutaner Injektion waren hingegen die Integrationsmuster der Ad12 DNA spezifisch und individuell für jeden Tumor.

Im weiteren konnte gezeigt werden, daß sowohl nach s.c. als auch nach i.m. Injektion die Tumorbildung von der Menge der injizierten Ad12-Virionen abhing. Nach Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu Ad12-Virionen entwickelten 94% (i.m.) bzw. 82% (s.c.) der Hamster Tumoren, während nach Injektion von  $4,5 \times 10^5$  pfu nur noch bei 20% (i.m.) bzw. 8% (s.c.) der Hamster eine Tumorbildung beobachtet werden konnte. Darüber hinaus nahm mit abnehmender Ad12 Menge die Zeit bis zur Tumorbildung zu sowie die Anzahl der pro Tier gebildeten Tumoren ab. Nach Injektion von  $4,5 \times 10^4$  pfu oder weniger Virionen wurde in keinem von 40 injizierten Hamstern die Bildung eines Tumors induziert.

Southern Transfer-Analysen haben gezeigt, daß die Menge der injizierten Ad12-Virionen keinen Einfluß auf die Anzahl der in die zelluläre DNA integrierten Ad12 Genome hat. Sowohl nach Injektion von  $4,5 \times 10^7$  pfu als auch von nur  $4,5 \times 10^5$  pfu Ad12-Virionen wurden Tumoren isoliert, die viele (>20) oder wenige Kopien der integrierten Ad12 DNA enthielten.

Die in der Nackenregion, am Muskel oder in der Bauchhöhle gebildeten Tumoren waren durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen nicht unterscheidbar und wiesen sowohl neuronale als auch mesenchymale Merkmale auf. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß Ad12 unabhängig von der Injektionsstelle der Ad12-Virionen und dem Ort der Tumorentwicklung die Bildung von wenig differenzierten Tumoren mit sowohl neuroektodermalen als auch mesenchymalen Charakteristika induziert.

## 7 Literatur

Abdou, N.I.; Wall, H.; and Clancy, J. 1981

The network theory of autoimmunity: In vitro modulation of DNA-binding cells by anti-idiotypic antibody present in inactive lupus sera, *J. Clin. Immunol.* 1, 234-238.

Acsadi, G.; Dickson, G.; Love, D.R.; Jani, A.; Walsh, F.S.; Gurusinghe, A.; Wolff, J.A.; and Davies, K.E. 1991a

Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs, *Nature* 352, 815-818.

Acsadi, G.; Jiao, S.; Jani, A.; Duke, D.; Williams, P.; Chong, W.; and Wolff, J.A. 1991b

Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo, *New Biologist* 3, 71-81.

Akusjärvi, G.; Persson, H.; and Roberts, R.J. 1986

in Doerfler, W. (ed.): *Adenovirus DNA: Structure and function in the adenovirus-2 genome*, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 53-95.

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.

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

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

Anderson, C.W.; Young, M.E.; and Flint S.J. 1989

Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu, *Virology* 172, 506-512.

Armstrong, D.G. 1976

Proteinverdauung und -absorption bei Monogastriden und Wiederkäuern, *Übers. Tierernährung* 4, 1-24.

Arnberg, N.; Edlund, K.; Kidd, A.H.; and Wadell, G. 2000

Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor, *J. Virol.* 74, 42-48.

Aubin, J.E. 1979

Autofluorescence of viable cultured mammalian cells, *J. Histochem. Cytochem.* 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, 285-294.

Azhar, S.; Mukhtar, H.; Dutta, G.P.; and Mohan Rao, V.K. 1974

Changes in the level of hydrolytic enzymes in the caecum and intestine of virulent strains of *Entamoeba histolytica* intracaecally, *Indian J. Med. Res.* 62, 573-580.

- Babich, A. Feldkamp, L.T.; Nevins, J.R.; Darnell, J.E.; and Weinberger, C. 1983  
Effect on adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: Transport control and specific translation discrimination, *Mol. Cell. Biol.* 3, 1212-1221.
- 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.
- Bandara, L.R.; and LaThangue, N.B. 1991  
Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor, *Nature* 351, 494-497.
- Bankhurst, A.D.; and Williams, R.C. 1975  
Identification of DNA binding lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Invest.* 56, 1378-1385.
- Behn-Krappa, A.; Hölker, I.; Sandaradura 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.
- Bendig, M.M. 1988  
The production of foreign proteins in mammalian cells, *Gent. Eng.* 7, 91-127.
- Bennet, R.; Gabor, G.; and Merritt, M. 1985  
DNA binding to human leukocytes, *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 leukocytes, *J. Immunol.* 140, 2937-2942.
- Benson, R.C.; Meyer, R.A.; Zaruba, M.E.; and Mc Khann, G.M. 1979  
Cellular autofluorescence - is it due to flavins?, *J. Histochem. Cytochem.* 27, 44-48.
- Bergelson, J.M.; Cunningham, J.A.; Droguett, G.; Kurt-Jones, E.A.; Krithivas, A.; Hong, J.S.; Horwitz, M.S.; Corwell, R.L.; and Finberg, R.W. 1997  
Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science* 275, 1320-1323.
- Berthold, F.; Hunneman, D.H.; Harms, D.; Kaser, H.; and Zieschang, J. 1992  
Serum vanillylmandelic acid/homovanillic acid contributes to prognosis estimation in patients with localised but not with metastatic neuroblastoma, *Eur J. Cancer* 28, 1950-1954.
- Berthold, F.; Baillot, A.; Hero, B.; Schurr, P.; Nerenz, A.; Hunneman, D.H.; and Sander, J. 1999  
Which cases are found and missed by neuroblastoma screening at 1 year? Results from the 1992 to 1995 study in three Federal States of Germany, *J. Clin. Oncol.* 17, 1200.

- Bestor, T.H.; and Verdine, G.L. 1994  
DNA methyltransferases, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 380-389.
- Bewley, M.C; Springer, K.; Zhang, Y.B.; Freimuth, P.; and Flanagan, J.M. 1999  
Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR, *Science* 286, 1579-1583.
- Bienenstock, J.; Mc Dermont, 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.
- Bird, A.P.; 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.
- 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.
- Blum, H.E.; Offersperger, W.B.; Walter, E.; Offersperger, S.; Wahl, A.; Zeschnick, C.; and Gerok, W. 1987  
Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection: Molecular evidence for monoclonal origin and expansion of malignantly hepatocytes, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 446-472.
- 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 microscopic study, *Am J. Anat* 136, 455-478.
- Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, 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.
- Borel, J.F. 1986  
Immunological properties of ciclosporin (Sandimmune), *Contrib. Nephrol.* 51, 10-18.
- 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.
- Bos J.L.; Polder, L.J.; Bernards, R.; Schrier, P.I.; van der Elsen, P.J.; van der Eb, A.J.; and van Ormondt, H. 1981  
The 2.2 kb E1A mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets, *Cell* 27, 121-131.
- Brown, D.T.; Westphal, M.; Burlingham, B.T.; Winterhoff, U.; and Doerfler, W. 1975  
Structure and composition of the adenovirus typ 12 core, *J. Virol.* 16, 366-387.

- Budker, V.; Zhang, G.; Knechtle, S.; and Wolff, J.A. 1996  
Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes, *Gene Therapy* 3, 593-598.
- Burlingham, B.T.; and Doerfler, W. 1971  
Three size classes of intracellular adenovirus deoxyribonucleic acid, *J. Virol.* 7, 707-719.
- 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.
- Caprossi, D.; Bacchetti, S.; and Nicoletti, B. 1991  
Synergism between aphidicolin and adenoviruses in the induction of breaks at fragile sites on human chromosomes, *Cancer Genet. Cytogenet.* 54, 39-53.
- Carbone, M. 1999  
Simian virus 40 and human tumors; It is time to study mechanisms, *J. Cell. Biochem.* 76, 189-193.
- 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.
- Charles River 1993  
Informationsblätter über Inzuchtmäuse.
- 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.
- Chowdhury, J.R.; Grossmann, M.; Gupta, S.; Chowdhury, N.R.; Baker, J.R.; and Wilson, J.M. 1991  
Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits, *Science* 254, 1802-1805.

- 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. 1994  
Differential surface characteristics of M cells from mouse intestinal Peyer's patches and caecal patches, *Histochem. J.* 26, 271-280.
- Clark, M.A.; Hirst, B.H.; and Jepson, M.A. 1998  
M cell surface  $\beta 1$  integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells, *Infect. Immun.* 66, 1237-1244.
- 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 Helinski, 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  $^{14}\text{C}$  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- $\gamma$  in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides, *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* 270, 404-410.
- D'Albis, A.; Couteaux, R.; Janmot, C.; Roulet, A.; and Mira, J-C. 1988  
Regeneration after cardiotoxin injury innervated and denervated slow and fast muscle of mammals, *Eur. J. Biochem.* 174, 103-110.
- 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 Therapy* 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.; Sierro, F.; and Kraehenbuhl, J-P. 1999  
Development of Peyer's patches, follicle-associated epithelium and M cell: Lessons from immunodeficient and knockout mice, *Immunology* 11, 183-191.
- Dejean, A.; and de The, H. 1990  
Hepatitis B virus as an insertional mutagen in a human hepatocellular carcinoma, *Mol. Biol. Med.* 7, 213-222.
- Diamandopoulos, G.T.; and McLane, M-F. 1975  
Effect of host age, virus dose, and route of inoculation on tumor incidence, latency, and morphology in syrian hamsters inoculated intravenously with oncogenic DNA simian virus 40, *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 479-482.
- Di Benedetto, 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-productiv 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 BHK12 cells, *J. Virol.* 6, 652-666.
- Doerfler, W. 1975  
Integration of viral DNA into the host genome, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 71, 1-78.
- Doerfler, W. 1981  
DNA methylation - A regulatory signal in eukaryotic gene expression, *J. Gen. Virol.* 57, 1-20.
- 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.; Gahlmann, R.; Stabel, S.; Deuring, R.; Lichtenberg, U.; Schulz, M.; Eick, D.; and Leisten, R. 1983  
On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs: The structure of junction sites, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 109, 193-228.
- 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 activity. In: *Encyclopedia of Human Biology* 3, 151-162
- Doerfler, W. 1991b  
The abortiv 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. 1992  
Transformation of cells by adenoviruses: less frequently discussed mechanisms, in Doerfler, W., and Böhm P. (eds.): *Malignant Transformation by DNA viruses, Molecular Mechanisms*, Verlag Chemie, Weinheim, 87-109.
- Doerfler, W. 1993  
Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutageneses, *Prog. Nucleic Res. Mol. Biol.* 46, 1-36.
- Doerfler, W.; and Boehm, P. (eds.) 1995  
The molecular repertoire of adenoviruses II, Verlag Chemie, Weinheim.
- Doerfler, W. 2000  
Foreign DNA in mammalian systems, Wiley-VCH.
- Dowty, M.E.; Williams, P.; Zhang, G.; and Wolff, J.A. 1995  
Plasmid DNA entry into post-mitotic nuclei of primary rat myotubes, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 4572-4576.
- Doyle, J.J.; and Doyle, J.L. 1990  
Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus (Life Technologies Inc.)* 12, 13-15.
- 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.
- Eddy, B.E.; Borman, G.S.; and Berkeley, W.H. 1961  
Tumors induced in hamsters by injection of Rhesus monkey kidney cell extracts, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107, 191-197.
- Eden, S.; Hashimshony, T.; Keshet, I.; Cedar, H.; and Thorne, A.W. 1998  
DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394, 842.

- Eggerding, F.A.; and Pierce, W.C. 1986  
Molecular biology of adenovirus type 2 semipermissive infections. I. Viral growth and expression of viral replicative functions during restricted adenovirus infection, *Virology* 148, 97-113.
- Eick, D.; and Doerfler, W. 1982  
Patterns of integration of adenovirus type 12 DNA: Rearrangements on the right terminus of viral genome in cell line T637, *J. Virol.* 42, 317-321.
- Ellis, W.C.; and Bleichner, K.L. 1969  
*J. Anim. Sci.* 29, 157-163
- 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.; and Owen, R. L. 1987  
Phenotype and distribution of T lymphocytes in Peyer's patches of athymic mice, *Histochemistry* 87, 321-325.
- 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.
- Esche, H.; Schilling, R.; and Doerfler, W. 1979  
In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transfected cells, *J. Virol.* 30, 21-31.
- Fanning, E.; and Doerfler, W. 1976  
Intracellular forms of adenovirus DNA. V. Viral DNA sequences in hamster cells abortively infected and transformed with human adenovirus type 12, *J. Virol.* 20, 373-383.
- Farber, M.S.; and Baum, S.G. 1978  
Transcription of adenovirus RNA in permissiv and nonpermissiv infection, *J. Virol.* 20, 373-383.
- 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.
- Fechteler, K.; Tatzelt, J.; Huppertz, S.; Wilgenbus, P.; and Doerfler, W. 1995  
The mechanism of adenovirus DNA integration: Studies in a cell-free system, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 199/II, Doerfler, W.; and Böhm, P. (eds.): "The molecular repertoire of adenoviruses II", 109-137.

- 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.
- Festing, M.F.; May, D.; Connors, T.A.; Lovell, D.; and Sparrow, S. 1978  
An athymic nude mutation in the rat, *Nature* 274, 365-366.
- Fisherman, D.M.; and Patterson, G.D. 1996  
Light scattering studies of supercoiled and nicked DNA, *Biopolymers* 38, 535-552.
- Flint, S.J. 1982  
Expression of adenoviral genetic information in productively infected cells, *Biochem. Biophys. Acta* 651, 175-208.
- 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.
- Freeman, A.E.; Black, P.H.; Vanderpool, J.H.; Henby, P.H.; Auston, J.B.; and Huebner, R.J. 1967  
Transformation of primary rat embryo cells by adenovirus type 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1205-1212.
- Fujimura, Y.; Kihara, T.; and Mine, H. 1992  
Membranous cells as portal of *Yersinia pseudotuberculosis* entry into 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.
- Gahlmann, R.; and Doerfler, W. 1983  
Integration of viral DNA into the genome of the adenovirus type 2-transformed hamster cell line HE5 without loss or alteration of cellular nucleotides, *Nucl. Acids Res.* 11, 7347-7361.
- Gahlmann, R.; Schulz, M. and Doerfler, W. 1984  
Low molecular weight RNAs with homologies to cellular DNA at the sites of adenovirus DNA insertion in hamster or mouse cells, *EMBO J.* 3, 3263-3269.

- Gaynor, R.B.; Hillman, D.; and Berk, A.J. 1984  
Adenovirus E1A protein activates transcription of a non viral gene which is infected or transformed into mammalian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1193-1197.
- Gerber, P.; and Kirschstein, R.L. 1962  
SV40-induced endopymonas in newborn hamsters, Virology 18, 582-588.
- 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.; and Hach, G. 1993  
Differential binding of lectins to M cells and enterocytes in the rabbit cecum, Gastroenterology 105, 1350-1361.
- Gebert, A.; Rothkötter, H-J.; and Pabst, R. 1996  
M cells in Peyer's patches of the intestine, Int. Rev. Cytology 167, 91-159.
- Giesecke, D.; and Hendrickx, H.K. 1973  
Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung, BLV Verlagsgesellschaft München, Bern, Wien.
- Ginsberg, H.S. 1979  
Adenovirus structural proteins, in Fraenkel-Conrat, H.; and Wagner, P.R. (eds.): Comprehensive Virology Vol. B plenum New York, 409.
- Ginsberg, H.S.; Bello, L.J.; and Levine 1967  
Control of biosynthesis of host macromolecules in cells infected with adenovirus, in Colter, J.S.; and Parachych (eds.): The molecular biology of viruses, Academic Press, New York, 547-572.
- Glover, T.; and Stein, C.K. 1988  
Chromosome breakage and recombination at fragile sites, Am. J. Hum Genet. 43, 265-273.
- Graham, F.L.; van der Eb, A.J.; and Heijneker, H.L. 1974  
Size and location of the transforming region in human adenovirus 5 DNA, Nature 251, 687-691.
- Graham, F.L. 1984  
The adenoviruses, in Ginsberg, H.S. (ed.): The adenoviruses, Plenum Publishing Corp. N.Y., 339-398.
- Graham, F.L.; Abraham, P.J.; Mulder, C.; Heijneker, H.L.; Sarnaar, S.O.; De Vries, F.A.J.; Fries, W.; and van der Eb, A.J. 1984  
Studies on the in vitro transformation by DNA and DNA-fragments of human adenovirus and simian virus 40, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 637-650.

- Green, M.; and Piña, M. 1964  
Biochemical studies on adenovirus multiplication, VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenovirus and their DNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 1251-1259.
- Green, M.; Brackmann, K.H.; Lucher, L.A.; and Symington, J.S. 1983  
Antibodies to synthetic peptides targeted to the transforming genes of human adenoviruses: An approach to understand early viral gene function, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 109, 167-192.
- Groneberg, J.; Sutter, D.; Soboll, H.; and Doerfler, W. 1978  
Morphological revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells, *J. Gen. Virol.* 40, 635-645.
- Groneberg, J.; and Doerfler, W. 1979  
Revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells have lost part of the viral genomes, *Int. J. Cancer* 24, 67-74.
- 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.
- Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; and Seder, R.A. 2000  
DNA vaccines: Immunology, application, and optimization, *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927-974.
- Habrova, V.; Takac, M.; Navratil, J.; Macha, J.; Ceskova, N.; and Jonak, J. 1996  
Association of Rous sarcoma virus DNA with *Xenopus laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization, *Mol. Reprod.* 44, 332-342.
- 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.

- Heller, H.; Kämmer, C.; Wilgenbus, P.; and Doerfler, W. 1995  
Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage  $\lambda$ ) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5515-5519.
- Herbst, G. 1844  
Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtung, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, 333-337.
- Herrmann, J.E.; Chen, S.C.; Jones, D.H.; Tinsley-Brown, A.; Fynan, E.F.; Greenberg, H.B.; and Farrar, G.H. 1999  
Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles, Virology 259, 148-153.
- 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.
- Hilger-Eversheim K.; and Doerfler W. 1997  
Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors: Non-specific chromosomal integration sites of viral DNA, Cancer Research 57, 3001-3009.
- Hilleman, M.R.; and Werner, J.H. 1954  
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.
- Hörnigke, H. 1984  
Dickdarmverdauung beim Kaninchen, Übers. Tierernährung 12, 215-250.
- 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.
- Horwitz, M.S. 1996  
Adenoviruses, in Fields, B.N. et al. (eds.), *Fields Virology*, 2149-2171.
- Hotchkiss, R.D. 1948  
The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography, *J. Biol. Chem.* 175, 315-327.
- Houweling, A.; van der Elsen, P.J.; and van der Eb, A.J. 1980  
Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4,5% fragment of adenovirus 5 DNA, *Virology* 105, 537-550.
- Huebner, R.J.; Rowe, W.P.; and Lane, W.T. 1962  
Oncogenic effects in hamster of human adenovirus types 12 and 18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 2051-2058.
- Jakob, T.; Walker, P.S.; Krieg, A.M.; Udey, M.C.; and Vogel, J.C. 1998  
Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: A role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA, *J. Immunol.* 161, 3042-3049.
- Javier, R.; Raska Jr.; K.; Mac Donald, G.J.; and Shenk, T. 1992  
Requirements for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors, *Science* 257, 1267-1271.
- 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.
- Jepson, M.A.; Clark, 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.
- Jessberger, R.; Heuss, D.; and Doerfler, W. 1989  
Recombination in hamster cell nuclear extracts between adenovirus type 12 DNA and two hamster preinsertion sequences, *EMBO J.* 8, 869-878.
- 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.
- Jox, A.; Rohen, C.; Belge, G.; Bartnitzke, S.; Pawlita, M.; Diehl, V.; Bullerdiek, J.; and Wolf, J. 1997  
Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability, *Annals of Oncology* 8, 131-135.

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, 1960

The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage I<sub>dg</sub>, J. Mol. Biol. 2, 392-415.

Kaiser, E.; Kuzmits R.; Pregant P.; Burghuber O.; and Worofka W. 1989

Clinical biochemistry of neuron specific enolase. Clin Chim Acta 183, 13-31

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.; Mestecky, J.; Lamm, M.; Strober, W.; Bienenstock, J.; and McGhee, J.R. (eds.), 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. (ed.): Physiology of digestion and metabolism in the ruminant, Proc. 3rd Int. Symp., Cambridge, 390-402.

Kelleher, C.A.; Dreyfus, D.H.; Jones, J.F.; and Gelfand, E.W. 1996

EBV infection of T cells: potential role in malignant transformation, Semin. Cancer Biol. 7, 197-207.

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

Khalili, K.; and Weinberg, R. 1984

Shut-off of actin biosynthesis in adenovirus serotype-2 injected cells, J. Mol. Biol. 175, 453-468.

Kirschstein, R.L.; Rabson, A.S.; and Peters, E.A. 1964

Oncogenic activity of adenovirus 12 in thymectomized BALB/c and C<sub>3</sub>H/HeN mice, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 198-200.

Knoblauch, M.; Schröer, J.; Schmitz, B.; and Doerfler, W. 1996

The structure of integration sites of adenovirus type 12 DNA in the hamster cell genome, Virology 70, 3788-3796.

Kochanek, S.; Toth, M.; Dehmel, A.; Renz, D.; and Doerfler, W. 1990

Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$ , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8830-8834.

- 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.; Pringault, E.; and Neutra, M.R. 1997  
Review article: Intestinal epithelia and barrier functions, *Aliment Pharmacol. Ther.* 11, 3-9.
- Krieg, A.M.; Yi, A.K.; Matson, S.; Waldschmidt, T.J.; Bishop, G.A.; Teasdale, R.; Koretzky, G.A.; and Klinmann, D.M. 1995  
CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374, 546-549.
- Krieg, A.M.; Hartmann, G.; and Yi, A.K. 2000  
Mechanism of action of CpG DNA, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 247, 1-21.
- Kruczek, I.; and Doerfler, W. 1982  
The unmethylated state of the promoter/leader and 5'-regions of integrated adenovirus genes correlates with gene expression, *EMBO J.* 1, 409-414.
- Kuhlmann, I.; Achten, S.; Rudolph, R.; and Doerfler, W. 1982  
Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: Loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation, *EMBO J.* 1, 79-86.
- Kuhlmann, I.; and Doerfler, W. 1982  
Shifts in the extent and patterns of DNA methylation upon explantation and subcultivation of adenovirus type 12-induced hamster tumor cells, *Virology* 118, 169-180.
- 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.
- Lee, J.S.; See, R.H.; Deng, T.; and Shi, Y. 1996  
Adenovirus E1A downregulates c-Jun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300, *Mol. Cell Biol.* 16, 4312-4326.
- 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.; Schmitz, B.; and 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.
- Levine, A.J.; Momand, J.; and Finlay, C.A. 1991  
The p53 tumor suppressor gene, *Nature* 351, 453-456.
- Lichy, J.H., Field, J.; Horwitz, M.S.; and Hurwitz, J. 1982  
Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase: Role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5225-5229.
- Liebler, E.M.; Lemke, C.; and Pohlenz, J.F. 1995  
Ultrastructural 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.
- Lillie, J.; and Green, M.R. 1989  
Transcription activation by the adenovirus E1A protein, *Nature* 338, 39-44.
- Lowden, S.; and Heath, T. 1995  
Lymphoid tissues of the ileum in young horses: distribution, structure and epithelium, *Anat. Embryol.* 192, 172-179.
- Lucher, L.A. 1990  
Adenovirus type 12 tumor antigen synthesis differs during infection of permissive and non-permissive cells, *J. Gen. Virol.* 71, 579-583.
- Lucher, L.A.; Khuntirat, B.; Zhao, J.; and Angeletti, P.C. 1992  
Altered Expression of adenovirus type 12 DNA-binding protein but not DNA polymerase during abortive infection of hamster cells, *Virology* 189, 17-195.
- Ludlow, J.W.; and Skuse, G.R. 1995  
Viral oncoproteins binding to pRB, p107, p130, and p300, *Virus. Res.* 35, 113-121.
- 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  
Biologically erodable microsphere as potential oral drug delivery systems, *Nature* 386, 410-414.
- Maturin, L.Sr.; and Curtiss, R. 1977  
Degradation of DNA by nucleases in intestinal tract of rats, *Science* 196, 216-218.
- 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 acids in the rumen, *British J. Nutr.* 29, 331-345.
- McAllan, A.B.; and Smith, R.H. 1973b  
Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro, *British J. Nutr.* 29, 467-474.
- McAllan, A.B. 1980  
The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines 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.
- McGhee, J.D.; and Ginder, G.D. 1979  
Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken  $\beta$ -globin genes, *Nature* 280, 419-420.
- Mellerick, D.M.; Fraser, N.W. 1987  
Physical state of the 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, H. 1982  
Beiträge zur Verdauungsphysiologie des Pferdes, *Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung*, 13.
- Meyer, K.B.; Thompson, M.M.; Levy, M.Y.; Barron, L.G.; and Szoka Jr., F.C. 1995  
Intratracheal gene delivery to the mouse airway: Characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics, *Gene Therapy* 2, 450-460.
- Miller, D.G.; Adam, M.A.; and Miller, A.D. 1990  
Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection, *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239-4242.

Miller, A.D. 1992

Human gene therapy comes of age, *Nature* 357, 455-460.

Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.; Masubuchi, Y.; Matsumoto, M; Doi, M.; Nishimura, C.; and Maeda, 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.

Modrow, S.; and Falke, D. 1997

*Molekulare Virologie*, Spektrum Akad. Verlag, 1997.

Münger, K. 1995

The molecular biology of cervical cancer, *J. Cell. Biochem.* 23, 55-60.

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.; 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.; Schwartz, 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.

Nemerow, 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 defence 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 defence 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.; Ogra, P.L.; and Mc Ghee, J.R. (eds.), *Mucosal vaccines*, Academic Press.

- 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.
- Ogawa, K.; Tsutsumi, A.; Iwata, K.; Fujii, Y.; Ohmori, M.; Hamaya, K; and Yabe, Y. 1965  
A histopathologic study of tumors induced by oncogenic adenovirus type 12, *Progr. Med. Japanese* 53, 678-685.
- Okudaira; K.; Yoshizawa, H.; and Williams, R.C. 1987  
Monoclonal murine anti-DNA antibody reacts with living mononuclear cells, *Arthritis Rheum.* 30, 669-674.
- Orend, G.; Kuhlmann, I.; and Doerfler, W. 1991  
Spreading of DNA methylation across integrated foreign (adenovirus type 12) genomes in mammalian cells, *J. Virol.* 65, 4301-4308.
- Orend, G.; Linkwitz, A.; and Doerfler, W. 1994  
Selectiv sites of adenovirus (foreign) DNA integration into the hamster genome: Changes in integration patterns, *J. Virol.* 68, 187-194.
- Orend, G.; Knoblauch, M.; and Doerfler, W. 1995  
Selectiv loss of unmethylated segments of integrated Ad12 genomes in revertants of the adenovirus type 12-transformed cell line T637, *Virus Res.* 38, 261-267.
- Ortin, J.; and Doerfler, W. 1975  
Transcription of the genom of adenovirus type 12. I. Viral mRNA in abortively infected and transfected cells, *J. Virol.* 15, 27-35.
- Ortin, J.; Scheidtmann, K.H.; Greenberg, R.; Westphal, M.; and Doerfler, W. 1976  
Transcription of the genom of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells, *J. Virol.* 20, 355-372.
- 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.; and Jones, A.L. 1974  
Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles, *Gastroenterology* 66, 189-203.
- 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.; Apple, R.T.; and Bhalla, D.K. 1986  
Morphometric and cytochemical analysis 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. 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.
- Pääbo, S.; Gifford, J.A.; and Wilson, A.C. 1988  
Mitochondrial DNA sequences from a 7000 year old brain, *Nucleic Acids Res.* 16, 9775-9787.
- Pappo, J. 1989  
Generation and characterization of monoclonal antibodies recognizing follicle epithelial M cells in rabbit gut-associated lymphoid tissues, *Cell Immunol.* 120, 31-41.
- Pappo, J.; and Ermak, T.H. 1989  
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.
- Pfeffer, E. 1987  
Verdauung, *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, 7. Auflage, 29-56.
- Pfeffer, A.; Schubbert, R.; Orend, G.; Hilger-Eversheim, K.; and Doerfler, W. 1999  
Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype, *Virus Research* 59, 113-127.
- Pfister, H. 1996  
The role of human papillomavirus in anogenital cancer, *Human Papillomavirus* 23, 579-595.
- Pines, J. 1995  
GFP in mammalian cells, *Trends Genet.* 11, 326-327.

- Pope, J.H.; and Rowe, W.P. 1964  
Immunofluorescent studies of adenovirus 12 tumors and of cells transformed or infected by adenovirus, *J. Exp. Med.* 120, 577-588.
- Popescu, N.C.; Di Paolo, J.A.; and Amsbaugh, S.C. 1987  
Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes, *Cytogenet. Cell Gent.* 44, 58-62.
- Popescu, N.C.; Zimonjic, D.; and Di Paolo, J.A. 1990  
Viral integration, fragile sites and proto-oncogenes in human neoplasia, *Hum. Genet.* 84, 383-386.
- Popescu, N.C.; Chen, M.; Simpsons, S.; Solinas, S.; and DiPaolo, J.A. 1993  
A Burkitt lymphoma cell line with integrated Epstein-Barr virus at a stable chromosome modification site, *Virology* 195, 248-251.
- Popescu, N.C.; and Zimonjic, D.B. 1997  
Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations, *Cancer Genet Cytogenet* 93, 10-21.
- 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.* 89, 2581-2584.
- Rao L.; Debbas, M.; Sabbatine, P.; Hockenbery, D.; Korsmeyer, S.; and White E. 1992  
The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDA and Bcl-2 proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7742-7746
- Rassool, F.V.; Mceithan, T.W.; Neilly, M.E.; van Melle, 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.
- Remus, R.; Kämmer, C.; Heller, H.; Schmitz, B.; Schell, G.; and Doerfler, W. 1999  
Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences, *J. Virol.* 73, 1010-1022.

- Rerat, A.A. 1980  
Some quantitative aspects of protein and carbohydrate absorption in the pig, Proc. Nutr. Soc. 39, 177-184.
- Riede, U-N.; and Saeger, W. 1995  
Nebennierenmark, in Riede, U-N.; and Schaefer, H-E. (eds.): Allgemeine und spezielle Pathologie, Georg Thieme Verlag, 986-991.
- 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.
- Robinson, P.J.; and Rapoport, S.I. 1987  
Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various times after osmotic opening, Am. J. Physiol. 253, 459-466.
- Roelvink, P.W.; Lee, G.M.; Einfeld, D.A.; Kovesdi, I.; and Wickham, T.J. 1999  
Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAT-recognizing adenoviridae, Science 286, 1568-1571.
- Rosenfeld, M.A.; Yoshimura, K.; Trapnell, B.C.; Yoneyama, K.; Rosenthal, E.R.; Dalemans, W.; Fukayama, M.; Bargon, J.; Stier, L.E.; Stratford-Perricaudet, I. 1992  
In vivo transfer of 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.
- Ross, G.F.; Bruno, M.D.; Uyeda, M.; Suzuki, K.; Nagao, K.; Whitsett, J.A.; and Korfhagen, T.R. 1998  
Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acid nuclease inhibitor, Gene Therapy 5, 1244-1250.
- Ross, M.H.; Rohen, J.W.; Lütjen-Drecoll, E.; and Kaye, G. 1996  
Atlas der Histologie - Mikroskopische Anatomie und Histologie des Menschen, 2. Auflage, Ullstein Mosby.
- Rowe, W.P.; Huebner, R.J.; Gilmore, L.K.; Parrott, R.H.; and Ward T.G. 1953  
Isolation of a cytogenic agent from human adenoids, undergoing spontaneously degeneration in tissue culture, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570-573.
- 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.
- Rueckert, R.R. 1996  
Picornaviridae: The viruses and their replication, in Fields B.N. et al. (eds.): *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 609-654.
- Russell, W.C. 2000  
Update on adenovirus and its vectors, *J. Gen. Virol.* 81, 2573-2604.
- 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 Phalipon, A. 1999  
M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: Mechanisms of interaction, consequences for the disease process, *Immunology* 11, 193-203.
- Sarnow, P.; Jacobson, S.J.; and Najita, L. 1990  
Poliovirus genetics, *Curr Top Microbiol Immunol* 161, 155-188.
- Schellander, K.; Peli, J.; Schmall, F.; and Brem, G. 1995  
Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm, *Animal Biotechnol.* 6, 41-50.
- Schick, J.; Baczko, K.; Fanning, E.; Groneberg, J.; Burger, H.; and Doerfler, W. 1976  
Intracellular forms of adenovirus DNA: Integrated form of adenovirus DNA appears early in productive infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1043-1047.
- Schnurr, D.; and Dondera, M.E. 1993  
Two new candidate adenovirus serotypes, *Intervirology* 36, 79-83.
- Schröer, J.; Hölker, I.; and Doerfler, W. 1997  
Adenovirus Type 12 DNA firmly associates with mammalian chromosomes early after virus infection or after DNA transfer by the addition of the DNA to the cell culture medium, *J. Virol.* 71, 7923-7932.
- 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. 1997  
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, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 961-966.
- Schubbert, R.; Hohlweg, U.; Renz, D.; and Doerfler, W. 1998  
On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: Chromosomal association and placental transmission to the fetus, *Mol. Gen. Genet.* 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.
- Shenk, T. 1996  
Adenoviridae: The viruses and their replication, in Fields B.N. et al. (eds.): *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2111-2148.
- Shiroki, K.; Hashimoto, S.; Saito, I.; Fukui, Y.; Kato, H.; and Shimojo, H. 1984  
Expression of the E4 gene is required for establishment of soft-agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12 E1 gene, *J. Virol.* 50, 854-863.
- Siebers, A.; and Finlay, B.B. 1996  
M cell and the pathogenesis of mucosal and systemic infections, *Trends in Microbiology* 4, 22-29.
- 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.
- Silbernagl, S.; and Despopoulos, A. 1991  
*Taschenatlas der Physiologie*, 4. überarb. Auflage, Thieme Verlag.
- 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 Lavitrano, M. 1996  
Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species, *Animal Biotechnol.* 7, 59-77.
- Spjut, H.J.; Van Hoosier, G.L.; and Trentin, J.J. 1967  
Neoplasms in hamsters induced by adenovirus type 12, *Arch. Pathol.* 83, 199-203.
- Sprengel, J.; Schmitz, B.; Heuss-Neitzel, D.; Zock, C.; and Doerfler, W. 1994  
Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: A comparative functional evaluation, *J. Virol.* 68, 379-389.
- Sprengel, J.; Schmitz, B.; Heuss-Neitzel, D.; and Doerfler, W. 1995  
The complete nucleotide sequence of the DNA of human adenovirus type 12, *Current Topics Microbiol. Immunol.* 199/II, 190-273
- Stabel, S.; Doerfler, W.; and Friis, R.R. 1980  
Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells, *J. Virol.* 36, 22-40.
- Stacey, K.J.; Sweet, M.J.; and Hume, D.A. 1996  
Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA, *J. Immunol.* 157, 2116-2122.

- Starzinski-Powitz, A.; Schultz, M.; Esche, H.; Mukai, N.; and Doerfler, W. 1982  
The adenovirus 12 mouse cell system: Permissivity and analysis of interaction patterns of viral DNA in tumor cells, *EMBO J.* 1, 493-497.
- Stillmann, B. 1986  
Functions of the adenovirus E1B tumor antigen, *Cancer Surv.* 5, 389-404.
- Stratford-Perricaudet, L.D.; Briand, P.; and Perricaudet, M. 1992  
Feasibility of adenovirus-mediated gene transfer in vivo, *Bone Marrow Transplant.* 9 Suppl 1, 151-152.
- Sutter, D.; Westphal, M.; and Doerfler, W. 1978  
Patterns of integration of viral DNA sequences in the genom of adenovirus type 12-transformed hamster cells, *Cell* 14, 569-585.
- 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.
- Takeshita, .H.; Mogi, K.; Yasuda, T.; Nakajima, Y.; Nakashima, Y.; Mori, S.; 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.
- Tanner, J.E.; Weis, J.; Fearon, D.; Whang, Y; and Kief, E. 1987  
Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates absorption, capping and endocytosis, *Cell* 50, 203-213.
- Tanner, J.E.; Alfieri, C.; Chatila, T.A.; and Diaz-Mitoma, F. 1996  
Induction of Interleukin-6 after stimulation of human B-cell CD21 by Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp220, *J. Virol.* 70, 570-575.
- Tatzelt, J.; Scholz, B.; Fichteler, K.; Jessberger, J.; and Doerfler, W. 1992  
Recombination between adenovirus type 12 DNA and a hamster preinsertion sequence in a cell-free system: Patch homologies and fractionation of nuclear extracts, *J. Mol. biol.* 226, 117-126.
- Thews, G.; Mutschler, E.; and Vaupel, P. 1989  
*Anatomie, Physiologie und Patophysiologie des Menschen*, 3. Auflage, 275-287.
- Todaro, G.J.; and Green, H. 1966a  
High frequency of SV40 transformation of mouse cell line 3T3; *Virology* 28, 756-759.
- Todaro, G.J.; and Green, H. 1966b  
Cell growth and the initiation of transformation by SV40; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 302-308.
- Toofanian, F.; and Teshfam, M. 1978  
*Res. Vet. Sci* 24, 382-389.

- Trentin, J.J.; Yabe, Y.; and Taylor, G. 1962  
The quest for human cancer viruses - A new approach to an old problem reveals cancer induction in hamster by human adenovirus, *Science* 137, 835-841.
- 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.
- 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.; Friedman, 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 den Heuvel, S.J.L.; van Laar, T.; The, I., and van der Eb, A.J. 1993  
Large E1B proteins of adenovirus types 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation, *J. Virol.* 67, 5226-5234
- van der Eb., A.J.; Mulder, C.; Graham, F.L.; and Houweling, A. 1977  
Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA, *Gene* 2, 115-132.
- 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 of the transforming genes of human adenovirus and SV 40, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 383-399.
- 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. 1964  
Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für großkorpuskuläre Elemente (Herbst Effekt), *Gastroenterology* 2, 57-64.
- Volkheimer, G. 1993  
Persorption von Mikropartikeln, *Pathologie* 14, 247-252.
- Wadell, G.; Hammarskjöld, M-L.; Winberg, G.; Varsani, T.W.; and Sundell, G. 1980  
Genetic variability of adenoviruses, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 354, 16-42.
- Wang, J.; Chenivesse, X.; Henglein, B.; and Brechot, C. 1990  
Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma, *Nature.* 343, 555-557.
- 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.
- Wels, A. 1987  
*Physiologie der Bewegung, Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, 7. Auflage, 656-685.
- 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 $\beta$ 1-4Gal-containing glycoconjugates, *Infect. Immun.* 63, 640-646.
- Whalen, R.G.; Harris, J.B.; Butler-Browne, G.S.; and Sesodia, S. 1990  
Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles, *Dev. Biol.* 141, 24-40.
- White, E.; Sabbatini, P.; Debbas, M.; Wold, W.S.M.; Kusher, D.L.; and Gooding, L.R. 1992  
The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor  $\alpha$ , *Mol. Cell Biol.* 12, 2570-2580
- Whyte, P.; Buchkovich, K.J.; Horowitz, J.M.; Friend, S.H.; Raybuck, M.; Weinberg, R.A.; and Harlow, E. 1988  
Association between an oncogene and an anti-oncogene: The adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product, *Nature* 334, 124-176.
- Whyte, P.; Williamson, N.M.; and Harlow, E. 1989  
Cellular targets for transformation by adenovirus E1A proteins, *Cell* 56, 67-75.
- Wigand, R.; Bartha, A.; Dreizim, R.S.; Esche, H.; Ginsberg, H.S.; Green, M.; Hierholzer, J.C.; Kalter, S.S.; Mc Ferran, J.B.; Petterson, U.; Russel, W.C.; and Wadel, G. 1982  
*Adenoviridae: Second Report, Intervirology* 18, 169-176.
- Wilson, J.M. 1996  
Adenoviruses as gene-delivery vehicles, *N. Engl. J. Med.* 334, 1185-1187.
- Wolf, J.L.; Kauffmann, R.S.; Finberg, R.; Dambrauskas, 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.
- Wolf, J.; Jox, A.; and Skarbeck, H. 1995  
Selective loss of integrated Epstein-Barr virus genome after long term cultivation of Burkitt's lymphoma x lymphoblastoid cell hybrids due to chromatin instability at the integration site, *Virology* 212, 179-185.
- 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.

- 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.; 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.; Acsadi, 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. 1997  
Naked DNA transport and expression in mammalian cells, *Neuromuscular Disorders* 7, 314-318.
- Worgall, S.; Wolff, G.; Falck-Pederson, E.; and Crystal, R.G. 1997  
Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration, *Human Gene Therapy* 8, 37-44.
- Yabe, Y.; Ogawa, K.; Iwata, K.; and Murakami, S. 1966  
Effect of injection of adenovirus type 12 in adult hamsters, *Acta Med. Okayama* 20, 147-154.
- Yanoff, M. 1991  
Correct use of the term "Homer Wright Rosette", *Am. J. Clin. Pathol.* 95, 903.
- Yasuda, T.; Nadano, D.; Awasu, S.; and Kishi, K. 1992  
Human urine deoxyribonuclease-II. DNase II. isoenzymes: A novel immunoaffinity 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.
- Yunis, J.J. 1987  
Multiple recurrent genomic rearrangements and fragile sites in human cancer, *Somat. Cell. Mol. Genet.* 13, 397-404
- Yunis, J.J.; Soreng, A.L.; and Bowe, A.E. 1987  
Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens, *Oncogenes* 1, 59-69.

- 
- Zani, M.; Lavitrano, M.; French, D.; Lulli, V.; Maione, B.; Sperandio, S.; and Spadafora, C. 1995  
The mechanism of binding of 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 deoxyribonuclease, *Anal. Biochem.* 14, 269-277.
- Zock, C.; and Doerfler, W. 1990  
A mitigator sequence in the downstream region of the major late promoter of adenovirus type 12, *EMBO J.* 9, 1615-1623.
- Zock, C.; Iselt, A.; and Doerfler, W. 1993  
A unique mitigator sequence determines the species specificity of the major late promoter in adenovirus type 12 DNA, *J. Virol.* 67, 682-693.
- Zoraqi, G.; and Spadafora, C. 1997  
Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome, *DNA and Cell Biology* 16, 291-300.
- zur Hausen, H. 1967  
Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells, *J. Virol.* 1, 1174-1185.
- zur Hausen, H.; and Schulte-Holthausen, H. 1970  
Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line of Burkitt tumor cells, *Nature* 227, 245-248.
- zur Hausen, H. 1991  
Viruses in human cancers, *Science* 254, 1167-1173.

---

## 8 Abkürzungen

A	Ampere
Ad	Adenovirus
Ad12	Adenovirus Typ 12
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Foetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
GFP	grün-fluoreszierende Protein
gfp	Gen für das GFP
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt

---

h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
i.m.	intramuskulär
l	Liter
Ls-DNA	Lachsspermien-DNA
M	Mol
m	milli
μ	mikro
MHC	Major Histocompatibility Complex Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
min	Minute
MLP	Major Late Promotor Später Hauptpromotor
NSE	Neuron-spezifische Enolase
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction Polymerase Kettenreaktion
pfu	plaque forming unit
p.i.	post injection
PLC	Primäres Leberzellkarzinom
PNET	primitive neuroektodermale Tumoren
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RE	Restriktionsendonuklease
RSV	Rous Sarcomavirus
RT	Raumtemperatur

RT	Reverse Transkriptase
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV	Simian-Virus
TE Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 9 Anhang

### 9.1 Berechnung der Zellzahl eines Sojablattes

Blattmaß:  $1 \times 2,5 \text{ cm}$  (=  $a \times b$ )

**1. Annahme:** Blatt ist elliptisch

Fläche der Ellipse:  $a \times b \times \pi$

$$1 \times 2,5 \times \pi = 7,854 \text{ cm}^2$$

Blattoberfläche  $\sim 8 \text{ cm}^2 = 800 \text{ mm}^2$

**2. Annahme:** Sojablatt ist 1,25 mm dick

Blattvolumen:  $800 \times 1,25 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$  **(1)**

**3. Annahme:** Größe der Zellen sei im Durchschnitt:  $30 \times 30 \times 30 \text{ }\mu\text{m}$

Zellvolumen beträgt demnach  $27 \times 10^3 \text{ }\mu\text{m}^3$  oder  $27 \times 10^{-6} \text{ mm}^3$  **(2)**

**4. Annahme:** 25% des Blattvolumens sind Interzellulare

Gesamtzellvolumen pro Blatt:  $1.000 \times 0,75 = 750 \text{ mm}^3$  **(3)**

Zellzahl ergibt sich wie folgt:  $750 : 27 \times 10^{-6} = 27,8 \times 10^6$

**Einschränkungen:**

a) Blätter sind seitlich abgeplattet

b) Ellipsenform ist zu hoch gegriffen

--> Die errechnete Zellzahl ist etwas zu hoch.

**Schlussfolgerung:**

Die Anzahl der Zellen in einem Sojablatt entspricht etwa:  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen/Sojablatt

## 9.2 Sequenzen der verwendeten synthetischen Oligonukleotide

Die hier aufgeführten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Life Technologies und MWG, Biotech bezogen. Sie wurden in 5' -> 3'-Richtung notiert und als PCR-Primer verwendet.

P1(42 sense)	CCC ATA TAT GGA GTT CCG
P2 (921 sense)	CGA CGG CAA CTA CAA GAC CC
P3 (1319 anti-sense)	CGT CCA TGC CGA GAG TGA TCC
P4 (582 sense)	GTC AGA TCC GCT AGC GCTACC
P5 (1574 anti-sense)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAT TTG TG
P6 (378 sense)	GGC AGT ACA TCA ATG GGC
P7 (604 anti-sense)	GCT CAC CAT GGT GGC GAC C
P8 (1010 anti-sense)	CCT CCT TGA AGT CGA TGC C
P9 (395 anti-sense)	GAG TCA AAC CGG CTA ATC CAC G
P11 (11sense)	CCT AGC TCG ATA CAA TAA ACG C
P12 (185 sense)	CCA CCT ACG GCA AGC TGA CC
P14 (645 sense)	CTA GGT GTG GCC ACC AAT TGG C
P15 (982 sense)	AAG TCT GAG ATA GAA AAA ATC C
P16 (20 sense)	TGG AAC CTC CAT GTG TCA CC
P17 (1536 anti-sense)	GGA AAT GCA AGG ACA ATGG
P18 (1284 anti-sense)	GCG ATG AAG CTG ATG CAC TGC

**Tabelle 8:** Sequenzen der verwendeten Primer

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Struktur eines Adenoviruspartikels . . . . .	15
<b>Abbildung 2:</b> Organisation des Adenovirus Typ 2 Genoms. . . . .	16
<b>Abbildung 3:</b> Expression von GFP in 3T3-Mausfibroblasten. . . . .	60
<b>Abbildung 4:</b> Nachweis der verfütterten pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt von Mäusen durch Southern Transfer-Analysen. . . . .	62
<b>Abbildung 5:</b> Nachweis der verfütterten pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt von Mäusen mittels PCR. . . . .	64
<b>Abbildung 6:</b> Nachweis von 1277 bp großen Fragmenten der verfütterten pEGFP-C1 DNA im GI-Trakt von Mäusen. . . . .	65
<b>Abbildung 7:</b> Nachweis der oral applizierten gfp DNA in verschiedenen Organen . .	66
<b>Abbildung 8:</b> Nachweis von Promotor-gfp-Fragmenten in Organen von Mäusen. . .	67
<b>Abbildung 9:</b> Nachweis der verfütterten pEGFP-C1 DNA in Gewebeschnitten mittels FISH. . . . .	68
<b>Abbildung 10:</b> Analyse der Transkription von verfütterter DNA. . . . .	71
<b>Abbildung 11:</b> Analyse des transgenen Status der F5-Generation mittels PCR. . . .	73
<b>Abbildung 12:</b> Analyse von Rubisco-spezifischen Primer. . . . .	75
<b>Abbildung 13:</b> Nachweis des Rubisco Gens im GI-Trakt mittels DNA-Transfer- Analyse nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern. . . . .	76
<b>Abbildung 14:</b> Nachweis von Fragmenten des Rubisco Gens im Magen-Darm- Trakt von Mäusen durch PCR-Analysen. . . . .	77
<b>Abbildung 15:</b> Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus. . . . .	78
<b>Abbildung 16:</b> Untersuchung der Persistenz des Rubisco Gens im GI-Trakt der Maus mittels der PCR-Methode . . . . .	79
<b>Abbildung 17:</b> Nachweis der mit der Nahrung aufgenommenen DNA in Organen. . .	80
<b>Abbildung 18:</b> Sequenzierung der PCR-Produkte. . . . .	80
<b>Abbildung 19:</b> Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen von Sojablättern. . . . .	81
<b>Abbildung 20:</b> Nachweis der injizierten DNA durch Southern Transfer-Analyse. . . .	83
<b>Abbildung 21:</b> Persistenz der i.m. injizierten DNA in verschiedenen Organen. . . . .	84
<b>Abbildung 22:</b> Ausscheidung der injizierten DNA über den Leber-Gallen-Darmweg. .	86
<b>Abbildung 23:</b> Ausscheidung des Bromphenolblaus aus dem Organismus. . . . .	87
<b>Abbildung 24:</b> Expression von GFP in injizierten Muskelfasern. . . . .	89
<b>Abbildung 25:</b> Nachweis der Transkription der injizierten DNA im kollateralen Muskel mittels der RT-PCR-Methode. . . . .	91

---

<b>Abbildung 26:</b> Analyse der Transkription der i.m. injizierten DNA in verschiedenen Organen. . . . .	92
<b>Abbildung 27:</b> Integrationsmuster der Ad12 DNA in den durch subkutane Injektion von Ad12-Virionen induzierten Tumoren. . . . .	97
<b>Abbildung 28:</b> Integrationsmuster der Ad12 DNA in den durch i.m. Injektion von Ad12-Virionen induzierten Tumoren. . . . .	103
<b>Abbildung 29:</b> FISH-Analysen der integrierten Ad12 DNA in Ad12-induzierten Tumoren und Tumorzelllinien. . . . .	105
<b>Abbildung 30:</b> Ad12-induzierte Tumoren in der Nackenregion von Hamstern. . . . .	107
<b>Abbildung 31:</b> Histologische und immunhistochemische Untersuchungen der Ad12-induzierten Tumoren. . . . .	108

---

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Expression des gfp Gens in 3T3-Mausfibroblasten in Abhängigkeit vom Promotor. ....	61
<b>Tabelle 2:</b> Nachweis der verfütterten gfp DNA im Darm und in verschiedenen Organen von Mäusen .....	69
<b>Tabelle 3:</b> Persistenz und Verteilung der parenteral applizierten pRSVGFP DNA ...	85
<b>Tabelle 4:</b> Tumorbildung nach subkutaner Injektion von Ad12-Virionen in Hamstern .....	94
<b>Tabelle 5:</b> Anzahl der integrierten Ad12 Genome in subkutan induzierten Tumoren .....	99
<b>Tabelle 6:</b> Ad12-induzierte Tumorbildung in unterschiedlichen Geweben .....	100
<b>Tabelle 7:</b> Anzahl der integrierten Ad12 Genome in Tumoren nach Injektion von Ad12-Virionen in Leber oder Muskel. ....	104
<b>Tabelle 8:</b> Sequenzen der verwendeten Primer .....	166

## 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.

Teilpublikationen:

Schubbert, R., Hohlweg, U., Renz, D., and Doerfler, W. 1998

On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: Chromosomal association and placental transmission to the fetus,

Mol. Gen. Genet. 259, 569-576.

Schubbert, R., Hohlweg, U., and Doerfler, W. 1999

Mit der Nahrung aufgenommene DNA überwindet die Gastrointestinal- und Plazenta-Barriere,

Ernährungsforschung 44, 1-6

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,

Mol Genet Genomics 265, 225-233.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach dem besten Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obrigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den

Urte Hohlweg

## “DANKE”

Mein Dank gilt in erster Linie und in ganz besonderer Weise Professor Dr. Walter Doerfler nicht nur für die interessanten Aufgabenstellungen, sondern auch für sein großes und stetes Interesse an meiner Arbeit sowie für seine Unterstützung und zahlreiche Ratschläge, die maßgeblich zu der Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Rainer Schubert, der mich in das “Mäuse...“-Projekt eingeführt hat und mir gerade aus tierärztlicher Sicht viel vermittelt hat. Silke Landrith danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die gute Pflege der Sojapflanzen. Auch den anderen Mitarbeitern des Labors 407, Sian Tjia, Herbert Müller-Hartmann, Kristina Hilger-Eversheim und sicherlich nicht zuletzt Gerti Meyer zu Altenschildesche, danke ich ganz herzlich für die vielen anregenden Diskussionen und für das angenehme Arbeitsklima.

Die Geduld und Mühe von Christina Kämmer beim Lesen, Korrigieren und Kommentieren dieser Arbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit weiß ich sehr zu schätzen. Sie hatte auf alle Fragen immer eine klärende Antwort.

Beryl Schwarz-Herzke danke ich besonders dafür, daß sie immer da war, wenn es wieder einmal brannte. Doris Renz danke ich sehr herzlich für die treue Zusammenarbeit, die zahlreichen Plasmid-Präparationen und die unzähligen Phagenhybridisierungen. Auch Gudrun Schell sei für ihren Einsatz in der Schlußphase dieser Arbeit gedankt.

Mein Dank gilt darüber hinaus den Mitarbeitern der Pathologie der Universität Aachen für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der durch Ad12-induzierten Tumoren. Den Mitarbeitern beider Tierställe, insbesondere Frau Molsberger-Pesch, Frau Morol und Herrn Schwabe, danke ich für die hervorragende Tierpflege.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitstreitern der 4. Etage bedanken, insbesondere bei Hilde Heller, Jörg Schröder und Anja Schramme, die mir mit Rat und Tat im Laufe der Jahre zur Seite standen. Ein großer Dank gilt schließlich Hanna Mansi-Wothke für die Herstellung der Zellkulturmedien sowie den verlässlichen und immer freundlichen Damen in der Spülküche, Frau Bläser, Frau Schmidt und Frau Jansen, ohne deren Reinigung von Geräten und Autoklavieren von Lösungen die Arbeit viel mühsamer gewesen wäre.

Zum Schluß herzlichen Dank an Georg, der nicht nur stets verständnisvoll, sondern auch in jeder Weise für mich persönlich hilfreich war.

## 12 Kurzzusammenfassung

Nach oraler Applikation von fremder Test-DNA, wie die des pEGFP-C1 Plasmids, an Mäuse persistieren kleine Mengen dieser DNA in Form von Fragmenten im Gastrointestinal-Trakt. Die fremde DNA kann mit Hilfe der PCR-Methode in Leber, Milz, Niere und Blut nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von FISH-Analysen unterstützen diese Beobachtungen und wiesen darüber hinaus die verfütterte Test-DNA in Zellen des Darmepithels nach. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Test-DNA aus dem Darmlumen über das Darmepithel und das Blut in innere Organe gelangt. Es gibt weder Hinweise darauf, daß die fremde DNA im Mausorganismus exprimiert wird, noch darauf, daß sie über die Keimbahn an Nachkommen weitergegeben wird. Es wurde ebenso gezeigt, daß auch in der natürlichen Nahrung enthaltene DNA, wie z.B. das pflanzenspezifische Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase Gen, nach Fütterung von Mäusen mit Sojablättern im Magen-Darm-Trakt nicht vollständig abgebaut wird und in seltenen Fällen in Form von Fragmenten in Leber- und Milzzellen gelangt.

Wird die Test-DNA in die Skelettmuskulatur von Mäusen injiziert, so ist die fremde DNA bis zu 24 h in Geweben nachweisbar, die entfernt von der Injektionsstelle liegen, wie beispielsweise in der Leber, dem Blut und dem kontralateralen Muskel. Im injizierten Muskel persistiert die fremde DNA hingegen für mindestens 17 Monate. Die Expression der Test-DNA kann nur im injizierten Muskelgewebe nachgewiesen werden. In einem Zeitraum zwischen 3 Tagen und 6 Wochen nach Injektion können in einem eng umgrenzten Bereich des Muskelgewebes grün-fluoreszierende Muskelfasern beobachtet werden.

Nach subkutaner Injektion von Adenovirus Typ 12 (Ad12) in neugeborene Hamster bilden sich Tumoren ausschließlich an der Injektionsstelle. Im Gegensatz dazu wird nach Injektion der Ad12-Virionen in die Skelettmuskulatur die Bildung von Tumoren nicht nur am Muskel, sondern auch an der Leber, den Hoden, dem Zwerchfell und dem Peritoneum induziert. Dabei hat weder die Injektionsstelle der Ad12-Virionen noch der Ort der Tumorbildung einen Einfluß auf den von Ad12-induzierten Tumortyp. Bei allen untersuchten Tumoren handelt es sich um undifferenzierte Tumoren mit sowohl neuroektodermalen als auch mesenchymalen Charakteristika.

## 13 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 green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as test gene has been traced from the intestinal contents, via the gut wall and peripheral white blood cells to liver, spleen and kidney. After feeding the cloned gfp gene daily for 21 days, transcription of this foreign gene has not been detected in any organ system of the mouse by UV-light microscopy or by the sensitive RT-PCR method. Hence, there is no evidence for the detectable expression of orally administered genes. Choosing a natural scenario, soybean leaves were fed to mice. The distribution of the plant-specific gene for the ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase (rubisco) has then been studied in the mouse organism. Starting at 3 h after feeding, the rubisco gene can be recovered almost intact from the contents of the gut. Rubisco gene fragments remain detectable up to 49 h after feeding in the intestine, up to 121 h in the cecum. Thus, plant-associated, naturally fed DNA is more stable in the intestinal tract than naked DNA which had disappeared from the intestinal tract by 24 h after feeding. Rubisco gene-specific PCR products of 337 bp nucleotides in length have been amplified from spleen and liver DNA.

Upon the intramuscular injection of gfp DNA, fragments of the foreign DNA have been amplified by PCR up to 17 months post injection in DNA from injected muscle, up to 24 h post injection in DNA from liver, blood, kidney and contralateral muscle. Furthermore gfp fragments can also be retrieved from the intestinal contents. Apparently, the organism eliminates injected foreign DNA via the liver-bile-intestinal route. However expression of the gfp gene could only be detected in the injected muscle, but not in the contralateral muscle, liver, spleen or blood of the same animal.

After the subcutaneous injection of Ad12 virions into newborn Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) tumors have been generated at the site of virus injection. In contrast, the intramuscular injection of Ad12 has caused widespread dissemination of tumors over the entire peritoneal cavity involving the surface of many abdominal organs. Independent of the subcutaneous or intraperitoneal localization of all Ad12-induced hamster tumors, their histological and immunohistochemical properties proved identical. The Ad12-induced malignancies are best classified as undifferentiated tumors with neuroectodermal and mesenchymal characteristics.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Urte Hohlweg, geb. Gerhardt
Geburtsdatum	7. November 1968
Geburtsort	Göttingen
Familienstand	verheiratet, keine Kinder
Eltern	Sybille Gerhardt, geb. Bach Richterin am Oberlandesgericht Dr. iur. Walter Gerhardt ordentlicher Professor an der Universität Bonn
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1975 - 1979	Grundschule Königswinter-Ittenbach
1979 - 1989	Gymnasium am Ölberg in Oberpleis
Mai 1989	Abitur

### Hochschulausbildung

Okt. 1989 - Jan. 1996	Biologiestudium in Freiburg i.Br.
Aug. 1992 - Mai 1993	Studienaufenthalt an der Brock-University in St. Catharines, Ontario, Kanada
Juni 1993	Bachelor of Science in Biological Science
Dez. 1994 - Dez. 1995	Diplomarbeit an der Klinik für Tumorbioogie in Freiburg i.Br.
Jan. 1996	Diplom in Biologie
seit Sep. 1996	Promotionsstudium Biologie in Köln

### Beruflicher Werdegang

März 1996 - Juli 1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
seit Sep. 1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik, Universität zu Köln

### Sonstige Aktivitäten

Feb. 1989	Förderprogramm "Jugend forscht" und Forschungsaufenthalt in Norditalien
Juli 1989 - Sep. 1989	Mitarbeiterin beim Caritas Hilfswerk
Feb. 1992	Sprachschule Kings College in Bournemouth, England