

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. H.J. SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Auswirkung von 5-FU auf die Aufnahme von
Adenoviren in Zellen *in vitro* und *in vivo***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Schwarz

2008

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. H.J. SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**Auswirkung von 5-FU auf die Aufnahme von
Adenoviren in Zellen *in vitro* und *in vivo***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Schwarz

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edward Geissler

2. Berichterstatter: PD Dr. Claus Hellerbrand

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.09

*Gewidmet:
Meiner Schwester*

1. Einleitung	12
1.1. Allgemeines zu Tumorerkrankungen	12
1.2. Der Vorgang der Apoptose	12
1.2.1. Der „Todesrezeptorweg“ (extrinsischer Signalweg)	14
1.2.2. Der mitochondriale Apoptoseweg (intrinsischer Signalweg)	16
1.3. Die Bedeutung der Gentherapie bei der Behandlung von Tumoren	19
1.4. Adenovirale Konstrukte bei der Gentherapie.....	22
1.5. Adenovirale Konstrukte in der Kombination mit 5-FU	25
1.6. Allgemeines zu Adenoviren	26
1.6.1. Entdeckung und Einteilung von Adenoviren	26
1.6.2. Aufbau des Virions und Genomstruktur	27
1.6.3. Der adenovirale Lebenszyklus	29
1.6.4. Die adenovirale Endozytose	29
1.6.5. Frühe Genprodukte	31
1.6.6. Die adenovirale DNA-Replikation	33
1.6.7. Späte Genprodukte.....	35
1.6.8. Morphogenese	35
1.7. Der Coxsackie-Adenovirusrezeptor – Aufbau und Struktur	36
1.8. 5-FU.....	38
2. Fragestellung	40
3. Material und Methoden.....	40

3.1.	Material	40
3.1.1.	Zellen und Zelllinien	40
3.1.2.	Zellkultur.....	42
3.1.3.	Antikörper.....	43
3.1.3.1.	Bax	43
3.1.3.2.	CAR.....	43
3.1.3.3.	Bcl-2.....	43
3.1.3.4.	E4orf3	44
3.1.3.5.	Hexon.....	44
3.1.3.6.	Aktin.....	44
3.1.4.	PCR-Primer.....	44
3.1.4.1.	β-Aktin (Genbanknummer: X00351.1)	44
3.1.4.2.	Bcl-2 (Genbanknummer: AAA51813)	44
3.1.4.3.	E4-Box (Genbanknummer: D63791).....	45
3.1.5.	5-FU.....	45
3.1.6.	DSS (Dextran Sulphate Sodium)	45
3.1.7.	Doxycyclin-induzierbarer Promoter	46
3.1.8.	Mäuse	47
3.2.	Methoden.....	48
3.2.1.	Adenovirale Techniken	48
3.2.2.	Zellkultur in Infektion mit Ad5	49
3.2.2.1.	Infektion der SW 480 Zellen mit Ad5-GFP.....	49

3.2.2.2.	Infektion der LoVo- und SW 480 -Zellen mit Ad5-CEAbax	50
3.2.2.3.	Infektion von Kolonkarzinomzellen mit Ad5-GFP	50
3.2.2.4.	Infektion von 293-Zellen mit Ad5-GFP in einem CAR-negativen System.....	50
3.2.3.	CAR-Blockade.....	51
3.2.4.	Western Blot Analyse im <i>in vivo</i> -Versuch	51
3.2.4.1.	kDa-Angaben für folgende aufgeführte Proteine	51
3.2.4.2.	Methodik der Western Blot Analyse.....	51
3.2.5.	PCR-Analyse im <i>in vitro</i> - und im <i>in vivo</i> -Versuch.....	56
3.2.6.	Transmissionselektronenmikroskopie	56
3.2.7.	Versuchsansatz beim Mausmodell	57
3.2.8.	Immunhistochemie der Mausschnitte.....	58
3.2.9.	H.E.-Färbung	60
3.2.10.	Infektion von Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlichen Ad5-Mutanten und 5-FU	61
3.2.11.	Nachweis der Effekte in einem CAR-negativen System.....	61
4.	Ergebnisse	62
4.1.	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Versuche.....	62
4.1.1.	Vergleich zwischen Zelllinien mit hoch- und niedrig-exprimierendem CAR-Level in Bezug zur adenoviralen Infektionsrate und 5-FU	62
4.1.2.	Zusammenhang zwischen der Konzentration von 5-FU und der Effizienz der Ad-Aufnahme in Zellen.....	66

4.1.3.	Die spezifischen Eigenschaften von 5-FU bezogen auf die Ad5-Aufnahme in Zellen	69
4.1.4.	Auswirkungen von 5-FU auf die Freisetzung von Ad5 aus liposomalen Strukturen.....	70
4.1.5.	Morphologische Veränderungen von Lipidschichten als Reaktion auf 5-FU.....	73
4.2.	Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Versuche	75
4.2.1.	Ergebnisse der Immunhistochemie	75
4.2.1.1.	Nachweis der in die Mausorgane aufgenommenen Adenoviren mittels des Hexon-Antikörpers.....	75
4.2.1.1.1.	Herz.....	75
4.2.1.1.2.	Leber	76
4.2.1.1.3.	Milz.....	77
4.2.1.1.4.	Niere.....	78
4.2.1.1.5.	Darm	79
4.2.1.1.6.	Lunge.....	81
4.2.1.2.	Nachweis des humanen bcl-2 mittels des bcl-2 Antikörpers.....	82
4.2.1.2.1.	Herz.....	82
4.2.1.2.2.	Leber	83
4.2.1.2.3.	Milz.....	84
4.2.1.2.4.	Niere.....	85
4.2.1.2.5.	Darm	86
4.2.1.2.6.	Lunge.....	87

4.2.2.	Ergebnisse der H.E.-Färbung	88
4.2.3.	Ergebnisse der PCR-Analyse	90
4.2.3.1.	Nachweis von bcl-2 und der E4-Box	90
4.2.3.1.1.	Herz.....	90
4.2.3.1.2.	Leber	92
4.2.3.1.3.	Niere.....	94
4.2.3.1.4.	Darm	95
4.2.3.1.5.	Milz.....	97
4.2.3.1.6.	Lunge.....	99
4.2.4.	Ergebnisse der Western-Blot-Analyse.....	101
4.2.4.1.	Bcl-2 und β -Aktin (I-19)	101
4.2.4.2.	E4orf3 und β -Aktin (I-19)	103
5.	Diskussion	106
5.1.	Auswirkungen von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate <i>in vitro</i>	108
5.2.	Auswirkungen von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate <i>in vivo</i>	113
5.2.1.	Herz.....	114
5.2.2.	Leber	117
5.2.3.	Milz.....	119
5.2.4.	Niere.....	121
5.2.5.	Darm	122
5.2.6.	Lunge.....	125

6. Zusammenfassung	127
7. Literatur.....	129
8. Danksagung	139
9. Curriculum vitae	140
10. Eidesstattliche Erklärung.....	143

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zu Tumorerkrankungen

Malignomerkrankungen stellen nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar. Es ist bekannt, dass Tumoren als Folge einer Anhäufung von genetischen Veränderungen entstehen, die in einem zellulären Phänotyp resultieren, der sich unter anderem durch unkontrolliertes Wachstum und reduzierte Apoptose charakterisieren lässt (Diep, Teixeira et al. 2004; Kleivi, Lind et al. 2007). Das bedeutet, dass es durch Fehlregulationen der zellulären Funktionen zu Neoplasien kommt, die sowohl benigne als auch maligne sein können. Diese Neoplasie meint damit eine autonome Zellteilung, die von Regulations- und Regenerationsmechanismen des Körpers abgekoppelt ist (Lopez-Saez, de la Torre et al. 1998). Entscheidend für ein benignes oder malignes Verhalten ist dabei die Metastatisierungsfähigkeit, aber auch Kriterien wie Veränderungen und Differenzierungsgrad der Zellen werden bei der Beurteilung der Dignität berücksichtigt. Die Entstehung von Tumoren, die auch als Kanzerogenese oder Karzinogenese bezeichnet wird, kann durch verschiedenste prädisponierend wirkende Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören v.a. familiäre Disposition, chemische Kanzerogene, Strahleneinwirkung, Lebensalter und Ernährungsgewohnheiten (Scapa and Eshchar 1985; Brambilla and Martelli 2007; Reed, Karres et al. 2007).

1.2. Der Vorgang der Apoptose

Bei vielzelligen Organismen spielt der Zelluntergang neben den Prozessen der Zellteilung und Zelldifferenzierung eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Homöostase des gesamten Organismus. So kommt es infolge schwerer Zellschädigung auf physiologischem Wege zum Zelluntergang. Dieser Zelltod ist in vielen Fällen nekrotisch und durch eine irreversible Dysfunktion der Mitochondrien gekennzeichnet, deren Energiereserven ausgeschöpft sind. Nekrotische Zellen können sowohl die Regulation des osmotischen Drucks als auch die Zellhomöostase nicht mehr aufrecht erhalten, was das Anschwellen der Zellen

(Onco) und die Zerstörung der Plasmamembran zur Folge hat (Cohen 1993). Die dabei in den extrazellulären Raum freigesetzten zytosolischen Enzyme führen dabei in den angrenzenden Geweben zu entzündlichen Prozessen, die wiederum den Zelluntergang beschleunigen (Raffray and Cohen 1997). Somit verursacht der nekrotische Zelltod relativ große irreversible Gewebeveränderungen. Auf der anderen Seite verfügt der Organismus über einen Mechanismus, der geschädigte, veraltete oder transformierte Zellen „geregelt“ eliminieren kann. Dieser genetisch codierte, so genannte „programmierte“ Zelltod (Lockshin and Williams 1965; Kerr, Wyllie et al. 1972) wird auch als Apoptose bezeichnet und ist nicht von einer entzündlichen Reaktion des umgebenden Gewebes gekennzeichnet. In einem gesunden Organismus treten während der Zellteilung- und Differenzierung ständig spontane Mutationen der DNA auf, die aber nicht zwangsläufig zur Elimination dieser Zellen führen muss, da der Körper über verschiedenste DNA-Reparaturmechanismen verfügt und bestimmte DNA-Defekte rückgängig machen kann (Capp, Boudsocq et al. 2006; Casali, Pal et al. 2006). Zu einem der wichtigsten Tumorsuppressorgenen zählt das p53-Gen, das Schäden im Genom einer Zelle erkennt, die Zelle anschließend in der G1-Phase des Zellzykluses arretiert und verschiedenste DNA-Reparaturmechanismen aktiviert (Shu, Li et al. 2006; Sykes, Mellert et al. 2006). Sobald aber in einer Zelle irreversible genetische Defekte in der DNA auftreten, kommt es in einem gesunden Organismus zur Eliminierung dieser Zelle durch die über das p53 eingeleitete Apoptose (Nio, Dong et al. 1998; Golstein and Kroemer 2006; Lai, Chi et al. 2006). Zu derartigen irreversiblen Schäden gehören besonders Defekte in Genen, die den Zellzyklus regulieren, wie z.B. die cdc-Gene (cell division cycle), da diese für die normale Zellproliferation benötigt werden (Reid and Hartwell 1977; Hartwell 1980; Weinert and Hartwell 1993; Nurse, Masui et al. 1998). Das Sterben der Zelle beginnt mit einer Schrumpfung des Zellkerns, relativ spät kommt es zum Zerfall der Plasmamembran in viele Vesikel und so zur Auflösung der Zelle (Kivinen, Kallajoki et al. 2005; Golstein and Kroemer 2006). Die DNA der betroffenen Zellen wird rasch abgebaut und bildet häufig Bruchstücke, die den Nucleosomen-assoziierten DNA-Teilen entsprechen. Im Verlauf der Apoptose bleibt die Membranintegrität erhalten, sodass keine Entzündungsreaktion stattfinden kann. Dies geschieht dadurch, dass sich Membranvesikel, die Fragmente der Zelle enthalten, exozytotisch von der Plasmamembran abschnüren. Diese so genannten apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) erlauben es Nachbarzellen bzw.

Makrophagen, die Überreste der sterbenden Zelle aufzunehmen und zu verwerten, ohne dass zytosolische Bestandteile in den extrazellulären Raum austreten können (Sasaki, Iwatsuki et al. 1995; Nishikawa and Sasaki 1996). Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese (Antonsson, Montessuit et al. 2001), was sie klar von der Zellnekrose unterscheidbar macht. Jede Zelle hat abhängig von ihrem Zelltyp und den proapoptotischen Stimuli zwei unterschiedliche Möglichkeiten, den Apoptosemechanismus einzuleiten. Auf der einen Seite kann sie den Zelluntergang durch die Freisetzung Apoptose-auslösender Faktoren aus den Mitochondrien (mitochondrialer Weg), auf der anderen Seite durch die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren der Zelle (Rezeptor-Weg) (Hengartner 2000) initiieren. Im Folgenden erfolgt die Beschreibung dieser beiden Apoptosewege, die auch als intrinsischer und extrinsischer Signalweg bezeichnet werden.

1.2.1. Der „Todesrezeptorweg“ (extrinsischer Signalweg)

Die Rezeptor vermittelte Signaltransduktion der Apoptose wird durch so genannte Todes- (*death*) Rezeptoren ausgelöst, die zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- und Nervenwachstums-Faktor (NFG)-Rezeptor-Superfamilie gehören (Schulze-Osthoff, Ferrari et al. 1998). Beispiele hierfür sind TNF- α und FasL/CD95L (Walczak and Krammer 2000), die als Liganden die Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Gegenwärtig sind sechs verschiedene Todesrezeptoren bekannt, zu denen die Rezeptoren TNF-R1 (CD120a/p55), Fas (CD95/Apo-1) oder LARD (Apo-3) gehören (Walczak and Krammer 2000). Dabei zählt der Apoptoseweg, der über den Fas-Rezeptor eingeleitet wird, zu den wohl am besten untersuchten Signaltransduktionswegen (Itoh, Yonehara et al. 1991). Im Falle dieses Fas-Rezeptors verursacht das Binden seines trimeren Liganden FasL (Rensing-Ehl, Frei et al. 1995) die Oligomerisierung des Fas-Rezeptors und die damit verbundene Bildung eines aktiven Signalkomplexes (*death-inducing signaling complex*, DISC) (Ni, Tomita et al. 1994; Kosai, Matsumoto et al. 1998). Der daraus resultierende trimerisierte Rezeptor vermittelt über homologe Bindung an seine nach zytoplasmatisch gerichtete Todesdomäne („*death-domain*“ = DD) eine enzymatische Bindung nicht aktiver Adapterproteine wie FADD (*Fas-associated death domain*) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Dieses Adapterprotein FADD kann nun

seinerseits über seine „Death-Effector-Domain“ (DED) (Boldin, Goncharov et al. 1996; Muzio, Chinnaiyan et al. 1996) mit der DED-Domäne der Initiator-Procaspase-8 interagieren und infolgedessen deren Autoproteolyse und damit Aktivierung dieser Caspase initiieren (Takahashi and Earnshaw 1996). Die Caspasen (*cystein aspartat-specific protease*) gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen (Gaur and Aggarwal 2003; Croft, Coleman et al. 2005), die Proteine spezifisch nach einem Aspartatrest spalten, selbst in einer Kaskade aktiviert werden und schließlich über die Aktivierung der DNAsen zur Degradation der chromosomalen DNA und somit zur Apoptose der Zelle führen (Nicholson, Ali et al. 1995; Gumucio, Diaz et al. 2002; Tomioka, Sameshima et al. 2002). Einmal aktiviert führt die Caspase-8 durch Proteolysereaktionen zu einer kaskadenartigen Aktivierung (Gaur and Aggarwal 2003; Croft, Coleman et al. 2005) weiterer Caspasen wie Caspase-3, -6 und -7 (Nicholson, Ali et al. 1995; Tewari, Quan et al. 1995). Dadurch erfolgt eine Vervielfältigung des „Todessignals“ und es kommt infolgedessen zu den klassischen oben erwähnten apoptotischen Zellveränderungen, die schließlich zum Tod der Zelle führen (Golstein and Kroemer 2006). Eine Kontrolle dieser Caspasen erfolgt intrazellulär über inhibitorische Proteine wie die IAPs (=Inhibitor apoptotischer Proteine), die die Caspasen im Zytosol blockieren können (Borner 2003).

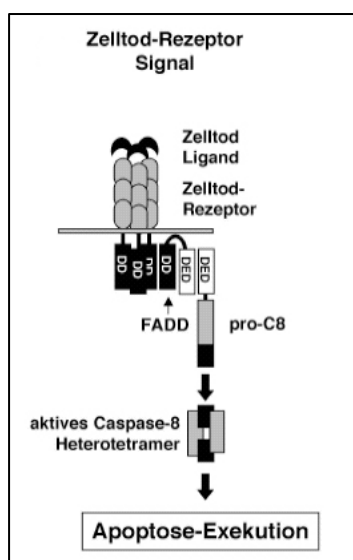


Abbildung 1: Aktivierung des Death-Rezeptor vermittelten Apoptosewegs

Die Aktivierung von Death-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC. Im Fall des CD95/Fas Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas Liganden an ein Rezeptor-Trimer zur DISC-Bildung: das FADD Adapterprotein wird über die Death-Domänen in CD95 und FADD rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Pro-Caspase-8 (C8) über die Death-Effector Domäne (DED) in pro-C8, wodurch die Aktivierung von pro-C8 zur aktiven C8 induziert wird.

DD: Death Domäne, DED: Death Effektor-Domäne, DISC: Death-Inducing Signaling Complex, FADD: Fas-assoziierte Death Domäne. nach (Knight 2006)

1.2.2. Der mitochondriale Apoptoseweg (intrinsischer Signalweg)

Im Gegensatz zur Rezeptor-vermittelten Apoptose wird der intrinsische Signaltransduktionsweg über die Mitochondrien (Pinkoski, Waterhouse et al. 2006) ausgelöst und tritt dabei als Reaktion auf den extrinsischen Apoptoseweg auf (Chauhan, Pandey et al. 1997; Schulze-Osthoff, Ferrari et al. 1998). Dieser Signalweg wird auf der einen Seite direkt von apoptotischen Stimuli wie γ -Strahlung, Chemotherapeutika, Viren, Bakterien, die Wegnahme von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren oder die Ablösung von der extrazellulären Matrix ausgelöst und auf der anderen Seite durch Stimuli des extrinsischen Signalwegs, bei denen die Bildung des DISC und die Aktivierung der Procaspase-8 nicht ausreichend für eine Aktivierung der Caspasenkaskade ist. Aus diesem Grund wird das Apoptosesignal intrazellulär über die Mitochondrien verstärkt. Dies geschieht durch die proteolytische Spaltung des zur bcl-2-Familie (Reed 1998) gehörenden pro-apoptotisch wirksamen Bid-Proteins (*bcl-2 interacting domain death agonist*) in das tBid (*truncated Bid*) über das der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg miteinander verbunden sind (Shulga and Pastorino 2006; Ward, Rehm et al. 2006). Bei der direkten Initiation des Apoptosesignalwegs durch zelluläre Stresssituationen wie z.B. nach Schädigung der chromosomalen DNA oder Hypoxie spielt das Tumorsuppressorgen p53 eine entscheidende Rolle. Dieses p53-Gen wird der Klasse der Tumor-Suppressor-Proteine zugerechnet, da man beobachtet hat, dass Mutationen in seinem Gen bei Mäusen zu vielfältigen Tumoren führen können (Sherr, Bertwistle et al. 2005; Zhu, Hoti et al. 2006). Das p53 kann als Transkriptionsfaktor die Expression von sowohl pro-apoptotisch wirkenden Proteinen, wie z.B. bax (Oltvai, Milliman et al. 1993), bak (Farrow, White et al. 1995), bok (Hsu, Kaipia et al. 1997) und bid, als auch anti-apoptotisch (z.B. bcl-2, bcl_{XL}) wirkender Proteine regulieren, die alle zur Familie der bcl-2-Proteine zählen (Reed 1998). So aktiviert p53 auf der einen Seite die Expression des pro-apoptotischen bcl-2-Homologans bax (bcl-associated X protein) (Oltvai, Milliman et al. 1993), bak und bok und verhindert auf der anderen Seite die Transkription des Apoptose-inhibierenden bcl-2 (Miyashita, Krajewski et al. 1994; Miyashita and Reed 1995). Bcl-2 oder bcl_{XL} verhindern die Apoptose durch direkte Wirkung auf die Mitochondrien, indem sie zum einen mittels des Cytochrom c die Aktivierung von Caspasen inhibieren (Kluck, Bossy-Wetzl et al. 1997; Yang, Liu et al. 1997) und zum anderen das Freisetzen weiterer pro-apoptotisch wirksamen

Proteine, wie z.B. das AIF (*apoptosis inducing factor*) (Susin, Zamzami et al. 1996; Krajewski, Krajewska et al. 1999) verhindern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Proteine das für die Integrität der Mitochondrien verantwortliche Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ (Shimizu, Eguchi et al. 1996) stabilisieren und den Einbau der mitochondrialen „*permeability transition pore*“ (mtPTP) (Marzo, Brenner et al. 1998) verhindern können. Wird aber nun die Expression des pro-apoptotischen Proteins bax mittels p53 aktiviert, transloziert dieses an die Mitochondrien, oligomerisiert und lagert sich in die äußere Mitochondrienwand ein (Gross, Jockel et al. 1998). Infolgedessen wird Cytochrom c freigesetzt (Jurgensmeier, Xie et al. 1998) und das Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ geht verloren, das unter physiologischen Bedingungen durch den Elektronentransport der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten wird und obligat für die Bildung von ATP durch oxidative Phosphorylierung ist. Diese Permeabilitätstransition (*mitochondrial permeability transition*, MPT) wird durch das Öffnen oben bereits erwähnter Megaporen (PTP) verursacht (Zoratti and Szabo 1995; Crompton 1999). Dieser durch bax vermittelte Vorgang ist unabhängig von der Wirkung von Caspasen und kann alleine den Zelltod auslösen. Wobei im Gegensatz dazu das oben erwähnte pro-apoptotisch wirkende Bid sowohl für seine eigene Aktivierung zum tBid als auch für die Weiterleitung des Apoptose-Signals zu den Mitochondrien für die folgende Freisetzung von Cytochrom c eine proteolytische Spaltung durch die Caspase-8 benötigt (Luo, Budihardjo et al. 1998; Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Shimizu and Tsujimoto 2000). Cytochrom c induziert nach Bindung an das C-terminale Ende von Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*) (Zou, Henzel et al. 1997) unter Verbrauch von ATP die Oligomerisierung von Apaf-1. Dieses bindet und aktiviert als Adapterprotein über eine *caspase recruitment domain* (CARD-Motiv) die Initiatorcaspase-9 und erzeugt hiermit eine allosterische Verstärkung (Rodriguez and Lazebnik 1999) von dessen Funktion (Hu, Benedict et al. 1999). Der nun entstandene Multiproteinkomplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase-9, der auch als Apoptosom bezeichnet wird, kann nun durch eine Apaf-1-induzierte Proteinkonformationsänderung die Caspase-9 aktivieren, ohne dass eine weitere proteolytische Prozessierung dieser Caspase notwendig ist (Stennicke, Deveraux et al. 1999). So kann die aktivierte Caspase-9 ähnlich der im Todesrezeptor-Apoptoseweg agierenden Caspase-8 die Effektor-Caspasen-3 und -7 binden und proteolytisch aktivieren (Rodriguez and Lazebnik 1999). Mit Aktivierung dieser

Affektor-Caspasen wird die Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet, die eine DNA-Fragmentierung, Zerstörung der Kernstruktur (Laminin) und Abbau von Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Matrixproteinen zur Folge hat. Nach diesem energieabhängigen Zellabbau werden die Bruchstücke von benachbarten Makrophagen aufgenommen und es kann so verhindert werden, dass der Organismus auf die Zerstörung der Zelle mit einer Entzündungsreaktion bzw. einer Antikörperbildung und damit mit einer Systemantwort reagiert. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass während der Exekutionsphase auch die äußere Mitochondrienmembran perforiert wird und dadurch das Protein Smac/Diablo freigesetzt, das IAPs (*inhibitors of apoptosis*) neutralisiert und dadurch verhindert, dass die Todeskaskade zu einem späteren Zeitpunkt noch gestoppt werden kann (Rodriguez and Lazebnik 1999). Diese anti-apoptotisch wirkenden IAPs sind die bisher einzig bekannten physiologischen Caspaseninhibitoren (Richter and Duckett 2000), deren Expression in vielen Tumorzelllinien hoch reguliert ist. Dadurch werden Apoptosedefizienz und Chemotherapieresistenz begünstigt. Zusätzlich konnte man beobachten, dass auch der Verlust der bax-Expression in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden ist (Sturm, Kohne et al. 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die inhibitorische Regulation des mitochondrialen Apoptosewegs überwiegend unter der Kontrolle von bcl-2 (B cell lymphoma gene 2), bcl-x_L (lange Spleissvariante des Bcl-x Proteins) und anderen apoptose-hemmenden Mitgliedern der bcl-2-Genfamilie erfolgt (Adams and Cory 1998; Lin, Yang et al. 1999; Willis, Day et al. 2003). Die Initiation und Aktivierung dieses über das Mitochondrium ablaufenden pro-apoptotischen Signalweges erfolgt vorwiegend mittels der Proteine der bax-Familie. Daher bestimmt die relative Konzentration an bcl-2 und bax, ob eine Zelle in den Vorgang des programmierten Zelltodes übergeht, oder nicht (Willis, Day et al. 2003).

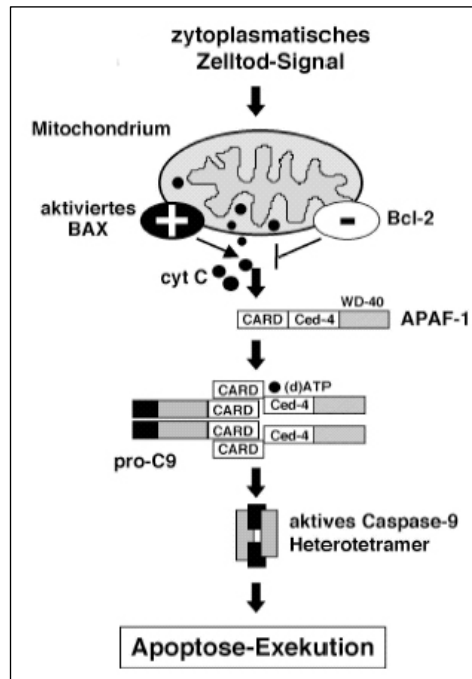


Abbildung 2: Der mitochondriale Weg der Apoptose

Der mitochondriale Apoptose-Signalweg kann über die Aktivierung von p53, z.B. nach DNA-Schädigung, aktiviert werden. Über bax wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des APAF-1 Adapterproteins, wodurch die Rekrutierung von pro-C9 in den Komplex ausgelöst wird. Pro-C9 wird autokatalytisch aktiviert und die Effektor-Caspase-Signalkaskade aktiviert.
nach (Knight 2006)

1.3. Die Bedeutung der Genterapie bei der Behandlung von Tumoren

Karzinome entstehen durch eine Ansammlung genetischer Alterationen, die die Biologie von Zellen verändert. Neben dem Wachstumsverhalten und der Fähigkeit Metastasen zu bilden, ist die Resistenz gegen Zellstress eines der Hauptmerkmale maligner Erkrankungen. Die mangelnde Möglichkeit auf Signale mit Apoptose zu reagieren, hat im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen zweimal entscheidende Bedeutung. Zum einem gibt eine reduzierte Apoptosefähigkeit der Zelle Zeit, um weitere genetische Alterationen anzusammeln. Zum anderen stellt sie ein Hindernis bei der Therapie von Karzinomen dar. Durch den Überlebensvorteil von Tumorzellen gegenüber dem umliegenden Gewebe sind zelltodinduzierende Therapieformen zum Scheitern verurteilt, solange sie keinen spezifischen Nachteil für die Tumorzellen beinhalten. Es ist daher für eine erfolgversprechende Therapieform

entscheidend, daß sie sich durch eine gewisse Spezifität für den Tumor auszeichnet. Desweiteren sollten therapeutische Interventionen die genetische Alteration berücksichtigen. So haben z.B. Patienten mit p53-Mutationen nach Bestrahlung, die in der Regel via p53 die Apoptose induziert, eine schlechtere Prognose (Lowe 1997). Eine therapeutische Intervention muss also zum einen spezifisch für Tumorzellen sein und zum anderen genetische Veränderungen, die das Absterben der Zellen verhindern, umgehen. In normalem zellulären Gewebe besteht zwischen Wachstum und Differenzierung einerseits und dem programmierten Zelltod (Apoptose) andererseits ein Fließgleichgewicht, d.h. die Anzahl der neu produzierten Zellen entspricht genau der der abgebauten Zellen (Knight 2006). Störungen dieses Fließgleichgewichtes können dazu führen, dass die durch eine erhöhte Mitoserate zu viel produzierten Zellen sich teilweise oder vollständig der Regulationsmechanismen entziehen und als Folge Tumore entstehen (Sherr, Bertwistle et al. 2005). Zu einer derartigen Transformation einer normalen in eine maligne Zelle reicht meist nicht eine Mutation aus, sondern es müssen mehrere genetische Veränderungen zusammen kommen. Neben dem Wachstumsverhalten und der Fähigkeit Metastasen zu bilden, ist die Resistenz gegen Zellstress eines der Hauptmerkmale maligner Erkrankungen.

Aus diesem Grund ist es sinnvoll therapeutische Strategien zu entwickeln, die auf diese genetischen Veränderungen abzielen und zur Apoptose der Tumorzellen führen. Dabei sollten diese Mechanismen besonders distal im Signalweg der Apoptose eingreifen um sicherstellen zu können, dass der apoptotische Signalweg in der transformierten Zelle nicht doch noch durch tumorspezifische Apoptose-Inhibitionsmechanismen verhindert werden kann. Ziel ist es daher, Therapieansätze so zu entwickeln, dass sie spezifisch gegen Tumorzellen gerichtet sind und somit nur diese abtöten und das restliche gesunde Gewebe schonen. Zudem schein es aufgrund der Kenntnis über die Mechanismen der Apoptose und den dabei bekannten regulierenden Faktoren sinnvoll Versuchsansätze zu finden, die in diese Signalprozesse eingreifen und diese regulieren können. Das bedeutet, dass eine Up-Regulation des pro-apoptotischen Proteins bax bzw. eine Down-Regulation des die Apoptose inhibierenden Proteins bcl-2 den Vorgang des programmierten Zelltods in tumorartig verändertem Gewebe verstärken könnte. Damit könnte Tumorgewebe, das ohnehin eine geringere Expression des Apoptose-aktivierenden bax-Proteins aufweist (Sturm, Kohne et al. 1999), zum einen in seinem exponentiellem Wachstum

gebremst werden und zum anderen könnte der durch die geringere bax-Expression bedingten Chemotherapeutikaresistenz entgegengewirkt werden.

Eine Gentherapie stellt ein neues therapeutisches Konzept bei der Behandlung von Tumoren dar, sowohl als Alternative, als auch in Verbindung mit einer Chemotherapie oder Radiotherapie (Mann 2002). Mechanismen der Gentherapie erlauben eine gezielte und spezifische Behandlung, die genau an den oben erwähnten Prozessen des physiologischen Zelllebens, wie der Apoptose, eingreifen können. Für eine somatische Gentherapie (im Gegensatz zur Keimbahntherapie, bei der Ei- und Samenzellen und Zellen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium eines Menschen als Zielzellen verwendet werden) sind Fragen wie die der geeigneten Zielzelle, des optimalen Vektors für den Gentransfer (Viren, Liposomen), der Expression des zu übertragenden Gens in der Zielzelle sowie der Sicherheit dieser Experimente von entscheidender Bedeutung. Da die genomische DNA im Allgemeinen zu groß für den Einbau in die heute zur Verfügung stehenden Vektoren ist, wird die keine Introns mehr enthaltende cDNA verwendet, aus der durch Ankoppelung der benötigten regulatorischen Sequenzen für die Transkription und Translation des Gens das so genannte Minigen entsteht. Um eine konstante Expression in der Zielzelle zu gewährleisten, wird ein Promotor an das Gen gekoppelt, unter dessen Kontrolle das Gen dann exprimiert wird. Es gibt mittlerweile viele verschiedene Möglichkeiten, bestimmte Gene ins Genom von humanen Zellen einschleusen zu können. Eine Auswahl an biologischen, chemischen und physikalischen Transportmöglichkeiten bietet Tabelle 1.

Virale Vektoren	Nicht-Virale Vektoren	Chemische Mittel	Physikalische Methoden
Retroviren	Liposomen	Ionen	Elektroporation
Adenoviren	Rezeptortargeting	DEAD-Dextran	Mikroinjektion
Herpesviren			Partikelabschluss
Adenoassoziierte Viren			„Jet Injektion“
			Direkte Injektion

Tabelle 1: Transportmöglichkeiten für eine Gentherapie

In den letzten Jahren folgten immer mehr Studien auf dem Gebiet der viralen Gentherapie, da virale Konstrukte mit den gewünschten Gensequenzen zum einen sehr einfach herzustellen sind und zum anderen der Transfer dieser viralen Vektoren ohne größeren Aufwand erzeugt werden kann.

1.4. Adenovirale Konstrukte bei der Gentherapie

Fortschritte im Bereich der medizinischen Grundlagenforschung und der Molekularbiologie haben in den letzten zwei Jahrzehnten wesentlich zum Verständnis molekularer Ursachen der Tumorentstehung beigetragen. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse konnten bestehende Therapieformen optimiert und neue Strategien zur Behandlung maligner Erkrankungen etabliert werden. Begünstigt durch die rasche Entwicklung molekularbiologischer Arbeitsmethoden und genetischer Transfersysteme wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche gentherapeutische Studien im Bereich der Onkologie initiiert und mittlerweile aus den Labors in die Klinik transferiert. Unter den verschiedenen Vektorsystemen, die derzeit zum Gentransfer in Tumorzellen verwendet werden, nehmen die von humanen Adenoviren abgeleiteten Vektoren eine zentrale Stellung ein. Allein in den USA werden inzwischen über 50 klinische Studien mit adenoviralen Vektoren durchgeführt (Alemany, Lai et al. 1999). Im Gegensatz zu anderen viralen und nicht-viralen Transfersystemen eignen sich diese Viren zur Tumorthherapie in besonderer Weise, da sie erstens aufgrund hoher in Zellkultur erzielbarer Virustiter eine sehr effiziente Transduktion von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ermöglichen, zweitens einen großen Zelltropismus besitzen und drittens eine robuste Expression verschiedener Fremdgene unter der Kontrolle viraler und zellulärer Promotoren erlauben.

Für derartige Versuchsansätze hat sich unter anderem das humane Ad5 als geeignet herausgestellt. Durch Deletion von Teilen des Virusgenoms und Insertion der gewünschten Sequenz unter der Regulation eines konstitutiven Viruspromotors wird das Virus zu einem replikationsdefizienten Vektor (He, Zhou et al. 1998). Dieser kann die exogene DNA auf differenzierte, nicht proliferierende Zellen übertragen (Graham and Prevec 1992). Um in die Zellen einzudringen, tritt das Adenovirus mit Rezeptoren der Zelloberfläche in Wechselwirkung und wird von der Zielzelle aufgenommen. Aus den Endosomen gelangt es in das Zytosol, von wo aus die Vektor-DNA den Zellkern erreicht, in dem sie ohne in das Wirtsgenom integriert zu

werden zur Expression des neuen Gens führt. Jedoch ist die Aufnahme der Adenoviren in Zellen nach bisheriger Auffassung abhängig von der Expression dieses Oberflächenrezeptors (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor, CAR). Es hat sich leider gezeigt, dass Tumorzellen normalerweise durch eine verminderte Expression von CAR charakterisiert sind, der die Faser (knob) Domäne von Ad Serotyp 2 und 5 bindet (Bergelson, Cunningham et al. 1997). Zellen, denen dieser Rezeptor fehlt, sind resistenter gegenüber einer Infektion mit Adenoviren und könnten folglich nur ein weniger bedeutsames Ziel für eine adenoviral-assoziierte Gentherapie sein (Li, Duan et al. 1999; Li, Pong et al. 1999). Ein weiteres Problem der viralen Tumorgentherapie ist es, mit den vorhandenen replikationsdefekten Viren mehr als ein paar Schichten eines Tumors *in vivo* zu infizieren. Dies ist dadurch zu erklären, dass im Tumor ein großer hydrostatischer Druck herrscht, der die Vektorpenetration verringert (Jain 1990). Ein Versuch diese Probleme zu lösen ist die Verwendung von replikations-kompetenten Vektoren, die die Möglichkeit besitzen, durch aufeinander folgende Zyklen der Infektion und Lyse von benachbarten Tumorzellen sich im Tumor zu vermehren und auszubreiten.

Zwei Gruppen adenoviraler Vektoren werden derzeit in der Tumorthherapie erprobt (Abb. 3) (Benihoud, Yeh et al. 1999). Die erste Gruppe umfasst Vektoren, die eine Deletion in der frühen Region 1 (E1) tragen. Dieser Bereich enthält zwei Transkriptionseinheiten (E1A und E1B), die unmittelbar zu Beginn der Infektion aktiviert werden und deren Genprodukte eine Schlüsselfunktion im produktiven Replikationszyklus einnehmen (Dobner, Horikoshi et al. 1996). E1-deletierte Adenoviren sind bei geringer Multiplizität replikationsdefekt, können aber in komplementierenden Zelllinien (z.B. 293-Zellen) vermehrt werden. Aufgrund ihrer relativ hohen Transduktionseffizienz nach intratumoraler und/oder lokaler Administration werden diese Vektoren zum Transfer therapeutisch wirksamer Gene in Tumorzellen verwendet, wobei die E1-Region durch das Fremdgen ersetzt wird (*E1-substituted vectors*). Neben den E1-substituierten Vektoren wird eine zweite Generation replikationsdefekter Adenoviren erprobt (*second generation vectors*), die zusätzlich eine Deletion in der frühen Region 4 (E4) enthalten (E1/E4-substituierte Vektoren). Diese Transkriptionseinheit kodiert für sechs verschiedene Genprodukte (E4orf1 - E4orf6/7), wovon mindestens zwei (E4orf3 und E4orf6) für den lytischen Infektionsverlauf in primären Zellen eine zentrale Rolle spielen (Nevels, Rubenwolf et al. 2000).

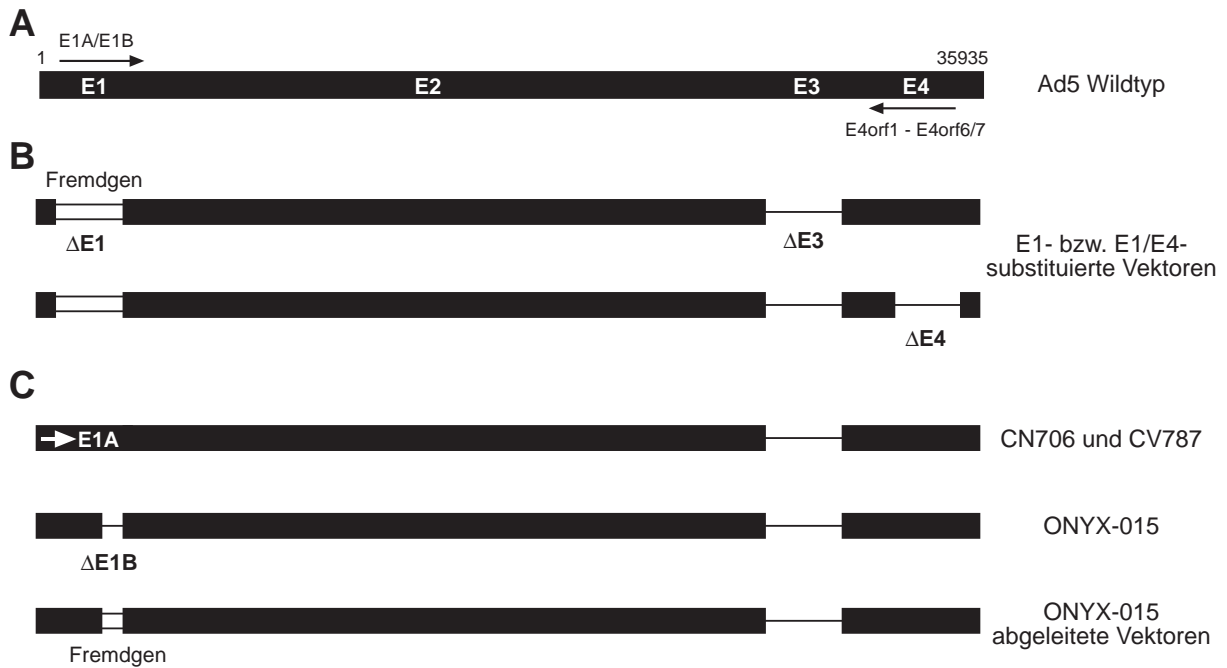


Abbildung 3: Übersicht adenoviraler Vektoren in der Tumorthherapie

A: Schematische Darstellung des linearen, doppelsträngigen DNA-Genoms (35935 Bp) von Adenovirus Typ 5 (Ad5) Wildtyp mit den frühen Regionen E1, E2, E3 und E4. Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung der E1A/E1B- und E4-Gene.

B: Replikationsdefekte Vektoren der ersten und zweiten Generation. Insetrierte Fremdgenen in der deletierten E1-Region ($\Delta E1$) sind durch einen weißen Balken dargestellt.

C: Konditional replikationskompetente Adenoviren. \Rightarrow bei CN706 und CV778 symbolisiert tumor-spezifisch aktive Promotoren, welche die Expression der E1A-Gene regulieren (Rodriguez, Schuur et al. 1997; Yu, Chen et al. 1999). ONYX-015 enthält eine Deletion im E1B-Gen ($\Delta E1B$); (Bischoff, Kim et al. 1996), das in den von ONYX-015 abgeleiteten Vektoren durch ein therapeutisch wirksames Fremdgen (weißer Balken) ersetzt wird.

Die meisten replikationsdefekten und -kompetenten Adenovirusvektoren tragen zusätzlich eine Deletion in der frühen Region 3 ($\Delta E3$). Die Genprodukte der E3-Region haben immunmodulatorische Funktionen (Mahr and Gooding 1999), sind aber für eine produktive Infektion in Gewebekultur nicht essentiell. Weitere Erläuterungen s. Text.

Die zweite Gruppe adenoviraler Vektoren, umfasst bedingt vermehrungsfähige Viren, die ganz oder teilweise die E1- und E4-Transkriptionseinheiten enthalten und aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontrollregionen und/oder kodierenden Bereichen der E1A- und E1B-Gene selektiv in bestimmten Tumorzellen replizieren (Abb. 3). Im Unterschied zu den Transfervektoren der ersten und zweiten Generation, beruht das onkolytische Potenzial dieser Viren nicht auf der Expression eines transduzierten Fremdgens, sondern auf ihrer Fähigkeit einen lytischen Infektionszyklus zu durchlaufen, der das Absterben der Wirtszellen bewirkt. Diese konditional replikationskompetenten Viren bieten damit prinzipiell die Möglichkeit das Tumorgewebe durch Ausbreitung infektiöser Nachkommenviren (*virus spread*)

vollständig zu eliminieren. Der derzeit prominenteste Vertreter dieser Gruppe ist ONYX-015 (Bischoff, Kirn et al. 1996). Das Virus trägt zwei Mutationen in der frühen Transkriptionseinheit E1B (Barker and Berk 1987), wodurch sein lytischer Wirtsbereich scheinbar auf bestimmte, insbesondere p53-negative Tumorzelltypen eingeschränkt wird (Bischoff, Kirn et al. 1996; Heise, Sampson-Johannes et al. 1997; Heise, Williams et al. 1999). Obwohl die molekulare Grundlage für die tumorspezifische Replikation der E1B-attenuierten Virusmutante noch unklar ist und kontrovers diskutiert wird (Lowe 1997; Lane 1998; Linke 1998; Paillard 1998; Pennisi 1998), stellen ONYX-015 und davon abgeleitete Vektoren (Duque, Alonso et al. 1998; Freytag, Rogulski et al. 1998; Wildner, Morris et al. 1999; Rogulski, Freytag et al. 2000; Rogulski, Wing et al. 2000; Sauthoff, Heitner et al. 2000; You, Yang et al. 2000) ein neues, vielversprechendes Therapiekonzept dar, das mittlerweile in klinischen Studien getestet wird (Kirn, Hermiston et al. 1998; Heise, Williams et al. 1999; Ganly, Kirn et al. 2000).

1.5. Adenovirale Konstrukte in der Kombination mit 5-FU

Als Versuch die antineoplastische Effizienz der Virustherapie zu erhöhen wurde die virale Onkolyse kombiniert mit der *Prodrug*-Suizid-Gen-Therapie. Die *Prodrug*-Suizid-Gen-Therapie basiert auf der selektiven Umwandlung eines nicht toxischen Medikaments in eine zytotoxische Form. Ein weit verbreitetes System basiert auf der Umwandlung von dem *Prodrug* 5-Fluorocytosin (5-FC) in 5-FU durch ein vektorkodiertes Cytosin-Deaminase (CD) -Gen (Huber, Austin et al. 1993). Der virale onkolytische Effekt des E1B-55K-deletierten Adenovirus konnte signifikant verstärkt werden. Dies wurde in soliden Xenograft-Tumor-Modellen untersucht, als das *Prodrug* erst nach maximaler Vektorreplikation und Genexpression gegeben wurde (Freytag, Rogulski et al. 1998; Wildner, Blaese et al. 1999; Wildner, Morris et al. 1999; Freytag, Khil et al. 2002). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Behandlung eines kolorektalen Karzinoms mit replikations-selektiven Ad dl1520 in Kombination mit 5-FU viel effizienter bei der Induktion zur Apoptose war, als die beiden Substanzen jeweils alleine (Heise, Lemmon et al. 2000; Khuri, Nemunaitis et al. 2000; Reid, Galanis et al. 2001; Petit, Davidson et al. 2002).

1.6. Allgemeines zu Adenoviren

1.6.1. Entdeckung und Einteilung von Adenoviren

Für die Etablierung neuer Zelllinien untersuchten Wallace Rowe und seine Mitarbeiter 1953 in Washington DC. adenoides Gewebe, das sie aus chirurgisch entfernten Rachentonsillen von 53 Kindern gewannen. 33 der angesetzten Kulturen wiesen nach vier Wochen einen langsam progredienten zytopathischen Effekt auf, den Rowe und seine Mitarbeiter auf die Anwesenheit eines übertragbaren, viralen Agens zurückführten (Rowe, Huebner et al. 1953). Bereits ein Jahr später wurde dieses virale Agens als Erreger akuter Infektionen des Respirationstraktes bei erkranktem Personal der US-Armee identifiziert (Hilleman and Werner 1954). Weitere Untersuchungen ließen mehrere Subtypen eines neues Virus aufweisen, die zunächst als Adenoid degenerierende (AD) Agentien bezeichnet wurden und seit 1956 zur Gruppe der Adenoviren zusammengefasst werden. Neben akuter Infektionen der Luftwege konnten im Laufe der Zeit weitere Infektionen mit der Anwesenheit dieser Virusgruppe in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen besonders Ausbrüche epidemischer Keratokonjunktivitis sowie andere Augeninfektionen (Ad8, Ad19) (Hogan 1957; Jawetz 1959) und intestinale Erkrankungen von Kindern durch eine Infektion mit Ad40 und Ad41 (de Jong, Wigand et al. 1983; Wigand, Baumeister et al. 1983; Wigand, Adrian et al. 1987). Trentin und Mitarbeiter konnten 1962 zeigen, dass Ad12 undifferenzierte Sarkome in neugeborenen Hamstern und anderen Nagetieren hervorrufen kann. Dies war der erste Hinweis dafür, dass es auch humanpathogene Viren mit onkogenem Potential gibt (Trentin, Yabe et al. 1962).

Die Adenoviren bilden die Familie der Adenoviridae, die in zwei Genera unterteilt wird: Aviadenovirus, welches die bei Vögeln vorkommenden Typen beinhaltet, und Mastadenovirus, zu denen die Säugetier-Adenoviren einschließlich der menschlichen Serotypen zählen. Diese beiden Genera werden v.a. aufgrund ihrer unterschiedlichen immunologischen Eigenschaften des Virions voneinander unterschieden (Norrby, Bartha et al. 1976). Insgesamt sind inzwischen mehr als 100 serologisch unterscheidbare Typen (Serotypen) von Adenoviren bekannt. Die humanen Adenoviren wurden ursprünglich nach ihrem Hämagglutinationsmustern unterteilt (Rosen 1960; Hierholzer 1973) und werden seit 1965 nach ihrem

onkogenem Potential in Nagetieren in sechs Genera (A bis F) subklassifiziert (Huebner, Casey et al. 1965).

1.6.2. Aufbau des Virions und Genomstruktur

Adenoviren sind unbehüllte, 65 bis 90 nm große Viruspartikel, deren Proteinkapsid regelmäßig ikosaedrisch aufgebaut ist (van Oostrum, Smith et al. 1987) und sie besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom. Das Capsid besteht aus 252 Untereinheiten (Capsomeren), die sich in 240 Hexone und 12 Pentone unterscheiden lassen. Jeweils 9 Hexone bilden die 20 Seitenflächen des Capsids und tragen ein gruppenspezifisches Antigen, das bei allen Adenoviren vorkommt. Die restlichen 12 Capsomere sind fünfeckige Pentone und bilden die von jeweils fünf Hexonen umringten Ecken des Ikosaeders. Nicht-kovalent verknüpft inserieren an ihnen 12 antennenähnliche Fiber, die zusammen mit den Pentonen das typenspezifische Antigen repräsentieren. Etwa 11 bis 15 weitere Strukturpolypeptide sind jeweils mit den Penton- und Hexon-Proteinen assoziiert.

Im Inneren des Partikels ist das so genannte Core durch Interaktionen mit Capsid-Proteinen positioniert. Dieses besteht aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül, das mit Virusproteinen einen z.T. histonartigen Nukleoproteinkomplex bildet (Abb. 4).

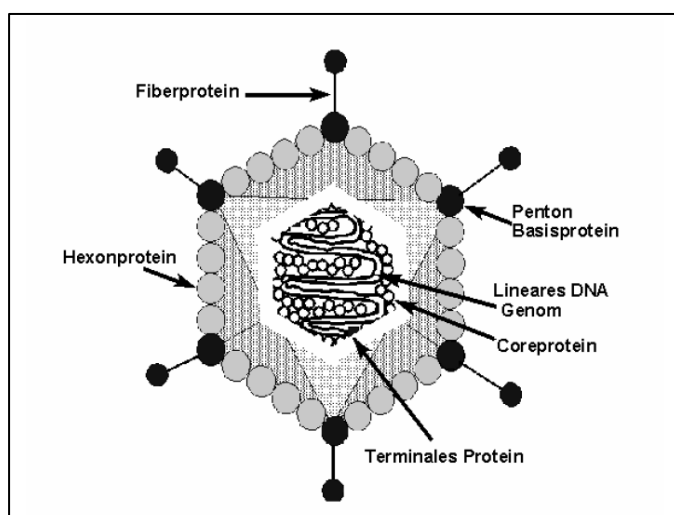


Abbildung 4: Aufbau eines Adenoviruspartikel (modifiziert nach Shenk) (Moore, Horikoshi et al. 1996)
Im Inneren befindet sich das lineare DNA Genom mit den Coreproteinen; das Capsid wird aus den Strukturproteinen gebildet.

Das Genom mit einer Länge von 36000 – 38000 bp je nach Virustyp besteht aus fünf codierenden Bereichen, wobei sich die einzelnen Gene für die Strukturproteine auf fast die ganze Länge des r-Stranges verteilen und die Gene für die frühen Proteine in Gruppen sowohl auf dem r- als auch auf dem l-Strang lokalisiert sind. An beiden 5'-Enden des linearen Genoms ist ein virales Protein von 55 kD mit einem dCMP kovalent gebunden, das für die Initiation der viralen DNA-Replikation verantwortlich ist. Zusätzlich dient es zur Anheftung an die nukleäre Matrix und hält das Virusgenom in einem quasi-zirkulären Zustand (Tamanoi and Stillman 1982).

Ad-DNA besitzt redundante, je nach Serotyp 100 bis 140 bp lange, invertierte Sequenzen an den Genomenden, sodass sich während der DNA-Replikation doppelsträngige Regionen ausbilden können, was zur Bildung von pfannenstielähnlichen Strukturen führt. Diese Enden dürften eine Rolle bei der DNA-Doppelstrangsynthese spielen. Bisher ist die DNA-Sequenz für Ad2, Ad5 und Ad12 vollständig bekannt (Roberts, White et al. 1986; Chroboczek, Bieber et al. 1992; Sprengel, Schmitz et al. 1994). Für andere Typen gibt es ausführliche Restriktionskarten und Teilsequenzen.

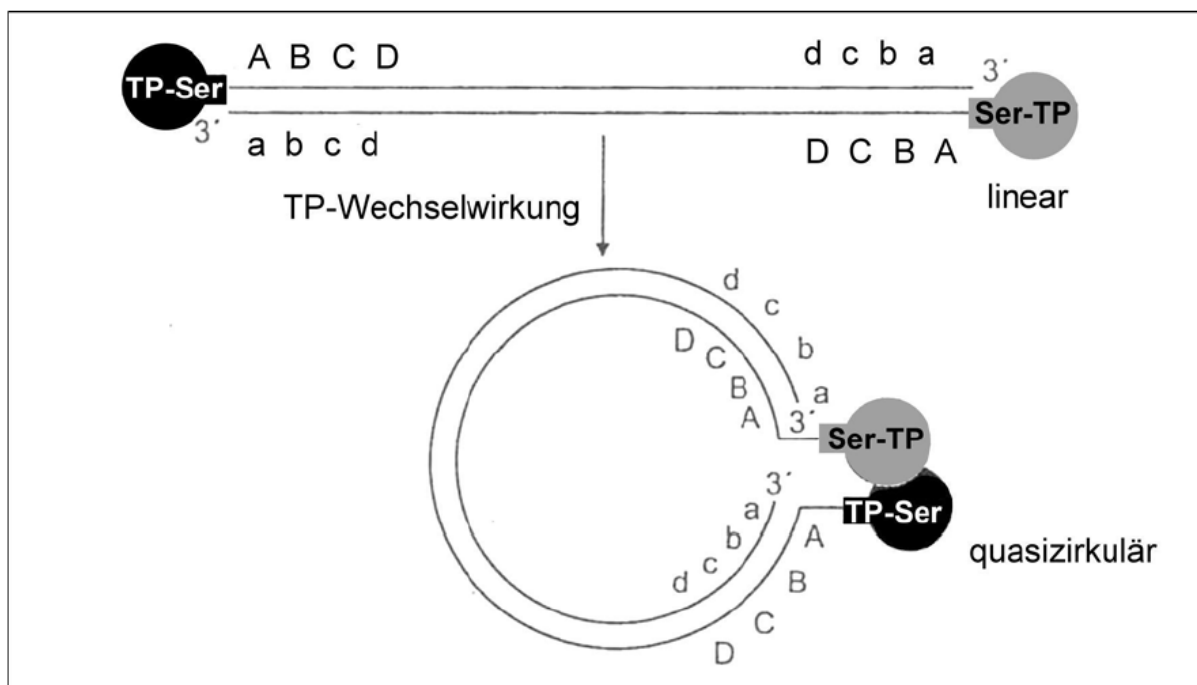


Abbildung 5: Genomaufbau der Adenoviren (nach Modrow S, Falke D (1997)).

Doppelsträngige, lineare DNA mit endständigen terminalen Proteinen, die kovalent an einen Serinrest gebunden sind; die Proteine halten das Genom in einem quasi-zirkulären Zustand.

1.6.3. Der adenovirale Lebenszyklus

Adenoviren benötigen 32 bis 36 Stunden für ihren Lebenszyklus. Bei der Bindung des Virus an die Zielzelle spielt die Wechselwirkung der viralen Fiberproteine mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle. Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix können nicht nur Chemokine und Wachstumsfaktoren speichern, sondern auch Viruspartikel, wie im Falle der Adenoviren. Jede der 12 Ecken des adenoviralen Virions besteht aus Pentonen, an denen wie bereits oben erwähnt 12 antennenähnliche Fiber-Proteine nicht-kovalent verknüpft inserieren und so gemeinsam das typenspezifische Antigen repräsentieren. Die adenoviralen Pentonbasen spielen eine essentielle Rolle bei der Infektion von Wirtszellen, da diese unentbehrlich für die Bindung und Internalisation sind. Partner im Falle der Pentonbasen sind drei Ubiquitin-Protein-Ligasen, die beim Proteinumsatz, Zellzyklus und der Endozytose beteiligt sind (Chroboczek, Gout et al. 2003). Der Schlüssel zur Plasmamembran besteht im Andocken des Virus an einen selektiven Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle (Meier and Greber 2004). Dabei können Adenoviren Zellen sowohl lytisch als auch latent infizieren. Während der lytische Infektionszyklus den Tod der Zelle bedeutet, kann das Virus im latenten Zustand in der Zelle persistieren, ohne eine Immunantwort zu erzeugen. Der Replikationszyklus der Adenoviren kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. Zur frühen Phase werden alle Prozesse gerechnet, die vor der DNA-Replikation (6-8 Stunden nach der Infektion) stattfinden, i.e. rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle, aktiver Transport der viralen DNA in den Zellkern und Expression der frühen viralen Genprodukte. Dagegen ist die späte Phase durch alle weiteren Vorgänge gekennzeichnet und beginnt daher per definitionem mit dem Einsetzen der viralen DNA-Synthese und endet mit dem Zelltod und der Freisetzung neuer Viruspartikel.

1.6.4. Die adenovirale Endozytose

Für die Internalisation in Wirtszellen ist eine rezeptorvermittelte Endozytose verantwortlich (Meier and Greber 2004). Dieser Rezeptor, der sowohl als Coxsackie B- als auch als Adenovirus-Rezeptor dient, wurde als ein 46 kDa Transmembranprotein identifiziert, das innerhalb der Tight junctions lokalisiert ist (Cohen, Shieh et al. 2001). Der vollständig entwickelte Coxsackie-Adenovirus-

Rezeptor (CAR) ist ein Typ-1-Transmembranprotein bestehend aus 346 Aminosäuren (Meier and Greber 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass Endothelzellen in der Lage sind, die Zusammensetzung und die Anzahl ihrer Oberflächenrezeptoren als Antwort auf inflammatorische Zytokine zu verändern. So dürfte die Expression des CAR während einer Entzündungsreaktion erhöht werden (Vincent, Pettersson et al. 2004). Die genaue zelluläre Funktion des CAR ist bisher jedoch noch ungeklärt. In menschlichen Geweben wurde eine hohe CAR-mRNA-Expression in Herz, Hoden, Prostata (Okegawa, Li et al. 2000) und Pankreas (Pearson, Koch et al. 1999) gefunden, während die mRNA-Expression in anderen Geweben wie Lunge, Muskel und Ovar relativ niedrig war (Bergelson, Cunningham et al. 1997). Eine ebenfalls geringe ohne gar keine Expression von CAR hat sich in B- und T-Lymphozyten gezeigt (Meier and Greber 2004). Im Bezug auf die Interaktion zwischen Adenoviren und CAR hat sich gezeigt, dass sowohl die transmembranöse als auch die zytoplasmatische Domäne von CAR, der zur Familie der Immunglobuline gezählt wird, nicht für die Anlagerung des Virus oder die Infektion verantwortlich sind (Wang, Guan et al. 2000). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Signale, die mittels dieses Rezeptors auf die Zelle übertragen werden, auf den Eintritt des Virus in die Zelle keinen Einfluss haben (Wang and Bergelson 1999). Demnach erfordert eine effiziente Internalisation von Adenovirus in Zellen eine weitere Interaktion mit einem separaten Rezeptor (Nemerow and Stewart 1999). Dadurch werden die Viruspartikel internalisiert und anschließend über Translokations-Systeme zum Zellkern geschleust (Leopold, Kreitzer et al. 2000). Adenoviren enthalten einen heterodimeren Proteinkomplex bestehend aus 186 kDa Faserproteinen, die für die erste Bindung an Zellen verantwortlich sind, und eine 400 kDa Penton-Basis, die 5 Arg-Gly-Asp -Sequenzen enthält und eine große Rolle bei der Interaktion mit den zellulären Integrinen $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ der adenoviralen Infektion spielen (Nemerow and Stewart 1999).

Die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen haben gezeigt, dass die Penetration von Adenoviren durch die Plasmamembran mittels rezeptorvermittelter Endozytose (Clathrin „coated pits“) einhergeht. Anschließend wird der Viruspartikel über diese Clathrin-bedeckten Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt. Die Freisetzung der Viruspartikel in das Zytoplasma einer Wirtszelle ist einer der entscheidendsten Schritte bei der Infektion, jedoch auch einer der am wenigsten genau verstandenen. Es konnte gezeigt werden, dass die

zytoplasmatische Freisetzung von Ad2 und Ad5 sehr rasch nach deren Endozytose stattfindet und durch lysosomotropische Substanzen verhindert werden kann (Greber, Willetts et al. 1993). Für die Zerstörung der endosomalen Membranen ist *in vitro* ein saurer pH erforderlich (Blumenthal, Seth et al. 1986), der wahrscheinlich zu Konformationsveränderungen von Oberflächenproteinen des Virions führt, obwohl mehrere Studien darüber berichten, dass ein niedriger endosomaler pH in Kombination mit der Anwesenheit von Ad-Partikeln nicht ausreichend für die Freisetzung der Virus-Partikel ist (Perez and Carrasco 1994). Daher müssen bei diesem Vorgang weitere Faktoren eine Rolle spielen, zu denen auch das $\alpha\beta 5$ -Integrin zählen soll (Wang, Guan et al. 2000). Nach Aufbrechen des Capsids (partielles *Uncoating*) und Freisetzung des Partikels ins Zytoplasma wandert die virale DNA anschließend als Nukleoproteinkomplex unter Beteiligung von zellulären Mikrotubuli zur Kernmembran. Da bereits zwei Stunden nach der Infektion Viruspartikel innerhalb des Zellkerns identifiziert werden konnten, wird angenommen, dass das Aufbrechen des Capsids auch erst nach dem Eintritt in den Zellkern stattfinden kann (Varga, Weibull et al. 1991). Der gesamte Prozess des *Uncoatings* ist stark energie- und temperaturabhängig. Unterhalb von 15°C wird nur eine geringe Menge an Virus-Partikeln in das Zytoplasma freigesetzt, wogegen bei einer Temperatur über 20°C eine stetige Steigerung bis zu einem Maximum bei 34°C aufgezeigt werden konnte. Die Aktivierungsenergie beträgt demnach bei einer Temperatur über 16°C 88 kJ/mol, darunter 331 kJ/mol (Svensson and Persson 1984).

1.6.5. Frühe Genprodukte

Im Zellkern werden zunächst die frühen (*early*-) Bereiche des Virusgenoms (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1) von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II der Wirtszelle transkribiert (Boulanger and Blair 1991). Die Genprodukte dieser *early proteins* haben allgemein regulatorische Funktionen bei viraler (und zellulärer) Genexpression und der Replikation von Virus-DNA. Das Hauptprodukt der E1A 13 S-mRNA wirkt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene (E1B, E2A, E2B, E3 und E4), leitet eine Expressionskaskade dieser frühen Gene ein und kann auch zelluläre Gene anschalten (z.B. das *c-myc*-, *c-fos*- und *hsp70*-Gen). Die E2A- und E2B-Regionen kodieren für Proteine, die für die DNA-Replikation unentbehrlich sind. Das E1A-Genprodukt ist ein DNA-bindendes Protein (DBP), das

auch in einer bislang unbekanntenen Art und Weise bei der Kontrolle der Transkription beteiligt zu sein scheint, wogegen das E2B-Genprodukt die viruseigene Polymerase darstellt. Die virale mRNA wird anschließend im Kern und/oder beim Transport durch die Kernmembran prozessiert und schließlich nach alternativem Spleißen an Polysomen im Zytoplasma in virusspezifische Polypeptide translatiert. Die E3-Region codiert für Proteine die dem Virus helfen, dem Abwehrmechanismus des Immunsystems zu entkommen. Die Lyse von Adenovirus-infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten wird durch das E3-Genprodukt (19 kDa) blockiert. Dies ist die Folge einer intrazellulären Komplexbildung, die im endoplasmatischen Retikulum zwischen dem E3-Protein (19 kDa) und den MHC-Klasse-I-Histokompatibilitäts-Antigen stattfindet, wodurch der Transport von Klasse-I-Antigenen an die Zelloberfläche gestört wird. MHC-Klasse-I-Moleküle sind bei der Präsentation von Antigenen nötig, um die zytotoxischen T-Lymphozyten zu aktivieren. Zusätzlich spielen die E3-Proteine (14,7 kDa; 10,4 kDa) eine wichtige Rolle als Antagonisten der E1A-vermittelten Zunahme der Empfindlichkeit von infizierten Zellen gegenüber der durch den Tumornekrosefaktor (TNF) vermittelten Lyse (Shenk and Williams 1984). Die E4-Region (34 kDa), die für mindestens sieben Polypeptide codiert, reguliert zusammen mit dem E1B-Protein (55 kDa) die Synthese der viralen Proteine und hemmt gleichzeitig die Proteinsynthese der Wirtszelle.

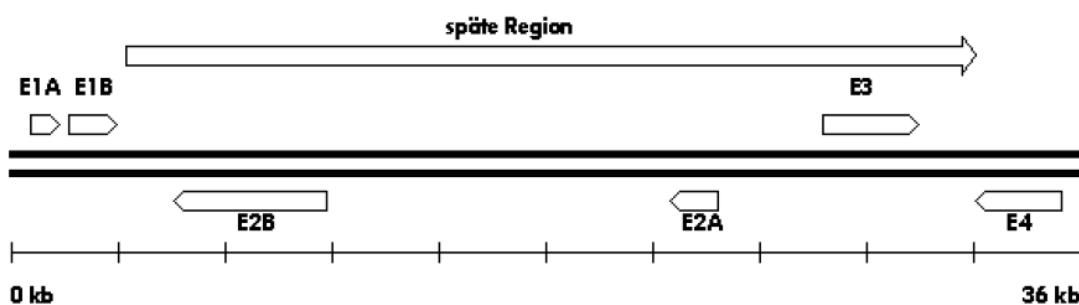


Abbildung 6: Genomkarte von Adenovirus Typ 5 (modifiziert nach Robbins (Nishida, Kang et al. 1998), (Robbins and Ghivizzani 1998).

Dargestellt sind die frühen Regionen (E) und die späte Region. Die doppelte fettgezeichnete Linie stellt die doppelsträngige Ad5-DNA dar.

1.6.6. Die adenovirale DNA-Replikation

Der Vorgang der adenoviralen DNA-Replikation, der erst nach Expression der frühen Gengruppen stattfinden kann und besonders von Proteinen reguliert wird, die in der E2-Region lokalisiert sind, ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gut untersucht. Etwa sechs bis acht Stunden nach Infektion der Wirtszelle beginnt die Replikation des Genoms und endet nach 24 Stunden. An jedem Ende der linearen, doppelsträngigen DNA befinden sich invertierte Nukleinsäureiterationen (ITRs) von 100-165 bp Länge (Wolfson and Dressler 1972), an dessen 5'-Enden terminale Proteine (TP 80 kDa) kovalent gebunden sind. Diese entstammen der E2-Region und dienen als Primer zur Initiation der DNA-Synthese (Kelly 1975; Stillman and Bellett 1979; Rawlins, Rosenfeld et al. 1984). Die DNA wird semikonservativ, i.e. ohne der Bildung von Okazaki-Fragmenten, synthetisiert (MODROW und FALKE, 1997) und beginnt mit der Veresterung eines dCMP-Moleküls (Cytosin) mit der OH-Gruppe eines Serin-Rests im terminalen Proteinvorläufer (pTP, 80 kDa) (Challberg, Desiderio et al. 1980; Lichy, Horwitz et al. 1981). Die Tp-Komponenten (55 kDa), die kovalent an den 5'-Enden des Genoms gebunden sind, interagieren mit dem entstandenen dCMP-pTP-Komplex, der eine hohe Affinität zur viralen DNA-Polymerase aufweist. Für die Initiation der DNA-Synthese dienen nicht nur die zellulären Kernfaktoren (NF-I, NF-II) und die DNA-Topoisomerase (Temperley and Hay 1992), sondern auch der resultierende Komplex, der über die 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose des dCMP als Primer wirkt (Challberg, Ostrove et al. 1982). Die DNA-Synthese erfolgt mittels der E2-kodierenden DNA-Polymerase kontinuierlich in 5'-3'-Richtung, wobei ein Elternstrang, der am 5'-Ende kovalent das 55 kDa TP gebunden hat, aus dem Doppelstrang verdrängt wird. Dieser wird mit E2A-Proteinen komplexiert, um so zu verhindern, dass die einzelsträngige DNA von zellulären Nukleasen abgebaut wird (Lindenbaum, Field et al. 1986). Da am anderen Elternstrang die komplementären Nukleotide bis zum Genomende angelagert werden, liegen nach dem ersten Synthesedurchlauf ein DNA-Doppelstrang und ein DNA-Einzelstrang vor, der mit E2A-Proteinen komplexiert ist. Diese semikonservative Replikation kann sich im weiteren Verlauf an dem neu gebildeten DNA-Doppelstrang wiederholen, während die Enden des DNA-Einzelstrangs mit ihren komplementären, invertierten Basenfolgen eine „Pfannenstielstruktur“ ausbilden. Anschließend hybridisieren die invertierten terminalen Wiederholungssequenzen miteinander, bilden einen Doppelstrang und lösen somit die Anlagerung weiterer Initiationskomplexe

bestehend aus dCMP-pTP/adenoviraler DNA-Polymerase/NF-I/NF-II aus (Temperley and Hay 1992). Die „Pfannenstielstruktur“ löst sich im weiteren Verlauf auf und die an den Einzelstrang komplexierten Proteine lösen sich, sodass der Einzelstrang folglich als Matrize für die kontinuierliche Synthese des DNA-Doppelstranges dienen kann. Erst nach Beendigung der Replikation durch die proteolytische Prozessierung des gebundenen TP-80kDa-Proteins kann das terminale Vorläuferprotein in das TP-55kDa-Protein, das mit dem adenoviralen Genom komplexiert ist, gespalten werden (Rekosh, Russell et al. 1977).

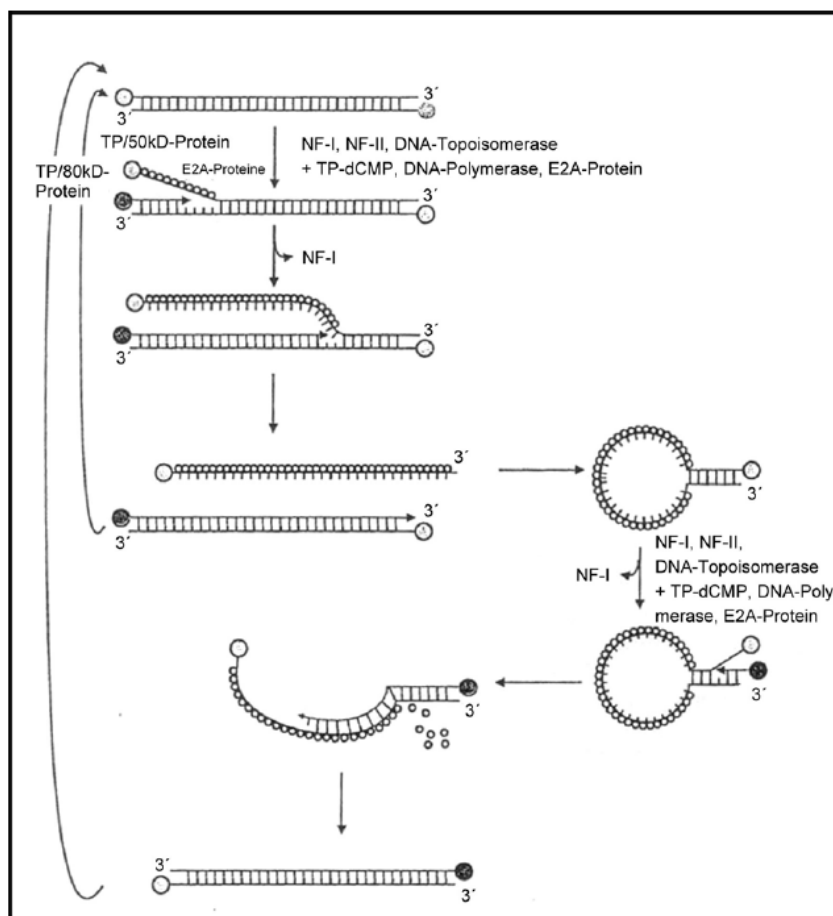


Abbildung 7: Verlängerung und Bildung der Doppelstränge (nach Modrow S, Falke D (1997)). Für die Initiation der DNA-Synthese sind zelluläre Faktoren (NF-I, NF-II, DNA-Topoisomerase) und virale Faktoren (TP-dCMP, DNA-Polymerase, E2A-Protein) notwendig.

1.6.7. Späte Genprodukte

Mit der DNA-Replikation setzt auch die „späte Phase“ des produktiven Infektionszyklus ein, in der die „späten“ Gene exprimiert werden, die in den Regionen L1 bis L5 kodiert werden. Diese (*late*-) Gene dienen vor allem für die Bildung von Strukturproteinen des ikosaedrischen Virions und sind damit essentiell für den Zusammenbau des Cores und des Capsids. Die neu synthetisierten DNA-Moleküle dienen als Genome für die Virusnachkommen und als zusätzliche Matrizen für die Synthese von späten mRNAs, die zum größten Teil vom sogenannten *major late*-Promotor (MLP) aus initiiert werden, der etwa acht Stunden nach Infektion der Wirtszelle aktiviert wird. Die Proteinkomplexe E1B-55kDa und E4-34kDa initiieren den Export der viralen mRNA-Spezies für die viralen Strukturproteine ins Zytoplasma und stören somit die zelluläre Proteinsynthese (Wilson 1996; Xu, Ying et al. 1997).

1.6.8. Morphogenese

Mit Hilfe von sowohl viralen als auch zellulären Proteinfaltungs-Katalysatoren werden aus den Hexon-, Penton- und Fiberproteinen die Capsomere gebildet. Proteine der L4-Region und damit der späten Phase sind für die Synthese und Reifung der Virionen verantwortlich. Dabei ist ein Protein mit proteolytischer Aktivität (33 kDa) von besonderer Bedeutung, da es die späten Polypeptide und das terminale Protein (TP-80 kDa) prozessiert (Rekosh, Russell et al. 1977). Die vielen neu synthetisierten Virus-Partikel können zu kristallartigen Strukturen in bestimmten Bereichen des Kerns infizierter Zellen führen. Damit insgesamt etwa 10⁴ bis 10⁵ Viren pro Wirtszelle neu gebildet werden können, müssen einige zelluläre Prozesse blockiert bzw. verhindert werden. Dies geschieht durch virale Faktoren (E1B und E4), die zum einen die Synthese zellulärer Proteine durch die Repression des RNA-Transports vom Zellkern ins Zytoplasma und auch deren Translation blockieren, und zum anderen verhindern, dass zelluläre Faktoren die Virusproduktion unterdrücken. Diese Prozesse führen die Wirtszelle infolgedessen bereits zu Beginn der Expression der frühen adenoviralen Genprodukte in den Zustand einer kritischen Unterversorgung. Der produktive Zyklus führt somit innerhalb von 30 bis 40 Stunden zur Lyse der Wirtszelle, weshalb die meisten Viren daher passiv freigesetzt werden und

anschließend neue Zellen infizieren können (Babiss, Ginsberg et al. 1985; Pilder, Moore et al. 1986; Bridge and Ketner 1990).

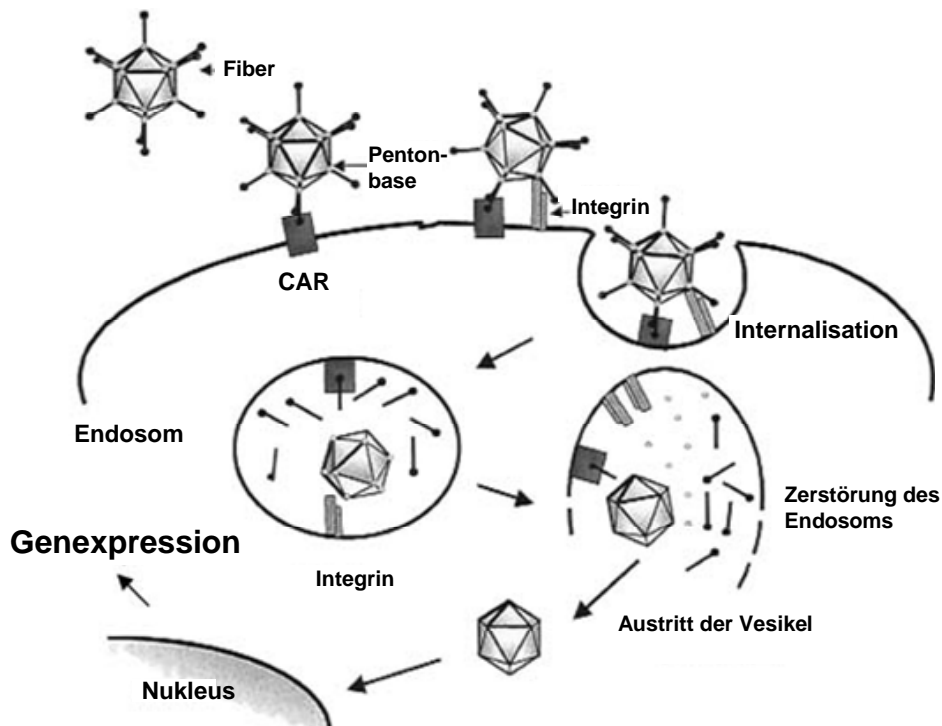


Abbildung 8: Lytischer Vermehrungszyklus der Adenoviren

(modifiziert nach Robbins (Nishida, Kang et al. 1998), (Robbins and Ghivizzani 1998).

1.7. Der Coxsackie-Adenovirusrezeptor – Aufbau und Struktur

Bereits vor über 20 Jahren konnte man feststellen, dass Ad2 mit dem strukturell und genetisch verschiedenen Coxsackievirus B3 um denselben Oberflächenrezeptor konkurriert (Lonberg-Holm, Crowell et al. 1976; Tomko, Xu et al. 1997) und wurde somit als Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet (Henry, Xia et al. 1994; Xia, Henry et al. 1994; Nemerow and Stewart 1999). Die Fiber-Proteine der Adenoviren regulieren die Bindung des Virus an die Wirtszelle über diesen 46 kDa - Zellrezeptor, dessen Gene auf dem distalen Abschnitt von Chromosom 16 lokalisiert sind (Chen, Ghosh et al. 2003). CAR dient fast allen Serotypen der Adenoviren als Rezeptor, außer derer, die unter der Serogruppe B zusammengefasst werden. In menschlichen Geweben wurde eine hohe CAR-mRNA-Expression in Herz, Hoden, Prostata und Pankreas gefunden, während in anderen Geweben wie Lunge, Muskel und Ovar die mRNA-Expression von CAR deutlich niedriger war (Bergelson,

Cunningham et al. 1997; Tomko, Johansson et al. 2000). In tumorartig verändertem Gewebe konnte zudem im Vergleich zu gesundem Gewebe eine unterschiedliche CAR-Expressionsrate nachgewiesen werden. So stellten sich z.B. zervikale Tumoren (Bergelson, Cunningham et al. 1997) und Glioma (Kim, Sumerel et al. 2003) als Tumoren mit hohem CAR-Anteil heraus, wohingegen Prostatatumoren nur eine mäßige und Brusttumoren, Rhabdomyosarkome, Pharynxtumore und Ovarialtumoren nur eine kaum noch detektierbare CAR-Expressionsrate zeigen (Blackwell, Miller et al. 1999; Okegawa, Li et al. 2000; Hemminki and Alvarez 2002). Trotzdem scheinen Tumorzellen zu einer down-Regulation von CAR zu führen, was sich in einer refraktären Ad-Infektion widerspiegelt (Nakayama, Both et al. 2006). Bisher konnte die genaue zelluläre Funktion von CAR, einem Mitglied der Immunglobulin-Familie, jedoch nicht vollständig geklärt werden. Dennoch lässt die nicht polymorphe Protein-Struktur des Glykoproteins (Howitt, Bewley et al. 2003) (Howitt, Anderson et al. 2003) darauf schließen, dass CAR nicht nur als Rezeptor für Adeno- und Coxsackieviren dient, sondern auch andere physiologische Funktionen wie z.B. die eines Zell-Adhäsionsmoleküls ebenso hat (Li, Pong et al. 1999). Anfänglich konnten bei Maus (Bergelson, Krithivas et al. 1998), später auch bei Mensch und Ratte (Fechner, Noutsias et al. 2003), zwei CAR-Isoformen (CAR1/CAR2) isoliert werden, die sich nur im C-terminalen Ende unterscheiden, wobei CAR2 (mCAR2) gegenüber CAR1 (mCAR1) um 13 AS kürzer ist und 13 AS ausgetauscht sind (insgesamt 26 AS verändert), eine Änderung, die nicht essentiell für die Ad-Rezeptorfunktion ist (Cohen, Gaetz et al. 2001). CAR dominiert vor allem an der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen innerhalb ihrer tight junctions (Howitt, Bewley et al. 2003). Eine 22 AS lange alpha-helikale Transmembrandomäne, der ein intrazellulärer Bereich mit Signalsequenzen folgt, verankert CAR in der Zellmembran. Die extrazelluläre Region des insgesamt 365 AS großen Transmembranproteins besteht aus zwei aminoterminalen immunglobulin-ähnlichen Domänen, die als CAR-D1 und CAR-D2 bezeichnet werden (Jiang and Caffrey 2005). Domäne 1 ist dabei mit IgV verwandt, Domäne 2 mit IgC2 (Williams and Barclay 1988). Für die hohe Bindungsaffinität der adenoviralen Fiber-Proteine an CAR ist besonders die N-terminale CAR-D1-Region verantwortlich (Excoffon, Traver et al. 2005; Liao, Sordet et al. 2005).

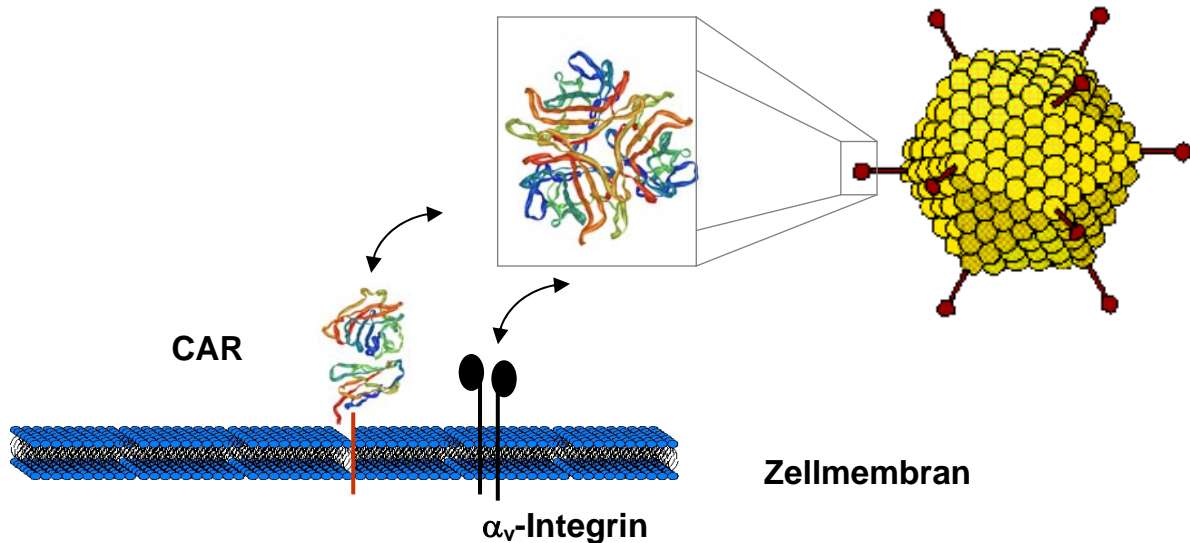


Abbildung 9: Interaktion zwischen den adenoviralen Fiber-Proteinen und CAR.

Inwieweit Adenoviren für eine positive Infektion von humanen Zellen den Coxsackie Adenovirus-Rezeptor benötigen (CAR) ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Da aber bekannt ist, dass gerade tumorartig verändertes Gewebe eine geringere Expression von CAR aufweisen, scheint es sinnvoll, gentherapeutische Methoden zu entwickeln, die eine erfolgreiche und effiziente Ad-Aufnahme in die gewünschten Zielgewebe unabhängig von CAR ermöglichen (Nakayama, Both et al. 2006).

1.8. 5-FU

5-Fluorouracil wurde in den späten fünfziger Jahren als Antimetabolit für die Hemmung der RNA- und DNA-Biosynthese entwickelt. 5-FU und andere Fluoropyrimidine wurden seither in einem breitem Spektrum für die Behandlung von humanen Tumoren eingesetzt (Liao, Sordet et al. 2005). Dabei ist 5-Fluorouracil (5-FU) immer noch eines der am meist beschriebenen anti-kanzerogen Substanzen, mit einer vorwiegenden Wirksamkeit gegen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und der Brust (Rustum 1999). 5-FU ist ein Analogon zu Uracil, das sich aber wegen seiner zusätzlichen Ähnlichkeit zu Vitamin B13 (orotic acid) und Thymin der gleichen Signalwege wie diese natürlichen Substrate bedient.

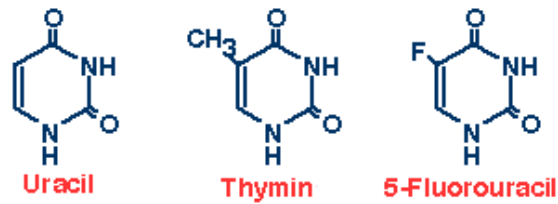


Abbildung 10: Strukturformeln von Uracil, Thymin und 5-FU.

Der Transport in die Zelle erfolgt entweder mit Hilfe eines Nucleobasentransporters, der eine hohe Affinität aufweist, oder mittels passiver Diffusion. Dabei gibt es einen deutlichen Hinweis darauf, dass der dypiridamol-sensitive Nucleosidtransporter ENT2 (Equilibrative nucleoside transporter) ebenso zum Eintritt von 5-FU in die Zelle beiträgt (Podgorska, Kocbuch et al. 2005). Um seine vollständige Aktivität in der Zelle entfalten zu können, muss 5-FU in eines seiner im Folgenden erwähnten Nucleotide umgewandelt werden (Rustum 1999):

- **FUTP**, welches in die RNA aufgenommen werden kann.
- **FdUTP**, welches in die DNA aufgenommen werden kann.
- **FUDP-Zucker**, die in die Glykosylierung von Proteinen und Lipiden eingreifen können.
- **FdUMP**. Dies ist ein Inhibitor der Thymidylat-Synthase (TS), wobei TS ein Schlüsselenzym für die *de novo* Synthese von Pyrimidin Desoxythymidin Triphosphat (dTTP), einem direkten Precursor der DNA-Synthese darstellt.

Jedoch hat sich gezeigt, dass die Umwandlung von 5-FU in 5-Fluoro-2'-desoxy-5'-monophosphat (FdUMP), welches wie bereits erwähnt durch Inhibition der Thymidylatsynthase (TS) letztendlich die DNA-Synthese hemmt, für den Hauptmechanismus der Effekte von 5-FU verantwortlich gemacht wird (Pinedo and Peters 1988). Zusätzlich induziert FdUMP Einfach-Strangbrüche der DNA und zelluläre Topoisomerase-I-DNA-Komplexe (Liao, Sordet et al. 2005). Für die Umwandlung von 5-FU in seine aktiven Metabolite wurde in verschiedenen Studien eine hohe Aktivität der Uridinkinase (UK) und der Uridinphosphorylase (UP) gefordert. Jegliche Beeinträchtigung bei der Umwandlung in eines dieser Nucleotide kann zur Resistenz gegen 5-FU führen (Noordhuis, Holwerda et al. 2004). Die aktiven Signalwege sind daher direkt für den zytotoxischen Effekt von 5-FU

verantwortlich, der sich sowohl in antikanzerogenen als auch in Nebeneffekten zeigt (Mullen, Coale et al. 1994).

2. Fragestellung

Ziel dieser Studie soll sein, die Effekte von 5-FU im Zusammenhang mit einer adenoviralen Infektion zu untersuchen. Insbesondere soll herausgestellt werden, inwieweit 5-FU Auswirkungen bei der Behandlung von Tumorzellen mit Adenoviren unabhängig vom Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) hat und ob die Effektivität der Adenoviren durch gleichzeitige Gabe von 5-FU erhöht wird.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellen und Zelllinien

Alle Zelllinien, die in dieser Studie verwendet worden sind, wurden von der DSMZ erworben (Braunschweig, Deutschland) und in einem geeigneten Medium (Invitrogen-GIBCO), das 10% FCS, 1% Pen/Strep (PS) und 1% Glutamin enthielt, gezüchtet. Die humanen embryonalen Nierenzellen 293 ließen wir in DMEM wachsen, die humanen Kolonadenokarzinomzellen DLD-1, LOVO, SW480 und SW620 in RPMI 1640 und die RKO Zellen auf McCoy.

RKO-Zellen sind charakterisiert durch die Expression von wt-p53. Die Malignität dieser Tumorzelllinie wird unter anderem durch Überexpression des Proto-Onkogens bcl-2 manifest. Isoliert wurden sie 1981 von Brattain et al. aus einem primären humanen Kolonkarzinom und mittels C3H 10T1/2 Mausfibroblasten zu einer permanenten Zelllinie entwickelt und klassifiziert (Brattain, Brattain et al. 1981). Sie weisen die Charakteristika hochaggressiver Zellen auf, eine schnelle Teilungsrate (Verdopplungszeit entspricht etwa 16h), und sind außerdem generell undifferenziert. So konnte in mehr als 75% Thymus-freier Mäuse, welche mit 5×10^6 Zellen beimpft wurden, ein Tumor induziert werden (DSMZ).

SW 480 und SW 620 Zellen: Diese beiden Zelllinien entstammen beide vom selben Patienten. Leibovitz et al. isolierten SW 480 Zellen aus einem primären Adenokarzinom des Kolons eines 50-jährigen weißen Patienten, Blutgruppe A, Rh⁺. SW 620 Zellen wurden hingegen ein Jahr später aus einer Lymphknotenmetastase dieses Patienten isoliert (Leibovitz, Stinson et al. 1976). SW 480 Zellen weisen in Kultur ein endothelartiges, inselartiges Wachstum auf sowie die Charakteristika individueller bipolarer Zellen. Elektronenmikroskopische Studien zeigen die typische polygonale Form der Zellen und häufig Mikrovilli an ihrer luminalen Seite. Als optimales Nährmedium hat sich ein Gemisch aus 90-95% RPMI 1640 + 5-10% FBS herausgestellt, sodass bei einem Splittvorgang einmal pro Woche (1:5 oder 1:10 mit Trypsin/EDTA) eine Verdopplungszeit der Zellen von 25 bis 30 h erzielt werden kann. Beide Zelllinien sind dem Stadium B der Dukes Klassifikation bzw. dem Broders Grade 4 zuzuordnen. SW 620 Zellen wachsen typischerweise weniger inselartig, eher in einer Mischung kleiner individueller sphärischer Zellen sowie bipolar. Sie wirken sowohl durch ihre isodiametrische Form als auch durch das Fehlen von Mikrovilli im Gegensatz zu den SW 480 Zellen vermehrt dedifferenziert. Sie entsprechen der Dukes C Klassifikation sowie ebenfalls dem Broders Grade 4. Im Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Typing werden beide Zelllinien dem Typ B zugeordnet. Sie exprimieren mt-p53 mit der bereits in den HT 29 Zellen beschriebenen Punktmutation, die den Austausch von Arginin 273 gegen Histidin zur Folge hat, wobei SW 480 noch eine zweite Punktmutation an der Aminosäure 309 aufweisen. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen RKO Zellen exprimieren diese Zelllinien kein bcl-2 (Leibovitz, Stinson et al. 1976), (DSMZ).

DLD-1 (mut p53): Bei den DLD-1-Zellen handelt es sich um eine humane Zelllinie, die aus einem kolorektalen Adenokarzinom etabliert wurde und im humanen p53-Gen mutiert ist. Morphologisch sind diese Zellen durch ein epithel-ähnliches, anhaftendes Wachstum als Monolayer charakterisiert. Sie erscheinen daher unter dem Mikroskop als rundliche Zellanhäufungen, die auch in verschiedenen Ebenen wachsen. Das optimale Nährmedium der DLD-1-Zellen stellt ein Puffer aus 90% RPMI 1660 + 10% FBS dar. Die Subkulturen sollten dabei alle zwei bis drei Tage 1:3 bzw. 1:5 mittels Trypsin/EDTA gesplittet werden, da deren Verdopplungszeit bei etwa 48 h liegt (Dexter, Barbosa et al. 1979), (DSMZ).

LoVo (wt p53): Die Zelllinie der LoVo-Zellen stammt ebenfalls aus einem humanen Kolonkarzinom. Dabei wurden die Zellen aus einer Lymphknotenmetastase eines 56-jährigen Kaukasischen Mannes, der an einem kolorektalen Adenokarzinom erkrankt war, gewonnen. Bei diesen Zellen ist beschrieben, dass sie CEA produzieren und keine Mutation im p53-Gen tragen. Morphologisch zeichnen sich die LoVo-Zellen dadurch aus, dass sie festhaftend und epithel-ähnlich in Monolayers wachsen. Dabei erscheinen sie aber unter dem Mikroskop eher spindelförmig. Als Medium etablierte sich ein Gemisch aus 90% RPMI 1640 und 10% FBS, sodass eine Verdopplung der Zellen innerhalb 48 h erreicht werden kann. Dabei sollte etwa zweimal pro Woche 1:3 bzw. 1:5 mittels Trypsin/EDTA gesplittet werden (Drewinko, Romsdahl et al. 1976; Drewinko, Barlogie et al. 1979; Chen, Dorotinsky et al. 1995), (DSMZ).

293-Zellen: humane embryonale Nierenzellen, **HEK** ("*Human Embryonic Kidney*"-Zellen). HEK-293 ist eine seit Ende der 1970er Jahre bestehende humane Zelllinie, die als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (**H**uman **E**mbrionic **K**idney) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen wurde. Spezifisch wurden 4,5 Kilobasen des viralen Genoms in das Erbgut der Nierenzelle eingebaut. HEK-293 sind hypotriploide Epithelzellen, die adhärent wachsen (Shein and Enders 1962; Zur Hausen 1967). Die Morphologie der 293-Zellen zeichnet sich durch ein adhärent fibroblatisches Wachstum als Monolayer aus. Unter geeigneten Bedingungen (85% Dulbecco's MEM + 15% FBS, 1:3 bzw. 1:5 Splitten alle zwei bis drei Tage ohne Trypsin/EDTA) kann eine Wachstumsverdopplung innerhalb von 20 bis 24 h erreicht werden (Graham, Smiley et al. 1977), (DSMZ).

3.1.2. Zellkultur

Sämtliche Zellen wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ in sterilen 75cm² Kulturfalschen von Corning in Kultur gehalten. RKO Zellen wurden in McCoy's 5A Medium mit Glutamax kultiviert. Dem Medium wurden jeweils 10% fetales Kälberserum (FCS) und 10⁵ U/ml Penicillin/Streptomycin zugefügt. Für Experimente wurden nur Zellen in den ersten einhundert Passagen verwendet.

SW 480 und SW 620 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium aufgenommen. Auch diesem Medium wurden 10% FCS, 10^5 U/ml Penicillin/Streptomycin und 2mmol L-Glutamin zugegeben. Beide Medien wurden über GIBCO-BRL bezogen.

3.1.3. Antikörper

3.1.3.1. Bax

Die Expression von bax wurde mit Hilfe des Western Blot Verfahrens nachgewiesen. Dazu wurde ein polyklonaler Rabbit Anti-Human Antikörper von Pharmingen (Katalognummer: 554106) verwendet, als entsprechenden Sekundärantikörper ein Goat Anti-Rabbit-IgG.

3.1.3.2. CAR

Zum Nachweis von CAR in einem Western-Blot-Verfahren diente ein Goat-Polyklonaler Antikörper von Santa Cruz (Katalognummer: sc-10313) mit dem dazugehörigen Sekundärantikörper: HRP-konjugiertes IgG von Donkey Anti-Goat.

3.1.3.3. Bcl-2

Die Expression von bcl-2 wurde zunächst in einer immunhistochemischen Untersuchung mittels des Rabbit Anti-Human-bcl-2 Polyclonal Antibody von BD Pharmingen (Catalog Number: 554160) nachgewiesen. Dafür diente der Goat Anti-Rabbit Igs Polyclonal Antibody, biotinyliert von BD Pharmingen (Catalog Number: 550338) als Sekundärantikörper.

Des weiteren wurde bcl-2 in einem Western-Blot-Verfahren detektiert, für das der bcl-2 MAb Purified Hamster Anti-Human der Firma BD Pharmingen (Catalog Number: 551051) verwendet wurde. Als entsprechenden Sekundärantikörper wurde der Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierte Mouse Anti-Armenian and Syrian Hamster IgG (Cocktail) Monoklonal Antibody der Firma BD Pharmingen (Catalog Number: 554012) eingesetzt.

3.1.3.4. E4orf3

Der E4orf3-Antikörper, der im Western-Blot-Verfahren des Mausmodells verwendet wurde, wurde eigens aus Hybridomzellen einer Ratte hergestellt (Prof. Dr. Dobner) und mittels des Sekundärantikörpers Goat Anti-Rat IgG-HRP von Santa Cruz (Catalog Number: sc-2006) detektiert.

3.1.3.5. Hexon

Die Expression von Hexon wurde in einer immunhistochemischen Untersuchung nachgewiesen. Dazu diente der Goat Polyclonal Antibody to Adenovirus von ACRIS (Catalog Number: BP100) als Primärantikörper und der biotinylierte Rabbit Anti-Goat IgG, IgM, IgA (H&L) von Open Biosystems (Catalog Number: SAB1072) als Sekundärantikörper.

3.1.3.6. Aktin

Für alle Western-Blot-Analysen wurde Aktin als Ladungskontrolle verwendet. Zum einen ein Goat polyklonaler Antikörper von Santa Cruz mit einem HRP-konjugierten IgG von Donkey Anti-Goat als Sekundärantikörper. Zum anderen wurde Aktin (I-19) von Santa Cruz (Catalog Number: sc-1616) verwendet. Für diesen Primärantikörper diente der Donkey Anti-Goat IgG-HRP von Santa Cruz (Catalog Number: sc-2020).

3.1.4. PCR-Primer

3.1.4.1. β -Aktin (Genbanknummer: X00351.1)

Forward-Primer: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGCGTGAC-3'

Reverse-Primer: 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

3.1.4.2. Bcl-2 (Genbanknummer: AAA51813)

Forward-Primer: 5'-GTGAACTGGGGGAGGATTGT-3'

Reverse-Primer: 5'-GCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'

3.1.4.3. E4-Box (Genbanknummer: D63791)

Forward-Primer: 5'GCAGCGGCGCATGAAGGAGT-3'

Reverse-Primer: 5'-AGTGCGCCGAGACAACCGAGAT-3'

3.1.5. 5-FU

Genauere Beschreibung siehe oben.

3.1.6. DSS (Dextran Sulphate Sodium)

Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind die beiden wichtigsten chronischen Erkrankungen, die den Gastrointestinaltrakt des Menschen befallen. Patienten dieser entzündlichen Erkrankungen zeigen Phasen der Remission und Rezidivs mit Symptomen wie blutiger Diarrhoe, abdominellen Schmerzen und rektalen Blutungen. Dabei bleibt die genaue Ätiologie bisher noch weitgehend unklar. Die Pathogenese scheint dagegen abhängig von Interaktionen zwischen lokalen Immunreaktionen und bestimmten Umweltfaktoren in genetisch determinierten Individuen zu sein (Podolsky 2002). Um die Pathologie der chronischen Darmerkrankungen besser verstehen zu können, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Tiermodelle entwickelt, allerdings existiert bisher kein spezifisches Modell für jede einzelne Erkrankung (Boismenu and Chen 2000). Eine Entzündung des Darms kann zum einen durch den Einsatz chemischer Substanzen wie Dextran Sulphate Sodium (DSS) und zum anderen durch Gentransfer spezifischer regulatorischer Zytokine künstlich induziert werden. Nach der oralen Inkubation von Versuchsmäusen mit DSS hat sich gezeigt, dass es infolge dessen zu einer Überwucherung der Darmflora mit fakultativen gram-negativen Bakterien kommt. Diese scheint am ehesten auf das übermäßige Wachstum von bakteriellen Spezies zu beruhen, die zur Familie der Enterobacteriaceae, besonders *Escherichia coli*, gehören. Die Folgen davon zeigen sich im wesentlichen in den histologischen Veränderungen der intestinalen Mukosa, zu denen die Abstumpfung der Villi des Ileus und der Krypten des Kolons mit milder epithelialer Zeldysplasie gehören (Wells and Rhame 1990; Kitajima, Takuma et al. 1999). Auf zellulärer Ebene konnte herausgestellt werden, dass DSS neben seiner direkten Zytotoxizität auch Einfluss auf die normale Interaktion zwischen intestinalen Lymphozyten, Epithelzellen und der extrazellulären Matrix nimmt (Kim, Seo et al.

2006). Zudem hat sich gezeigt, dass es infolge einer DSS-Gabe neben einer abweichenden Modulation von integrin-beta-7-Rezeptoren, sowie anderen Rezeptoren und deren Funktionen auch zu Veränderungen von bestimmten Adhäsionsmembranproteinen, wie z.B. dem Leukozyten-beta-2-Integrin kommt (Ni, Chen et al. 1996; Abdelbaqi, Chidlow et al. 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse verwendeten wir für unser Mausmodell DSS, um eine künstliche Kolitis zu erzeugen.

3.1.7. Doxycyclin-induzierbarer Promoter

Ein viel erprobtes binäres System zur induzierbaren Genexpression in genetisch veränderten Mäusen ist das TetOn/Off-System (Gossen and Bujard 1992). Vor allem in Eukaryoten hat dieses bakterielle Tet-System weit verbreitete Verwendung bei der Regulation der Genexpression gefunden (Geissendorfer and Hillen 1990; Wissmann, Wray et al. 1991). Seine Vorteile sind ein universell zellgängiger Induktor wie Doxycyclin sowie ein Regulatorprotein, der Tet-Repressor, der seine Liganden mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Das Tet-System besteht also aus zwei Hauptkomponenten: Dem vom Liganden DOX abhängigen und somit exogen und reversibel induzierbaren Effektor tTA sowie dem über die TRE-CMV-Minimalpromotorkassette gesteuerten Transgen als Responder (Knott, Garke et al. 2002). Das Tet-System wurde in Eukaryoten erstmals für die exogene Genregulation in Pflanzen angewendet (Gatz and Quail 1988), wobei die so genannte TATA-Box eines Promotors mit drei *tet*-Operatoren flankiert wurde, sodass seine Transkription durch einen konstitutiv exprimierten TetR reprimiert war und durch Doxycyclin induzierbar gemacht werden konnte. Da bei Säugern die erzielte Repression oft unvollständig ist, wurden die heute am häufigsten verwendeten Regulatorsysteme so entwickelt, dass TetR als Doxycyclin-induzierbare, spezifische DNA-Bindeeinheit fungiert (Kim, Gatz et al. 1995), die mit eukaryontischen Regulator-domänen fusioniert wird. Zusammenfassend kann man sagen, dass das TetOff-System (tTA) die Expression in Abwesenheit seines Liganden Doxycyclin (DOX) aktiviert. Bei Zugabe von DOX erlischt die Transkription des Reportergens. Im Gegensatz hierzu führt die Zugabe von DOX im TetOn-System (rtTA) zu einer transkriptionellen Induktion des Reportergens.

3.1.8. Mäuse

Bei den in unserem Versuch verwendeten Mäusen handelt es sich um männliche BALB C Mäuse. Diese wurden in zwei verschiedenen Käfigen gehalten und nach folgendem Schema behandelt:

KÄFIG 1: OHNE DSS		
Tier-Nr.:	Injektion	DOXI-Gabe
1	—	—
2	5-FU	—
4	Co-Inf.	+
6	Co-Inf. + 5-FU	+

KÄFIG 2: MIT DSS			
Tier-Nr.:	Injektion	DOXI-Gabe	DSS-Gabe
1	—	—	+
2	5-FU	—	+
4	Co-Inf.	+	+
5	Co-Inf. + 5-FU	+	+
6	Co-Inf. + 5-FU	+	+

Je nach Versuchstier erfolgte die Injektion von 300µl des Ansatzes bestehend aus 5-FU und bcl-2 + r-TA in die Vena cava inferior. Nach 48h wurde den entsprechenden Tieren Doxycyclin in die Schwanzvene gespritzt und nach weiteren 48h erfolgte für die Tiere in Käfig 2 die Gabe von DSS über das Trinkwasser für weitere 7 Tage. Zur besseren Darstellung unseres Tiermodells dient das folgende Schema:

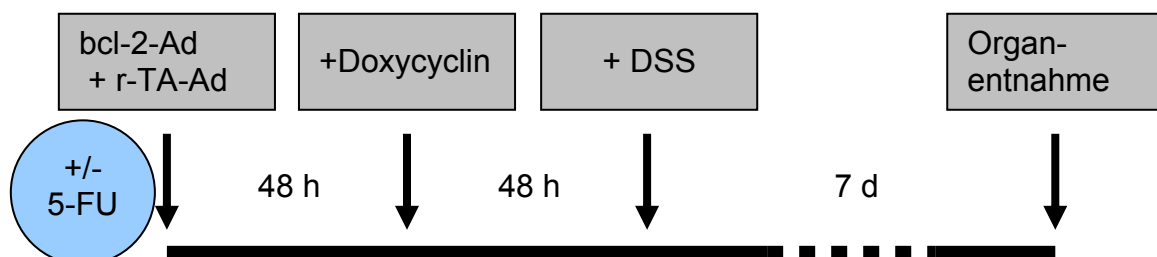


Abbildung 11: Schematische Darstellung des *in vivo*-Versuchs: Zeitlicher Ablauf.

3.2. Methoden

3.2.1. Adenovirale Techniken

Zum Transfer des pro-apoptischen Genes *bax* unter der Kontrolle des CEA Promotors bzw. des anti-apoptischen Genes *bcl-2* unter der Kontrolle des TetOn-Promotors haben wir rekombinante Adenoviren (rAds) nach der von Vogelstein und Mitarbeitern (He, Zhou et al. 1998) entwickelten Methode hergestellt. Im Unterschied zu dem klassischen Verfahren der Transfektion bzw. Infektion geeigneter Plasmide und Wildtyp-Virus in 293-Zellen erfolgt die Herstellung dieser rAds durch homologe Rekombination nach Transformation zweier Transfer-Plasmide in *E. coli*. Die Anzucht der rAds erfolgt nach Transfektion der aus *E. coli* gewonnenen rekombinanten viralen DNA in 293-Zellen, welche die viralen Proteine der E1-Region exprimieren.

Das humane *bcl-2* Gen wurde über die Schnittstellen Kpn I und Not I in ein pTRE-2-Plasmid kloniert. Der TetOn-Promotor wurde von Clontech bezogen und mit Hilfe der Restriktionsnukleasen Kpn I und Xho I vor das *bcl-2*-Gen in den pTRE-2-Plasmid kloniert. Im Anschluss wurde das gesamte TetOn-Promotor-*bcl-2* Fragment in einen pAdTrack Vektor unter Verwendung von Not I and Xho I integriert. Dieser Shuttle-Vektor wurde mit PmeI linearisiert, mittels Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt und mit dem pAdEasy-1 gemischt. Die Transfektion erfolgte in BJ5183 Zellen mittels Elektroporation (2,500 V, 200 Ohm, 25 mF) in einem BioRad Gen-Pulser Elektroporator. Die Zellen wurden anschließend in 500ml L-Brot ausgesät und für 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Petrischalen, l-agar plus 50 mg/ml Kanamycin auspipettiert. 10-20 Kolonien wurden nach 20h Kulturzeit bei 37°C gewonnen. Die Klone wurden gescreent und durch Spaltung mit Endonukleasen PacI, SpeI and BamHI mit pAdEasy-1 verglichen. Bei korrekter Größe und richtigen Spaltpattern wurde die Plasmid-DNA in supergecoiltem Zustand in DH10B Zellen für die Amplifikation transferiert. 293 Zellen (Konfluenz 50%) wurden mit OptiMEM gewaschen. Die mit PacI gespaltene rekombinante adenovirale Vektor DNA (4mg) wurde mit 20 ml Lipofectamin (Life Technologies) transfiziert. Das Medium mit dem Transfektionsmix wurde nach 6h entfernt und die Zellen für 10 Tage in Kultur genommen. Transfizierte Zellen wurden anhand ihrer GFP-Expression kontrolliert und nach Abschabung der Zellen aus den Flaschen und entsprechender Trennung von dehiszenten Zellen in Kultur separiert und asserviert.

Die zu übertragenden Gene werden zunächst in ein Shuttleplasmid (pAdTrack) eingeführt und sind dort von Ad5-DNA-Sequenzen flankiert, mit deren Hilfe das Gen über homologe Rekombination in das adenovirale Genom (pAdEasy-1) eingeführt wird. Das Shuttleplasmid enthält ein grünes fluoreszentes Protein unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, wodurch später transfizierte Zellen einfach identifiziert werden können. Die flankierenden Sequenzen stammen aus dem E3-Bereich von Ad5. Die Übertragung findet in der komplementierenden humanen Zelllinie 293 statt. Diese erlaubt die Replikation von Adenoviren und enthält das E1-Gen von Ad5 im Genom integriert. Durch die konstitutive Expression der E1-Gene ist diese Zelllinie in der Lage, Ad5-Mutanten mit Deletionen in der essentiellen E1-Region zu komplementieren. Dieses Leck der E1 und E3-Region der adenoviralen Vektoren erhöht die Effizienz einer *in-vivo* humanen Gentherapie (Gorziglia, Kadan et al. 1996; Gorziglia, Lapcevich et al. 1999). Das Rekombinationsplasmid mit dem zu übertragenden Gen wird auf 293-Zellen nach Rekombination in E.coli und Spaltung durch Pac 1 transfiziert. Die Übertragung des heterologen Gens in das deletierte Ad5-Genom in der den Replikationsdefekt komplementierenden Zelle wird durch grüne Fluoreszenz angezeigt und führt zur Freisetzung rekombinanter replikationsdefekter Ad5-Deletionsmutanten. Werden Zellen, die den Replikationsdefekt in der E1-Region nicht komplementieren können, mit den rekombinanten replikationsdefekten Ad5-Deletionsmutanten infiziert, erfolgt keine Produktion infektiöser Virionen.

3.2.2. Zellkultur in Infektion mit Ad5

3.2.2.1. Infektion der SW 480 Zellen mit Ad5-GFP

Für die Infektion der SW 480 Zellen mit Ad wurden die Zellen auf 96-Wells ausgesät, dabei je 1500 Zellen pro Well. Die Infektion erfolgte anschließend auf zwei unterschiedlichen Wegen: Die SW 480 Zellen wurden zum einen zwei Stunden vor der Ad5-Infektion mit 5-FU inkubiert, zum anderen erfolgte die Infektion mit Ad5 gleichzeitig mit der Gabe von 5-FU. In beiden Fällen ließen wir die Zellen zwei Tage lang wachsen. Die mit 5-FU vorbehandelten Zellen wurden zuvor bei 37°C in RPMI/FCS/PS inkubiert, welche folgende 5-FU-Konzentrationen enthielten: 2, 10, 30 und 50 µM. Nach zwei Stunden wurde das Medium mit frischem RPMI/FCS/PS-

Medium gewechselt, die Zellen gewaschen und mit Ad5-GFP in einer Konzentration von 300 FFU/Well in 200 µl Medium ohne 5-FU infiziert. Bei der gleichzeitigen Behandlung der SW 480 Zellen mit Ad5 und 5-FU wurden die Zellen mit Ad5-GFP infiziert, die in 200 µl Medium gelöst waren, welche 5-FU in der oben genannten Konzentration enthielt. Als Kontrollen wurden Zellen mitgeführt, die wir in Medium ohne 5-FU und ohne Ad5 wachsen ließen. Nach 24, 48 und 72 Stunden konnten mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops die infizierten Zellen, die aufgrund der GFP-Expression grün leuchteten, quantifiziert werden.

3.2.2.2. Infektion der LoVo- und SW 480 -Zellen mit Ad5-CEAbax

Für die Infektion der LOVO und SW 480 Zellen mit Ad5-CEAbax wurden die Zellen auf 60 mm Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Platte ausgesät. Nach einem Tag wurden die Zellen mit dem Virus (Floureszenz Forming Unit: FFU von 1) in 1 ml Medium ohne FCS und PS infiziert. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen mit einem Medium behandelt, das FCS, PS und 5-FU mit der Endkonzentration von 2 µM für LOVO und 20 µM für SW 480 enthielt.

3.2.2.3. Infektion von Kolonkarzinomzellen mit Ad5-GFP

Für die Behandlung der Kolonkarzinomzellen mit Ad5-GFP und 5-FU, 5-BrU, 5-FC, DOC oder Taxol wurden die Zellen auf 6-Well-Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Nach einem Tag wurde Ad5-GFP in einer Konzentration von 3×10^4 FFU/Well in 1 ml Medium ohne FCS und PS hinzugefügt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurde 2 ml Wachstumsmedium auf die Platten pipettiert, das FCS, PS und die Medikamente in den folgenden endgültigen Konzentrationen enthielt: 4 µM für 5-FU, 5-BrU, 5-FC und DOC und 5 ng/ml für Taxol. 40 h nach Infektion wurde die Anzahl der grün leuchtenden Zellen ermittelt.

3.2.2.4. Infektion von 293-Zellen mit Ad5-GFP in einem CAR-negativen System

Für diesen Versuch wurden transfektionsähnliche Bedingungen verwendet. Dazu wurde Ad5-GFP mittels Liposomen in die Zelle geschleust. Diese 293-Zellen wurden auf 6-Wellen ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well) und über Nacht wachsen gelassen. Die

Struktur der Liposomen um Ad wurde wie folgt hergestellt: Ad-GFP (3×10^4 FFU) wurden mit Lipofectamin (Invitrogen) gemischt, das in eine Endkonzentration von 0,4 mg/ml mit PBS gebracht wurde. Nach 2 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde 5-FU mit einer Konzentration von 20 μ M hinzugefügt. Der Ansatz wurde auf die Zellen gegeben, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 50 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand (100 μ l/Well) wurde 1:10 mit DMEM ohne FCS und PS verdünnt und auf die Zellen gegeben, welche anschließend für 30 min bei 37°C weiter inkubiert wurden.

3.2.3. CAR-Blockade

SW 480 Zellen wurden auf 6-Wells ausgesät (2×10^5 Zellen/Well) und mit einem CAR-Antikörper (goat polyklonalem Antikörper, Santa Cruz) bei einer Verdünnung von 1:1000, 1:750, 1:500, 1:250, 1:100 und 1:50 für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Ad-GFP inkubiert und die Anzahl der grün leuchtenden Zellen wurde 36 h nach der Infektion ausgezählt.

3.2.4. Western Blot Analyse im *in vivo*-Versuch

3.2.4.1. kDa-Angaben für folgende aufgeführte Proteine

Aktin	46 kDa
Bax	21 kDa
Fiber	98 kDa
CAR	46 kDa
Bcl-2	26 kDa
E4orf3	11 kDa

3.2.4.2. Methodik der Western Blot Analyse

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels des BC Assays (PIERCE) bestimmt. Die Proben wurden in folgenden Proteinmengen eingesetzt: 40 μ g für die CAR Western Blot Analyse, 60 μ g für die Ermittlung von bax und 50 μ g für die Ermittlung des Fiber-Proteins mittels der Western Blot Analyse. Für die Fiber Western-Blot-Analyse muss

erwähnt werden, dass der Antikörper Mono- und Trimere erkennt, sodass die Proben für diesen Versuch nicht denaturiert werden dürfen. Im Anschluss wurden die Proben auf unterschiedlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetragen. Die unterschiedliche Prozentualität der Gele resultiert aus den unterschiedlichen Proteingrößen. Folgende Gele wurden gegossen: 10% für CAR-WB, 15% für bax-WB und 7,5% Fiber-Protein-WB. Geblottet wurde mittels Tankblotverfahren auf Nitrozellulosemembranen (Bio-Rad, Hercules, CA), wobei die Porengröße dabei 0,45 µm betrug. Die Blots wurden mit 5% fettarmer Trockenmilch in 0.1% Tween 20 PBS (T-PBS-MILK) für 1h bei Raumtemperatur blockiert und dann über Nacht bei 4°C mit den geeigneten Antikörpern inkubiert: CAR (goat polyklonal Antikörper, Santa Cruz) mit einer Verdünnung von 1:285, bax (polyklonaler Rabbit Anti-human, Pharmingen) mit einer Verdünnung von 1:1000 und Aktin (goat polyklonaler Antikörper, Santa Cruz) mit einer Verdünnung von 1:1000. Nach Waschen mit T-BPS wurden die folgenden Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 hinzugefügt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert: HRP-konjugiertes IgG von donkey anti-goat für CAR- und Aktin-Ermittlung und goat anti-rabbit für die Ermittlung von bax. Da CAR und Aktin gleiches Molekulargewicht haben, wurde der Blot, der für CAR verwendet wurde, zunächst einem Stripvorgang mit 2% SDS in Tris Puffer (ph 6.7) für 45 min bei Raumtemperatur unterzogen und anschließend für die Ermittlung von Aktin verwendet. Schließlich wurden die Proteine mittels vergrößerter Chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) auf einem ECL-WB-Film exponiert.

Für die Protein-Extraktion der Maus-Organen (Herz, Leber, Milz, Niere, Darm und Lunge) wurden diese mit dem Complete Mammalian Proteome Extractions Kit von Calbiochem (Catalog Number: 539779) behandelt. Dafür wurden von jedem Organ der 9 Versuchstiere in etwa 50-100 mg Gewebepulver hergestellt und die Proteine mittels Resuspensions Puffer (Imidazol/Sucrose), Extraktions Reagenz (Urea/Thiourea/Detergent), Reducing Agent (DTT) und Benzonase gelöst. Die daraus gewonnenen Pellets wurden vor der weiteren Verarbeitung im Protein Assay in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Pellets, die aus der Proteinextraktion gewonnen wurden, enthielten störende Substanzen, wie z.B. Harnstoff. Daher mussten diese mittels spezieller Reagentien (UPPA-I und UPPA-II) herausgefällt werden. Hierfür wurde der Non-Interfering Protein Assay Kit von Calbiochem (Catalog Number: 488250) verwendet. Nach der UPPA-Fällung wurden die Pellets in Lysepuffer aufgenommen und mit einem

Ultraschall-Homogenisator (15 sek, 2 cycle) behandelt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des BCA-Kit (BC Assay) der Firma Uptima (Catalog Number: UP95424A) durchgeführt. In diesem wird Cu^{2+} durch die Proteine reduziert, die reduzierten Cu^+ -Ionen bilden anschließend mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex. Die Intensität des Farbumschlages wurde photometrisch bei 540 nm bestimmt. Die daraus resultierenden Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Standardkurve errechnet.

Zum Nachweis verschiedener Proteine wie vor allem bcl-2 und E4orf3 wurden die Proben zunächst lysiert. Der dafür verwendete Lysepuffer enthielt 1% Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40 = Igepal), 0,1% SDS, 0,5% Sodium Desoxycholat sowie die Protease-Hemmer Phenylmethylsulfonyl-Fluoride (100 mg/ml) und 0,1% Aprotinin (100 U/ml). Die Proteaseinhibitoren PMSF und Aprotinin wurden beim Ansetzen des Lysepuffers immer frisch zugesetzt. Bis zur weiteren Verwendung konnte das Zelllysat bei -20°C gelagert werden.

Es wurde eine standardisierte Gesamtproteinkonzentration von 50 μg für alle Proben im Gel eingesetzt, die nach Ermittlung der Proteinkonzentrationen mittels des Protein-Assay-Verfahrens und entsprechender Verdünnung mit dem Lysepuffer vorausgesetzt werden konnte. Die entsprechenden Proben konnten anschließend mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens dargestellt werden. Hierfür wurden die Proben dann im Verhältnis 1:3 mit einem 6x-Sample-Puffer gemischt und zur Denaturierung der Proteine 10 min im kochendem Wasserbad (99°C) inkubiert. Der 6x-Sample-Puffer bestand aus Aqua dest., 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), Glycerol, 10% (w/v) SDS, 2- β -Mercaptoethanol und 0,05 (w/v) Bromphenolblau.

Anschließend konnten die Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch unter einer Spannung von 100 V vertikal aufgetrennt werden. Der Bisacrylamidanteil des Gels lag aufgrund der ähnlichen Größe der zu blottenden Proteine (etwa bei 26 kDa) bei 12%. Die Polyacryamidgele wurden nach folgender Vorschrift in die Apparaturen des Western Blot Mini-Gel-Apparates gegossen:

Resolving Gel:

	12%
Aqua dest.	3,5 ml
1,5M Tris Puffer, pH 8,8	2.5 ml
SDS, 10%	100 µl
Bisacrylamid, 30%	3,3 ml
Ammoniumpersulfat, 10%	80 µl
TEMED	5-10 µl

Stack Gel:

Aqua dest.	6,1 ml
0,5M Tris Puffer pH 6,8	2,5 ml
SDS, 10%	100 µl
Bisacrylamid, 30%	1,3 ml
Ammoniumpersulfat, 10%	80 µl
TEMED	5-10 µl

Anschließend wurde der Mini Gel Western Blot Apparat mit Running-Puffer aufgefüllt und bei einer angelegten Spannung von 100 V für 2-3 Stunden laufen gelassen:

Running-Puffer:

Glycin (Puffersubstanz)	14,4g
Tris Base	3g
SDS, 10%	1%

Orientierung für die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische lieferten die verwendeten Marker der Firma Bio Rad (Precision Plus Protein (500 µl), Catalog Number: 161-0374) Für den Transfer der Proteine beim Blotting von den Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurde eine Spannung von 100 V für eine Stunde angelegt.

Transfer-Puffer:

25mM Tris Base
192mM Glycin
Methanol (in Lsg. 20%)

pH: 8,3

Die Nitrocellulosemembranen wurden anschließend eine Stunde in 5%igem Trockenmilchpulver in t-TBS (2,42 g/l Tris Base, 8 g/l NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,6) blockiert, gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper (2 µg/ml, bcl-2 MAb Purified Hamster-Anti-Human, BD Pharmingen, Catalog Number: 551051) über Nacht bei 4°C. Nachdem die Membranen dreimal 10 Minuten mit t-TBS gewaschen wurden, konnte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:5000, Horseradish Peroxidase (HRP)-Conjugated Mouse Anti-Armenian and Syrian Hamster IgG (Cocktail) Monoklonal Antibody, BD Pharmingen, Catalog Number: 554012) für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit T-TBS wurden die Nitrocellulosemembranen für eine Minute mit einem ECL Kit (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, Catalog Number: RPN2106) inkubiert und anschließend entwickelt.

Vor jeder weiteren Inkubation mit anderen Antikörpern wurden die Nitrozellulosemembranen mit Stripping-Puffer (2% SDS = 20 g/l, 7,56 g/l Tris Base = 62,5 mM, pH: 6,7) für jeweils 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Analog zum bcl-2-Antikörper wurden anschließend alle weiteren Schritte für die folgenden Antikörper durchgeführt. So wurden die Nitrozellulosemembranen mit dem eigens aus Hybridomzellen (Ratte) hergestellten E4orf3-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 in 5%-BSA/T-TBS über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:2000, Goat-Anti-Rat IgG-HRP, Santa Cruz, Catalog Number: sc-2006) für 1 Stunde bei Raumtemperatur versetzt.

Als Ladungskontrolle diente β-Aktin (I-19) (1:1000, Santa Cruz, Catalog Number: sc-1616), das über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Am folgenden Tag erfolgte der Nachweis mittels des Sekundärantikörpers (1:5000, Donkey-Anti-Goat IgG-HRP, Santa Cruz, Catalog Number: sc-2020), dessen Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde erfolgte.

3.2.5. PCR-Analyse im *in vitro*- und im *in vivo*-Versuch

Folgende adenovirale DNA-Proben (jeweils 2 µg) wurden für die PCR verwendet: DNA allein, DNA in der Anwesenheit von 9,6 µM 5-FU, DNA/Lipofectamin (0,2 mg/ml), DNA/Lipofectamin in der Anwesenheit von 9,6 µM 5-FU. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 2060 g für 35 min bei 18°C zentrifugiert. Zur Kontrolle wurde eine zusätzliche Probe von DNA/Lipofectamin (0,2 mg/ml) hergestellt, mit einem Lysepuffer 1 Stunde lang bei 4°C behandelt und anschließend zentrifugiert. Von den Überständen wurde die DNA auf eine Mischung von NaOAc und Isopropanol ausgefällt, mittels Zentrifugation isoliert und danach mit 75% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Die PCR wurde mit Hilfe des Taq PCR Master Mix (Qiagen) durchgeführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden dann auf einem 1,5% Agarose-Gel, das 0,25 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen, um die spezifische Amplifikation der PCR nachzuweisen.

Des weiteren erfolgte eine quantitative PCR-Analyse im Light-Cycler aus den Organen (Herz, Milz, Leber, Darm, Lunge und Niere) des Mausmodells. Hierfür diente der PCR-Master-Mix von Roche. Untersucht wurden die Gewebe auf β-Aktin zur Faktor-Normierung, bcl-2 und die E4-Box, wobei zur Analyse jeweils 60 ng DNA eingesetzt wurden. Die etablierten Primer-Endkonzentrationen betragen je 10 µM und die MgCl₂-Konzentration je 3 mM. Außerdem wurden die PCR-Produkte vom Light-Cycler zur Validierung der PCR auf ein Agarose-Gel für eine Gelelektrophorese aufgetragen und sichtbar gemacht. So konnte zusätzlich die Spezifität der Primer getestet werden und überprüft werden, ob nicht noch Nebenprodukte mit amplifiziert wurden.

3.2.6. Transmissionselektronenmikroskopie

Folgende Lösungen wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (EM) analysiert: (A) Lipofectamin von 0,5 mg/ml, (B) Lipofectamin von 0,5 mg/ml, das über Nacht mit 20 µM 5-FU behandelt wurde, (C) Ad-GFP (4×10^5 pfu/ml), das mit Lipofectamin komplexiert war in einer Konzentration von 0,5 mg/ml, (D) Ad-GFP (4×10^5 pfu/ml), das mit 0,5 mg/ml Lipofectamin komplexiert war, das zuvor 1 h bei Raumtemperatur

inkubiert worden war und dann über Nacht mit 20 µM 5-FU behandelt worden war. Zur Herstellung der EM-Proben wurde das negative Fleck-Verfahren verwendet. Kurz, ein Tropfen jeder Probe wurde auf ein Kupfergitter abgeladen und mit einem formbaren Karbonfilm bedeckt. Der Film wurde dann mit 2% Wolframphosphorsäure befeuchtet und an der Luft getrocknet. Die EM-Bilder wurden auf einem Zeiss-Instrument, das mit 80 kV arbeitet, aufgezeichnet.

3.2.7. **Versuchsansatz beim Mausmodell**

Die Mäuse wurden in zwei Gruppen von je sechs Tieren aufgeteilt, von denen nur die zweite Gruppe mit DSS behandelt wurde. Folgendes Schema zeigt den Versuchsansatz:

	- DSS	+ DSS
Tier 1	PBS	PBS
Tier 2	+ 5-FU (10µM)	+ 5-FU (10µM)
Tier 3	Koinfektion	Koinfektion
Tier 4	Koinfektion + Doxycyclin ohne 5-FU	Koinfektion + Doxycyclin ohne 5-FU
Tier 5	Koinfektion + Doxycyclin + 5-FU	Koinfektion + Doxycyclin + 5-FU
Tier 6	Koinfektion + Doxycyclin + 5-FU	Koinfektion + Doxycyclin + 5-FU

Den entsprechenden Tieren wurde zeitgleich zur Infektion mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad im Verhältnis von 4:1 5-FU (10 µM), aufgenommen in 300 µl physiologischer (0,9%) NaCl-Lösung, in die Vena cava inferior gespritzt. Nach 48 Stunden erfolgte die Gabe von Doxycyclin (286 µg/100gKG; KG Mäuse ~ 25 g → 71,5 µg Doxycyclin/Maus), welches über die Schwanzvene injiziert wurde. Wiederum 48 Stunden später erhielten die entsprechenden Versuchstiere für sieben Tage DSS über das Trinkwasser. Bei allen Mäusen wurden sieben Tage später die Organe Herz, Milz, Leber, Darm und Lunge entnommen. Von diesen wurden Proben für die Immunhistochemie, die quantitative PCR-Analyse und für die Western-Blot-Analyse gewonnen. Wie aus obigem Schema ersichtlich dienten die Tiere 1 und 2 als Kontrolltiere.

3.2.8. Immunhistochemie der Mausschnitte

Für die Immunhistochemie wurden die einzelnen Organe (Herz, Leber, Milz, Niere, Lunge und Darm) der insgesamt 9 Versuchstiere in Tissue-Tec-O.C.T.-Medium eingebettet und bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wurden von allen Organen zahlreiche Gefrierschnitte hergestellt, um eine möglichst hohe Antigenerhaltung zu erzielen. Die Schnitte wurden zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend mit eiskaltem Aceton für 10 min fixiert und dann für die weitere Verarbeitung bei -20°C gelagert. Für unsere Studie testeten wir die einzelnen Organe mit zwei verschiedenen Antikörpern, einem Hexon-Antikörper (Polyclonal Antibody to Adenovirus (Hexon) aus goat, ACRIS, Catalog Number: BP100) und einem bcl-2-Antikörper (Rabbit Anti-Human-Bcl-2 Polyclonal Antibody aus rabbit, BD Pharmingen, Catalog Number: 554160).

Zunächst wurden die Aceton-fixierten Gefrierschnitte bei Raumtemperatur für etwa 10 min getrocknet und anschließend in TRIS-Puffer für 2 Stunden gewaschen, wobei der TRIS-Puffer alle 30 min gewechselt wurde, um das O.C.T.-Medium vollständig zu entfernen. Nach kurzem Abspülen der Präparate mit dest. Wasser wurde mit je 100 μl 0,3% H_2O_2 -Methanol-Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur gegen die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Vor der Serumblockierung erfolgte ein weiterer Waschvorgang, zunächst mit Aqua dest. und dann dreimal für je 5 min mit TRIS-Puffer. Gegen Kollagene und unspezifische Proteine wurden die Objektträger in der Feuchtkammer mit 20%-Rabbit-Serum (SIGMA, Produkt Nr.: R133) für 20 min bei Raumtemperatur blockiert. Ohne weitere Waschvorgänge wurden die Schnitte danach über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer mit Primärantikörper (1:100 in 1%-Rabbit-Serum, Polyclonal Antibody to Adenovirus (Hexon), ACRIS, Catalog Number: BP100) die Negativkontrolle mit 100 μl 1%-Rabbit-Serum inkubiert.

Im Folgenden wurde ein HRP-Kit (Streptavidin-HRP, Serotec, Catalog Number: STAR5B) verwendet, der für die spezifische Bindung der Primärantikörperreaktion dient. Dies geschieht durch Zugabe von biotinylierten Sekundärantikörpern gegen goat-Immunglobuline, gefolgt von einem Komplex, der sich aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase zusammensetzt. Schließlich wird der Antigen-Antikörperkomplex durch eine Chromogen-Substratlösung in einer Farbreaktion durch DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und Wasserstoffperoxid) sichtbar

gemacht. Der biotinylierte Sekundärantikörper (Rabbit Anti-Goat) des HRP-Kits bindet an den zuvor amplifizierten Primärantikörper (Goat Anti-Hexon) über ein bestimmtes Epitop, so dass letztendlich die Antigenstruktur des Hexons im Mausgewebe nachgewiesen werden kann. Der StreptAB-Komplex/HRP des Duett-Kits wird mit einem aus *Streptomyces avidinii* gewonnenen Streptavidin und Meerrettichperoxidase hergestellt. Die Peroxidase wird optimal über einen 7-Antom-Spacer mit Biotin in einer 0,01-molaren phosphatgepufferten Kochsalzlösung und Natriumnitritlösung bei einem pH von 7,2 konjugiert. Die Verwendung des Streptavidins als Komplex erweist sich als sehr vorteilhaft, da es eine bessere Spezifität der Färbung verursacht.

So wurde am folgenden Tag dreimal für 5 min mit TRIS-Puffer gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer mit dem Sekundärantikörper (1:500 in 1%-Rabbit-Serum, Rabbit Anti-Goat IgG, IgM, IgA (H&L)) inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang (3 dreimal für je 5 min mit TRIS-Puffer) wurden die Schnitte mit je 100 µl Streptavidin (1:300 in 1%-Rabbit-Serum, Serotec, Catalog Number: STAR5B) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer versetzt. Anschließend erfolgte die Substratreaktion mittels einer DAB-Färbung (DAB/PBS-Lsg. + 1,5 µl 30% H₂O₂), die nach max. 10 min bei Raumtemperatur mit ausreichend dest. Wasser gestoppt wurde. Anschließend wurden die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt und ca. 30 min gebläut.

Bei einem positivem Ergebnis lassen sich unter dem Lichtmikroskop braune Färbungen der mit Adenoviren infizierten Zellen erkennen.

Für die Immunhistochemie mit dem bcl-2-Antikörper wurden die mit Aceton fixierten Gefrierschnitte aus der Maus nach dem gleichen Protokoll-Schema behandelt wie bei der Hexon-Färbung. Dabei wurde der Primär-Antikörper (Rabbit Anti-Human bcl-2 Polyklonaler Antikörper) 1:50 mit 1%-goat-Serum verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte mit dem Sekundär-Antikörper (Goat Anti-Rabbit Igs Polyclonal Antibody, biotinyliert), der 1:100 mit 1%-goat-Serum verdünnt wurde, für 1 Stunde bei Raumtemperatur überschichtet und darauf analog zur Hexon-Färbung mit Streptavidin (1:300 in 1%-goat-Serum, BD Pharmingen, Catalog Number: 554066) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die DAB-Färbung, die Gegenfärbung mit Hämalaun und das Bläuen erfolgte nach gleichen Schema wie oben erwähnt. Als Positiv- und Negativ-Kontrollen dienten bei der Immunhistochemie mit dem bcl-2-Antikörper humane Kolonschnitte. Diese zu

testenden Paraffinschnitte, die in Formalin fixiert waren, wurden zuerst im Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 99% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 2x 70% Ethanol) entwässert. Anschließend wurden die Schnitte in Citratpuffer für 20 Minuten gekocht, wodurch die Antigen-Bindungsstellen der Membranoberfläche vollständig freigelegt werden. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren wurden die Schnitte in ein 3%iges Wasserstoffperoxid-Methanolgemisch gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als zweite Blockierung gegen Kollagene und unspezifische Proteine wurde 20%-iges goat-Serum gegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Färbung der Maus-Gefrierschnitte mit Primär- und Sekundär-Antikörpern in den jeweils gleichen Konzentrationen und unter gleichen Arbeits- und Umgebungsbedingungen.

3.2.9. H.E.-Färbung

Die Routinefärbung für die histologische Untersuchung von Gewebeschnitten ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung), in der das positiv geladene Hämatoxylin nach Oxidation zu Hämatein und folgender Zugabe von Alaunen als Hämalaun an die sauren Bestandteile der DNA bindet, sodass die Zellkerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien und Kalk blau gefärbt werden. Das negativ geladene Eosin bindet dagegen an die positiv geladenen Gewebsbestandteile, was sich in einer roten Färbung des Zytoplasmas der Zellen, Kollagenfasern und proteinhaltigen Lösungen widerspiegelt.

Um die Colitis der mit DSS behandelten Tiere besser beurteilen zu können, wurden die Darmschnitte und zusätzlich auch alle anderen Organe der Versuchstiere mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt. Dabei wurden die Schnitte nach einem 30 min langem Waschvorgang in TRIS-Puffer und dreimaligem Waschen mit Aqua dest. für 10 min mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt und für weitere 10 min mit Wasser gebläut. Nach einem folgenden Waschvorgang mit Aqua dest. wurden die Präparate für wenige Minuten mit Eosin überschichtet, danach wieder mit Aqua dest. gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 99%, Xylol) gereinigt.

3.2.10. Infektion von Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlichen Ad5-Mutanten und 5-FU

Um die Rolle von 5-FU bezüglich der Infektion von Tumorzellen mit Ad5 besser verstehen zu können, verwendeten wir für die Infektion von Kolonkarzinomzellen mit unterschiedlicher CAR-Expressionsrate zwei Ad5-Mutanten, denen die E1- und die Replikationsregion fehlte, die dafür aber GFP (Ad5-GFP) exprimierten.

3.2.11. Nachweis der Effekte in einem CAR-negativen System

Um den Effekt in einem CAR-negativen System bewerten zu können, wurde Ad5-GFP in Liposomen eingekapselt, die mit 5-FU behandelt wurden. So konnte ein Vergleich zu Kontrollen erfolgen, bei denen die Zellen ohne die gleichzeitige Behandlung von 5-FU infiziert wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der *in vitro*-Versuche

4.1.1. Vergleich zwischen Zelllinien mit hoch- und niedrig-exprimierendem CAR-Level in Bezug zur adenoviralen Infektionsrate und 5-FU

Sämtliche Zell-Linien (DLD-1, LoVo, SW 480 und SW 620) wurden mit Ad-GFP oder Ad-CEAbax bei einem FFU behandelt, das zu 50% die Zellen infizierte. Der Erfolg der Infektion war dabei in allen Zelllinien am höchsten (bis zu 98%), sobald die adenoviralen Konstrukte in Kombination mit 5-FU verwendet wurden, was die große Population an grünen Zellen in LoVo- und SW 480 -Zellen als Beispiel zeigt (siehe dazu Abbildung 12).

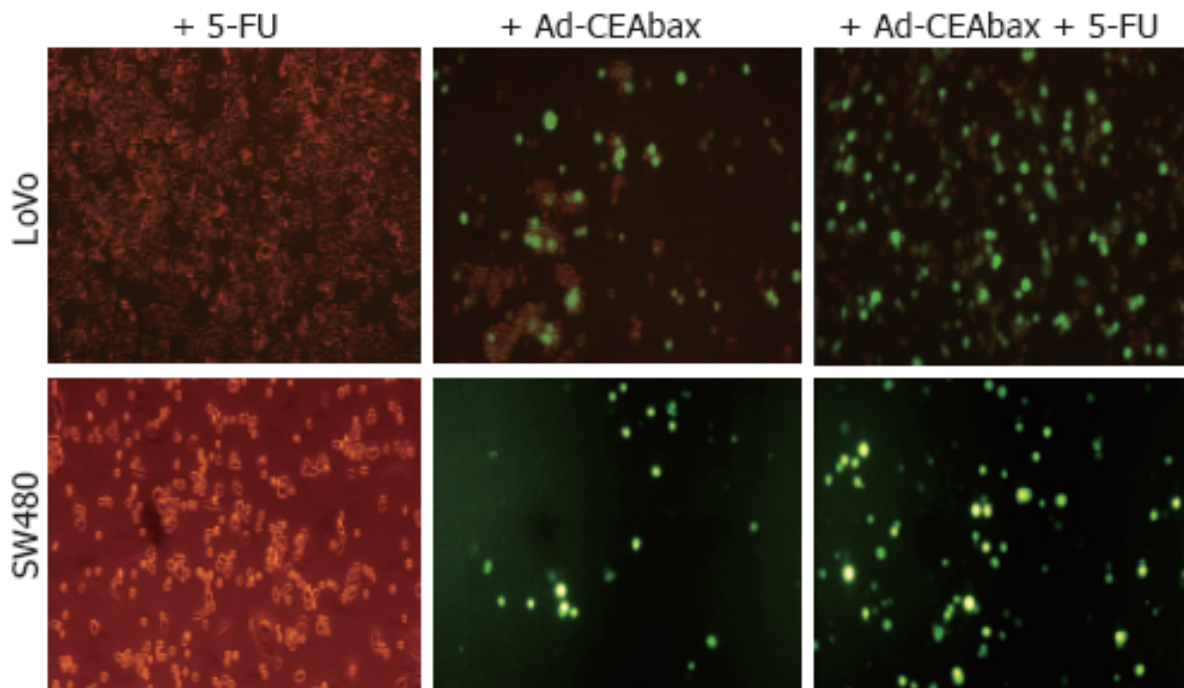


Abbildung 12: Auswirkungen von 5-FU auf die adenovirale Infektion von Kolonkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlicher CAR-Expression.

5-FU wurde für die LoVo-Zellen in einer Konzentration von 2 µmol/L und für die SW 480-Zellen in einer Konzentration von 20 µmol/L verwendet. Die MOI für das Virus (AdCEAbax) lag bei 1. Die Zellen wurden mit 5-FU allein oder mit dem Virus in An- und Abwesenheit von 5-FU behandelt.

Die Expression von bax mit 5-FU und/oder dem Virus wurde mittels Western-Blot-Analyse nach einer Inkubation von 24 h, 36 h und 48 h kontrolliert (siehe dazu Abbildung 13).

Das Expressionslevel von CAR der Kolonkarzinom-Zelllinien wurde mittels Western-Blot-Analyse unter der Ladungskontrolle von Aktin dargestellt (siehe dazu Abbildung 15).

Entsprechend der GFP-Expression wurde eine erhöhte Expression von bax auf dem Western Blot detektiert, sobald zur Infektion mit Ad-CEAbax 5-FU gegeben wurde, gegenüber dem Expressionsgrad von bax nach alleiniger Infektion mit Ad-CEAbax (siehe Abbildung 13).

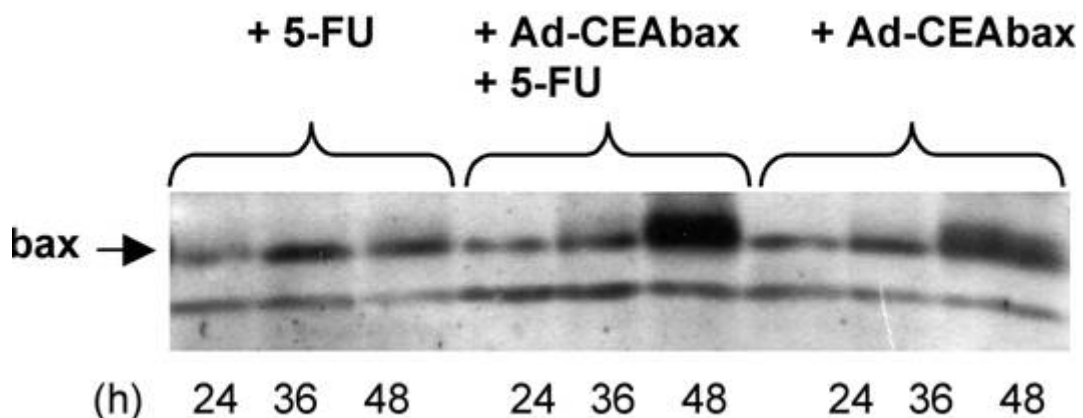


Abbildung 13: Kontrolle der Expression von bax mit 5-FU und/oder dem Virus (AdCEAbax) mittels Western Blot Analyse nach einer Inkubation von 24 h, 36 h und 48 h.

Zur Kontrolle wurden 293 Zellen mit der DNA des CMV Promotor/GFP transfiziert und mit 10 mmol/l 5-FU behandelt. In der Anzahl der grünen Zellen zeigte sich kein Unterschied nach der Gabe von 5-FU, was dafür spricht, dass 5-FU nicht mit der Translation der Reportergene interferiert. Zusätzlich wurden SW 480 -Zellysate, die mit 5-FU (10 mmol/l) behandelt wurden, und Kontrollzellen auf das adenovirale Fiber-Protein geblottet (die adenovirale MOI lag dabei einmal bei einer MOI von 200 und bei einem weiteren Versuch bei 50). In beiden Fällen lies sich mehr Fiber-Protein in

den mit 5-FU behandelten Zellen nachweisen, was dafür spricht, dass diese Zellen intrazellulär nun eine höhere Anzahl an Adenoviren enthielten (siehe Abbildung 14).

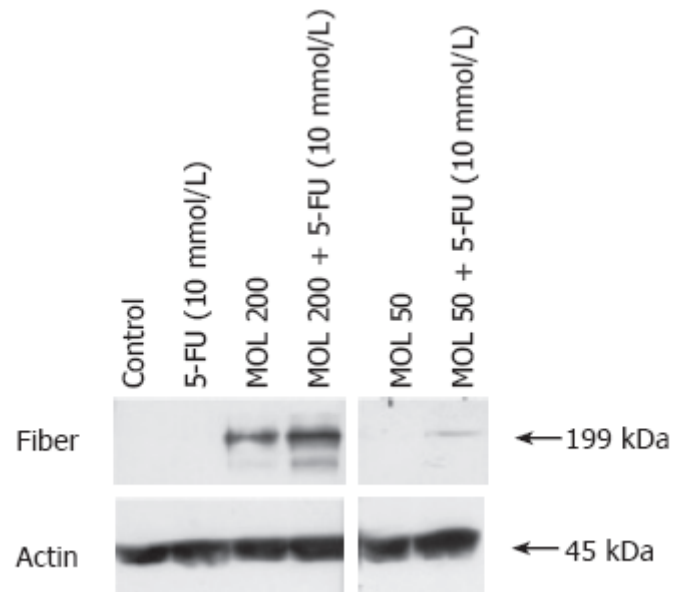


Abbildung 14: Western Blot Analyse zur Beurteilung des nach der Ad-GFP-Infektion intrazellulär lokalisiereten adenoviralen Fiber-Proteins in SW 480 -Zelllysaten (Aktin diente zur Ladungskontrolle).

In Kontrollzellen und Zellen, die nur mit 5-FU behandelt wurden konnte kein Fiber-Protein nachgewiesen werden. Geringe Fiber-Protein-Konzentrationen konnten in Ad-GFP-infizierten Zellen in Abhängigkeit der Ad-GFP-Konzentration detektiert werden (MOI von 50 und 200). Die zusätzliche Gabe von 5-FU erhöhte die Fiber-Protein-Konzentration in allen Zelllysaten, was auf eine erhöhte adenovirale Aufnahme in die Zellen hindeutet.

5-FU erhöhte die Aufnahmerate von Ad nicht nur in Zellen, in denen CAR auf einem hohen Level exprimiert wird, wie z.B. in LoVo-Zellen, sondern besonders in Zellen mit einer niedrigen CAR-Expressionsrate (siehe Abbildung 15).

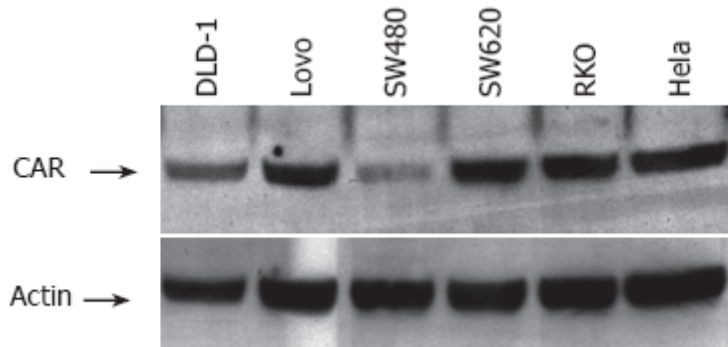


Abbildung 15: Western Blot Analyse zum Nachweis von CAR (Aktin diente zur Ladungskontrolle)

Das zeigt, dass der Effekt nicht an die Expression des CAR gebunden ist. Um die Funktion des CAR zu blockieren wurden SW 480 Zellen mit einem Antikörper gegen CAR für 24 h (Santa Cruz, N-17) in einer aufsteigenden Konzentrationenreihe von 1:1000 bis zu 1:50 und zusätzlich mit Ad (MOI 400) inkubiert. Die virale Aufnahme in die Zellen wurde ab Konzentrationen von mehr als 1:500 geblockt, jedoch wurde bei der gleichzeitigen Behandlung mit 5-FU die virale Aufnahme weiterhin vergrößert, was wiederum für einen CAR-unabhängigen Mechanismus spricht (siehe Abbildung 16).

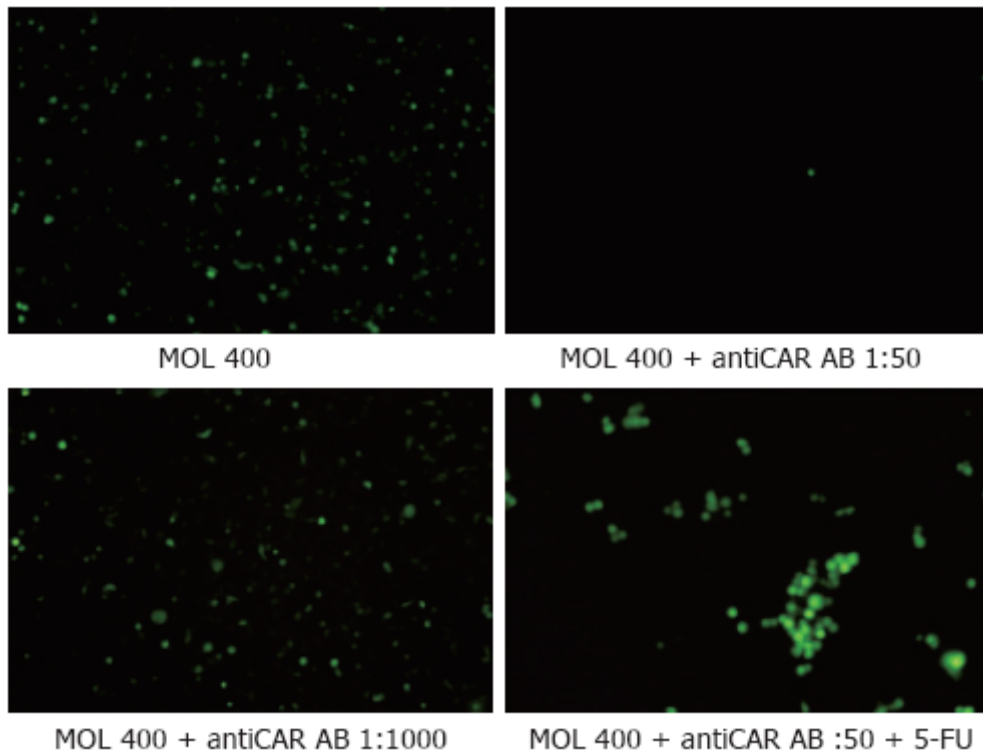


Abbildung 16: Anzahl der GFP-exprimierenden SW 480-Zellen nach der Infektion mit Ad-GFP (MOI von 400) mit und ohne Blockade von CAR in Abhängigkeit von der Gabe von 5-FU.

Neben einer Kontrolle wurde die Funktion von CAR durch einen anti-CAR-Antikörper in Konzentrationen von 1:1000 und 1:50 geblockt. Die gleichzeitige Gabe von 5-FU konnte die Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen sogar bei CAR-Antikörper-Konzentrationen von 1:50 erhöhen.

4.1.2. Zusammenhang zwischen der Konzentration von 5-FU und der Effizienz der Ad-Aufnahme in Zellen

Die GFP-Expression in mit 5-FU vorbehandelten Zellen war signifikant höher als in unbehandelten Zellen und die Zahl der Zellen, die das fluoreszierende Protein produzierten, vergrößerte sich mit steigenden Konzentrationen der kanzerogenen Substanz bis zu 10 μM . In der Tat zeigte sich jeweils nach 48 h und 72 h, dass die Infektionsrate in den mit 10 μM 5-FU vorbehandelten Zellen mehr als doppelt so hoch war als in den Zellen, die mit 2 μM 5-FU vorbehandelt wurden (siehe Abbildung 17 A).

A. Vorbehandlung mit 5-FU

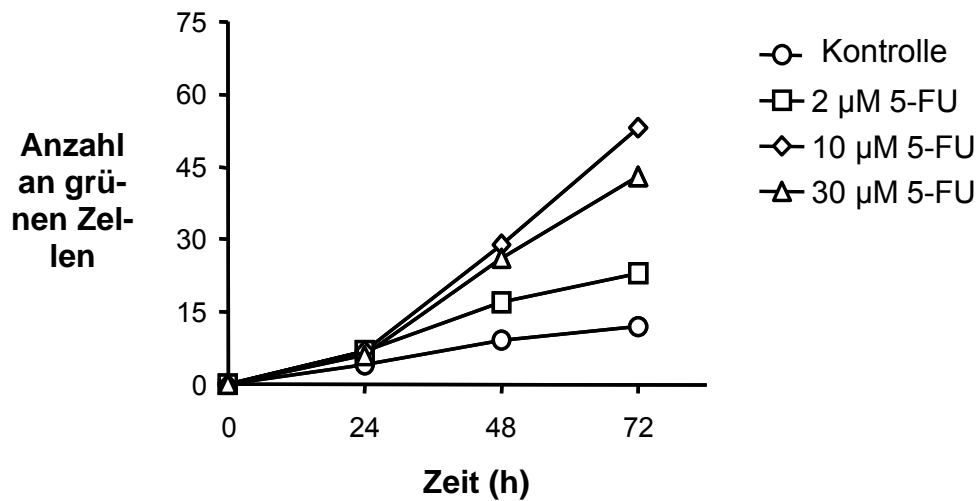


Abbildung 17 A: Abhängigkeit der adenoviralen Infektionsrate infolge einer Ad-GFP-Infektion von SW 480 Zellen nach einer vorherigen Gabe von 5-FU.

Zwei Stunden nach der Inkubation mit 5-FU in den entsprechenden Konzentrationen (2 µM, 10 µM und 30 µM) wurde 5-FU entfernt und die Zellen wurden mit dem adenoviralen Konstrukt Ad5-GFP infiziert. Als Alternative wurden die Zellen gleichzeitig zur Virusinfektion mit 5-FU behandelt (siehe dazu Abbildung 17 B). Die Anzahl der grünen Zellen wurde jeweils 24 h, 28 h und 72 h nach der Infektion ausgezählt. Die aufgeführten Daten ergeben sich als Durchschnittswerte aus drei Experimenten. Die Standardabweichung lag im Bereich von 10%-15%.

Ab Konzentrationen, die höher als 30 µM und 50 µM waren, konnte jedoch beobachtet werden, dass die Substanz langsam weniger effektiv wirkte, ein Phänomen, das auf einen inhibitorischen Effekt von 5-FU auf die virale DNA-Replikation hindeuten könnte. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und die Standardabweichung betrug weniger als 15%.

Ein höherer Effekt von 5-FU ließ sich bei seiner gleichzeitigen Applikation mit Ad5 beobachten, was nicht nur auf eine Steigerung des Resultats, sondern auch der Infektionsrate schließen lässt, besonders wenn die Substanz in den beiden höchsten Dosen von 30 µM und 50 µM verwendet wurde. Unter diesen Voraussetzungen war die Anzahl der grünen Zellen, die nach 24 h gezählt werden konnten, dreimal so groß als im Falle der Vorbehandlung mit 5-FU. Nach 72 h zeigte sich eine Erhöhung der Dichte der grün leuchtenden Zellen von über 50% (siehe Abbildung 17 B).

B. 5-FU simultan

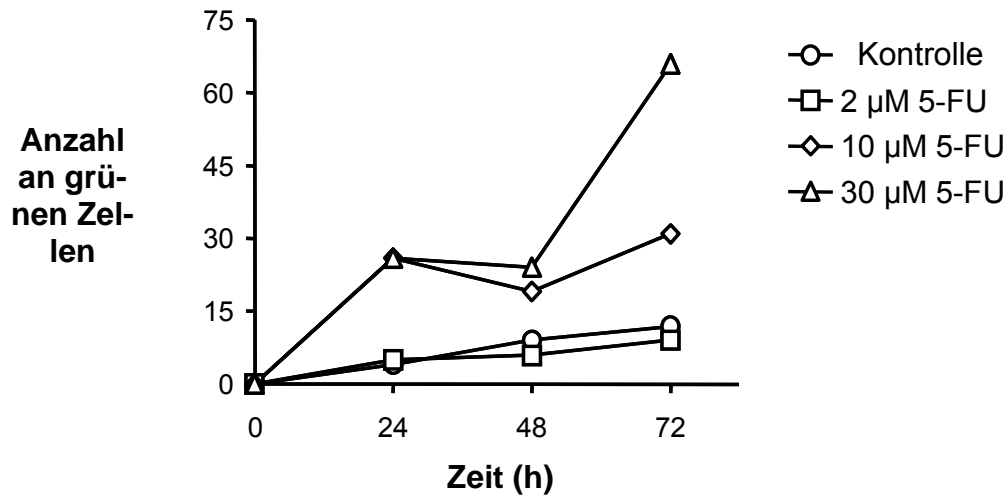


Abbildung 17 B: Abhängigkeit der adenoviralen Infektionsrate infolge einer gleichzeitigen Gabe von 5-FU zur Infektion von SW 480-Zellen mit Ad-GFP.

Die Anzahl der grünen Zellen wurde jeweils 24 h, 28 h und 72 h nach der Infektion ausgezählt. Die aufgeführten Daten ergeben sich als Durchschnittswerte aus drei Experimenten. Die Standardabweichung lag im Bereich von 10%-15%.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zeigen, dass nach der Behandlung mit 5-FU und Ad5-GFP eine signifikant höhere Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen, verglichen mit Ad5-GFP allein, beobachtet werden konnte. In Zelllinien mit einer geringen CAR-Expression (SW 480) zeigte sich ein noch stärkerer Effekt von 5-FU, was darauf schließen lässt, dass es sich beim Transport von Ad5 durch die Zellmembran um einen Mechanismus handeln könnte, der unabhängig von CAR abläuft. Die Erhöhung der Infektionsrate war dosisabhängig und maximal bei gleichzeitiger Gabe von 5-FU und Ad5-GFP.

4.1.3. Die spezifischen Eigenschaften von 5-FU bezogen auf die Ad5-Aufnahme in Zellen

Der positive Effekt von 5-FU auf die Ad5-Infektion könnte auf seine Funktion als Chemotherapeutikum oder auf seine Struktur und seinen chemischen Charakter zurückzuführen sein. Um einschätzen zu können welche strukturellen und chemischen Eigenschaften von 5-FU eine Rolle beim Eintritt der Adenoviren in Zellen spielen könnten, wurden die beiden Pyrimidin-Derivate von 5-FU, nämlich 5-BrU und 5-FC, in Kombination mit Ad5 verwendet. Die chemische Struktur von 5-BrU weist einen größeren Halogen-Anteil auf und ist weniger elektronegativer als 5-FC. In 5-FC liegt an Position 4 eine Aminogruppe anstatt der Carbonylgruppe wie in 5-FU vor, sodass das Molekül eine höhere Hydrophilie aufweist. In beiden Fällen änderte sich das Level der Infektion nicht in Hinsicht auf Ad5 allein, was darauf hindeutet, dass die Eigenschaft von 5-FU auf die Ad5-Infektion spezifisch ist und dass dabei keine Gemeinsamkeit mit anderen Molekülen vorliegt, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu 5-FU haben.

Zusätzlich zu anderen Chemotherapeutika, wie Taxol (Mann 2002), wurde das Zellmembran-destabilisierende Gallensalz Deoxycholat (Lasch, Hoffmann et al. 1990) in Kombination mit Ad5 verwendet. Im Falle der DLD-1 und SW 480 Zellen konnte nur 5-FU den zellulären Eintritt von Ad5 positiv beeinflussen, wohingegen sich bei Taxol keinerlei Effekte zeigten. Im Gegensatz dazu konnte die Infektion der LoVo-Zellen mit beiden antikanzerogenen Substanzen verbessert werden, sogar mit Taxol doppelt so gut als mit 5-FU (siehe dazu Abbildung 18). Die Effekte beider Substanzen waren in den RKO-Zellen, die CAR auf einem hohen Level exprimieren, nur geringfügig nachweisbar.

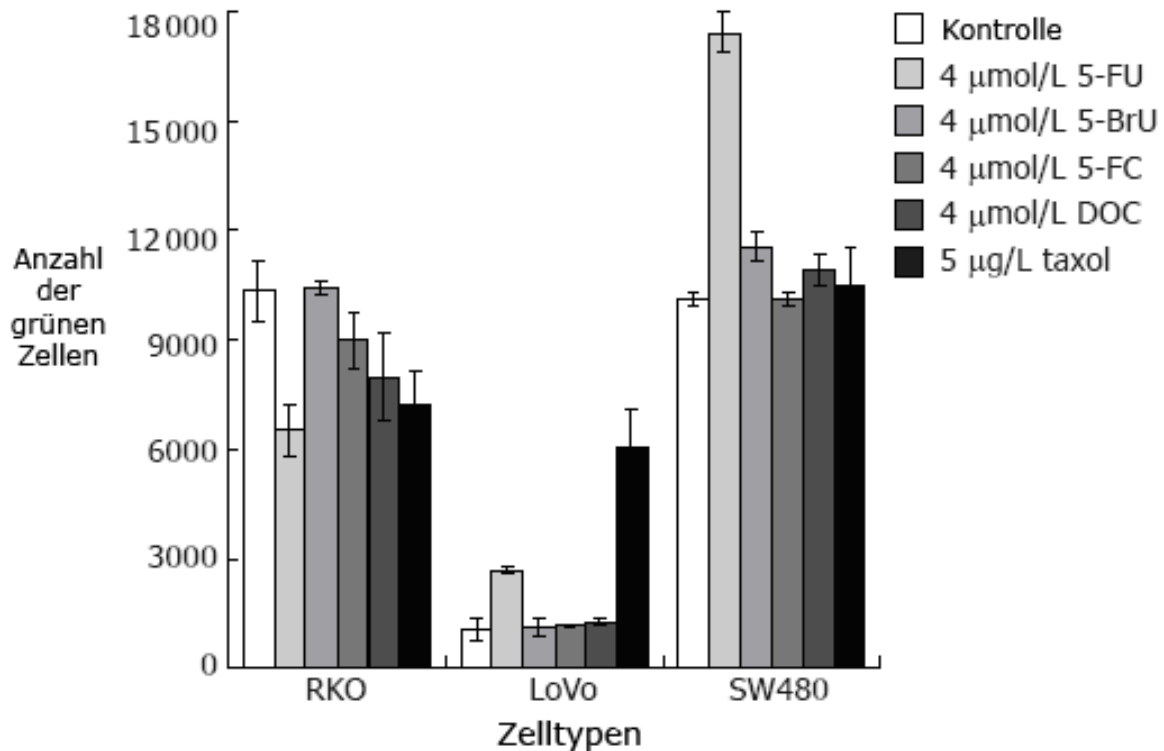


Abbildung 18: Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen bei RKO-, LoVo- und SW 480 Zellen nach der Gabe von 0 µmol/L (Kontrolle) bzw. jeweils 4 µmol/L 5-FU, 5-BrU, 5-FC, DOC und 5 µg/L Taxol.

Andere Pyrimidin-Analoga zeigen den positiven Effekt von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate nicht. Die Anzahl der infizierten grünen Zellen wurde 40 h nach Infektion gezählt. Die aufgeführten Daten ergeben sich als Durchschnitt aus drei Versuchen, wobei der Messfehler die übliche Standardabweichung aufzeigt.

4.1.4. Auswirkungen von 5-FU auf die Freisetzung von Ad5 aus liposomalen Strukturen

Basierend auf der Beobachtung, dass 5-FU einen positiven Einfluss auf die Aufnahme von Ad5 in Zellen unabhängig von CAR hat, forderten wir, dass es einen 5-FU-vermittelten Transfer von Ad5 durch Lipidmembranen geben muss. Um zu untersuchen, in welchem Maße 5-FU Einfluss auf geordnete Lipidstrukturen aufweist, wurde ein Gemisch aus Liposomen von DOSPA/DOPE in einem Verhältnis von 3:1 verwendet (Lipofectamine™), um das virale Kapsid einzuhüllen. Dabei handelt es sich um das polykationische Lipid 2,3 -dioleyloxy- N- [2(spermincarboxamido)ethyl] - N,N – dimethyl – 1 – propanaminiumtrifluoroacetate (DOSPA) und das Phospholipid

dioleolyphosphatidylethanolamine (DOPE). Der resultierende Komplex wurde dann mit 5-FU über Nacht behandelt und anschließend zentrifugiert. In 293-Zellen, die ein ideales System für die Replikation von Ad-Mutanten darstellen, deren E1 Region deletiert ist, wurde die Infektionsfähigkeit der Überstände getestet. Die folgende Abbildung zeigt einen Überblick über die dafür durchgeführten Versuche (Abbildung 19).

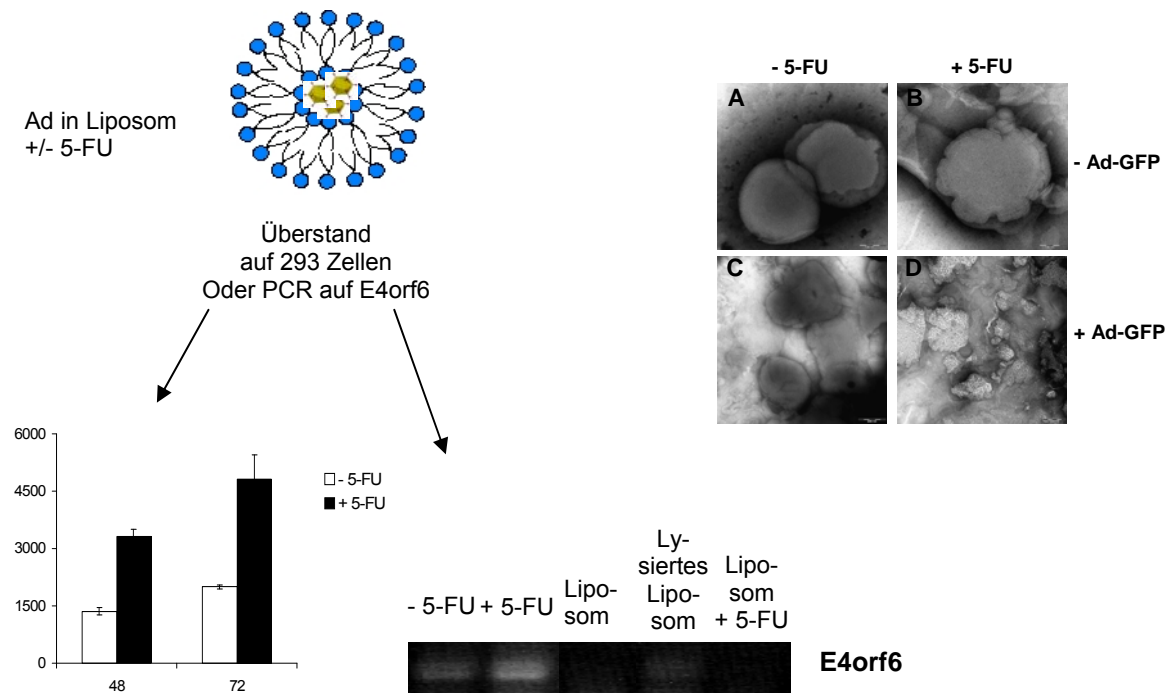


Abbildung 19: Übersicht zum Versuchsaufbau: PCR und Infektion von 293-Zellen mit Überständen von 5-FU behandelten Ad5-Liposomen.

(genauere Beschreibung der einzelnen Versuche siehe unten)

Wie Abbildung 20 aufweist, zeigt die Anzahl der grünen Zellen, die von der Infektion mit dem Überstand der mit 5-FU behandelten Ad5-Liposomen-Präparationen stammen einen Unterschied zur Anzahl der Zellen auf, die von der Infektion mit dem Überstand stammen, die ohne 5-FU behandelt wurden. Im Vergleich zu den Kontrollen enthielten die Überstände dieser Liposomen schließlich 2,4 mal mehr Ad5-GFP nach der Behandlung mit 5-FU. Zusätzlich konnten unter dem Elektronenmikroskop an den Lipidmembranen morphologische Veränderungen festgestellt werden.

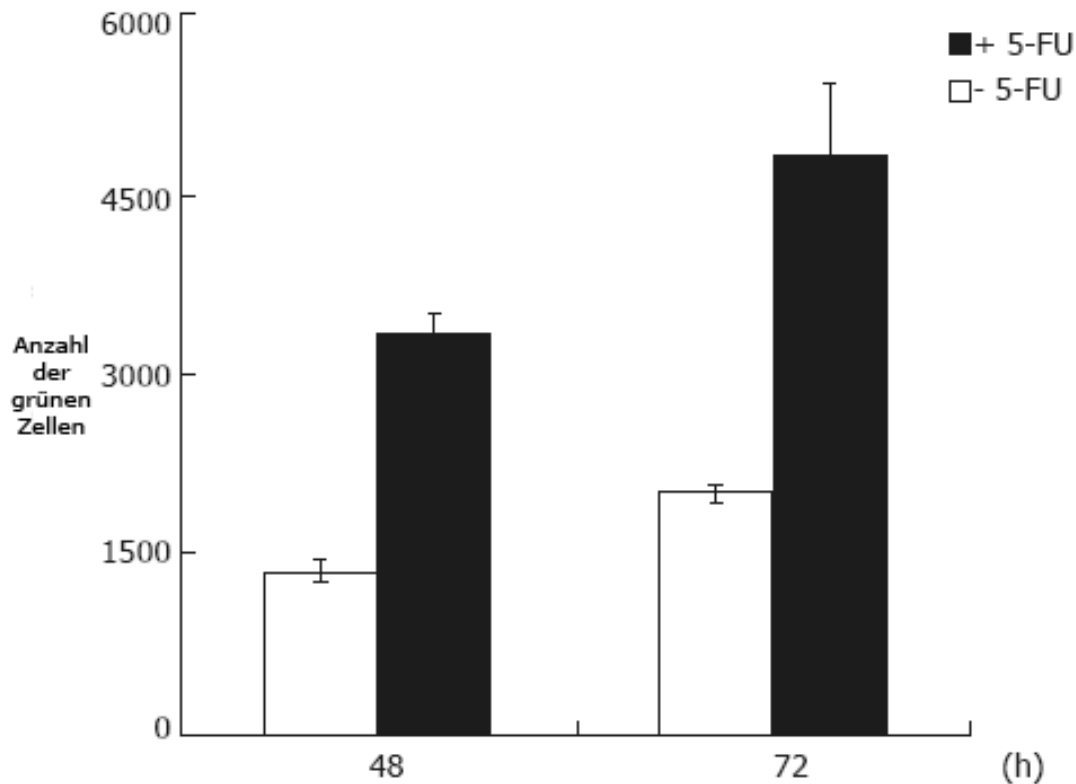


Abbildung 20: Nachweis der erhöhten Freisetzung von viralen Partikeln aus in Liposomen eingehüllten adenoviralen Formationen.

293-Zellen wurden mit dem Überstand von zentrifugierten in Liposomen eingehüllten Ad5-GFP-Lösungen mit und ohne 5-FU inkubiert. Die Anzahl der grünen Zellen wurde 48 h und 72 h nach Infektion ausgezählt. Die aufgeführten Ergebnisse ergeben sich aus dem Durchschnitt dreier Versuche, wobei der Messfehler im Bereich der Standardabweichung lag. Auf der anderen Seite führte eine Behandlung von in Liposomen eingekapselter viraler DNA mit 5-FU zu keiner DNA-Freisetzung, was die Ergebnisse einer PCR-Analyse ergaben (siehe dazu Abbildung 21).

Dies deutet darauf hin, dass der Überstand als Folge der Inkubation von Ad5, die in Liposomen verpackt waren, mit 5-FU eine höhere Konzentration an Virus enthält. Offenbar dürfte die Substanz einen störenden Effekt auf die Lipid-„Präparation“ haben, da sie die „freie“ Form gegenüber der eingekapselten von Ad5 bevorzugt.

Um zu kontrollieren ob die Behandlung mit 5-FU die Freisetzung von adenoviraler DNA auslösen könnte, wurden Proben von DNA-Liposom-Lösungen mit und ohne 5-FU in einer PCR und anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese getestet. Es zeigte sich für die adenovirale DNA keine Bande mit Ethidiumbromid, was darauf hindeutet, dass keine Freisetzung von DNA-Komponenten aus dem Liposomenkomplex in Anwesenheit von 5-FU stattgefunden hat. Zur Kontrolle wurde

der DNA-Liposomenkomplex vor der PCR gespalten und die Banden der DNA-Produkte, wie zu erwarten war, anschließend auf einem Agarosegel sichtbar gemacht (siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Auftrennung der aus der PCR-Analyse stammenden Proben mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Die PCR-Analyse zeigte keine Freisetzung viraler DNA aus den Liposomen nach einer Behandlung mit 5-FU.

Die Proben wurden jeweils in Duplikaten aufgetragen: DNA allein (Spuren 1 und 2), DNA und 9,6 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU (Spuren 3 und 4), DNA und Lipofectamin (Spuren 5 und 6), DNA und Lipofectamin und Lysepuffer (Spuren 7 und 8), DNA mit Lipofectamin und 9,6 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU (Spuren 9 und 10).

4.1.5. Morphologische Veränderungen von Lipidschichten als Reaktion auf 5-FU

Die elektronenmikroskopischen Bilder der Lipidstrukturen zeigten nach der Behandlung mit 5-FU ein vielschichtiges Motiv. Dieses ist durch eine unregelmäßige Dicke des Liposoms charakterisiert, welches durch das Verschwinden der geordneten Schichtstruktur an manchen Stellen entstand (Abbildung 22).

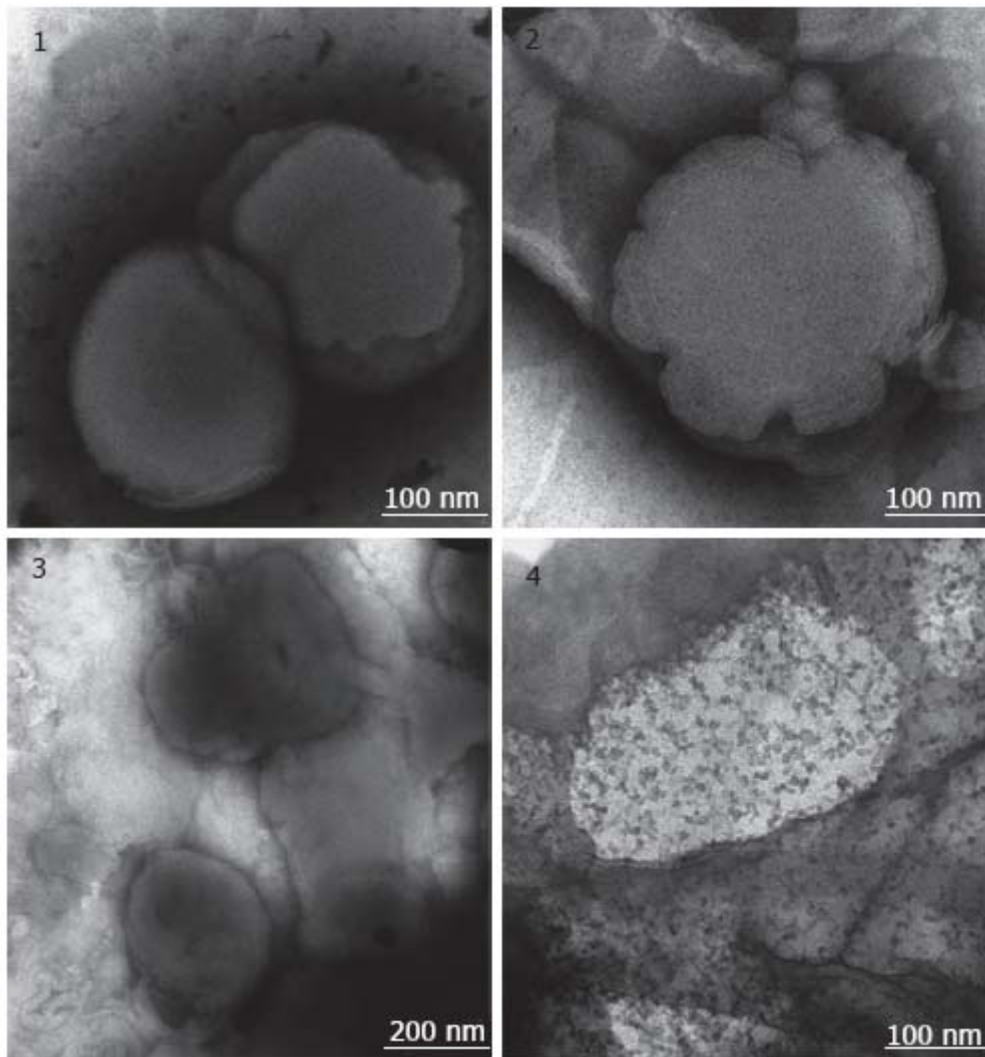


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Darstellung liposomaler Strukturen und deren Veränderungen als Reaktion auf die Gabe von 5-FU.

(1) Lipofectamin, **(2)** Lipofectamin nach der Behandlung mit 5-FU über Nacht, **(3)** Ad5-GFP in Komplexen mit Lipofectamin, **(4)** Ad5-GFP in Komplexen mit Lipofectamin nach einer Behandlung mit 5-FU über Nacht.

Ebenso ließ sich im Falle des Liposomenkomplexes, der mit 5-FU behandelt wurde, eine ungleichmäßige Lipid-Oberfläche nachweisen. Jedoch zeigten sich helle Punkte, die wahrscheinlich auf Störungen in Aufbau und Ordnung der vielen Schichten hinweisen.

4.2. Ergebnisse der *in vivo*-Versuche

Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen verstarben die Tiere Nummer 3 mit und ohne DSS und Tier 5 ohne DSS, sodass in der folgenden Auswertung der Ergebnisse von Immunhistochemie, PCR- und Western-Blot-Analyse diese nicht mehr berücksichtigt werden.

4.2.1. Ergebnisse der Immunhistochemie

4.2.1.1. Nachweis der in die Mausorgane aufgenommenen Adenoviren mittels des Hexon-Antikörpers

Die Effektivität der adenoviralen Aufnahme, mit denen die Versuchsmäuse infiziert wurden, konnte durch eine Braunfärbung des Gewebes in den Gefrierschnitten nachgewiesen werden. Diese Farbreaktion ist Folge einer Bindung des verwendeten Hexon-Antikörpers an die Antigene des Hexon-Kapsidmoleküls der Adenoviren. Zusätzlich konnte durch die Stärke der Braunfärbung auch der Grad der Infektion qualitativ bestimmt werden. Wie bereits oben schon erwähnt, dienten bei diesem Versuch insgesamt vier Tiere als Kontrolltiere (Tier 1: PBS ± DSS, Tier 2: 5-FU ± DSS). Alle weiteren Versuchstiere wurden mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad infiziert. Das Verhältnis dieser Koinfektion (bcl-2-Ad zu r-TA-Ad) betrug 4:1, welches im Voraus als solche etabliert wurde (Tier 4: Koinfektion + Doxycyclin ± DSS, Tier 5 und Tier 6: Koinfektion + Doxycyclin + 5-FU ± DSS). Im Folgenden werden die einzelnen Mausorgane (Herz, Leber, Milz, Niere, Darm und Lunge) nacheinander detailliert behandelt.

4.2.1.1.1. Herz

Bei den Herz-Gefrierschnitten aller Versuchstiere zeigte sich keinerlei bräunliche Anfärbung des Myokardgewebes. Auch die einzelnen Schnitte wiesen untereinander keine nennenswerten Unterschiede auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass Myokardzellen keine geeigneten Zielzellen für Adenoviren sind und diese so nur in geringstem Maße infiziert werden. Ein diese Annahme bekräftigender Nachweis wird später bei den Ergebnissen des bcl-2-Antikörpers deutlich gemacht.

HERZ Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	—	—	—	—	—

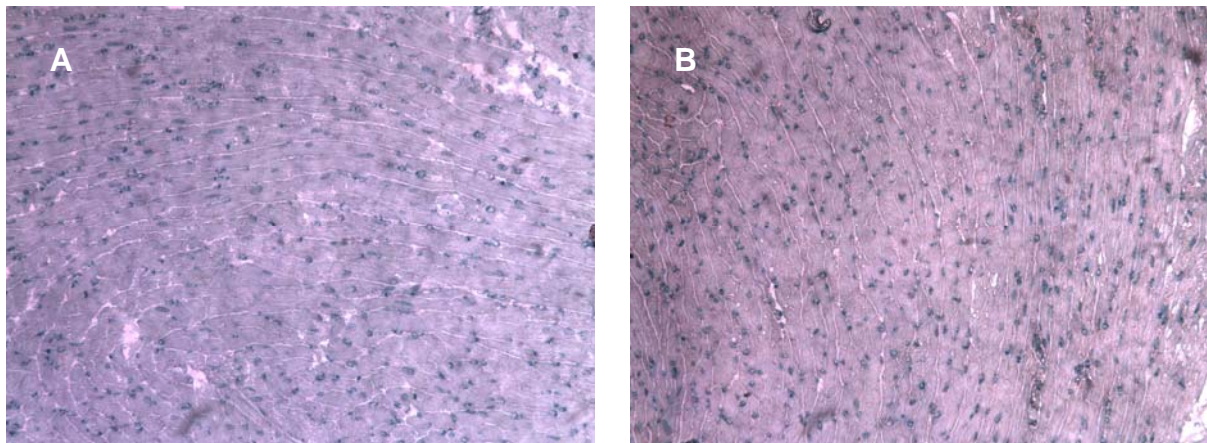


Abbildung 23: **A. Herz von Tier 4 +DSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.**
B. Herz von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.1.2. Leber

Wie zu erwarten konnte bei den Kontrolltieren 1 und 2 keine Braunfärbung sowohl in den Parenchym- als auch in den Stromazellen der Leber nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen alle anderen Tiere in den Leberschnitten eine Infektion mit Adenoviren nach. So zeigte sich eine besonders starke Braunfärbung der Hepatozyten in den Schnitten der Tiere 4 (ohne DSS) und Tier 6 (ohne DSS). Etwas weniger, aber dennoch deutlich bräunlich angefärbt, waren die Schnitte der Tiere 5 und 6 (jeweils mit DSS). Eine bevorzugte Lokalisation der Adenoviren im hepatischen Gewebe konnte nicht gefunden werden. Parenchym und Stroma der untersuchten Leberorgane färbten sich gleichmäßig an.

LEBER Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	++	+	++	+	+

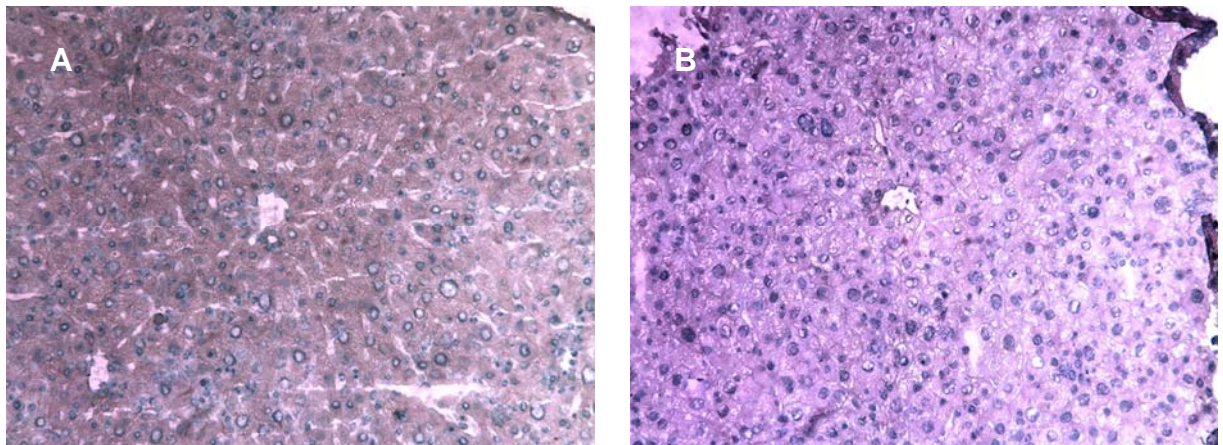


Abbildung 24: **A. Leber von Tier 6 ØDSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.**
B. Leber von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.1.3. Milz

Etwas deutlicher zeigten sich die Unterschiede in der Infektion der Milzgewebe mit Adenoviren, wobei bei allen Versuchstieren (mit Ausnahme der Kontrolltiere) die Braunfärbung und damit Anlagerung des Hexon-Antikörpers besonders am Endothel lokalisiert war. Bei Tier 4 sowohl mit als auch ohne DSS zeigte sich dabei nur eine geringe Veränderung. Etwas stärker färbte sich das Endothel der Milz bei Tier 5. Im Gegensatz dazu erschienen die Milzendothelien der Tiere 6 mit und ohne DSS, die beide simultan zur Ad5-Infektion mit 5-FU vorbehandelt wurden, deutlicher braun gefärbt, wobei Tier 6 mit DSS eine noch geringfügig stärkere Reaktion aufwies. Dies lässt wiederum den Schluss zu, dass sich auch in der Milz eine größere Menge an Adenoviren befinden muss, nachdem diese Tiere mit 5-FU behandelt wurden.

MILZ				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
Kontrolle								
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	(+)	(+)	+(+)	+	++

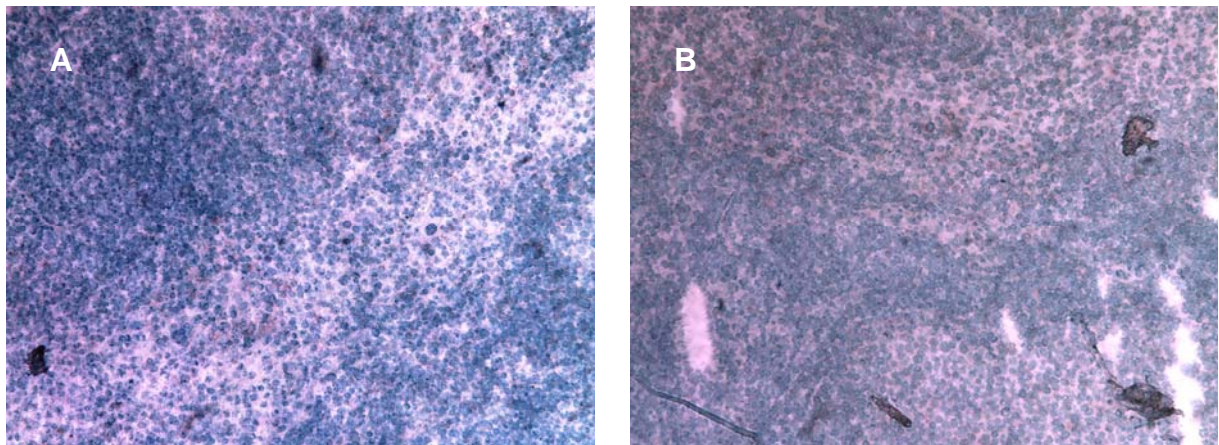


Abbildung 25: **A. Milz von Tier 5 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.**
B. Milz von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.1.4. Niere

Die Ergebnisse der Immunhistochemie der Nieren-Schnitte mit dem Hexon-Antikörper sind denen der Milz-Schnitte sehr ähnlich. So zeigten sich wiederum deutliche Unterschiede in der Braunfärbung bei den Organen, die mit bzw. ohne 5-FU behandelt wurden. Eine leichte Anfärbung konnte bei den Tieren 4 mit und ohne DSS und Tier 5 mit DSS nachgewiesen werden. Dabei wurden Unterschiede in der Lokalisation der Anlagerung des Hexon-Antikörpers gefunden. So erschien bei Tier 4 ohne DSS nur die Nierenrinde braun gefärbt, wohingegen das Nierenmark keinerlei Veränderung aufzeigte. Diese unterschiedliche Verteilung innerhalb des Organs ließ sich bei Tier 4 mit DSS und Tier 5 mit DSS nicht nachweisen. Wie bei den beiden vorher angesprochenen Organen Leber und Milz zeigte sich auch bei der Niere der Tiere 6 mit und ohne DSS eine qualitativ höhere Menge an Adenoviren im Gewebe im Gegensatz zu den anderen Versuchstieren. Dabei lies sich in der Nierenrinde des

Tier 6 mit DSS eine geringfügig höhere Braunfärbung nachweisen als im Nierenmark. Keine Unterschiede in der Lokalisation der Hexon-Antikörper bezüglich Mark und Rinde konnten bei Tier 6 ohne DSS gefunden werden, deren bräunliche Anfärbung insgesamt noch etwas stärker war als bei Tier 6 mit DSS. Wenn auch nicht so klar ersichtlich wie bei den anderen untersuchten Organen könnte die vermehrte Anfärbung der Tiere 6 ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass 5-FU eine Infektion mit Adenoviren erleichtert.

NIERE				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
Kontrolle								
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	Rinde + Mark —	+	++	+	Rinde + Mark (+)

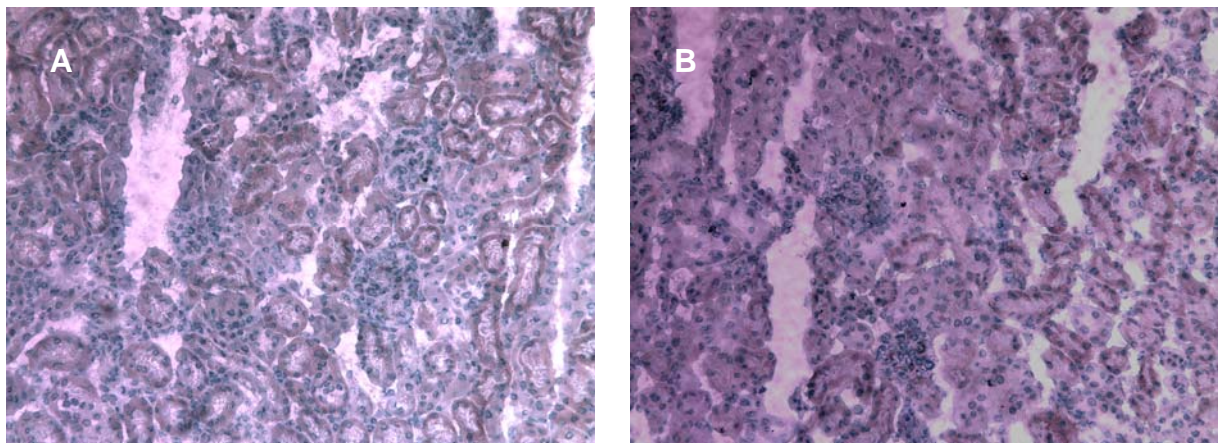


Abbildung 26: A. Niere von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.
B. Niere von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.1.5. Darm

Der Darm galt in unserer Studie besonderem Interesse, da die eine Hälfte der Versuchmäuse mit DSS (dextran sulphate sodium) behandelt wurde, um so eine Kolitis künstlich zu erzeugen. Dabei stellte sich die Frage, inwieweit sich Differenzen bei der Ad5-Aufnahme in Kolitis- bzw. Nicht-Kolitis-Zellen ergeben und ob 5-FU trotz einer Kolitis den gleichsinnigen Effekt auf die Ad5-Infektion zeigt wie bei den anderen

Organen. Die nicht mit 5-FU behandelten Versuchstiere Tier 4 mit und ohne DSS und Tier 5 mit DSS wiesen alle eine ähnlich starke Braunfärbung des Kolons auf, die in der Intensität der Färbung in etwa der der Niere gleichen. Demgegenüber zeigte sich bei beiden Tieren 6 mit und ohne DSS ein leicht unterschiedlicher Grad der Braunfärbung, der dennoch deutlich höher lag als bei den anderen Tieren. Beim Darm von Tier 6, das mit DSS vorbehandelt wurde und damit eine künstlich erzeugte Kolitis aufwies, waren die Hexon-Antikörper vorwiegend an den Stellen lokalisiert, an denen die Entzündung besonders stark zu sehen war. Im Gegensatz dazu schien das Gewebe von Tier 6 ohne DSS gleichmäßig mit Adenoviren infiziert zu sein. Der Nachweis der höheren Rate an Adenoviren in den mit 5-FU behandelten Mäusen (Tiere 6) weist wiederum auf den positiven Effekt von 5-FU im Zusammenhang mit der Infektion von Adenoviren hin.

DARM								
Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	+	+	++	+	++

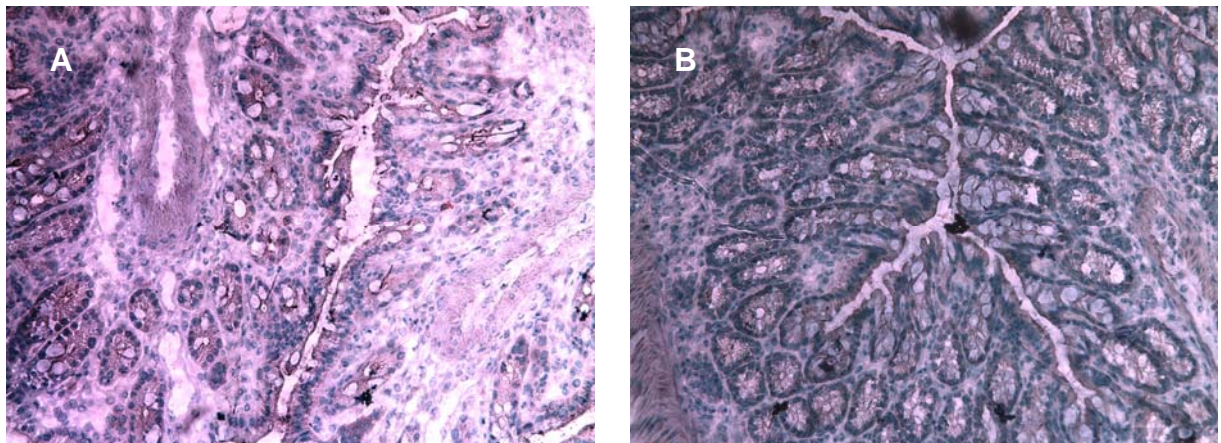


Abbildung 27: A. Darm von Tier 5 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.
 B. Darm von Tier 6 ØDSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.1.6. Lunge

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung auf Hexon fielen bei den einzelnen Versuchstieren sehr unterschiedlich aus. So konnte bei den Tieren 5 mit DSS und 6 mit DSS keinerlei Braunfärbung nachgewiesen werden, was allerdings auch an der eher schlechten Qualität der Gefrierschnitte liegen könnte. Tier 4 ohne DSS zeigte eine geringe Anfärbung, die gleichmäßig im gesamten Lungengewebe lokalisiert war. Eine ähnlich geringe Färbung konnte auch bei Tier 4 mit DSS gefunden werden, allerdings schienen die Alveolen aufgrund der Intensität der Braunfärbung etwas stärker mit Antikörpern beladen zu sein als das restliche Lungengewebe. Ebenso wies das Gewebe um die Alveolen im Gegensatz zum restlichen Lungengewebe bei Tier 6 ohne DSS eine Anlagerung von Hexon-Antikörpern auf.

LUNGE Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	(+)	Alveolen (+)	Alveolen (+)	—	—

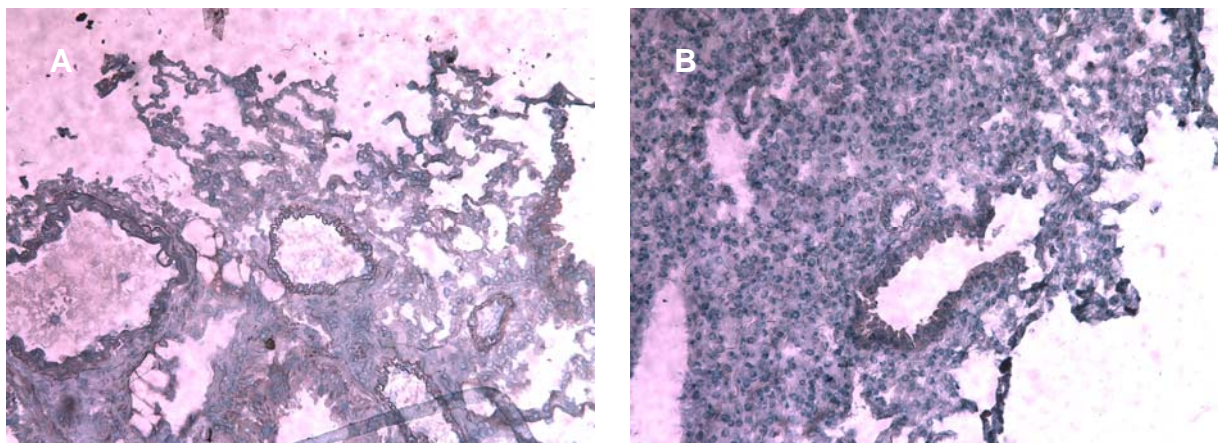


Abbildung 28: A. Lunge von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.
B. Lunge von Tier 6 ØDSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf Hexon.

4.2.1.2. Nachweis des humanen bcl-2 mittels des bcl-2 Antikörpers

Um die mit humanem bcl-2-gekoppelten Adenoviren (Ad5) in den Organen der infizierten Mäuse (Tiere 5 und 6) zu detektieren, wurde ein immunhistochemisches Verfahren mit einem vorher beschriebenen bcl-2-Antikörper durchgeführt. Zudem wurden für den Vergleich und die Auswertung der Ergebnisse zwei humane Kolon-Paraffinschnitte mitgeführt, der eine als Positiv- der andere als Negativkontrolle. Analog der Auswertung der Immunhistochemie mit dem Hexon-Antikörper soll im Folgenden jedes Organ der Versuchsmäuse einzeln im Vergleich zu den anderen beschrieben werden.

4.2.1.2.1. Herz

Analog der Herz-Gefrierschnitte, die auf Hexon untersucht wurden, lieferte auch die Immunhistochemie mit dem bcl-2-Antikörper bei allen Versuchstieren keine auswertbaren Ergebnisse. So konnte in keinem der insgesamt neun Herz-Schnitte eine Braunfärbung beobachtet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Qualität der Gefrierschnitte unzureichend für eine immunhistochemische Analyse waren, oder aber, dass Herz kein geeignetes Zielorgan für Adenoviren darstellt.

HERZ								
Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	—	—	—	—	—

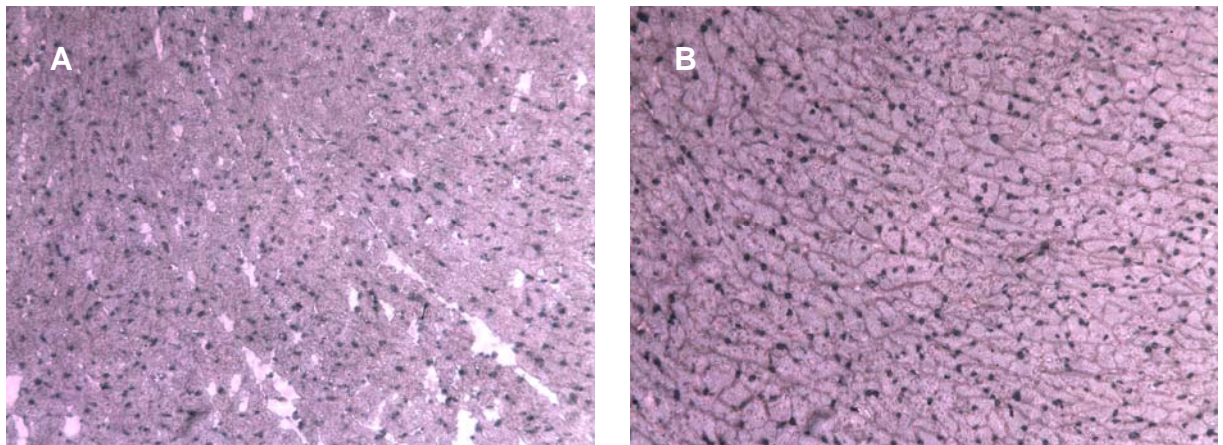


Abbildung 29: **A. Herz von Tier 4 +DSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.**
 B. Herz aus Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.

4.2.1.2.2. Leber

Die immunhistochemische Analyse der Lebergewebe mit dem bcl-2-Antikörper erbrachte bei allen Versuchstieren ein vergleichbares Bild. So zeigte sich in allen Schnitten der Mäuse, die mit Adenoviren infiziert waren (Tier 4 ± DSS, Tier 5 + DSS, Tier 6 ± DSS) eine mäßige bis starke Braunfärbung im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tier 1± DSS und Tier 2 ± DSS). Eine genauere Unterscheidung innerhalb der Anfärbung war nicht möglich.

LEBER								
Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)

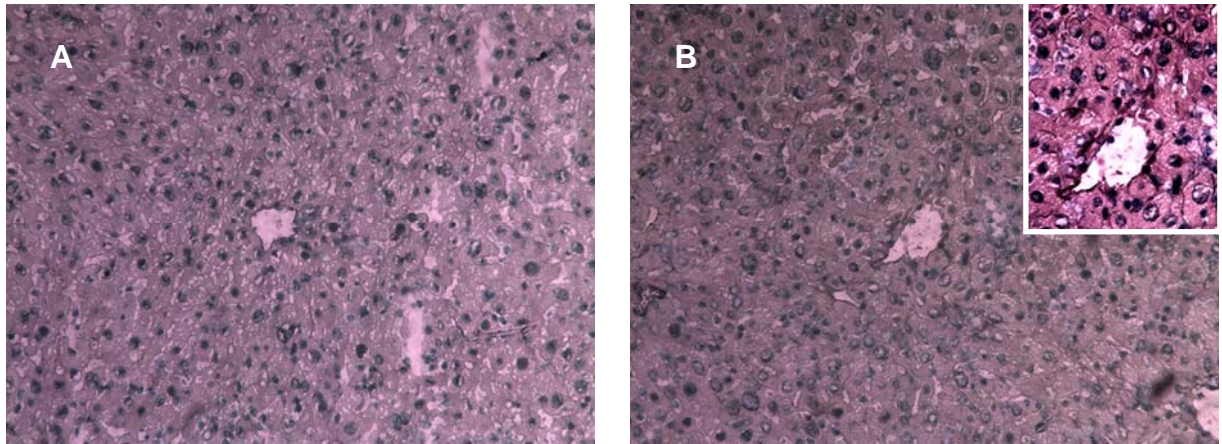


Abbildung 30: **A. Leber von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.**
 B. Leber von Tier 6 ØDSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.

4.2.1.2.3. Milz

Die Gefrierschnitte der Milz wiesen nach deren Reaktion mit dem bcl-2-Antikörper ein gemischtes Bild auf. So konnte die Braunfärbung bei manchen Schnitten sehr deutlich beobachtet werden, bei anderen jedoch konnte kein Unterschied zu den Kontrollen gesehen werden, da das histologische Bild vom Hintergrund dominierte. Dies war bei den Schnitten von Tier 4 mit DSS und Tier 5 mit DSS der Fall, so dass diese nicht ausgewertet werden konnten. Demgegenüber zeigte sich bei Tier 4 ohne DSS eine deutliche histologische bräunliche Anfärbung, die vorwiegend am Endothel des Milzgewebes lokalisiert war. Ebenso konnte bcl-2 bei den Schnitten von Tier 6 mit und ohne DSS deutlich detektiert werden. Die Immunreaktion äußerte sich bei Tier 6 mit DSS in geringem Maße stärker als bei Tier 6 ohne DSS, wobei im Gegensatz zu Tier 4 ohne DSS das Gewebe homogen gefärbt war.

MILZ				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
Kontrolle								
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	Endothel ++	Hintergrund	+(+)	Hintergrund	++

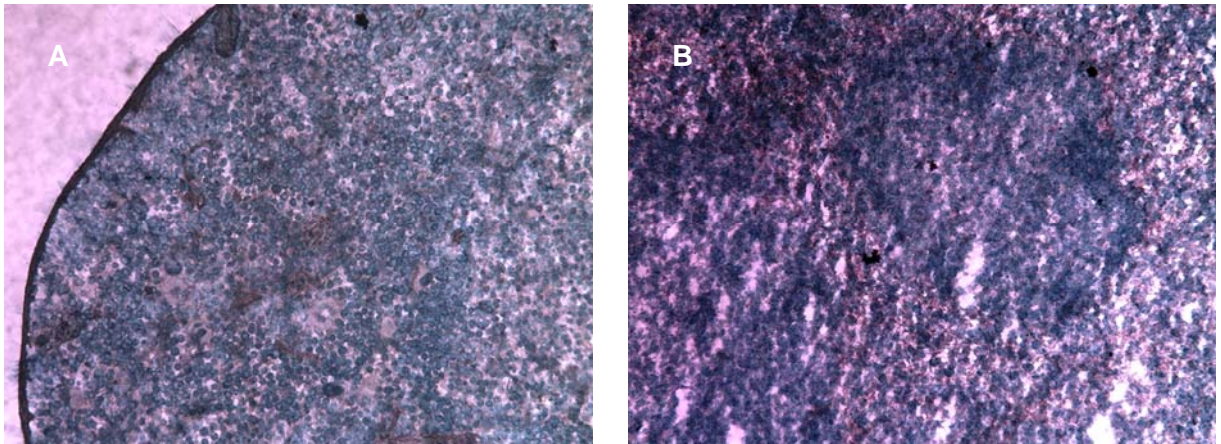


Abbildung 31: **A. Milz von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt mit bcl-2.**
 B. Milz von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt mit bcl-2.

4.2.1.2.4. Niere

Wie bereits bei der Auswertung der Immunhistochemie der Nieren-Schnitte mit dem Hexon-Antikörper deutlich gemacht wurde, erwiesen sich die Nieren-Schnitte auch bei der bcl-2-Immunreaktion als sehr gut geeignet. Alle mit Adenoviren infizierten Mäuse ließen nach der Immunreaktion mit dem bcl-2-Antikörper einen eindeutigen Nachweis von bcl-2-Antigenen zu. Bei Tier 4 ohne DSS konnte ein Unterschied in der Lokalisation der bcl-2-Antigene bezüglich Nierenmark und Nierenrinde gefunden werden, wobei diese vereinzelt im Bereich des Marks zu finden waren. Die Nierenrinde von Tier 4 ohne DSS konnte aufgrund der starken Hintergrund-Überlagerung nicht genau beurteilt werden. Eine etwas deutlichere Immunreaktion zeigte sich bei den Nieren-Schnitten von Tier 4 mit DSS, die homogen über das ganze Präparat verteilt war. Geringfügig weniger färbte sich das Nierenparenchym und –Stroma beim Präparat von Tier 5 mit DSS an, wobei die Nierenglomerula von der Immunreaktion ausgespart blieben. Ein ähnliches Bild lieferte der Schnitt der Niere von Tier 6 mit DSS, denn auch hier konnte man ein nicht homogen gefärbtes Bild erkennen. So waren die Nierenglomerula etwas weniger stark angefärbt als das restliche Gewebe. Dennoch ließ sich in keinem anderen Präparat eine so starke Braunfärbung des Gewebes und damit eine so deutliche Immunreaktion mit dem bcl-2-Antikörper nachweisen wie bei Tier 6 mit DSS. Die Farbreaktion beim Nierenschnitt von Tier 6 ohne DSS wies ebenfalls auf eine deutliche Anlagerung der bcl-2-

Antikörper hin, wenn auch geringfügig schwächer als beim Schnitt von Tier 6 mit DSS. Insgesamt schienen die Schnitte der Versuchstiere, die mit 5-FU vorbehandelt wurden (Tier 5 mit DSS, Tier 6 mit und ohne DSS), eine höhere Rate an Adenoviren zu enthalten als alle anderen Schnitte, was wiederum Hinweise für den positiven Effekt von 5-FU in Bezug auf adenovirale Infektionen geben kann.

NIERE				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
Kontrolle								
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	Rinde + Mark —	++ Glomerula (+)	++(+)	+(+) Glomerula	+++ Glomerula

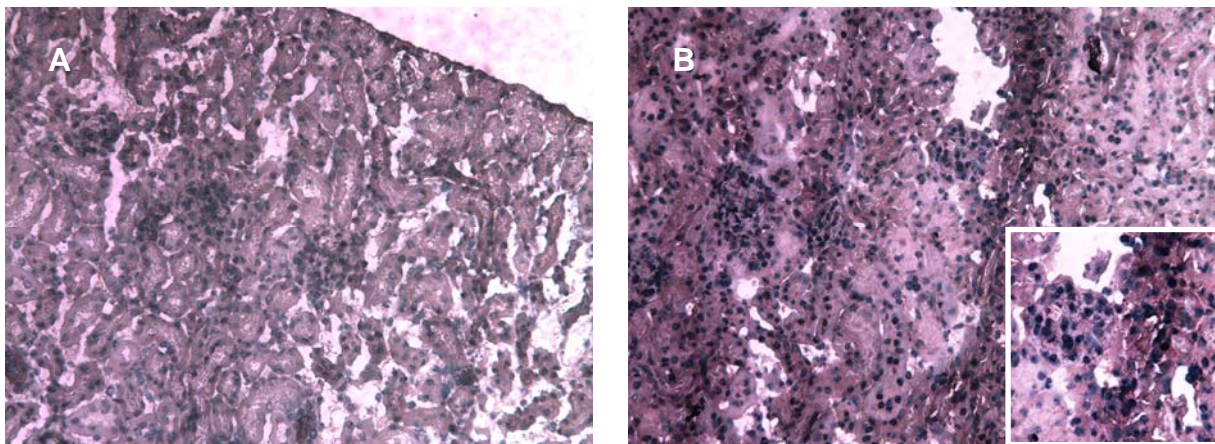


Abbildung 32: A. Niere von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.
B. Niere von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2.

4.2.1.2.5. Darm

Die immunhistochemische Analyse der Darmschnitte auf bcl-2-Antikörper ergab ähnliche Ergebnisse wie die Analyse mittels des Hexon-Antikörpers. Das Darm-Präparat von Tier 4 mit DSS zeigte nur eine geringfügige bräunliche Anfärbung in den Randbereichen des Schnittes. Schon etwas stärker erschien die Farbreaktion beim Kolon von Tier 4 ohne DSS, wobei besonders das Kolonepithel angefärbt war. Am deutlichsten konnte die Immunreaktion mit dem bcl-2-Antikörper im Präparat von Tier 5 mit DSS nachgewiesen werden. In diesem Schnitt war insbesondere die

Kolonschleimhaut angefärbt, die durch DSS künstlich erzeugte Kolitis war jedoch nur wenig zu sehen. Bei den Tieren 6 mit und ohne DSS konnten deutliche Unterschiede gefunden werden, die jedoch wahrscheinlich auf die eher schlechtere Qualität des Präparats von Tier 6 mit DSS zurückgeführt werden muss und weniger auf die bei Tier 6 mit DSS erzeugte Kolitis. So war die Braunfärbung beim Darmschnitt von Tier 6 ohne DSS deutlicher ersichtlich als bei Tier 6 ohne DSS.

DARM Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1 Ø 5-FU Ø DSS	T1 Ø 5-FU + DSS	T2 + 5-FU Ø DSS	T2 + 5-FU + DSS	T4 Ø 5-FU Ø DSS	T4 Ø 5-FU + DSS	T6 + 5-FU Ø DSS	T5 + 5-FU + DSS	T6 + 5-FU + DSS
—	—	—	—	Epithel +	Am Rand (+)	+(+)	++	(+)

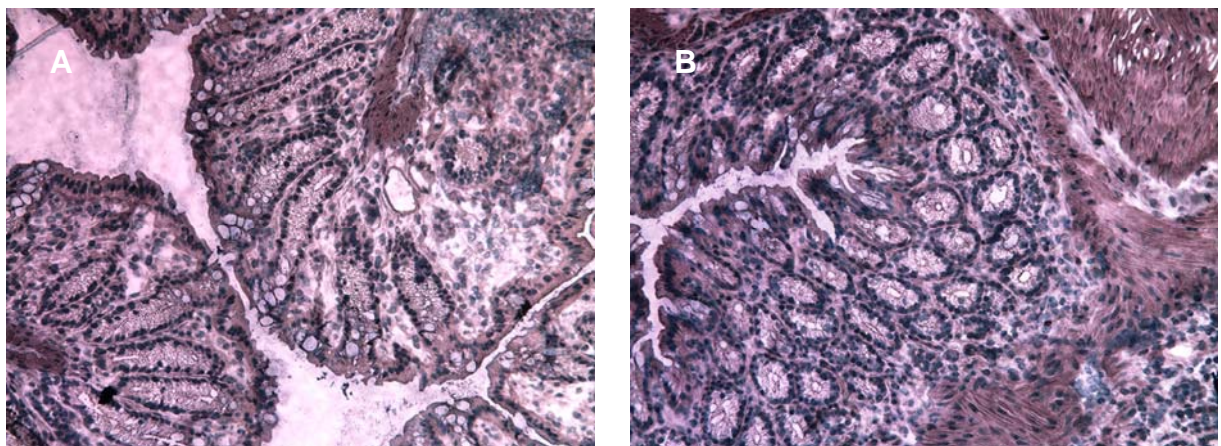


Abbildung 33: A. Darm von Tier 4 ØDSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2
B. Darm von Tier 5 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2

4.2.1.2.6. Lunge

Die Gefrierschnitte der Lungen unserer Versuchstiere zeigten nach der Inkubation mit dem bcl-2-Antikörper alle ein relativ ähnliches Bild. Bei Tier 4 ohne DSS konnte kein Unterschied in der Färbung im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden werden. Tier 4 mit DSS, Tier 5 mit DSS und Tier 6 mit DSS wiesen aufgrund der Braunfärbung eine mäßig starke Immunreaktion mit dem bcl-2-Antikörper auf. Am stärksten positiv angefärbt zeigte sich das Präparat von Tier 6 ohne DSS, wobei

auch wie bei allen anderen Schnitten die Braunfärbung homogen über das gesamte Präparat verteilt war und sich nicht wie bei der Immunhistochemie mit dem Hexon-Antikörper Unterschiede innerhalb der Anfärbung des Lungengewebes ergaben.

LUNGE								
Kontrolle				Koinfektion: bcl-2-Ad/r-TA-Ad				
T1	T1	T2	T2	T4	T4	T6	T5	T6
Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	Ø 5-FU	Ø 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU	+ 5-FU
Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	Ø DSS	+ DSS	+ DSS
—	—	—	—	wie Kontrolle	+(+)	++	+(+)	+(+)

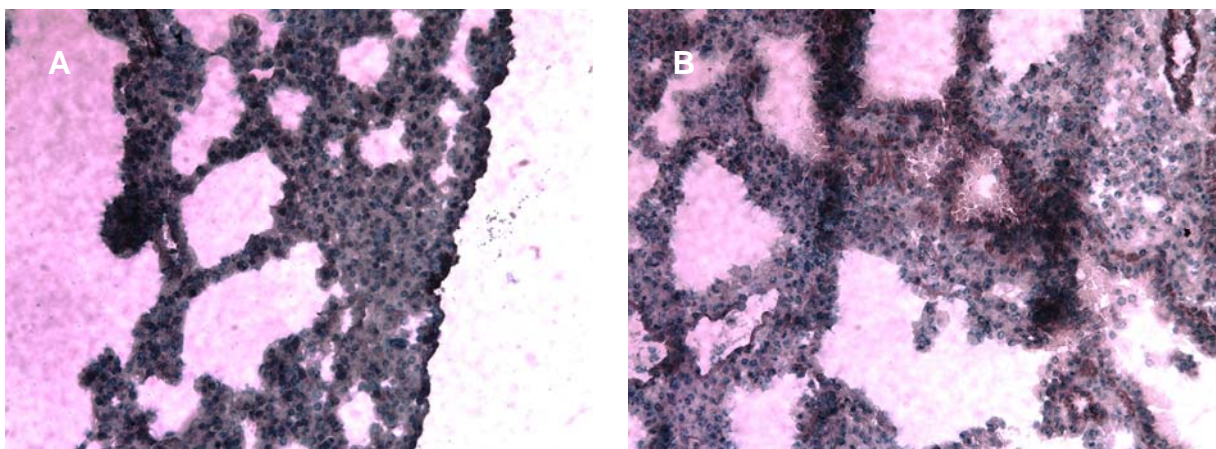


Abbildung 34: A. Lunge von Tier 4 +DSS Ø5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2
 B. Lunge von Tier 6 +DSS +5-FU immunhistochemisch angefärbt auf bcl-2

4.2.2. Ergebnisse der H.E.-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente zur histologischen Beurteilung unserer Kolon-Maus-Gewebeschnitte, insbesondere dem Vergleich zwischen den mit bzw. ohne DSS behandelten Mäusen. Gemäß den in der Literatur beschriebenen pathologischen Gewebsveränderungen während einer Kolitis ulcerosa konnten wir bei allen mit DSS behandelten Tieren eine gestörte Schleimhautstruktur und -architektur nur Mukosa und Submukosa betreffend erkennen. So zeigten sich z.T. ödematös geschwollene Schleimhäute mit leichten Blutungen und kleinen Ulzerationen (Sartor 1997; Neurath and Schurmann 2000). Neben Schleimhautabflachungen, die mit dem Verlust des Reliefs einher gingen, konnte

auch eine überschießende Regeneration mit der Bildung von Pseudopolypen beobachtet werden (Roediger 1988; Ditschkowski, Einsele et al. 2003). Das histologische Bild wird von Granulozyten, Lymphozyten, Histozyten und Zelldetritus vermehrt besonders in den Krypten bestimmt, wobei die Zahl der Becherzellen stark reduziert ist (Almy 1961). Diese Gewebeveränderungen konnte in den Darmschnitten der Vergleichsmäuse nicht nachgewiesen werden.

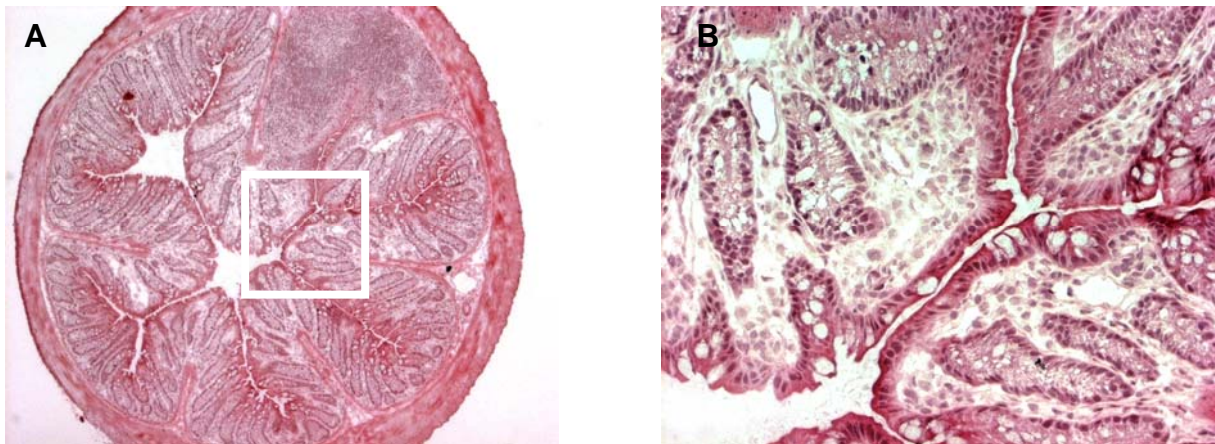


Abbildung 35: H.E.-Färbung vom Darm des Tieres T4 ohne DSS in Übersichtsaufnahme (A) und vergrößertem Ausschnitt (B).

Das histologische Bild zeigt gesundes Darmgewebe mit normaler Kryptenarchitektur, zahlreichen Becherzellen und wenigen Lymphozyten innerhalb der Mukosa.

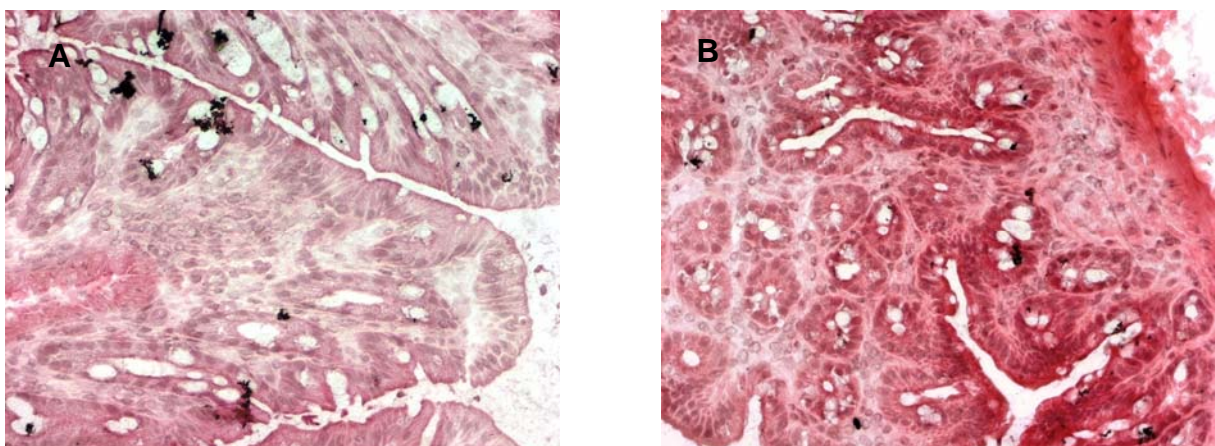


Abbildung 36: A. H.E.-Färbung vom Darm des Tieres 4 mit DSS. B. H.E.-Färbung vom Darm des Tieres 5 mit DSS.

Das histologische Bild beider Tiere zeigt ein mittels DSS induziertes entzündlich verändertes Darmgewebe. Besonders auffällig sind in Bild A die zahlreichen eingewanderten Lymphozyten als Immunreaktion auf die Entzündung. Bild B weist eine deutliche Kryptenarchitekturstörung auf.

4.2.3. Ergebnisse der PCR-Analyse

Um eine genaue Aussage über das Ausmaß der Aufnahme der Ad5 in die Zellen der verschiedenen Organe unserer Versuchstiere treffen zu können, erfolgte der Nachweis von bcl-2 und der E4-Box auf DNA-Ebene mittels der quantitativen Analyse durch den Light-Cycler. Zur Faktor-Normierung diente β -Aktin, auf das die Gewebe ebenfalls untersucht wurden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses Versuches tabellarisch dargestellt.

4.2.3.1. Nachweis von bcl-2 und der E4-Box

4.2.3.1.1. Herz

Die PCR-Analyse von Proben der Herzorgane unserer 9 Versuchstiere liefert eindeutige Ergebnisse bei Gegenüberstellung der Tiere, die mit DSS zu denen, die ohne DSS behandelt worden sind. So weisen die mit DSS über das Trinkwasser gefütterten Tiere eine höhere Menge an bcl-2-DNA auf als ihre Kontrollen ohne DSS. Ähnliches kann man auch bei der Detektion der E4-Box erkennen. Bis auf das Tier 4 ohne DSS zeigt sich auch hier wieder eine, wenn auch nicht so stark ausgeprägte, größere Menge an DNA bei den Mäusen, die mit DSS behandelt worden sind. In Bezug auf die Gabe von 5-FU konnte bei den Herzen der Mäuse kein signifikant größerer Unterschied zwischen den einzelnen Tieren gefunden werden. Für bcl-2 konnte eine besonders hohe Infektion mit Ad5 im Myokard von Tier 5 mit DSS nachgewiesen werden, wohingegen die Herzen der Tiere T6 mit und ohne DSS keinen oder nur einen geringgradig höheren Wert aufweisen als die Tiere, die mit der Koinfektion keine gleichzeitige Injektion von 5-FU erhielten. Auch der Nachweis der E4-Box liefert keinen deutlichen Hinweis auf eine höhere Infektionsrate bei den Tieren, die mit 5-FU behandelt wurden im Gegensatz zu den Kontrolltieren ohne 5-FU. Als Negativ-Kontrollen dienten die Tiere 1 und 2 jeweils mit und ohne DSS, die wie zu erwarten keine DNA für bcl-2 oder die E4-Box aufweisen.

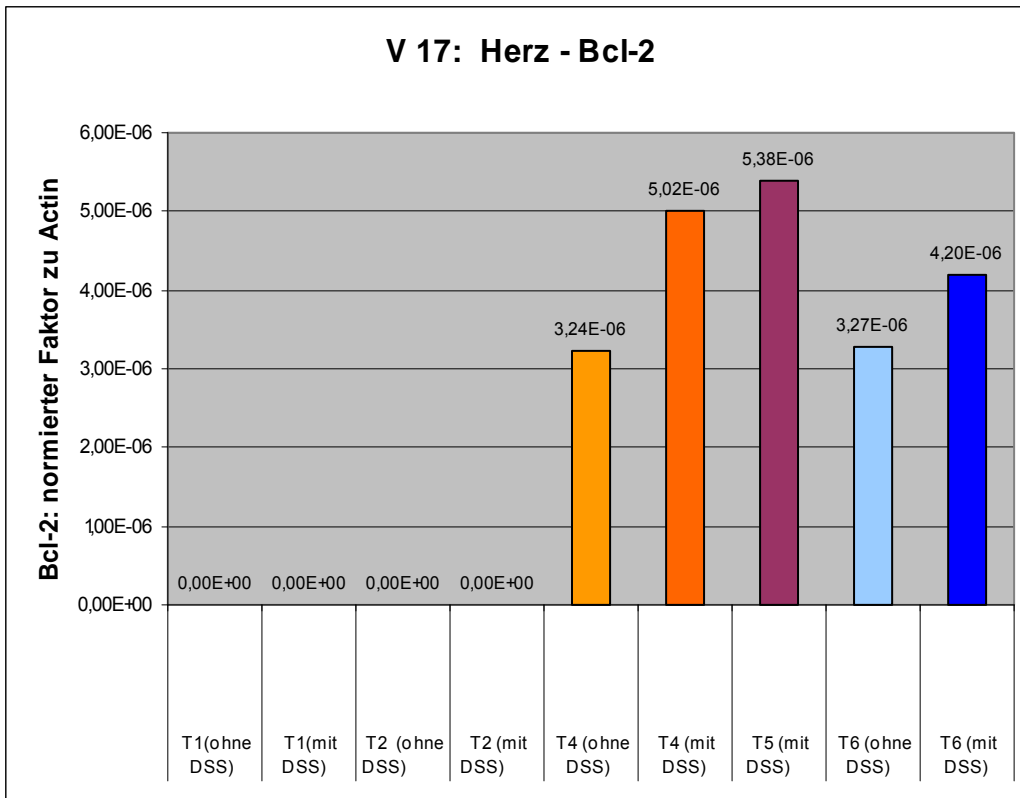


Abbildung 37: PCR-Analyse der Herzpräparate der neun Versuchsmäusen auf bcl-2.

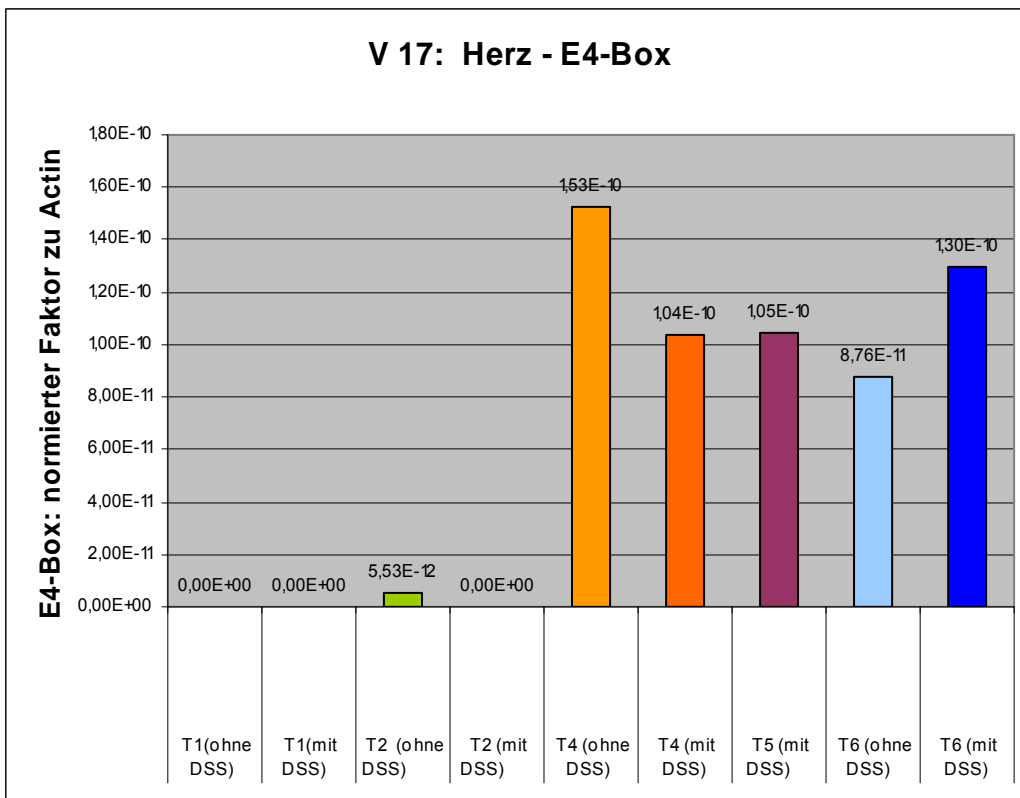


Abbildung 38: PCR-Analyse der Herzpräparate der neun Versuchsmäusen auf die E4-Box.

4.2.3.1.2. Leber

Bei Untersuchung der Leberorgane unserer Versuchsmäuse erhielten wir eine 10 bis 100-fach höhere Ausbeute an DNA sowohl für bcl-2 als auch für die E4-Box im Vergleich zu allen anderen Organen. So erreicht der Nachweis von bcl-2 in der Leber Werte zwischen 1 und $1,88 \times 10^{-4}$ als normierter Faktor zu β -Aktin, wogegen sich die Zahlen bei den anderen fünf Organen zwischen $2,93 \times 10^{-6}$ (Darm) und $6,05 \times 10^{-5}$ (Lunge) bewegen. Beim Nachweis der E4-Box in den Leberorganen liegen die Werte zwischen $2,1 \times 10^{-9}$ und $3,52 \times 10^{-9}$ im Gegensatz zu den restlichen Organen, bei denen Werte zwischen $1,92 \times 10^{-11}$ (Darm) und $6,92 \times 10^{-10}$ (Lunge) gefunden werden. Trotz des höheren DNA-Nachweises in der Leber kann kein eindeutiger Rückschluss auf die Wirkungen von 5-FU gezogen werden, da zwar bei den Tieren 5 und 6 jeweils mit DSS höhere Werte für bcl-2 gefunden werden, aber die geringste Menge an DNA bei Tier 6 ohne DSS zu finden ist. Im Gegensatz dazu weist Tier 4 ohne DSS, das zur Koinfektion mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad kein 5-FU injiziert bekam, mit einem Wert von $1,88 \times 10^{-4}$ die größte DNA-Menge auf. Anders stellen sich die Ergebnisse bei der Untersuchung der Leberorgane auf die E4-Box dar. Hier zeigt sich besonders bei den Tieren 6 mit und ohne DSS, die beide mit 5-FU vorbehandelt wurden, eine deutlich erfolgreichere Infektion als bei den Tieren 4 mit und ohne DSS, die kein 5-FU bekamen. Der Größenunterschied der DNA-Mengen zwischen bcl-2 und der E4-Box jeweils als normierter Faktor zu β -Aktin weist wie bei allen anderen fünf Organen einen Wert von 10^{-5} auf. Für bcl-2 und die E4-Box konnte wiederum in den Negativkontrollen der Tiere 1 und 2 jeweils mit und ohne DSS keine DNA nachgewiesen werden.

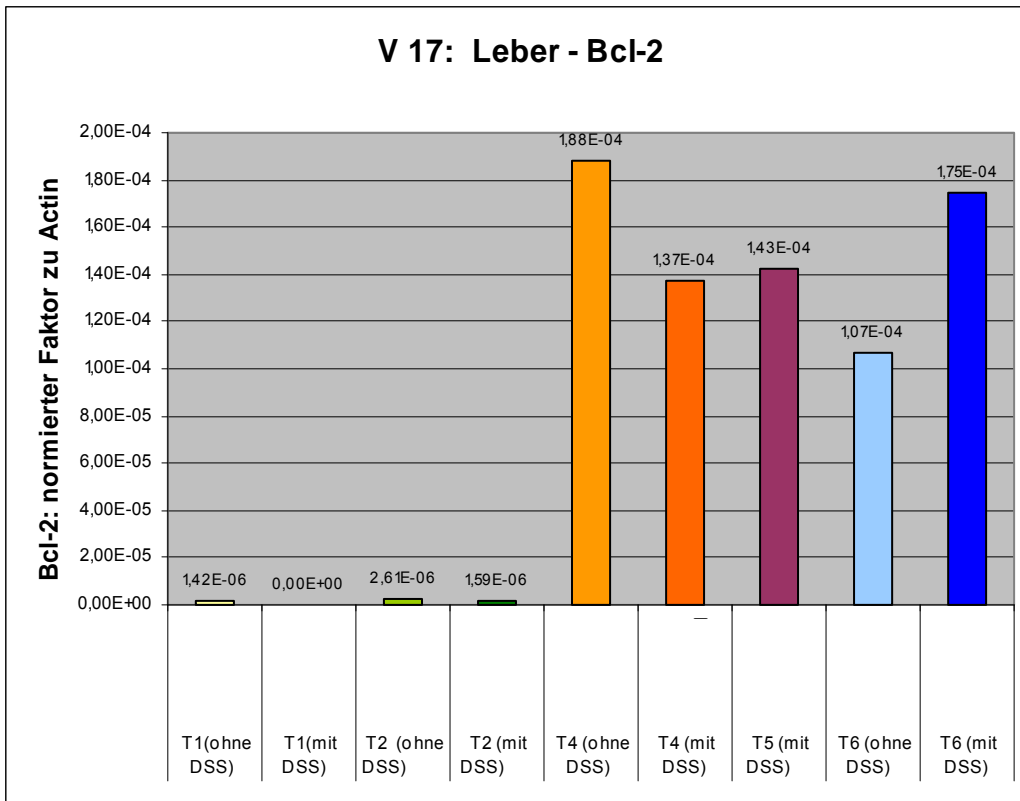


Abbildung 39: PCR-Analyse der Leberpräparate der neun Versuchsmäusen auf bcl-2.

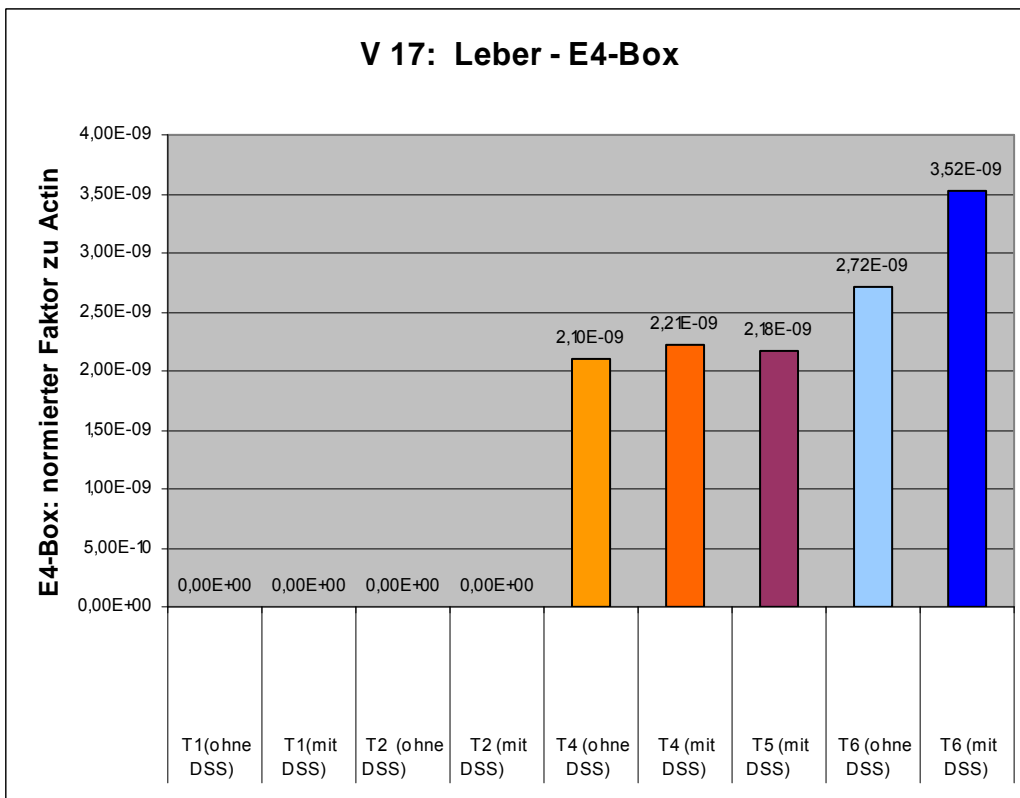


Abbildung 40: PCR-Analyse der Leberpräparate der neun Versuchsmäusen auf die E4-Box.

4.2.3.1.3. Niere

Ein ganz anderes Bild der DNA-Werte zeigt sich bei der Analyse der Nieren unserer Mäuse. So unterscheiden sich die DNA-Mengen der Nieren sowohl für bcl-2 als auch die E4-Box untereinander viel stärker als bei allen anderen Organen. Dagegen erkennt man ein sehr ähnliches Bild beim Vergleich der PCR-Analysen, sobald man die Ergebnisse für bcl-2 mit denen der E4-Box innerhalb der Nieren vergleicht. Das bedeutet, dass sowohl bei Tier 4 ohne DSS als auch bei Tier 5 mit DSS signifikant höhere Werte ersichtlich sind als bei den Nieren der anderen Tiere, auch wenn diese im Vorfeld gleich behandelt wurden. Die geringsten Werte ($6,36 \times 10^{-6}$ für bcl-2 und $6,24 \times 10^{-11}$ für die E4-Box) lassen sich bei der Niere von Tier 6 mit DSS nachweisen, obwohl dieses Tier ebenso wie Tier 5 mit DSS zur Injektion von bcl-2-Ad und r-TA-Ad gleichzeitig 5-FU gespritzt bekam. Insgesamt liegen die DNA-Mengen für bcl-2 und die E4-Box höher als bei den Organen Herz, Milz und Darm.

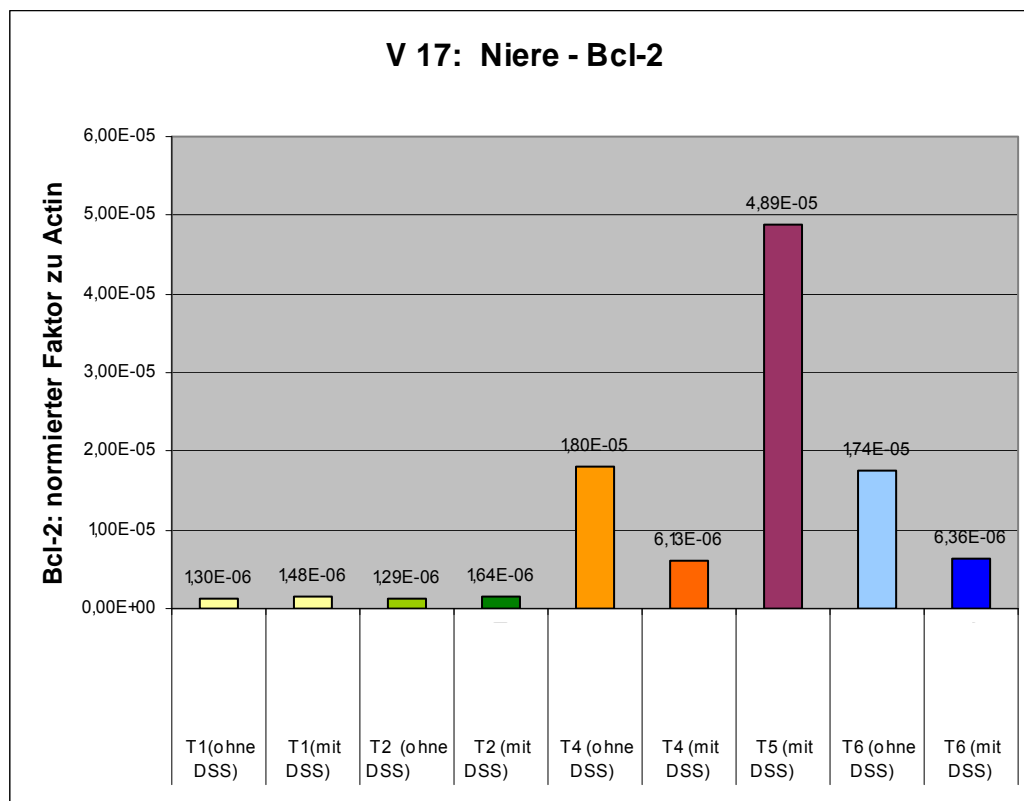


Abbildung 41: PCR-Analyse der Nierenpräparate der neun Versuchsmäuse auf bcl-2.

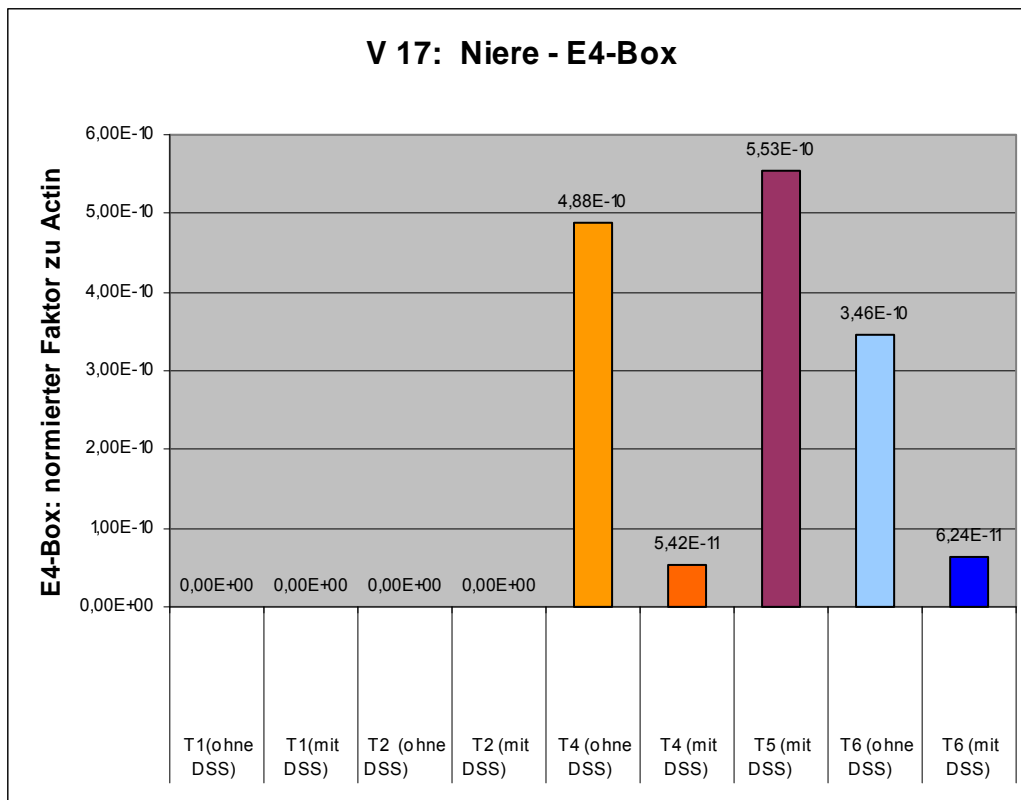


Abbildung 42: PCR-Analyse der Nierenpräparate der neun Versuchsmäuse auf die E4-Box.

4.2.3.1.4. Darm

Bei Betrachten der PCR-Analysen vom Darm der 9 Versuchstiere zeigen sich zunächst andere Ergebnisse als bei den restlichen Organen. So scheint der Unterschied in Bezug auf die Tiere mit und ohne DSS zumindest bei der E4-Box genau entgegengesetzt zu sein als bei den übrigen Organen. Die Tiere T4 und T6 ohne DSS zeigen hier die höchsten Werte auf, wohingegen sich bei den Kontrolltieren, die mit DSS aber ansonsten genauso behandelt worden waren, deutlich geringere DNA-Werte nachweisen lassen. Bei der Detektion des Inserts bcl-2 scheint dieses eher ähnlich zu den übrigen Organen, sodass mit Ausnahme der Tiere 4 mit und ohne DSS, von Tier 6 mit DSS und von Tier 5 mit DSS höhere Werte erzielt werden. Ein deutlicher Unterschied lässt sich auch bei der Auswertung der mit 5-FU behandelten Tiere T5 mit DSS, T6 mit DSS und ohne DSS erkennen, die mit einer Differenz von bis zu $3,75 \times 10^{-6}$ mehr bcl-2 (als normierten Faktor zu β -Aktin) aufweisen als die Kontrolltiere ohne 5-FU. Dieses Ergebnis wird bei Untersuchung auf die E4-Box nicht ersichtlich, da hier die höchsten Werte v.a. bei den Tieren ohne Vorbehandlung mit 5-FU gefunden werden, mit Ausnahme von Tier 6 ohne DSS. Bis

auf Tier 4 mit DSS scheinen die DNA-Werte bei Vergleich der DNA-Daten für bcl-2 und die E4-Box genau umgekehrt zu sein. Die Kontrolltiere Tier 1 und 2 jeweils mit und ohne DSS weisen wiederum keine falsch positiven Werte auf.

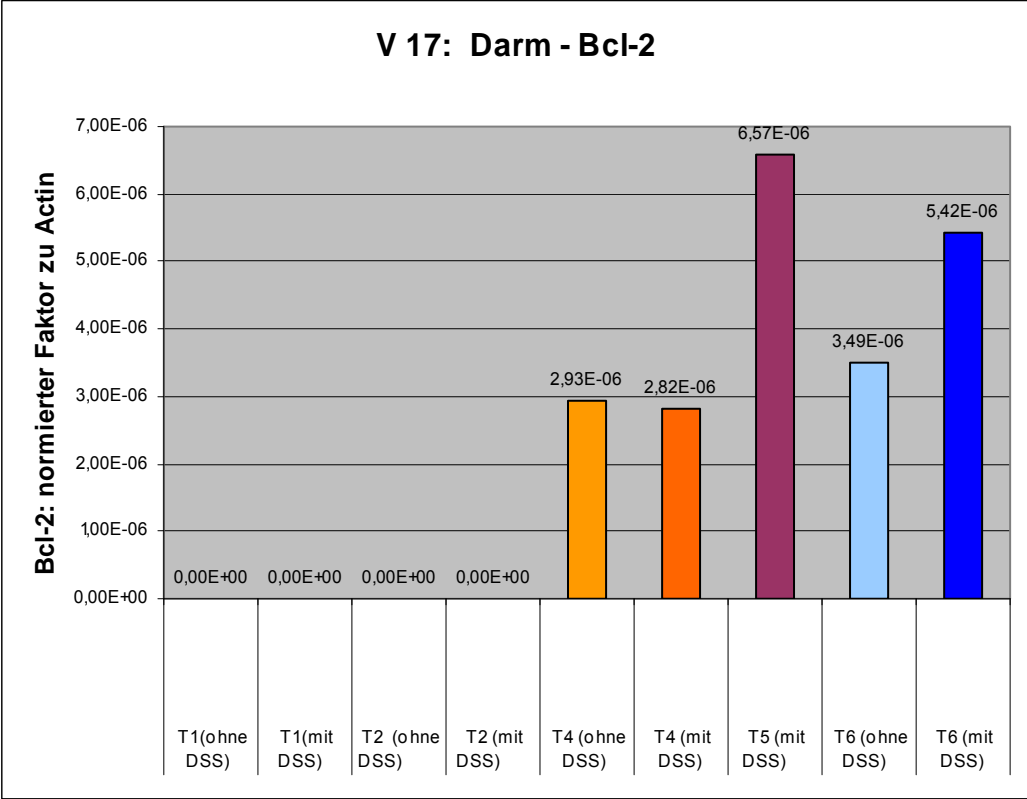


Abbildung 43: PCR-Analyse der Darmpräparate der neun Versuchsmäusen auf bcl-2.

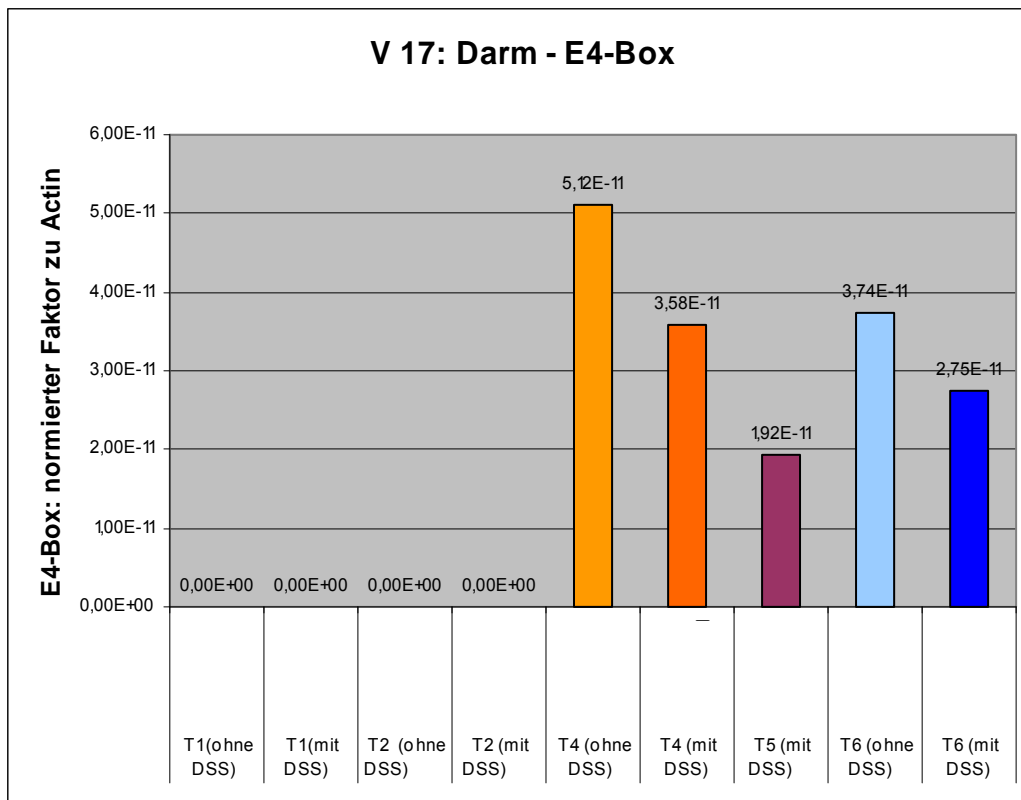


Abbildung 44: PCR-Analyse der Darmpräparate der neun Versuchsmäusen auf die E4-Box.

4.2.3.1.5. Milz

Die Ergebnisse der PCR-Analysen der Milzorgane zeigen besonders beim Nachweis der E4-Box deutliche Unterschiede zwischen den Tieren, die mit 5-FU behandelt wurden und denen, die nur mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad infiziert wurden. So lässt sich eine Differenz von $5,4 \times 10^{-6}$ bei bcl-2 (als normierter Faktor zu β -Aktin) bei Tier 6 mit DSS beim Vergleich zu Tier 4 ohne DSS aufweisen. Zwar fällt der Unterschied zwischen eben diesen beiden Tieren bei Betrachten der E4-Box mit $2,04 \times 10^{-10}$ geringer aus, dafür weist aber das Tier 6 ohne DSS einen höheren Wert im Gegensatz zu den anderen Tieren auf, die kein 5-FU erhielten. Wie bei der Untersuchung der anderen Organe auch lässt sich bei den Organpräparaten der Milz der einzelnen Versuchsmäuse wieder ein Unterschied zwischen den Tieren, die mit bzw. ohne DSS behandelt worden sind. So findet man eine Differenz von $0,72 \times 10^{-10}$ (Tier 4 mit DSS im Vergleich zu Tier 4 ohne DSS; E4-Box) bis zu $4,4 \times 10^{-6}$ (Tier 6 mit DSS im Vergleich zu Tier 6 ohne DSS; bcl-2) zugunsten der Tiere mit DSS-Behandlung. Bis auf die Daten von Tier 6 ohne DSS scheinen die Ergebnisse der restlichen Tiere beim Vergleich zwischen bcl-2-Nachweis und der E4-Box sehr

ähnlich auszufallen. Für die Kontrolltiere 1 und 2 jeweils mit und ohne DSS ergaben sich wie zu erwarten keine DNA-Werte.

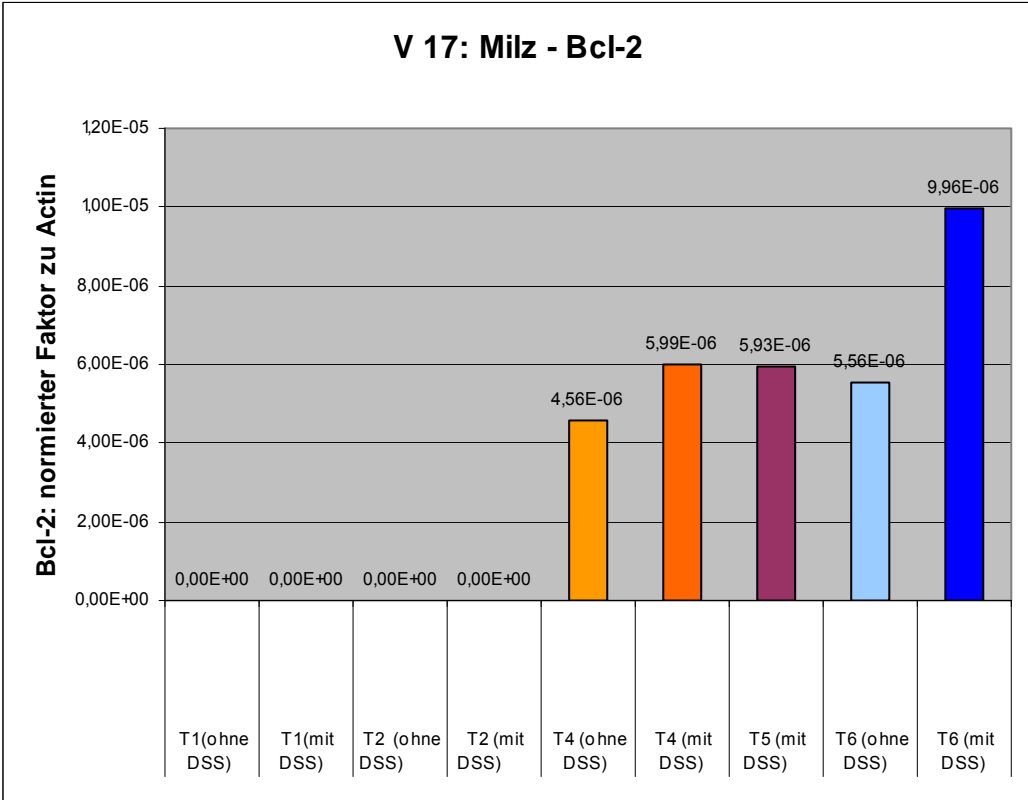


Abbildung 45: PCR-Analyse der Milzpräparate der neun Versuchsmäusen auf bcl-2.

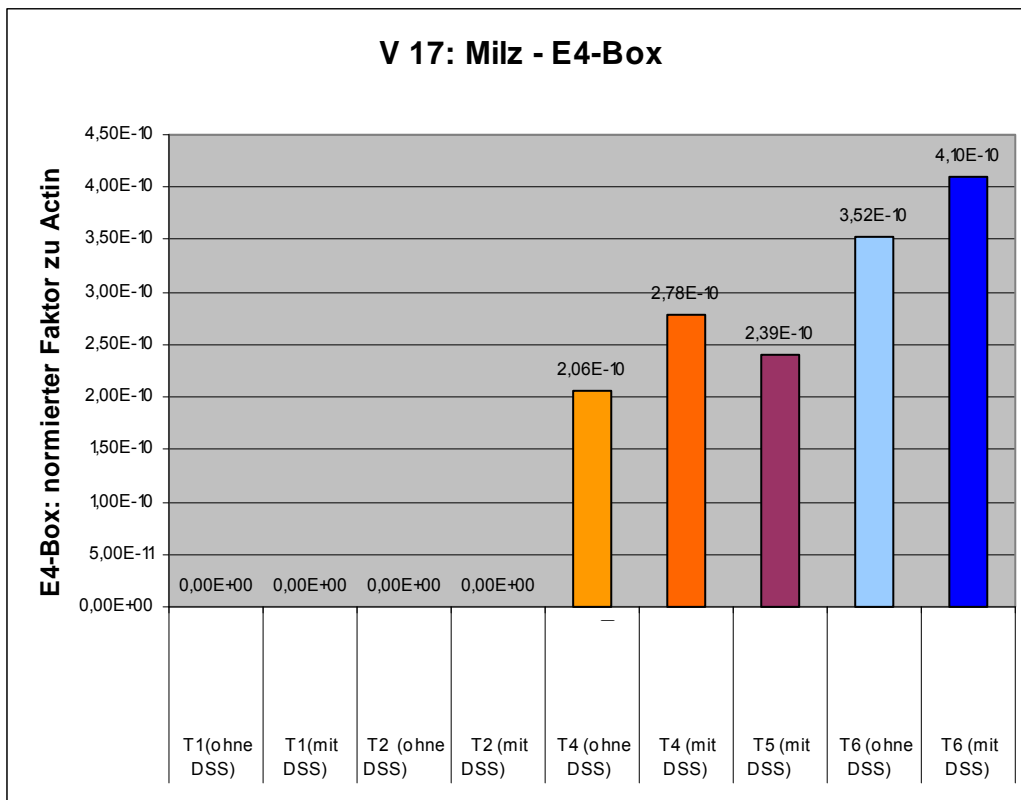


Abbildung 46: PCR-Analyse der Milzpräparate der neun Versuchsmäusen auf die E4-Box.

4.2.3.1.6. Lunge

Mit einer Menge zwischen $9,41 \times 10^{-6}$ und $6,05 \times 10^{-5}$ für bcl-2 und Werten zwischen $2,04 \times 10^{-10}$ und $6,92 \times 10^{-10}$ für die E4-Box liegen die DNA-Ergebnisse der Organe Lunge bei allen Versuchstieren im oberen Mengenbereich im Vergleich zu den anderen Organen. Dennoch zeigt sich kein besonders großer Unterschied innerhalb der Lungen unserer Mäuse, da diese sowohl für bcl-2 als auch die E4-Box mit Ausnahme von Tier 4 mit DSS in einem ähnlichen Bereich liegen. Nichtsdestotrotz lässt sich wiederum wie bei allen anderen Organen - ausgenommen Tier 6 mit und ohne DSS bei der E4-Box - der gleiche Unterschied zwischen den mit und den ohne DSS behandelten Tieren nachweisen. Die Lungen der Tiere 5 mit DSS und Tier 6 mit und ohne DSS, die alle drei neben der Koinfektion von bcl-2-Ad und r-TA-Ad gleichzeitig noch 5-FU injiziert bekamen, zeigen nahezu identische DNA-Werte sowohl beim Nachweis von bcl-2 als auch der E4-Box auf. Dagegen stellt man einen nennenswerten Unterschied von $4,49 \times 10^{-5}$ für bcl-2 und $3,61 \times 10^{-10}$ für die E4-Box beim Vergleich der Tiere 4 mit und ohne DSS fest, die jedoch beide mit den beiden Viren infiziert wurden und auch sonst bis auf die DSS-Gabe gleich behandelt wurden.

Wie bei allen anderen fünf Organen auch zeigen die Tiere 1 und 2 sowohl mit als auch ohne DSS als Kontrolltiere keine bzw. eine vernachlässigbar geringe DNA-Menge auf.

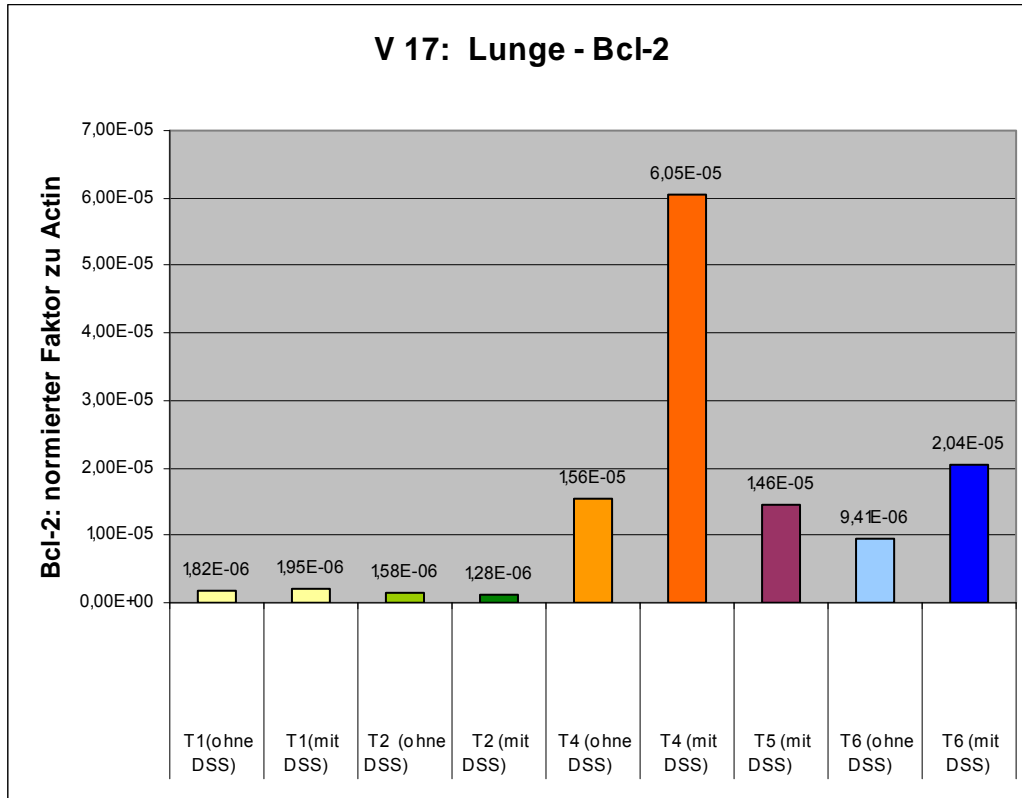


Abbildung 47: PCR-Analyse der Lungenpräparate der neun Versuchsmäuse auf bcl-2.

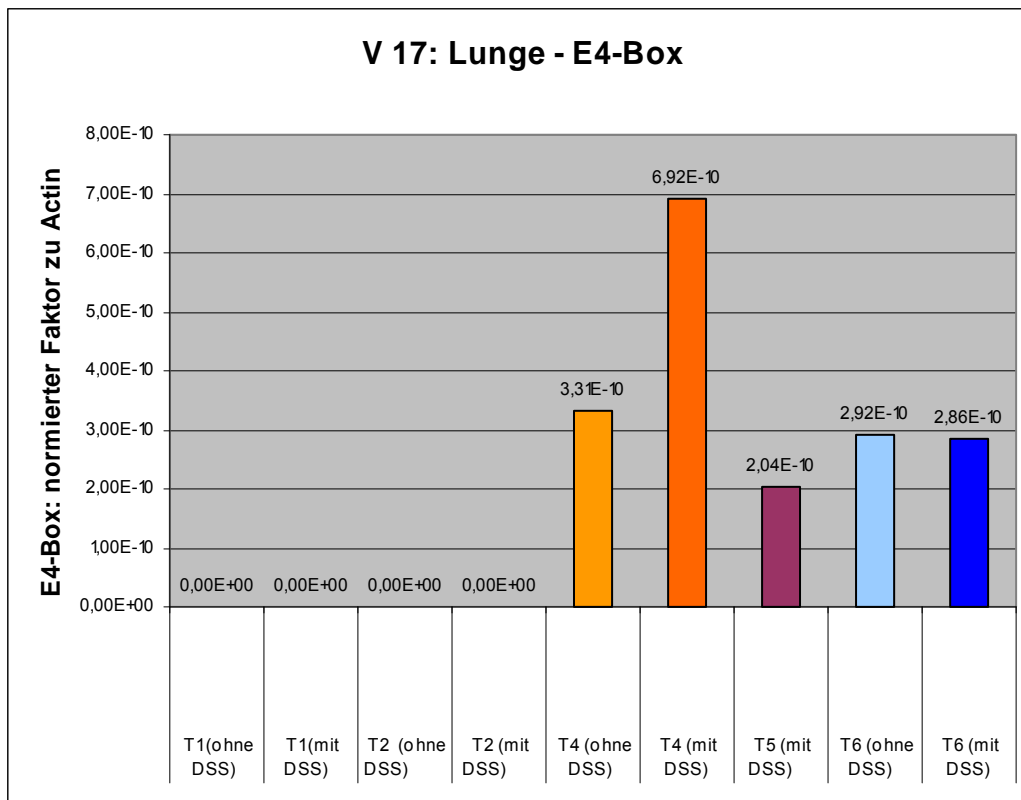


Abbildung 48: PCR-Analyse der Lungenpräparate der neun Versuchsmäuse auf die E4-Box.

4.2.4. Ergebnisse der Western-Blot-Analyse

Als weiteren Nachweis der Effektivität der Ad5-Infektion unserer Versuchstiere diene das Western-Blot-Verfahren. Hierfür wurden die Organe Leber und Niere aller neun Versuchstiere auf Proteinebene auf bcl-2, E4orf3 und β -Aktin zur Ladungskontrolle untersucht.

4.2.4.1. Bcl-2 und β -Aktin (I-19)

Das humane bcl-2 ist ein Protein mit einem spezifischen Gewicht von 26 kDa. Auf unser Analyse-Gel trugen wir Proteinproben von den Organen Niere und Leber auf, sowie eine Positivkontrolle und einen Marker. Wie zu erwarten findet sich nur in den Organen der Versuchsmäuse ein positiver bcl-2-Nachweis, die zuvor mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad infiziert worden waren. So erkennt man bei den Kontrolltieren Tier 1 und Tier 2 jeweils mit und ohne DSS keine Proteinbande bei 26 kDa. Obwohl die in der

Western-Blot-Analyse untersuchten Nieren von Mäusen stammen, die ebenfalls die Koinfektion erhielten, lässt sich bei diesen Tieren (Tiere 4 mit und ohne DSS und auch bei den Tieren 6 mit und ohne DSS) kein positiver Proteinnachweis für das humane bcl-2 erbringen. Zudem scheinen die Proteinmengen von bcl-2 hier so gering zu sein, dass sich kein Unterschied für die gleichzeitige Gabe von 5-FU nachweisen lässt. Dagegen weisen die Leberorgane eine größere Menge an Protein im Gegensatz zu den untersuchten Nieren auf. Beim Vergleich der Banden von den Tieren 4 mit und ohne DSS zeigt sich bei den Tieren 5 und 6 mit und ohne DSS, die gleichzeitig zur Koinfektion noch 5-FU erhalten hatten, eine größere Proteinmenge. Die Proteinmenge scheint hier derjenigen der Positivkontrolle zu entsprechen.

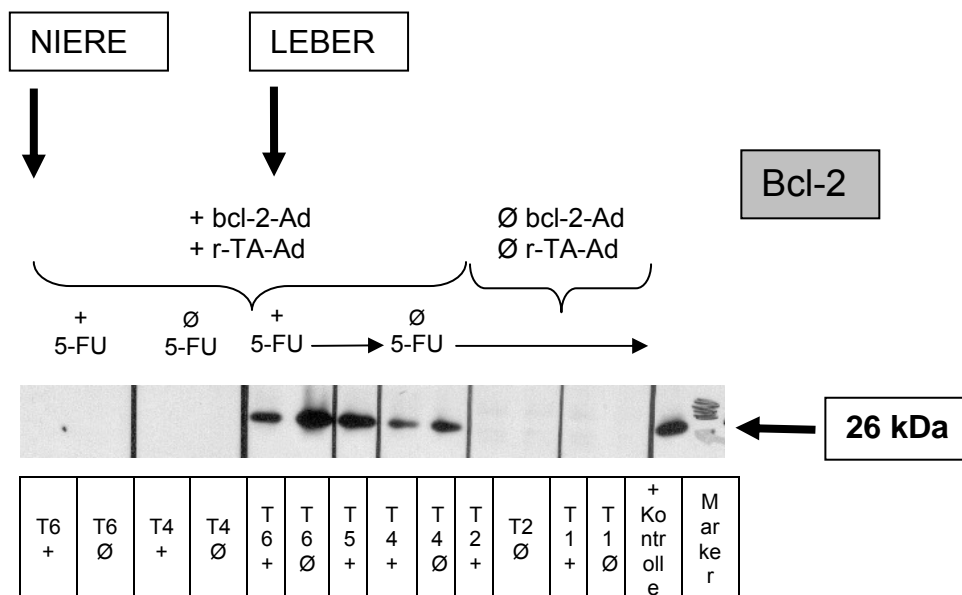


Abbildung 49: Western-Blot-Analyse von Nieren- und Lebergewebe auf bcl-2 (26 kDa).

Um sicherstellen zu können, dass bei unserem Western Blot gleiche Proteinmengen geladen wurden, führten wir mit der gleichen Nitrozellulosemembran eine weitere Analyse auf β -Aktin durch. Das spezifische Gewicht dieses Proteins liegt bei 46 kDa.

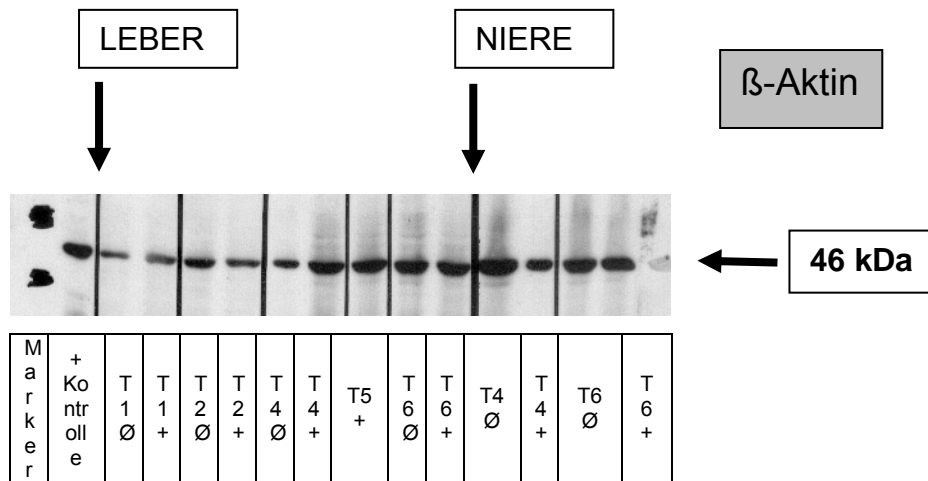


Abbildung 50: Western-Blot-Analyse von Nieren- und Lebergewebe auf β -Aktin (46 kDa).

4.2.4.2. E4orf3 und β -Aktin (I-19)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse auf E4orf3 von den Organen Leber und Niere mit den dazu gehörigen β -Aktin-Nachweisen zur Kontrolle erläutert. E4orf3 gehört zu den oben beschriebenen adenoviralen Proteinen der *early region* und hat ein spezifisches Gewicht von 11 kDa. Wie der Name bereits andeutet, gehört es zu den Proteinen, die im Zellkern als erstes transkribiert und anschließend rasch translatiert werden und daher gut für einen Proteinnachweis aus Adenoviren dienen kann. In unserem Versuch zeigt sich ein deutlicher Unterschied beim Vergleich der mit Ad5 infizierten Tiere zu denen, die keine Koinfektion erhalten haben. Hier findet sich keine Proteinbande. Bei der genauen Betrachtung der Banden erkennt man, dass es einen Unterschied in den Proteinmengen der einzelnen Leber-Organen geben muss, abhängig davon, ob die Mäuse gleichzeitig zur Koinfektion mit 5-FU behandelt wurden. So zeigt sich eine deutlich stärker gefärbte Bande bei den Tieren 5 mit DSS und den Tieren 6 mit und ohne DSS.

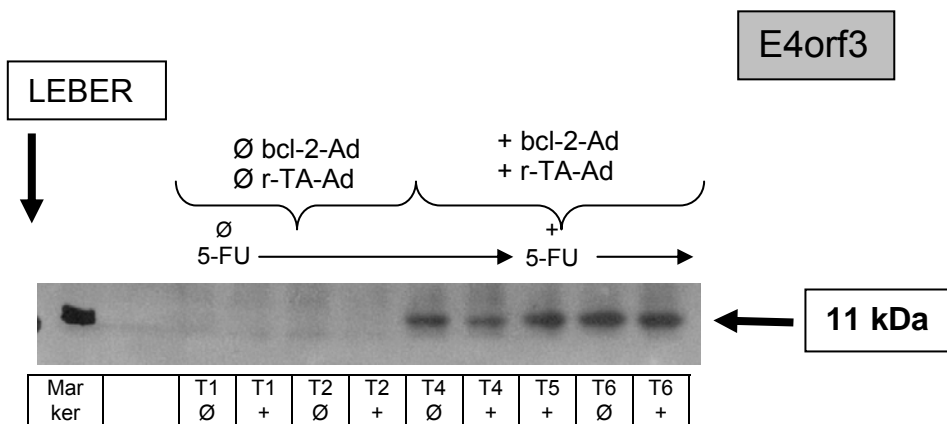


Abbildung 51: Western-Blot-Analyse von Lebergewebe auf E4orf 3 (11 kDa).

Zur Ladungskontrolle diente wiederum die Western-Blot-Analyse der gleichen Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper gegen β -Aktin, das bei 46 kDa läuft.

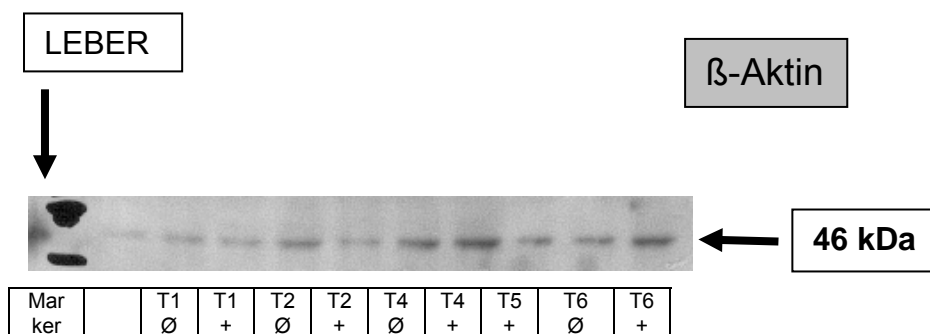


Abbildung 52: Western-Blot-Analyse von Lebergewebe auf β -Aktin (46kDa).

Der gleiche Versuch erfolgte mit den Nierenorganen unserer 9 Versuchstiere. Die Ergebnisse lassen hier allerdings nur eine sehr geringe Ausbeute an Protein E4orf3 nachweisen. Aufgrund der gering angefärbten Proteinbanden fällt es schwer genaue Rückschlüsse bei Vergleich der mit 5-FU behandelten und unbehandelten Tieren zu ziehen.

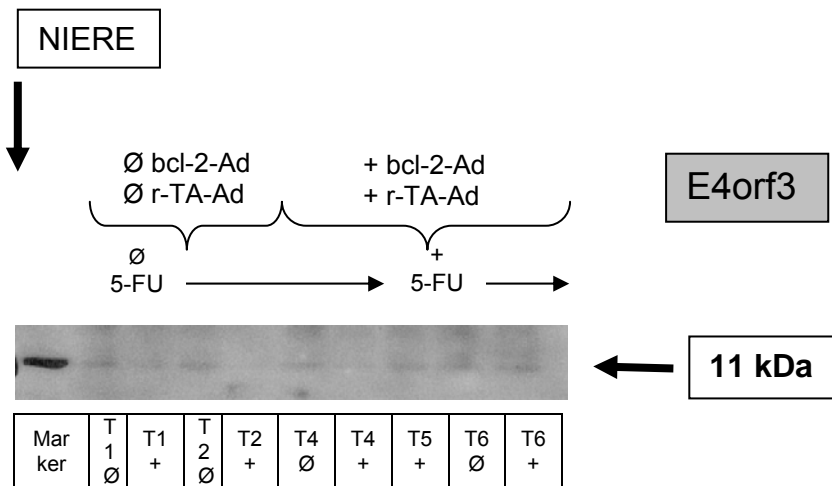


Abbildung 53: Western-Blot-Analyse von Nierengewebe auf E4orf 3 (11 kDa).

Wie bei den oben beschriebenen Versuchen, wurde auch hier mit der gleichen Membran eine weitere Western-Blot-Analyse mit β -Aktin (46 kDa) zur Ladungskontrolle durchgeführt.

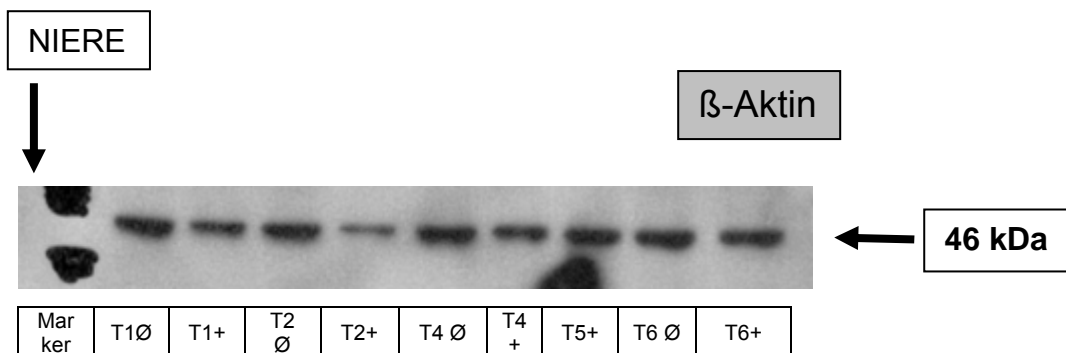


Abbildung 54: Western-Blot-Analyse von Nierengewebe auf β -Aktin (46 kDa).

5. Diskussion

Die hohe und immer weiter steigende Inzidenz von Tumorerkrankungen stellt ein großes Aufgabenfeld für die Wissenschaft dar um neue und bessere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Aufgrund der Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung, der Identifizierung von Genen, die ursächlich in das Geschehen der malignen Transformation und des malignen Wachstums involviert sind, ist es erstmals möglich gemacht worden, Angriffspunkte für eine Tumorthherapie auf molekularer Ebene zu finden und zu nutzen. Hierbei stellt die Gentherapie eine neuartige Therapieform dar, bei der Nukleinsäuren wie DNA und RNA als pharmakologische Agenzien genutzt werden. Die therapeutischen Strategien richten sich dabei auf das Einbringen von Genkonstrukten, die auf der einen Seite für therapeutisch wirksame Proteine und Enzyme kodieren und auf der anderen Seite direkt und gezielt auf die Regulation bestimmter zellulärer Prozesse einwirken, die z.B. für die Tumorgenese und Progression verantwortlich sind. Obwohl die Intention der Gentherapie im ursprünglichsten Sinne des Wortes primär die Therapie defekter Gene besonders bei genetisch bedingten Erbkrankheiten wie z.B. Hämophilie oder Mukoviszidose zum Ziel hatte, erkannte man sehr bald die vielfältigen Möglichkeiten, die sich mit dieser neuartigen Therapieform bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eröffnen würden (Anderson 1992). Auf der anderen Seite kann der Ansatz einer Gentherapie aber auch ganz neue Aspekte bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. der Colitis ulcerosa erbringen. Im Vordergrund aktueller Forschung steht vor allem die somatische Gentherapie. Hierbei werden therapeutisch aktive Genkonstrukte in Tumorzellen transduziert, die auf verschiedenen Wegen die Tumorenstehung und das Tumorwachstum negativ beeinflussen. Dies geschieht hauptsächlich durch additive Geninsertion, Gensubstitution oder Gensuppression. Neben diesen verschiedenen Ansatzpunkten zur Beeinflussung zellulärer Prozesse und der wachsenden Zahl an neu konstruierten therapeutisch aktiven Genen wird parallel dazu mit Hochdruck daran gearbeitet sichere und effiziente Gentransfersysteme zu entwickeln. In der Forschung stützt man sich dabei besonders auf retrovirale Vektoren genetisch modifizierter RNA-Viren (Retroviren), da diese Systeme auf eine lange experimentelle Erfahrung zurückgreifen können und eine hohe Effizienz des Gentransfers gezeigt haben (Walther and Stein 2000). Dennoch wird dieses

Forschungsgebiet seit längerer Zeit immer mehr durch die ebenso erfolgsversprechenden Adenovirus- und Herpes-Virus-Vektoren (modifizierte DNA-Viren) ergänzt und verdrängt. Um den Erfolg einer Gentherapie zu garantieren ist die Auswahl der therapeutischen Gene und der Vektoren von besonderer Bedeutung. Ziel ist es, die Modalitäten der Tumorthherapie, wie Chemotherapie, Radiotherapie oder Hyperthermie regulierbar zu machen. Hierfür ist es erforderlich für die Gentherapie-Studien ganz bestimmte Vektorkonstrukte zu verwenden, deren Expression über bestimmte Faktoren reguliert werden kann, was bedeutet, dass somit in diese Vektorkonstrukte induzierbare konditionelle Promotoren eingesetzt werden müssen. Ein derartiges therapeutisches Gensystem ermöglicht die Induktion einer bedarfsgerechten Expression der gewünschten Genprodukte, so dass diese für einen bestimmten Zeitpunkt in therapeutisch relevanten Konzentrationen zur Verfügung stehen. In unserer Arbeit verwendeten wir aus diesen oben genannten Gründen für den *in-vivo*-Teil das TetOn-System. Mit diesem System ergibt sich die Möglichkeit, die Expression des gewünschten Gens durch die Gabe bzw. den Entzug von Doxycyclin extern zu regulieren. Obwohl diese Versuchsansätze für die Therapie von Tumorerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen sehr viel versprechend erscheinen, bergen sie dennoch viele Schwierigkeiten, an denen weitere Forschungsarbeit geleistet werden muss. In unserer Studie befassten wir uns mit der Problematik, die sich auf die Aufnahmefähigkeit von Adenoviren in humane Zellen bezieht. Wie aus früheren Studien bekannt ist, benötigt Ad5 den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), um in humane Zellen aufgenommen werden zu können (Howitt, Anderson et al. 2003). Auf der anderen Seite hat sich aber in den Arbeiten vieler anderer Arbeitsgruppen herausgestellt, dass gerade Tumorzellen CAR nur auf einem sehr geringen Level exprimieren bzw. dass es sehr große Unterschiede im Grad der CAR-Expression zwischen verschiedenen Tumorarten gibt. So zeigte sich z.B. eine hohe Expressionsrate bei Osteosarkomen und Lipomen, wohingegen die Inzidenz von CAR in Kolon-Karzinomzellen und Chondrosarkomen sehr gering ist (Gu, Ogose et al. 2004). Es existieren mittlerweile zahlreiche Studien, die sich genau mit der eben beschriebenen Problematik beschäftigen und neue Möglichkeiten in der Kombination einer adenoviral-vermittelten Gentherapie mit Chemotherapeutika untersuchen. So erzielte die Arbeitsgruppe um Uchida positive Ergebnisse beim Einsatz von 5-FU in einem adenoviralen Gentransfer. Sie konnten nachweisen, dass ein adenoviral-vermittelter Transfer von Genen, die für die Caspase-8 kodieren, die ja

einen essentiellen Bestandteil des Apoptosevorgangs darstellt, nach einer gleichzeitigen Gabe von 5-FU deutlich effizienter war. Dies konnte durch eine gesteigerte Apoptoserate in den infizierten Kolon-Karzinomzellen DLD-1 nachgewiesen werden (Uchida, Shinoura et al. 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, wie sinnvoll es ist, neue Ansatzpunkte für die Tumorthherapie zu finden, die gerade in den Prozess der Apoptose eingreifen können. In unserer Studie untersuchten wir daher die Auswirkungen eines adenoviralen Transfers von für den Apoptosevorgang nötigen humanen Genen (bax bzw. bcl-2) und inwieweit sich die Effizienz einer Ad5-Infektion im Zusammenhang mit einer Zytostatika-Gabe mittels 5-FU beeinflussen lässt.

5.1. Auswirkungen von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate *in vitro*

In unserer *in vitro* -Studie konnten wir demonstrieren, dass 5-FU die Effizienz adenoviraler Aufnahme in kolorektale Karzinom-Zellen erhöht. Dies überwindet folglich die Resistenz einiger kolorektaler Karzinom-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Adenoviren. Dieser Effekt ist unabhängig von der CAR-Expression auf der Oberfläche der Zellen, was wir aufgrund der Ergebnisse unseres *in vitro* – Versuchs aussagen können, der unter 4.1.1 beschrieben ist. Bei diesem Experiment infizierten wir verschiedene Zell-Linien (DLD-1, LoVo, SW 480 und SW 620), die jeweils einen unterschiedlichen CAR-Expressionsgrad aufweisen, mit unseren adenoviralen Konstrukten Ad5-GFP oder Ad5-CEAbax. Die erhöhte adenovirale Aufnahme in die Zellen bei einer gleichzeitigen Gabe von 5-FU zeigte sich sowohl in der Western-Blot-Analyse der Zelllysate als auch in eine hier nicht beschriebenen Durchflusszytometrie.

Darüber hinaus wurde angenommen, dass der Verlust der Sensibilität von Karzinomzellen gegenüber einer Ad5-Behandlung generell eine Folge des Verlustes des adenoviralen Rezeptors auf der Zellmembran darstellt. Dies würde eine strenge Limitation bei der Anwendung gentherapeutischer Strategien mit Ad5, einem Gen liefernden System (Graham and Prevec 1992), bedeuten. Obwohl die Bindung von Ad5 an seinen Rezeptor als ersten Schritt für eine Infektion angenommen wurde, zeigten unsere Ergebnisse dagegen, dass die Anwesenheit von CAR nicht unbedingt

für die Effizienz einer viralen Infektion von Nöten ist. Tatsächlich konnten, wie oben beschrieben, nicht nur Zellen mit einer Resistenz gegenüber Ad5, die CAR nur auf einem niedrigen Niveau exprimieren, wie z.B. SW 480 Zellen, gefunden werden, sondern auch Zellen mit normaler CAR-Expressionsrate, wie DLD-1-, LoVo- und SW 620 -Zellen. Die gleichzeitige Behandlung mit 5-FU und Ad5 konnte jedoch in allen getesteten Zellsystemen die geringe Sensitivität gegenüber einer adenoviralen Infektion erhöhen. Aber die Effekte der Behandlung mit 5-FU waren besonders bei den Zelllinien beeindruckend, die sich schwierig mit Ad5 infizieren lassen.

Zusätzlich prüften wir dieses Ergebnis in einem CAR-negativen System, in dem wir die Funktion von CAR durch einen anti-CAR-Antikörper blockierten und wiederum die adenovirale Infektionsrate in Abhängigkeit von 5-FU detektierten. So konnte unsere Hypothese, dass 5-FU die Aufnahme von Ad5 unabhängig von CAR steigert, in einem rezeptorfreen System bekräftigt werden und der Effekt von 5-FU genauer eingeschätzt werden, wobei sich zeigte, dass die virale Aufnahme immer noch erhöht blieb. Dabei konnten wir feststellen, dass verglichen mit einer Inkubation der Zellen mit 5-FU vor der Infektion mit Ad5 der positive Effekt von 5-FU größer war, sobald beide, also 5-FU und Ad5, gleichzeitig hinzugefügt wurden.

In weiteren Versuchen stellten wir den Zusammenhang zwischen der Konzentration von 5-FU und der Effizienz der Ad5-Aufnahme in Zellen dar, deren Ergebnisse unter 4.1.2 genauer beschrieben sind. Hier konnten wir in den Zelllysaten eine größere Menge adenoviraler Fiber-Proteine nach der Behandlung mit Ad5 nachweisen, die abhängig von den Konzentrationen der Ad5 und 5-FU war, was darauf hinweist, dass eine größere Menge an GFP-exprimierenden und infolgedessen grün leuchtenden Zellen die Folge einer größeren Ad5-Aufnahme in die Zellen ist. Die Effektivität der Ad5-Aufnahme in die Zellen wurde anhand dieser GFP-Expression gemessen und erwies sich in den mit 5-FU vorbehandelten Zellen als signifikant höher als in unbehandelten Zellen. Zudem vergrößerte sich die Zahl der das fluoreszierende Protein GFP produzierenden Zellen bis auf das Doppelte mit steigender Konzentration von 5-FU bis zu einem Maximum bei 10 μ M 5-FU. Wie aus den unter 4.1.2 beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, konnten wir nachweisen, dass die größte Ausbeute an GFP-exprimierenden Zellen bei gleichzeitiger Gabe von 5-FU und Ad5-Infektion erzielt werden kann, was den klaren Schluss nach sich ziehen lässt, dass besonders die simultane Gabe des Zytostatikums 5-FU zur Ad5-Infektion einen deutlich positiven Effekt erbringt. Auch bei diesem Versuch konnte wiederum

festgestellt werden, dass Zelllinien mit einer geringen CAR-Expressionsrate (SW 480) besonders stark auf die Gabe von 5-FU reagieren, was unsere Hypothese von oben bekräftigt, dass der Transport von Ad5 durch die Zellmembran einem anderen Mechanismus unterliegt als bisher angenommen und daher unabhängig von CAR stattfindet. Diese Aussage stellt einen großen Fortschritt für die Entwicklung neuer gentherapeutischer Maßnahmen sowohl bei Tumor- als auch bei Entzündungserkrankungen dar, da ja bei derartig veränderten Zellen von einer geringeren CAR-Expressionsrate ausgegangen werden muss.

Des Weiteren untersuchten wir verschiedene Pyrimidin-Analoga auf ähnliche Effekte von 5-FU im Zusammenhang mit einer adenoviralen Aufnahme in Zellen (Lasch, Hoffmann et al. 1990; Mann 2002). Hierbei lieferten uns die Ergebnisse, beschrieben unter 4.1.3, eindeutige Hinweise darauf, dass die Steigerung der Ad5-Infektionsrate ein spezifischer Effekt von 5-FU allein ist. So konnten wir bei keinem der untersuchten Pyrimidin-Analoga wie 5-BrU, 5-FC, Taxol und DOC (Deoxycholat) eine signifikante Steigerung der Ad5-Infektionsrate eruieren, die bezogen auf alle untersuchten Zelllinien annähernd vergleichbar zu den Effekten von 5-FU ist. Daraus lässt sich schließen, dass es für eine Erfolg versprechende Behandlung mittels eines gentherapeutischen Transfers von modifizierten Adenoviren die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Pyrimidin-Analogons 5-FU erfordert.

Der synergistische Effekt von onkolytischen Adenoviren (*d1* 1520) und chemotherapeutischen Substanzen wie z.B. 5-FU und Cisplatin (Heise, Lemmon et al. 2000; Khuri, Nemunaitis et al. 2000; Reid, Galanis et al. 2001; Petit, Davidson et al. 2002) ist seit langem bekannt, jedoch konnte der Grund für dieses Verhalten bisher nicht vollständig erforscht werden. Eine Erklärung hierfür scheint die erhöhte Chemosensitivität der Zellen zu sein, die durch die virale Replikation induziert wird. Diese tritt wahrscheinlich infolge der Expression der E1A-Gene nach der Ad5-Infektion auf und steigert die Rate des tumorbedingten Zelltodes (Sanchez-Prieto, Quintanilla et al. 1996). Dennoch gilt dieser Mechanismus nicht für alle Zellsysteme, da er nur in Zellen auftreten kann, die gegenüber der Ad5-Aufnahme nicht resistent sind. Vielmehr deuten unsere Daten darauf hin, dass sogar E1-deletierte Konstrukte, die dadurch replikationsdefizient sind, effektiver im Zusammenhang mit der Behandlung mit 5-FU sind.

An den von uns zusätzlich durchgeführten Versuchen konnten wir darlegen, dass es einen 5-FU vermittelten Transfer von Ad5 durch Lipidmembranen geben muss. Dies

konnten wir mittels unserer Ergebnisse unter 4.1.4 aufzeigen, die einen deutlichen Einfluss von 5-FU auf geordnete Lipidstrukturen und damit auf die Freisetzung von Ad5 aus liposomalen Strukturen nachweisen. Bei simultaner Behandlung mit 5-FU konnte eine erhöhte Freisetzung von viralen Partikeln aus in Liposomen eingehüllten adenoviralen Formationen detektiert werden, was wiederum den positiven Effekt des Zytostatikums in Zusammenhang mit einem adenoviralen Gentransfer in Zellen offensichtlich herausstellt.

Zudem korreliert dieser Effekt mit einer Veränderung an Lipidmembranen, was an unseren Ergebnissen deutlich wird, die unter 4.1.5 beschrieben sind. Der sofortige Effekt von 5-FU lässt zur Annahme führen, dass der Eintritt von Ad5 in Zellen unabhängig von der Produktion oder Degradierung von Effektoren stattfindet. Hierfür untersuchten wir weiterhin zu den vorhergehenden Experimenten die Potenz von Ad5, in der Anwesenheit von 5-FU durch liposomale Membranen hindurch zu dringen, und entsprechend dieser Hypothese beobachteten wir wiederum eine erhöhte Freisetzung der Adenoviren aus den Liposomen, sobald diese mit 5-FU behandelt wurden.

Mit all unseren Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die antikanzerogene Substanz 5-FU in der Kombination mit Adenoviren die Möglichkeit eines Gentransfers von Adenoviren erleichtert v.a. in Karzinomzellen. Wie vorher beschrieben, wurde in unserem System ein replikationsdefektes Adenovirus (E1-deletiertes Ad) verwendet, um CMV-Promotor/GFP-DNA zu transformieren. 5-FU konnte wahrscheinlich die Transkription dieses CMV Promoters ähnlich der Induktion des FDXR durch p53 erhöhen, sobald dieser mit 5-FU behandelt wurde (Hwang, Bunz et al. 2001). Hierfür wurden Zellen mit CMV Promotor/GFP transfiziert und man konnte keine Veränderung der GFP-Expressionsrate im Zusammenhang mit 5-FU nachweisen.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse unserer Experimente mit Zellen, die sich in ihrer CAR-Expression unterscheiden (siehe dazu v.a. 4.1.2), fordern wir, dass die Aufnahme von Ad5 auf einem anderen Mechanismus basieren könnte, als darauf, dass die Ad5-Aufnahme die Bindung an den Ad5-Rezeptor CAR benötigt. In der Anwesenheit von CAR werden die Ad5 in die Zellen mittels eines Internalisationsmechanismus befördert, der eine rezeptorvermittelte Endozytose beinhaltet (Nemerow and Stewart 1999). Alternativ dazu interagiert das adenovirale Protein-Kapsid in der Abwesenheit von CAR direkt mit den Phospholipidschichten auf

der Zellmembran, was aufgrund der Ergebnisse unter 4.1.4 und 4.1.5 deutlich hervorgeht. Derartige Interaktionen führen jedoch nur dann zu einem effektiven intrazellulären Transfer, wenn 5-FU gegeben wird und sind bei keinem anderen Derivat von 5-FU nachweisbar (vgl. 4.1.3). Die intra- und extrazelluläre Diffusion der Substanz durch die Membran könnte an zeitliche Veränderungen bei der Bildung und dem Ordnen der Lipiddoppelschichten, die die Zellmembran bilden, gekoppelt sein, die während der Veränderung durch äußere Substanzen leichter erreichbar sein könnte. Nichtsdestotrotz müssen die potenzierenden Effekte von 5-FU auf die Membran verschieden sein im Vergleich zu denen anderer amphiphiler Moleküle, von denen die Auslösung eines lytischen Prozesses an Membranen bekannt ist, nämlich so wie bei DOC (Shiao, Chen et al. 1989), bei dem nach bisheriger Beobachtung bereits angenommen wurde, dass dieses Gallensalz die adenovirale Aufnahme in Zellen nicht erhöht. Frühere Studien berichten über morphologische Veränderungen von Zellen nach einer Behandlung mit Adenoviren (Habib, Mitry et al. 2002) oder mit anderen Detergenzien (Shiao, Chen et al. 1989). Vielmehr wurden die Interaktionen zwischen biologischen Membranen oder Modelmembranen und hydrophoben Substanzen wie 1,4-Dihydropyridinen (Boffi, Grande et al. 2003; Labianca, Fossati et al. 2004) und Benzocain (Pinto, Yokaichiya et al. 2000) im Detail untersucht, aber es ist nur wenig über die Interaktionen von 5-FU und Zellmembranen bekannt. Die humanen Kolonkarzinomzellen, die in dieser Arbeit getestet wurden, wurden in unseren Versuchen generell größer und nahmen eine spindelförmige Form bei der Inkubation mit 5-FU an. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass 5-FU neben seiner gut bekannten anti-kanzerogenen Wirkung einen potentiell zerstörenden Effekt auf Zellmembranen ausübt. Der genaue Mechanismus der adenoviralen Passage durch die Zellmembran in der Anwesenheit von 5-FU bleibt jedoch unklar.

Zusammenfassend gehen wir aufgrund der Ergebnisse unserer *in vitro*-Versuche davon aus, dass 5-FU zusätzlich zu seiner chemotherapeutischen Wirksamkeit eine Rolle bei der Erhöhung der Sensibilität von Zellen im Bezug auf Umwelteinflüsse durch Veränderungen der Phospholipiddoppelschichten der Zellmembranen hat. Dies wäre für den Transport therapeutischer Komponenten unabhängig von der An- oder Abwesenheit spezieller Zelloberflächen-Rezeptoren besonders hilfreich, wie im Falle des Transfers von Ad5 in CAR-negative Zellen. Auf der anderen Seite könnten Nebeneffekte einer adenoviralen Infektion während einer Hochdosis-Chemotherapie nicht nur darauf basieren, dass sie das Immunsystem supprimieren, sondern, wenn

5-FU die virale Aufnahme erhöhte, dass die „fluid-like“ Nebeneffekte der 5-FU-Chemotherapie die Aufnahme von Viren in Zellen in größerer Menge ermöglichen könnten. Insgesamt weisen die Ergebnisse unserer *in vitro* –Versuche darauf hin, dass mit einer adenoviralen Infektion und der simultanen Behandlung mit 5-FU ein Erfolg versprechender Schritt in der Erforschung neuer gentherapeutischer Konzepte erbracht werden kann.

5.2. Auswirkungen von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate *in vivo*

Eine gezielte virale Gentherapie bringt für die Zukunft neue Behandlungsoptionen sowohl in der Tumorthherapie als auch bei der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen mit sich und ist daher in der medizinischen Forschung von besonderem Interesse. Für den viralen Gentransfer haben sich v.a. replikationsdefiziente Adenoviren als geeignet herausgestellt, die *in vivo* insbesondere in Versuchen mit Mäusen eingesetzt werden und in einem derartigen Modell sehr häufig untersucht wurden (Becker, Noel et al. 1994). In unserer Studie verwendeten wir ein Mausmodell, um die zuvor ermittelten Ergebnisse der *in vitro* -Versuche auch an einem lebenden Modell nachweisen zu können. So infizierten wir unsere Versuchsmäuse mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad nach oben bereits ausführlich beschriebenem Schema und stellten die Unterschiede bezüglich einer simultanen Gabe von 5-FU im Vergleich zu Placebo heraus. Zum Nachweis der auf die Gabe von 5-FU zurückzuführenden gesteigerten Effizienz einer erfolgten Ad5-Infektion untersuchten wir die Mausorgane zunächst immunhistochemisch. Für diesen qualitativen Nachweis einer stattgehabten adenoviralen Infektion der verschiedenen Mausorgane Leber, Herz, Milz, Niere, Darm und Lunge verwendeten wir zwei unterschiedliche Antikörper für den immunhistochemischen Versuch: Zum einen den Hexon-Antikörper, der an die Antigene des Hexon-Kapsidmoleküls der Adenoviren bindet, und zum anderen den bcl-2-Antikörper, der das humane bcl-2-Insert der Adenoviren detektiert. Um mit quantitativen Ergebnissen argumentieren zu können, erfolgte der Nachweis zusätzlich auf DNA-Ebene mittels des PCR-Verfahrens. Getestet wurden die DNA-Proben unserer neun Versuchstiere auf das humane Insert

bcl-2 und die adenoviralen Sequenzen der E4-Box. Das Western-Blot-Verfahren diente anschließend zur Darstellung der gewünschten translatierten Proteine humanes bcl-2, virales E4orf3 und β -Aktin als Ladungskontrolle. Das besondere Interesse galt dabei in allen drei Versuchen dem Vergleich zwischen den Mäusen, die nur mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad koinfiziert wurden (Tiere 4 mit und ohne DSS) und denen, die zur Koinfektion simultan 5-FU injiziert bekamen (Tier 5 mit DSS, Tiere 6 mit und ohne DSS). Bei einem Teil unserer Versuchsmäuse induzierten wir künstlich mittels DSS eine Colitis ulcerosa. Hier sollte zusätzlich die Frage geklärt werden, ob bei dem mit DSS vorbehandeltem Darmgewebe, das durch die Entzündung normalerweise resistenter für eine adenovirale Infektion ist als gesundes (Mukoyama, Kanbe et al. 2005), die Ad5-Aufnahme in die Zellen durch eine gleichzeitige Gabe von 5-FU gesteigert werden kann. Denn gerade für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn stellt in der Zukunft eine gezielte Gentherapie eine neue und viel versprechende Therapieoption dar. Ein derartiger Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren dürfte ein hohes therapeutisches Potential im Bezug auf entzündlich verändertes Darmgewebe durch die Expression spezifischer Signaltransduktionsproteine haben (Wirtz, Galle et al. 1999; Wirtz and Neurath 2003; Wirtz and Neurath 2003). Die Ergebnisse dieser drei Versuche des Mausmodells werden im Folgenden für jedes einzelne Organ (Herz, Leber, Niere, Darm, Milz und Lunge) der Versuchsmäuse ausführlich diskutiert.

5.2.1. Herz

Das humane Myokardgewebe ist schon seit längerer Zeit Gegenstand für gentherapeutische Untersuchungen. Das größte Ziel liegt dabei in der Entdeckung neuer und einfacher Behandlungsmöglichkeiten verschiedener Myokarderkrankungen.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir aus diesem Grund Herzgewebe von Mäusen, die zu einem Teil allein mit bcl-2-Ad und r-TA-Ad koinfiziert wurden und zum anderen Teil zusätzlich 5-FU verabreicht bekamen. Mittels dieses Versuchsansatzes sollte herausgestellt werden, ob und inwiefern die Gabe von 5-FU Auswirkungen auf eine adenovirale Infektion von Myokardgewebe hat. Der immunhistochemische Nachweis der Ad5-Infektion erbrachte sowohl für den Hexon- als auch für den humanen bcl-2-Antikörper keine signifikanten Ergebnisse. So zeigte sich in keinem der Schnitte von den insgesamt neun Versuchstieren eine Braunfärbung der

Myokardzellen, die eine positive Reaktion nachweisen würde. Beim Betrachten der Herzgewebe konnte kein Unterschied zwischen den mit Adenoviren infizierten Organen und den Negativkontrollen gefunden werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Qualität der Gefrier- bzw. der Paraffinschnitte nicht ausreichend für eine immunhistochemische Färbung war. Zum anderen könnte dieses Ergebnis aber auch ein Hinweis dafür sein, dass die Konzentration der Adenoviren im Myokardgewebe zu gering war, um mittels Immunhistochemie angefärbt werden zu können. Aus dem negativen bzw. nicht auswertbaren Ergebnis beider Antikörper im Vergleich zu den anderen Organen könnte daher der Schluss gezogen werden, dass humanes Myokardgewebe nur in sehr geringem Ausmaß auf eine adenovirale Infektion anspricht. Dass aber eine Infektion mit Adenoviren bei unseren Versuchstieren stattgefunden hat, beweisen die Ergebnisse der PCR-Analyse und des Western Blots. Mit dieser Kenntnis sollte angenommen werden, dass die histologischen Schnitte für eine Färbung mit dem Hexon-Antikörper und dem bcl-2-Antikörper nicht geeignet waren. Als genauere Untersuchung der Herzproben diene das PCR-Verfahren. Dieses hat sich bereits in den verschiedensten Studien als sehr spezifische und sensible Methode zur Detektion eines positiven Gentransfers herausgestellt (Luo, Cao et al. 2006). Aufgrund unserer Ergebnisse hat sich gezeigt, dass ein Gentransfer mittels rekombinierten Adenoviren in jedem Falle möglich ist. Wir konnten sogar herausstellen, dass Myokardgewebe von erkrankten Mäusen entgegen der bisherigen Annahme einfacher und effizienter von Adenoviren infiziert werden kann. So ergab sich bei den Mäusen, bei denen durch DSS eine Kolitis künstlich erzeugt wurde, eine höhere Ausbeute an detektierbarem humanen bcl-2 im Vergleich zu den gesunden Tieren. Dennoch schien nach unseren Ergebnissen das Myokardgewebe am geringsten auf eine adenovirale Infektion anzusprechen im Gegensatz zu den restlichen untersuchten Organen derselben Mäuse. Auch die Werte der PCR-Analyse auf das adenovirale Protein E4orf3 weisen eine eher geringere Ad5-Infektion auf. Diese niedrige Infektionsrate könnte auch der Grund dafür sein, dass wir keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Gabe von 5-FU gefunden haben. Auf der anderen Seite hat sich sogar gezeigt, dass das zytotoxisch wirksame Agens 5-FU in verschiedenen Studien deutliche Schäden am Myokardgewebe hinterlässt. So konnte die Arbeitsgruppe um Alter in 1,2% bis 7,6% der Fälle unter den mit 5-FU behandelten Patienten kardiotoxische Nebenwirkungen von 5-FU beobachten (Alter, Herzum et al. 2006). Dazu zählen z.B. Arrhythmie,

Herzinfarkte und der plötzliche Herztod. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der kardiotoxischen Wirksamkeit von 5-FU wie auch Koronarspasmen, kardiale Ischämie und verminderte Kontraktibilität des Myokardmuskels zeigten Studien von Tsibiribi (Tsibiribi, Bui-Xuan et al. 2006). Daher sollte die Gabe von 5-FU nur aufgrund strenger Indikation erfolgen. Die zahlreich beobachteten Fälle bekräftigen das kardiotoxische Potential von 5-FU und verlangen daher eine besondere Überwachung von mit 5-FU behandelten Patienten. Der genaue Mechanismus dieser durch 5-FU ausgelösten Toxizität gegenüber dem Myokardgewebe bleibt bisher unverstanden. Jedoch geht man von der Hypothese aus, dass ein Spasmus der Koronararterien und auch erworbene toxisch-entzündliche Reaktionen wie Nekrose, Fibrose und Apoptose in den meisten Fällen für diese kardialen Läsionen verantwortlich sind (Rodriguez Roldan, Lara Alvarez et al. 2006; Tsibiribi, Descotes et al. 2006). Abgesehen davon sollte dennoch der positive Effekt einer adenoviralen Gentherapie nicht außer Acht gelassen werden, der anhand vieler Experimente offensichtlich erscheint. So untersuchte z.B. die Arbeitsgruppe von Wei erfolgreich mittels eines durch Adenovirus vermittelten Gentransfers von CTLA4Ig, wie man die Entzündungsreaktion einer Autoimmunmyokarditis vermindern kann (Wei, Wei-Min et al. 2006). Ebenso existieren Studien, die über eine Erhaltung der myokardialen Kontraktionsfunktion bei Mäusen nach einer Gentherapie mit Adenoviren berichten (Belke, Gloss et al. 2006). In unseren Versuchen verwendeten wir ein rekombinantes Adenovirus, das als Insert das humane bcl-2 enthielt. Wie schon beschrieben, handelt es sich dabei um ein anti-apoptotisches Protein, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Saraste, Pulkki et al. 1999). Während einer Ischämie im Myokardgewebe hat sich gezeigt, dass das proapoptotisch wirksame bad, das aufgrund der Hypoxie vom Zytosol in das Mitochondrium eindringt, das bcl-2 bindet. Als Folge wird bcl-2 in geringerem Maße abgelesen und es kommt zur Apoptose der Myokardzelle (Rajesh, Suzuki et al. 2006). Aus diesem Grund könnte ein Gentransfer von bcl-2 in erkranktes Myokardgewebe die Zellen vor dem Zelltod schützen. Wie oben bereits beschrieben ist ein Gentransfer in Myokardgewebe mittels rekombinater Adenoviren möglich und erfolgreich und hat sich in vielen Studien als elegante und effiziente Behandlungsmethode herausgestellt. Und dies bezieht sich nicht nur auf eine akute kardiale Symptomatik, sondern auch auf chronische Herzinsuffizienz (Hui, Li et al. 2006). Neben diesen Beispielen lassen sich weitere Studien bezüglich neuer Therapieoptionen durch eine Adenovirus vermittelte

Gentherapie in der Literatur finden, was deutlich zeigt, dass das Myokard als Zielgewebe für diese neue Behandlungsmethode von großem Interesse ist. Daher scheint es sinnvoll, weitere Studien auf diesem Gebiet zu entwickeln, die darauf abzielen, dass der gentherapeutische Transfer der gewünschten Proteine möglichst einfach und effizient erfolgen kann.

5.2.2. Leber

Die Ergebnisse, die wir bei den Experimenten mit den Lebergeweben unserer Versuchsmäuse erzielen konnten, geben einen deutlichen Hinweis dafür, dass Leberparenchym für gentherapeutische Versuchsansätze als sehr gut geeignet erscheint. Für unsere *in vivo* - Studie verwendeten wir ein adenovirales Konstrukt, das das humane bcl-2 als Insert enthält. Die Expression dieses Gens hat eine anti-apoptotische Wirkung zur Folge (Nunez, Hockenbery et al. 1991), die besonders in der Transplantationsforschung Gegenstand zahlreicher Untersuchungen ist (Rentsch, Kienle et al. 2005). Ziel ist es dabei, die Graft-versus-Host-Reaktion abzuschwächen und das Spenderorgan vor einer durch das eigene Immunsystem ausgelöste Abstoßungsreaktion mit apoptotischem Untergang der Zellen zu schützen (Kienle, Rentsch et al. 2005; Wang, Li et al. 2006). Die Hypothese unserer Studie, einen adenoviralen Gentransfer mittels der simultanen Gabe von 5-FU effizienter und einfacher zu machen, konnten wir sowohl durch eine Immunhistochemie, eine quantitative PCR als auch durch das Western-Blot-Verfahren bekräftigen. Der immunhistochemische Nachweis einer positiven Ad5-Infektion konnte bei den histologischen Schnitten aus der Leber sowohl mittels des Hexon-Antikörpers als auch mittels des humanen bcl-2-Antikörpers farblich dargestellt werden. Zudem zeigten sich bei der Immunhistochemie mit dem Hexon-Antikörper innerhalb der Lebergewebe der neun verschiedenen Versuchstiere Unterschiede in der immunhistochemisch bedingten bräunlichen Anfärbung, was auf eine unterschiedliche Infektionsrate der einzelnen Organe hindeutet. Beim Vergleich der Tiere 4 mit und ohne DSS, die beide nicht mit 5-FU vor der Koinfektion mit bcl-2-Ad/r-TA-Ad inkubiert wurden, stellte sich heraus, dass eine Infektion des Leberparenchyms mit Adenoviren in Mäusen, bei denen eine Kolitis künstlich erzeugt worden ist, erschwert ist. Diese Aussage wird durch die PCR nochmals bestätigt. Gestützt wird dieses Ergebnis zudem bei Betrachten der Tiere 5 und 6 mit DSS im Gegensatz zu Tier 6 ohne DSS, das wiederum mit einer stärkeren Anfärbung auf

eine höhere Ad5-Infektionsrate bei gesunden Mäusen hindeutet. Dies konnte nur bei der immunhistochemischen Untersuchung auf Hexon dargestellt werden. Eine Aussage bezüglich einer unterschiedlichen Ad5-Konzentration in Bezug auf die Gabe von 5-FU konnte in den Lebern unserer Versuchstiere nicht getroffen werden, da die Ergebnisse hierfür sowohl in der Hexon- als auch in der bcl-2-Färbung zu unspezifisch sind. An dieser Stelle setzen die Ergebnisse der quantitativen PCR-Analyse an, die deutlich auf einen positiven Einfluss von 5-FU auf die adenovirale Infektionsrate hinweisen. Mit Ausnahme von Tier 4 ohne DSS und ohne 5-FU, das bei der Detektion von bcl-2 nicht aber bei der E4-Box die größte Menge an Adenoviren aufzeigte, konnte sowohl für den Nachweis von bcl-2 als auch für die adenovirale E4-Box eine effizientere Ad5-Aufnahme im Lebergewebe nachgewiesen werden, sobald die Mäuse gleichzeitig zur Koinfektion mit 5-FU behandelt wurden. Da wir im Vergleich zu allen anderen Organen im Lebergewebe unserer Versuchsmäuse die größte Menge an Adenoviren gefunden haben, könnte dies darauf hinweisen, dass Adenoviren ohnehin Lebergewebe leicht infizieren können (Johnson, Huyn et al. 2006). Zusätzlich zeigen aber die Ergebnisse der PCR-Analyse einen deutliche Zunahme der Ad5-Aufnahme nach Gabe von 5-FU. Unterstützt wird diese Aussage durch den Nachweis der Proteinexpression von bcl-2 und E4orf3 mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens. Auch hier kann aufgrund der kräftigeren Proteinbanden in beiden Fällen der Schluss gezogen werden, dass ein Gentransfer mittels adenoviraler Vektoren durch die gleichzeitige Wirkung von 5-FU verstärkt wird.

Unsere Ergebnisse, die wir anhand der Tests der Maus-Lebergewebe finden konnten, nehmen einen hohen Stellenwert in der medizinischen Forschung ein. Erkrankungen der Leber gehören zu den häufigsten Erkrankungen der Welt und stellen immer noch eine große Herausforderung für die Suche nach neuen Behandlungsoptionen dar. Dies begründet sich auch daraus, dass das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) zu den häufigsten malignen Primärtumoren gehört (Guan and Liu 2006), jedoch die Lebertransplantation, die bisher immer noch als die sicherste Therapie gilt, nicht allen Patienten ermöglicht werden kann. Daher existieren verschiedene interventionelle Behandlungsansätze wie z.B. eine transarterielle Chemoembolisation (TACE), lokale Ablation und perkutane Ethanolinstillation (PEI). Aufgrund der steigenden Inzidenz von Lebererkrankungen herrscht großes Interesse in der Erforschung neuer möglichst nicht invasiver

Techniken. Auch auf diesem Gebiet scheint daher, wie in unserer Studie dargestellt, eine viral-vermittelte Gentherapie ein eleganter und viel versprechender Therapieansatz zu sein. Als Transferviren haben sich auch hier adenovirale Vektoren als sehr geeignet herausgestellt (Narvaiza, Aparicio et al. 2006), unterstützt besonders durch die Tatsache, dass rekombinante Adenoviren nicht hepatotoxisch wirken (Au, Thorne et al. 2006). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe um Au nachweisen, dass Lebertumorzellen eine höhere Expressionsrate der adenoviralen Gene verglichen mit gesunden Leberparenchymzellen aufzeigen. Aufgrund verschiedenster Untersuchungen lässt sich herausstellen, dass Leberzellen zu den humanen Zellen mit der höchsten CAR-Expressionsrate zählen und somit besonders für einen adenoviral-vermittelten Gentransfer in Frage kommen, allerdings zeigen sie ein ähnliches Expressionsmuster bezüglich des alpha-v-Integrins im Vergleich zu anderen Organen auf (Fechner, Haack et al. 1999). Ebenso konnte dargestellt werden, dass CAR in den *tight junctions* zwischen den einzelnen Hepatozyten lokalisiert ist und somit keine Verbindung zum Gefäßsystem des Tumors hat. Vielmehr besitzt sogar das Endothel der Tumorzellen keinen CAR (Au, Thorne et al. 2006). Diese beiden Argumente und die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Smith lassen den Schluss zu, dass auch im Leberparenchym die Aufnahme der Adenoviren unabhängig von CAR abläuft (Smith, Idamakanti et al. 2003), was auch wir in unserer Studie herausstellen konnten. Daher scheint es sinnvoll Systeme zu entwickeln, die die Internalisation des rekombinaten Virus mit den gewünschten Sequenzen in die Zielzelle unabhängig von CAR erleichtern (Nakayama, Both et al. 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse der Leberparenchymuntersuchungen bezogen auf einen adenoviralen Gentransfer bisher in der Literatur beschriebene Hypothesen unterstützen. Zusätzlich konnten wir deutlich herausstellen, dass sich die Infektionsrate und damit die Effizienz dieses Ad5-Gentransfers mit einer gleichzeitigen Gabe des Zytostatikums 5-FU um ein Vielfaches steigern lässt.

5.2.3. Milz

Die Infektion von Milzgewebe mit einem adenoviralen Wildtyp hat eine deutliche Steigerung der Apoptoserate der Zellen zur Folge (Rautenschlein, Suresh et al. 2000). Die *in vivo* Infektion mit rekombinaten Adenoviren führt dagegen besonders in Leber und Milz zunächst zu einer ausgeprägten systemischen Antigenpräsentation.

Daher erweist sich die Milz ebenfalls geeignet als Ziel einer Infektion mit replikationsdefizienten Adenoviren in der Gentherapie. Dennoch scheint das Milzgewebe bezüglich der Möglichkeiten gentherapeutischer Behandlungsoptionen noch relativ wenig untersucht zu sein und am ehesten als Vergleichsorgan in die Forschungsarbeiten mit einbezogen zu werden (Ai, Zhang et al. 2005). In unserer Studie wurden die Gewebeproben aus den Milzorganen der neun Versuchsmäuse in den oben ausführlich beschriebenen Verfahren der Immunhistochemie, PCR und der Western-Blot-Analyse auf eine adenovirale Infektion untersucht. Laut unserer dadurch ermittelten Daten zeigte sich bei allen Tieren, die koinfiziert wurden, ein positiver Nachweis von vorhanden Adenoviren. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung der Milz-Schnitte geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass eine simultane Gabe des Zytostatikums 5-FU die adenovirale Infektion in humanes Gewebe erleichtert. Dies konnte besonders bei der Auswertung der Testung auf Hexon aufgezeigt werden, da in dieser Versuchsreihe eine kräftigere Braunfärbung bei den Schnitten der Tiere T5 mit DSS und T6 mit und ohne DSS nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der starken Hintergrundfärbung der Präparate konnte dieser Schluss bei der Anfärbung von bcl-2 nicht so deutlich gezogen werden. Dennoch zeigt sich auch hier die stärkste Braunfärbung bei der Milz von Tier 6 mit DSS, das gleichzeitig zur Koinfektion mit 5-FU behandelt worden war. Eine unterschiedliche Infektionsrate in Bezug auf die Gabe von DSS konnte nicht erkannt werden. Aussagekräftiger erscheinen hier die Ergebnisse der PCR-Analyse. Diese lassen bei allen mit DSS vorbehandelten Mäusen eine höhere Menge an humanem bcl-2 und adenoviraler E4-Box nachweisen als bei den Kontrolltieren, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass sich Milzgewebe von an Kolitis erkrankten Mäusen leichter mit Adenoviren infizieren lässt. Ob dabei ein Zusammenhang mit dem in den Kolitismäusen aktivierten Immunsystem besteht, bleibt bisher ungeklärt. Gleichzeitig konnten wir bei den Tieren 5 mit DSS und 6 mit und ohne DSS, die neben der Koinfektion noch 5-FU verabreicht bekamen, sowohl bei der PCR-Analyse auf humanes bcl-2 als auch auf die adenovirale E4-Box eine höhere Ad5-Infektionsrate feststellen im Vergleich zu den Tieren 4 mit und ohne DSS. Dieser Unterschied war deutlich und bestätigt aus diesem Grund unsere Annahme, dass ein adenoviral-vermittelter Gentransfer durch die simultane Gabe von 5-FU erleichtert und gesteigert werden kann.

5.2.4. Niere

Der Versuch mit Hilfe von rekombinanten viralen Vektoren einen Gentransfer in Nierenzellen zu ermöglichen, eröffnet neueste Therapieoptionen bei den verschiedensten Nierenerkrankungen (Chevalier 2006; Mene 2006). Auch im Bereich der Nierentumorforschung ist die Möglichkeit einer Genthherapie von großem Interesse, da Nierentumore zu den am stärksten therapieresistenten Tumoren gehören (Reu, Bae et al. 2006; Ronnen, Kondagunta et al. 2006). Als Grund dafür stellte sich besonders die geringere CAR-Expression in tumorartig verändertem Nierenparenchym im Vergleich zu gesundem Nierengewebe heraus. In unserer Studie versuchten wir daher die CAR-unabhängige Ad5-Aufnahme in die Nierenzellen mittels der gleichzeitigen Gabe von 5-FU zu verbessern. Der Nachweis einer positiven Ad5-Infektion konnte bei den Gefrierschnitten der Nieren mittels immunhistochemischer Anfärbung erbracht werden, wobei diese bevorzugt in der Rinde und den Nierenglomerula lokalisiert werden konnte. Auch bei diesem Versuch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Adenoviren humanes Gewebe in höherem Ausmaß infizieren, sobald 5-FU gegeben wird. Dafür spricht zum einen die kräftigere Braunfärbung des Nierenparenchyms von Tier 6 ohne DSS bei der Detektion von Hexon und zum anderen bei den Tieren T6 mit und ohne DSS beim Nachweis von bcl-2. Die Gabe von DSS scheint beim Nierengewebe im Gegensatz zu Lebergewebe keinen bzw. einen mit dieser Methode unzureichend nachzuweisenden Einfluss auf eine adenovirale Infektion zu haben. Die Auswertung der PCR-Daten liefert keine wirklich aussagekräftigen Ergebnisse. Sowohl beim Nachweis des Inserts bcl-2 als auch der adenoviralen E4-Box könnte eventuell eine gesteigerte Ad5-Infektionsrate nach 5-FU-Gabe angenommen werden, allerdings differieren die Werte der Tiere 5 und 6 jeweils mit DSS sehr stark, obwohl diese beiden Mäuse einer identischen Behandlung unterzogen wurden. Unterschiede aufgrund der mit DSS künstlich induzierten Kolitis ließen sich nicht eruieren. Zur Beurteilung der Expression der Proteine bcl-2 und E4orf3 erfolgte ein Western-Blot-Verfahren. Da sich in diesen Versuchen keine Proteinbanden darstellen ließen, muss man davon ausgehen, dass entweder das Nierenparenchym unserer Versuchsmäuse den Bedingungen im Labor nicht standhalten konnte, oder dass tatsächlich keine bzw. eine unter der Nachweisgrenze liegende adenovirale Infektion stattgefunden hat. In der Literatur lassen sich mehrere Studien finden, die sich v.a. auf die zellulären Veränderungen in Nierenzellkarzinomen beziehen und Grundlage für die

Erforschung neuer Therapieoptionen darstellen sollen. Bisher konnte dabei schon bewiesen werden, dass karzinomatös veränderte Nierenzellen durch den Transfer von vaskulärem endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) durch Behinderung der tumorbedingten Angiogenese in ihrem Wachstum eingeschränkt werden (Ichikura, Eto et al. 2006) und damit auf diesem Gebiet ein enormer Fortschritt geschaffen wurde. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass Nierentumorzellen aufgrund einer durch den Tumor bedingten sehr starken oben bereits erwähnten CAR-Down-Regulation eher resistent für eine Infektion mit Adenoviren reagieren (Rancourt, Rogers et al. 1998). Somit macht es Sinn, neue Ansatzpunkte ähnlich unserer Experimente zu finden, die eine CAR-unabhängige Ad5-Aufnahme in die Zellen ermöglichen (Haviv, Blackwell et al. 2002). Auf der anderen Seite konnte die Arbeitsgruppe um Haviv alternative Bindungsstellen auf den Nierenzellen detektieren, zu denen das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin und der vermeintliche Ad3-Rezeptor gehören. Um die CAR-abhängige Ad5-Infektionsresistenz der Nierenzellen zu überwinden werden entsprechende Virus-Modulationen zu entwickeln sein, die über alternative Wege in das Zytoplasma der Zielzelle gelangen können (Schmidt, Piekos et al. 2000). Laut unseren Ergebnissen könnte eine simultane Gabe von 5-FU den Erfolg derartiger neuer Versuchsansätze durch eine gesteigerte adenovirale Infektionsrate deutlich erhöhen.

5.2.5. Darm

Modifizierte Adenoviren repräsentieren einen neuen Behandlungsansatz sowohl für für gastrointestinale Karzinome als auch chronisch entzündliche Erkrankungen des Darms. Aus diesem Grund stehen in Bezug auf die Organe des Verdauungstraktes verschiedenste Ansatzpunkte einer Genterapie im Mittelpunkt heutiger Forschungsarbeiten. Wie oben bereits mehrfach erwähnt, erscheint der Hauptrezeptor CAR grundsätzlich für eine gesicherte Aufnahme in humane Darmzellen nötig zu sein. Allerdings hat auch in diesem Gewebe eine kanzerogene Veränderung die Down-Regulation dieses adenoviralen Rezeptors zur Folge, die eine verminderte Ad5-Infektion und ein damit verbundenes niedrigeres Potential einer wirksamen Genterapie nach sich zieht (Korn, Macal et al. 2006). Zusätzlich ist bereits bekannt, dass der Verlust von CAR in dessen Ausmaß abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors ist. So erwiesen sich moderate bzw. wenig differenzierte Kolontumoren als sehr stark vom CAR-Verlust betroffen (Korn, Macal et

al. 2006), was darauf hindeutet, dass der Grad der Malignität des Tumors in Korrelation zu dessen Ad5-Resistenz steht. Neben Karzinomen scheinen auch chronische Entzündungen des Kolons wie die Colitis ulcerosa und Morbus Crohn potentiell für eine genvermittelte Therapie interessant zu sein. Allerdings konnte auch hier im entzündlichen Gewebe eine geringere CAR-Expressionsrate nachgewiesen werden, die einen deutlichen Rückschlag in Bezug auf Therapieoptionen mittels adenoviralem Gentransfer bedeutet (Sasaki, Mathis et al. 2005). Die Inzidenz dieser chronischen Erkrankungen steigt weltweit deutlich an und die genaue Ätiologie bleibt dabei noch weitgehend im Ungewissen (Karlinger, Gyorke et al. 2000). Sicher ist, dass neben genetischen Faktoren auch bestimmte immunologische Faktoren eine gewisse Rolle bei der Manifestation der Entzündung haben und zusätzlich ein erhöhtes Risiko für die betroffenen Patienten besteht ein kolorektales Karzinom zu entwickeln (Geier, Butler et al. 2006). Die Möglichkeit, mittels adenoviralem Gentransfer bestimmte Sequenzen in die entzündeten Darmzellen einschleusen zu können, um somit die Zellen vor dem gesteigerten Zelltod zu schützen, bringt neue Hoffnung in die Behandlungsoptionen für Kolitiserkrankungen mit sich. Grund für diesen vermehrten Zellumsatz stellt neben dem entzündlichen Zerfall der Kolitzellen auch der apoptotische Untergang der Zellen dar. Dieser wird über einen komplizierten Mechanismus geregelt, der unter anderem durch das Gleichgewicht zwischen dem proapoptotisch wirkenden bax und dem antiapoptotischen bcl-2 gesteuert wird (Azad, Vallyathan et al. 2006).

In der vorliegenden Untersuchung versuchten wir aus diesem Grund in den Vorgang der Apoptose einzugreifen, indem wir das humane Protein bcl-2 mit Hilfe von adenoviralen Vektoren in die Kolitzellen der Versuchsmäuse einzuschleusen versuchten. Dabei stellten wir die Hypothese auf, dass bcl-2 als antiapoptotisch wirkendes Protein genau diesen vermehrten Zellumsatz in entzündetem Gewebe vermindern kann. Mehrere Studien berichten aber über eine geringere CAR-Expression auf der basolateralen Zelloberfläche von entzündlich veränderten Zellen, die nach bisheriger Auffassung durch die inflammatorischen Zytokine vermittelt wird (Vincent, Pettersson et al. 2004). Diese Down-Regulation hat aber eine deutliche Abnahme der Ad5-Bindungs- und Aufnahme rate zur Folge, sodass die therapeutischen Optionen im Bereich eines viralen Gentransfers limitiert sind. Diese Einschränkung ließ unsere Untersuchungen zum einen darauf abzielen, in wie weit CAR für die Ad5-Aufnahme benötigt wird, und zum anderen Möglichkeiten zu

ermitteln, die den CAR-unabhängigen adenoviralen Transfer erleichtern können. Im *in vitro* -Teil unserer Studie wurde bereits ausführlich darüber berichtet, dass die adenovirale Aufnahme in humane Zellen unabhängig von CAR erfolgen kann. Zudem konnten wir mittels Immunhistochemie und PCR-Analyse herausstellen, dass das Zytostatikum 5-FU gerade beim Darmgewebe einen positiven Effekt auf die Ad5-Infektionsrate erzielen konnte. Um die Unterschiede zwischen gesundem und entzündlich verändertem Kolon untersuchen zu können, induzierten wir wie oben bereits ausführlich beschrieben bei der Hälfte unserer Versuchsmäuse durch die Gabe von DSS (Dextran Sulphate Sodium) eine chronische Kolitis. Durch diesen Vergleich versuchten wir herauszustellen, ob sich die durch die Kolitis erschwerte Ad5-Infektion der Darmgewebe mit einer gleichzeitigen Gabe von 5-FU steigern lässt. Zunächst konnten wir nachweisen, dass Adenoviren gesundes Darmgewebe in stärkerem Maße infizieren, als entzündliches Gewebe. Dies zeigt sich bei der Betrachtung der immunhistochemischen Anfärbung mittels humanem bcl-2-Antikörper bei den Tieren T4 ohne und mit DSS, die beide zwar mit bcl-2-Ad/r-TA-Ad koinfiziert, aber nicht mit 5-FU inkubiert worden sind. Im Gegensatz dazu lassen die Ergebnisse der histologischen Schnitte der Tiere T5 mit DSS und T6 mit und ohne DSS sowohl für den Hexon- als auch für den bcl-2-Antikörper eine intensivere Braunfärbung nachweisen. Diesen Mäusen wurde allesamt simultan zur Koinfektion das Zytostatikum 5-FU verabreicht. Dieses Resultat spricht eindeutig dafür, dass 5-FU die adenovirale Infektionsrate in Darmgewebe erleichtert. Zudem konnte innerhalb dieser drei Tiere kein Unterschied mehr bezüglich der Braunfärbung erkannt werden, obwohl zwei dieser Mäuse eine mit DSS künstlich erzeugte Kolitis aufwiesen. Demnach kann postuliert werden, dass 5-FU einen größeren Einfluss auf die adenovirale Infektionsrate hat, als die Vorgabe gesundes oder entzündlich verändertes Darmgewebe. Da man davon ausgeht, dass die Zellen einer Kolitis CAR in geringerem Ausmaß exprimieren (Kesisoglou, Chamberlain et al. 2005) und dennoch eine größere Menge an Adenoviren in diesen Kolitiszellen nach der Gabe von 5-FU nachgewiesen werden kann, muss man daraus schließen, dass 5-FU die adenovirale Infektion unabhängig von CAR steigert. Unterstützt werden diese Aussagen durch die Ergebnisse der PCR-Analyse. Der Nachweis von bcl-2 gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass die simultane Gabe von 5-FU die Infektionsrate der Adenoviren signifikant steigert. Dies zeigt sich beim Vergleich der Ergebnisse von den Tieren 4 mit und ohne DSS, die kein 5-FU injiziert bekamen, und

den Tieren 5 mit DSS und 6 mit und ohne DSS, die neben der Koinfektion simultan 5-FU erhielten. Auch in diesem Versuch konnten wir entgegen bisher beschriebener Literatur feststellen, dass diese Infektion in den Kolitismäusen größer war, als in den gesunden Mäusen (Kesisoglou, Chamberlain et al. 2005). Anhand dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass auch im Bereich chronisch entzündlicher Erkrankungen eine neue und viel versprechende Behandlungsoption mittels Gentherapie und gleichzeitiger Gabe von 5-FU gefunden worden ist. Gerade die Steigerung der Effizienz des Gentransfers durch das Zytostatikum bringt daher für die Zukunft nicht nur große Hoffnung in der Tumorthherapie, sondern auch in der Behandlung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn mit sich.

5.2.6. Lunge

In unserer Studie galt auch beim Lungenparenchym das Interesse der Effizienzsteigerung einer adenoviralen Gentherapie. Dafür untersuchten wir wiederum die Effekte von der gleichzeitigen Gabe von 5-FU auf die Ad5-Infektionsrate mittels immunhistochemischer Anfärbung und PCR-Analyse. Das Lungengewebe unserer neun Versuchsmäuse eignete sich nicht für eine Beurteilung einer immunhistochemischen Färbung auf Hexon. So konnte nur bei den Tieren 4 mit und ohne DSS und bei Tier 6 ohne DSS eine leichte Braunfärbung nachgewiesen werden, die aber aufgrund der geringen Intensität keine genauen Rückschlüsse nach sich ziehen lässt. Die Anfärbung des bcl-2-Antikörpers zeigt dagegen bessere Ergebnisse. Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte hier bei den Tieren 4, 5 und 6 eine positive Farbreaktion beobachtet werden. Eine genaue Differenzierung zwischen diesen histologischen Schnitten konnte aber ebenfalls kaum erfolgen, da der Grad der Anfärbung bei allen Präparaten annähernd gleich war. Einziger Hinweis auf die positive Auswirkung von 5-FU auf die adenovirale Infektion ist das Bild von Tier 6 ohne DSS. Hier deutet die kräftigere Farbreaktion auf eine höhere Konzentration an Adenoviren hin, wobei dies, weil alleiniges Ergebnis, als unspezifisch angesehen werden muss. Die Werte der PCR-Analyse sind ebenfalls sehr unspezifisch und können daher keine wirklich relevante Aussage über die Auswirkung des Zytostatikums auf die adenovirale Infektionsrate zulassen. Mit Ausnahme von Tier 4 mit DSS, das sowohl beim Nachweis von bcl-2 als auch der E4-Box im Vergleich zu allen anderen infizierten Tieren sehr hohe Werte aufzeigte, lagen die Ergebnisse beider Versuche bei den anderen Tieren sehr eng beieinander,

sodass eine genauere Differenzierung zwischen den einzelnen Tieren nicht erfolgen konnte. Dieses Ergebnis könnte zum einen daran liegen, dass unser Lungengewebe für die PCR-Analyse nicht geeignet war, oder aber daran, dass 5-FU tatsächlich keinen Einfluss auf den adenoviralen Gentransfer ausübt. Diese Frage bleibt allerdings noch zu klären. Insgesamt muss aber dennoch darauf hingewiesen werden, dass Lungengewebe in jedem Falle Ziel gentherapeutischer Untersuchungen bleiben sollte, da bisher große Erfolge auf diesem Gebiet erzielt wurden, die große Hoffnung für neue Behandlungsstrategien von Lungenerkrankungen mit sich bringen dürften.

Weshalb in der medizinischen Forschung neue Therapiemöglichkeiten bezüglich Lungenerkrankungen mit Hochdruck gesucht werden, wird offensichtlich, sobald man sich vor Augen führt, dass Lungenerkrankungen zu den häufigsten Erkrankungen in der westlichen Welt gehören, deren Inzidenz dabei von Jahr zu Jahr noch ansteigt (Nowak, Berger et al. 2005; Ulmeanu, Didilescu et al. 2006). Diese Tatsache machte das Organ Lunge schon seit längerer Zeit zum Gegenstand gentherapeutischer Forschung (Szokol, Murphy et al. 2004; Kolb, Martin et al. 2006). Auf dem Gebiet des Lungenkarzinoms wurden dabei schon erfolgreiche Untersuchungen veröffentlicht, die z.B. darauf abzielen, das Tumorwachstum mit Hilfe des adenoviralen Transfers bestimmter Sequenzen zu stoppen (Tian, Li et al. 2006). Aber auch für die Therapie chronischer Lungenerkrankungen wie z.B. der Lungenfibrose (Gazdhar, Fachinger et al. 2006; Rosenecker, Huth et al. 2006) oder der Unterdrückung einer Graft-versus-Host-Reaktion nach einer Lungentransplantation (Okada, Zuo et al. 2006) stehen aufgrund der neuen Ansatzpunkte, die durch eine virus-vermittelte Gentherapie entstehen und nach unseren Ergebnissen mit einer simultanen Behandlung mit 5-FU noch optimiert werden können, Erfolg versprechende Therapieoptionen zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

Adenoviren werden in 60% aller gentherapeutischen Studien als Vektoren eingesetzt und in Zellen durch Bindung an den Coxackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) aufgenommen. Da Tumorzellen und auch Entzündungszellen oftmals wenig oder keinen CAR exprimieren, sind Mechanismen, die CAR-unabhängig die Aufnahme von Adenoviren erhöhen, von entscheidender klinischer Bedeutung. Weiterhin ist bekannt, dass 5-FU die Effektivität von Adenoviren erhöht. Ziel war es, diejenigen Mechanismen zu untersuchen, die eine adenovirale Behandlung mittels der Gabe von 5-FU effektiver machen. Durch die Kombination von 5-FU mit Adenoviren erhöhte sich die Infektionsrate der Zellen *in vitro* von etwa 50% auf 94%-99%. Gleichzeitig konnte mehr Fiberprotein in den Zellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich auch in Zellen mit blockiertem CAR demonstrieren. Im Überstand der Liposomen, die mit 5-FU behandelt wurden, konnten 2,4 mal mehr Adenoviren nachgewiesen werden. Das PCR Produkt auf E4orf6 war ebenfalls in höherem Maße im Überstand der mit 5-FU behandelten Liposomen nachzuweisen und die Oberfläche der Liposomen war deutlich in Anwesenheit von 5-FU und Adenoviren verändert. Um die Ergebnisse des *in vitro* -Teils bekräftigen zu können, setzten wir unsere daraus gewonnenen Daten und Aussagen auch *in vivo* um. Das hierfür entwickelte Mausmodell basierte auf dem Vergleich von Mäusen, die einerseits neben einer adenoviralen Infektion gleichzeitig mit 5-FU behandelt wurden und andererseits allein infiziert wurden. Die Organentnahme der Versuchsmäuse erfolgte daraufhin nach 7 Tagen Inkubationszeit. Die einzelnen Organe (Herz, Leber, Milz, Niere, Darm und Lunge) der neun Tiere wurden daraufhin immunhistochemisch auf das adenovirale Kapsidprotein Hexon und auf das adenovirale Insert humanes bcl-2 untersucht. Zusätzlich erfolgte eine PCR-Analyse aller Organe, um das humane bcl-2 und die adenovirale E4-Box quantitativ nachweisen zu können. Von den Organen Leber und Niere wurde im Anschluss daran eine Untersuchung auf Proteinebene durchgeführt. Mittels dieses Western-Blot-Verfahrens konnte die erfolgte adenovirale Infektion durch die Testung auf die Expression des adenoviralen Proteins E4orf3 und des humanen bcl-2 nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse dieser sowohl qualitativen als auch quantitativen Versuche zeigten einen positiven Effekt von 5-FU auf eine adenovirale Infektion, die bei einer simultanen Gabe deutlich gesteigert werden konnte.

Wir konnten daher zeigen, dass 5-FU die Aufnahme von Adenoviren in Tumorzellen und auch in entzündlich veränderte Zellen unabhängig von CAR erhöht. Dies ist nach den Ergebnissen unserer *in vitro* Versuche zufolge mit Veränderungen in Membranen vergesellschaftet. Somit erscheint eine Kombination von 5-FU und Adenoviren im Rahmen gentherapeutischer Ansätze sinnvoll.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine gleichzeitige Behandlung von Geweben mit Adenoviren und 5-FU die Aufnahme dieser Viren sowohl in Tumorzellen als auch in Entzündungszellen steigert. Besonders wichtig scheint auch, dass wir diesen Effekt unabhängig von der Expression des CAR beobachten konnten und 5-FU die Einschleusung des viralen Proteinkapsids durch die Lipidmembran begünstigt. Unabhängig des darauf basierenden Mechanismus, der in der Zukunft einer noch weiteren Erforschung erfordert, kann man sagen, dass eine kombinierte Behandlung mit Adenovirus und 5-Fluoruracil eine erhebliche Bedeutung im Zusammenhang mit einem Gentransfer zu haben scheint.

7. Literatur

- Abdelbaqi, M., J. H. Chidlow, et al. (2006). "Regulation of dextran sodium sulfate induced colitis by leukocyte beta 2 integrins." Lab Invest **86**(4): 380-90.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- Ai, Y. H., L. N. Zhang, et al. (2005). "[Gene transfection efficiency and destination of recombinant adenovirus gene transfer through internal jugular vein injection in rats]." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **30**(6): 653-6.
- Aleman, R., S. Lai, et al. (1999). "Complementary adenoviral vectors for oncolysis." Cancer Gene Ther **6**(1): 21-5.
- Almy, T. P. (1961). "Observations on the pathologic physiology of ulcerative colitis." Gastroenterology **40**: 299-306.
- Alter, P., M. Herzum, et al. (2006). "Cardiotoxicity of 5-fluorouracil." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **4**(1): 1-5.
- Anderson, W. F. (1992). "Human gene therapy." Science **256**(5058): 808-13.
- Antonsson, B., S. Montessuit, et al. (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." J Biol Chem **276**(15): 11615-23.
- Au, T., S. Thorne, et al. (2006). "Minimal hepatic toxicity of Onyx-015: spatial restriction of coxsackie-adenoviral receptor in normal liver." Cancer Gene Ther.
- Azad, N., V. Vallyathan, et al. (2006). "S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis." J Biol Chem **281**(45): 34124-34.
- Babiss, L. E., H. S. Ginsberg, et al. (1985). "Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport." Mol Cell Biol **5**(10): 2552-8.
- Barker, D. D. and A. J. Berk (1987). "Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection." Virology **156**(1): 107-21.
- Becker, T. C., R. J. Noel, et al. (1994). "Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells." Methods Cell Biol **43 Pt A**: 161-89.
- Belke, D. D., B. Gloss, et al. (2006). "In vivo gene delivery of HSP70i by adenovirus and adeno-associated virus preserves contractile function in mouse heart following ischemia-reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H2905-10.
- Benihoud, K., P. Yeh, et al. (1999). "Adenovirus vectors for gene delivery." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 440-7.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5." Science **275**(5304): 1320-3.
- Bergelson, J. M., A. Krithivas, et al. (1998). "The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses." J Virol **72**(1): 415-9.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, et al. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science **274**(5286): 373-6.
- Blackwell, J. L., C. R. Miller, et al. (1999). "Retargeting to EGFR enhances adenovirus infection efficiency of squamous cell carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **125**(8): 856-63.
- Blumenthal, R., P. Seth, et al. (1986). "pH-dependent lysis of liposomes by adenovirus." Biochemistry **25**(8): 2231-7.
- Boffi, F., S. Grande, et al. (2003). "MRS study of the interaction of dihydropyridines with lipid molecules in phosphatidylcholine vesicles." Physiol Chem Phys Med NMR **35**(1): 55-72.
- Boismenu, R. and Y. Chen (2000). "Insights from mouse models of colitis." J Leukoc Biol **67**(3): 267-78.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, et al. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." Cell **85**(6): 803-15.
- Borner, C. (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Mol Immunol **39**(11): 615-47.
- Boulanger, P. A. and G. E. Blair (1991). "Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins." Biochem J **275 (Pt 2)**: 281-99.
- Brambilla, G. and A. Martelli (2007). "Genotoxic and carcinogenic risk to humans of drug-nitrite interaction products." Mutat Res **635**(1): 17-52.
- Brattain, M. G., D. E. Brattain, et al. (1981). "Initiation and characterization of cultures of human colonic carcinoma with different biological characteristics utilizing feeder layers of confluent fibroblasts." Oncodev Biol Med **2**(5): 355-66.
- Bridge, E. and G. Ketner (1990). "Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression." Virology **174**(2): 345-53.

- Capp, J. P., F. Boudsocq, et al. (2006). "The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **34**(10): 2998-3007.
- Casali, P., Z. Pal, et al. (2006). "DNA repair in antibody somatic hypermutation." *Trends Immunol* **27**(7): 313-21.
- Challberg, M. D., S. V. Desiderio, et al. (1980). "Adenovirus DNA replication in vitro: characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(9): 5105-9.
- Challberg, M. D., J. M. Ostrove, et al. (1982). "Initiation of adenovirus DNA replication: detection of covalent complexes between nucleotide and the 80-kilodalton terminal protein." *J Virol* **41**(1): 265-70.
- Chauhan, D., P. Pandey, et al. (1997). "Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells." *J Biol Chem* **272**(48): 29995-7.
- Chen, J. W., R. Ghosh, et al. (2003). "Structure and chromosomal localization of the murine coxsackievirus and adenovirus receptor gene." *DNA Cell Biol* **22**(4): 253-9.
- Chen, T. R., C. S. Dorotinsky, et al. (1995). "DLD-1 and HCT-15 cell lines derived separately from colorectal carcinomas have totally different chromosome changes but the same genetic origin." *Cancer Genet Cytogenet* **81**(2): 103-8.
- Chevalier, R. L. (2006). "Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy." *Nat Clin Pract Nephrol* **2**(3): 157-68.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* **81**(4): 505-12.
- Chroboczek, J., F. Bieber, et al. (1992). "The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2." *Virology* **186**(1): 280-5.
- Chroboczek, J., E. Gout, et al. (2003). "Novel partner proteins of adenovirus penton." *Curr Top Microbiol Immunol* **272**: 37-55.
- Cohen, C. J., J. Gaetz, et al. (2001). "Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting." *J Biol Chem* **276**(27): 25392-8.
- Cohen, C. J., J. T. Shieh, et al. (2001). "The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15191-6.
- Cohen, J. J. (1993). "Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function." *Chest* **103**(2 Suppl): 99S-101S.
- Croft, D. R., M. L. Coleman, et al. (2005). "Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration." *J Cell Biol* **168**(2): 245-55.
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." *Biochem J* **341** (Pt 2): 233-49.
- de Jong, J. C., R. Wigand, et al. (1983). "Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool." *J Med Virol* **11**(3): 215-31.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* **144**(5): 891-901.
- Dexter, D. L., J. A. Barbosa, et al. (1979). "N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells." *Cancer Res* **39**(3): 1020-5.
- Diep, C. B., M. R. Teixeira, et al. (2004). "Genome characteristics of primary carcinomas, local recurrences, carcinomatoses, and liver metastases from colorectal cancer patients." *Mol Cancer* **3**: 6.
- Ditschkowski, M., H. Einsele, et al. (2003). "Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation." *Transplantation* **75**(10): 1745-7.
- Dobner, T., N. Horikoshi, et al. (1996). "Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor." *Science* **272**(5267): 1470-3.
- Drewinko, B., B. Barlogie, et al. (1979). "Response of exponentially growing, stationary-phase, and synchronized cultured human colon carcinoma cells to treatment with nitrosourea derivatives." *Cancer Res* **39**(7 Pt 1): 2630-6.
- Drewinko, B., M. M. Romsdahl, et al. (1976). "Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line." *Cancer Res* **36**(2 Pt 1): 467-75.
- DSMZ: www.dsmz.de
- Duque, P. M., C. Alonso, et al. (1998). "Antitumoral effect of E1B defective adenoviruses in human malignant cells." *Gene Ther* **5**(2): 286-7.
- Excoffon, K. J., G. L. Traver, et al. (2005). "The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor." *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**(6): 498-503.
- Farrow, S. N., J. H. White, et al. (1995). "Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K." *Nature* **374**(6524): 731-3.
- Fechner, H., A. Haack, et al. (1999). "Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers." *Gene Ther* **6**(9): 1520-35.

- Fechner, H., M. Noutsias, et al. (2003). "Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism." *Circulation* **107**(6): 876-82.
- Freytag, S. O., M. Khil, et al. (2002). "Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer." *Cancer Res* **62**(17): 4968-76.
- Freytag, S. O., K. R. Rogulski, et al. (1998). "A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy." *Hum Gene Ther* **9**(9): 1323-33.
- Ganly, I., D. Kirn, et al. (2000). "A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **6**(3): 798-806.
- Gatz, C. and P. H. Quail (1988). "Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(5): 1394-7.
- Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1403-8.
- Gazdhar, A., P. Fachinger, et al. (2006). "Gene transfer of hepatocyte growth factor by electroporation reduces bleomycin-induced lung fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Geier, M. S., R. N. Butler, et al. (2006). "Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics." *Int J Food Microbiol*.
- Geissendorfer, M. and W. Hillen (1990). "Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded tet regulatory elements." *Appl Microbiol Biotechnol* **33**(6): 657-63.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2006). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." *Trends Biochem Sci*.
- Gorziglia, M. I., M. J. Kadan, et al. (1996). "Elimination of both E1 and E2 from adenovirus vectors further improves prospects for in vivo human gene therapy." *J Virol* **70**(6): 4173-8.
- Gorziglia, M. I., C. Lapceovich, et al. (1999). "Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3." *J Virol* **73**(7): 6048-55.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.
- Graham, F. L. and L. Prevec (1992). "Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines." *Biotechnology* **20**: 363-90.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Greber, U. F., M. Willetts, et al. (1993). "Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells." *Cell* **75**(3): 477-86.
- Gross, A., J. Jockel, et al. (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." *Embo J* **17**(14): 3878-85.
- Gu, W., A. Ogoose, et al. (2004). "High-level expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor messenger RNA in osteosarcoma, Ewing's sarcoma, and benign neurogenic tumors among musculoskeletal tumors." *Clin Cancer Res* **10**(11): 3831-8.
- Guan, Y. S. and Y. Liu (2006). "Interventional treatments for hepatocellular carcinoma." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**(4): 495-500.
- Gumucio, D. L., A. Diaz, et al. (2002). "Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis." *Clin Exp Rheumatol* **20**(4 Suppl 26): S45-53.
- Habib, N. A., R. R. Mitry, et al. (2002). "Assessment of growth inhibition and morphological changes in in vitro and in vivo hepatocellular carcinoma models post treatment with dl1520 adenovirus." *Cancer Gene Ther* **9**(5): 414-20.
- Hartwell, L. H. (1980). "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone." *J Cell Biol* **85**(3): 811-22.
- Haviv, Y. S., J. L. Blackwell, et al. (2002). "Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors." *Cancer Res* **62**(15): 4273-81.
- He, T. C., S. Zhou, et al. (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2509-14.
- Heise, C., M. Lemmon, et al. (2000). "Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration." *Clin Cancer Res* **6**(12): 4908-14.
- Heise, C., A. Sampson-Johannes, et al. (1997). "ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents." *Nat Med* **3**(6): 639-45.
- Heise, C. C., A. M. Williams, et al. (1999). "Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy." *Cancer Res* **59**(11): 2623-8.
- Hemminki, A. and R. D. Alvarez (2002). "Adenoviruses in oncology: a viable option?" *BioDrugs* **16**(2): 77-87.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.

- Henry, L. J., D. Xia, et al. (1994). "Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in Escherichia coli." *J Virol* **68**(8): 5239-46.
- Hierholzer, J. C. (1973). "Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination." *J Infect Dis* **128**(4): 541-50.
- Hilleman, M. R. and J. H. Werner (1954). "Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness." *Proc Soc Exp Biol Med* **85**(1): 183-8.
- Hogan, M. J. (1957). "Keratoconjunctivitis; the clinical characteristics of the California epidemic, 1941-1942." *Am J Ophthalmol* **43**(4 Part 2): 41-4.
- Howitt, J., C. W. Anderson, et al. (2003). "Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR." *Curr Top Microbiol Immunol* **272**: 331-64.
- Howitt, J., M. C. Bewley, et al. (2003). "Structural basis for variation in adenovirus affinity for the cellular coxsackievirus and adenovirus receptor." *J Biol Chem* **278**(28): 26208-15.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bcl-2 is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12401-6.
- Hu, Y., M. A. Benedict, et al. (1999). "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis." *Embo J* **18**(13): 3586-95.
- Huber, B. E., E. A. Austin, et al. (1993). "In vivo antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase." *Cancer Res* **53**(19): 4619-26.
- Huebner, R. J., M. J. Casey, et al. (1965). "Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3: sharing of tumor antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus type 7 tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(2): 381-8.
- Hui, H. P., X. Y. Li, et al. (2006). "[Adeno-associated viral gene transfer of SERCA2a improves heart function in chronic congestive heart failure rats]." *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* **34**(4): 357-62.
- Hwang, P. M., F. Bunz, et al. (2001). "Ferrodoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells." *Nat Med* **7**(10): 1111-7.
- Ichikura, H., M. Eto, et al. (2006). "In vivo growth of transitional and renal cell carcinoma cell lines can be suppressed by the adenovirus-mediated expression of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor." *Oncol Rep* **15**(5): 1333-7.
- Itoh, N., S. Yonehara, et al. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." *Cell* **66**(2): 233-43.
- Jain, R. K. (1990). "Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors." *Cancer Res* **50**(3 Suppl): 814s-819s.
- Jawetz, E. (1959). "The story of shipyard eye." *Br Med J* **51**(26): 873-6.
- Jiang, S. and M. Caffrey (2005). "NMR assignment and secondary structure of the Coxsackievirus and Adenovirus receptor domain 2." *Protein Pept Lett* **12**(6): 537-9.
- Johnson, M., S. Huynh, et al. (2006). "Differential Biodistribution of Adenoviral Vector In Vivo as Monitored by Bioluminescence Imaging and Quantitative Polymerase Chain Reaction." *Hum Gene Ther*.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, et al. (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 4997-5002.
- Karlinger, K., T. Gyorke, et al. (2000). "The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Eur J Radiol* **35**(3): 154-67.
- Kelly, T. J. (1975). "Structure of the DNA of the Adenovirus 7-Simian Virus 40 Hybrid, E46, by Electron Microscopy." *J Virol* **15**(5): 1267-1272.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Kesisoglou, F., J. R. Chamberlain, et al. (2005). "Chimeric Ad5 vectors expressing the short fiber of Ad41 show reduced affinity for human intestinal epithelium." *Mol Pharm* **2**(6): 500-8.
- Khuri, F. R., J. Nemunaitis, et al. (2000). "A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer." *Nat Med* **6**(8): 879-85.
- Kienle, K., M. Rentsch, et al. (2005). "Expression of BCL-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation." *Transplant Proc* **37**(1): 439-41.
- Kim, H. J., C. Gatz, et al. (1995). "Tetracycline repressor-regulated gene repression in recombinant human cytomegalovirus." *J Virol* **69**(4): 2565-73.
- Kim, M., L. A. Sumerel, et al. (2003). "The coxsackievirus and adenovirus receptor acts as a tumour suppressor in malignant glioma cells." *Br J Cancer* **88**(9): 1411-6.
- Kim, T. W., J. N. Seo, et al. (2006). "Involvement of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis." *World J Gastroenterol* **12**(2): 302-5.
- Kirn, D., T. Hermiston, et al. (1998). "ONYX-015: clinical data are encouraging." *Nat Med* **4**(12): 1341-2.

- Kitajima, S., S. Takuma, et al. (1999). "Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." *Exp Anim* **48**(3): 137-43.
- Kivinen, K., M. Kallajoki, et al. (2005). "Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix." *Exp Cell Res* **311**(1): 62-73.
- Kleivi, K., G. E. Lind, et al. (2007). "Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses." *Mol Cancer* **6**: 2.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* **275**(5303): 1132-6.
- Knight, R. A. (2006). "The archaeology of apoptosis." *Parasitology* **132** Suppl: S3-5.
- Knott, A., K. Garke, et al. (2002). "Tetracycline-dependent gene regulation: combinations of transregulators yield a variety of expression windows." *Biotechniques* **32**(4): 796, 798, 800 passim.
- Kolb, M., G. Martin, et al. (2006). "Gene therapy for pulmonary diseases." *Chest* **130**(3): 879-84.
- Korn, W. M., M. Macal, et al. (2006). "Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation." *Cancer Gene Ther* **13**(8): 792-7.
- Kosai, K., K. Matsumoto, et al. (1998). "Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor." *Biochem Biophys Res Commun* **244**(3): 683-90.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1999). "Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **6**(1): 29-40.
- Labianca, R., R. Fossati, et al. (2004). "Randomized trial of intraportal and/or systemic adjuvant chemotherapy in patients with colon carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **96**(10): 750-8.
- Lai, P. B., T. Y. Chi, et al. (2006). "Different levels of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro." *Apoptosis*.
- Lane, D. P. (1998). "Killing tumor cells with viruses--a question of specificity." *Nat Med* **4**(9): 1012-3.
- Lasch, J., J. Hoffmann, et al. (1990). "Interaction of Triton X-100 and octyl glucoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies." *Biochim Biophys Acta* **1022**(2): 171-80.
- Leibovitz, A., J. C. Stinson, et al. (1976). "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines." *Cancer Res* **36**(12): 4562-9.
- Leopold, P. L., G. Kreitzer, et al. (2000). "Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis." *Hum Gene Ther* **11**(1): 151-65.
- Li, D., L. Duan, et al. (1999). "Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **5**(12): 4175-81.
- Li, Y., R. C. Pong, et al. (1999). "Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy." *Cancer Res* **59**(2): 325-30.
- Liao, Z. Y., O. Sordet, et al. (2005). "A novel polypyrimidine antitumor agent FdUMP[10] induces thymineless death with topoisomerase I-DNA complexes." *Cancer Res* **65**(11): 4844-51.
- Lichy, J. H., M. S. Horwitz, et al. (1981). "Formation of a covalent complex between the 80,000-dalton adenovirus terminal protein and 5'-dCMP in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5): 2678-82.
- Lin, H. H., T. P. Yang, et al. (1999). "Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced Madin-Darby canine kidney simple epithelial cyst formation." *Kidney Int* **55**(1): 168-78.
- Lindenbaum, J. O., J. Field, et al. (1986). "The adenovirus DNA binding protein and adenovirus DNA polymerase interact to catalyze elongation of primed DNA templates." *J Biol Chem* **261**(22): 10218-27.
- Linke, S. P. (1998). "Cancer. Has the smart bomb been defused?" *Nature* **395**(6697): 13, 15.
- Lockshin, R. A. and C. M. Williams (1965). "Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth." *J Insect Physiol* **11**: 123-33.
- Lonberg-Holm, K., R. L. Crowell, et al. (1976). "Unrelated animal viruses share receptors." *Nature* **259**(5545): 679-81.
- Lopez-Saez, J. F., C. de la Torre, et al. (1998). "Cell proliferation and cancer." *Histol Histopathol* **13**(4): 1197-214.
- Lowe, S. W. (1997). "Progress of the smart bomb cancer virus." *Nat Med* **3**(6): 606-8.
- Luo, J., Z. H. Cao, et al. (2006). "[Effect of adenovirus-mediated mutant exogenous P27kip1 gene expression on the chemosensitivities of cholangiocarcinoma cell line]." *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **44**(19): 1349-52.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Mahr, J. A. and L. R. Gooding (1999). "Immune evasion by adenoviruses." *Immunol Rev* **168**: 121-30.
- Mann, J. (2002). "Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future." *Nat Rev Cancer* **2**(2): 143-8.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." *J Exp Med* **187**(8): 1261-71.
- Meier, O. and U. F. Greber (2004). "Adenovirus endocytosis." *J Gene Med* **6** Suppl 1: S152-63.
- Mene, P. (2006). "Recent perspectives in the mechanisms and therapy of renal sclerosis." *J Nephrol* **19**(4): 413-8.

- Miyashita, T., S. Krajewski, et al. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-805.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-9.
- Modrow S, Falke D (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 391-406.)
- Moore, M., N. Horikoshi, et al. (1996). "Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11295-301.
- Mukoyama, T., T. Kanbe, et al. (2005). "Therapeutic effect of adenoviral-mediated hepatocyte growth factor gene administration on TNBS-induced colitis in mice." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(4): 1217-24.
- Mullen, C. A., M. M. Coale, et al. (1994). "Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-fluorocytosine and induce protective immunity to wild type tumor." *Cancer Res* **54**(6): 1503-6.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* **85**(6): 817-27.
- Nakayama, M., G. W. Both, et al. (2006). "An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice." *Virology* **350**(1): 103-15.
- Narvaiza, I., O. Aparicio, et al. (2006). "Effect of Adenovirus-Mediated RNA Interference on Endogenous MicroRNAs in a Mouse Model of Multidrug Resistance Protein 2 Gene Silencing." *J Virol* **80**(24): 12236-47.
- Nemerow, G. R. and P. L. Stewart (1999). "Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(3): 725-34.
- Neurath, M. F. and G. Schurmann (2000). "[Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]." *Chirurg* **71**(1): 30-40.
- Nevels, M., S. Rubenwolf, et al. (2000). "Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein." *J Virol* **74**(11): 5168-81.
- Ni, J., S. F. Chen, et al. (1996). "Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes." *Gut* **39**(2): 234-41.
- Ni, R., Y. Tomita, et al. (1994). "Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes." *Exp Cell Res* **215**(2): 332-7.
- Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." *Nature* **376**(6535): 37-43.
- Nio, Y., M. Dong, et al. (1998). "p53 expression affects the efficacy of adjuvant chemotherapy after resection of invasive ductal carcinoma of the pancreas." *Anticancer Res* **18**(5B): 3773-9.
- Nishida, K., J. D. Kang, et al. (1998). "Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration." *Spine* **23**(22): 2437-42; discussion 2443.
- Nishikawa, S. and F. Sasaki (1996). "Phagocytotic processing of apoptotic bodies of transitional ameloblasts by MHC Class II-expressing macrophages in rat incisor." *J Histochem Cytochem* **44**(12): 1459-67.
- Noordhuis, P., U. Holwerda, et al. (2004). "5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers." *Ann Oncol* **15**(7): 1025-32.
- Norrby, E., A. Bartha, et al. (1976). "Adenoviridae." *Intervirology* **7**(3): 117-25.
- Nowak, D., K. Berger, et al. (2005). "Epidemiology and health economics of COPD across Europe: a critical analysis." *Treat Respir Med* **4**(6): 381-95.
- Nunez, G., D. Hockenbery, et al. (1991). "Bcl-2 maintains B cell memory." *Nature* **353**(6339): 71-3.
- Nurse, P., Y. Masui, et al. (1998). "Understanding the cell cycle." *Nat Med* **4**(10): 1103-6.
- Okada, Y., X. J. Zuo, et al. (2006). "Adenovirus mediated IL-10 gene transfer to the airway of the rat lung for prevention of lung allograft rejection." *Transpl Immunol* **16**(2): 95-8.
- Okegawa, T., Y. Li, et al. (2000). "The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy." *Cancer Res* **60**(18): 5031-6.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* **74**(4): 609-19.
- Paillard, F. (1998). "Adenoviral vector persistence in vivo with a soluble form of CTLA4." *Hum Gene Ther* **9**(12): 1699-700.
- Pearson, A. S., P. E. Koch, et al. (1999). "Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines." *Clin Cancer Res* **5**(12): 4208-13.
- Pennisi, E. (1998). "Training viruses to attack cancers." *Science* **282**(5392): 1244-6.
- Perez, L. and L. Carrasco (1994). "Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry." *J Gen Virol* **75** (Pt 10): 2595-606.

- Petit, T., K. K. Davidson, et al. (2002). "Efficient induction of apoptosis by ONYX-015 adenovirus in human colon cancer cell lines regardless of p53 status." *Anticancer Drugs* **13**(1): 47-50.
- Pilder, S., M. Moore, et al. (1986). "The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs." *Mol Cell Biol* **6**(2): 470-6.
- Pinedo, H. M. and G. F. Peters (1988). "Fluorouracil: biochemistry and pharmacology." *J Clin Oncol* **6**(10): 1653-64.
- Pinkoski, M. J., N. J. Waterhouse, et al. (2006). "Mitochondria, apoptosis and autoimmunity." *Curr Dir Autoimmun* **9**: 55-73.
- Pinto, L. M., D. K. Yokaichiya, et al. (2000). "Interaction of benzocaine with model membranes." *Biophys Chem* **87**(2-3): 213-23.
- Podgorska, M., K. Kocbuch, et al. (2005). "Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters." *Acta Biochim Pol* **52**(4): 749-58.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." *N Engl J Med* **347**(6): 417-29.
- Raffray, M. and G. M. Cohen (1997). "Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death?" *Pharmacol Ther* **75**(3): 153-77.
- Rajesh, K. G., R. Suzuki, et al. (2006). "5-HT2 receptor blocker sarpogrelate prevents downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2 and protects the heart against ischemia-reperfusion injury." *Life Sci* **79**(18): 1749-55.
- Rancourt, C., B. E. Rogers, et al. (1998). "Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **4**(10): 2455-61.
- Rautenschlein, S., M. Suresh, et al. (2000). "Pathogenic avian adenovirus type II induces apoptosis in turkey spleen cells." *Arch Virol* **145**(8): 1671-83.
- Rawlins, D. R., P. J. Rosenfeld, et al. (1984). "Structure and function of the adenovirus origin of replication." *Cell* **37**(1): 309-19.
- Reed, J. C. (1998). "Bcl-2 family proteins." *Oncogene* **17**(25): 3225-36.
- Reed, M. J., N. Karres, et al. (2007). "The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent." *Int J Cancer* **120**(4): 753-60.
- Reid, B. J. and L. H. Hartwell (1977). "Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **75**(2 Pt 1): 355-65.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2001). "Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial." *Gene Ther* **8**(21): 1618-26.
- Rekosh, D. M., W. C. Russell, et al. (1977). "Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA." *Cell* **11**(2): 283-95.
- Rensing-Ehl, A., K. Frei, et al. (1995). "Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo." *Eur J Immunol* **25**(8): 2253-8.
- Rentsch, M., K. Kienle, et al. (2005). "Adenoviral bcl-2 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation." *Transplantation* **80**(10): 1461-7.
- Reu, F. J., S. I. Bae, et al. (2006). "Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation." *J Clin Oncol* **24**(23): 3771-9.
- Richter, B. W. and C. S. Duckett (2000). "The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond." *Sci STKE* **2000**(44): PE1.
- Robbins, P. D. and S. C. Ghivizzani (1998). "Viral vectors for gene therapy." *Pharmacol Ther* **80**(1): 35-47.
- Roberts, M. M., J. L. White, et al. (1986). "Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon." *Science* **232**(4754): 1148-51.
- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." *Genes Dev* **13**(24): 3179-84.
- Rodriguez, R., E. R. Schuur, et al. (1997). "Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells." *Cancer Res* **57**(13): 2559-63.
- Rodriguez Roldan, J. M., M. A. Lara Alvarez, et al. (2006). "[Myocardial necrosis and cardiogenic shock with normal coronaries: cardiotoxicity due to 5-FU or catecholamine cardiomyopathy]." *Med Intensiva* **30**(3): 123-4.
- Roediger, W. E. (1988). "What sequence of pathogenetic events leads to acute ulcerative colitis?" *Dis Colon Rectum* **31**(6): 482-7.
- Rogulski, K. R., S. O. Freytag, et al. (2000). "In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy." *Cancer Res* **60**(5): 1193-6.
- Rogulski, K. R., M. S. Wing, et al. (2000). "Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization." *Hum Gene Ther* **11**(1): 67-76.
- Ronnen, E. A., G. V. Kondagunta, et al. (2006). "Treatment outcome for metastatic papillary renal cell carcinoma patients." *Cancer* **107**(11): 2617-21.

- Rosen, L. (1960). "A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses." *Am J Hyg* **71**: 120-8.
- Rosenecker, J., S. Huth, et al. (2006). "Gene therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives." *Curr Opin Mol Ther* **8**(5): 439-45.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1953). "Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture." *Proc Soc Exp Biol Med* **84**(3): 570-3.
- Rustum, Y. M. (1999). "Clinical implications of 5-FU modulation." *Oncology (Williston Park)* **13**(7 Suppl 3): 22-5.
- Sanchez-Prieto, R., M. Quintanilla, et al. (1996). "Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene." *Oncogene* **13**(5): 1083-92.
- Saraste, A., K. Pulkki, et al. (1999). "Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation." *Eur J Clin Invest* **29**(5): 380-6.
- Sartor, R. B. (1997). "Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases." *Am J Gastroenterol* **92**(12 Suppl): 5S-11S.
- Sasaki, K., H. Iwatsuki, et al. (1995). "Accumulation and massive cell death of polymorphonuclear neutrophils in the developing bone marrow of the mouse: a histological study." *Acta Anat (Basel)* **153**(2): 111-8.
- Sasaki, M., J. M. Mathis, et al. (2005). "Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector." *J Inflamm (Lond)* **2**(1): 13.
- Sauthoff, H., S. Heitner, et al. (2000). "Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector." *Hum Gene Ther* **11**(3): 379-88.
- Scapa, E. and J. Eshchar (1985). "Chemical burns of the upper gastrointestinal tract." *Burns Incl Therm Inj* **11**(4): 269-73.
- Schmidt, M. R., B. Piekos, et al. (2000). "Expression of a human coxsackie/adenovirus receptor transgene permits adenovirus infection of primary lymphocytes." *J Immunol* **165**(7): 4112-9.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, et al. (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." *Eur J Biochem* **254**(3): 439-59.
- Shein, H. M. and J. F. Enders (1962). "Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics." *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1164-72.
- Shenk, T. and J. Williams (1984). "Genetic analysis of adenoviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* **111**: 1-39.
- Sherr, C. J., D. Bertwistle, et al. (2005). "p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 129-37.
- Shiao, Y. J., J. C. Chen, et al. (1989). "The solubilization and morphological change of human platelets in various detergents." *Biochim Biophys Acta* **980**(1): 56-68.
- Shimizu, S., Y. Eguchi, et al. (1996). "Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors." *Oncogene* **13**(1): 21-9.
- Shimizu, S. and Y. Tsujimoto (2000). "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 577-82.
- Shu, K. X., B. Li, et al. (2006). "The p53 network: p53 and its downstream genes." *Colloids Surf B Biointerfaces*.
- Shulga, N. and J. G. Pastorino (2006). "Acyl coenzyme A-binding protein augments bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating mu-calpain." *J Biol Chem* **281**(41): 30824-33.
- Smith, T. A., N. Idamakanti, et al. (2003). "Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice." *Hum Gene Ther* **14**(8): 777-87.
- Sprengel, J., B. Schmitz, et al. (1994). "Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis." *J Virol* **68**(1): 379-89.
- Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, et al. (1999). "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing." *J Biol Chem* **274**(13): 8359-62.
- Stillman, B. W. and A. J. Bellett (1979). "Replication of DNA in adenovirus-infected cells." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43 Pt 2**: 729-39.
- Sturm, I., C. H. Kohne, et al. (1999). "Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases." *J Clin Oncol* **17**(5): 1364-74.
- Susin, S. A., N. Zamzami, et al. (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." *J Exp Med* **184**(4): 1331-41.
- Svensson, U. and R. Persson (1984). "Entry of adenovirus 2 into HeLa cells." *J Virol* **51**(3): 687-94.
- Sykes, S. M., H. S. Mellert, et al. (2006). "Acetylation of the p53 DNA-Binding Domain Regulates Apoptosis Induction." *Mol Cell* **24**(6): 841-851.
- Szokol, J. W., G. S. Murphy, et al. (2004). "Gene therapy in heart and lung disease." *Curr Opin Anaesthesiol* **17**(1): 13-20.
- Takahashi, A. and W. C. Earnshaw (1996). "ICE-related proteases in apoptosis." *Curr Opin Genet Dev* **6**(1): 50-5.

- Tamanoi, F. and B. W. Stillman (1982). "Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(7): 2221-5.
- Temperley, S. M. and R. T. Hay (1992). "Recognition of the adenovirus type 2 origin of DNA replication by the virally encoded DNA polymerase and preterminal proteins." *Embo J* **11**(2): 761-8.
- Tewari, M., L. T. Quan, et al. (1995). "Yama/PPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase." *Cell* **81**(5): 801-9.
- Tian, H., L. Li, et al. (2006). "Antitumor effect of antisense ornithine decarboxylase adenovirus on human lung cancer cells." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**(6): 410-6.
- Tomioka, M., M. Sameshima, et al. (2002). "A possible intermediate step during apoptotic execution." *Hum Cell* **15**(1): 43-51.
- Tomko, R. P., C. B. Johansson, et al. (2000). "Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob." *Exp Cell Res* **255**(1): 47-55.
- Tomko, R. P., R. Xu, et al. (1997). "HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3352-6.
- Trentin, J. J., Y. Yabe, et al. (1962). "The quest for human cancer viruses." *Science* **137**: 835-41.
- Tsibiribi, P., C. Bui-Xuan, et al. (2006). "Cardiac lesions induced by 5-fluorouracil in the rabbit." *Hum Exp Toxicol* **25**(6): 305-9.
- Tsibiribi, P., J. Descotes, et al. (2006). "Cardiotoxicity of 5-fluorouracil in 1350 patients with no prior history of heart disease." *Bull Cancer* **93**(3): E27-30.
- Uchida, H., N. Shinoura, et al. (2003). "5-Fluorouracil efficiently enhanced apoptosis induced by adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in DLD-1 colon cancer cells." *J Gene Med* **5**(4): 287-99.
- Ulmeanu, R., C. Didilescu, et al. (2006). "[Epidemiology of lung cancer]." *Pneumologia* **55**(1): 19-23.
- van Oostrum, J., P. R. Smith, et al. (1987). "The structure of the adenovirus capsid. III. Hexon packing determined from electron micrographs of capsid fragments." *J Mol Biol* **198**(1): 73-89.
- Varga, M. J., C. Weibull, et al. (1991). "Infectious entry pathway of adenovirus type 2." *J Virol* **65**(11): 6061-70.
- Vincent, T., R. F. Pettersson, et al. (2004). "Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells." *J Virol* **78**(15): 8047-58.
- Walczak, H. and P. H. Krammer (2000). "The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems." *Exp Cell Res* **256**(1): 58-66.
- Walther, W. and U. Stein (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases." *Drugs* **60**(2): 249-71.
- Wang, D. S., Y. Li, et al. (2006). "Utility of adenovirus-mediated Fas ligand and bcl-2 gene transfer to modulate rat liver allograft survival." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**(4): 505-10.
- Wang, K., T. Guan, et al. (2000). "Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5." *J Virol* **74**(6): 2731-9.
- Wang, X. and J. M. Bergelson (1999). "Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection." *J Virol* **73**(3): 2559-62.
- Ward, M. W., M. Rehm, et al. (2006). "Real time single cell analysis of Bid cleavage and Bid translocation during caspase-dependent and neuronal caspase-independent apoptosis." *J Biol Chem* **281**(9): 5837-44.
- Wei, L., L. Wei-Min, et al. (2006). "Upregulation of CD4+CD25+ T lymphocyte by adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig fusion protein in experimental autoimmune myocarditis." *Autoimmunity* **39**(4): 289-98.
- Weinert, T. A. and L. H. Hartwell (1993). "Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint." *Genetics* **134**(1): 63-80.
- Wells, C. L. and F. S. Rhame (1990). "Effect of oral dextran sulfate on the mouse intestinal tract." *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(4): 361-5.
- Wigand, R., T. Adrian, et al. (1987). "A new human adenovirus of subgenus D: candidate adenovirus type 42." *Arch Virol* **94**(3-4): 283-6.
- Wigand, R., H. G. Baumeister, et al. (1983). "Isolation and identification of enteric adenoviruses." *J Med Virol* **11**(3): 233-40.
- Wildner, O., R. M. Blaese, et al. (1999). "Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase." *Cancer Res* **59**(2): 410-3.
- Wildner, O., J. C. Morris, et al. (1999). "Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer." *Gene Ther* **6**(1): 57-62.
- Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." *Annu Rev Immunol* **6**: 381-405.
- Willis, S., C. L. Day, et al. (2003). "The Bcl-2-regulated apoptotic pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4053-6.
- Wilson, J. M. (1996). "Adenoviruses as gene-delivery vehicles." *N Engl J Med* **334**(18): 1185-7.
- Wirtz, S., P. R. Galle, et al. (1999). "Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure." *Gut* **44**(6): 800-7.
- Wirtz, S. and M. F. Neurath (2003). "Gene transfer approaches for the treatment of inflammatory bowel disease." *Gene Ther* **10**(10): 854-60.

- Wirtz, S. and M. F. Neurath (2003). "Inflammatory bowel disorders: gene therapy solutions." Curr Opin Mol Ther **5**(5): 495-502.
- Wissmann, A., L. V. Wray, Jr., et al. (1991). "Selection for Tn10 tet repressor binding to tet operator in *Escherichia coli*: isolation of temperature-sensitive mutants and combinatorial mutagenesis in the DNA binding motif." Genetics **128**(2): 225-32.
- Wolfson, J. and D. Dressler (1972). "Adenovirus-2 DNA contains an inverted terminal repetition." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(10): 3054-7.
- Xia, D., L. J. Henry, et al. (1994). "Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution." Structure **2**(12): 1259-70.
- Xu, R., B. Ying, et al. (1997). "Construction and identification of a recombinant adenovirus which expresses human interferon-gamma." Chin J Biotechnol **13**(1): 1-8.
- Yang, J., X. Liu, et al. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." Science **275**(5303): 1129-32.
- You, L., C. T. Yang, et al. (2000). "ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients." Cancer Res **60**(4): 1009-13.
- Yu, D. C., Y. Chen, et al. (1999). "The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts." Cancer Res **59**(17): 4200-3.
- Zhu, D. E., N. Hoti, et al. (2006). "Suppression of tumor growth using a recombinant adenoviral vector carrying the dominant-negative mutant gene Survivin-D53A in a nude mice model." Cancer Gene Ther **13**(8): 762-70.
- Zoratti, M. and I. Szabo (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1241**(2): 139-76.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al. (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." Cell **90**(3): 405-13.
- Zur Hausen, H. (1967). "Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells." J Virol **1**(6): 1174-85.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all meinen Verwandten, Freunden und Bekannten bedanken, die mich in der Zeit der Erstellung der Dissertation vor allem moralisch unterstützten und somit zum Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Edward Geissler**, Leiter der experimentellen Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg, der kurzfristig die Aufgabe des Erstgutachters meiner Dissertation übernommen hat. Ebenso gilt mein Dank **Herrn PD Dr. Claus Hellerbrand** aus der Abteilung für Innere Medizin I des Klinikums der Universität Regensburg, der sich zur Erstellung des Zweitgutachens meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

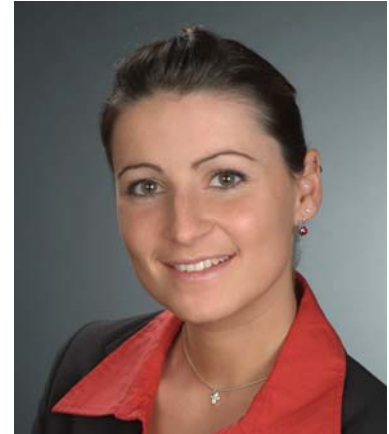
Danken möchte ich auch meinem Betreuer **Herrn PD Dr. med. Alexander Beham** vom Institut für Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Literaturrecherche, der Durchführung der Diskussion und seine Hilfe bei Fertigstellung der Arbeit.

Bei **Mandy Vogel** und **Manuela Kovacs** für die professionelle Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken, ihre Hilfestellung bei der Vorbereitung der Experimente, ihre hervorragende Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuche sowie für ihre Ratschläge zur Erstellung des Textes.

Mein Dank gilt auch ganz besonders meiner Schwester **Julia Schwarz**, meinem Bruder **Matthias Schwarz** und meinen Eltern **Anni und Wolfgang Schwarz**, die mich während der gesamten Zeit der praktischen und theoretischen Arbeit unterstützt und motiviert haben. Ohne ihre Hilfe hätte ich diese Dissertation nicht in diesem Maße durchführen können.

9. Curriculum vitae

Curriculum vitae



Persönliche Daten

Schwarz

Stefanie Emmi Elisabeth

Plattenstr. 10, Zimmer 1106
CH – 8032 Zürich
Schweiz
+41 76 4592796
+49 176 20639135
stefanie.schwarz@eliteakademie.de

Geboren am 19. Oktober 1981 in Regensburg

Bildungsweg

1988 – 1992	Besuch der Grundschule Burgweinting
1992 – 2001	Besuch des staatlichen Gymnasiums in Neutraubling (Abitur mit der Durchschnittsnote 1,0)
WS 2001 – SS 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Durchschnittsnote 1,6 (2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Durchschnittsnote 2,0)
10/04 – 06/07	Promotion im Institut für Chirurgie am Klinikum der Universität Regensburg Thema: <i>„Auswirkungen von 5-FU auf die Aufnahme von Adenoviren in Zellen in vitro und in vivo“</i>

Famulaturen:	1. Anästhesie am Evangelischen Krankenhaus Regensburg (14.02 – 14.03.04) 2. Institut für Überdruckmedizin in Regensburg (06.02. – 06.03.05) 3. Lubwe Mission Hospital in Zambia (25.08. – 05.09.05) 4. Kardiologie am Klinikum der Universität Regensburg (21.09. – 06.10.05) 5. Neurologie und klinischen Neurophysiologie am Klinikum Augsburg (11.03. – 26.03.06)
---------------------	--

Praktisches Jahr: (28.08.06 – 29.07.07)

1. Terial: Neurologie am Bezirkskrankenhaus der Universität Regensburg
2. Terial: Chirurgie am Klinikum der Universität Regensburg

3. Terial: Innere Medizin am Spital Thuis (Schweiz) und am Klinikum der Universität Regensburg

Seit Juli 2008

Assistenzärztin am Universitätsspital Zürich, Institut für Neurologie

Stipendien und Auszeichnungen

- 01.06.2001 Leonhard-Deininger-Stiftung
„...in Würdigung ihrer hervorragenden schulischen Leistungen und ihres vorbildlichen sozialen Verhaltens...“
- Seit Juni 2001 Online-Stipendium von e-fellows.net
- 23.11.2005 Erhalt des Abschlusszertifikats der Bayerischen Elite-Akademie

Praktika und Zusatzqualifikationen:

- 20.07.00 – 05.08.00 Teilnahme an der **Deutschen Schülerakademie 2000** in Roßleben
- August 2001 Praktikum am Voice Treatment Center (Medical Center) an der George Washington University in Washington DC.
- Juli/August 2001 Praktikum bei Crouse Malchow Schlackman & Hoppey in Washington DC. (Anwaltskanzlei)
- Seit Mai 2002 Nebentätigkeit als Assistentin an der Druckkammer im Institut für Überdruckmedizin in Regensburg
- 03.10. – 05.10.03 Teilnahme am Taucherarztlehrgang I (Diplom „Tauglichkeitsuntersuchungen“ „Medical Examiner of Divers“)
- 06.10. – 08.10.03 Teilnahme am GTÜM Kurs B („Tauchmedizin für Fortgeschrittene“)
- 21.10. – 23.12.02 Studentische Hilfskraft im Institut für makroskopische Anatomie der Universität Regensburg
- 04/03 – 07/06 Studentische Hilfskraft im Institut für mikroskopische Anatomie der Universität Regensburg
- 03.12. – 17.12.03 Teilnahme am Workshop Zeitmanagement an der Universität Regensburg
- Seit Februar 2004 Mitglied der **Bayerischen Elite-Akademie**
Praxisorientierte Projektarbeit mit dem Thema:
„Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen Investitionen in Human- und Sozialkapital und ökonomischem Erfolg“
- 02.08. – 21.08.04 Forschungspraktikum am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene im Klinikum der Universität Regensburg
- 06.09. – 17.09.07 Sportmedizinische Betreuung des Fußballteams vom Projekt „Jugend der Welt“ bei der Frauenfußball-WM in Shanghai
- 08/07 – 03/08 Forschungspraktikum am Institut für Neuroonkologie im Klinikum der Universität Regensburg

Soziales, Interessen

- Seit 2002 Aktives Mitglied der **Fachschaft Medizin** Regensburg
- Seit 2003 Mitglied des Deutschen Famulantenaustausches (Lokalvertretung Regensburg)
- Sprachen: Gefestigte Englischkenntnisse in Wort und Schrift (mehrmonatige Aufenthalte in England, Irland und USA)
Umfassende Lateinkenntnisse (langjährige Tätigkeit als Nachhilfelehrer)
- Musik: Musikalische Ausbildung am Klavier, an der Violine (Mitglied im *Ostbayer. Jugendorchester*, Kammermusikgruppen, Gospel-Chor)
- Theater: Teilnahme an der Musicalproduktion *Sweet Charity* des Jugendclubs der Städtischen Bühnen Regensburg
- Sport: Aktives Mitglied im Volleyballverein SVO, Rhythmische Sportgymnastik
-

Regensburg, im Dezember 2008

Stefanie Schwarz

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.