

**Untersuchungen zur T<sub>H</sub>1 assoziierten  
Immunpathogenese und adenoviralen  
Gentherapie bei Chronisch  
Entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg Universität  
Mainz

**Stefan Wirtz**  
geboren in Zell an der Mosel

Mainz, 2001

Tag der mündlichen Prüfung : 21.02.2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenetische Faktoren für die Entstehung von CED</b>	<b>2</b>
1.2.1	Das Immunsystem des Darms	2
1.2.2	Zelluläre und molekulare Elemente der Pathophysiologie von CED	4
1.2.2.1	Epithelzellen	4
1.2.2.2	Makrophagen	5
1.2.2.3	T-Lymphozyten	5
<b>1.3</b>	<b>Transkriptionsfaktoren der STAT - Familie</b>	<b>7</b>
1.3.1	Die IL-12/STAT-4 Signaltransduktionskaskade	8
<b>1.4</b>	<b>Vektorstrategien für die Gentherapie</b>	<b>10</b>
1.4.1	Adenoviren	12
1.4.1.1	Struktur des Kapsids und Genoms von Adenovirus Serotyp 5	12
1.4.1.2	Der adenovirale Lebenszyklus	13
1.4.2	Gentransfer mit rekombinanten adenoviralen Vektoren	14
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Reagenzien und Materialien</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>17</b>
2.3.1	Häufig verwendete Puffer und Medien	17
2.3.2	Enzyme	18
2.3.3	Bakterienstämme	18
2.3.4	Kryokonservierung	18
2.3.5	Elektroporation von Bakterienzellen	19
2.3.5.1	Herstellung elektrokompeter E. coli	19
2.3.5.2	Transformation	19
2.3.6	Isolation von Plasmid-DNA	19
2.3.6.1	Im kleinen Maßstab (Miniprep)	19
2.3.6.2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.3.7	Enzymatische Modifikation von Plasmiden	20

2.3.8	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	20
2.3.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	21
2.3.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.3.11	Fällung von DNA	21
2.3.12	Isolierung der genomischen DNA aus dem Mäuseschwanz	21
2.3.13	Isolierung von RNA	22
2.3.14	Reverse Transkription	22
2.3.15	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.3.16	Transiente Transfektionen eukaryontischer Zellen	24
2.3.16.1	Lipofektion	24
2.3.16.2	Kalziumphosphat Kopräzipitation	25
2.3.17	Herstellung der FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäuse	25
<b>2.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>25</b>
2.4.1	Isolation gesamtzellulärer Proteine	25
2.4.1.1	Herstellung von Proteinlysaten	25
2.4.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	26
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.4.3	Western-Blot	26
2.4.4	ELISA (,enzyme linked immunosorbent assay‘)	28
2.4.5	Chemolumineszenter Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase	29
<b>2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
2.5.1	Kultivierung und Konservierung von Zellen	29
2.5.2	Isolierung primärer Zellen der Maus	30
2.5.2.1	Einzelzellsuspensionen und CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz	30
2.5.2.2	CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>High</sup> T-Lymphozyten aus der Milz	31
2.5.2.3	Isolierung mononukleärer Zellen der Lamina Propria (LPMC)	32
<b>2.6</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.6.1	Produktion rekombinanter viraler Partikel	32
2.6.2	CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation	33
2.6.3	Quantifizierung viraler Partikel	33
2.6.3.1	OPU (‘opticle particle units’)	33
2.6.3.2	PFU (‘plaque forming units’)	34
2.6.3.3	FFU (‘fluorescence forming units’)	34
2.6.4	Infektionsversuche mit rekombinanten Ad-5	34
2.6.4.1	<i>In vitro</i>	34
2.6.4.2	<i>In vivo</i>	35
<b>2.7</b>	<b>Mausmodelle</b>	<b>35</b>



2.7.1	Immunisierung der FVB/N Mäuse	35
2.7.2	,TNBS-Kolitis‘	36
2.7.3	T - Zell Transfer in C.B-17 SCID-Mäuse	36
<b>2.8</b>	<b>Histochemie</b>	<b>36</b>
2.8.1	Doppelfärbung	36
2.8.2	X-Gal Färbung kultivierter Zellen	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Überexpression von STAT-4 im transgenen Mausmodell</b>	<b>38</b>
3.1.1	Generierung STAT-4 transgener Mäuse	38
3.1.1.1	Herstellung des Vektorkonstrukts für die Mikroinjektion	38
3.1.1.2	Herstellung und Identifizierung transgener ‚founder‘ Mäuse	40
3.1.1.3	Gewebedistribution der Expression von STAT-4 mRNA und Protein	40
3.1.1.4	Induktive STAT-4 Expression über Immunisierung mit DNP-KLH/ CFA	42
3.1.2	Chronische Kolitis in DNP-KLH behandelten FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen	44
3.1.2.1	Phänotyp	44
3.1.2.2	Histologische Analyse	45
3.1.2.3	Infiltrierende CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lamina Propria exprimie- ren aktiviertes STAT-4 und produzieren proinflammatorische Zyto- kine	47
3.1.3	Charakterisierung der Immunantwort in FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen mit Ko- litis	49
3.1.4	CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten aus FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen mit Kolitis sind reak- tiv gegenüber bakteriellen Antigenen der autologen intestinalen Flora	50
3.1.5	Adoptiver Transfer der Kolitis in SCID Mäuse durch CD4 <sup>+</sup> T-Lym- phozyten	52
<b>3.2</b>	<b>Adenoviraler Gentransfer in den Dickdarm</b>	<b>54</b>
3.2.1	Herstellung und Produktion rekombinanter Adenoviren	54
3.2.1.1	Herstellung von Ad5lacZ über homologe Rekombination in 293 Zellen	55
3.2.1.2	Herstellung von Ad-GFP-sIL-18 und Ad-GFP-asIL-18 über homo- loge Rekombination in E. coli	57
3.2.2	Transduktion von Kolonzellen <i>in vitro</i>	59
3.2.2.1	Rekombinante Ad5 können kolonepithelartige Zellen <i>in vitro</i> effizient transduzieren	59

3.2.2.2	Transduktion primärer mononukleärer Zellen der Lamina Propria	61
3.2.2.3	Gesteigerte Transduktion von primären CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten und LPMC über die Verwendung von Ad5 mit modifizierter Oberflächenstruktur	62
3.2.2.4	Modulation der IL-18 Expression in DLD-1 Zellen	64
3.2.3	Untersuchungen <i>in vivo</i>	65
3.2.3.1	Transduktion von Zellen des Kolons nach lokaler Administration rekombinanter Ad-5	66
3.2.3.2	Zeitlicher Verlauf der $\beta$ -Galaktosidase Expression im Dickdarm	67
3.2.3.3	Vornehmlich Epithelzellen werden durch intraluminale Administration rekombinanter Ad-5 transduziert	68
3.2.3.4	Erhöhte Transduktionsraten in Mäusen mit experimenteller Kolitis	70
3.2.3.5	Die intrarektale Administration rekombinanter Ad-5 führt zu keiner systemischen Intoxikation	70
3.2.3.6	Intrarektale Administration von Ad-GFP-as-IL-18 vermindert die IL-18 Expression im entzündeten Darm	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Das STAT-4 transgene Mausmodell</b>	<b>73</b>
4.1.1	Induzierbare Aktivierung der STAT-4 Expression in FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen	74
4.1.2	Chronische Kolitis in immunisierten FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen	75
4.1.3	Die zentrale Rolle von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten für die Entstehung der Kolitis	77
4.1.4	Störung der Toleranz gegenüber Antigenen der intestinalen Mikroflora im entzündeten Darm	78
<b>4.2</b>	<b>Adenovirale Genexpression im Dickdarm</b>	<b>80</b>
4.2.1	Adenovirus-medierte Transduktion des Kolons	80
4.2.2	Transduktion von Kolonepithelzellen	81
4.2.3	Transduktion von LPMC	82
4.2.4	Transduktion von entzündetem Gewebe	83
4.2.5	Sicherheit der lokalen Administration	84
4.2.6	Modulation der Expression von IL-18 im entzündeten Darm	85
4.2.7	Perspektiven replikationsdefekter Ad-5 für den therapeutischen Gentransfer in den Dickdarm	86
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>88</b>

<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>Anhang</b>	
Danksagung	113
Publikationsliste	114
Lebenslauf	115
Eidesstattliche Erklärung	116

# 1. Einleitung

## 1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn (Colitis granulomatosa) und Colitis ulcerosa sind die Prototypen in Schüben verlaufender chronisch entzündlicher Erkrankungen des Darms (CED) mit einer jährlichen Inzidenz in Deutschland von 5-10 Fällen/100000 Personen (Podolsky et al., 1991). Die Ereignisse, welche zur Entstehung dieser lebensbedrohenden und bisher nur symptomatisch behandelbaren Krankheiten führen, sind noch weitgehend unbekannt. Während bei der Colitis ulcerosa die entzündlichen Erscheinungen ausschließlich im Dick- und Mastdarm auftreten, kann bei Morbus Crohn der gesamte Verdauungstrakt vom Mund bis zum Anus betroffen sein. Patienten mit Morbus Crohn sind u.a. von starken Bauchschmerzen, blutiger Diarrhoe und extraintestinalen Manifestationen wie Arthritis, Augenerkrankungen, primär sklerosierender Cholangitis, Anämie und malabsorptiven Vitaminmangelzuständen betroffen. Die entzündlichen Veränderungen können die gesamte Darmwand umfassen, und es kommt in Phasen hoher entzündlicher Aktivität zur Ausbildung von Geschwüren, Granulomen, Engstellen (Stenosen) und gelegentlich zur Ausbildung von Verbindungsgängen mit anderen Organen oder umgebendem Gewebe (Fisteln). Bei ca. 70-85 % der Patienten ist das terminale Ileum betroffen, häufig aber auch der Dickdarm (40 - 55%; Kornbluth et al., 1993).

Die Colitis ulcerosa verläuft chronisch-rezidivierend oder chronisch-kontinuierlich und ist symptomatisch meist durch blutig-schleimige Diarrhoen und akute Bauchkrämpfe gekennzeichnet. Während die Tunica muscularis stets entzündungsfrei ist, führt der Befall der Mukosa und Submukosa meist zur Ausbildung von Geschwüren, Kryptenabszessen und entzündlichen Pseudopolypen. Die Colitis ulcerosa beginnt meist im Rektum und kann sich im Krankheitsverlauf gleichmäßig bis zum Coecum ausbreiten. Bei Totalbefall des Dickdarms ist nach mehr als 10 jähriger Krankheitsdauer auch eine erhöhte Inzidenz zu dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut und der Entstehung von Karzinomen gegeben (Jewell et al., 1993).

Akute entzündliche Schübe bei CED werden medikamentös zumeist mit Kortikosteroiden in hohen Dosen behandelt, was vor allem bei der oftmals notwendigen Langzeittherapie mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist. Desweiteren werden standardmäßig antientzündliche Substanzen wie Mesalazin (5-Amino-Salizylsäure), Azathioprin bzw. 6-Mercaptopurin verabreicht. Neben der konservativ-medikamentösen Therapie ist nicht selten eine chirurgische Intervention notwendig. Die meisten (~ 70 %) Morbus Crohn Patienten benötigen im Laufe ihres Lebens zumindest einen chirurgischen Eingriff. Eine vollständige Heilung der Colitis ulcerosa kann bisher nur durch die Entfernung des gesamten Dickdarms (Colectomie) erreicht werden.

## 1.2 Pathogenetische Faktoren für die Entstehung von CED

Die Ätiopathogenese bei CED ist noch weitgehend unklar. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben jedoch zu der Erkenntnis geführt, daß eine fehlgesteuerte Aktivierung des intestinalen Immunsystems ein zentraler pathogenetischer Faktor für die Krankheitsentstehung sein kann. Insbesondere die Analyse experimenteller Tiermodelle hat gezeigt, daß multiple genetische, endogene und umweltbedingte Faktoren den Ausbruch und die Chronizität dieser Erkrankungen begünstigen (Wirtz et al., 2000).

### 1.2.1 Das Immunsystem des Darms

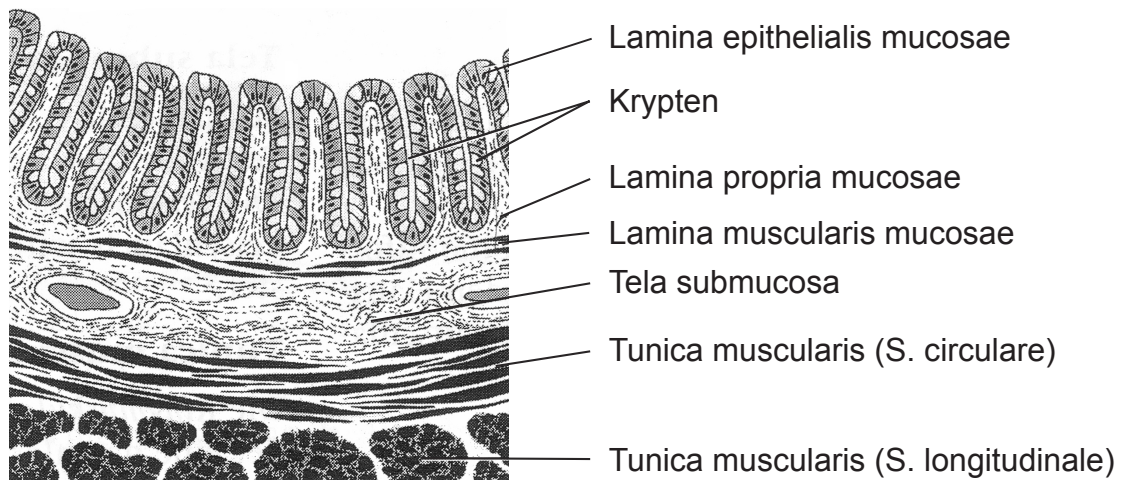
Die Mukosa des Gastrointestinaltraktes (Tunica mucosa) trennt die Bestandteile des Darmlumens vom Körperinneren und stellt mit ca. 200 m<sup>2</sup> die weitaus größte Oberfläche des menschlichen Körpers dar. Damit ein effizienter Transport der Nahrungsbestandteile ins Gefäßsystem gewährleistet ist, aber gleichzeitig eine effiziente Barriere für den unphysiologischen Eintritt pathogener Antigene, Mikroorganismen und Toxine besteht, hat sich in der Phylogenese des Säugerorganismus im Darm ein hochkomplexes, immunregulatorisches Netzwerk entwickelt. Unter physiologischen Bedingungen können somit pathogene Faktoren mit hoher Selektivität eliminiert werden, während apathogene Substanzen und Bestandteile der intestinalen Mikroflora toleriert werden.

Mikroanatomisch gesehen hat die Tunica mucosa in den verschiedenen Bereichen des Darms einen einheitlichen, mehrschichtigen Grundbauplan (**Abb. 1**) aus Epithelschicht (Lamina epithelialis mucosae), Lamina propria mucosae und Lamina muscularis mucosae, gefolgt von einer Bindegewebeschicht (Tela submucosa) und einer Schicht aus glatter Muskulatur (Tunica muscularis). In der Darmwand liegen zudem das arterielle und venöse Gefäßsystem, die Lymphgefäße und das intramurale Nervensystem. Die einschichtige Lamina epithelialis mucosae des Darms besteht überwiegend aus resorptiven Enterozyten, die eine hochprismatische Oberfläche ausbilden. Darin eingebettet liegen mucus-bildende Becherzellen, enteroendokrine Zellen und intraepitheliale Lymphozyten (**IEL**). In der Lamina propria mucosae befinden sich im Bindegewebe lymphoide Strukturen und freie Zellen der Immunabwehr, wie Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und eosinophile Granulozyten.

Das mukosaassoziierte lymphatische Gewebe des Darms (**GALT** = ‚gut associated lymphoid tissue‘) ist das größte immunologische Organ des Körpers. Im Prinzip kann in 3 funktionelle Bereiche unterschieden werden :

1. Organisierte lymphatische Gewebe (subepitheliale lymphatische Follikel, Peyer'sche Plaques, mesenteriale Lymphknoten, Appendix),

2. freie lymphatische Zellen der Lamina propria,
3. intraepitheliale Lymphozyten.



**Abb. 1 Ausschnitt eines Querschnitts durchs Colon transversum**  
(verändert nach Linß & Fanghänel, 1999)

Unter physiologischen Bedingungen beginnt nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand eine immunologische Reaktion auf luminalen Antigene am sog. ‚induktiven Ort‘ des mukosalen Immunsystems : Makromoleküle und Mikroorganismen werden über die epitheliale Barriere durch spezialisierte epitheliale Zellen, die Microfold („M“) - Zellen, oder spezialisierte Dendritische Zellen (Rescigno et al., 2001), endozytotisch aufgenommen und aktiv durch Transzytose in die Peyer‘ schen Plaques transportiert. Dort aktivieren die luminalen Antigene über antigenpräsentierende Zellen spezifische regulatorische T- und B-Lymphozyten. Ein Teil dieser aktivierten Lymphozyten wandert über den Ductus thoracicus in die Zirkulation und gelangt schließlich über die Expression von Adhäsionsmolekülen in die Lamina Propria des Darms, den mukosalen ‚Effektor Ort‘. Dies bedeutet, daß Antigene der Nahrungsmittel und der intestinalen Mikroflora automatisch zur Anwesenheit spezifischer, immunkompetenter Zellen in der gastrointestinalen Schleimhaut führen (Salmi et al, 1999; Rothkotter et al., 1999). Treten diese Antigene z.B. pathogene Mikroorganismen (z.B. Salmonella spec., Yersinia spec.) direkt in die Schleimhaut ein, wird in der Regel eine spezifische humorale Immunantwort initiiert. Während B-Lymphozyten in nicht mukosaassoziierten Bereichen des Körpers vorwiegend IgG und IgM Antikörper produzieren, sezernieren die Plasmazellen der Lamina Propria fast ausschließlich neutralisierendes IgA, das über transzytotische Mechanismen ins Darmlumen gelangt. IgA Antikörper sind keine potenten Aktivatoren gewebedestruierender Entzündungserscheinungen wie IgG und es wird daher angenommen, daß über die Sekretion von IgA statt IgG pathogene Faktoren neutralisiert bzw. eliminiert, aber gleichzeitig die empfindliche Schleimhautstruktur des Darms geschützt werden sollen (Kelsall et al., 1995).

In der physiologischen intestinalen Mikroflora wurden mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies nachgewiesen, deren Zahl im Darm die Gesamtzahl der Körperzellen mehrfach übertrifft. Auch die Nahrungsmittel enthalten eine Vielzahl körperfremder und immunologisch relevanter Substanzen. Der permanente Kontakt des mukosalen Immunsystems mit hohen Konzentrationen dieser ‚nützlichen‘ Antigene erfordert immunregulatorische Schutzmechanismen, welche eine überschießende Immunantwort effizient und permanent supprimieren können.

## **1.2.2 Zelluläre und molekulare Elemente der Pathophysiologie von CED**

### **1.2.2.1 Epithelzellen**

Die intestinalen Epithelzellen (IEC) sind zusammen mit löslichen Faktoren wie Mucinen und ‚trefoil‘ Peptiden eine wichtige antigenunspezifische Barriere gegen potentiell pathogene Substanzen des Lumens (Perdue et al., 1999; Wong et al., 1999). Hierzu zählen pathogene Bakterien, Produkte der intestinalen Mikroflora, toxische Nahrungsbestandteile und potentiell autoaggressive Substanzen wie beispielsweise Verdauungsenzyme und Gallensäuren. Der interzelluläre Dialog mit anatomisch benachbarten immunologischen Effektorzellen ist ein wesentliches Momentum der Integrität des mukosalen Immunsystems. Diese lymphoepitheliale Kommunikation erfolgt direkt über gemeinsame Rezeptor-/Ligandensysteme oder lösliche Botenstoffe wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Moleküle des Arachidonsäurestoffwechsels (Shanahan et al., 1999). IECs sind befähigt, luminale Antigene aufzunehmen und über das MHC Klasse Ib Molekül CD1d speziellen regulatorischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu präsentieren (Campbell et al., 1999). Aktuelle Untersuchungen haben zudem Hinweise ergeben, daß IECs auch über die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 die Aktivierung von Makrophagen durch physiologische, luminale Antigene supprimieren können (Colgan et al., 2000). Wie in IL-7/IL-7 Rezeptor transgenen bzw. ‚knockout‘ Mäusen gezeigt wurde, ist die Produktion von IL-7 durch IEC essentiell für die normale Entwicklung der Peyer‘ schen Plaques und TCR- $\gamma\delta^+$  intraepithelialer Lymphozyten (Laky et al., 2000). Die unphysiologische Überexpression von IL-7 in Mäusen führt dagegen zur Entwicklung einer chronischen ulzerierenden Kolitis (Watanabe et al., 1998). Interessanterweise produzieren IEC bei Colitis ulcerosa Patienten mit akuten Entzündungsschüben große Mengen an IL-7 und IL-7R. Es wird daher in diesem Zusammenhang vermutet, daß dieses IL-7 einen direkten oder indirekten Einfluß auf die pathophysiologische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten hat (Watanabe et al., 1999).



### 1.2.2.2 Makrophagen

Intestinale Makrophagen sind ein wesentliches Element inflammatorischer Prozesse im Darm. Makrophagen können als professionelle APC T-Lymphozyten antigenspezifisch aktivieren und produzieren in aktiviertem Zustand zahlreiche proinflammatorische (z.B. IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ ) und immunmodulatorische (IL-12, IL-18) Zytokine. Während humane Lamina Propria Makrophagen im Ruhezustand CD68 und vergleichsweise geringe Mengen CD14 und CD68 exprimieren, gibt es bei CED Subpopulationen, die verstärkt die Aktivierungsmarker CD14 und CD33, CD44 oder CD16 exprimieren (Rogler et al., 1998). Sowohl bei Morbus Crohn, als auch bei Colitis ulcerosa wurde eine erhöhte Produktion von TNF- $\alpha$  durch intestinale Makrophagen nachgewiesen. Die spezifische Blockade der Proteinsynthese der p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Transkription von TNF- $\alpha$  und anderer proinflammatorischer Zytokine reguliert, über spezifische Antisenseoligonukleotide konnte in einem Tiermodell für CED die entzündlichen Veränderungen in der Darmschleimhaut nahezu vollständig beseitigen (Neurath et al., 1996). Auch für IL-6 wurden bei Crohn Patienten signifikant erhöhte Serumspiegel gefunden, die direkt mit der klinischen Krankheitsaktivität korrelierten (Gross et al., 1992). Ferner konnte bei Morbus Crohn gerade in stark entzündeten Arealen vermehrt IL-12 und IL-18 nachgewiesen werden. Diese Zytokine werden im Darm hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Dendritischen Zellen produziert und sind wichtige Effektormoleküle einer zellvermittelten autoimmun Gewebedestruktion (Monteleone et al., 1997; Pizarro et al., 1999).

### 1.2.2.3 T-Lymphozyten

Zahlreiche Studien haben demonstriert, daß im Darm verschiedene T-Lymphozyten Subpopulationen existieren, die durch molekulare und funktionelle Charakteristika voneinander abgegrenzt werden können. Die Migration und Einordnung der T-Lymphozyten in die Mikroumgebung der Darmmukosa wird bestimmt durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren, die z.B. von T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut nicht oder nur in vermindertem Umfang exprimiert werden. Im Rahmen von Genese und Chronizität der CED scheinen T-Lymphozyten eine zentrale, regulatorische und effektorische Rolle wahrzunehmen (Romagnani et al., 1997).

Die intestinalen intraepithelialen T-Lymphozyten (*i*IEL) sind überwiegend CD8 und  $\alpha^E\beta 7$  Integrin positiv.  $\alpha^E\beta 7$  Integrin Rezeptoren ermöglichen, vermutlich im Zusammenspiel mit Chemokinen, durch die Bindung an E-Cadherin die Adhäsion an Zellen des Epithels (Arstila et al., 2000). Das Verhältnis von  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$  T-Zellen innerhalb der *i*IEL Subpopulation ist ungefähr gleich. Die  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten exprimieren zumeist CD8  $\alpha/\alpha$  Homodimere und entwickeln sich vermutlich außerhalb des Thymus. Die Variabilität der exprimierten Antigenrezeptoren ist bei *i*IEL im Vergleich zu T-Lymphozyten aus der Lamina Propria oder dem



peripheren Blut gering (Helgeland et al., 1997). Diese Tatsache läßt vermuten, daß nur ein eingeschränktes Spektrum intestinaler Antigene erkannt werden kann. Die physiologische Funktion der *i*IEL ist noch weitgehend unklar. Es wird sowohl eine Rolle bei der initialen Bekämpfung luminaler Pathogene, als auch eine Funktion bei der Ausprägung einer immunologischen Toleranz gegen z.B. Antigene der Nahrung diskutiert (Oida et al., 2000).

Bei CED finden sich in der Lamina propria vermehrt infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die große Mengen proinflammatorischer Zytokine sezernieren. Die Klassifizierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in zwei funktionell verschiedene Untergruppen aufgrund ihres Zytokinexpressionsprofils, hat zu einem erweiterten Verständnis der zentralen regulatorischen Rolle der T-Lymphozyten und ihrer Zytokine bei Infektionen und Autoimmunerkrankungen geführt (Mosmann et al., 1986). T<sub>H</sub>1 Zellen, die vor allem IFN- $\gamma$  und IL-2 produzieren, steuern die zellvermittelte Immunität gegen intrazelluläre Pathogene. Demgegenüber fördern die IL-4 und IL-5 produzierenden T<sub>H</sub>2 Zellen die humorale Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger. Interessanterweise haben einige Studien gezeigt, daß T-Lymphozyten aus der Lamina Propria bei den beiden Hauptformen von CED unterschiedliche Zytokinexpressionsprofile haben. T-Lymphozyten aus dem Darm von Patienten mit Morbus Crohn produzierten *in vitro* nach polyklonaler Stimulation vor allem die T<sub>H</sub>1 Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , aber im Vergleich zu Zellen aus Kontrollpatienten geringere Mengen der T<sub>H</sub>2 Zytokine IL-4 und IL-5 (Fais et al., 1991; Fuss et al., 1996; Parronchi et al., 1997). Auch auf der Ebene der mRNA ergaben sich in Morbus Crohn Läsionen signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Level in der Lamina Propria (Niessner et al., 1995). Dagegen wurde keine veränderte IFN- $\gamma$  Produktion von T-Lymphozyten aus Colitis ulcerosa Resektaten beobachtet. Diese produzierten jedoch deutlich vermehrt IL-5 (Fuss et al., 1996). Eine mögliche Ursache für diese verschiedenartig polarisierten Immunantworten ist die vermehrte Produktion von IL-12 und IL-18 durch intestinale Makrophagen, wie sie nur im Darm von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen wurde (Monteleone et al., 1997, Pizarro et al., 1999). Auch die Analyse verschiedener experimenteller Tiermodelle hat ergeben, daß aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Zytokine ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei CED sein könnten. So führt beispielsweise der adoptive Transfer der CD45RB<sup>High</sup> Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz von Balb/c Mäusen in immundefiziente C.B-17 SCID Mäuse zur Entwicklung einer chronischen Kolitis mit einigen histopathologischen Ähnlichkeiten zum Morbus Crohn (Powie et al., 1994).

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, daß im mukosalen Immunsystem eine weitere wichtige Gruppe spezialisierter T-Lymphozyten existiert, die eine pathologische Immunantwort gegen Nahrungsmittelantigene (orale Toleranz) und Bestandteile der normalen intestinalen Mikroflora unterdrückt. Diese regulatorischen T-Zellen (T-reg) konnten *in vitro* IL-10 abhängig generiert werden und waren in der Lage, die Aktivierung von T-Lymphozyten antigenspezifisch zu inhibieren. Nach adoptiven Kottransfer in C.B-17 SCIDs zusammen mit CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> Zellen konnten sie die Entwicklung einer chronischen Kolitis verhindern

(Groux et al., 1997). Die immunsuppressive Wirkung dieser Zellpopulation ist zumindest teilweise auf die Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 zurückzuführen. Die molekularen Prozesse, die zur Entwicklung der T-reg Zellen *in vivo* führen sind noch unklar. Einige Daten legen nahe, daß die Peyer'schen Plaques im Bereich der M-Zellen das spezialisierte Mikromilieu für die Genese toleranzinduzierender T-Lymphozyten sein könnten (MacDonald et al., 2001). Im Darm von Patienten mit CED ist das T-zellvermittelte immunologische Gleichgewicht wahrscheinlich erheblich gestört. So konnte in Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie im experimentellen Tiermodell der Verlust der Toleranz gegen die bakterielle Mikroflora beobachtet werden (Duchmann et al., 1995 und 1996).

### 1.3 Transkriptionsfaktoren der STAT - Familie

STAT („signal transducer and activator of transcription“) Transkriptionsfaktoren sind eine strukturell konservierte Proteinfamilie, die bisher u.a. in Dictyostelium, *C. elegans*, Drosophila und Vertebraten nachgewiesen wurde (Ihle, 2001). In höheren Eukaryonten sind STAT Faktoren an der Signalübertragung vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren beteiligt (O'Shea, 1997). STAT Proteine liegen in inaktivierter Form als Monomere im Zytoplasma vor. Die STAT Signaltransduktionskaskade beginnt mit der Bindung eines Ligands an den Zelloberflächenrezeptor und seiner daraus resultierenden Aggregation mit intrazellulär assoziierten Janus-Kinasen (JAK), die nachfolgend phosphoryliert und aktiviert werden. Aktivierte JAKs phosphorylieren zytoplasmatische Tyrosine des Rezeptors und ermöglichen so die selektive Anlagerung von STAT Proteinen über ihre „src homology 2“ (SH2) Domäne. Nach der Tyrosinphosphorylierung durch die JAKs können die STATs über die wechselseitige Assoziation ihrer SH2 Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinen Homo- oder Heterodimere bilden. Infolgedessen wird das Kernlokalisierungssignal demaskiert und die STAT-Dimere translozieren in den Nukleus. Dort können STATs über die Bindung an regulatori-



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von STAT-Proteinen** *ND* : die N-Domäne besteht (bei STAT-4) aus 8  $\alpha$  Helices und ist für die Stabilisierung der Interaktionen zwischen STAT Dimeren verantwortlich. Über die exponierte *Coiled Coil* Domäne können Protein-Protein Interaktionen erfolgen. *DB* : sequenzspezifische Bindung an die DNA. *SH2* : Bindung an Phosphotyrosine. *Y* : Tyrosinrest der nach Ligandenbindung an den Rezeptor durch Jaks phosphoryliert wird. *TAD* : C-terminale Transaktivierungsdomäne mit Serinrest, der bei einigen STATs zur vollständigen Aktivierung phosphoryliert wird.

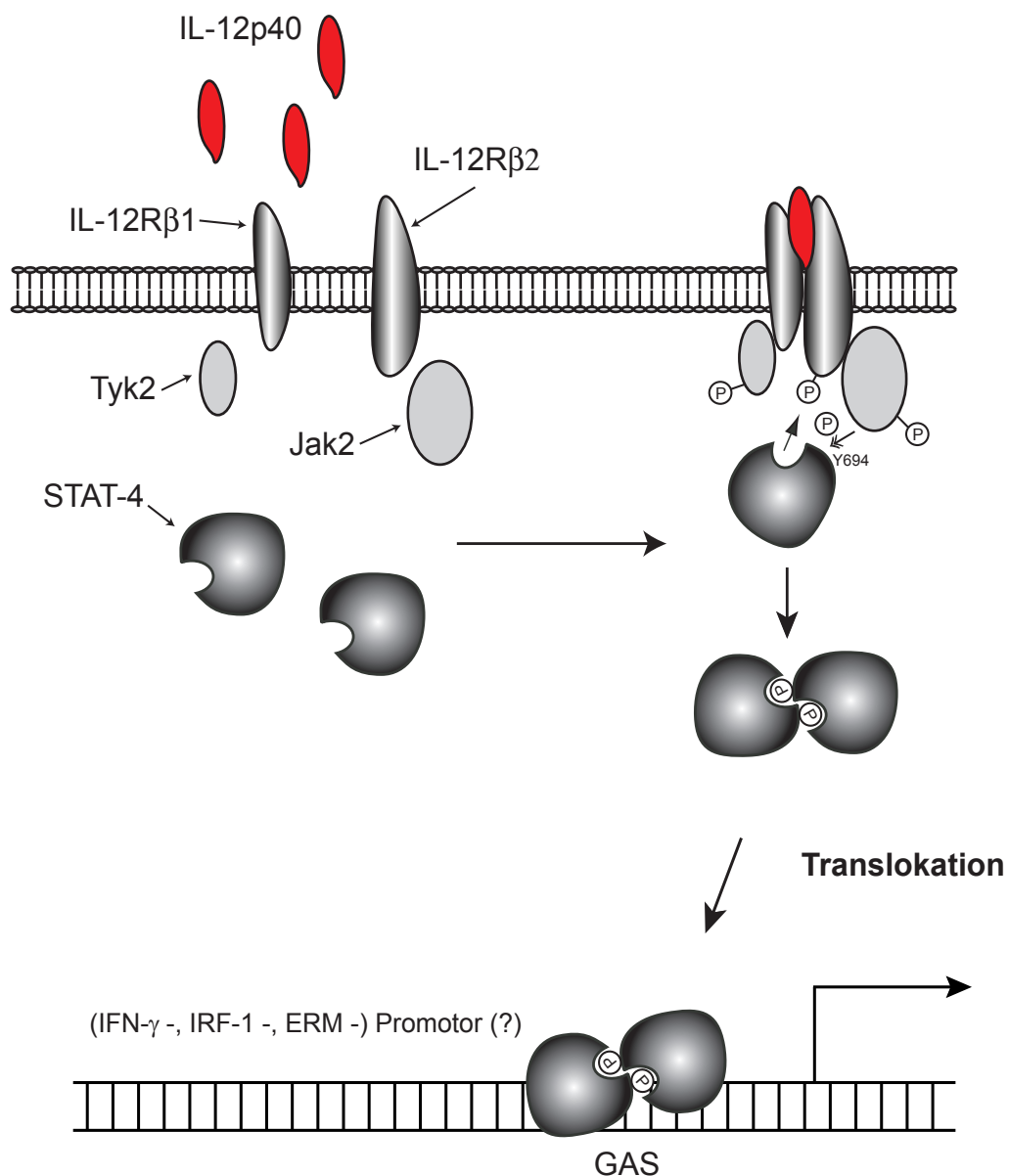
sche Zielsequenzen der chromosomalen DNA und die Wechselwirkung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne mit anderen Proteinfaktoren direkt die Transkription von Zielgenen modulieren. Bis dato wurden bei Säugern sieben verschiedene STAT Proteine identifiziert (STAT - 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6), die ihrerseits wiederum über ein komplexes, intrazelluläres Netzwerk anderer Proteine reguliert werden können (Liu et al., 1998; Krebs et al., 2000).

### 1.3.1 Die IL-12/STAT-4 Signaltransduktionskaskade

Interleukin-12 (IL-12, IL-12p70) ist ein heterodimeres Zytokin aus den zwei kovalent verbundenen Untereinheiten p35 und p40 (Wolf et al., 1991). IL-12 p35 wird in vielen Zelltypen konstitutiv exprimiert, während IL-12 p40 streng reguliert im wesentlichen nur in Dendritischen Zellen (DC), aktivierten Makrophagen und EBV transformierten B-Lymphozyten produziert wird. Es besitzt eine zentrale Funktion bei der Initiierung und Perpetuierung zellvermittelter ( $T_H1$ ) Immunantworten und steuert so die Bekämpfung intrazellulärer Infektionen (Lamont et al., 1996; Jouanguy et al., 1999). Dementsprechend wurden bakterielle Zellwandkomponenten wie LPS in Kombination mit dem T- und NK-Zell Zytokin IFN- $\gamma$  als stärkste Stimuli für die Produktion von bioaktivem IL-12 beschrieben (D'Andrea et al., 1992). Dagegen wird die IL-12 Synthese durch die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  gehemmt (Schmitt et al., 1997). IL-12 p40 defiziente Mäuse produzieren substantiell weniger IFN- $\gamma$  nach Behandlung mit LPS und sind nicht in der Lage, protektive  $T_H1$  Antworten gegen intrazelluläre Erreger zu initiieren (Szabo et al., 1995). Beim Menschen führen genetische Störungen der IL-12 Signaltransduktion zu einer lebensbedrohenden Suszeptibilität für Infektionen mit Mycobacterium oder Salmonella Arten (Verhagen et al., 2000; Sakai et al., 2001).

Die biologischen Funktionen von IL-12 werden über den IL-12 Rezeptor vermittelt, der vor allem auf  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Lymphozyten und aktivierten  $CD56^+$  NK-Zellen exprimiert wird. Die hochaffine Form des IL-12 Rezeptors gehört zur Zytokinrezeptor Superfamilie und ist ein Heterodimer aus  $\beta 1$  und  $\beta 2$  Kette. Nur die  $\beta 2$  Kette scheint über zytoplasmatische Domänen an ‚downstream‘ Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein. IL-12 selbst fördert autoregulatorisch die Hochregulation der  $\beta 2$  Kette, während IL-4 vermutlich für die Herunterregulation in  $T_H2$  Zellen verantwortlich ist. Die IL-12 Signaltransduktion verläuft über die Aktivierung der rezeptorassoziierten Janus-Kinasen Jak2 und Tyk2 und die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-4 an Tyr 694 (Presky et al., 1996; Naeger et al., 1999). Aktiviertes STAT-4 transloziert homodimerisiert in den Nukleus und bindet dort als Dimer oder Tetramer (=Doppeldimer) sequenzspezifisch an sog. N3 STAT Sequenzen im Promotor der Zielgene. Wie neuere Studien zeigten, ist zur Aktivierung der vollen transkriptionellen Aktivität von STAT-4 auch die Phosphorylierung von Serin-Resten erforderlich. So führt die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor auch zur Aktivierung der MKK6/p38 Kaskade, die letztlich in der Phosphorylierung des Ser 721 am STAT-4 C-Terminus resultiert

(Visconti et al., 2000). Über die Gene, die durch STAT-4 reguliert werden und somit an der Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu T<sub>H</sub>1 Zellen beteiligt sind, ist noch wenig bekannt. Neben dem ETS Transkriptionsfaktor ERM (Ouyang et al., 1999) und IRF-1 (IFN inducible factor I; Galon et al., 1999) kommt vor allem das Gen für IFN- $\gamma$  in Frage, das mehrere potentielle Bindungsstellen für STAT-4 besitzt, die *in vitro* in T-Lymphozyten einen IL-12 induzierbaren Komplex binden konnten (Xu et al., 1996; Barbulescu et al., 1998). Die zentrale, nicht redundante Funktion von STAT-4 für die Signaltransduktion von IL-12 in der Maus zeigt der Vergleich von IL-12<sup>-/-</sup> und STAT-4<sup>-/-</sup> Mäusen, die einen ähnlichen T<sub>H</sub>1 defizienten Phänotyp besitzen (Szabo et al., 1995; Kaplan et al., 1996; Thierfelder et al.,



**Abb.3 Schematische Darstellung der IL-12/STAT-4 Signaltransduktionskaskade**  
 GAS : ‚gamma interferon activation site‘

1996). Beim Menschen kann STAT-4 möglicherweise anders als bei der Maus auch an der Signaltransduktion der Type 1 Interferone (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) beteiligt sein (Farrer et al., 2000). Eine genaue Analyse der funktionellen Relevanz dieses Unterschieds zwischen Maus und Mensch steht allerdings noch aus.

In entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit Morbus Crohn wurde vermehrt IL-12 nachgewiesen. Auch die  $\beta$ 2 Kette des IL-12 Rezeptors scheint dort signifikant hochreguliert zu sein (Parello et al., 2000). Es wird daher angenommen, daß eine deregulierte, zellvermittelte Immunantwort gegen intestinale Antigene ein wichtiger pathogenetischer Faktor für Entstehung und Perpetuierung von Morbus Crohn sein könnte. Diese Hypothese wird auch durch verschiedene Experimente mit IL-12<sup>-/-</sup> und STAT-4<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt, die in verschiedenen experimentellen Modellen im Unterschied zu Wildtypmäusen keine chronischen Kolitiden entwickelten (Simpson et al., 1998). In einem weiteren experimentellen Mausmodell konnte eine granulomatöse Kolitis mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-12 therapiert werden (Neurath et al., 1995).

## 1.4 Vektorstrategien für die Gentherapie

Viele Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen lassen sich bisher mit konventionellen medikamentösen Therapieformen nur symptomatisch behandeln, während die eigentliche Krankheitsursache, wie z.B. ein Gendefekt, nicht behoben werden kann. Es wird daher in den letzten Jahren zunehmend untersucht, ob die gezielte Einschleusung neuen genetischen Materials in den Organismus eine leistungsfähige Behandlungsoption sein kann. Anwendungsmöglichkeiten des therapeutischen Gentransfers ergeben sich vor allem bei Erbkrankheiten mit isoliertem Einzelgendefekt, Krebs, multifaktoriellen genetischen Erkrankungen und chronischen Infektionskrankheiten (Mountain et al., 2000). Bei der somatischen Gentherapie, d.h dem Transfer therapeutischer Geninformation in betroffene Organe oder Körperzellen, kann zwischen *ex vivo* und *in vivo* Strategien unterschieden werden. Bei der ersten Methode wird das therapeutische Gen in der Zellkultur in zuvor dem Patienten entnommene Körperzellen eingebracht. Diese Zellen werden vermehrt und wieder in den Patienten transferiert. Für die *ex vivo* Strategie eignen sich vor allem leicht zugängliche Zellen, z.B. haematopoetische Stammzellen aus Blut und Knochenmark, Hautzellen oder Hepatozyten. Bei der *in vivo* Gentherapie erfolgt ein potentiell therapeutischer Gentransfer direkt in die Zirkulation oder das Zielgewebe im Gesamtorganismus (Hoffmann et al., 1999).

Damit die therapeutische Geninformation in den Zielzellen transkribiert und translatiert werden kann, müssen verschiedene intra- und extrazelluläre Barrieren (u.a. Zellmembran, Endosomen, Gewebestrukturen, angeborenes und adaptives Immunsystem) überwunden werden. Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Gentherapie liegt daher in der Aus-

wahl eines geeigneten Gentransfersystems, das eine effiziente und dem Verwendungszweck entsprechende Genexpression in der gewünschten zellulären Zielstruktur erlaubt. Die verwendeten Vektoren müssen zudem hohen Anforderungen an die Sicherheit genügen und sollten weder toxisch noch immunogen sein.

Prinzipiell kann in virale und nicht-virale Systeme unterschieden werden. Als nicht-virale Methoden wurden u.a. die Injektion ‚nackter‘ Plasmid DNA, Elektroporation, Lipofektion und ballistische Gentransfermethoden („gene gun“) beschrieben. Einer vergleichsweise einfachen Handhabung dieser Methoden, steht als großer Nachteil die geringe Transfektionseffizienz *in vivo* entgegen. Desweiteren ist ein spezifisches Targeting von Zellen nur schwer möglich (Mountain, 2000).

Ein wesentlich effektiverer Gentransfer ist dagegen durch die Verwendung viraler Vektorsysteme möglich, da Viren im Zuge ihrer Koevolution mit den Säugetieren teilweise äußerst effiziente Strategien entwickelt haben, ihre genetische Information in Wirtszellen einzubringen. Bis dato wurde bereits eine große Anzahl rekombinanter viraler Vektorsysteme wie Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Herpes simplex-Viren (HSV) in klinischen und präklinischen Studien erprobt (Gunzburg et al., 1995; Gottschalk et al., 1998, Lachmann et al., 1999; Walther et al., 2000). Die Auswahl eines geeigneten Gentransfersystems ist in der Regel von der Art der Therapie und der Art der zu therapierenden Zellen abhängig. Retrovirale Vektoren integrieren das gewünschte Gen stabil in das Genom der Zielzellen und könnten so eine fortwährende Genexpression in Mutter- und Tochterzellen herbeiführen. Die genomische Integration und Genexpression des Transgens ist allerdings nur in proliferierenden Zellen möglich. Da die momentan verfügbaren Systeme nur vergleichsweise niedrige Virustiter ermöglichen, ist der Einsatz von Retroviren auf *ex vivo* Strategien beschränkt (Romano et al., 1999). Mit einer retroviralen *ex vivo* Strategie wurde in den USA die erste Gentherapie bei einem Kind mit einem genetisch bedingten Defekt in der Produktion des Enzyms Adenosin-Desaminase (ADA) durchgeführt (Meran et al., 1990). Lentiviren, eine Untergruppe von Retroviren zu denen auch HIV-1, HIV-2 und SIV zählen, können sowohl ruhende, als auch proliferierende Zellen transduzieren, sind aber noch unzureichend charakterisiert. Zudem bestehen sicherheitsrelevante Bedenken hinsichtlich der Möglichkeit einer homologen Rekombination, die theoretisch zu der Entstehung pathogener Wildtypviren führen könnte (Buchsacher et al., 2000). Durch die Integration des genetischen Materials in der Zielzelle an beliebiger Stelle kann bei Verwendung von Retro- und Lentiviren darüber hinaus die Gefahr der Insertionsmutagenese und der onkogenen Transformation der Zielzellen nicht ausgeschlossen werden. Virale Vektoren auf HSV (Herpes simplex Virus) -1 Basis können in neuronalen Geweben persistieren und werden daher im Zusammenhang mit der Gentherapie neurologischer Erkrankungen diskutiert (Fraefel et al., 2000). AAV, die den Parvoviren zugerechnet werden, sind für den Menschen weitgehend apathogen und können ruhende und proliferierende Zellen stabil und gleichermaßen gut transduzieren. Für die Replikation der AAV werden allerdings Helferviren benötigt, die aufwendig abgetrennt werden



müssen.

Rekombinante, replikationsdefekte Adenoviren des Serotyps 5 wurden in einem großen Teil der bisher durchgeführten gentherapeutischen Studien verwendet, weil sie gegenüber vielen anderen viralen und nichtviralen Gentransfersystemen eine Reihe von Vorteilen besitzen. Das Genom und der Infektionszyklus sind biologisch sehr gut untersucht. Viele Studien haben gezeigt, daß Adenoviren ein breites Spektrum ruhender und proliferierender Zellen effizient transduzieren können. Adenoviren können zwar in der infizierten Zelle episomal persistieren, integrieren aber nur sehr selten in die chromosomale DNA. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit, vergleichsweise einfach sehr hohe Virustiter ( $\sim 1 \times 10^{13}/\text{ml}$ ) zu generieren, die für eine effiziente *in vivo* Gentherapie obligatorisch sind (Trapnell et al., 1994; Wilson et al., 1996). Neben einer Reihe klinischer Protokolle der Phase I mit gesunden Individuen, werden mittlerweile mit rekombinanten Adenoviren auch Phase II Studien an Patienten zur Therapie von Krebs (Habib et al., 1999 und 2001; Nemunaitis et al., 2000 und 2001; Schuler et al., 2001) durchgeführt.

## 1.4.1 Adenoviren

Adenoviren, die 1953 als eine der Ursachen zumeist harmloser allgemeiner Erkältungskrankheiten entdeckt wurden (Rowe et al., 1953), werden in zwei Gattungen unterteilt, die Mastadenoviren der Säugetiere und die Aviadenoviren, die in verschiedenen Vogelarten endemisch sind. Mittlerweile sind insgesamt über 100 verschiedene Serotypen identifiziert worden. Die bisher identifizierten 47 humanen Serotypen werden in 6 Subgenera (A-F) unterteilt und sind häufig latent in adenoidem Gewebe wie z.B. den Tonsillen zu finden. Eine akute Infektion mit einigen Serotypen kann zu Pharyngitis, Rhinitis, Kerato-Konjunktivitis und/oder Enteritis führen. Der überwiegende Teil der Serotypen bleibt dagegen subklinisch (Modrow et al., 1997).

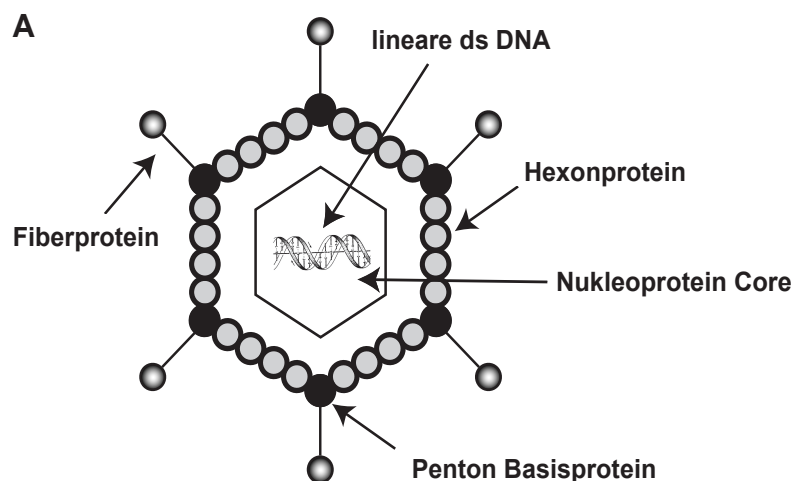
### 1.4.1.1 Struktur des Kapsids und Genoms von Adenovirus Serotyp 5

Die ikosaedrischen Kapside haben einen Durchmesser von 60-90 nm und umschließen ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom von 35935 bp (**Abb. 3A**; Chroboczek et al., 1987). Das virale Kapsid besteht aus 252 Proteinbausteinen (Kapsomeren, 240 strukturelle Einheiten aus Hexon Polypeptiden und 12 aus Pentonbasis Polypeptiden) und 60 trimeren Fibrinproteinstrukturen (Nermut et al., 1975; Philipson et al., 1984; Burnett et al., 1985). Innerhalb des Kapsids stabilisieren weitere Polypeptide (,scaffolding‘ Proteine) die virale Struktur (Dokland et al., 1999). Der Replikationszyklus kann in eine frühe Phase, in der die regulatorischen ,E‘ - Gene exprimiert werden, und eine späte Phase mit Transkription/Translation der strukturgebenden ,L‘ Gene aufgeteilt werden. Er ist gekennzeichnet durch eine kaskadenar-

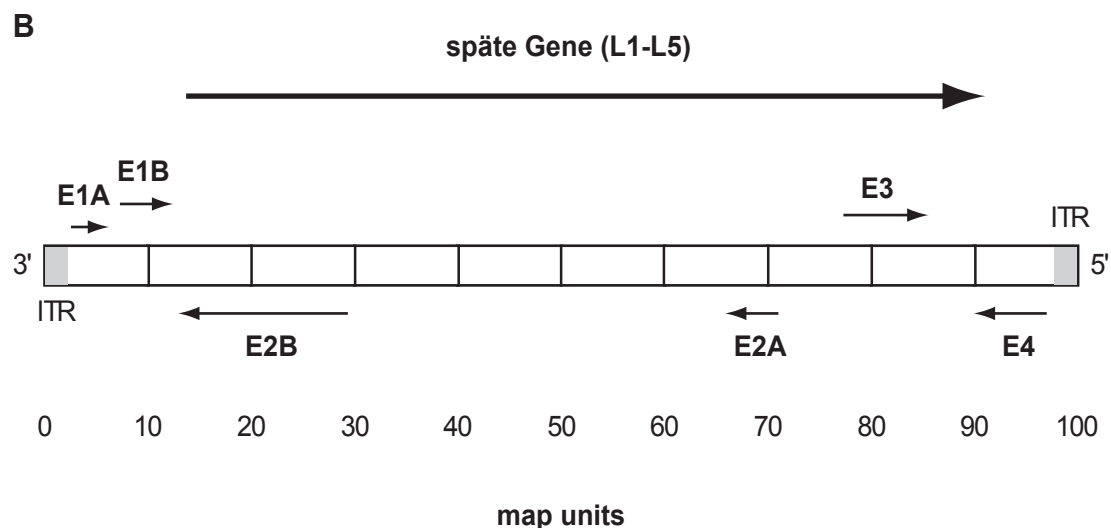
tig aufeinanderfolgende Expression viraler Gene, die in der Zerstörung der infizierten Zelle und der Freisetzung viraler Partikel mündet (Kasamatsu et al., 1998).

### 1.4.1.2 Der adenovirale Lebenszyklus

Durch die spezifische Bindung der Adenovirus Fiberproteine an den Cosackie- und Adenovirusrezeptor auf den Zielzellen kommt es nach einer Interaktion der Pentonbasis Proteine mit zellulären Integrinen zur Endozytose in Clathrin-umkleidete Vesikel (Mathias et al., 1994; Roelvink et al., 1999). Nach der Ansäuerung der Endosomen wird der Viruskern freigesetzt und über Kernlokalisierungssignale in den Nukleus transportiert. Durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie wird zunächst das E1A Gen exprimiert. Die E1A Proteine initiieren die Transkription der E1B, E2A, E2B, E3 und E4 Gene, die die Replikation und Expression der Virusstrukturkomponenten kontrollieren. Das E1B Genprodukt verhindert den Abbau der viralen DNA durch Nukleasen und verhindert im Komplex mit E1A Proteinen die wei-



**Abb. 3 A. Schematische Struktur eines Adenovirus-  
virions B. Aufbau des Adenovirus Serotyp 5 Genoms.**  
ITR : inverted terminal repeats; E1 - E4 : Leseraster früh abgelesener Gene; L1-L5 : Leseraster spät abgelesener Gene (Beschreibung siehe Text)





tere Transkription der frühen Gene, die sonst zu einem frühzeitigen Absterben der Wirtszelle führen würde. Darüber hinaus reprimiert das E1B Protein die Translation der zellulären mRNA, wohingegen es im Komplex mit einem Genprodukt der E4 Region die Translation der späten viralen Gene transaktiviert. E2 kodierte Proteine, u.a die virale DNA-Polymerase und TP, und weitere Faktoren aus E4 steuern die virale Replikation, die ca. 6-8 Stunden nach der Infektion beginnt. Als Primer für die DNA-Synthese fungiert die prozessierte Form des 80 kD Terminalen Proteins (TP), das kovalent an die 5' Enden der ITRs gebunden vorliegt (Webster et al., 1997). Die E3 Region ist für die Replikation primär nicht essentiell. So können E3 defiziente Adenoviren beispielsweise in Hela Zellen replizieren (Haj-Ahmad et al., 1986). Das E3 19 kD Protein blockiert allerdings die Präsentation viraler Peptide über MHC Klasse I Moleküle und verhindert dadurch die spezifische Erkennung und Lyse infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (Andersson et al., 1985). Desweiteren wird der FAS/Apo1 Rezeptor herabreguliert und auf diesem Wege der TNF- $\alpha$  vermittelte apoptotische Zelltod verhindert (Elsing et al., 1998). Interessanterweise wird der E3 Promotor durch NF- $\kappa$ B transaktiviert. Der starke NF- $\kappa$ B Aktivator TNF- $\alpha$  fördert so die Synthese eines Proteins, daß die eigene physiologische Funktion inhibiert (Williams et al., 1990; Pahl et al., 1996).

Über den sehr starken ‚major late promoter‘ (MLP) der Transkriptionseinheit für die späten Gene (L1-L5) werden große Mengen an Virusstrukturkomponenten produziert. Der Zusammenbau der kompletten Virusstruktur erfolgt im Nukleus. Man nimmt an, daß in einer infizierten Zelle während eines 34-36 h produktiven Vermehrungszyklus  $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  Viren produziert werden.

## 1.4.2 Gentransfer mit rekombinanten, adenoviralen Vektoren

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Vektorsysteme basierend auf dem Genom von Ad5 entwickelt. Da ein Adenovirusvirion nur wenig mehr als die Größe des Ad5 Genoms verpacken kann (105 % =  $\sim 37,5$  kb; Bett et al., 1993), wurden Deletionsmutanten generiert, die die Insertion entsprechend größerer Abschnitte rekombinanter DNA erlauben. Der überwiegende Teil der gegenwärtig verwendeten Vektoren (‚first generation recombinant adenoviruses‘) besitzen Deletionen in den E1 und E3 Regionen und erlaubt somit die Insertion von ca. 7,5 kb rekombinanter DNA. Die Einklonierung der Fremd-DNA erfolgt zumeist in die E1 Region, kann aber auch in E3 erfolgen. Einige Systeme erlauben Expressionskassetten sowohl in E1 als auch in E3 (Bett et al., 1994). Die Entfernung der E1 Region beinhaltet außerdem einen wesentlichen sicherheitsrelevanten Aspekt, da die resultierenden viralen Partikel replikationsdefekt sind und sich somit *in vivo* in infizierten Zellen nicht vermehren können (McGrory et al., 1988, Bett et al., 1994). Sofern der rekomb-

binante Adenovirus nicht für zytotoxische Proteine kodiert, überleben die infizierten Zellen die Transduktion mit Ad5. Zur Herstellung und Vermehrung der rekombinanten replikationsdefekten Partikel *in vitro* wurden Zelllinien wie 293 (Graham et al., 1977) und 911 (Fallaux et al., 1996) entwickelt, die die E1 Genprodukte *in trans* zur Verfügung stellen. Desweiteren existieren Vektorsysteme, in denen neben E1 bzw. E3 auch Sequenzen aus E2 oder E4 deletiert wurden (Raper et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden adenovirale Vektorsysteme mit Deletionen in E1 und E3 verwendet. Derartige, replikationsdefekte Vektoren wurden bereits in vielen tierexperimentellen Ansätzen und Gentherapieprotokollen beim Menschen verwendet (Danthinne et al., 2000). Die Einklonierung der Fremd-DNA in die E1 Region erfolgte dabei über homologe Rekombination in 293 Zellen oder BJ 5183 Bakterienzellen.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist noch weitgehend unklar. Zur Entwicklung kausaler therapeutischer Ansätze für diese komplexen, multifaktoriellen Krankheiten ist jedoch ein detailliertes Verständnis der immunregulatorischen Prozesse im gesunden und erkrankten Darm erforderlich. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben zu der Hypothese geführt, daß eine deregulierte zelluläre ( $T_H1$ ) Immunantwort gegen die normale intestinale Mikroflora in genetisch prädisponierten Patienten maßgeblich an der Pathogenese insbesondere des Morbus Crohn beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Dissertation sollte daher ein *in vivo* Modell entwickelt werden, das zu einem erweiterten Verständnis der molekulare Rolle der IL-12 vermittelten  $T_H1$  Antworten im Immunsystem des Darms beitragen sollte. Dazu sollte zunächst eine Expressionskassette für den IL-12 assoziierten Transkriptionsfaktor STAT-4 hergestellt und per Mikroinjektion stabil in die Keimbahn von Mäusen integriert werden. Anschließend sollte der Effekt der Überexpression von STAT-4 auf die Homöostase des mukosalen Immunsystems histologisch und molekularbiologisch untersucht werden. Dabei war die Charakterisierung der intestinalen T-Lymphozyten und deren Zytokinexpressionsprofil zunächst von besonderem Interesse.

Bakterien bzw. bakterielle Zellwandbestandteile gelten als wichtige Aktivatoren der Synthese von IL-12 und werden als krankheitsrelevanter Faktor bei CED diskutiert. In diesem Zusammenhang war die Analyse der Reaktivitäten intestinaler T-Lymphozyten gegen Antigene der autologen Flora ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen.

Der gezielte Transfer rekombinanter, genetischer Information in den Gastrointestinaltrakt könnte für biologische Studien im Tiermodell und die Gentherapie bei CED von großer Bedeutung sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher methodische Studien zu den Perspektiven rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren für den Gentransfer in den Dickdarm durchgeführt. Nach der Klonierung der Reportergene lacZ und EGFP in adenovirale

Vektoren und der Herstellung hochreiner Viruspräparationen mit hohem Titer, sollten zunächst verschiedene Applikationswege vergleichend hinsichtlich einer effizienten Transduktion von Zielzellen im Darm analysiert werden. Zudem sollten die Transduktionskapazitäten für verschiedene intestinale Zell-/Gewebetypen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Ein weiterer Untersuchungsaspekt war die Frage, ob die histologischen und molekularen Veränderungen im Rahmen eines intestinalen Entzündungsprozesses, die Aufnahme adenoviraler Partikel beeinflusst.

Schließlich sollte untersucht werden, ob eine adenovirale Überexpression von ‚antisense‘ RNA *in vivo* die Synthese endogener Proteine beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde ein replikationsdefekter Adenovirus generiert, der in transduzierten Zellen ‚antisense‘ RNA des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-18 (IL-18) überexprimiert, das im entzündeten Darmabschnitten von Patienten mit Morbus Crohn verstärkt exprimiert wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Materialien

Alle Reagenzien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders spezifiziert, in analysenreiner Qualität von den Firmen Roche, Roth, Merck, Fluka und Sigma bezogen. Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore, Eschborn. Alle hitzestabilen Puffer und Lösungen für molekular- und zellbiologische Anwendungen wurden bei 121° C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Die verwendeten Plastikwaren wurden von Eppendorf (Hamburg), Costar (Bodenheim) und Greiner (Frickenhausen) steril bezogen oder im Autoklav sterilisiert.

### 2.2 Versuchstiere

Die Stämme FVB/N und Balb/c stammten aus den Beständen der Tierhaltung der Universitätsklinik Mainz, C.B-17 SCID Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen. Sie wurden in einem geschlossenen IVC System (Charles River) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen, gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten. Futter und Wasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Die Temperatur betrug  $22 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5\%$ .

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 Häufig verwendete Puffer und Medien

<b>LB Medium</b> 1% (w/v) Bakto-Tryptone (Difco) 0.5% (w/v) Hefe Extrakt (Difco) 0.5% (w/v) NaCl pH 7  zur Herstellung von LB Agar wurden 1,5% (w/v) Bacto Agar (Difco) addiert	<b>SOC Medium</b> 2% (w/v) Bakto-Tryptone 0.5% (w/v) Hefe Extrakt 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose	<b>20 x SSC</b> 3 M NaCl, 0,2 M Natriumcitrat pH 7,0  <b>TE Puffer</b> 10 mM Tris/HCl pH 7,5 1mM EDTA
<b>50 x TAE</b> 242 g Trisaminomethan 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O	<b>10 x TBE</b> 108 g Trisaminomethan 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA ph 8,0 ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O	<b>6 x DNA Gelladepuffer</b> 30% (v/v) Glycerin 10 mM, 1 mM EDTA 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenxyanol

**Tabelle 1 : Standardpuffer – und Medien für die Molekularbiologie**

### 2.3.2 Enzyme :

Endonukleasen : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; NEB, Frankfurt

MMTV Reverse Transkriptase : Promega, Mannheim

Turbo Pfu Polymerase : Stratagene, Heidelberg

Taq Polymerase, Expand Taq : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

T4 DNA Ligase : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

T4 DNA-Polymerase : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Klenow Polymerase : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Mung Bean Nuklease : Promega, Mannheim

Alkalische Phosphatasen (CIAP und SEAP) : Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

### 2.3.3 Bakterienstämme :

#### XL1blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

#### XL1blue MRF'

D(mcrA)183 DmcrCB-hsdSMR-mrr)173 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>

#### JM110

rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F'traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]

#### TOP 10

F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔm15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (str<sup>r</sup>) endA1 nupG

#### BJ 5183

endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (str<sup>r</sup>)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB Medium bei 37° C und 225 rpm (Certomat, Braun Biotech) oder auf LB-Agar Platten. Für Selektionszwecke wurde den Medien sterile Lösungen der Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml, Ratiopharm) oder Kanamycin (25 µg/ml, Roche) steril zugegeben.

### 2.3.4 Kryokonservierung

1 ml einer Übernachtsbakterienkultur wurde kurz abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl LB- Medium resuspendiert und 500 µl 60 %iges (v/v) Glycerin addiert. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

## **2.3.5 Elektroporation von Bakterienzellen**

### **2.3.5.1 Herstellung elektrokompetenter E. coli**

1000 ml LB-Medium wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 - 0,8 bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde abzentrifugiert (6000 rpm, 15 min, 0°C), und in 1000 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 500 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, ein weiteres mal zentrifugiert und in 20 ml Wasser aufgenommen. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml 10% (v/v) Glycerin suspendiert und Aliquots in N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Transformationsrate wurde durch Transformation von 0,1 ng pUC18 - DNA bestimmt und war in der Regel 10<sup>8</sup>-10<sup>10</sup> Kolonien/μg DNA.

### **2.3.5.2 Transformation**

Zur Transformation wurden 20 μl kompetente Zellen mit 2 μl Ligationsansatz in einer Elektroporationsküvette (0,1 cm gap, Bio-Rad, München ) für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Ausübung des Pulses im Bio-Rad ‚Gene Pulser‘ (200 Ohms, 25 μF, 2,5 KV, 5 ms) wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium in ein 15 ml Röhrchen transferiert und für 1 h bei 37°C mit 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Transformationsansätze in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und zur Ausbildung der Kolonien über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.3.6 Isolation von Plasmid-DNA**

### **2.3.6.1 Im kleinen Maßstab (Miniprep)**

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien nach der Methode von He et al., (1990) isoliert. Dazu wurden 1,5 ml Bakterienübernachtskultur kurz abzentrifugiert, das Zellpellet in 100 μl Lyse-puffer resuspendiert und zusammen mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) 15 sek stark gevortext. Dabei denaturierten die Proteine und die Lipide lösten sich in der phenolischen Phase. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase mit den Plasmiden wurde vorsichtig von der Inter- und unteren Phase (genomische DNA, Proteine, Lipide) abgezogen und zur Fällung zu 250 μl eiskaltem Ethanol in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, das Pellet gewaschen, getrocknet und in 20 μl TE Puffer resuspendiert.

**Lysepuffer :**

50 mM Tris-HCl, pH 8  
62,5 mM EDTA  
2,5 M LiCl  
4 % (v/v) Triton-X-100

### 2.3.6.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung reiner Plasmid-DNA für Sequenzierungen, Subklonierungen und Transfektionen wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse und nutzt die selektive Bindung von Nukleinsäuren an ein Anionenaustauscherharz.

### 2.3.7 Enzymatische Modifikation von Plasmiden

Restriktionsverdauungen wurden in den mitgelieferten Puffern nach Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms (Roche, NEB) durchgeführt. Zur Erzeugung von glatten Enden (*blunt ends*) wurde restriktionsverdaute DNA mit 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl dNTPs (5 mM, Roth) und 2 U Klenow Enzym in wässriger Lösung für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min auf 70° C erhitzt. Wurde in einem Klonierungsexperiment geschnittene Vektor-DNA eingesetzt, die kompatible Enden enthielt, wurde zur Verhinderung der Rezirkulation in einer Ligation mittels alkalischer Phosphatase (1 U CIAP/Ansatz) für 30 Minuten direkt im jeweiligem Restriktionsansatz dephosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/50 Volumen 0,5 M EDTA pH 8 gestoppt und die Enzyme bei 70° C für 10 Minuten inaktiviert. Anschließend wurden die Plasmidmoleküle über den Genclean II Kit (Fa. Qbiogen, Heidelberg) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.3.8 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA Moleküle analytisch und präparativ aufgetrennt. Die Agarose Konzentration innerhalb der verwendeten Gele wurde nach der Größe der zu trennenden DNA Fragmenten gewählt. Die Agarose (NEEO, Roth) wurde in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle vollständig aufgelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60° C wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml, Stocklösung 10 mg/ml) hinzugegeben. Die zu analysierenden Versuchsansätze wurden mit 6 fach Lade-puffer versetzt und in die Taschen des erstarrten Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 5-8 V/cm in 1x TAE-Puffer mittels ‚Agagel Standard‘ und ‚Agagel mini‘ Elektrophoresesy-

stemen (Biometra, Göttingen).

### 2.3.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur DNA - Isolierung aus Agarosegelen wurde der GeneClean II Kit (Qbiogen, Heidelberg) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode wird zunächst die Gelmatrix durch eine NaI/NaClO<sub>4</sub> Lösung aufgelöst. In Anwesenheit relativ hoher Konzentrationen eines chaotrophen Salzes kann die DNA reversibel an eine Silikamatrix binden und so von Proteinen und Salzen befreit werden (Vogelstein et al., 1979).

### 2.3.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen wurden mit einem Spektralphotometer (Spectronic 601, Milton Roy) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm in einer Quarzküvette photometrisch bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  ermittelt. Für die Transfektion eukaryontischer Zellen wurde ausschließlich reine DNA mit  $A_{260}/A_{280}$  Quotienten im Bereich von 1,8-2,0 verwendet.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel verwendet :

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{OD} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$A_{260}$  = Absorption bei 260 nm

OD = 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngige DNA

OD = 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngige DNA bzw. RNA

OD = 30  $\mu\text{g/ml}$  Oligonucleotide

### 2.3.11 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen eiskaltes 100 % Ethanol zugegeben. Anschließend wurde für 15 min bei -80 °C inkubiert, 20 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in TE Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.3.12 Isolierung der genomischen DNA aus dem Mäuseschwanz

Als Ausgangsmaterial zur Identifizierung der genomischen Integration des STAT-4 Trans-



gens in FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze verwendet, die mit dem QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers aus 0,3-0,5 cm Biopsien isoliert wurden.

### 2.3.13 Isolierung von RNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA aus kultivierten Zellen und Geweben der Maus erfolgte nach der Guanidinium-Thiocyanat Methode (Chomczynski et al., 1987). Die entnommenen Mausorgane wurden sofort nach Entnahme aus den Tieren in N<sub>2</sub> eingefroren. Der Zellaufschluß wurde in 5 ml RNA-Lysepuffer (4 M Guanidinium-Thiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5 % Sarcosyl; 0,1 M 2-Mercaptoethanol) mit einem Dispergierstab (Ultra-Turrax T8, Ika Labortechnik) bei maximaler Umdrehungszahl durchgeführt. Zellen aus Kulturen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und direkt im Kulturgefäß durch Zugabe von RNA-Lysepuffer aufgeschlossen. Dem Zellextrakt wurde 0,1 V 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 V Aqua Phenol (Roth) und 0,2 V Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeetzt. Anschließend wurde für 30 s gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung 30 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA in der wässrigen Phase wurde mit 1 V Isopropanol 1 h bei -80°C präzipitiert und für 30 min bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend in 700 µl RNA-Lysepuffer resuspendiert. Durch Zugabe von 1 V Isopropanol wurde die RNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 1 h bei -80° C präzipitiert. Daraufhin wurde 30 min bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach RNA Menge in 50 bis 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

### 2.3.14 Reverse Transkription

Um die Expression eines Gens auf Ebene der mRNA zu untersuchen, wurden RT-PCR Experimente ausgehend von gesamtzellulärer RNA (siehe 2.3.13) durchgeführt. Zunächst wurde die mRNA durch die enzymatische Aktivität der viralen Reversen Transkriptase unter Verwendung eines Oligo dT Primers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Erststrangsynthese). Diese wurde im Anschluß als Matrize für eine genspezifische PCR-Reaktion verwendet. Als Kontrolle wurden jeweils Reaktionsansätze für das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin mitgeführt, für das in in allen Versuchsansätzen in etwa gleich starke Signale zu fordern waren.

#### Erststrangsynthese :

5 µg RNA wurden zusammen mit 0,5 µg Oligo dT Primer (Roche) in einem Volumen von 10 µl H<sub>2</sub>O zur Zerstörung von Sekundärstrukturen für 10 min auf 65° C erhitzt und anschlie-

ßend sofort auf Eis transferiert. Nach Zugabe von 0,6 µl 100 mM DTT, 1,5 µl 5mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 6 µl 5x Erststrangpuffer (Gibco BRL), 0,5 µl RNAsin (Roche), 0,4 µl BSA (1mg/ml), 9,5 µl H<sub>2</sub>O und 1,5 µl MMTV Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde für 1 h bei 39° C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz anschließend 2 min auf 95°C erhitzt. Jeweils 4 µl der Ansätze wurden in der Standard-PCR verwendet.

### 2.3.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden HPSF gereinigt in lyophilisierter Form von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und in TE-Puffer als 100 µM Stocklösungen bei -20° C aufbewahrt. Da häufiges Auftauen die Qualität der Oligonukleotide beeinflusste, wurden daraus 20 µM Gebrauchslösungen in H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Amplifikationsreaktionen erfolgten im Mastercycler 5330 von Eppendorf-Hitzeler (Hamburg). Für die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) für ein gegebenes Primerset wurde folgende Formel verwendet : Als Schmelztemperatur wurde entsprechend die niedrigste Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer gewählt.

$$T_M[^\circ\text{C}] = 81,5 + 16,6 \times (\log M + 0,41 \times (\% GC)) - \frac{600}{N}$$

M : Kationen Konzentration im Reaktionsansatz

N : Anzahl der Nukleotide des verwendeten Oligonukleotids

% GC : Guanosin plus Cytosin-Gehalt des Oligonukleotids in Prozent

#### Standardansatz :

x µl Matrizen-DNA

5 µl 10 x Reaktionspuffer

4 µl dNTP Mix (je 5 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP)

1 µl Primer 1 (Endkonzentration 0,4 µM)

1 µl Primer 2 (Endkonzentration 0,4 µM)

2,5 U Taq-Polymerase

ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O

Soweit als möglich wurden Reaktionsmische aus gemeinsamen Komponenten für die verschiedenen Ansätze hergestellt, um Ungenauigkeiten durch das Pipettieren kleiner Volumina zu reduzieren und möglichst vergleichbare Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Um während der Reaktion einer Verdunstung des Wassers entgegenzuwirken, wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Aliquots der Ansätze wurden nach der Amplifikation mit 6x Ladepuffer versetzt und auf 1-2 % Agarose-Gelen analysiert.

**Programmierung des Thermocyclers :**

95° C	5 min		Initiale Denaturierung der DNA
94° C	45 sek	] 18-35 x	Exponentielle Amplifikation
T <sub>M</sub>	60 sek		
72° C	75 sek *		
72° C	10 min		Terminale Elongation

\* abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz

Name	Sequenz	Verwendung
S4tg-1	5' - ccagtcttgagtctcaatcc - 3'	Identifizierung von FVB/N <sup>S-4tg</sup> Mäusen
S4tg-2	5' - ctctggctaactagagaacca - 3'	
S4tg-3	5' - gcgaagtctcaagaccaacc - 3'	RT-PCR Nachweis des STAT-4 Transgens
S4tg-4	5' - gacagtgggagtggcacctt - 3'	
S4-1	5' - gagagtgagattccactctg - 3'	RT-PCR für STAT-4
S4-2	5' - cactctccagtttcatctgc - 3'	
BMP-6-1	5' - gtctgcagatgtgtctgctgtcacg - 3'	Kontrolle für genomische DNA
BMP-6-2	5' - atgatgccaccaccacg - 3'	
mβ-Aktin-1	5' - tcctgtggcatccatgaa - 3'	RT-PCR Kontrolle
mβ-Aktin-2	5' - cgcagctcagtaacagtc - 3'	

Tabelle 2 : Oligonukleotidprimerpaare für die PCR

## 2.3.16 Transiente Transfektionen eukaryontischer Zellen

### 2.3.16.1 Lipofektion

Das Prinzip der transienten oder stabilen Transfektion von Zellen mit Liposomen ist die Bindung der negativ geladenen DNA an synthetische, ungeladene oder positiv geladene Phospholipidvesikel definierter Größe. Die DNA-Lipid Komplexe können mit der Zellmembran der zu transfizierenden Zielzellen fusionieren, und die assoziierte DNA kann so endozytisch in das Zellinnere gelangen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zur Transfektion von 293 und COS7 Zellen das polykationische Lipid DOSPER (Roche) verwendet, während für Jurkat Zellen das GENEPORTER Reagenz (Peqlab, Erlangen) eingesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte dabei gemäß den Angaben der Hersteller in serumfreien Medien.

### **2.3.16.2 Kalziumphosphat Kopräzipitation**

Die DNA wird bei dieser von Graham et al. (1973) entwickelten Methode als Komplex mit feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die adhärennten Zielzellen gebracht und von diesen endozytotisch aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Herstellung des Ad-lacZ Reporteradenovirus in 293 Zellen verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  293 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 36  $\mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$ , 5  $\mu\text{g}$  des Shuttle Vektors und 5  $\mu\text{g}$  des proadenoviralen Plasmids in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gemischt. Zur Herstellung des Präzipitats wurde diese Lösung anschließend mit einer Pasteurpipette tropfenweise zu 150  $\mu\text{l}$  2x HeBS Puffer pH 7,21 gegeben. Um möglichst kleine Präzipitate zu erlangen, wurde gleichzeitig stark gevortext. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei RT inkubiert. Unter Schwenken wurden die DNA/Kalziumphosphat-Präzipitate auf die subkonfluenten 293 Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen abtrypsinisiert und gleichmäßig auf vier 6 cm Schalen verteilt. Zeitgleich wurden zur Kontrolle Versuchsansätze mitgeführt, in denen 293 Zellen auf gleiche Art und Weise mit 10  $\mu\text{g}$  des Reportervektors pEGFP-C1 (Clontech, Heidelberg) transfiziert wurden, der die Quantifizierung transfizierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop ermöglichte.

### **2.3.17 Herstellung der FVB/ $\text{N}^{\text{S-4tg}}$ Mäuse**

Die Herstellung der FVB/ $\text{N}^{\text{S-4tg}}$  Mäuse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. S. Kanzler im Labor von Professor Blessing (I. Medizinische Klinik) durch Mikroinjektion einer STAT-4 CMV Promotor Expressionskassette (Abb. 4) in männliche Vorkerne von FVB/N Zygoten und anschließende Reimplantation in scheinchwangere C57BL/6 Mäuse.

## **2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1 Isolation gesamtzellulärer Proteine**

#### **2.4.1.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Zur Präparation von Zellextrakten aus Geweben der Maus wurden die entnommenen Organe sofort in  $\text{N}_2$  schockgefroren. Anschließend wurden sie in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 500  $\mu\text{l}$  Zellysepuffer (MPER Reagenz (Perbio, Bonn) mit 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) per 10 ml) überführt, mit einer Schere grob zerkleinert und mit maxima-

ler Leistung dispergiert (Ultraturrax T8, Ika Labortechnik). Kultivierte Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von Zellysepuffer direkt aufgeschlossen. Anschließend wurden die festen Zellbestandteile durch Zentrifugation (4°C, 15 min, 14000 rpm) abgetrennt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80° C.

#### **2.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen**

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate wurde nach Bradford et al., 1976 durchgeführt (Protein Assay, Bio-Rad), eine Methode, die darauf beruht, daß Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung einen Farbkomplex mit Absorptionsmaximum bei 595 nm bilden. Der Proteingehalt der Proben konnte aus den gemessenen Extinktionen bei 595 nm mittels einer Eichgeraden berechnet werden, die mit Verdünnungsreihen von BSA (‘bovine serum albumin’, Roth) erstellt wurden.

#### **2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Diese Methode ermöglichte die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht durch die ‚Markierung‘ mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS). Sie erfolgte als vertikale Elektrophorese mit dem Mini Protean III System (Bio-Rad) in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach dem Prinzip von Schägger & Jagow (hochauflösende Tris-Tricine Gelsysteme, Schagger et al., 1987). Es wurde hierfür ein zweiphasiger Gelaufbau mit 6 % Sammelgelen und 7,5-15 % Trenngelen verwendet.

Die Proben wurden zur Denaturierung für 10 min in reduzierendem Ladepuffer, (Rotiload-1, Roth) im Thermoschüttler auf 95° C erhitzt und anschließend in die Geltaschen des polymerisierten Sammelgels aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte für 3-4 h bei 8 V/cm. Als Molekulargewichtsstandard wurden vorgefärbte Proteinmischungen (Kaleidoskopstandards, Bio-Rad) verwendet.

#### **2.4.3 Western-Blot**

Die in einer analytischen SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,45 µm) übertragen. Der Transfer erfolgte hierbei über Nacht in einer Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad) bei einer Stromstärke von 150 mA in Transferpuffer nach Angaben des Herstellers. Im Anschluß an den Transfer wurde die Membran zur Blot- und Ladekontrolle reversibel für 2 min in 0,1 % Ponceau S Lösung gefärbt und anschließend kurz in PBS entfärbt. Zur Absättigung freier

Bindungsstellen wurde die Membran 1 h bei 37° C oder über Nacht bei 4° C in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4° C mit dem in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit T-PBS (PBS/0,1 % Tween 20) entfernt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte für 1 h bei RT mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit T-PBS für je 10 min wurde die Detektion mit dem ECL- System (Fa. Bio-Rad) durchgeführt. Hierzu wurde die zuvor kurz angetrocknete Membran für 1 min mit ECL-Lösung inkubiert und anschließend in einer Filmkassette zusammen mit einem Film (Biomax ML, Kodak) exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte in einem Fuji-Prozessor. Die Detektion von primär gebundenen Antikörpern mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörpern über Chemolumineszenz-Reaktionen ist reversibel, d.h. man kann die an der Membran gebundenen Antikörper wieder entfernen (*strippen*). Hierzu wurde die Membran für 10-20 min in Stripping-Lösung geschüttelt und anschließend 3 x mit T-PBS gewaschen.

<b>Gelpuffer :</b> 3 M Tris pH 8,45 0,3 % SDS	<b>Sammelgel Stammlösung (10%) :</b> 10 ml Gelpuffer 7,5 ml 40% Acrylamid/Bis (29:1) 4 g Glycerin ad 30 ml mit H <sub>2</sub> O	<b>Trenngel Stammlösung :</b> 800 µl Gelpuffer 300 µl Acrylamid/Bis (29:1) 900 µl H <sub>2</sub> O
<b>Anodenpuffer :</b> 0,2 M Tris pH 8,9	<b>Transfer-Puffer :</b> 2,9 g Glycin 5,8 g Trisaminomethan 3,7 ml 10 % SDS 200 ml Methanol ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O	<b>Ponceau S Färbelösung :</b> 0,1 % Ponceau S (w/v), 5 % Essigsäure (v/v)
<b>Kathodenpuffer :</b> 0,1 M Tris 0,1 M Tricine 0,1 % SDS pH 8,25		<b>Blockierungslösung :</b> 5 % (w/v) Trockenmilch in PBS
		<b>Stripping-Lösung :</b> 0,1 M Glycin pH 2,8

**Tabelle 3 : Puffer für SDS-Page und Western-Blot**

Name	Klon	Spezies	Hersteller	Arbeitskonzentration
α-STAT-4	C20	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	0,2 µg/ml
α-STAT-4	L18	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	0,1 µg/ml
α-Maus IL-18	51817.111	Ratte, IgG <sub>2a</sub>	R&D Systems	0,75 µg/ml
α-Erk2	D-2	Maus, IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz	0,1 µg/ml
α-Kaninchen-IgG-POD	-	Esel, polyklonal	Amersham	1 : 5000
α-Maus-IgG-POD	-	Schaf, polyklonal	Amersham	1 : 5000
α-Ratte-IgG-POD	-	Ziege, polyklonal	Santa Cruz	1 : 2500

**Tabelle 4 : Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blot Analysen**

## 2.4.4 ELISA (,enzyme linked immunosorbent assay‘)

Zur Bestimmung der Konzentration von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden sog. Sandwich-ELISA Experimente durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein zytokinspezifischer, monoklonaler Antikörper verdünnt in 50 µl 0,1 % BSA in PBS auf einer 96 *well* Mikrotiterplatte (Maxisorb, Nunc) über Nacht immobilisiert. Anschließend wurde zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen 200 µl Absättigungspuffer addiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Daraufhin wurde 2x mit PBS/Tween gewaschen und 50 µl der Zellkulturüberstände als Doppelwerte hinzugefügt. Zur Generierung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem Zytokin mitgeführt. Desweiteren wurden 50 µl eines zweiten Zytokin-spezifischen, Biotin-markierten, monoklonalen Antikörpers verdünnt in 0,1 % BSA in PBS hinzugefügt. Die Platten wurden für mindestens 12 h bei 4° C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 75 µl/*well* einer 1/1000 in 0,1 % BSA in PBS verdünnten Streptavidin-HPO (horsereidish peroxidase, Fa. Dako) Lösung addiert. Die Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und anschließend intensiv gewaschen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 20 ml Substratpuffer mit 1 ml TMB-Lösung gemischt. Von dieser Lösung wurden je 200 µl in die *wells* gegeben. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt, das als Radikal, im Chromogen TMB (Trimethylbenzidin) eine Farbveränderung von hellgrün nach dunkelgrün bewirkte. Die Färbungsreaktion wurde nach 5-20 min durch Zugabe von 100 µl Stoppuffer abgebrochen. Die optische Dichte wurde im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen.

	Klon	Arbeitskonzentration
<b>Capture</b>		
α-IFN-γ	R4-6A2	4 µg / ml
α-TNF-α	G281-2626	2 µg / ml
α-IL-4	11B11	2 µg / ml
α-IL-10	JES5-2A2	4 µg / ml
<b>Detektion</b>		
α-IFN-γ Biotin	XMG1.2	2 µg / ml
α-TNF-α Biotin	MP6-XT3	2 µg / ml
α-IL-4 Biotin	BVD6-24G2	2 µg / ml
α-IL-10 Biotin	SXC-1	1 µg / ml
<b>Standard</b>		
IFN-γ		4000 pg / ml
TNF-α		2000 pg / ml
IL-4		4000 pg / ml
IL-10		2000 pg / ml

**Tabelle 5 : Antikörper und rekombinante Zytokine für ELISA**



<b>Coating-Puffer</b> 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 8,2	<b>PBS/Tween</b> 0,5 ml Tween 20 in 1 l PBS	<b>Absättigungspuffer</b> PBS mit 3% BSA
<b>Stoppuffer</b> 28 ml konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 0,5 l (H <sub>2</sub> O)	<b>Substratpuffer</b> 0,033 M Zitronensäure mit KOH auf pH 4,1 eingestellt	
<b>TMB- Lösung</b> 120 mg 3,5,5 Tetramethylbenzidin (Fluka, Schweiz) in 2,5 ml Aceton lösen, 22,5 ml Ethanol und 150 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> addieren, in dunkler Flasche bei RT lagern		

**Tabelle 6 : Puffer für Zytokin ELISA**

## 2.4.5 Chemolumineszenter Nachweis der $\beta$ -Galaktosidase

Die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, dem Genprodukt des lacZ Gens aus E. coli, in Zell- und Gewebeertrakt wurde mittels ‚ $\beta$ -Gal Reporter Gene Assay‘ (Roche) quantifiziert. Die Ergebnisse dienten als Maß für die zelluläre Transduktion durch lacZ Reportergenadenoviren. Das Prinzip des verwendeten Testsystems beruht auf der Deglykosylierung eines Dioxetan Substrats durch die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase im neutralen pH Bereich. Der Wechsel zu pH > 12 führt zur Deprotonierung der aktivierten, stabilisierten Dioxetan-Intermediate und zur Emission von Photonen, die im Luminometer sensitiv quantifiziert werden können. Zum Zell- und Gewebeaufschluß wurden Organe der Maus in Reporterlysepuffer (Roche), der mit 1 Tablette ‚Complete Protease Inhibitor Cocktail‘/10 ml (Roche) supplementiert wurde, homogenisiert. Dagegen wurden kultivierte Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit Reporterlysepuffer für 10 min bei RT inkubiert. Feste Bestandteile wurden durch 10 min Zentrifugation (14000 rpm, 4° C) entfernt. 1-5 µl der Proteinlysate wurden in 4 ml Plastikröhrchen mit 200 µl Reaktionspuffer gemischt und für 1 h bei 37° C inkubiert. Die Versuchsansätze wurden im Sirius Tube Luminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim) gemäß den Angaben des Herstellers analysiert.

## 2.5 Zellbiologische Methoden

### 2.5.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen

Alle Arbeiten für die Zellkultur wurden in einer sterilen Werkbank (SterilGuard, Baker) durchgeführt. Die Kultivierung aller Primärzellen aus der Maus und der Zelllinien erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Primäre Zellen aus Milz und Darm, sowie Jurkat Zellen wurden in RPMI1640 supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem foetalem Kälberserum (FCS, PAA),



2 mM L-Glutamin (Gibco BRL) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed, Berlin) kultiviert. Die Kultivierung der 293, COS7, DLD-1 und HT-29 Zellen erfolgte in Dulbecco's MEM (+ Glutamax I, Gibco BRL) mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin. Zur Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität wurde mit dem Farbstoff Trypanblau (Seromed) angefärbt, für den lebende Zellen temporär impermeabel sind, während sich das Zytoplasma abgestorbener Zellen blau anfärbt. Die Quantifizierung erfolgte lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zellkammer.

Zum Einfrieren der Zellen wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in einem vorgekühlten 2 ml Kryoröhrchen (Nunc) tropfenweise in 1 ml 10 % (v/v) DMSO in FCS aufgenommen. Die Proben wurden sofort für 12-24 Stunden in einen  $-80^\circ\text{C}$ -Tiefkühlschrank gestellt und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen schnell auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt und in Kulturmedium resuspendiert.

Zur Zellernte und zum Passagieren wurden adhärent wachsende Zellen mittels Trypsin/EDTA Lösung abgelöst. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 2x mit PBS gewaschen und 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA in PBS (Seromed) auf den Zellrasen gegeben, so daß der Zellrasen damit gerade bedeckt war. Anschließend wurde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde der Zeitpunkt des Ablösens der Zellen beobachtet. Die Zellen wurden dann durch Abklopfen vollständig vom Untergrund gelöst, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in Kulturmedium resuspendiert bzw. weiterverarbeitet.

Zelllinie	Charakterisierung	Referenz
Jurkat	humane Thymom Zelllinie	ATCC TIB-152
COS7	Affennieren Zelllinie	ATCC CRL-1651
293	humane embryonale Ad-5 E1 <sup>+</sup> Nieren Zelllinie	ATCC CRL-1573
DLD-1	humane Kolon Adenokarzinom Zelllinie	ATCC CCL-221
HT-29	humane Kolon Adenokarzinom Zelllinie	ATCC HTB-38

**Tabelle 7 : Liste der verwendeten Zelllinien**

## 2.5.2 Isolierung primärer Zellen der Maus

### 2.5.2.1 Einzelzellsuspensionen und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz

Für die Präparation primärer Milzzellen wurde den Mäusen nach zervikaler Dislokation durch einen Flankenschnitt die Milz entnommen und in sterilem RPMI1640 Kulturmedium zwischengelagert. Mit dem Kolbenende einer 5 ml Spritze wurden die Milzen durch ein 40 µm Zellsieb (Falcon, Heidelberg) gedrückt. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die

Erythrozyten durch Zugabe von 5 ml ACK-Puffer (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM EDTA) für 5 min bei RT depletiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen.

Zur Anreicherung  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten aus der Gesamtmilzzellpopulation wurde das MACS System (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf einer ferromagnetischen Markierung der Zielzellen durch zelltypspezifische, monoklonale Antikörper, die mit Mikropartikeln (Microbeads) konjugiert sind. Die Trennung der magnetisch markierten Zielzellen von unmarkierten Zellen erfolgt dann in einer Magnetsäule. Zuerst wurden dazu die primären Gesamt-Milzzellen in MACS-Puffer (PBS, 3 % (v/v) FCS, 2 mM EDTA) resuspendiert ( $90 \mu\text{l}/1 \times 10^7$  Milzzellen) und mit  $\text{CD4}$  spezifischen Microbeads versetzt ( $10 \mu\text{l}$  beads pro  $1 \times 10^7$  Zellen). Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei  $6^\circ \text{C}$  inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Microbeads wurden dann 45 ml MACS-Puffer hinzugefügt und für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde abhängig von der Zellzahl in 0,5-4 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Magnetfeld auf eine mit 3 ml MACS-Puffer equilibrierte  $\text{VS}^+$  Positivselektionssäule gegeben. Zur Entfernung der Negativfraktion wurde die Säule 3x mit je 4 ml eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, wurde die Positivfraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Der Reinheitsgrad der isolierten Zellpopulation wurde durch FACS-Analyse („fluorescent activated cell sorting“) mit  $\text{CD4}$  spezifischen Antikörpern (Becton-Dickinson, Heidelberg) bestimmt und betrug in der Regel 95-98 %.

### 2.5.2.2 $\text{CD4}^+\text{CD62L}^{\text{High}}$ T-Lymphozyten aus der Milz

Für die Induktion der T Zell abhängigen SCID Kolitis (siehe 2.7.3) wurden naive  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten benötigt. Diese wurden anhand des Oberflächenrezeptors  $\text{CD62L}$  (Mel-14, L-Selektin) aus Einzelzellsuspensionen der Milz mit dem MACS Multisort-Kit (Miltenyi Biotech) isoliert (Atreya et al., 2000). Dazu wurden  $1 \times 10^8$  frisch isolierte Milzzellen aus Balb/c Mäusen in 1 ml MACS-Puffer für 6-8 min mit  $1/10 \text{ V } \alpha\text{CD4 FITC}$  (Klon RM4-5, Becton-Dickinson) bei  $6^\circ \text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde mit der 10-15 fachen Menge an MACS-Puffer gewaschen und erneut in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.  $1/10 \text{ V } \alpha\text{-FITC}$  Microbeads wurden addiert und der Ansatz für 15 min bei  $6^\circ \text{C}$  inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in 1,5 ml MACS-Puffer resuspendiert und im Magnetfeld auf eine equilibrierte  $\text{VS}^+$  Säule gegeben. Zur Entfernung der Negativfraktion wurde 3x mit je 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, wurde die Positivfraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen. Zur Entfernung („Abschneiden“) der Microbeads wurde mit  $60 \mu\text{l}$  „Multisort Release“ Reagenz für 10 min bei  $6^\circ \text{C}$  inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann im Magnetfeld auf eine equilibrierte  $\text{VS}^+$  Säule gegeben und die

Zellen mit 3 x 4 ml MACS-Puffer eluiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert und 120 µl ‚Release stop‘ Reagenz addiert. Um nun aus diesen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten die CD62L<sup>High</sup> Subpopulation zu isolieren, wurden 7,5 µl CD62L Microbeads hinzugefügt und für 10 min bei 6° C inkubiert. Nach einem Waschschritt zum Entfernen freier Microbeads wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert und im Magnetfeld auf eine equilibrierte VS<sup>+</sup> Säule gegeben. Zur Entfernung der Negativfraktion wurde 3x mit je 4 ml MACS-Puffer gewaschen. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, konnte die Positivfraktion mit 5 ml MACS-Puffer eluiert werden. Zur Erfolgskontrolle wurden im Anschluß alle Fraktionen durch FACS-Analyse überprüft.

### **2.5.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen der Lamina Propria (LPMC)**

Zur Isolierung von LPMC wurde den Mäusen der Dickdarm entnommen und der Länge nach aufgeschnitten. Um Faecesreste zu entfernen, wurde gründlich mit PBS gespült. Die Abtrennung der Zellen des Kolonepithels erfolgte durch 30 min Schütteln bei 37° C in 30 ml PBS, dem 120 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 zugesetzt wurden. Anschließend wurde für 5 min bei RT gründlich in PBS gespült. Der Darm wurde dann in kleine Stücke zerteilt und in 10 ml RPMI1640 Kulturmedium mit 10 % FCS, 0,2 mg/ml Collagenase D (Roche) und 1 mg /ml DNase I (Roche) bei 37° C für 30-60 min geschüttelt. Nach dem enzymatischen Verdau des Bindegewebes wurde die Gewebesuspension mit dem Kolbenende einer 2 ml Spritze durch ein steriles 40 µM Zellsieb gedrückt und für 5 min bei 1300 rpm pelletiert. Es wurde 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 5 ml auf Eis vorgekühlter 100 % Percoll-Lösung (Dichte :1,077 g/ml, Seromed) resuspendiert. Nachdem vorsichtig mit eiskaltem 40 % Percoll überschichtet wurde, wurde für 15 min bei 2500 rpm und 4° C ohne Bremse zentrifugiert. Die Phase zwischen den beiden Gradienten mit den LPMC wurde entnommen. Die LPMC wurden 2 mal mit kaltem PBS gewaschen und in der Neubauer Zählkammer quantifiziert.

## **2.6 Virologische Methoden**

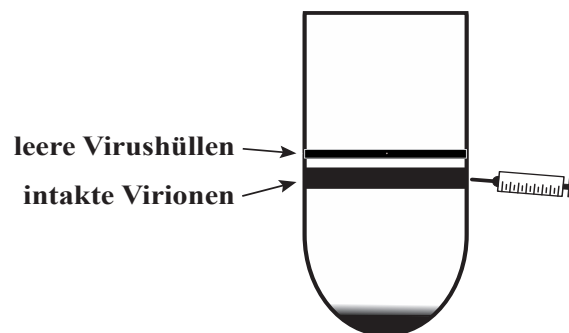
### **2.6.1 Produktion rekombinanter viraler Partikel**

Zur Vermehrung rekombinanter Adenoviren wurden 293 Zellen am Tag zuvor in einer Dichte von 5 x 10<sup>6</sup>/15 cm Kulturschale ausgesät. Am Versuchstag wurde das Medium abgesaugt, 3 ml virushaltiges Kulturmedium auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges

Schwenken gleichmäßig verteilt. Es wurde für 90 min im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgesaugt und 20 ml Kulturmedium hinzugegeben. Wenn nach 2-3 Tagen im Lichtmikroskop in der Mehrzahl der Zellen zytopathische Effekte (Abrundung und Ablösung der Zellen durch Ad-5 mediierte Zerstörung des Zytoskeletts) zu verzeichnen waren, wurden die Zellen mit einem Gummischaber vollständig abgelöst und abzentrifugiert. Zur Freisetzung der adenoviralen Partikel wurde das Zellpellet durch 3 maliges Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und Auftauen bei RT aufgeschlossen. Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min abgetrennt. Die Proben wurden bis zur Aufreinigung im CsCl Dichtegradienten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.6.2 CsCl-Dichtegradientenultrazentrifugation

Für die *in vivo* Experimente im Mausmodell mit rekombinanten Ad5 wurden hochreine Viruspräparationen benötigt, die durch zweifache Aufreinigung in diskontinuierlichen CsCl Stufengradienten hergestellt wurden. Dazu wurde zunächst 8 ml CsCl-Lösung (Dichte :  $1,4\text{ g/cm}^3$ ) in einem ‘Ultraclear’ Röhrchen (Beckman Coulter, Krefeld) mit 6 ml CsCl (Dichte :  $1,2\text{ g/cm}^3$ ) überschichtet und anschließend mit virushaltigem Zellextrakt bis knapp unter den Rand des Röhrchens aufgefüllt. Im SW28 Rotor wurde für 18 h bei 25000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  ohne Bremse ultrazentrifugiert (Optima XL, Beckman Coulter). Die undurchsichtige Bande mit den intakten Virionen wurde über eine sterile 5 ml Spritze mit einer 18 G Nadel durch die Röhrchenwand abgezogen. Anschließend wurde die Virussuspension mit PBS verdünnt und erneut, wie oben beschrieben, über einen diskontinuierlichen Stufengradienten aufgereingt. Das zelltoxische CsCl wurde über die Gelfiltration mit Sephadex-G-25 Säulen (PD-10, Amersham-Pharmacia) nach Angaben des Herstellers aus der Viruspräparation entfernt.



## 2.6.3 Quantifizierung viraler Partikel

### 2.6.3.1 OPU (‘opticle particle units’)

Eine einfache und gut reproduzierbare physikalische Methode zur groben Bestimmung adenoviraler Titer als OPU ist die photometrische Analyse der Absorption der Virus DNA bei 260 nm.  $1\text{ OD}_{260}$  entspricht dabei  $1,1 \times 10^{12}$  viralen Partikeln. Dazu wurden Virusstocks in

0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA verdünnt und für 10 min bei 56° C inkubiert. Die Messung der OD<sub>260</sub> erfolgte im Spectronic 601 Photometer (Milton Roy). Der Nachteil dieser Methode bestand allerdings darin, daß auch nicht infektiöse, defekte Partikel quantifiziert wurden und somit keine qualitativen Aussagen getroffen werden konnten.

### **2.6.3.2 PFU ('plaque forming units')**

Die Titer von Adenoviruspräparationen ohne EGFP-Marker wurden ‚traditionell‘ über die Ausbildung von lytischen Ausparungen im Zellrasen ('*plaques*') bestimmt (Graham et al., 1977). 3 x 10<sup>5</sup> 293 Zellen wurden in 6 cm Schalen ausgesät. 12-18 h später wurde das Medium abgesaugt und 1 ml serieller Verdünnungen der Viruspräparation in Medium auf die Zellen gegeben. Nach 90 min wurde der Überstand entfernt und vorsichtig mit warmer 1,25 % SeaPlaque Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in Kulturmedium überschichtet. 3 Wochen nach der Infektion wurden in der Verdünnung, die noch gut sichtbare *plaques* produzierte, die *plaques* gezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die PFU/ml bestimmt.

### **2.6.3.3 FFU ('fluorescence forming units')**

Anhand der Expression des Reportergens EGFP wurden die Titer von Ad-GFP-sIL-18 und Ad-GFP-as-IL-18 Präparationen im Fluoreszenzlicht determiniert. Die Anzahl infizierter Zellen wurde dabei mit der Anzahl GFP-exprimierender Zellen gleichgesetzt. Dazu wurden 5 x 10<sup>5</sup> 293 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. 12-15 h später wurde das Kulturmedium abgesaugt und jeweils 1 ml der seriellen Verdünnungen der Virussuspensionen in Medium hinzugegeben. 90 min später wurden die Virussuspensionen durch 5 ml Kulturmedium ersetzt. 18 Stunden später wurden die Zellen trypsinisiert und die Anzahl GFP positiver Zellen im Durchflußzytometer bestimmt (FACScan mit Cellquest Software, Becton Dickinson).

## **2.6.4 Infektionsversuche mit rekombinanten Ad-5**

### **2.6.4.1 *In vitro***

Zur Infektion von Zielzellen wurden Viruspräparationen mit bekanntem Titern verwendet, wobei teilweise verschiedene Verhältnisse von Virus zu Zelle eingesetzt wurde (MOI = 'multiplicity of infection'). Für die Transduktion adhärent wachsender Zellen wurde die entsprechend verdünnte Virussuspension so auf den subkonfluenten Monolayer gegeben, daß dieser

gerade bedeckt war. Durch vorsichtiges Schütteln wurde eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet. Es wurden Kontrollansätze mitgeführt, in denen anstatt einer Virussuspension virusfreier Puffer hinzugefügt wurde. 90 min später wurde abgesaugt und Kulturmedium hinzugegeben. Zur Transduktion von Suspensionszellen (u.a. LPMC, Milzzellen) wurden die Zellen in 15 ml Röhrchen in der Virussuspension mit der gewünschten MOI resuspendiert. Die Versuchsansätze wurden für 90 min im Brutschrank inkubiert und dabei gelegentlich leicht gemischt. Anschließend wurde mit 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und in Kulturmedium aufgenommen.

#### **2.6.4.2 *In vivo***

Zur Infektion von Mäusen wurden  $1 \times 10^9$  -  $1 \times 10^{10}$  pfu bzw. ffu der rekombinanten Ad-5 in 100 µl PBS intravenös in die lateralen Schwanzvenen, intraperitoneal oder intrarektal appliziert. Kontrolltiere wurden mit 100 µl PBS behandelt. Für die intrarektale Applikation wurden die Tiere zuvor durch intraperitoneale Behandlung mit 15-17 µl/g Körpergewicht 2,5 % Avertin in PBS anaesthetisiert. Mit einem kleinen 2 F Katheter (Braun Melsungen) wurde der Dickdarm zur Beseitigung des Stuhls intensiv gespült. Anschließend wurde die Virussuspension mit dem Katheter 4 cm darmaufwärts des Rektums langsam in das Lumen appliziert. Um den Austritt der Lösung zu verhindern, wurde die Maus mit dem Kopf nach unten positioniert und das Rektum mit einem 4F Ballonkatheter (Mansfield, New York) für 30 min verschlossen.

## **2.7 Mausmodelle**

### **2.7.1 Immunisierung der FVB/N Mäuse**

Für die Immunisierung der Wildtyp FVB/N und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse wurden 100 µg DNP-KLH emulsiert in 100 µl 50 % (v/v) des Adjuvans CFA („complete Freund's adjuvans“) intraperitoneal in die Mäuse injiziert. Zur Herstellung der DNP-KLH/CFA Emulsion wurde 1 ml 2 mg/ml DNP-KLH (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) in PBS und 1 ml CFA (Sigma) auf Eiswasser für 10 min mit einem Dispergierstab (Ultraturrax T8, IKA Labor-technik) intensiv gemischt. Um das Aufheizen der Probe zu verhindern, wurde nach jeweils 1 min für 15 sek pausiert. Die Herstellung von DNP-KLH mit ALUM als Adjuvans erfolgte folgendermaßen : Eine 10 % Aluminiumkaliumsulfat ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ) Lösung wurde mit 1 Tropfen des pH Indikators Phenolrot (Seromed) versetzt. Anschließend wurde tropfenweise bis zum Farbumschlag 0,5 M NaOH hinzugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das weiße Präzipitat 2x mit 0,15 M NaCl gewaschen.



1 mg DNP-KLH wurde für 10 min bei RT durch 1 ml ALUM Suspension absorbiert. Dann wurden 4 ml PBS addiert. 500 µl der gut gemischten Suspension wurden per Maus intraperitoneal administriert.

## 2.7.2 ‚TNBS-Kolitis‘

Die Induktion einer ‚TNBS-Kolitis‘ erfolgte wie von Neurath et al., 1995 beschrieben. 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden durch intraperitoneale Behandlung mit 14-17 µl Avertin/g Körpergewicht anaesthetisiert. Mit einem 2 F Katheter wurden 100 µl einer 2,5 % 2, 4, 6 Trinitrobenzonsulfonsäure Lösung (Sigma) in 50 % (v/v) Ethanol über das Rektum 4 cm in den Dickdarm appliziert.

## 2.7.3 T - Zell Transfer in C.B-17 SCID-Mäuse

Durch adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> Zellen kann man in immundefekten C.B-17 SCID Mäusen chronische Kolitiden induzieren (Powrie et al., 1994). Um die im Originalprotokoll verwendete, sehr aufwendige Isolation dieser Zellpopulation durch FACS zu umgehen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Alternativprotokoll etabliert (Atreya et al., 2000). Dabei wurde anstelle der CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> Subpopulation der Milz, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> Zellen transferiert. 1 x 10<sup>6</sup> frisch isolierte Zellen (siehe 2.5.3.3) aus der Milz von Balb/c Mäusen wurden intraperitoneal in 6-8 Wochen alte, weibliche C.B-17 SCID Mäuse transferiert. Für die *in vivo* Beurteilung der entzündlichen Erscheinungen im Darm adoptiv transferierter C.B-17 SCID Mäuse wurde eine endoskopische Sonde (Länge :7 cm, Ø 0,9 mm) der Fa. Volpi Medical (Schlieren) eingesetzt. Die Klassifizierung der Kolitis erfolgte mittels des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten MEICS- Score.

	Endoskopische Einstufung							Gesamt	
	Keine	0	1-2	1	3-5	2	> 5		3
<b>Ulzerationen (x2)</b>	Keine	0	1-2	1	3-5	2	> 5	3	x2
<b>Maskierung des Vaskularisierungsmusters</b>	Keine	0	moderat	1	auffällig		komplett	3	x1
<b>Mukosale Granularität</b>	Keine	0	moderat	1	auffällig	2	stark	3	x1
<b>Ausmaß</b>	Keine	0	1-2	1	3-4	2	> 4	3	x1
									<b>0-15</b>

Tabelle. 8 MEICS (‚murine endoscopic index of colitis severity‘) Score



## 2.8 Histochemie

### 2.8.1 Doppelfärbung

Zur immunhistochemischen Analyse/Doppelfärbung von Organquerschnittspräparaten der Maus wurden 10 µm Gefrierschnitte hergestellt und für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und in PBS gewaschen. Anschließend wurde über Nacht mit dem Primärantikörper verdünnt in PBS/0,1 % BSA bei 4° C inkubiert. Die Präparate wurden mit PBS/0,1 % BSA gewaschen und dann mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Vector Laboratories, Burlingame) verdünnt in PBS/0,1 % BSA für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde daraufhin mit dem Streptavidin konjugierten Chromophor Cy2 (Dianova, Hamburg) inkubiert. Zur Doppelfärbung wurde ein weiteres Mal wie oben beschrieben mit einer anderen Kombination von Primär- und Sekundärantikörper bzw. dem Chromophor Cy3 (Dianova) gefärbt. Abschließend wurden die Präparate eingedeckelt (Vectashield Mounting Medium, Vector) und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

### 2.8.2 X-Gal Färbung kultivierter Zellen

Die enzymatische Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse des 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosids (X-Gal) zu einem intensiv blauen Farbstoff. Die Färbung mit X-Gal erlaubt den Nachweis und die Quantifizierung von Zellen, die mit den LacZ Reporterviren Ad-5lacZ bzw. Ad.Z.F(pk7) transduziert waren. Dazu wurden die Ad-5 behandelten Zellen mit 2x mit PBS gewaschen und für 5 min auf Eis mit Fixierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und über Nacht bei 37° C mit Färbelösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der Prozentsatz blau gefärbter Zellen in der Gesamtpopulation im Lichtmikroskop bestimmt.

Fixierungslösung	Färbelösung
2,7 ml 37 % Formaldehyd 0,4 ml Glutardialdehyd ad 50 ml mit PBS	1 ml X-Gal (25 mg/ml in Dimethylformamid) 50 µl 1M MgCl <sub>2</sub> 41 mg K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 53 mg K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] x 3 H <sub>2</sub> O ad 25 ml mit PBS

**Tabelle 9 : Puffer für die X-Gal Färbung**

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Überexpression von STAT-4 im transgenen Mausmodell

Experimentelle Tiermodelle haben erheblich dazu beigetragen, zu einem erweiterten Verständnis zu gelangen, welche Faktoren und/oder genetischen Veränderungen im menschlichen Organismus an pathophysiologischen Prozessen beteiligt sein können und ermöglichen die experimentelle Erforschung neuer therapeutischer Ansätze. Früher wurden Tiere gezielt so gezüchtet, daß sich mehr oder minder zufällig eine Mutation entwickelte, die einem bestimmten Krankheitsbild entsprach. Während der letzten Jahre wurden jedoch zunehmend Möglichkeiten entwickelt, gezieltere Eingriffe in das Genom von Inzuchttieren vorzunehmen, die häufig eine direkte Korrelation von genetischer und phänotypischer Veränderung erlauben. Eine Methode zur Herstellung transgener Mäuse, d.h. zur stabilen (Keimbahn-) Integration rekombinanter Konstrukte in das Genom von Mäusen ist dabei die direkte Mikroinjektion gereinigter DNA Sequenzen (Gordon et al., 1985).

Der Transkriptionsfaktor STAT-4 ist als Mediator der biologischen Funktionen des immunregulatorischen Zytokins Interleukin-12 ein Schlüsselmolekül der zellvermittelten Immunität. Um die Rolle von STAT-4 im mukosalen Immunsystem des Darms *in vivo* funktionell zu charakterisieren, sollte in der vorliegenden Arbeit ein transgenes Mausmodell entwickelt werden. Eine gezielte Überexpression von STAT-4 sollte dabei unter der Kontrolle des ‚major immediate early‘ Promotors des humanen Cytomegalivirus (CMV) erfolgen. Dieser zeigt zwar in transienten Transfektionen *in vitro* in vielen Zelllinien eine starke konstitutive Aktivität, ist aber *in vivo* kein pan-spezifischer Promotor, weil in den meisten Geweben relativ unabhängig vom Vektorsystem und der Transduktionsmethode nach mehreren Wochen eine Ruhigstellung erfolgt (Petitclerc et al., 1995; Koedood et al., 1995). Studien mit transgenen Mäusen, in denen der CMV Promotor das lacZ Reportergen aus *E. coli* kontrollierte, haben jedoch gezeigt, daß dieser Ruhezustand über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B *in vivo* aufgehoben werden konnte und somit eine induzierte Genexpression ermöglicht wurde (Loser et al., 1998).

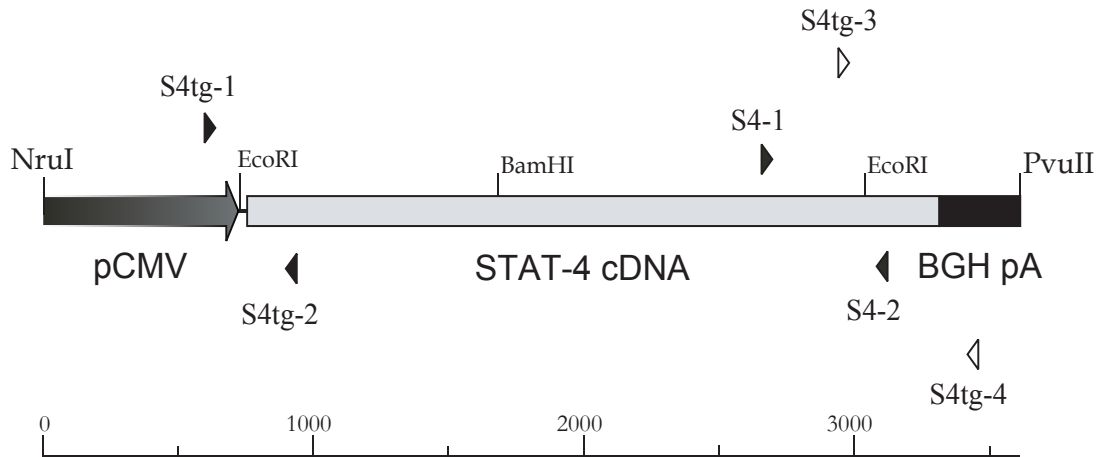
#### 3.1.1 Generierung STAT-4 transgener Mäuse

##### 3.1.1.1 Herstellung des Vektorkonstrukts für die Mikroinjektion

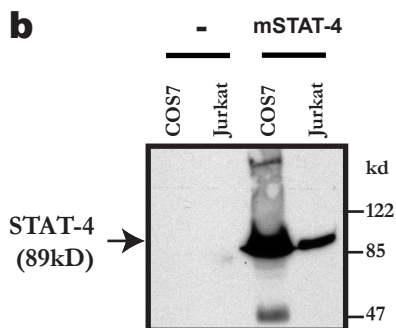
Ausgangspunkt für die Generierung des STAT-4 Expressionskonstrukts war ein cDNA Klon

(GenBank : U06923, Zhong et al., 1994), der die gesamte kodierende Sequenz für murines STAT-4 beinhaltet. Dieser wurde freundlicherweise von Professor James Darnell (Rockefeller University, New York) zur Verfügung gestellt. Die vollständige Sequenz von 2,5 kb wurde über die ApaI/NotI Schnittstellen gerichtet in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) eingebracht, der neben dem humanen CMV Promotor das Polyadenylierungssignal des ‚bovine growth hormon‘ (BGH) besitzt. Die Klonierung des Konstrukts (**Abb. 4a**) wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Zum Nachweis

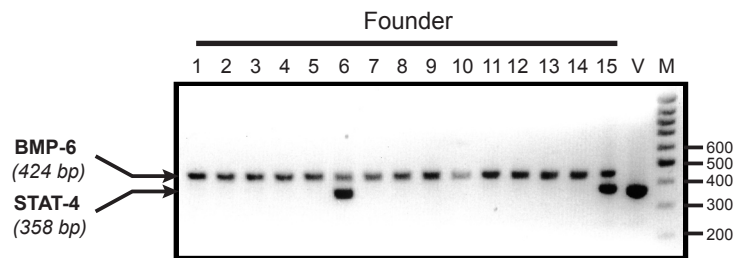
**a**



**b**



**c**



**Abb. 4 Generierung der FVB/N<sup>S4tg</sup> Mäuse** **a. Vektorkonstrukt für die Mikroinjektion** Die murine STAT-4 cDNA wurde über die ApaI/NotI Schnittstellen in den eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3.1 zwischen die Sequenz des humanen ‚immediate early‘ CMV Promotors und des Polyadenylierungssignals des bovinen Wachstumshormons eingebracht (pcDNA3.1mS-4). Um prokaryontische Sequenzen zu entfernen, wurde anschließend ein Restriktionsverdau mit NruI und PvuII durchgeführt. **b.** 10 µg des STAT-4 Konstrukts oder pcDNA3.1 ohne Insertion wurde mittels Liposomen transient in  $1 \times 10^6$  COS7 bzw. Jurkat Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden Proteinlysate hergestellt und je 50 µg in einem 7,5 % SDS-Page aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde STAT-4 mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen. **c. Identifizierung transgener ‚founder‘ Tiere mittels transgen-spezifischer PCR** Das STAT-4 Expressionskonstrukt wurde in die männlichen Vorkerne befruchteter FVB/N Eizellen mikroinjiziert. Die überlebenden Zygoten wurden in scheinsschwangere C57BL/6 Ammenmäuse transferiert. Aus der Schwanzspitze der Nachkommen wurde durch Verdau mit Proteinase K die genomische DNA isoliert. Jeweils 100 ng der Schwanz-DNA (Spur 1-15) und als Positivkontrolle 10 ng pcDNA3.1mS-4 (V) wurden einer transgenspezifischen PCR Analyse mit dem Primerpaar S4tg-1 und S4tg-2 unterzogen. Als (Wildtyp-) PCR-Kontrolle wurde jeweils im gleichen Ansatz ein Fragment des BMP (‚bone morphogenetic protein‘) -6 Gens amplifiziert. Die Amplifikate wurden im Anschluß auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt.

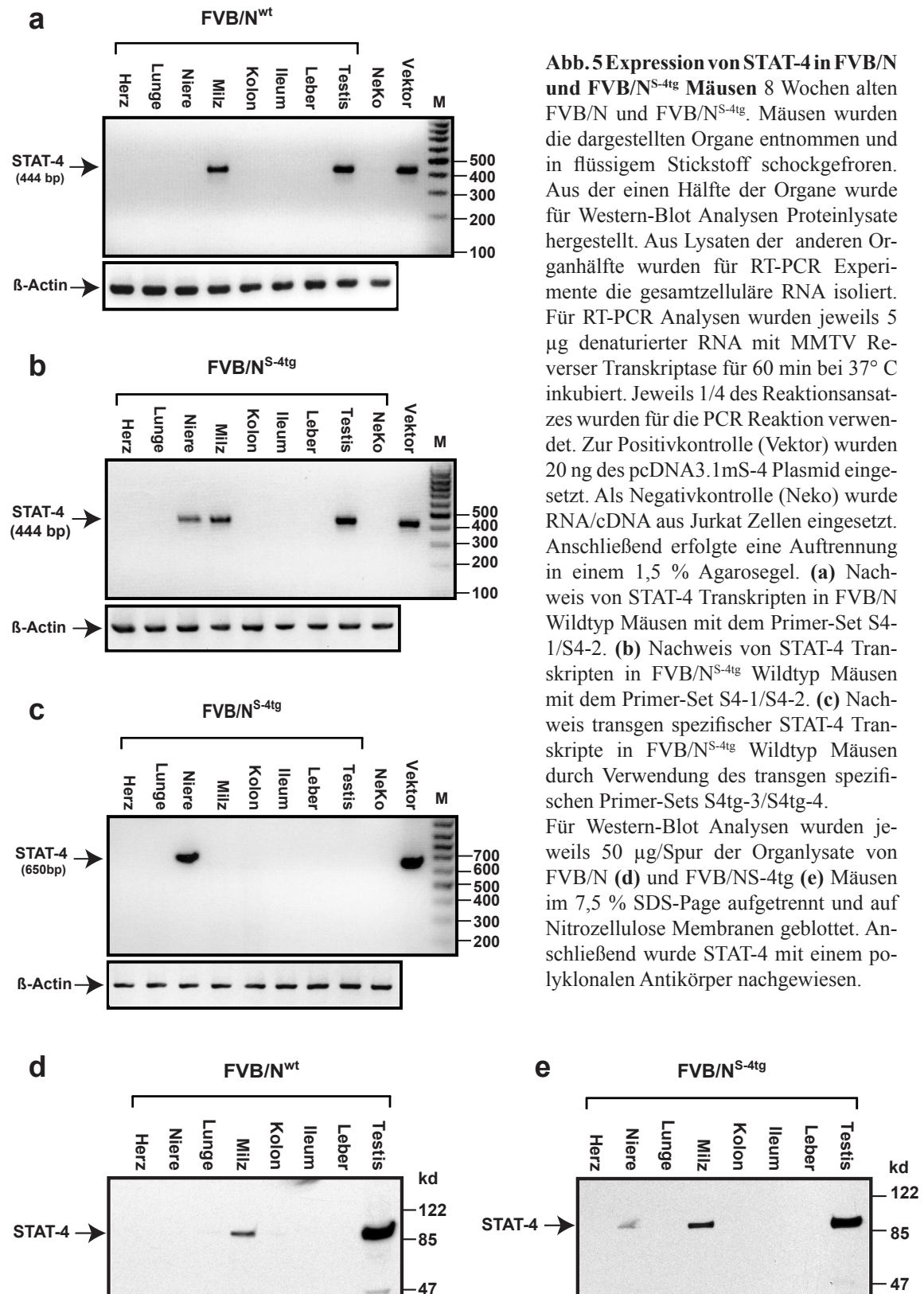
der Funktionalität des generierten Konstrukts wurden COS7 Zellen bzw. die humane Thymoma-Zelllinie Jurkat transient mittels Lipofektion mit dem STAT-4 Expressionskonstrukt transfiziert. Im STAT-4 spezifischem Western Blot mit Proteinlysaten konnte anschließend in den transfizierten Zellen rekombinantes STAT-4 Protein nachgewiesen werden (**Abb. 4b**).

### 3.1.1.2 Herstellung und Identifizierung transgener ‚founder‘ Mäuse

Die Generierung STAT-4 transgener Mäuse erfolgte in Labor von Professur Blessing (I. Medizinische Klinik) durch Mikroinjektion der linearisierten Expressionskassette in die männlichen Vorkerne befruchteter FVB/N Eizellen, die aus superovulierten Weibchen gewonnen wurden. Zuvor wurden die Vektorsequenzen durch Restriktionsverdau mit NruI/PvuII entfernt (**Abb. 4a**). Intakte Zygoten wurden in die Eileiter scheinchwangerer C57BL/6 Ammenmäuse eingebracht (Gordon et al., 1985; Schenkel et al., 1995). Die 15 erhaltenen Nachkommen (‚founder‘) wurden mittels transgen-spezifischer PCR mit genomischer DNA aus der Schwanzspitze hinsichtlich der genomischen Integration des mikroinjizierten Konstrukts analysiert. Eine stabile Integration des STAT-4 Konstrukts konnte so in 2 Foundertieren nachgewiesen werden (**Abb. 4c**). Der Anteil an transgenen Nachkommen (FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse) lag somit bei 13 % und lag im Rahmen der Erwartungen. Die generierten transgenen Mäuse waren normal lebensfähig, fertil und es ergaben sich keine offensichtlichen Hinweise auf gravierende pränatale Seiteneffekte, die beispielsweise durch eine Expression des STAT-4 Transgens in der Embryogenese entstehen könnten. Eine phänotypische Beobachtung der adulten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Tiere über mehrere Generationen hinweg zeigte, daß sie bezüglich Größe, Entwicklung und Verhalten nicht von den Wildtyp Mäusen unterscheidbar waren. In vergleichender histologischer Analyse Haematoxylin/Eosin gefärbter Querschnittpräparate der wichtigsten Organsysteme konnten in den transgenen Mäusen keine pathologischen Auffälligkeiten ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Die in der vorliegenden Arbeit nachfolgend dargestellten Experimente wurden mit Nachkommen der ‚founder‘ Maus 15 durchgeführt, da Southern-Blot Versuche zu der Annahme führten, daß im Vergleich zum ‚founder‘ Tier 6 eine erhöhte Anzahl transgener Kopien vorhanden war. Da integrationsbedingte Seiteneffekte unter ungünstigen Bedingungen erheblichen Einfluß auf phänotypische Besonderheiten transgener Mäuse haben können, wurde zur Kontrolle jeweils auch Experimente mit ‚founder‘ 6 Nachkommen durchgeführt. Dabei wurde stets die gleiche Tendenz beobachtet.

### 3.1.1.3 Gewebedistribution der Expression von STAT-4 mRNA und Protein

Um die Expression von STAT-4 in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen im Vergleich mit Wildtypmäu-



**Abb. 5 Expression von STAT-4 in FVB/N und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen** 8 Wochen alten FVB/N und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen wurden die dargestellten Organe entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus der einen Hälfte der Organe wurde für Western-Blot Analysen Proteinlysate hergestellt. Aus Lysaten der anderen Organhälfte wurden für RT-PCR Experimente die gesamtzelluläre RNA isoliert. Für RT-PCR Analysen wurden jeweils 5 µg denaturierter RNA mit MMTV Reverser Transkriptase für 60 min bei 37° C inkubiert. Jeweils 1/4 des Reaktionsansatzes wurden für die PCR Reaktion verwendet. Zur Positivkontrolle (Vektor) wurden 20 ng des pcDNA3.1mS-4 Plasmid eingesetzt. Als Negativkontrolle (Neko) wurde RNA/cDNA aus Jurkat Zellen eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung in einem 1,5 % Agarosegel. **(a)** Nachweis von STAT-4 Transkripten in FVB/N Wildtyp Mäusen mit dem Primer-Set S4-1/S4-2. **(b)** Nachweis von STAT-4 Transkripten in FVB/N<sup>S-4tg</sup> Wildtyp Mäusen mit dem Primer-Set S4-1/S4-2. **(c)** Nachweis transgen spezifischer STAT-4 Transkripte in FVB/N<sup>S-4tg</sup> Wildtyp Mäusen durch Verwendung des transgen spezifischen Primer-Sets S4tg-3/S4tg-4. Für Western-Blot Analysen wurden jeweils 50 µg/Spur der Organlysate von FVB/N **(d)** und FVB/NS-4tg **(e)** Mäusen im 7,5 % SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membranen geblottet. Anschließend wurde STAT-4 mit einem polyclonalen Antikörper nachgewiesen.

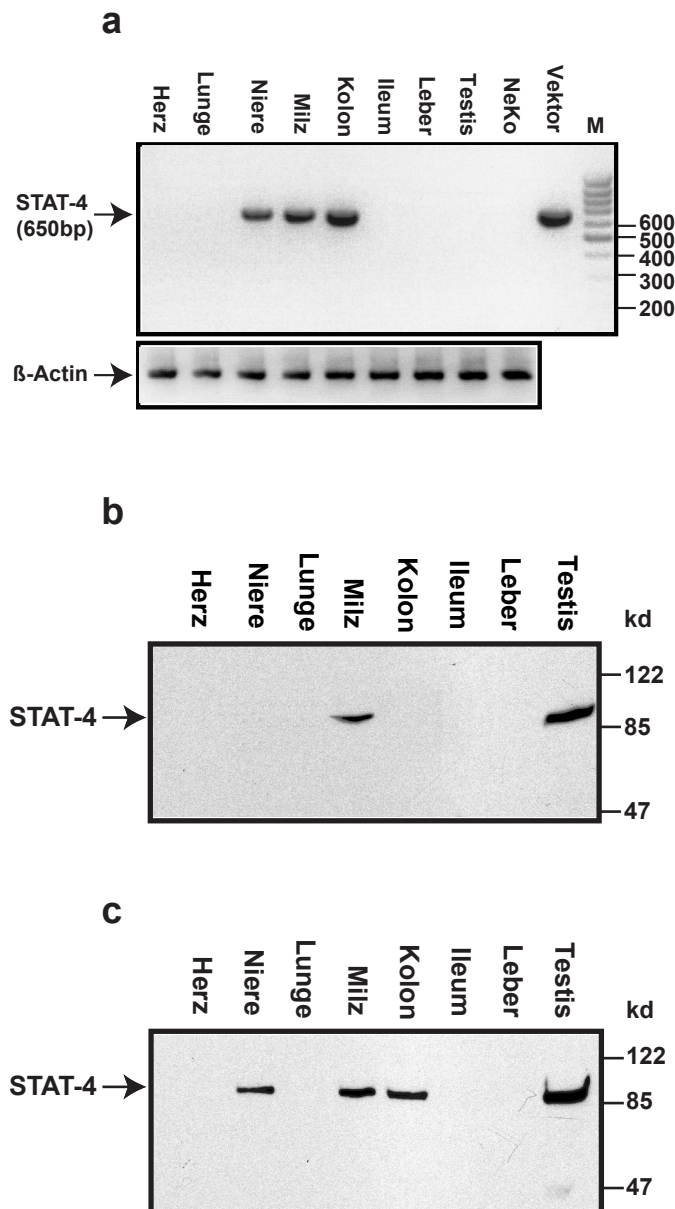
sen zu analysieren, wurden verschiedene Organe entnommen und daraus gesamtzelluläre RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine vergleichende Analyse mittels STAT-4 spezifischer RT-PCR. FVB/N Wildtypmäuse exprimierten nachweisbare Mengen an STAT-4 mRNA in der Milz und insbesondere in der Testes (**Abb. 5a**). Zur Untersuchung, in welchen Geweben STAT-4 Protein in FVB/N Mäusen vorhanden war, wurde STAT-4 in Organlysaten im Western-Blot mit einem spezifischen Antiserum immunologisch nachgewiesen. Auch auf Proteinebene zeigte sich, daß STAT-4 im Vergleich der untersuchten Gewebe in Wildtypmäusen ausschließlich in Milz und Testes exprimiert wurde, während in Herz, Lunge, Niere, Leber, Kolon und Ileum mit der eingesetzten Methodik keine endogene Expression von STAT-4 Protein detektiert werden konnte (**Abb. 5d**). Die Untersuchung der Organlysate, die aus Organen von FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen gewonnen wurden, ergab ein ähnliches Bild : Neben einer Expression in Milz und Testes konnte hier allerdings auch ein Signal in der Niere beobachtet werden (**Abb. 5b und 5e**). Die Verwendung eines 3' PCR Primers, der im BGH Polyadenylierungssignal hybridisierte und somit in der RT-PCR zusammen mit einem 5' Primer aus der kodierenden Sequenz ausschließlich transgene STAT-4 Transkripte amplifizierte, bestätigte, dass der CMV Promotor in FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen nur in der Niere nachweisbar aktiv war (**Abb. 5c**) und daß in diesen Mäusen die Expression des endogenen STAT-4 Proteins nicht nachweisbar (z.B. durch autoregulatorische Prozesse) beeinflusst wurde. Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse dieser Experimente die anfängliche Erwartung, daß der verwendete humane CMV Promotor *in vivo* in den meisten Geweben transkriptionell inaktiv sei.

#### 3.1.1.4 Induktive STAT-4 Expression über Immunisierung mit DNP-KLH/CFA

Der humane CMV Promotor besitzt 4 Konsensus Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel Familie und anderer induzierbarer Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (Sambucetti et al., 1989). Loser et al. (1998) haben gezeigt, daß ein transkriptionell inaktiver CMV Promoter in transgenen Mäusen durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in der Leber reaktiviert werden konnte.

Um zu untersuchen, ob über die Aktivierung von Zellen des Immunsystems eine Reaktivierung der Transkription der rekombinanten CMV STAT-4 Expressionskassette in Immunzellen induziert werden konnte, wurden die FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse und Wildtyp Kontrollen einmalig intraperitoneal mit DNP-KLH dispergiert in 50 % CFA behandelt. Interessanterweise zeigte sich nach dieser Behandlung eine signifikant größere Menge an STAT-4 Transkripten (**Abb. 6a**) in der Milz und im Dickdarm der FVB/N<sup>S-4tg</sup> Tiere, während die STAT-4 Protein Expression in den untersuchten Organen immunisierter FVB/N Kontrollmäuse (**Abb. 6b**) offenbar nicht beeinflusst wurde. Entsprechend den Ergebnissen der RT-PCR bestätigte sich auch im





**Abb. 6 STAT-4 Expression in immunisierten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen** 8 Wochen alte FVB/N Wildtyp oder FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse wurden intraperitoneal mit 100 µg DNP-KLH in 50% (v/v) CFA behandelt. 7 Tage später wurden Organe entnommen und gesamtzelluläre RNA isoliert bzw. Proteinlysate hergestellt. **(a)** 5 µg RNA aus FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen wurden revers transkribiert und einer PCR Analyse mit dem transgenspezifischen Primer-Set S-4tg1/S-4tg2 unterzogen. Als Kontrolle wurde mit den korrespondierenden revers transkribierten RNAs eine PCR für das Haushaltsgens β-Actin durchgeführt. Anschließend wurde in einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Neko: Jurkat RNA/cDNA als Negativkontrolle; Vektor: pcDNA3.1mS-4 als Positivkontrolle. Je 50 µg Organlysate aus immunisierten FVB/N Wildtyp **(b)** und FVB/N<sup>S-4tg</sup> **(c)** Mäusen wurden in einem 7,5 % SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Anschließend wurde murines STAT-4 mit einem polyklonalen Antikörper spezifisch nachgewiesen.

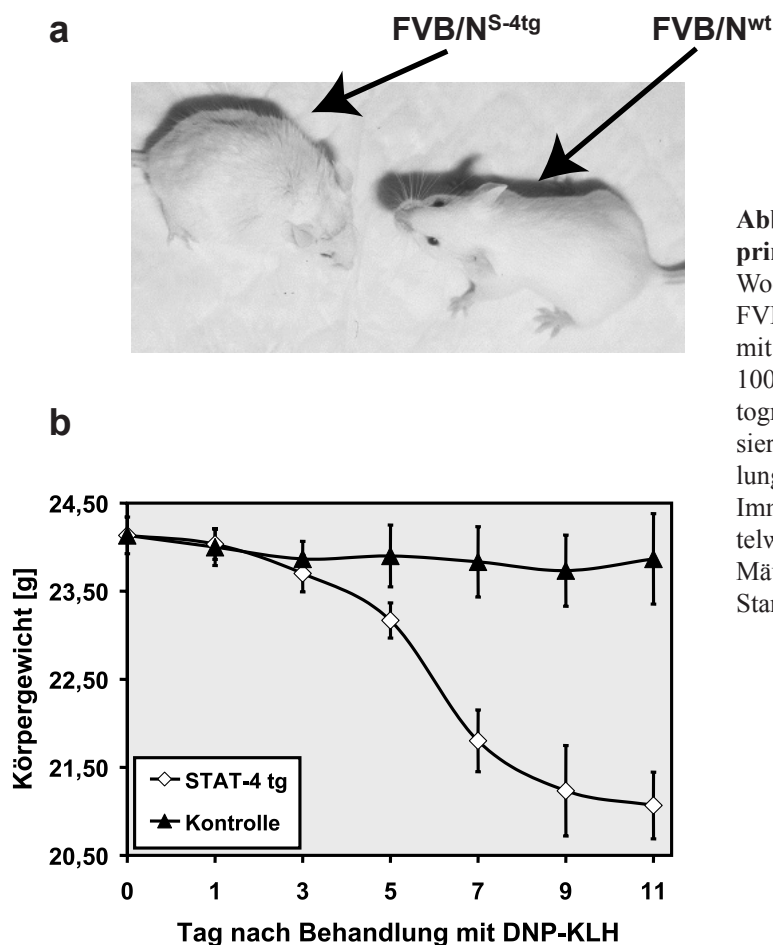
STAT-4 spezifischen Western-Blot die induktive Aktivierung der Expression von STAT-4 in Milz und Dickdarm DNP-KLH/CFA behandelter transgener Mäuse (**Abb. 6c**). Um zu überprüfen, ob die gesteigerte STAT-4 Expression zumindest zum Teil auf eine Aktivierung der Transkription/Translation des transgenen Konstrukts zurückzuführen war, wurde wiederum eine RT-PCR mit dem transgen spezifischen Primersset durchgeführt. Wie in **Abb. 6a** gezeigt, konnte in Milz und Kolon eine Transkription des STAT-4 Transgens nachgewiesen werden. Da keine Möglichkeit bestand ausschließlich endogenes STAT-4 nachzuweisen, konnte allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß auch ein erhöhter Level an endogener Produktion in diesen Mäusen zur erhöhten Gesamtmenge an STAT-4 beitrug.



### 3.1.2 Chronische Kolitis in DNP-KLH behandelten FVB/ $N^{S-4tg}$ Mäusen

#### 3.1.2.1 Phänotyp

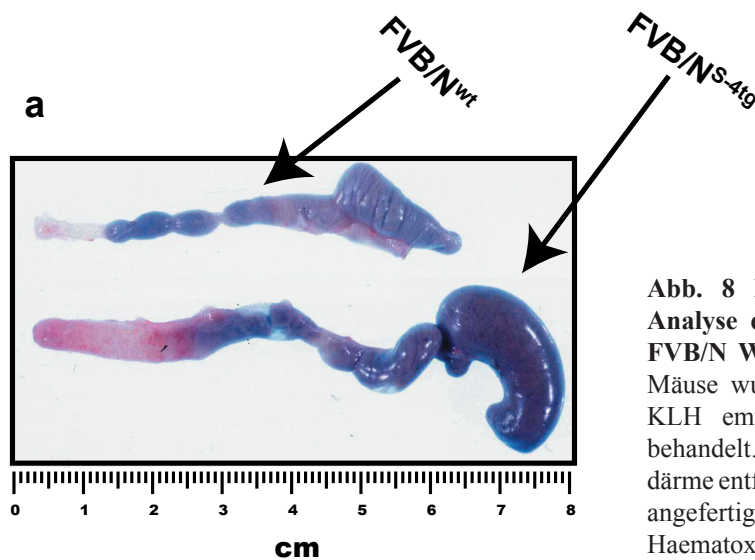
Während DNP-KLH immunisierte Kontrollmäuse äußerlich unauffällig waren, konnte in der Gruppe der DNP-KLH/CFA immunisierten FVB/ $N^{S-4tg}$  Tiere bereits nach einigen Tagen eine offensichtliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes beobachtet werden, die sich äußerlich in struppigem Fell, Durchfällen, Apathie und gravierenden Gewichtsverlusten bemerkbar machte (**Abb. 7a und 7b**). Eine moderate Gewichtsabnahme konnte bei der Mehrzahl der untersuchten transgenen Mäuse bereits 3-4 Tage nach Versuchsbeginn nachgewiesen werden. Nach 7-8 Tagen ergab sich als Durchschnitt aller untersuchten FVB/ $N^{S-4tg}$  Tiere im Mittel ein Gewichtsverlust von 23 %. Am Tag 11 waren 1/5 der behandelten Mäuse verstorben. Bei den überlebenden Mäusen konnte im weiteren zeitlichen Verlauf nach ca. 2 Wochen eine Gewichtszunahme festgestellt werden. Durchschnittlich 5 Wochen nach der Behandlung mit DNP-KLH/CFA erreichten die meisten der untersuchten transgenen Mäuse wieder das Ausgangsgewicht.



**Abb. 7 Phänotyp STAT-4 überexprimierender FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäuse.** 8 Wochen alte Wildtyp FVB/N und FVB/ $N^{S-4tg}$  wurden intraperitoneal mit 100  $\mu$ g DNP-KLH emulsiert in 100  $\mu$ l 50 % CFA behandelt. **(a)** Photographie 8 Tage nach der Immunisierung. **(b)** Zeitverlauf der Entwicklung des Körpergewichts nach der Immunisierung. Die Daten sind Mittelwerte des Gewichts von jeweils 3 Mäusen/Untersuchungszeitpunkt  $\pm$  Standardabweichung.

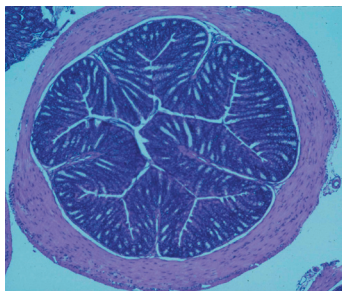
### 3.1.2.2 Histologische Analyse

Um die offensichtlichen phänotypischen Besonderheiten der DNP-KLH/CFA behandelten FVB/N<sup>S-4tg</sup> transgenen Mäuse genauer zu charakterisieren, wurden den Mäusen Organe entnommen, die makro- und mikroskopisch analysiert wurden. Zur histologischen Beurteilung wurden Paraffin- und Gefrierschnittpräparate angefertigt, die zur Differenzierung polymorpher und mononukleärer Zellen mit Haematoxylin und Eosin angefärbt wurden. Während für alle anderen Organe keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen ermittelt wurden,

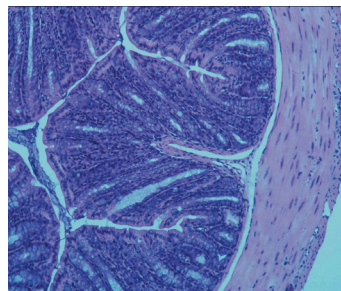


**Abb. 8 Makro- und mikroskopische Analyse des Dickdarms immunisierter FVB/N Wildtyp und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse.** Mäuse wurden intraperitoneal mit DNP-KLH emulsiert in 100  $\mu$ l 50% CFA behandelt. Nach 8 Tagen wurden Dickdärme entfernt (a) und Paraffinquerschnitte angefertigt. Die Präparate wurden mit Haematoxylin/Eosin gefärbt und im Mikroskop photographiert. (b) und (c) : FVB/N Wildtyp; (d), (e) und (f) : FVB/N<sup>S-4tg</sup>

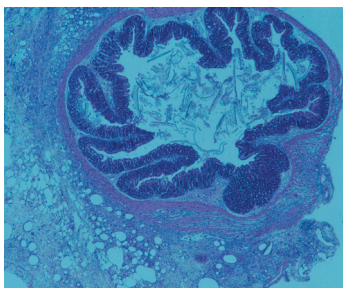
b



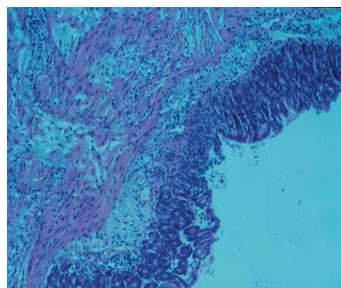
c



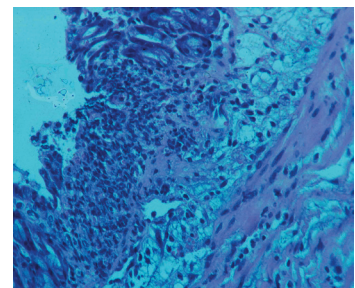
d



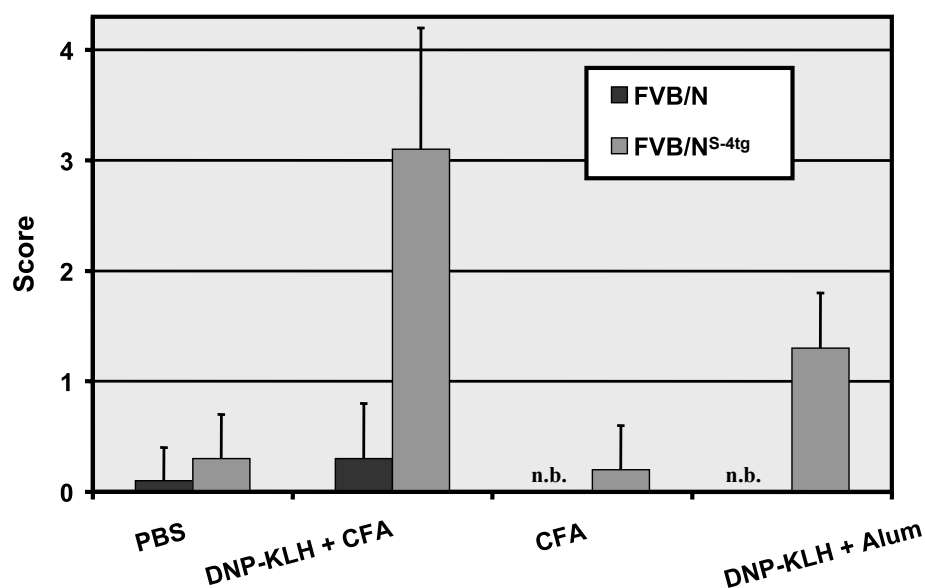
e



f



ergab die Analyse des Dickdarms DNP-KLH/CFA behandelter FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse gravierende pathologische Befunde. Makroskopisch gesehen war der Dickdarm vergrößert, stark verdickt und in Teilbereichen als Folge einer schweren transmuralen Entzündung stark gerötet (**Abb. 8a**). Der Darminhalt war weich und breiig. Die histopathologische Analyse ergab eine starke hyperplastische Verdickung der Kolonwand, Ödeme und starke Infiltrationen mit mononukleären Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten) in der Lamina Propria. In stark entzündeten Bereichen war die normale Kryptenarchitektur und Schleimhautstruktur weitgehend aufgehoben. Um über eine histopathologische Gesamtbeurteilung die Gegebenheiten im Darm der unterschiedlichen Versuchsgruppen semiquantitativ vergleichen zu können, wurden die Kolonquerschnitte mittels eines 4 Punkte ‚Score‘-Systems klassifiziert (Neurath et al., 1995). Die Ergebnisse sind in **Abb. 9** dargestellt. Um den Einfluß des zur Im-



**Abb. 9 Histologische Klassifikation der entzündlichen Veränderungen im Dickdarm** Wildtyp FVB/N und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse (je 3 Tiere/Gruppe) wurden intraperitoneal mit 100 µl PBS, 100 µg DNP-KLH in 100 µl 50% (v/v) CFA, 100 µl 50% (v/v) CFA oder 100 µg DNP-KLH in 100 µl Alum behandelt. 8 Tage später wurden der Dickdarm entnommen und Kryostatquerschnitte hergestellt. Der Grad der entzündlichen Veränderungen in den Querschnitten wurde mikroskopisch nach folgenden Kriterien semiquantitativ bestimmt: **0**: keine Anzeichen einer Entzündung; **1**: leichte entzündliche Veränderungen; **2**: geringfügige leukozytäre Infiltrationen; **3**: starke leukozytäre Infiltration, Verdickung der Kolonwand **4**: transmurale Entzündung, Verlust der Becherzellen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens 3 Querschnitten/Maus +/- Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt.

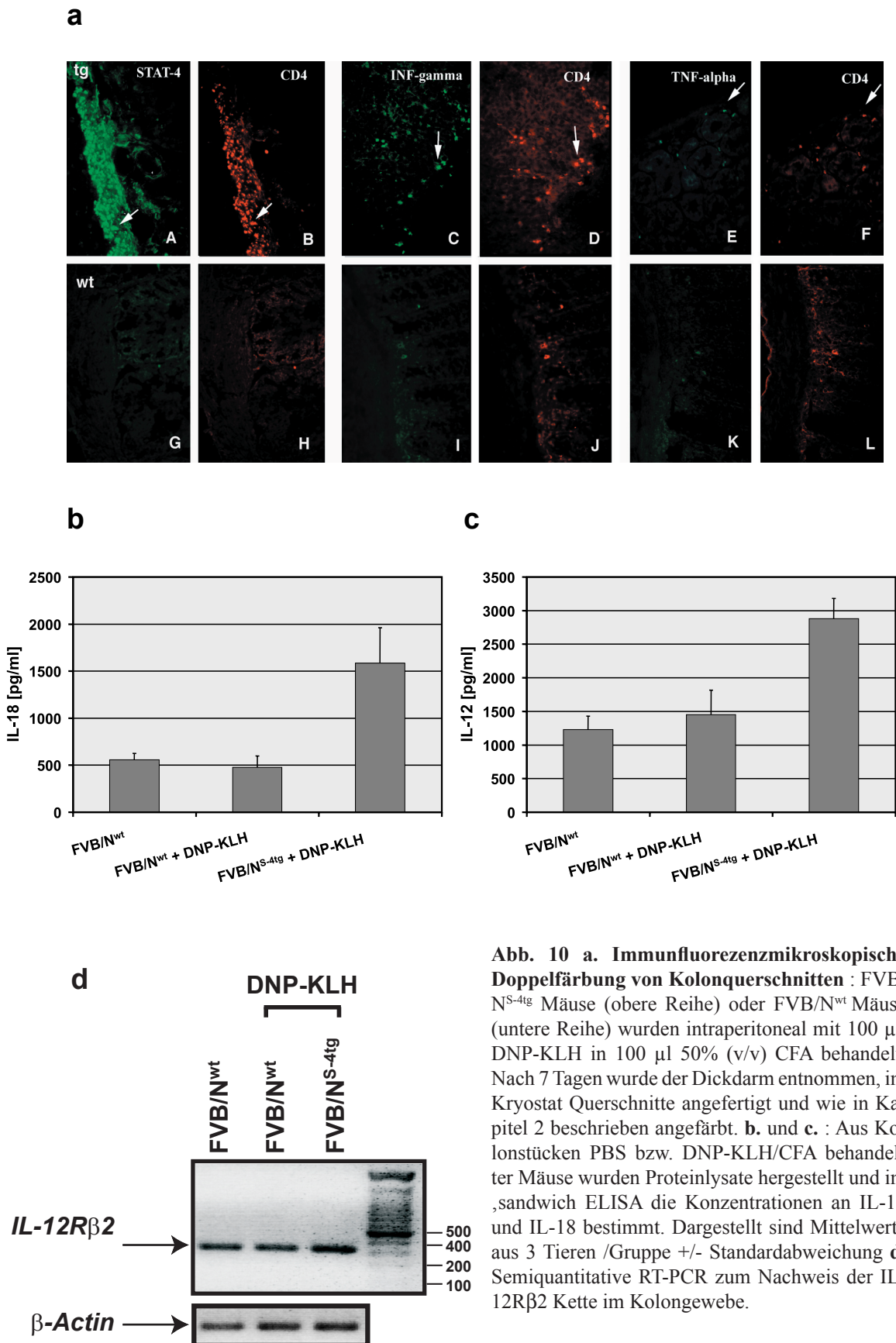
munstimulation verwendeten Adjuvans zu analysieren, wurden zudem FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse intraperitoneal mit CFA (ohne DNP-KLH) oder DNP-KLH absorbiert in ALUM (Aluminiumkaliumsulfat) behandelt. Für CFA ergaben sich im Kolon keine signifikanten, histologischen Anomalien. Die Behandlung mit DNP-KLH/Alum führte dagegen ebenfalls zu entzündlichen Veränderungen der Darmschleimhaut. Das Ausmaß der Entzündung in DNP-KLH behandelten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen wurde jedoch bei weitem nicht erreicht. Diese Beobachtung

ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Immunisierungen mit ALUM als Adjuvans eher die humorale Immunantwort aktivieren als solche mit CFA (Comoy et al., 1998).

### 3.1.2.3 Infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Lamina Propria exprimieren aktiviertes STAT-4 und produzieren proinflammatorische Zytokine

Wie bereits in 3.1.1.4 beschrieben, resultierte die Behandlung mit DNP-KLH/CFA in der Expression von STAT-4 Transkripten und Protein im Dickdarm transgener Mäuse. Da sich der Dickdarm aus heterogenen Zellverbänden zusammensetzt, war es von besonderem Interesse die Zelltypen/Gewebe zu identifizieren, die für die gesteigerten STAT-4 Signale verantwortlich waren. Zur weiteren Untersuchung der STAT-4 Expression in entzündeten Dickdarmbereichen wurden deshalb mit aufeinanderfolgenden Querschnittspräparaten immunfluoreszenzmikroskopische Doppelfärbungen durchgeführt. Die Doppelfärbung ermöglichte hier Aussagen über die Lokalisation der Expression von STAT-4 in der Dickdarmschleimhaut und lieferte gleichzeitig Informationen darüber, welche Zellen für diese Produktion verantwortlich waren. Wie in **Abb. 10** dargestellt, detektierte die spezifische Färbung mit Antikörpern gegen STAT-4 starke Signale in mononukleären Zellen der Lamina Propria von FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen, während in Präparaten von Kontrolltieren nur vereinzelt STAT-4 positive Zellen gefunden wurden. Die Färbung gegen das akzessorische Molekül CD4 als T-Helferzellmarker zeigte, daß es sich dabei vornehmlich um infiltrierende CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten handelte. Neben dem Zytoplasma waren auch die Nuklei im überwiegenden Teil dieser Zellen STAT-4 positiv. Da nur aktiviertes, phosphoryliertes STAT-4 als Dimer aus dem Zytoplasma in den Kern transloziert (Ihle et al., 1995; Darnell et al., 1997), kann daraus geschlossen werden, daß STAT-4 in den CD4<sup>+</sup> Zellen des entzündeten Darms in einer aktivierten Form vorlag. Die Aktivierung von Stat-4 durch IL-12 ist eine entscheidende Komponente multipler Signaltransduktionskaskaden, die zur Induktion der Synthese von IFN- $\gamma$  beitragen (Lawless et al., 2000). Stat-4 defiziente Mäuse produzieren kein IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit IL-12 (Kaplan et al., 1996; Thierfelder et al., 1996), und STAT-4 wurde mit der direkten und indirekten transkriptionellen Regulation des IFN- $\gamma$  Gens in Zusammenhang gebracht (Xu et al., 1996; Barbulescu et al., 1998). Daher wurde in Querschnittspräparaten des entzündeten Darms die Expression von IFN- $\gamma$  immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. In der vergleichenden Analyse der IFN- $\gamma$  Expression in DNP-KLH behandelten Wildtyp und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen ergaben sich starke IFN- $\gamma$  Signale im entzündeten Darm der transgenen Tiere. Wie die Doppelfärbung für IFN- $\gamma$  und CD4 demonstrierte, waren in erster Linie T-Lymphozyten für die gesteigerte IFN- $\gamma$  Produktion verantwortlich. Um über das Zytokinexpressionsmuster ein genaueres Bild der immunologischen Reaktionen im entzündeten Darm zu erlangen, wurde auch für die immunmodulatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-4 gefärbt.

Ebenso wie IFN- $\gamma$ , wurde auch das proinflammatorische und gewebedestruierende TNF- $\alpha$  im entzündeten Darm verstärkt exprimiert, wohingegen das T<sub>H</sub>2 Zytokin IL-4 nicht nach-





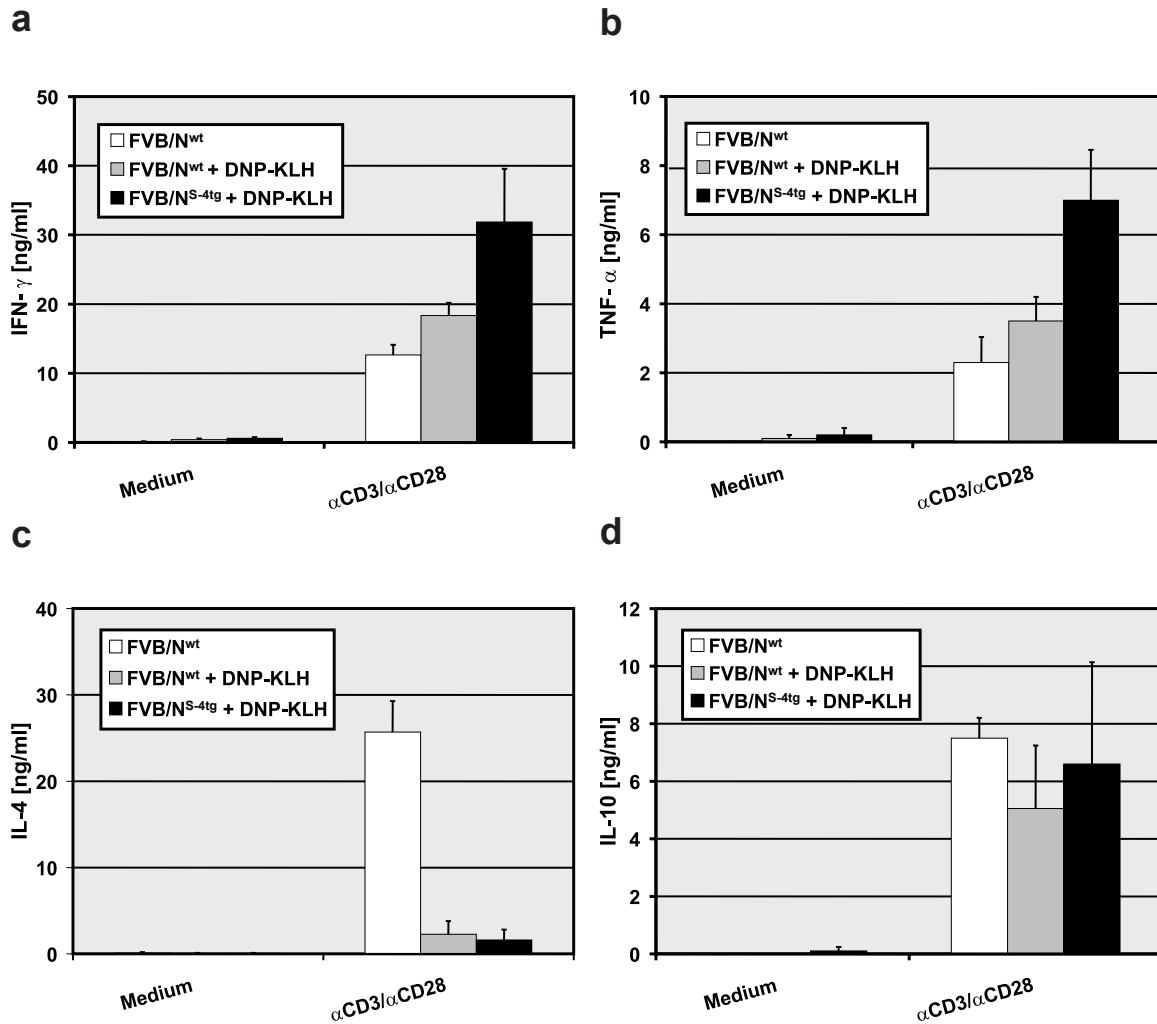
weisbar erhöht war. Außerdem wurden im ELISA mit Kolonlysaten die Menge der proinflammatorischen  $T_H1$  Zytokine IL-12 und IL-18 Gehalt bestimmt, die vor allem von aktivierten Makrophagen sezerniert werden (**Abb 10b und 10c**). Es zeigte sich dabei, daß diese Zytokine im Darm der FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäuse verstärkt exprimiert wurden. Der semiquantitative Nachweis der mRNA der  $\beta 2$  Kette des IL-12 Rezeptors zeigte dagegen, daß diese im entzündeten Darm nur wenig stärker transkribiert wurde (**Abb. 10 d**).

Zusammenfassend zeigte sich, daß  $CD4^+$  T-Lymphozyten der Lamina Propria in den FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäusen mit Kolitis große Mengen an aktiviertem STAT-4 exprimierten. Die Aktivierung von STAT-4 in diesen Zellen ging einher mit der starken Produktion der proinflammatorischen  $T_H1$  Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Die erhöhte Expression von IL-12 und IL-18 impliziert die Anwesenheit aktivierter Makrophagen im entzündeten Darm.

### 3.1.3 Charakterisierung der Immunantwort in FVB/ $N^{S-4tg}$ Mäusen mit Kolitis

Die histologische Analyse der Querschnittpräparate immunisierter FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäuse ergab Hinweise auf eine autoimmune Immunantwort im entzündeten Darm, die durch die Aktivierung von  $T_H1$  Subpopulationen von IFN- $\gamma$  produzierenden T-Lymphozyten charakterisiert war.

Um den Zytokinstatus von T-Helferzellen der Milz zu untersuchen, wurden primäre  $CD4^+$  T-Lymphozyten mittels immunmagnetischer Separationstechniken aus der Milz unbehandelter und DNP-KLH/CFA behandelter Mäuse isoliert. Im Anschluß wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen die CD3 $\epsilon$  Komponente des T-Zellrezeptors und das kostimulatorische Molekül CD28 für 48 Stunden stimuliert. In den Zellkulturüberständen wurden durch spezifische ‚sandwich‘ ELISA Untersuchungen die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-10 quantifiziert. Die Auswertung der Daten zeigte, daß in Überständen der stimulierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten aus DNP-KLH behandelten FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten und DNP-KLH Kontrollen die Level der  $T_H1$  Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  erhöht waren (**Abb. 11 a und b**). Während sich für das immunsuppressive Zytokin IL-10 keine signifikanten Unterschiede innerhalb der 3 Versuchsgruppen ergaben, zeigte sich, daß die Immunisierung mit DNP-KLH/CFA sowohl in Kontrollmäusen, als auch in FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäusen zu einem starken Rückgang der Expression von IL-4 führte (**Abb. 11 c und d**). Da auch in der Gruppe der immunisierten FVB/N Wildtyp Mäuse auch die Werte für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  leicht erhöht waren, deuteten diese Ergebnisse darauf hin, daß die Immunisierung der Mäuse mit DNP-KLH/CFA zu einen Anstieg der  $T_H1$  Immunantwort (zellvermittelte Immunität) gegenüber der  $T_H2$  Antwort (humorale Immunität) führte.



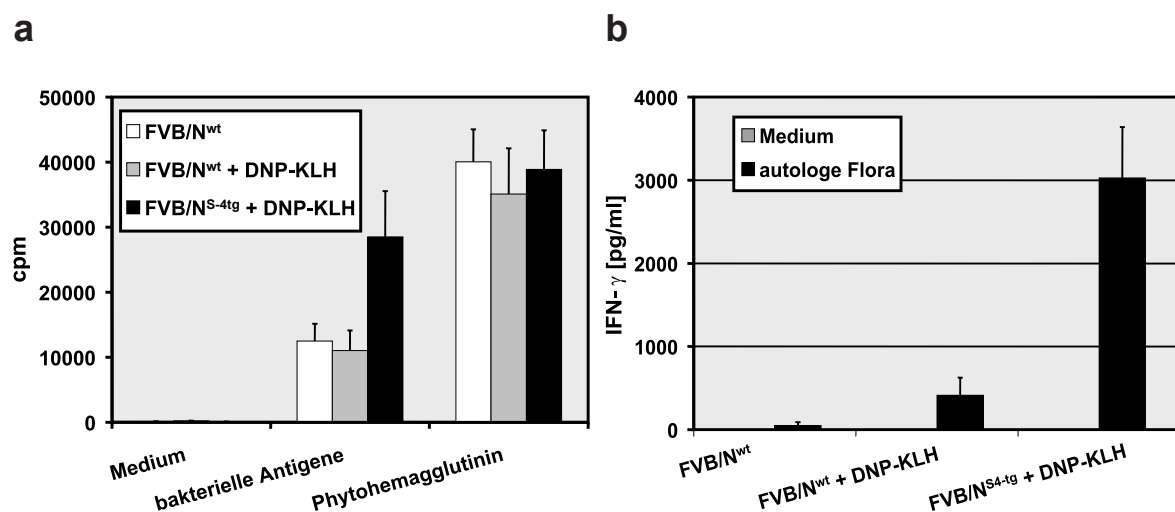
**Abb. 11 Zytokinexpressionsprofil stimulierter primärer T-Lymphozyten aus der Milz** Wildtyp FVB/N und FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse (je 3 Tiere/Gruppe) wurden intraperitoneal mit 100  $\mu$ l PBS oder 100  $\mu$ g DNP-KLH emulsiert in 100  $\mu$ l 50% (v/v) CFA behandelt. 8 Tage später wurde die Milz entnommen und daraus mittels immunmagnetischer Separation CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten angereichert. Jeweils  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in RPMI1640 Kulturmedium wurden in 6 Loch Platten mit je 10  $\mu$ g/ml immobilisierten  $\alpha$ CD3 und  $\alpha$ CD28 monoklonalen Antikörpern stimuliert oder unstimuliert kultiviert. 48 h später wurden Überstände geerntet. In spezifischen Sandwich ELISA-Experimenten wurde darin die Konzentration von (a) IFN- $\gamma$ , (b) TNF- $\alpha$ , (c) IL-4 und (d) IL-10 als Doppelwerte bestimmt.

### 3.1.4 CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen mit Kolitis sind reaktiv gegenüber bakteriellen Antigenen der autologen intestinalen Flora

Zahlreiche experimentelle und klinische Befunde führten zu der Erkenntnis, daß immunologische Reaktionen gegen die luminal, bakterielle Flora an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wesentlich beteiligt sind (Sartor et al., 1997; Wirtz et al., 2000). Duchmann et al. (1995 und 1996) konnten zeigen, daß intestinale CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch Bakterien der normalen Mikroflora des Darms antigenspezifisch aktiviert wurden und in entzündeter Darmschleimhaut bei CED und im experimentellen Mausmodell einer



haptenininduzierten Kolitis signifikant erhöht waren. Um zu untersuchen, ob im entzündeten Dickdarm DNP-KLH/CFA behandelter FVB/N<sup>S-4tg</sup> die Toleranzmechanismen gegenüber autologen bakteriellen Antigenen beeinflusst waren, wurden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz isoliert und mit autologen, luminalen Antigenen des Darms inkubiert. Da T-Helferzellen nur Antigene erkennen können, die als Peptidfragmente durch MHCII Moleküle auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen (APC) präsentiert werden, wurden zunächst APC mit den bakteriellen Antigenen beladen. Dazu wurde zunächst der Darminhalt der Mäuse auf Blutagarplatten ausgestrichen und für 12 h bei 37° C inkubiert. Die Kolonien wurden geerntet und durch Sonifizierung und  $\gamma$ -Bestrahlung sterilisiert. 100  $\mu$ g der Bakteriensuspensionen wurden mit  $2 \times 10^7$  Makrophagen, die über Adhärenz aus primären Zellen aus der Milz von FVB/N Mäusen isoliert wurden, für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die gepulsten APC zur Inaktivierung mit 3000 rad bestrahlt. Zur Durchführung von Proliferationstests wurden je  $5 \times 10^4$  gepulste APC mit  $5 \times 10^4$  autologen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für 5 Tage koinkubiert. Als Positivkontrolle wurden je  $5 \times 10^4$  T-Lymphozyten polykonal mit Phytohemagglutinin stimuliert. Für die letzten 18 h wurden zur radioaktiven Markierung der neusynthetisierten DNA proliferierender Zellen 0,25  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H] Tymidin/Ansatz hinzugefügt. In **Abb. 12a** ist das Resultat dieses Proliferationstests graphisch dargestellt. Die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der immunisierten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse proliferierten wesentlich stärker nach Stimulation mit autologen Antigenen der intestinalen Mikroflora als Zellen immunisierter oder unbehandelter FVB/N Kontrolltiere. In einem weiteren Experiment wurden jeweils  $5 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Versuchsgruppen mit  $5 \times 10^5$  ‚autolog‘ gepulster APC für 48 h koinkubiert und in den Zellkulturüberständen im ELISA die IFN- $\gamma$  Konzentrationen bestimmt. Die Zellen aus den immunisierten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Tieren produzierten 7 mal mehr IFN- $\gamma$  als die immunisierten Kontrollmäuse, während unbehandelte Kontrollen praktisch



**Abb. 12** Reaktivität von T-Lymphozyten aus FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen gegen Antigene der autologen intestinalen Flora **a**. Proliferationstest **b**. IFN- $\gamma$  spezifischer ‚sandwich‘ ELISA (Versuchsdurchführung im Text beschrieben)

kein IFN- $\gamma$  sezernierten (**Abb. 12 b**).

Zusammengefasst konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, daß Bestandteile von Antigenen der autologen bakteriellen Flora des entzündeten Dickdarms DNP-KLH/CFA behandelte STAT-4 transgener Mäuse CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Milz *in vitro* stärker aktivierten als die autologe Flora der Kontrollmäuse. Dies implizierte, daß die chronische Entzündungsreaktion im Dickdarm STAT-4 überexprimierender transgener FVB/N Mäuse vermutlich das Resultat einer aggressiven zellulären Immunantwort gegen normale Bestandteile der intestinalen Flora war. Eine Störung der immunologischen Mechanismen, die zur Toleranz gegenüber Antigenen der Darmflora führen, durch die unphysiologisch regulierte Aktivierung der IL-12/STAT-4 Signaltransduktionskaskade scheint somit für die Entwicklung der Kolitis in diesen Mäusen von besonderer Bedeutung zu sein.

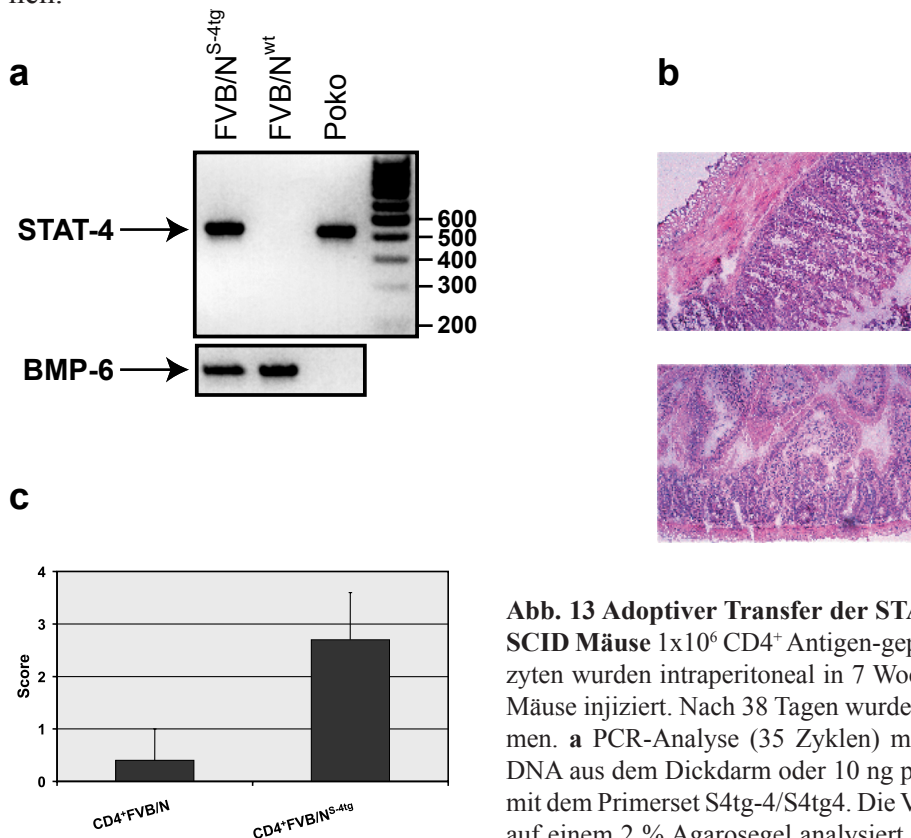
### 3.1.5 Adoptiver Transfer der Kolitis in SCID Mäuse durch CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Untersuchungen mit Patientenmaterial und die Analyse experimenteller Tiermodelle für CED haben die Vermutung nahegelegt, daß immunmodulatorische Funktionen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, wie z.B. die Produktion proinflammatorischer Zytokine, ein wesentliches Element der Entstehung und Chronifizierung intestinaler Entzündungsreaktionen sind (Simpson et al., 1998). Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchung der FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse bestätigten diese Befunde. Um die Rolle der T-Helferzellen für die Pathogenese der Kolitis in den STAT-4 transgenen Mäusen weitergehend zu untersuchen, wurde ein adoptives Transfermodell von Antigen aktivierten T-Lymphozyten in C.B-17 SCID („severe combined immune deficiency“) Mäuse etabliert. C.B-17 SCID Mäuse besitzen infolge eines autosomal rezessiven Defekts im Rearrangement antigen-spezifischer Rezeptoren auf Lymphozyten keine T- und B-Lymphozyten. Sie akzeptieren Allo- und Xenogene Transplantate und sind daher für Zelltransferstudien besonders gut geeignet. Wenn SCID Mäuse mit der CD45RB<sup>High</sup> Subpopulation CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten transferiert werden, entwickeln die Tiere nach 6-10 Wochen eine T<sub>H</sub>1 dominierte chronische Kolitis. Werden dagegen die CD45RB<sup>Low</sup> Subpopulation oder unfraktionierte Gesamt CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten übertragen, bleiben die Tiere gesund (Powrie et al., 1993 und 1994) bzw. entwickeln Anzeichen intestinaler Entzündung erst einige Monate später (Claesson et al., 1999).

Vor dem adoptiven Transfer wurden die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus der Milz DNP-KLH/CFA behandelte FVB/N<sup>S-4tg</sup> und FVB/N Wildtypmäuse für 4 Tage mit inaktivierten APC koinkubiert, die mit autologen, bakteriellen Antigenen gepulst wurden (siehe 3.1.4). Anschließend wurden jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen/Maus intraperitoneal in 7 Wochen alte C.B-17 SCID transferiert. Nach 5-6 Wochen, als in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> transferierten Mäusen erste Zeichen der Verschlechterung des Allgemeinzustandes zu beobachten waren, wurde der Dick-

darm entnommen, genomische DNA isoliert und zum Nachweis des STAT-4 Transgens eine PCR Analyse mit einem transgen spezifischen Primerset durchgeführt (**Abb. 13a**). So konnten transgene T-Lymphozyten aus FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen im Darm der adoptiv transferierten Mäuse nachgewiesen werden.

Zur histologischen Analyse wurden Querschnittpräparate hergestellt, die zur Unterscheidung polymorpher und mononukleärer Zellen mit Haematoxylin/Eosin gefärbt wurden. Während in FVB/N Wildtyp transferierten SCID Mäusen keine pathologischen Veränderungen des Kolons beobachtet werden konnten, ergaben sich in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> transferierten Mäusen ähnliche Entzündungserscheinungen, wie in immunisierten STAT-4 transgenen Tieren (**Abb. 13b und c**). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß aktivierte T-Lymphozyten STAT-4 transgener Mäuse nach Übertragung in immundefekte C.B-17 SCID-Mäuse eine chronische Kolitis auslösen konnten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe waren daher ein weiterer bedeutender Nachweis der besonderen pathogenetischen Rolle CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für die STAT-4 Kolitis im Speziellen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Allgemeinen.



**Abb. 13 Adoptiver Transfer der STAT-4 Kolitis in C.B-17 SCID Mäuse**  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> Antigen-gepulste CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden intraperitoneal in 7 Wochen alte C.B-17 SCID Mäuse injiziert. Nach 38 Tagen wurde der Dickdarm entnommen. **a** PCR-Analyse (35 Zyklen) mit 200 ng genomischer DNA aus dem Dickdarm oder 10 ng pCDNA3.1mS-4 (Poko) mit dem Primerset S4tg-4/S4tg4. Die Versuchsansätze wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert. **b** Haematoxylin/Eosin Färbung von Kryostatquerschnitten (oben : FVB/N<sup>wt</sup>; unten : FVB/N<sup>S-4tg</sup>) **c**. histologischer Score (siehe Abb. 9)

## 3.2 Adenoviraler Gentransfer in den Dickdarm

### 3.2.1 Herstellung und Produktion rekombinanter Adenoviren

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen beruhen wahrscheinlich auch auf einer übermäßigen oder fehlgesteuerten Umsetzung der genetischen Information (Genexpression) bestimmter Gene. Die Möglichkeit, normale oder gezielt genetisch modifizierte Proteine *in vivo* im Darm des intakten Gesamtorganismus zu exprimieren, könnte daher neuartige Möglichkeiten für experimentelle Untersuchungen im Tiermodell und die Therapie bei CED eröffnen. Da die Verwendung replikationsdefekter adenoviraler Partikel des Serotyps 5 (Ad5) als gentherapeutische Transfervehikel eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen viralen und nichtviralen experimentellen Ansätzen aufweist (siehe Einleitung), wurden zur Evaluierung der Möglichkeiten und Grenzen ihres Einsatzes für biologische Studien und die somatische Gentherapie im Gastrointestinaltrakt rekombinante Ad5 generiert, die anhand eines leicht nachweisbaren (,Reporter') Proteins die Identifizierung und Quantifizierung transduzierter Zellen und Gewebe ermöglichen sollten. Die folgenden Reportergene wurden hierfür ausgewählt :

- LacZ Gen aus *E. coli* : das Genprodukt  $\beta$ -Galaktosidase besitzt eine enzymatische Aktivität, die mittels chemolumineszenten Substraten auf 1,2 Dioxetane Basis hochsensitiv (bis zu 20 fg) in Zellysaten detektiert werden kann. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eines histochemischen Nachweises durch Färbung mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal).
- EGFP (,enhanced green fluorescent protein') : eine kodonoptimierte Variante des autofluoreszenten GFP Proteins der Qualle *Aequorea victoria*, das fluoreszenzmikroskopisch direkt - ohne weiteres experimentelles Vorgehen in Form eines Antikörper-Nachweises oder einer Substratumsetzung - nachgewiesen werden kann (Chalfie et al., 1994). Da anders als bei den Nachweismethoden für  $\beta$ -Galaktosidase das Absterben der untersuchten Zellen nicht obligatorisch ist, werden Zeitverlaufsexperimente ermöglicht. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer automatisierten Quantifizierung GFP positiver Zellen durch FACS Analyse.

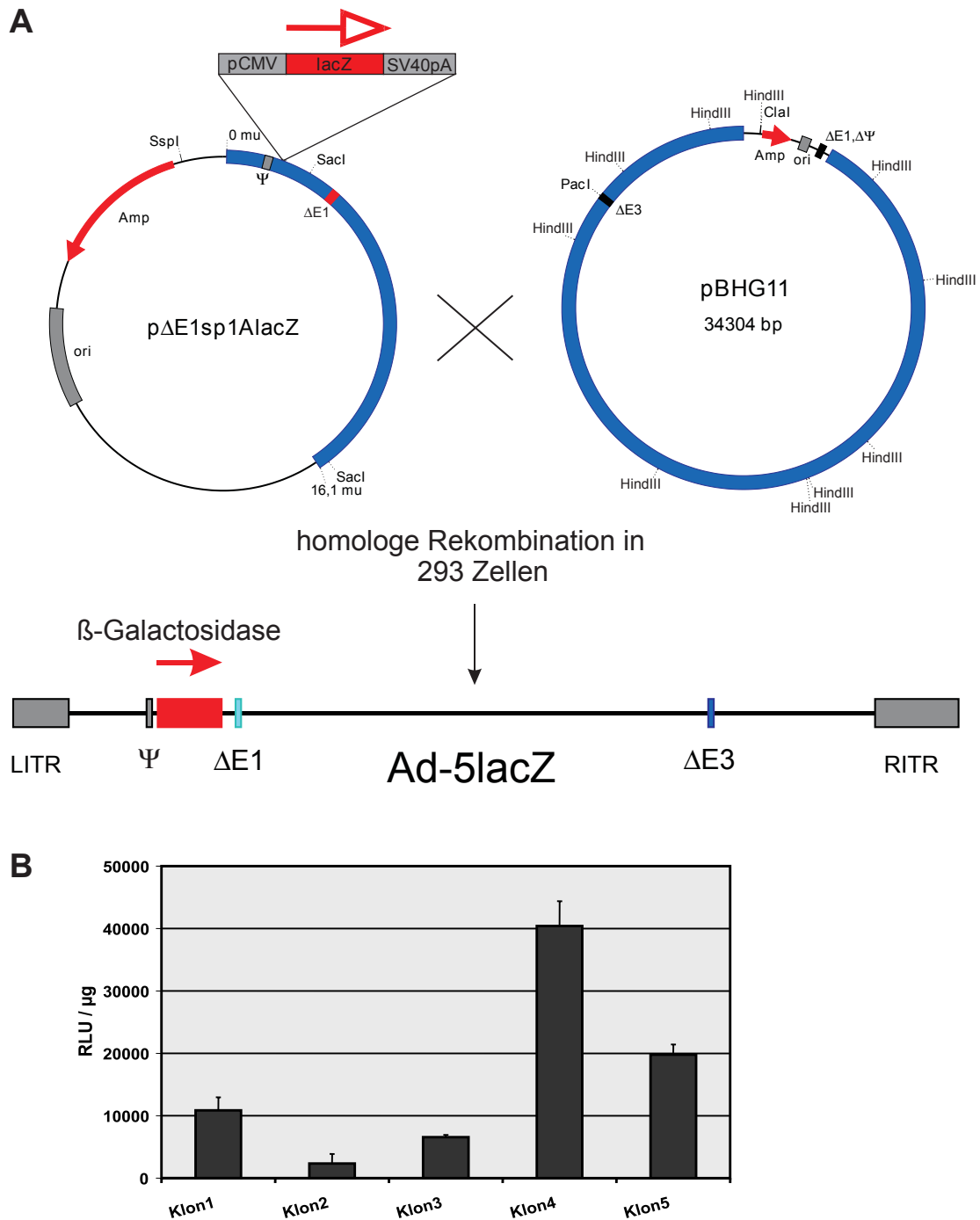
Während dem Wirkmechanismus der meisten Arzneimittel/Wirksamstoffe die Hemmung der Funktion von Proteinen zugrunde liegt, ermöglicht die Überexpression von Gegensinn (,antisense') RNA bereits die spezifische Hemmung der Translation/Bildung der entsprechenden Genprodukte. Um zu untersuchen, ob die Möglichkeit einer gezielten Modulation von Proteinen in Zellen des Darms durch rekombinante Ad5, die ,antisense' RNA exprimieren, besteht, wurde ein adenoviraler Vektor generiert, der Sequenzinformationen zur

Expression der ‚antisense‘ RNA des Zytokins Interleukin-18 (IL-18) unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors beinhaltete. Diese Expressionkassette wurde in das Genom der rekombinanten Ad5, die EGFP exprimieren, zusätzlich integriert. IL-18 supprimiert als antiangiogenetischer Faktor das Wachstum von Tumoren (Cao et al., 1999; Pages et al., 2000) und ist ein wichtiger Regulator der Funktionen intestinaler Lymphozyten (Kanai et al., 2000). Als potenter Aktivator der Synthese des  $T_H1$  Zytokins IFN- $\gamma$  ist es außerdem ein wichtiger Mediator proinflammatorischer Prozesse und wird, da es in der Kolonmukosa von Patienten mit Morbus Crohn in entzündeten Arealen verstärkt exprimiert wird, als wichtiger pathogenetischer Faktor bei CED diskutiert (Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999).

### 3.2.1.1 Herstellung von Ad5lacZ über homologe Rekombination in 293 Zellen

Zur Herstellung des replikationsdefekten  $\beta$ -Galaktosidase Reportervektors (Ad-5lacZ) wurde eine Vorgehensweise gewählt, die auf das in der Arbeitsgruppe von Frank Graham in Toronto entwickelte System der homologen Rekombination in der embryonalen Nierenzelllinie 293 basiert (Mc Grory et al., 1988; Bett et al., 1994). Dabei wird die zu exprimierende Zielsequenz in einen Hilfs- („Shuttle“-) Vektor zwischen Ad5 homologe Sequenzen aus der E1 Region kloniert. Dieses Konstrukt wird zusammen mit einem Plasmid, welches das vollständige Ad5 Genom enthält (mit Deletionen in E1 und E3), in adhärenzte 293 Zellen kotransfiziert. 293 Zellen haben die linken 11 % der Ad5 DNA stabil ins Genom integriert und stellen somit das für die Ad5 Replikation substanzielle E1-Protein *in trans* zur Verfügung (Graham et al., 1977). Die Überschichtung der transfizierten Zellen mit Agarose gewährleistet, daß freigegebene virale Partikel Ad5 produzierender Zellen nur unmittelbar benachbarte Zellen infizieren können. Aus diesem Grund kann, infolge der lytischen Aktivität gebildeter Adenoviren, eine erfolgte homologe Rekombination nach ca. 10-21 tägiger Kultivierungsdauer mikroskopisch als Aussparung („plaque“) im Zellrasen identifiziert und Klone einzeln als Agaroseblocks separiert werden.

Der Shuttle Vektor p $\Delta$ E1sp1ACMVlacZ wurde konstruiert, indem die Sequenz für das vollständige bakterielle lacZ Gen - inklusive eines eukaryontischen Translations-Initiations Signals unter Kontrolle des starken humanen ‚immediate early‘ CMV Promotors - durch PstI Restriktionsverdau aus dem Plasmid pCMV- $\beta$  (Clontech, Heidelberg) heraus geschnitten wurde. Um eine effektive Transkription und Translation in Säugerzellen zu gewährleisten, enthielt diese  $\beta$ -Galaktosidase Expressionskassette zusätzlich die Polyadenylierungssequenz und ein Intron (Spleiß Donor/Akzeptor) des Simian Virus 40 (SV40). Nach Glättung der 5‘-Überhangenden mit Klenow Polymerase wurde das Fragment in die EcoRV Schnittstelle des Shuttle Vektors p $\Delta$ E1sp1A ligiert. Die Ligationsprodukte wurden zur Vermehrung in chemo-kompetente Bakterien transformiert und mittels Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. 3 Wochen nach der Kotransfektion von p $\Delta$ E1sp1ACMVlacZ und dem proadenoviralen Plas-



**Abb. 14 Konstruktion replikationsdefekter Ad-5lacZ Partikel** **A.** *Homologe Rekombination in 293 Zellen* Der ‚shuttle‘ Vektor p $\Delta E1sp1AlacZ$ , der eine Expressionskassette für das bakterielle lacZ Gen unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus ‚immediate early‘ Promotors (pCMV) enthält, wurde zusammen mit dem proadenoviralen Plasmid pBHG11 in 293 Zellen, die das für die Replikation essentielle E1 Protein in ‚trans‘ zur Verfügung stellen, kotransfiziert. Da in pBHG11 das Verpackungssignal ( $\Delta\Psi$ ) deletiert ist, können nur homologe Rekombinanten replizieren. Die resultierenden viralen Partikel sind aufgrund der Deletionen in der E1 ( $\Delta E1$ ) und E3 ( $\Delta E3$ ) Region replikationsdefekt und können sich somit nur in E1 exprimierenden Zellen vermehren. Amp : Ampicillinresistenz, ori : Replikationsursprung, mu : ‚map units‘, SV40pA : Polyadenylierungssignal, LITR/RITR : ‚left/right inverted terminal repeats‘ **B.** *Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase Expression generierter Ad5lacZ Klone* Je  $1 \times 10^6$  subkonfluent wachsende 293 Zellen wurden mit 2 ml Kulturüberstand der Ad-5 Klone 1-5 für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Reporterlysepuffer aufgeschlossen und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als relative Lichteinheiten (RLU)/ $\mu$ g Protein bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

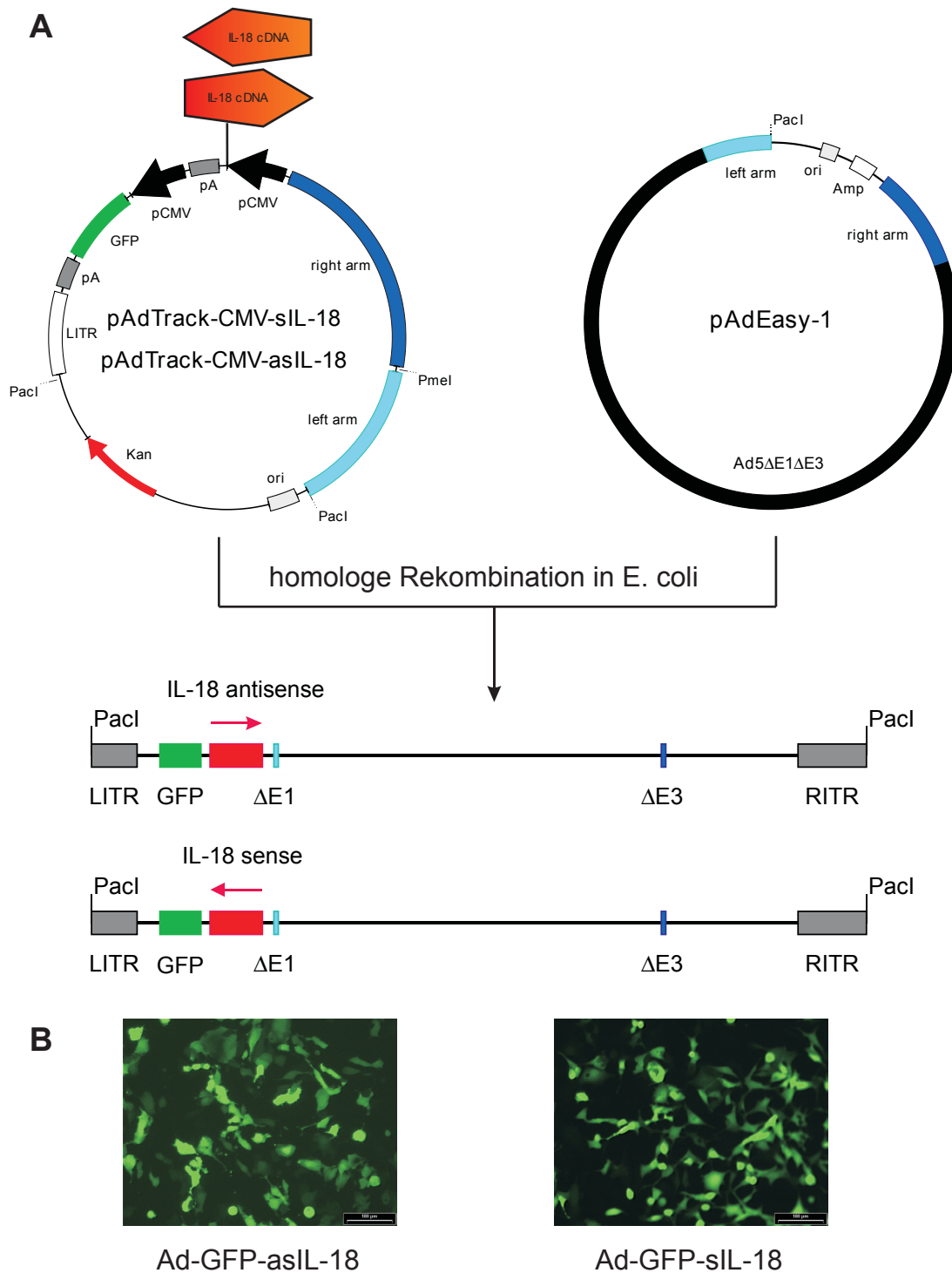


mid pBHG11 in 293 Zellen mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation (**Abb. 14A**), konnten homologe Rekombinanten als adenovirale Plaques im Zellrasen identifiziert werden. Insgesamt 5 isolierte Klone wurden sukzessiv in 293 Zellen amplifiziert und hinsichtlich der Expression funktionell aktiver  $\beta$ -Galaktosidase analysiert. Das Prinzip des verwendeten chemolumineszenten Testsystems beruht auf der Deglykosylierung eines Dioxetan Substrats durch die enzymatische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase im neutralen pH Bereich. Der Wechsel zu  $\text{pH} > 12$  führt zur Deprotonierung der aktivierten stabilisierten Dioxetan-Intermediate und zur Emission von Photonen, die im Luminometer sensitiv quantifiziert werden können. Da der Klon 4 die stärkste enzymatische Aktivität zeigte (**Abb. 14B**), wurde dieser in 293 Zellen im Großmaßstab vermehrt und in den weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten verwendet. Für Infektionsversuche *in vivo* und *in vitro* verwendete Ad-5lacZ Partikel wurden über zwei aufeinanderfolgende biphasische CsCl Dichtegradientenultrazentrifugationen von Zelltrümmern und leeren Viruskapsiden befreit. Anschließend wurde das zelltoxische CsCl durch Dialyse gegen 0,1 M Tris pH 8, 10% (v/v) Glycerin entfernt. Die Quantifizierung viraler Partikel erfolgte als ‚plaque forming units‘ (pfu) im Plaquetest auf 293 Zellen.

### 3.2.1.2 Herstellung von Ad-GFP-sIL-18 und Ad-GFP-asIL-18 über homologe Rekombination in *E. coli*

Da Rekombinationsereignisse, die zur Bildung rekombinanter Adenoviren in 293 Zellen führen, generell sehr selten sind und der zeitliche und materielle Aufwand zur Herstellung von Ad-5lacZ erheblich war, wurde zur Generierung von Ad-GFP-sIL-18 und Ad-GFP-asIL-18 ein neuartiges System auf Grundlage einer homologen Rekombination in BJ 5183 Bakterienzellen, die aufgrund der Mutation der Exonuklease I (sbcBC) besonders rekombinogen sind, verwendet (He et al, 1998; **Abb.15A**). Dazu wurde zunächst ein 0,6 kb Fragment, das für die vollständige murine IL-18 cDNA kodiert, mit EcoRI/BamHI aus pCR3.1-mIL-18 (hergestellt von Karina Barbulescu) herausgeschnitten und nach Glättung der Einzelstrangüberhängenden in ‚sense‘ und ‚antisense‘ Orientierung in die EcoRV Schnittstelle des pAdTrackCMV Shuttle Plasmids inkloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden durch PmeI Verdau linearisiert und jeweils zusammen mit dem proadenoviralen Plasmid pAdEasy-1 in kompetente BJ 5183 Zellen elektroporiert. Um homologe Rekombinanten positiv zu selektionieren, wurden die Bakteriensuspensionen auf Kanamycinagarplatten ausgestrichen. Die DNA positiver Klone wurde zur Kontrolle ansequenziert und durch Restriktionsverdau mit Pac I von prokaryotischen Sequenzen befreit und linearisiert. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend zur Produktion viraler Partikel mittels liposomaler Transfektion in 293 Zellen eingebracht. Die GFP Fluoreszenz erlaubte 7-10 Tage später die Identifizierung infektiöser adenoviraler Partikel (**Abb. 15B**) Die Bestimmung der Titer der GFP exprimie-





**Abb. 15 Konstruktion von Ad-GFP-as-IL-18 und Ad-GFP-sIL-18** **A.** *Homologe Rekombination in E. coli* Die über die Pme I Schnittstelle linearisierten ‚shuttle‘ Vektoren pAdTrack-CMV-sIL-18 und pAdTrack-CMV-asIL-18, die Expressionskassetten für EGFP und ‚sense‘ bzw. ‚antisense‘ RNA des murinen IL-18 beinhalten, wurden zusammen mit dem proadenoviralen Plasmid pAdEasy1 in BJ 5183 Bakterienzellen elektroporiert. Anschließend wurde auf Kanamycin- (Kan) haltigem Agar selektioniert. Da pAdEasy-1 nur eine Ampicillinresistenz besitzt und die ‚shuttle‘ Vektoren linearisiert vorliegen, wurden somit homologe Rekombinanten angereichert. **B.** Homologe Rekombinanten wurden nach PacI Verdau in 293 Zellen transfiziert. 7-10 Tage später konnten virale Partikel anhand der Expression des GFP Reportergens im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Die resultierenden viralen Partikel sind aufgrund der Deletionen in der E1 ( $\Delta E1$ ) und E3 ( $\Delta E3$ ) Region replikationsdefekt und können sich nur in E1 exprimierenden Zellen vermehren.

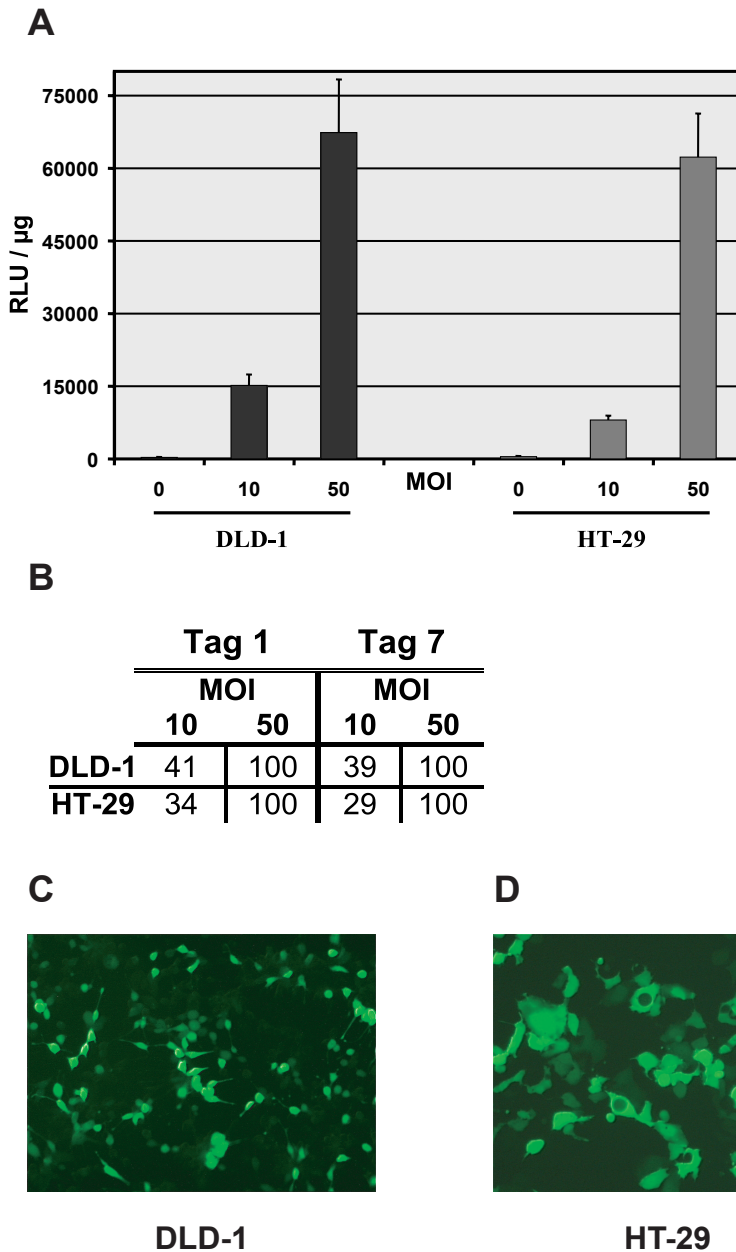
renden Adenoviren erfolgte nach zweimaliger Aufreinigung über biphasische Dichtegradientenultrazentrifugation in 293 Zellen fluoreszenzmikroskopisch als ‚fluorescence forming units‘ (ffu).

### 3.2.2 Transduktion von Kolonzellen *in vitro*

Die adenovirale Infektion beginnt mit der hochaffinen Assoziation der Proteine des viralen Kapsids an die extrazelluläre Domäne des Coxsackie- und Adenovirusvirusrezeptors (CAR) auf der Membran der Zielzellen. Anschließend erfolgt die Internalisierung über die Bindung viraler Pentonproteine an zelluläre  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  Integrine (Nemerow et al., 1999 und 2000). Die Expression dieser Rezeptoren und somit auch die Permissivität für rekombinante Ad5 variiert allerdings von Zelltyp zu Zelltyp sehr stark. Da sich der Dickdarm aus sehr heterogenen Zellverbänden zusammensetzt, besteht die Möglichkeit, dass einzelne Zellen/Zellarten ein völlig anderes Adenovirusrezeptor Expressionsmuster aufweisen. Da keine geeigneten Antikörper zur Untersuchung der zellulären Verteilung von CAR und  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  Integrinen, z.B. in Gewebeschnitten oder Westen-Blots, zur Verfügung standen, wurde zunächst die Frage, inwieweit die generierten rekombinanten Ad5 unterschiedliche Zelltypen des Dickdarms transduzieren können, *in vitro* in der Zellkultur untersucht.

#### 3.2.2.1 Rekombinante Ad5 können kolonepithelartige Zellen *in vitro* effizient transduzieren

Da in der Literatur bisher keine geeignete Methode beschrieben wurde, humane intestinale Epithelzellen (u.a. Enterozyten, M-Zellen) effizient und längerfristig in Kultur zu nehmen, wurden in der vorliegenden Arbeit als *in vitro* Modell für Zellen epithelialer Herkunft die gut charakterisierten humanen Zelllinien DLD-1 (Dexter et al., 1981) und HT-29 (Thomas et al., 1974) verwendet, die aus kolorektalen Adenokarzinomen isoliert wurden und große phänotypische Gemeinsamkeiten mit Enterozyten des Kolons besitzen. Jeweils  $1 \times 10^6$  semi-konfluent wachsende DLD-1 und HT-29 Zellen wurden mit Ad-5lacZ oder Ad-GFP-sIL-18 (Infektionsmultiplizität (MOI) : 10) infiziert. Am darauf folgenden Tag wurden aus den Ad-5lacZ behandelten Zellen Proteinlysate hergestellt und im  $\beta$ -Galaktosidase Test analysiert (**Abb. 16A**), wohingegen die Zellen, welche mit Ad-GFP-sIL-18 behandelt wurden, fluoreszenzmikroskopisch im FITC Filterset untersucht wurden (**Abb. 16C und Abb. 16D**). Beide Zelllinien konnten durch die beiden verwendeten Reportervektoren annähernd gleichermaßen gut transduziert werden. Die Ermittlung des Anteils GFP exprimierender Zellen in der Gesamtkultur als Maß für die Transduktionseffizienz 24 h nach der Infektion mit Ad-GFP-sIL-18 (MOI: 10) ergab Werte von 25 % (DLD-1) und 31 % (HT-29). Nach der Infektion mit einer MOI von 50 waren 24 h p.i. praktisch alle Zellen GFP positiv (**Abb. 16B**). Durch die

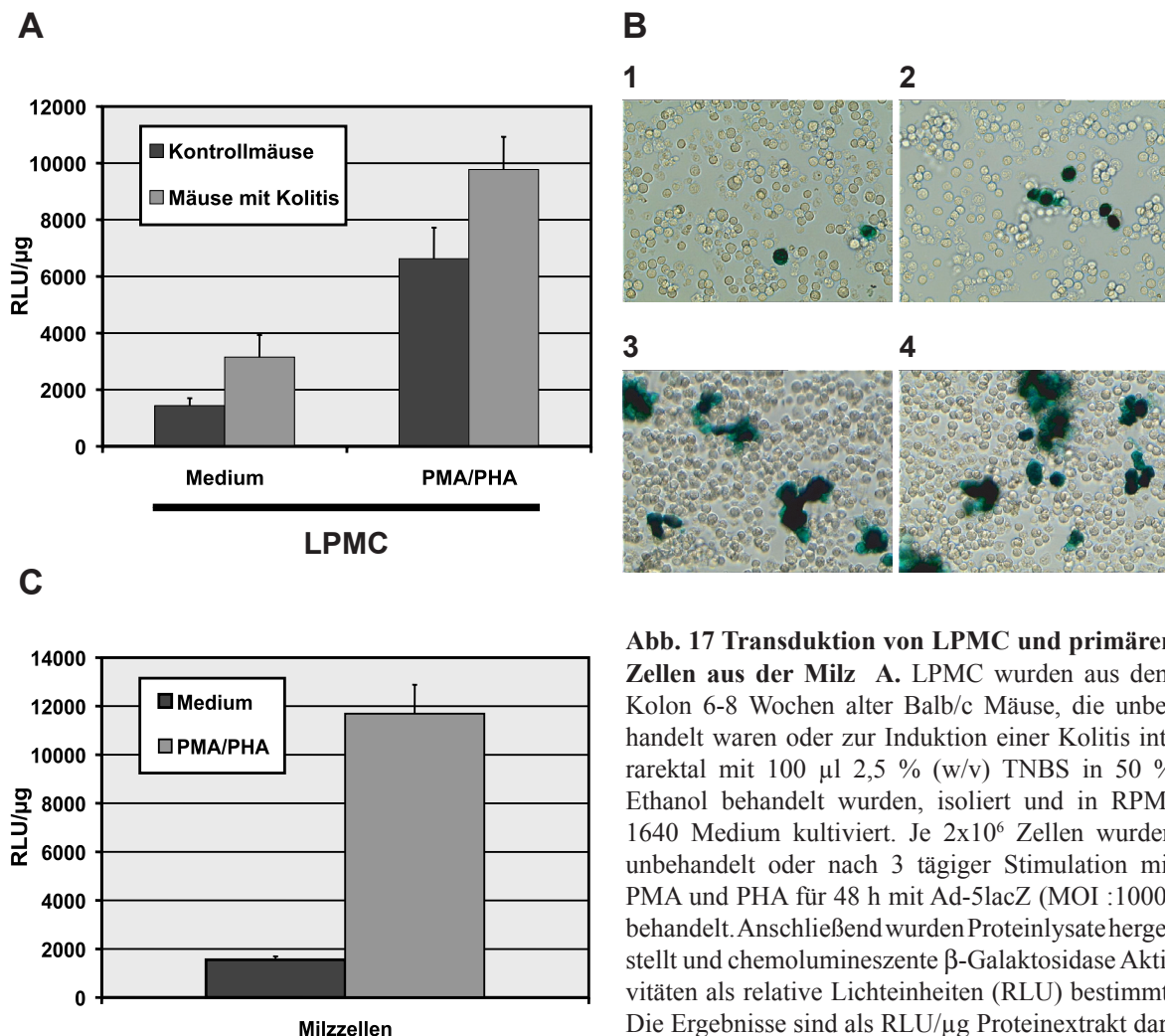


**Abb. 16 Ad-5lacZ und Ad-GFP-sIL-18 können DLD-1 und HT-29 Zellen effizient transduzieren**  
**A.** Je  $1 \times 10^6$  DLD-1 bzw. HT-29 Zellen wurden mit unterschiedlichen Infektionsmultiplizitäten an Ad-5lacZ infiziert. Nach 24 h wurden Proteinlysate hergestellt und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als relative Lichteinheiten (RLU)/ $\mu$ g Protein bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsversuchen  $\pm$  Standardabweichung. **B.** DLD-1 bzw. HT-29 Zellen wurden mit unterschiedlichen Infektionsmultiplizitäten an Ad-GFP-sIL-18 infiziert. An Tag 1 bzw. Tag 7 p.i. wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS/2% Paraformaldehyd fixiert und

vermehrte Anzahl an viralen Partikeln, die eine Zelle infizierten, waren bezüglich der Stärke der Reporterexpression kumulative Effekte zu verzeichnen. Die Analyse der Zellen 7 Tage nach der Infektion, d.h. nach mehreren Zellzyklen, zeigte, daß die Ad5 vermittelte Genexpression in den transduzierten Zellen persistierte und mitotisch weitergegeben wurde. Um den Einfluss der Transduktion mit rekombinanten Ad5 auf die Vitalität der infizierten Zelllinien genauer zu untersuchen, wurden Färbungen mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau durchgeführt. Es wurden dabei keine zytopathischen Effekte beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2.2 Transduktion primärer mononukleärer Zellen der Lamina Propria

Die mononukleären Immunzellen der Lamina Propria (LPMC) haben innerhalb des mukosalen Immunsystems große funktionelle Bedeutung und sind in entzündeten Arealen bei CED stark vermehrt vorhanden. Die Beeinflussung der biologischen Funktionen der LPMC durch die Expression rekombinanter Gene erscheint daher besonders interessant. In dieser Zellpopulation dominieren allerdings zahlenmäßig Lymphozyten und myeloide Zellen, die, wie bisherige Studien zeigten, nur geringe Mengen der für den adenoviralen Gentransfer erforderlichen  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  Integrin Rezeptoren exprimieren (Huang et al., 1995). Um dennoch die Permissivität dieser Zellen für rekombinante Ad5 zu untersuchen, wurde 8 Wochen alten



**Abb. 17 Transduktion von LPMC und primären Zellen aus der Milz** **A.** LPMC wurden aus dem Kolon 6-8 Wochen alter Balb/c Mäuse, die unbehandelt waren oder zur Induktion einer Kolitis intrarektal mit 100  $\mu$ l 2,5 % (w/v) TNBS in 50 % Ethanol behandelt wurden, isoliert und in RPMI 1640 Medium kultiviert. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden unbehandelt oder nach 3 tägiger Stimulation mit PMA und PHA für 48 h mit Ad-5lacZ (MOI :1000) behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als relative Lichteinheiten (RLU) bestimmt. Die Ergebnisse sind als RLU/ $\mu$ g Proteinextrakt dargestellt und sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen

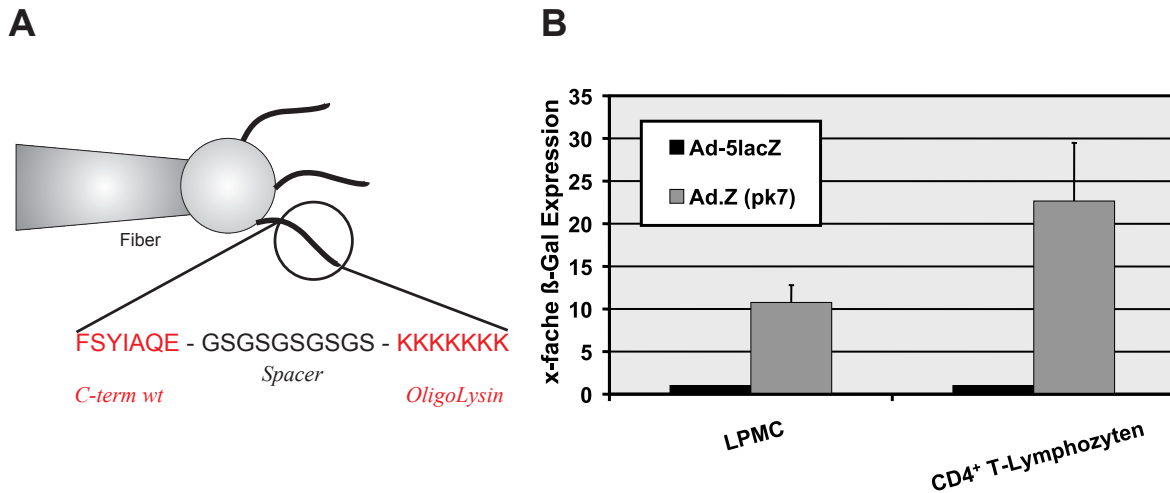
Infektionsversuchen +/- Standardabweichung. **B.** Ad-5lacZ infizierte LPMCs (siehe A.; 1/2 : Kontrollmäuse/Kolitismäuse unbehandelt, 3/4 : Kontrollmäuse/Kolitismäuse + PMA/PHA) wurden fixiert und über Nacht mit X-Gal gefärbt (siehe Material & Methoden) **C.** Je  $2 \times 10^6$  frisch isolierte primäre Zellen aus der Milz 6-8 Wochen alter Balb/c Mäuse wurden unstimuliert oder für 72 h mit PMA/PHA vorbehandelt. Anschließend wurde für 48 h mit Ad-5lacZ (MOI : 1000) behandelt, Proteinlysate hergestellt und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als relative Lichteinheiten (RLU)/ $\mu$ g Protein bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Infektionsversuchen +/- Standardabweichung.

Balb/c Mäusen der Dickdarm entnommen und daraus LPMC isoliert. Wie in **Abb. 17** dargestellt, ergaben die Infektionsversuche mit Ad-5lacZ erwartungsgemäß, daß diese Zellpopulation im Vergleich zu den Kolonepithelzelllinien selbst mit wesentlich höheren Infektionsmultiplizitäten (MOI : 1000) schlechter transduzierbar waren. Da sich auch die Milz zumeist aus lymphoiden und myeloiden Zellen zusammensetzt, wurden zum Vergleich auch primäre Milzzellen isoliert und mit Ad-5lacZ infiziert. Auch diese zeigten sich annähernd resistent gegenüber der Transduktion mit Ad5 (**Abb. 17C**). Huang et al. (1995) haben gezeigt, dass Monozyten und T-Lymphozyten aus humanen peripherem Blut, die im ‚naiven‘ Grundzustand wenig permissiv waren, durch Behandlung mit zellaktivierenden Substanzen die  $\alpha_v$  Integrine stark hochregulierten und als Resultat gesteigerte Ad5 Transduktionsraten zu beobachten waren. Um einen möglichen Einfluss des Aktivierungszustandes auf die Transduktionskapazitäten von LPMC und primären Milzzellen der Maus zu untersuchen, wurden diese durch die Kultivierung in Phorbolster (PMA) und Phytohemagglutinin (PHA) haltigem Medium für 48 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Ad-5lacZ (MOI =1000) behandelt und 2 Tage später in Zellysepuffer aufgeschlossen. Bei gleicher Infektionsmultiplizität zeigten die PMA/PHA stimulierten Zellen dabei im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant erhöhte Transduktionsraten. Diese Tatsache ist insbesondere deshalb interessant, weil im Rahmen pathophysiologischer Prozesse in entzündeten Darmarealen bei Patienten mit CED häufig starke Infiltrate aus mononukleären Immunzellen vorhanden sind, die sich als Resultat der Wirkung proinflammatorischer Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren in einem chronisch aktivierten Zustand befinden. Aus diesem Grund wurden die Infektionsexperimente auch mit LPMC aus dem Darm von Balb/c Mäusen mit experimenteller Kolitis, die durch intrarektale Applikation der haptenisierenden Substanz Trinitrobenzylsulfonsäure (TNBS) induziert wurde, durchgeführt. Interessanterweise zeigten die LPMCs aus entzündetem Darm verglichen mit den Kontrollzellen aus dem normalen Darm tatsächlich eine um ca. 50 % verstärkte Expression der rekombinanten  $\beta$ -Galaktosidase. Eine weitere Erhöhung der Transduktionsrate konnte erreicht werden, indem die LPMC aus TNBS-Kolitis Mäusen mit PMA/PHA aktiviert wurden.

### **3.2.2.3 Gesteigerte Transduktion von primären CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und LPMCs über die Verwendung von Ad5 mit modifizierter Oberflächenstruktur**

Die Assoziation von Ad5 an CAR und  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  Integrine stellt ein zentrales Element der Adenovirusinfektion dar. Um das Problem der limitierten Expression der Adenovirusrezeptoren in vielen Geweben zu umgehen, sind in jüngster Zeit verschiedene experimentelle Strategien diskutiert worden. Ein vielversprechender Ansatz könnte dabei die Konstruktion rekombinanter Adenoviren mit gentechnisch modifizierten Virushüllproteinen sein, die eine Anheftung an andere Zelloberflächenmoleküle als CAR bzw.  $\alpha_v$  Integrine ermöglichen. So





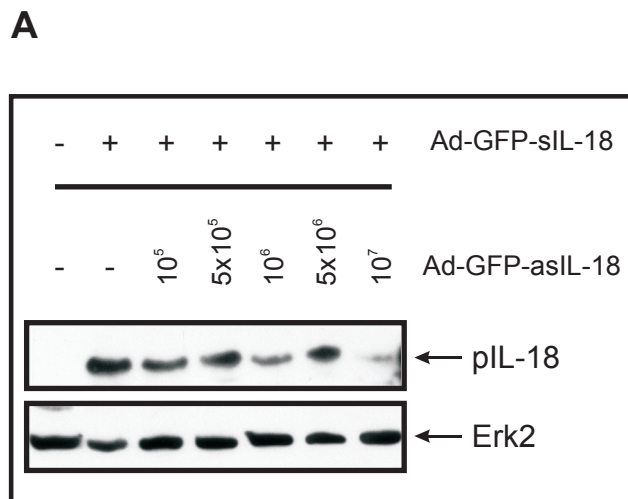
**Abb.18 Steigerung der Transduktionseffizienz von LPMCs und primären CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch Verwendung von Ad5 mit modifizierter Oberflächenstruktur** **A.** Schematische Darstellung der Struktur von *Ad.Z.pk7* Sieben Lysinreste (K) wurden über einen Adapter (spacer) mit dem c-terminalen Ende des Fiberproteins verbunden und ermöglichen so die Assoziation an zelluläre Heparansulfatstrukturen. **B.** Je  $2 \times 10^6$  LPMCs aus dem Kolon 6-8 Wochen alter Balb/c Mäuse wurden mit Ad-5lacZ oder Ad.Z.F(pk7) (MOI : 1000) infiziert. 48 h später wurden Proteinlysate hergestellt und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als relative Lichteinheiten (RLU)/ $\mu$ g Protein bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsversuchen +/- Standardabweichung.

wurden beispielsweise rekombinante Ad5 entwickelt, die das FLAG Epitop auf dem Kapsid exprimieren und über  $\alpha$ FLAG/ $\alpha$ CD3 bispezifische monoklonale Antikörper eine verbesserte Transduktion von T-Lymphozyten erlaubten (Wickham et al., 1997). Für eine T –Zell gerichtete *in vivo* Gentherapie im Darm erschienen diese aber eher ungeeignet, weil die Zellen über die Bindung des Ad5/Antikörperkomplexes an CD3 erst stimuliert und später anerg bzw. apoptotisch werden. (T. J. Wickham, pers. Mitteilung). Die Fa. Genvec (Rockville, Maryland) stellte freundlicherweise Ad.Z.F(pk7) zur Verfügung, eine gezielt genetisch modifizierte Ad5 Variante, die am c-terminalen Ende des Fiberproteins zusätzlich ein exponiertes Oligopeptid aus 7 Resten der Aminosäure Lysin besitzt (**Abb. 18A**). Die Polylysinsequenz erlaubt eine Interaktion der viralen Partikel mit Heparansulfat-Proteoglykanen der Zellmembran oder Extrazellulärmatrix, die ubiquitär auf praktisch allen Körperzellen verbreitet sind. Ad.Z.F(pk7) besitzt wie Ad-5lacZ eine CMV Promotor Expressionskassette für  $\beta$ -Galaktosidase und erlaubt so in Transduktionsstudien den direkten Vergleich zu Wildtyp Ad5. Wie in **Abb. 18B** gezeigt, konnte Ad.Z.F(pk7) isolierte LPMC aus dem Kolon von Balb/c Mäusen bei gleicher Infektionsmultiplizität (MOI : 1000) wesentlich effizienter transduzieren als Ad5-lacZ. Zum Vergleich wurden auch CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten Zellen aus der Milz isoliert und mit Ad.Z.F(pk7) infiziert. Auch hier zeigte sich, daß bei der Verwendung von Ad.Z.F(pk7) stark erhöhte Transduktionsraten zu verzeichnen waren. Im Vergleich zu Ad-5lacZ wurde nach der Infektion mit Ad.Z.F(pk7) eine um mehr als 20 fach erhöhte chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen werden. Keine signifikant unterschiedliche Transduktionskapazitäten ergaben sich dagegen bei Analyse von DLD-1 Zellen (Daten

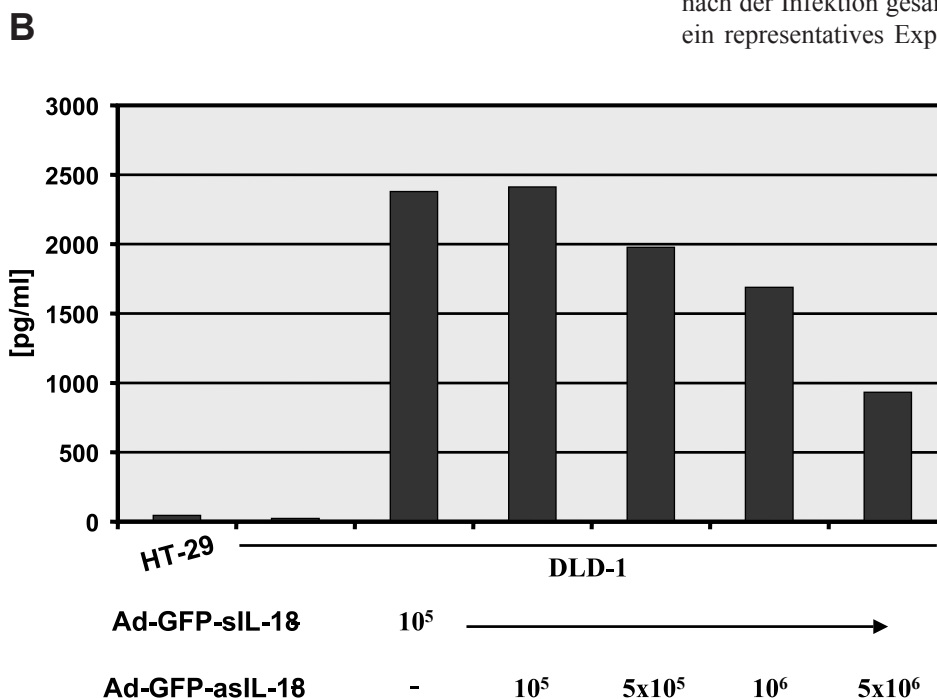
nicht gezeigt)

### 3.2.2.4 Modulation der IL-18 Expression in DLD-1 Zellen

IL-18 (,IGIF' = interferon- $\gamma$  inducing factor') ist als potenter Aktivator der Produktion von IFN- $\gamma$  ein wichtiger Mediator gewebedestruierender proinflammatorischer Prozesse (Okamura et al., 1995; McInnes et al., 2000). IL-18 besitzt anders als die meisten Zytokine keine N-terminale Signalsequenz, die eine direkte Sekretion durch die Plasmamembran erlaubt. Stattdessen wird ein inaktives ,precursor' Polypeptid synthetisiert, das durch die proteolytische Aktivität der Cystein-Protease Caspase-1 (ICE : IL-1beta converting enzyme) zu biologisch aktivem IL-18 prozessiert wird. In der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus



**Abb. 19 Modulation der Expression von IL-18 in DLD-1 Zellen** **A.**  $5 \times 10^5$  semikonfluent wachsende DLD-1 Zellen wurden mit Medium (Spur 1) oder  $1 \times 10^5$  pfu Ad-GFP-sIL-18 (Spur 2-7) behandelt. Zusätzlich (Spur 3-7) wurde mit steigenden Mengen des Ad-GFP-asIL-18 antisense RNA Konstrukts infiziert. 48h p.i. wurden Proteinlysate hergestellt, je 30  $\mu$ g denaturiert in einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Anschließend wurde IL-18 bzw. zur Lade- und Blotkontrolle Erk2 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. **B.** IL-18 spezifischer ,sandwich' ELISA mit Zellkulturüberständen un behandelter oder Ad-GFP-sIL-18 und Ad-GFP-asIL-18 infizierter DLD-1 Zellen, die 48h nach der Infektion gesammelt wurden. Jeweils ein representatives Experiment ist dargestellt.





Crohn wurden im Vergleich zu Kontrollpatienten in Epithelzellen und LPMC stark erhöhte Level an biologisch aktivem IL-18 gefunden (Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999). Da die Beeinflussung der IL-18 Expression somit für das Studium der Pathogenese bei CED von Bedeutung sein kann, wurde untersucht, ob über die Infektion mit Ad-GFP-sIL-18 /Ad-GFP-asIL-18 im *in vitro* Modell DLD-1 Zellen eine Modulation der IL-18 Expression möglich war. Dazu wurden zunächst - die Ergebnisse der Experimente mit den Reporteradenoviren als Grundlage nehmend - subkonfluent wachsende DLD-1 Zellen mit Ad-GFP-sIL-18 infiziert (MOI :10) und für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, Proteinlysate hergestellt und ein IL-18 spezifischer Western-Blot Proteinnachweis durchgeführt. Zur internen Lade- und Blotkontrolle wurde die Nitrozellulosemembran anschließend mit einem Antikörper für Erk2 rehybridisiert. Wie in **Abb. 19A** gezeigt, resultierte die Infektion der DLD-1 Zellen mit Ad-GFP-sIL-18 in einer starken Expression des rekombinanten IL-18 Proteins. Da der verwendete monoklonale Antikörper auch an humanes IL-18 bindet, war auch in den nicht Ad-GFP-sIL-18 behandelten DLD-1 Zellen ein schwaches Signal vorhanden, das wahrscheinlich durch endogenes IL-18 hervorgerufen wurde. Die Koinfektion der Ad-GFP-sIL-18 behandelten Zellen mit variablen Mengen des Ad-GFP-asIL-18 ‚antisense‘ RNA Konstrukts führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-18 Menge in den Zellysaten.

Da IL-18 nach der Prozessierung durch Caspase-1 als reifes IL-18 aus der Zelle sezerniert wird, wurde untersucht, ob in den infizierten DLD-1 Zellen auch die Menge an sekretiertem IL-18 verändert war. Dazu wurde in den korrespondierenden Zellkulturüberständen im spezifischen ‚Sandwich‘-ELISA die IL-18 Proteinkonzentrationen bestimmt. Die Auswertung zeigte, daß *in vitro* durch die Ad-GFP-asIL-18 vermittelte Überexpression von IL-18 ‚antisense‘ RNA auch die biologisch aktive Form von IL-18 im Zellkulturüberstand dosisabhängig reduziert werden konnte (**Abb. 19B**).

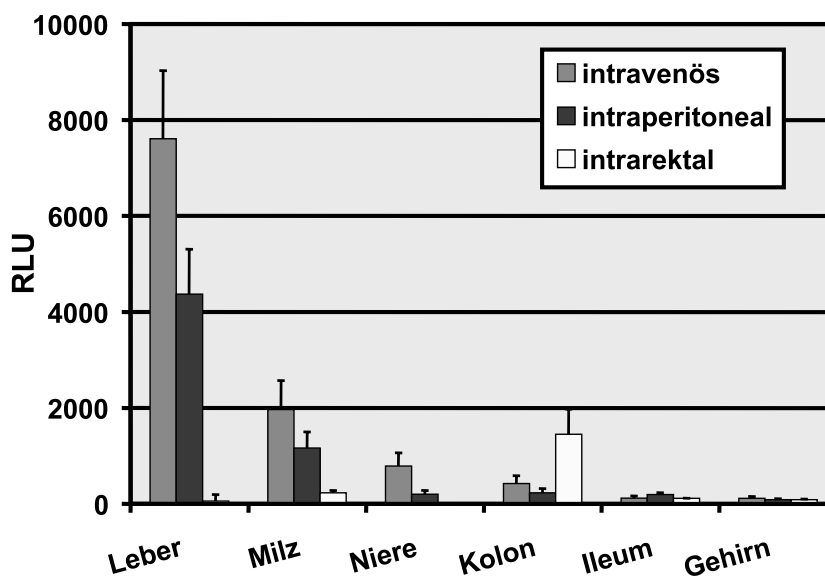
### 3.2.3 Untersuchungen *in vivo*

Zusammenfassend haben die *in vitro* Versuche mit den Reportervektoren gezeigt, daß rekombinante Ad5 prinzipiell durchaus in der Lage waren, Zellen gastrointestinaler Herkunft zu transduzieren. Hinsichtlich der Transduktionseffizienz ergaben sich, vermutlich aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression der Adenovirusrezeptoren, dagegen gravierende Unterschiede. Zellen epithelialer Herkunft konnten bei gleicher Infektionsmultiplizität wesentlich effizienter infiziert werden als LPMC, die zumeist aus Zellen lymphoider oder myeloider Herkunft bestehen. Interessanterweise konnten Möglichkeiten zur Steigerung der Transduktionskapazitäten der LPMC aufgezeigt werden, einerseits über Hochregulation der Adenovirusrezeptoren durch Stimulation der Zellen, andererseits durch Verwendung von Ad5 mit chimären Fiberproteinen, die als Resultat veränderter Zellbindungseigenschaften LPMC

mehr als 10 fach effektiver transduzieren konnten als Wildtyp Ad-5.

### 3.2.3.1 Transduktion von Zellen des Kolons nach lokaler Administration rekombinanter Ad-5

Eine gentherapeutische Transduktion der Leber über eine systemische Administration rekombinanter Ad5 in den Blutkreislauf war im Maus- oder Rattenmodell bereits Gegenstand vieler Untersuchungen (Strauss et al., 1994; Panis et al., 1996; Ilan et al., 1999). Für eine effiziente Transduktion von Lungenzellen wurde dagegen eine intratracheale Administration als besonders geeignet beschrieben (Crystal et al., 1992). Da der Gastrointestinaltrakt diesbezüglich weniger gut untersucht wurde, war für die *in vivo* Studien im Mausmodell wichtig, geeignete Möglichkeiten der Applikation der rekombinanten Ad5 zu finden. Dazu wurden Ad-5lacZ Partikel zunächst intravenös über die lateralen Schwanzvenen in 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse administriert. 3 Tage später wurden den Mäusen Organe entnommen und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie homogenisiert und in den Proteinlysaten als Mass für die Transduktionseffizienz chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Diese systemische Administration führte zu einer starken Reporterexpression in der Leber und anderen gut durchbluteten Organen wie Milz und Niere (Abb. 20). Auch im Bereich der Einstichstelle im Schwanz waren viele Zellen infiziert (Daten nicht gezeigt). In Gewebeproben aus dem Kolon konnten allerdings nur sehr geringe Mengen an  $\beta$ -Galaktosidase gefunden werden. Ein ähnliches Bild ergab die Analyse von Mäusen, welche die gleiche Menge an Ad-5lacZ intraperitoneal erhielten. Auch hier wurden die höchsten Transduktionsraten in der Leber und der Milz gefunden, sowie im Bereich der Einstichstelle (Zwerchfell, Bauchhöhle), während im Kolon wiederum vernachlässigbar kleine

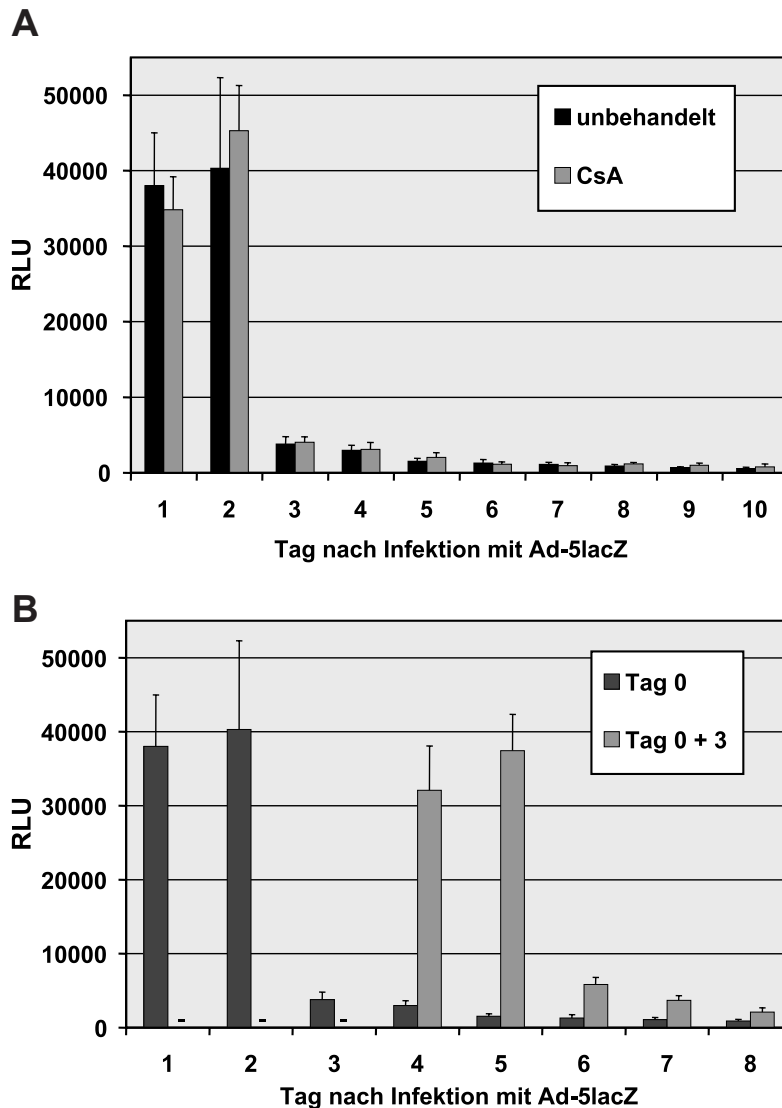


**Abb. 20** Reporterexpression im Kolon nach Administration rekombinanter, replikationsdefekter Ad5. 6-8 Wochen alten Balb/c Mäusen (3 Mäuse/Gruppe) wurden intravenös, intraperitoneal oder intrarektal  $1 \times 10^9$  pfu Ad-5lacZ appliziert. 3 Tage p.i. wurden die dargestellten Organe entnommen, jeweils 100 mg in Reporterlysepuffer homogenisiert und im Lumimeter chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsversuchen  $\pm$  Standardabweichungen.

Mengen des  $\beta$ -Galaktosidase Transgens exprimiert wurden, Da die untersuchten systemischen Applikationsformen in Mäuse somit kein effizientes ‚targeting‘ von Zellen des Darms durch rekombinante Ad5 erlaubten, wurde eine lokales intraluminales Administrationssystem etabliert. Die Ad-5lacZ Partikel wurden dabei mit einem 2F Katheter 4 cm in das Dickdarmlumen anaesthesierter Mäuse gegeben. Um ein Austreten der Virussuspension zu verhindern, wurde das Rektum mit einem 4F Ballonkatheter für 30 Minuten verschlossen. Nach 3 Tagen wurden Organlysate hergestellt und wiederum  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Es zeigte sich, daß die Transduktionsraten im Kolon verglichen mit den systemischen Applikationsweisen wesentlich höher waren. Da in Leber, Milz und Niere im Gegensatz dazu nur marginale Werte beobachtet wurden, kann vermutet werden, daß bei dieser lokalen Applikationsform nur geringe Mengen der viralen Partikel in das Blutgefäßsystem eintreten können.

### 3.2.3.2 Zeitlicher Verlauf der $\beta$ -Galaktosidase Expression im Dickdarm

Zur Aufrechterhaltung der funktionalen Integrität des intestinalen Epitheliums ist eine ausgewogene Balance zwischen dem Verlust von Epithelzellen und der Erneuerung durch Proliferation und Differenzierung notwendig (‚turnover‘). Die aus pluripotenten Stammzellen gebildeten Vorläuferzellen der resorptiven Enterozyten ‚wandern‘ wie auch Becherzellen und enteroendokrine Zellen innerhalb der Kolonkrypten entlang der Krypten/Villus Achsen im Zuge der Reifung und Ausdifferenzierung lumenwärts und werden letztlich als senescente Zellen abgegeben (Schmidt et al., 1985; Kerneis et al., 1996). Um den Einfluß dieser ständigen Erneuerungsprozesse auf den zeitlichen Verlauf der rekombinanten adenovirusvermittelten Genexpression zu untersuchen, wurden Balb/c Mäuse intrarektal mit Ad-5lacZ behandelt und in 24 h Abschnitten die chemolumineszenten  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten in Kolonlysaten bestimmt. In **Abb. 21** ist der zeitliche Verlauf der  $\beta$ -Galaktosidase Expression im Kolon behandelter Mäuse dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß schon nach 24 h p.i. maximale Werte zu verzeichnen waren und dann bis zum 8 Tag eine kontinuierliche Abnahme der Expression des Transgens beobachtet werden konnte. Am Tag 10 p.i. war nur noch ein Bruchteil der nach 24 h gemessenen Aktivität vorhanden. Überraschend war in erster Linie der rapide Abfall um mehr als das zehnfache am Tag 3 p.i.. Bisherige Studien haben gezeigt, dass es nach intravenöser Administration rekombinanter Ad-5 in immunkompetenten Mäusen zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt, die zu einer progredienten Zerstörung infizierter Zellen durch adenoviruspezifische zytotoxische T-Lymphozyten führt. Um zu untersuchen, ob immunologische Reaktionen gegen die intrarektal applizierten Ad-5 für den steten Rückgang der Transduktionsraten verantwortlich sein konnten, wurde ein gleichartiges Zeitverlaufsexperiment mit Balb/c durchgeführt, welche durch die Behandlung mit dem Calcineurin-Hemmer Cyclosporin-A stark immunsupprimiert waren. Es erga-



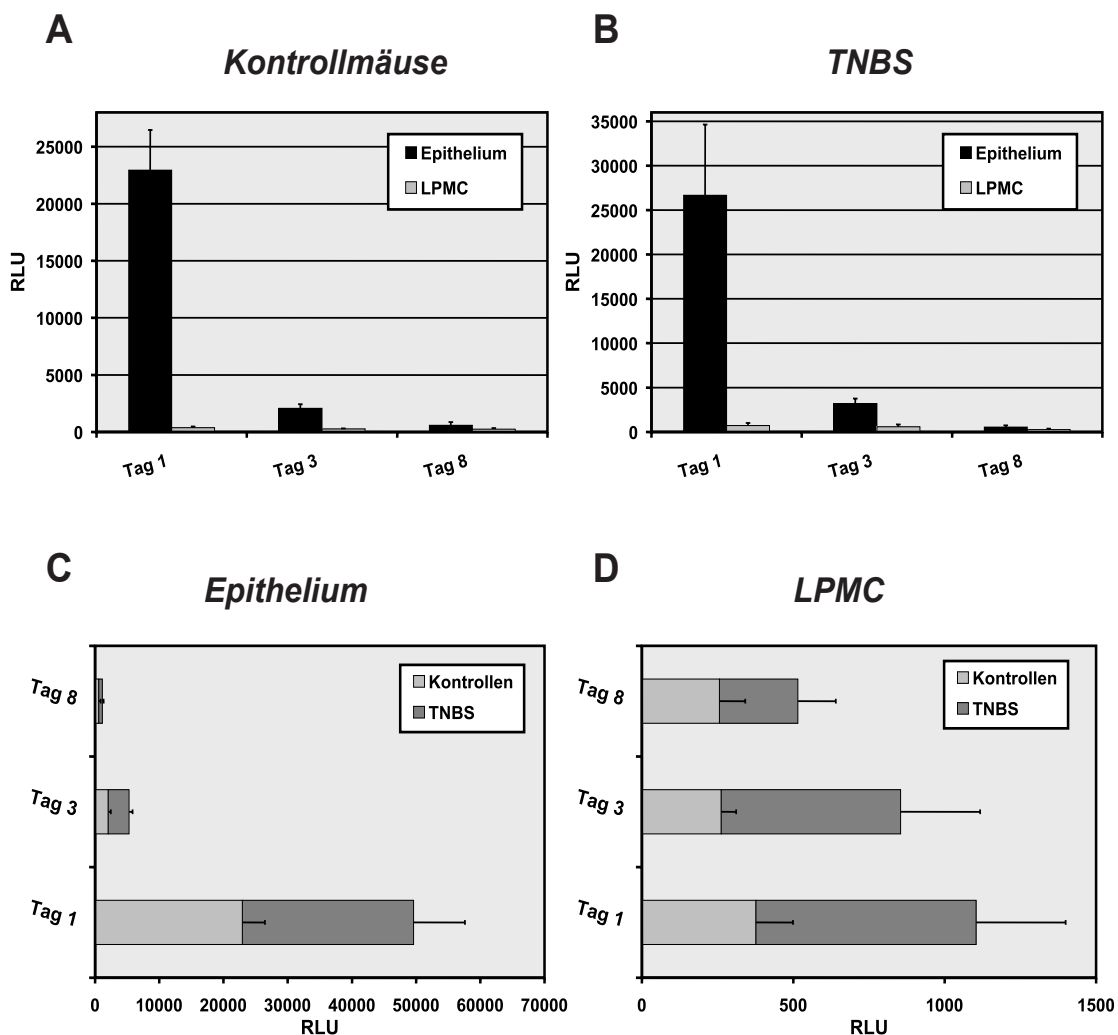
**Abb. 21 Zeitverlauf der  $\beta$ -Galaktosidase Expression nach intrarektaler Administration.** **A.** 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse (3 Tiere/Untersuchungszeitpunkt) wurden intrarektal mit  $1 \times 10^9$  pfu Ad-5lacZ behandelt. Eine zweite Gruppe wurde zusätzlich intraperitoneal mit  $10 \mu\text{g}$  Cyclosporin A/g Körpergewicht behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Dickdarm entnommen, jeweils 100 mg in Reporterlysepuffer homogenisiert und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsversuchen  $\pm$  Standardabweichung. **B.** 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse (3 Tiere / Untersuchungszeitpunkt) wurden intrarektal mit  $1 \times 10^9$  pfu Ad-5lacZ behandelt. Einer zweite Gruppe wurde am Tag 3 erneut je  $1 \times 10^9$  pfu /Maus Ad-5lacZ appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Dickdarm entnommen, jeweils 100 mg in Reporterlysepuffer homogenisiert und chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsversuchen  $\pm$  Standardabweichung.

ben sich keine gravierenden Unterschiede im Zeitverlauf der  $\beta$ -Galaktosidase Expression, was vermuten läßt, daß eine Immunantwort gegen die Kapsidproteine nicht wesentlich am schnellen Rückgang der Transduktionsraten beteiligt war. Wurde den Mäusen am Tag 3 nach der Erstbehandlung ein weiteres Mal intrarektal  $1 \times 10^9$  pfu Ad-5lacZ appliziert, ergab sich eine vergleichbare, um 3 Tage verzögerte Transduktionskinetik (**Abb. 21B**).

### 3.2.3.3 Vornehmlich Epithelzellen werden durch intraluminale Administration rekombinanter Ad-5 transduziert

Die *in vitro* Versuche (siehe 3.2.2.1) demonstrierten, daß Zellen epithelialer Herkunft eher permissiv für eine Infektion mit Ad5 waren als LPMC. Da eine immunologische Reaktion ausgeschlossen werden konnte, war die kontinuierliche Abnahme der  $\beta$ -Galaktosidase Level innerhalb weniger Tage wahrscheinlich auf das normale ‚shedding‘ infizierter Zellen zu-

rückzuführen. Dies implizierte, daß auch *in vivo* Epithelzellen der Darmschleimhaut besser transduziert wurden als LPMC, die nicht im vergleichbarem Ausmaß einem derartigen Erneuerungsprozess ausgesetzt sind wie Enterozyten. Um diese Vermutung zu analysieren, wurden Kolonepithelzellen und LPMC Ad-5lacZ behandelter Balb/c Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten getrennt isoliert und hinsichtlich der  $\beta$ -Galaktosidase Expression untersucht (Abb. 22A). Tatsächlich war insbesondere an Tag 1 p.i. in den Epithelzellen im Vergleich mit den LPMC eine deutlich erhöhte enzymatische Aktivität erkennbar. Im weiteren zeitlichen Verlauf gingen die Transduktionsraten im Epithelium stark zurück, während die schwächere, aber deutlich detektierbare Enzymaktivität im Extrakt der LPMC vergleichs-



**Abb. 22 Vergleich der Transduktionsraten im Kolongewebe von Kontrolltieren und Mäusen mit experimenteller Kolitis** 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse (3 Tiere/Gruppe), die unbehandelt waren (A) oder zur Induktion einer transmuralen Kolitis intrarektal mit 100  $\mu$ l 2,5 % (w/v) TNBS in 50 % Ethanol vorbehandelt wurden (B), wurden 2 Tage später intrarektal mit  $1 \times 10^9$  pfu Ad5lacZ infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Dickdarm entnommen und daraus LPMC bzw. Zellen des Epitheliums isoliert. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und im Luminometer chemolumineszente  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten determiniert. In (C) und (D) sind die Ergebnisse für Kontrollen und TNBS-Mäuse vergleichend dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Infektionsexperimenten  $\pm$  Standardabweichung.

weise weniger stark zurückging.

### **3.2.3.4 Erhöhte Transduktionsraten in Mäusen mit experimenteller Kolitis**

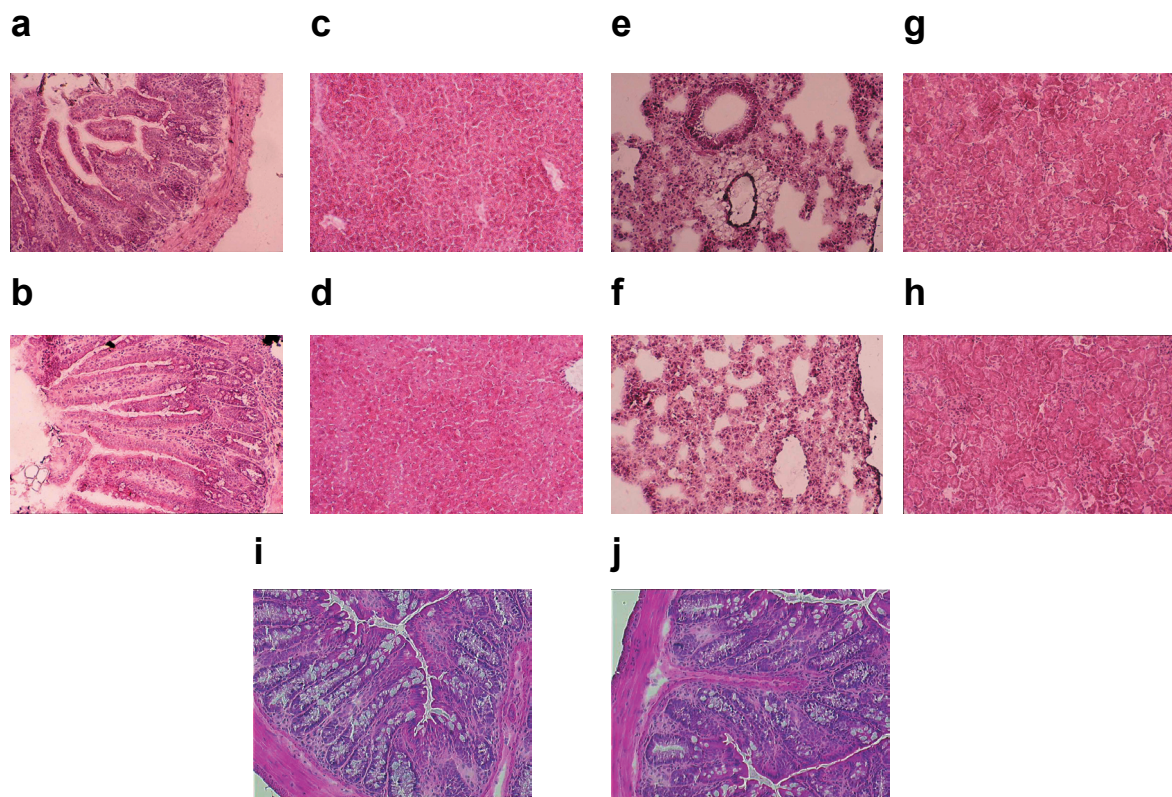
Die *in vitro* Infektionsversuche in 3.2.2.3 haben dargelegt, daß PMA/PHA aktivierte LPMC – vermutlich aufgrund einer vermehrten Expression der Ad5 Rezeptoren – höhere Transduktionsraten zeigten als unstimulierte Kontrollzellen. CED sind assoziiert mit bedeutenden histopathologischen Veränderungen wie Hyperplasie, Zerstörung der Kryptenarchitektur und der Ausprägung von Läsionen. Neben der Hochregulation der Adenovirusrezeptoren könnte auch die zerstörte Schleimhautstruktur im entzündeten Darm einen Effekt auf adenovirale Transduktionsraten gehabt haben, indem z.B. eine verbesserte räumliche Zugänglichkeit subepithelial gelegener Bereiche gegeben war. Deshalb wurden Balb/c Mäuse mit experimenteller (TNBS-) Kolitis intrarektal mit Ad-5lacZ behandelt und im  $\beta$ -Galaktosidase Assay mit Kolonlysaten die adenoviralen Transduktionsraten bestimmt (**Abb. 22B**). Der Vergleich mit gleichartig behandelten Mäusen ohne entzündeten Darm ergab in der Gruppe der Kolitis-Mäuse signifikant höhere Transduktionseffizienzen. Die getrennte Analyse von Epithelzellen und LPMC demonstrierte, daß auch im entzündeten Dickdarm vor allem Epithelzellen effizient infiziert wurden. Die Beobachtung der höheren  $\beta$ -Galaktosidase Mengen im Darm der TNBS Kolitis Mäuse im Vergleich mit den Kontrollen konnte auf eine verstärkte Reporterexpression vor allem in LPMC zurückgeführt werden (**Abb. 22 C und D**). Die Infektionsversuche mit TNBS Kolitis Mäusen bestätigten damit die Ergebnisse der *in vitro* Versuche mit isolierten LPMC und zeigten, daß mittels rekombinanter Ad5 im entzündeten Darm rekombinante Proteinfaktoren gezielt exprimiert werden können.

### **3.2.3.5 Die intrarektale Administration rekombinanter Ad-5 führt zu keiner systemischen Intoxikation**

Die direkte Administration E1/E3 defizienter, rekombinanter Ad5 in die Blutzirkulation ist mit einer Reihe systemischer Nebeneffekte (u.a. antigen - und nicht antigenspezifischen immunologischen Reaktionen) verbunden (Gao et al., 1996; Cichon et al., 1999). Um zu überprüfen, ob auch die lokale, intrarektale Administration zu gravierenden Seiteneffekten führt, wurden Balb/c Mäuse intrarektal mit Ad5lacZ behandelt und nach 7 Tagen Organe entnommen. Die histologische Analyse von Hematoxylin/Eosin gefärbten Kryostatschnitten von Dünndarm, Leber, Lunge, Niere, Dickdarm ergab keine pathologischen Befunde (Abb. 23). Desweiteren wurde den infizierten Mäusen und Kontrollen 7 Tage p.i. Blut entnommen und serologisch analysiert (Labor für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Uniklinikum Mainz). Auch die ermittelten Serumkonzentrationen für Kreatinin (0,35  $\nu$  0,35 mg/dl



in Kontrollmäusen), Urease (19 v 17 mg/dl), Bilirubin (0,95 v 1,01 mg/dl), alkalische Phosphatase (88 v 126 U/l) und Lipase (> 190 v <190 U/l) lieferten keine Anhaltspunkte für eine akute Intoxikation der Adenovirus behandelten Tiere.



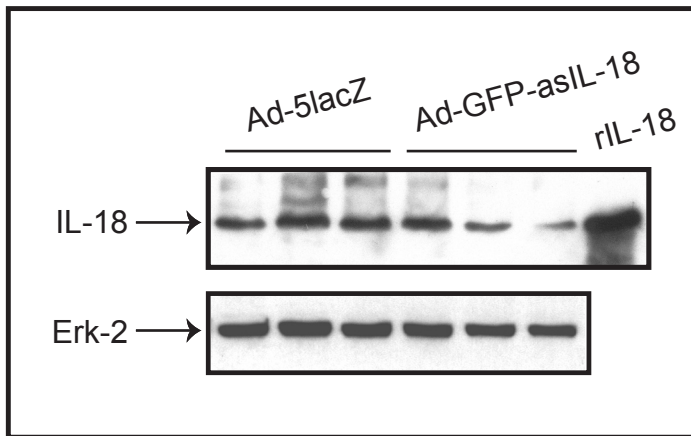
**Abb. 23 Histopathologische Untersuchung von Gewebeschnitten Ad-5lacZ behandelter Mäuse 6-8 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden intrarektal mit PBS oder  $1 \times 10^9$  pfu Ad-5lacZ behandelt. 7 Tage später wurden Organe entnommen, Kryostatschnitte angefertigt und mit Haematoxylin/Eosin angefärbt. a, c, e, g, i : PBS; b, d, f, h, j : Ad-5lacZ (a, b : Ileum; c, d : Leber; e, f : Lunge; g, h : Niere; i, j : Kolon).**

### 3.2.3.6 Intrarektale Administration von Ad-GFP-as-IL-18 vermindert die IL-18 Expression im entzündeten Darm

Nachdem ein System zur adenoviralen Transduktion von Zellen des Kolons *in vivo* etabliert werden konnte, wurde untersucht, ob mittels der Überexpression von ‚antisense‘ RNA durch rekombinante Ad5 die Menge endogener Proteine im Darm beeinflusst werden konnte. Als Modellsystem bot sich hierfür das CB.17 SCID Modell an, in dem bereits die verstärkte Expression von IL-18 im entzündeten Darm nachgewiesen wurde (Kawachi et al., 2000). Dazu wurden CB.17 SCID Mäusen jeweils  $1 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>High</sup> T-Lymphozyten intraperitoneal transplantiert, die mittels immunmagnetischer Separation aus der Milz von Balb/c Mäusen isoliert wurden (Atreya et al., 2000). Nachdem die Tiere 8 Wochen nach dem adoptiven Transfer erste Zeichen der Manifestation einer chronischen Kolitis wie Gewichtsverlust, Prolapsus recti und Diarrhoe zeigten, wurden je Maus 3 mal im Abstand von 48 h  $1 \times 10^{10}$  ffu Ad-GFP-asIL-18 intrarektal appliziert. Kontrollmäuse wurden mit  $1 \times 10^{10}$  pfu Ad-5lacZ behandelt. **Abb. 24** zeigt eine IL-18 spezifische Western-Blot Analyse mit Zellysaten aus dem

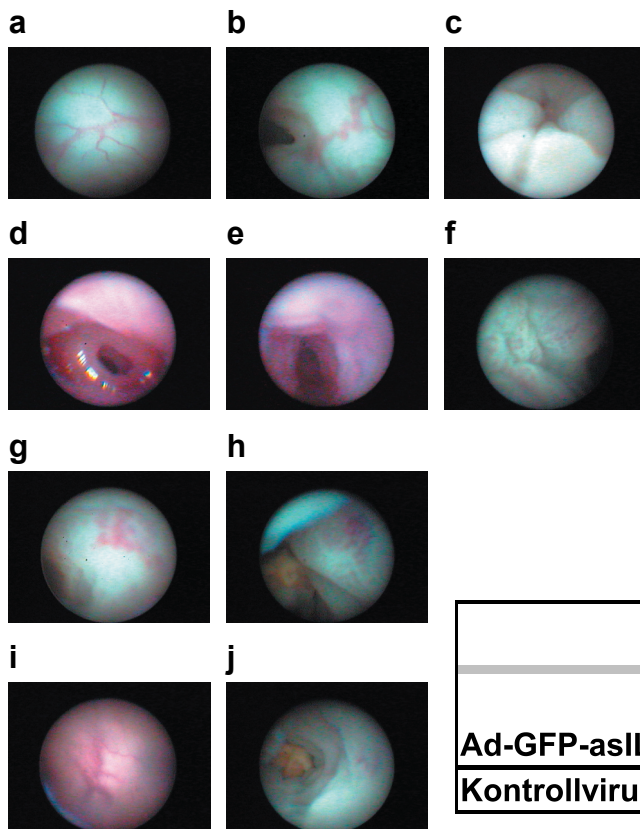


Kolon, die 48 h nach der letzten Behandlung hergestellt wurden. Die Administration von Ad-GFP-asIL-18 führte im Mittel zu einer signifikanten Reduktion der Menge an biologisch aktivem IL-18 verglichen mit den Kontrollen.



**Abb. 24 Modulation der IL-18 Level im Dickdarm *in vivo*** 6-8 Wochen alte C.B.17 SCID Mäuse wurden zur Induktion einer chronischen Kolitis mit  $1 \times 10^6$  frisch isolierten  $CD4^+CD62L^{High}$  Zellen aus der Milz von Balb/c Mäusen adoptiv transferriert. 8 Wochen später wurden 3x im 48 h Abstand jeweils  $1 \times 10^{10}$  pfu/Maus Ad-GFP-asIL-18 bzw. Ad-5lacZ intrarektal administriert. 48h nach der letzten Behandlung wurde der Dickdarm entnommen und Proteinlysate hergestellt. Je 50  $\mu$ g wurden denaturiert, in einem 15 % SDS-Page aufgetrennt und auf Nitrozellulose immobilisiert. Anschließend wurden IL-18 bzw. zur Lade- und Blotkontrolle Erk2 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen.

Die endoskopische Analyse (**Abb. 25**) der behandelten Tiere ergab für die Ad-GFP-asIL-18 einen signifikanten Rückgang der entzündlichen Erscheinungen im Dickdarm, während in den Kontrollvirus-behandelten Tieren weiterhin starke Ulzerationen und gestörte Vaskualisierungsmuster vorhanden waren.



**Abb. 25 Endoskopische Analyse** Adoptiv transferrierte C.B-17 SCID-Mäuse (siehe Abb. 24) wurden vor bzw. am Tag 4 und 6 nach der Behandlung mit Ad5 koloskopisch analysiert. Der Grad der entzündlichen Erscheinungen wurde mittels MEICS (,murine endoscopic index of colitis severity') - Score (siehe Material und Methoden) klassifiziert. **a-c** untransferrierte, **d-h** PBS/Ad-lacZ behandelte und **i-j** Ad-GFP-asIL-18 behandelte C.B-17 SCID Mäuse

	MEICS Score		
	Tag 0	Tag 4	Tag 6
Ad-GFP-asIL-18	6-7	4-5	3-4
Kontrollvirus	6	6	6

## 4. Diskussion

Die gegenwärtig verfügbaren therapeutischen Optionen können chronisch entzündliche Darmerkrankungen im Prinzip nur symptomatisch behandeln. Es werden dabei überwiegend Substanzen eingesetzt, die entzündliche Prozesse eher unspezifisch inhibieren (v.a. Kortikosteroide, 5-Aminosalicylsäure) oder als Hemmstoffe des Nukleinsäurestoffwechsels (z. B. Azathioprin, 6-Mercapto-Purin, Methotrexat) die Proliferation und proinflammatorische Wirkung von Immunzellen unterbinden. Die medikamentöse Behandlung ist oft mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden und liefert z.B. bei Patienten mit steroidrefraktärem Morbus Crohn nur unbefriedigende Ergebnisse. Um verbesserte und gezieltere therapeutische Strategien entwickeln zu können, ist es notwendig, die Ätiopathogenese dieser Krankheiten umfassend zu verstehen. Über die grundlegenden molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von CED führen, ist zur Zeit jedoch noch wenig bekannt. Im Rahmen der Erforschung multifaktorieller, chronischer Erkrankungen nehmen neue *in vitro* und *in vivo* Modelle eine entscheidende Rolle ein. Die Erzeugung transgener Tiere erlaubt die Herstellung von Krankheitsmodellen mit definierten genetischen Bedingungen und kann hilfreich sein, daß komplexe, funktionelle Wechselspiel zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems und exogenen Faktoren zu untersuchen. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher eine neues transgenes Mausmodell etabliert, das zu einem erweiterten Verständnis der molekularen Rolle des IL-12/STAT-4 Signaltransduktionsweges bei CED beitragen sollte. Tiermodelle erleichtern desweiteren die Identifizierung potentieller Ansatzpunkte (,targets‘), um beim Menschen grundlegend therapeutisch in einen Krankheitsprozess eingreifen zu können. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher im Tiermodell bei der Maus untersucht, ob die Möglichkeit besteht, mittels Adenovirus-mediertem somatischen Gentransfer Proteinfaktoren gezielt im normalen und entzündlich veränderten Darm exprimieren zu können.

### 4.1 Das STAT-4 transgene Mausmodell

Das immunregulatorische Zytokin IL-12 und, wie Studien aus jüngster Zeit gezeigt haben, auch die  $\beta 2$  Kette des hochaffinen IL-12 Rezeptors sind in Darmbereichen mit aktivem Morbus Crohn stark hochreguliert (Monteleone et al., 1997; Parronchi et al., 1997; Parello et al., 2000). In verschiedenen experimentellen Mausmodellen konnte die Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-12 die Entwicklung intestinaler Entzündungserscheinungen verhindern oder eine bereits etablierte Kolitis therapieren (Davidson et al., 1998; Neurath et al., 1995). Diese Erkenntnisse haben die Hypothese nahegelegt, daß die pathologische Aktivierung der IL-12 Signaltransduktion eventuell ein wesentliches Element der Pathogenese bei CED sein könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher ein *in vivo* Modell zur weitergehenden Untersuchung der Bedeutung des IL-12 Signalweges für das Immunsys-

stem des Darms generiert werden. Dazu wurden unter Verwendung der Inzuchtlinie FVB/N durch Mikroinjektion eines geeigneten Konstrukts in Zygoten transgene Mäuse hergestellt (FVB/N<sup>S-4tg</sup>), die den Transkriptionsfaktor STAT-4 (Zhong et al., 1994; Yamamoto et al., 1994), den zentralen Mediator der biologischen Funktionen von IL-12, induzierbar überexprimierten (**Abb. 4**). Transgene Mäuse für STAT-Faktoren wurden bisher nur für STAT-3 beschrieben. Die spezifische Überexpression von Wildtyp STAT-3 nur im Herz resultierte dabei in einer Hyperthrophie der Myozyten und einer Protektion vor einer Doxorubicin vermittelten Kardiomyopathie (Kunisada et al., 2000).

Eine erste Analyse der generierten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse ergab keine phänotypischen Besonderheiten. Die Analyse der STAT-4 Expression in verschiedenen Organsystemen auf mRNA- und Proteinebene zeigte, daß transgenes STAT-4 nur in der Niere exprimiert wurde (**Abb. 5**). Die vergleichende histologische Analyse der Nieren von Wildtypmäusen und transgenen Tieren ergab jedoch keine histologischen Abnormitäten. Für die Expression des Wildtyp STAT-4 Gens in Milz und Testes ergaben sich in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Tieren keine Unterschiede zu den Kontrollen. Es bestätigte sich somit auch für die hier verwendete Mäuseinzuchtlinie FVB/N der bereits publizierte Befund, daß STAT-4 vor allem in T-Lymphozyten und myeloiden Zellen aus der Milz und in Testes nachgewiesen werden kann und nicht ubiquitär exprimiert wird, wie z.B. STAT-1 und STAT-2 (Zhong et al., 1994; Yamamoto et al., 1994). Die STAT-4 Expression in Testes war auffällig stark. Herrada et al. (1997) konnten STAT-4 in kondensierten perinuklearen Theka männlicher Spermatozoen lokalisieren und vermuteten einen Einfluß von STAT-4 auf die paternale Musterbildung in Zygoten. Eine genaue Analyse der Rolle von STAT-4 in Testes steht aber noch aus.

#### 4.1.1 Induzierbare Aktivierung der STAT-4 Expression in FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen

Der humane CMV-Promotor der STAT-4 Expressionskassette in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen war nur in der Niere transkriptionell aktiv. Das Studium der Literatur ergibt allerdings ein differenzielles Bild der Aktivität des humanen CMV-Promotors in transgenen Mäusen. Übereinstimmend wird in mehreren Studien mit reportertransgenen Mäusen beschrieben, daß in vielen Geweben *in vivo* keine konstitutive Aktivität vorhanden war (Mikkelsen et al., 1992; Baskar et al., 1996; Loser et al., 1998). Eine konstitutive Expression in wichtigen Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten und myeloiden Zellen wurde bisher nicht beschrieben. Interessanterweise wurde festgestellt, daß ein ‚stummer‘ CMV-Promotor in Hepatozyten über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mit Hilfe von LPS reaktiviert werden konnte (Loser et al., 1998). Um über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Expression der STAT-4 Kasette in Immunzellen, vor allem in T-Lymphozyten, der vermutlich wichtigsten Zielstruktur der immunregulatorischen Wirkung von IL-12, zu induzieren, wurden

die FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse mit DNP-KLH/CFA immunisiert. Wie die Analyse der STAT-4 Expression in den immunisierten Mäusen ergab, führte diese Behandlung zur Aktivierung von Transkription und Translation des transgenen STAT-4 in Milz und Dickdarm (**Abb. 6**). Im folgenden konnte gezeigt werden, daß es im Dickdarm gerade CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten waren, die das STAT-4 Transgen in verstärktem Ausmaß exprimierten (**Abb. 10**). Dagegen konnte in anderen Zelltypen z.B. Epithel- und Muskelzellen im Darm keine Expression von STAT-4 nachgewiesen werden. Die Analyse der immunisierten Wildtyp Mäusen zeigte, daß die Behandlung mit DNP-KLH/CFA keinen Einfluß auf die Expression des endogenen STAT-4 Gens hatte. Über die Steuerung der Transkription des STAT-4 Gens ist sehr wenig bekannt und die Analyse und Sequenz des Promotors bisher nicht beschrieben. Während die STAT-4 Expression in NK Zellen durch IL-2 stimuliert wird (Wang et al., 2000), existieren keine Daten über die Regulation von STAT-4 in T-Lymphozyten. Das generierte induzierbare Mausmodell wurde daher nachfolgend verwendet, um den Einfluß einer gezielt deregulierten STAT-4 Expression auf das Immunsystem des Darms zu analysieren.

#### 4.1.2 Chronische Kolitis in immunisierten FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen

Die FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse zeigten überraschenderweise schon einige Tage nach der Immunisierung und Überexpression von STAT-4 erste Charakteristika krankhafter Veränderungen im Darm wie Gewichtsreduktion und blutige Diarrhoe. Die histologische Analyse ergab gravierende entzündliche Erscheinungen exklusiv im Dickdarm, während in anderen Organen keine histopathologischen Auffälligkeiten beobachtet werden konnten (**Abb. 7, 8 und 9**). Die transmurale Enterokolitis war gekennzeichnet durch eine starke Verdickung der Kolonwand und massive Infiltrationen mit mononukleären Zellen. Der histopathologische Vergleich mit CED beim Menschen ergab in Teilaspekten Gemeinsamkeiten mit Morbus Crohn des Menschen, wo entzündliche Manifestationen anders als bei Colitis ulcerosa auch außerhalb der Tela mucosa lokalisiert sind. Diese Entzündungserscheinungen im Darm korrelierten eng mit der induzierbaren Expression und nukleären Lokalisation von STAT-4 in T-Lymphozyten des Dickdarms (**Abb. 10**). Diese Ergebnisse sind daher ein weiterer wichtiger Nachweis der pathophysiologische Rolle des IL-12/STAT-4 Signaltransduktionswegs im Rahmen chronischer Darmentzündungen und zeigen, daß die Aktivierung dieser Kaskade ausreicht, das immunologische Gleichgewicht im Darm zu zerstören.

Für den Mechanismus der STAT-4 Aktivierung in den T-Lymphozyten des Darms können mehrere Möglichkeiten diskutiert werden. Eine ektopische Überexpression von STAT-4 in COS7 Zellen *in vitro* ist nicht mit einer Tyrosinphosphorylierung und Dimerisierung verbunden. Wird aber gleichzeitig auch JAK2 überexprimiert, erfolgt die Aktivierung von STAT-4 auch in diesen Zellen, die keinen IL-12 Rezeptor exprimieren (Zhong et al., 1994). Eine *in*

*in vitro* Analyse dieser Frage in primären T-Lymphozyten wird dadurch erschwert, daß diese außer mit Retroviren nur sehr ineffizient transfiziert werden können (Riviere et al., 2000). Die T-Lymphozyten der Lamina Propria befinden sich als Resultat der fortwährenden Anwesenheit potentiell pathogener Antigene im Darmlumen in einem chronisch aktivierten Zustand, der unter physiologischen Bedingungen aktiv und antigen-spezifisch supprimiert werden kann (siehe Einleitung). Offenbar wird vermehrt exprimiertes transgenes STAT-4 Protein in diesen Zellen schnell aktiviert. Im Darm der FVB/N Wildtyp Mäuse konnten geringe Mengen an konstitutiv exprimiertem IL-12 detektiert werden (**Abb. 10**). Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mit IL-12 p40 Promotor/Reporter gen transgenen Mäusen haben ergeben, daß der IL-12 p40 Promotor im Darm im Gegensatz zu anderen Organen konstitutiv aktiv war (Becker et al., 2001). Dieses konstitutiv exprimierte IL-12 könnte durch Aktivierung des transgen überexprimierten STAT-4 im Darm eine proinflammatorische  $T_H1$  Immunantwort initiiert haben. Da im entzündeten Darm der FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäuse aber signifikant höhere Level an IL-12 existierten, wäre es vorstellbar, daß eine initiale Aktivierung von STAT-4 wiederum zur verstärkten Synthese von IL-12 durch Makrophagen führte.

Desweiteren ist von einem Einfluß der immunstimulierenden Behandlung der Mäuse mit DNP-KLH/CFA auf die Aktivierung von STAT-4 auszugehen. In jüngsten Studien wurde deutlich, daß die mycobakterielle Komponente des CFA Adjuvans möglicherweise die Entwicklung zellulärer ( $T_H1$ ) Immunantworten über die Hochregulation der IL-12 $\beta$ 2 Kette fördert (Galbiati et al., 2000). Diese Beobachtung wurde durch die Ergebnisse der ELISA-Experimente mit stimulierten Milzzellen aus DNP-KLH/CFA behandelten FVB/ $N^{wt}$  - und FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäusen bestätigt, die in geringerem Ausmaß das  $T_H2$  Zytokins IL-4 produzierten als die PBS Kontrollen (**Abb. 11**). Die spezifische RT-PCR für die  $\beta$ 2 Kette zeigte dagegen, daß die immunisierten Wildtyp Mäuse im Gegensatz zu den transgenen Tieren keine signifikante Hochregulation zeigten. Diese Ergebnisse müssen allerdings noch durch Proteindaten bestätigt werden, wenn geeignete Antikörper zur Verfügung stehen.

IL-4 hemmt die Expression der IL-12 $\beta$ 2 Kette (Szabo et al., 1997). Dementsprechend entwickelten mit ALUM immunisierte FVB/ $N^{S-4tg}$  Mäuse nur wesentlich mildere Kolitiden, denn Immunisierungen mit ALUM sind zumeist mit der Induktion von  $T_H2$  Antworten verbunden (Brewer et al., 1999) und werden im Mausmodell z.B. für die Etablierung von allergischem Asthma verwendet (Kung et al., 1994).

In einem anderen experimentellen Ansatz mit STAT-4 ‚knockout‘ Mäusen konnten andere Arbeitsgruppen weitere Hinweise für die wichtige Rolle von STAT-4 im Rahmen intestinaler Entzündungen ermitteln. In Zelltransfermodellen zeigte sich, daß STAT-4 defiziente Knochenmarkszellen bzw. T-Lymphozyten in adoptiv transferierten Mäusen keine Kolitis induzieren konnten (Simpson et al., 1998), oder zumindest mit verzögerter Kinetik (Claesson et al., 1999).



### 4.1.3 Die zentrale Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für die Entstehung der Kolitis

Als eine der wesentlichen Ursachen für chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen werden heute Störungen der lokalen immunologischen Steuerungsmechanismen diskutiert. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und ihre löslichen Botenstoffe als zentrale Regulatoren der adaptiven Immunantworten sind daher interessante Zielstrukturen für die Erforschung der molekularen Ursachen und die Therapie bei CED. In der Lamina propria entzündeter Darmabschnitte konnten in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen erhöhte Frequenzen STAT-4 überexprimierender, aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachgewiesen werden (**Abb. 10**). Die Analyse der Zytokinexpression zeigte, daß diese wie auch polyklonal stimulierte T-Lymphozyten aus der Milz vermehrt die proinflammatorischen T<sub>H</sub>1 Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  produzierten und sezernierten. Mit der Doppelfärbung konnten STAT-4 überexprimierende T-Lymphozyten direkt als Produzenten dieser Zytokine identifiziert werden. Das läßt vermuten, daß proinflammatorische Zytokine maßgeblich an der Entstehung der Kolitis in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen beteiligt waren. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  werden auch im Darm von Patienten mit Morbus Crohn verstärkt produziert und gelten als wichtigste Mediatoren der intestinalen Entzündung (Fais et al., 1991; Lanfranchi et al., 1992; Parronchi et al., 1997). TNF- $\alpha$  wird bei CED von T-Lymphozyten, Mastzellen und insbesondere durch aktivierte Makrophagen produziert. Modifizierte, monoklonale Antikörper gegen TNF- $\alpha$  (Remicade, Infliximab) wurden inzwischen erfolgreich in klinischen Studien bei Patienten mit steroidrefraktärem Morbus Crohn angewendet (Targan et al., 1997). In weiteren anti-TNF- $\alpha$  Strategien in der klinischen Erprobungsphase werden Etanercept, ein Fusionsprotein aus dem F<sub>c</sub> Anteil von IgG1 und der extrazellulären Domäne des TNF Rezeptors p75 (Sandborn et al., 1999) und der TNF Syntheseinhibitor Thalidomid untersucht (Fishman et al., 2000). IFN- $\gamma$  ist ein wichtiger Aktivierungs- und Differenzierungsfaktor für Zellen myeloider Herkunft. In Makrophagen wird durch IFN- $\gamma$  die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren und die Hochregulation von MHC Klasse II und Fc $\gamma$ RI Rezeptoren induziert. Man nimmt daher an, daß IFN- $\gamma$  über die Aktivierung intestinaler Makrophagen maßgeblich zur chronischen Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei Morbus Crohn beiträgt.

Die molekularen Prozesse, die zur IL-12 vermittelten IFN- $\gamma$  Produktion in T-Lymphozyten führen, werden noch nicht vollständig verstanden. Es gibt *in vitro* Hinweise darauf, daß STAT-4 spezifisch an regulatorische Sequenzen des humanen IFN- $\gamma$  Promotors binden kann (Xu et al., 1996; Barbulescu et al., 1998). Die in den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen beobachtete direkte Korrelation der STAT-4 Überexpression und Aktivierung mit der massiven Produktion von IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten des entzündeten Darms (**Abb. 10**) ist ein weiterer Hinweis für einen direkten Einfluß von STAT-4 auf die IFN- $\gamma$  Expression in diesen Zellen. In einer neueren Studie zur Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion in T-Lymphozyten wurde deutlich, daß STAT-4 direkt oder indirekt an der Hochregulation des IL-18 Rezeptors beteiligt

ist (Lawless et al., 2000). Da IL-18 zusammen mit IL-12 die Synthese von IFN- $\gamma$  stimulieren kann, ist somit ein weiterer indirekter Mechanismus der STAT-4 abhängigen Expression von IFN- $\gamma$  gegeben. Im entzündeten Darm der transgenen FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse wurde auch vermehrt IL-18 exprimiert (**Abb. 10**), das auch in der entzündeten Mukosa von Crohn Patienten signifikant hochreguliert war (Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999). Im Dick- und Dünndarm wird IL-18, das synergistisch mit IL-12 T<sub>H</sub>1 Immunantworten regulieren kann, vor allem von aktivierten Makrophagen und Epithelzellen produziert. Interessanterweise wird IL-18 auch mit der Hochregulation der IL-12R $\beta$ 2 Kette in Zusammenhang gebracht (Chang et al., 2000).

Der adoptive Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> Zellen aus IFN- $\gamma$  defizienten Mäusen in C.B-17 SCID Mäuse führte zu einer ähnlichen intestinalen Pathologie wie der Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> Wildtyp Zellen (Simpson et al., 1998). Desweiteren entwickelten IFN- $\gamma$  Rezeptor defiziente Mäuse eine T<sub>H</sub>1 dominierte experimentelle Kolitis (Camoglio et al., 2000). Obwohl weitgehend gesichert ist, daß die Induktion der IFN- $\gamma$  Synthese durch IL-12/STAT-4 ein wichtiger pathogenetischer Faktor für die Entstehung von CED ist, demonstrieren diese Studien, daß dieser Signaltransduktionsweg vermutlich weitere IFN- $\gamma$  unabhängige Wege steuert, die die T-Zell medierte Entstehung intestinaler Entzündungsreaktionen begünstigen. Polarisierte T<sub>H</sub>2 Zellen exprimieren nur minimale Mengen der IL-12R $\beta$ 2 Kette. Neueste Studien haben Hinweise ergeben, daß IL-12 selbst in diesen Zellen seinen hochaffinen Rezeptor hochreguliert und die Differenzierung zu einem T<sub>H</sub>0/T<sub>H</sub>1 Phänotyp induziert. Die Änderung des T Helferzellphänotyps war hierbei gekennzeichnet durch verminderte Level des T<sub>H</sub>2 spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 und erhöhte Expression des T<sub>H</sub>1 assoziierten Transkriptionsfaktors T-bet (Smits et al., 2001). Für die induktive Expression von T-bet in naiven T-Lymphozyten sind TCR-Signale und die Aktivierung von STAT-4 erforderlich, während STAT-6 für die GATA-3 Expression notwendig ist (Grogan et al., 2001). Die molekularen Vorgänge dieser elementaren STAT- abhängigen Prozesse in T-Lymphozyten, die zur Differenzierung in T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Subpopulationen führen, werden noch unvollständig verstanden. Mit den FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen steht ein Mausmodell zur Verfügung, mit dem die Regulation der Polarisierung von Immunantworten *in vivo* weiter untersucht werden kann.

#### 4.1.4 Störung der Toleranz gegenüber Antigenen der intestinalen Mikroflora im entzündeten Darm

Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben zu der Hypothese geführt, daß den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen pathogenetisch eine Fehlregulation der Immunantwort gegenüber Antigenen der normalen intestinalen Mikroflora zugrundeliegt. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß sich Morbus Crohn häufig in Darmbereichen mit hoher



Bakteriendichte (terminales Ileum, Kolon) manifestiert. Einige Arbeiten haben eine infektiöse Genese von CED z.B. durch Viren oder Mycobakterien postuliert (Hubbard et al., 1999). Bisher konnten jedoch keine schlüssigen Nachweise für diese Theorie erbracht werden. Dagegen konnte bei Patienten mit CED gezeigt werden, daß die Frequenz von T-Lymphozyten mit Reaktivitäten für residente Bakterienspezies in entzündeter Darmmukosa erhöht war (Duchmann et al., 1995). Darüber hinaus führte in einigen diesbezüglich untersuchten Tiermodellen (u.a. IL-2<sup>-/-</sup>, IL-10<sup>-/-</sup>, HLA-B27 transgene Ratten, CD45RB<sup>High</sup> Transfer Modell) die Behandlung mit Antibiotika und insbesondere die Zucht und Haltung unter keimfreien Bedingungen verglichen mit konventionell gehaltenen Tieren zu einer signifikant verminderten intestinalen Pathologie (Schultz et al., 1999; Sellon et al., 1998; Rath et al., 1999; Aranda et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Bestandteile/Epitope bestimmter Bakterienstämme wie z.B. *Bacteroides spec.* möglicherweise ein besonderes proinflammatorisches Potential besitzen, während z.B. *Lactobacillus* Arten zur Probiose verwendet werden könnten (Rath et al., 1996, Schultz et al., 2000). Um zu untersuchen, inwieweit im entzündeten Darm der FVB/N Mäuse immunologische Reaktionen gegen die autologe Flora existieren, wurde ein System etabliert, in dem T-Lymphozyten mit Bestandteilen der bakteriellen Mikroflora auf Antigen präsentierenden Zellen gepulst werden. Die Analyse der Zellen aus transgenen FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen zeigte, daß in diesen Mäusen T-Lymphozyten existierten, die nach Kontakt mit Antigenen der autologen Flora proliferierten. Diese reaktiven Zellen produzierten ferner IFN- $\gamma$  und konnten somit dem T<sub>H</sub>1 Phänotyp zugeordnet werden (Abb. 12). Dies impliziert gestörte Toleranzmechanismen im entzündeten Darm dieser Mäuse und läßt vermuten, daß die Aktivierung dieser Zellen durch die permanente Präsenz der intestinalen Bakterien als antigene Stimuli wesentlich zur Genese, Perpetuierung und Chronizität der Kolitis in diesen Mäusen beiträgt. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Duchmann et al., (1996) veröffentlicht, die im TNBS Modell der Maus T<sub>H</sub>1 dominierte, pathologische Reaktivitäten gegen die autologe Darmflora beobachteten, die durch systemische Behandlung mit Antikörpern gegen IL-12 oder rekombinantem IL-10 inhibiert werden konnte.

Durch adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäusen, die mit autologen bakteriellen Antigenen auf APC gepulst wurden, konnte die chronische Kolitis in C.B-17 SCID Mäuse übertragen werden (**Abb. 13**). Dagegen entwickelten SCID Mäuse, die mit bakteriengepulsten Kontrollzellen aus FVB/N Wildtyp Zellen transferiert wurden, zum gleichen Untersuchungszeitpunkt keine intestinale Pathologie. Dieses Experiment demonstrierte direkt die wichtige Rolle bakterienreaktiver T-Lymphozyten für die intestinale Pathogenese im STAT-4 transgenen und SCID Tiermodell. Durch diese Ergebnisse wird das Postulat weiter unterstützt, das solche Zellen nicht nur vermehrt im Darm von Patienten mit CED vorkommen, sondern eine prädominante Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankungen spielen könnten.

## 4.2 Adenovirale Genexpression im Dickdarm

Die bisherigen therapeutischen Konzepte erlauben lediglich die symptomatische Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und sind häufig mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden. Die Identifizierung und das erweiterte Verständnis der molekularen und immunregulatorischen Schlüsselmechanismen, die die Pathogenese beeinflussen, in jüngster Zeit eröffnet allerdings neue Perspektiven für eine kausale Therapie dieser Erkrankungen.

Zu den neuartigen Strategien, die bereits über das tierexperimentelle Stadium hinausgehen, gehören momentan die anti-TNF- $\alpha$  Therapie mit inhibitorischen monoklonalen Antikörpern (Present et al, 1999), und rekombinanten TNFRp75/IgGFc Fusionsproteinen (Sandborn et al., 1999). Desweiteren werden Antisenseoligonukleotide gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Schreiber et al., 2001) und rekombinante, antiinflammatorische Zytokine (IL-10 : Bickston et al., 2000; IL-11 : Sands et al., 1999; IFN- $\alpha$  : Ruther et al., 1998) bei CED klinisch evaluiert.

Während viele Studien in den letzten Jahren den therapeutischen Gentransfer in Organe wie Leber, Lunge und Muskel untersucht haben, wurde der Gastrointestinaltrakt diesbezüglich bisher weniger gut untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher im Tiermodell die Perspektiven rekombinanter, replikationsdefekter, adenoviraler Partikel für die Gentherapie im Darm untersucht. Dazu wurden mit Ad-5lacZ und Ad-5-GFP-sIL-18 bzw. Ad-5-GFP-asIL-18 Reporteradenoviren generiert, die in transduzierten Zellen die Expression der leicht nachweisbaren Proteine  $\beta$ -Galaktosidase oder EGFP induzierten (**Abb. 14 und 15**). Die Herstellung von Ad-5lacZ erfolgte durch homologe Rekombination in 293 Zellen nach der von Bett et al. (1994) beschriebenen Methode, während die anderen Vektoren über eine neuartige Methode auf Basis der homologen Rekombination in BJ 5183 Bakterienzellen generiert wurden (He et al., 1998).

### 4.2.1 Adenovirus-medierte Transduktion des Kolons

Ein wichtiger Faktor für einen erfolgreichen Gentransfer mit replikationsdefekten Adenoviren oder anderen Vektorsystemen ist die Auswahl geeigneter Administrationswege. In der vorliegenden Arbeit konnte ein lokales, intrarektales Applikationssystem etabliert werden, das im Kolon wesentlich höhere Transduktionsraten generierte als systemische Applikationsformen, die vor allem zur Transgenexpression in Leber und Milz führten (**Abb. 20**). In einer anderen Arbeit wurde bereits untersucht, ob die Applikation rekombinanter Ad5 in das Duodenum von Ratten über eine orale Sonde zur Infektion intestinaler Zellen führte. Dabei wurden transgen positive Zellen vor allem im Jejunum und Ileum gefunden, während sich für das Kolon geringere Transduktionsraten ergaben (Cheng et al., 1997). Ein wiederholt in-

traperitoneal applizierter rekombinanter Ad5, der für eine IL-4 oder IL-10 Expressionskassette kodierte, war im TNBS-Kolitis Modell der Ratte therapeutisch wirksam. Das rekombinante IL-4/IL-10 wurde allerdings nicht im Gastrointestinaltrakt selbst produziert, sondern erreichte diesen in niedriger Konzentration über das Blutgefäßsystem (Hogaboam et al., 1997; Barbara et al., 2000). Da für die meisten Anwendungen aber die direkte Transduktion von Zellen im Darm notwendig ist oder hohe lokale und niedrige systemische Konzentrationen löslicher Faktoren angestrebt werden, bietet die lokale Administration eine Reihe von Vorteilen. Die gute Transduzierbarkeit intestinaler Gewebe durch rekombinante Adenoviren reflektiert die Tatsache, daß der Gastrointestinaltrakt bevorzugt auch von ‚natürlichen‘ Infektionen betroffen ist (Nishio et al., 1992). Dagegen zeigten andere Studien, daß der intraoperative Gentransfer in das terminale Ileum von Ratten mittels rekombinanten Retroviren vergleichsweise ineffizient war (Lau et al., 1995), was wahrscheinlich auch darauf zurückzuführen war, daß Retroviren aufgrund der sensiblen Lipidhülle nicht zu hohen Titern konzentriert werden können und ausschließlich mitotisch aktive Zellen transduzieren können.

## 4.2.2 Transduktion von Kolonepithelzellen

Das intestinale Epithelgewebe, das sich im wesentlichen aus resorptiven Enterozyten, muscusbildenden Becherzellen und M-Zellen zusammensetzt, hat multiple physiologische Funktionen. Die Enterozyten werden kontinuierlich durch Proliferation und Differenzierung pluripotenter Stammzellen regeneriert. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben deutlich gemacht, daß Epithelzellen nicht nur eine passive physikalische Barriere gegen potentiell pathogene Substanzen des Darmlumens sind, sondern aktiv zur Aufrechterhaltung der Homöostase des mukosalen Immunsystems beitragen (Hershberg et al., 2000). Epithelzellen besitzen *in vitro* die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und pro- und anti-entzündliche Zytokine zu sezernieren. Mittels eines transgenen Tiermodells konnten Hermiston et al. (1995) des weiteren nachweisen, daß transgene Mäuse, die eine aberrante Form von N-Cadherin in Enterozyten des Dünndarms exprimierten, schwere intestinale Entzündungserscheinungen entwickelten. Folglich scheint auch der interzelluläre Dialog von Epithelzellen mit z.B. T-Lymphozyten über Adhäsionsmoleküle für die Integrität des Darms bedeutsam zu sein. Intestinale Epithelzellen sind somit ein interessantes gentherapeutisches Zielobjekt für die Behandlung von CED. Durch die Transduktion von Enterozyten mit gezielt modifizierten- oder Wildtyp Enzymen könnten zudem Verdauungs- und Resorptionsstörungen beeinflußt werden. Ferner könnten sie als *in vivo* Produktionsstätte für Zytokine und andere Proteinfaktoren genutzt werden, die para- oder exokrin die Funktionen anderer Zellen beeinflussen.

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich, daß humane Kolonepithelzelllinien *in vitro* bereits mit Infektionsmultiplizitäten von 10 gut transduzierbar waren (**Abb. 16**). Diese Beobachtung konnte auch für Kolonepithelzellen der Maus *in vivo* bestätigt werden (**Abb. 22**). Die Zeitverlaufsexperimente zeigten jedoch einen rapiden Abfall der Reporterexpression

bereits 2-3 Tage nach der Virusadministration vermutlich als Resultat des epithelialen ‚turnover‘ seneszenten Zellen (**Abb. 21A**). Die Expression des Transgens blieb auch nach wiederholter Behandlung transient (**Abb. 21B**). Dies impliziert, daß der adenovirale Gentransfer in Kolonepithelzellen nur für eine zeitlich befristete Form der Therapie führen kann.

Eine längerfristige Expression des rekombinanten Proteins bedingt die Transduktion undifferenzierter Stammzellen in den Lieberkühn-Krypten. Die intraluminale Applikation der adenoviralen Partikel führt aber offenbar zu einer geringen Transduktion von Stammzellen, die im Kolon im Bereich der Kryptenbasis liegend (Loeffler et al., 1986), möglicherweise schlecht zugänglich sind. Inwieweit intestinale Stammzellen transduziert wurden, muß noch weiter untersucht werden, wird aber dadurch erschwert, daß bisher keine morphologischen oder molekularen Marker bekannt sind, die eine Unterscheidung von anderen Epithelzellen erlauben (Booth et al., 2000). Falls die intraluminale Applikation von Ad5 zur Transduktion von Stammzellen führt, so ist dennoch keine lange fortwährende Genexpression zu erwarten, da Adenoviren nur episomal persistieren. Der adenovirale Gentransfer kann aber auch eine stabile zelluläre Integration erlauben, indem die Information für die transgene cDNA zwischen retrovirale LTR Sequenzen kloniert wird (Zheng et al., 2000).

### 4.2.3 Transduktion von LPMC

Mononukleäre Zellen der Lamina Propria (u.a. T- und B-Lymphozyten, Makrophagen) sind ein wichtiger Bestandteil des mukosalen Immunsystems. Sie sind wesentlich an der Pathogenese bei CED beteiligt (siehe Einleitung) und daher eine attraktive Zielstruktur für den therapeutischen Gentransfer. Die Ergebnisse der Transduktionsanalyse mit den Reporteradenoviren zeigten, daß LPMC *in vitro* und *in vivo* nach intrarektaler Vektoradministration bei gleicher Infektionsmultiplizität bedeutend weniger permissiv waren als intestinale Epithelzellen. Verschiedene Studien existieren, die die Transduktion humaner primärer Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen aus peripherem Blut durch Ad5 untersucht haben. Die geringe Permissivität konnte dabei zumindest teilweise auf die unzureichende Oberflächenexpression von CAR und  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  Integrinen zurückgeführt werden (Horvath et al., 1988; Huang et al., 1997). Für diese Vermutung sprechen auch die Ergebnisse der ektopischen Expression von CAR *in vitro* oder in transgenen Mäusen, die zur verbesserten Transduktion von T-Lymphozyten führte (Leon et al., 1998; Wan et al., 2000).

Durch die Stimulation isolierter PBMC konnten die  $\alpha_v$ -Integrine hochreguliert und die Permissivität für Ad5 gesteigert werden (Huang et al., 1997). Ein weiterer Gegenstand der Untersuchungen war daher der Einfluß einer Zellaktivierung auf die adenovirale Transduktion von LPMC. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit Phorbol ester und Phytohaemagglutinin stimulierte LPMC wie auch primäre Zellen aus der Milz verstärkt transduziert wurden (**Abb. 17**). Dies könnte bedeuten, daß die Möglichkeit

besteht, aktivierte LPMC mittels Ad5 gezielt anzusteuern.

Die aktivierten LPMC waren zwar wesentlich permissiver für rekombinante Ad5 als unstimulierte Zellen, es besteht jedoch weiterhin Bedarf an Strategien, unstimulierte Zellen haematopoetischer Herkunft effizient zu transduzieren. In der Literatur wurden bereits verschiedene molekulare Ansätze beschrieben, den natürlichen Tropismus von C Subgruppen Adenoviren zu verändern, um gezielt ein differenziertes Spektrum von Zellen für die Infektion zugänglich zu machen. So wurden bispezifische Antikörper benutzt, um eine molekulare Brücke zwischen den Ad5 Fiberproteinen und spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen zu generieren (Wickham et al., 1996 und 1997; Miller et al., 1998; Israel et al., 2001). Ein konzeptionell anderer Ansatz zur Beeinflussung des Tropismus rekombinanter Ad5 ist die genetische Modifikation der Fiberstruktur. Mit AdZ.F(pk7) wurde in der Arbeitsgruppe von Tom Wickham ein Reporteradenovirus entwickelt, der über eine Polylysinsequenz an zelluläre Heparansulfatstrukturen assoziieren und ein erweitertes Spektrum verschiedener Zelltypen effizient infizieren konnte (Wickham et al., 1997). Dieser Virus konnte frisch isolierte LPMC und angereicherte primäre T-Lymphozyten aus der Milz 10 bzw. 20 fach effizienter transduzieren als ein Reportervirus mit Wildtypfiberstruktur (**Abb. 18**). Die Verwendung rekombinanter Ad5 mit gezielt abgewandelter Fiberstruktur, könnte demzufolge eine wichtige Bedeutung für den Gentransfer in LPMC haben. Für intestinale Epithelzellen ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede. Dies deutet darauf hin, daß die CAR Rezeptoren und  $\alpha_v$  Integrine auf diesen Zellen ausreichend exprimiert werden und die Verwendung von Ad.Z.F(pk7) zumindest *in vitro* für Epithelzellen keine Vorteile bietet.

#### 4.2.4 Transduktion von entzündetem Gewebe

Bei CED kommt es zu der chronischen Aktivierung von infiltrierenden Entzündungszellen. Die experimentellen Daten aus den *in vitro* Studien haben deutlich gemacht, daß aktivierte LPMC permissiver für Ad5 waren als unstimulierte Zellen. Um daher zu ergründen, inwieweit sich im entzündeten Darm veränderte, adenovirale Transduktionsraten ergeben, wurden TNBS-Kolitis Mäuse intrarektal mit Reporteradenovirus behandelt. Der Vergleich zum Normaldarm ergab eine signifikant erhöhte Reporterexpression im entzündeten Darm (**Abb. 22**). Insbesondere die erhöhte Transduktion von Zellen im Bereich der Lamina Propria erscheint interessant. Die normale Mukosastruktur und Integrität der epithelialen Barriere ist in stark betroffenen Darmbereichen weitgehend zerstört (Podolsky, 1991). Neben der aktivierungsabhängigen Hochregulation der Adenovirusrezeptoren kann als mögliche Ursache der stärkeren Transduktion subepithelialer Areale daher auch deren verbesserte räumliche Zugänglichkeit diskutiert werden. Die lokale, intrarektale Ad5 Administration scheint daher die Zielsteuerung der rekombinanten Genexpression in entzündete Darmareale zu erlauben. Bei zukünftigen Strategien zur Zielsteuerung der rekombinanten Genexpression innerhalb

der entzündeten Darmareale könnten zelltypspezifische Promotoren eine Rolle spielen. So konnte kürzlich gezeigt werden, daß mittels Ad5 rekombinantes IFN- $\alpha$  durch Verwendung des Hepatozyten-spezifischen Transthyretin Promotors spezifisch in der Leber exprimiert werden konnte (Auricchio et al., 2000). Für Lymphozyten und Makrophagen stehen zur Zeit allerdings noch keine geeigneten Promotoren zur Verfügung, da z.B. der makrophagenspezifische Lysozym M- und die T-Lymphozyten spezifischen CD2 und lck Promotoren größer als 7,5 kb sind und damit die Aufnahmekapazität E1/E3 defizienter Ad5 überschritten wird. Die Entwicklung adenoviraler Vektoren mit zusätzlichen Deletionen in E2, E4 bzw. L1-L5 und der korrespondierenden Zelllinien erlaubt größere Klonierungskapazitäten und könnte damit erweiterte experimentelle Gestaltungsmöglichkeiten eröffnen.

#### 4.2.5 Sicherheit der lokalen Administration

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß rund 55 % der erwachsenen Bevölkerung infolge ‚natürlicher‘ Infektionen neutralisierende Antikörper gegen Strukturkomponenten des Ad5 Virions besitzen. Zudem präexistieren in einigen Menschen adenovirusreaktive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Chirmule et al., 1999). In solchen Patienten besteht eine starke immunologische Barriere insbesondere gegen wiederholte Dosen rekombinanter Ad5. Replikationsdefekte Ad5 der ersten Generation beinhalten zusätzlich zur potentiell therapeutischen Geninformation weitere Leseraster für virale Gene, die in transduzierten Zellen (auch in Abwesenheit von E1) offenbar in geringem Ausmaß exprimiert und auf MHC Klasse I präsentiert werden. Dies kann in der Zerstörung infizierter Zellen durch spezifische CTL Antworten und dem Verlust der Expression des Transgens resultieren (Yang et al., 1994). In Mäusen wurde nach systemischer Behandlung mit hohen Dosen rekombinanter Ad5 die Entwicklung von Leberdystrophien und Hepatitis beschrieben (Christ et al., 2000). Durch unsachgemäße Behandlung eines Patienten mit rekombinanten Ad5 ist es in einer Phase I Studie zur Korrektur der erblichen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz zum Tod des Patienten durch akutes Organversagen gekommen. Werden adenovirale Partikel dagegen bei Patienten lokal in Tumore oder unter die Haut appliziert, wurden keine gravierenden systemischen Seiteneffekte beobachtet (Swisher et al., 1999; Harvey et al., 1999).

Um zu ermitteln, ob die intrarektale Administration von Ad5 mit systemischen Seiteneffekten verbunden war, wurden Organpräparate infizierter Mäuse histologisch analysiert. Es wurden in keinem der untersuchten Organe pathologische Befunde festgestellt (**Abb. 23**). Zudem ergaben sich auch bei der Untersuchung klinischer Parameter im Blutserum (z.B. Transaminasen) keine Hinweise auf Schädigungen der Leber. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Beobachtung, daß die intraluminale Instillation der Ad5 Partikel zu keiner hohen Reporterexpression außerhalb des Darms führte. Demzufolge könnte die lokale Behandlung mit rekombinanten Ad5 eine relativ sichere Methode zur therapeutischen Genexpression im



Kolon sein. Diese Vermutung wird darüber hinaus auch durch die Analyse der Mäuse unterstützt, die durch Cyclosporin A Behandlung immunsupprimiert wurden. Diese zeigten nach intrarektaler Behandlung mit Ad5 einen vergleichbaren Zeitverlauf der Reporterexpression wie immunkompetente Mäuse (**Abb. 21**). Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die schnelle Abnahme der adenovirusvermittelten Transduktion von Darmzellen auf das epitheliale ‚turnover‘ und nicht auf eine virusspezifische CTL-Antwort gegen transgen-positive Zellen zurückzuführen war. Interessanterweise erlaubte die lokale Applikationsmethode auch eine wiederholte Administration (**Abb. 21 B**), was nach systemischer Administration in der Leber zu akuten Entzündungserscheinungen führen kann (Benihoud et al., 1998).

Zusammenfassend lassen die experimentellen Daten somit vermuten, daß die intrarektale Administration mit geringen systemischen Immunreaktionen gegen Strukturkomponenten der adenoviralen Partikel verbunden ist. Weitere Langzeitstudien müssen klären, inwieweit die behandelten Mäuse dennoch mukosale Immunantworten entwickeln, die z.B. eine Readministration verhindern könnten. Dabei erscheint es besonders wichtig zu analysieren, ob Ad-5 reaktive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gebildet werden, die an der humoralen und zellulären Immunantwort gegen Adenoviren wesentlich beteiligt sind (Ye et al., 2000)

#### 4.2.6 Modulation der Expression von IL-18 im entzündeten Darm

Die Expression revers komplementärer (‚antisense‘) RNA ist in Pro- und Eukaryonten ein natürlich vorkommender Mechanismus zur selektiven Regulation von Transkription/ Translation korrespondierender Gene. Die transiente oder stabile Expression von ‚antisense‘ RNA wird daher auch als therapeutische Option zur spezifischen Inhibition der Synthese krankheitsrelevanter Proteinfaktoren diskutiert (Gewirtz et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde basierend auf den methodischen Studien zur Transduktion des Dickdarms mit rekombinanten Ad5 untersucht, ob eine adenovirale ‚antisense‘ Strategie die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-18 unter *in vivo* Bedingungen vermindern kann, das im Zusammenspiel mit IL-12 die Entstehung und Perpetuierung gewebedestruierender T<sub>H</sub>1 Immunantworten begünstigen konnte. IL-18 war im entzündeten Darm der FVB/N<sup>S-4tg</sup> Mäuse (**Abb. 10**) hochreguliert. Vergleichbares wurde auch bei TNBS-Kolitis und in C.B-17 SCID Mäusen nach adoptivem Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>High</sup> T-Lymphozyten beobachtet (Camoglio et al., 2000; Kawachi et al., 2000). Zudem scheint reifes IL-18 und die enzymatisch aktive Form von Caspase-1 im Serum und in entzündeten Läsionen bei Morbus Crohn stark hochreguliert zu sein (Pizarro et al., 1999; Monteleone et al., 1999; Kanai et al., 2000). Die physiologische Funktion von IL-18 in der normalen Mukosa ist noch unklar, könnte aber im Bereich der Immunität gegen gastrointestinale Tumore liegen (Pages et al., 2000).

Zunächst wurde *in vitro* mit DLD-1 Zellen untersucht, ob durch die Infektion mit Ad-GFP-



asIL-18 die IL-18 Expression beeinflusst werden konnte. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der IL-18 Proteinmenge innerhalb der infizierten Zellen und im Kulturüberstand (**Abb. 19**). Durch die wiederholte intrarektale Administration in C.B-17 SCID Mäuse mit experimenteller Kolitis, konnte die IL-18 Menge im Darm signifikant reduziert werden (**Abb. 24**).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten zum ersten Mal, daß es möglich ist, die Expression eines im Darm synthetisierten Gens *in vivo* durch ‚antisense‘ RNA zu vermindern. Die intraluminale Administration der adenoviralen Partikel in den Mäusedarm führt demzufolge zu Transduktionsraten, die ausreichen, die Expression eines vergleichsweise stark transkribierten Gens zu reprimieren.

In den dargestellten Experimenten wurden jeweils  $1 \times 10^{10}$  pfu bzw. ffu rekombinanter Ad5 appliziert. Da aber die Möglichkeit besteht, mittels geeigneter Dichtegradientenzentrifugation Titer von über  $10^{13}$  zu erzeugen (Bett et al., 1994), kann davon ausgegangen werden, daß prinzipiell einere weitere Repression der Expression eines Zielgens erreicht werden kann.

Die Überexpression rekombinanter, dominant-negativer Varianten eines Proteins stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, die pathologische Wirkungsweise von Proteinfaktoren wie z.B. Signaltransduktions- oder Transkriptionsfaktoren zu inhibieren (Shamah et al., 1995). Die Expression solcher Mutanten im Darm für biologische Studien oder die Gentherapie könnte eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit für rekombinante Ad5 sein.

Als weitere ‚antisense‘ Strategie zur Blockade der Translation von Darmproteinen wurde die Verwendung von synthetischen Antisense-Phosphorothionat Oligonukleotiden beschrieben, die jedoch nur eine kurze Halbwertszeit besitzen (Neurath et al., 1996; Gewirtz et al., 1998). Vergleichende Studien müssen zeigen, welche Strategie für einen gegebenen therapeutischen Ansatz geeigneter ist.

Eine erste endoskopische (**Abb. 25**) und histologische Analyse (Daten nicht gezeigt) des Dickdarms der Adenovirus-behandelten behandelten SCID Mäuse ergab in Ad-GFP-asIL-18 behandelten Tieren einen deutlichen Rückgang der entzündlichen Veränderungen, während in den Kontrollvirus behandelten Tieren keine klinischen Verbesserungen beobachtet werden konnten. Dies unterstützt die Hypothese, daß deregulierte  $T_H 1$  Antworten ursächlich an der Pathogenese bei CED beteiligt sein könnten und identifiziert IL-18 als potentielle Zielstruktur für die Therapie dieser Erkrankungen.

#### 4.2.7 Perspektiven replikationsdefekter Ad-5 für den therapeutischen Gentransfer in den Dickdarm

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde analysiert, inwieweit replikationsdefekte Adenoviren in der Lage sind, die Expression rekombinanter genetischer Information im Dickdarm zu gewährleisten. Die Ergebnisse zeigten, daß im Mausmodell die Transduktion von

Darmzellen durch lokale Administration der viralen Partikel möglich ist. Die Ergebnisse aus präklinischen, tierexperimentellen Studien mit Nagern können in der Regel nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Viele Untersuchungen der vergangenen Jahre haben allerdings gezeigt, daß bezüglich adenoviraler Tropismen viele Gemeinsamkeiten zwischen Maus und Mensch bestehen. Zudem handelte es sich bei den hier verwendeten Ad5 um den humanen Serotyp, der als permissiv für intestinale Gewebe beschrieben wurde. Es sollten daher im humanen Darm noch höhere oder zumindest vergleichbare Transduktionsraten zu erwarten sein. Aufgrund der Tatsache, daß vornehmlich die kurzlebigen Epithelzellen transduziert werden, sind Wildtyp Ad5 besonders für die transiente Genexpression geeignet. In diesem Zusammenhang erscheint die Möglichkeit interessant, über Ad5 exprimierte Proteine orale Toleranzmechanismen zu induzieren. Hierzu müssten aber die Effekte einer Transduktion von M-Zellen und Dendritischen Zellen detailliert untersucht werden. Die verstärkte Transduktion subepithelialer Bereiche in entzündeten Darmarealen eröffnet die Möglichkeit einer Zielsteuerung der therapeutischen Genexpression bei CED. Durch den Einsatz adenoviraler Partikel mit modifizierter Oberflächenstruktur oder zelltypspezifischen Promotoren ist vermutlich auch beim Menschen ein noch erweitertes *targeting* von distinkten Zellpopulationen möglich. Zur Verwendung spezieller Promotoren sind jedoch adenovirale Systeme notwendig, die erhöhte Klonierungskapazitäten erlauben. Diese Systeme mit zusätzlich deletierten viralen Leserastern sind auch aus Sicherheitsaspekten den adenoviralen Vektoren der ersten Generation vorzuziehen. In jüngster Zeit wurden daher adenovirale Vektoren entwickelt, in denen sämtliche viralen Leseraster deletiert wurden (Morrall et al., 1999). Diese Vektoren („gutless vectors“) können wesentlich größere Transgene aufnehmen und sind weniger immunogen.

Die vorläufigen Studien in dieser Arbeit lassen vermuten, daß die lokale intrarektale Behandlung nicht mit akuten systemischen Nebenwirkungen verbunden ist und daher relativ sicher ist. Da in klinischen Studien nach systemischer Administration von hohen Dosen Ad5 gravierende Nebenwirkungen aufgetreten sind, ist die weitere Untersuchung der Sicherheitsaspekte nach einem lokalen, intrarektalen Gentransfer besonders bedeutsam.

## 5 Zusammenfassung

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind in Schüben auftretende Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, die weltweit die häufigste Form chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) darstellen. Die Ätiopathogenese dieser Krankheiten ist noch unklar, es wird aber vermutet, daß eine fehlgesteuerte, zellvermittelte Immunantwort gegen Bestandteile der physiologischen Darmflora in genetisch prädisponierten Individuen wesentlich zur Entstehung und Perpetuierung der entzündlichen Erscheinungen beiträgt. Zur Aufklärung der molekularen Vorgänge, die zur Pathogenese dieser Krankheiten beitragen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert, in dem der Transkriptionsfaktor STAT-4 ektopisch überexprimiert wurde. STAT-4 ist als zentraler Mediator der biologischen Funktionen des immunregulatorischen Zytokins IL-12 ein wichtiger Bestandteil  $T_H1$  assoziierter Immunantworten. Die Immunisierung der STAT-4 transgenen Mäuse mit DNP-KLH/CFA resultierte in einer induktiven Überexpression von STAT-4 in Milz und Dickdarm, die auf RNA- und Proteinebene dokumentiert werden konnte. Die phänotypische und histologische Analyse dieser Mäuse machte deutlich, daß die verstärkte Produktion und Aktivierung von STAT-4 im Dickdarm mit der Entstehung schwerer, transmuraler Entzündungserscheinungen korrelierte. Diese histopathologischen Merkmale beinhalteten das Auftreten hyperplastischer Verdickungen der Kolonwand, die Zerstörung der Kryptenarchitektur und starke Infiltrationen mit mononukleären Zellen. Immunfluoreszenzmikroskopische Doppelfärbungen identifizierten  $CD4^+$  T-Lymphozyten der Lamina Propria als Hauptproduzenten des STAT-4 Transgens. Diese Zellen produzierten große Mengen der proinflammatorischen  $T_H1$  Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die auch in entzündlichen Läsionen beim Morbus Crohn verstärkt exprimiert werden. Ein vergleichbares Zytokinexpressionsprofil zeigten polyklonal stimulierte primäre T-Lymphozyten aus der Milz, die dagegen nur geringe Mengen des  $T_H2$  Zytokins IL-4 sezernierten. Außerdem konnte im entzündeten Darm der transgenen Mäuse eine im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant hochregulierte Expression von IL-12 und IL-18 beobachtet werden. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß eine unphysiologische Aktivierung der IL-12/STAT-4 Signaltransduktionskaskade offenbar ausreicht, im Dickdarm eine  $T_H1$  mediierte Gewebedestruktion auszulösen.

In weiteren Untersuchungen wurde die Rolle von Bestandteilen der intestinalen Mikroflora für die pathogenetischen Veränderungen im Darm der Mäuse mit STAT-4 Kolitis untersucht. In einem ersten Ansatz zeigte sich, daß  $CD4^+$  T-Lymphozyten aus den STAT-4 transgenen Mäusen reaktiv gegen bakterielle Antigene der autologen Flora waren und verstärkt IFN- $\gamma$  sezernierten. Diese T-Lymphozyten waren darüber hinaus in der Lage, in einem adoptiven Transfermodell in immundefiziente C.B-17 SCID Mäuse die Entwicklung einer chronischen Kolitis zu induzieren. Damit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen  $T_H1$  vermittelten immunologischen Reaktionen gegen die autologe Mikroflora und der Entstehung chronischer Kolitiden demonstriert werden.

Der gezielte Transfer rekombinanter, genetischer Information in den Gastrointestinaltrakt könnte für biologische Studien im Tiermodell und die somatische Gentherapie bei CED von großer Bedeutung sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher methodische Studien zu den Perspektiven rekombinanter, replikationsdefekter Adenoviren für den Gentransfer in den Dickdarm durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Reportergene lacZ und EGFP in adenovirale Vektoren kloniert und hochreine Viruspräparationen mit hohem Titer hergestellt. Die vergleichende Analyse verschiedener Applikationswege zeigte, daß die lokale, intraluminale Administration der adenoviralen Partikel in einer effizienten Transduktion von Zielzellen im Mäusedarm resultierte, während eine Reportergenexpression nach systemischer Behandlung hauptsächlich in Leber und Milz nachzuweisen war. Der intrarektale Applikationsweg erwies sich zudem als relativ sicher und war nicht mit einer systemischen Intoxikation verbunden. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu Transduktionskapazitäten verschiedener intestinaler Zell-/Gewebetypen ergaben hohe Infektionsraten für Zellen des Kolonepithels. Dagegen waren mononukleäre Zellen der Lamina Propria für die Infektion mit Adenoviren wenig permissiv. Aufgrund der hohen *turnover* Rate des intestinalen Epithels war die Reportergenexpression im Darm nur transient. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die histologischen und molekularen Veränderungen im Rahmen eines intestinalen Entzündungsprozesses zu einer gesteigerten adenoviralen Transduktion subepithelialer Areale führen kann.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Adenovirus vermittelte Expression von ‚antisense‘ RNA *in vivo* die Synthese endogener Darmproteine beeinflussen kann. Die adenovirale Überexpression der ‚antisense‘ RNA des proinflammatorischen Zytokins IL-18, das in entzündlichen Läsionen von Patienten mit aktivem Morbus Crohn stark vermehrt gebildet wird, konnte im CD4CD45RB<sup>High</sup> Kolitis Modell in SCID Mäusen die IL-18 Menge in der Kolonmukosa reduzieren. Mit diesem Versuchsansatz konnte eine etablierte Kolitis in den SCID-Mäusen therapiert werden. Dies unterstützt die Hypothese, daß deregulierte T<sub>H</sub>1 Antworten ursächlich an der Pathogenese bei CED beteiligt sein könnten und identifiziert IL-18 als potentielle Zielstruktur für die Therapie dieser Erkrankungen.

# Literaturverzeichnis

**Andersson, M., S. Paabo, T. Nilsson and P.A. Peterson** 1985. Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell*. **43**:215-22.

**Aranda, R., B.C. Sydora, P.L. McAllister, S.W. Binder, H.Y. Yang, S.R. Targan and M. Kronenberg** 1997. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients. *J Immunol*. **158**:3464-73.

**Arstila, T., T.P. Arstila, S. Calbo, F. Selz, M. Malassis-Seris, P. Vassalli, P. Kourilsky and D. Guy-Grand** 2000. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propia and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med*. **191**:823-34.

**Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, S. Rose-John and M.F. Neurath** 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. **6**:583-8.

**Auricchio, L., P. Delmastro, V. Salucci, O.G. Paz, P. Rovere, G. Ciliberto, N. La Monica and F. Palombo** 2000. Liver-specific alpha 2 interferon gene expression results in protection from induced hepatitis. *J Virol*. **74**:4816-23.

**Barbara, G., Z. Xing, C.M. Hogaboam, J. Gauldie and S.M. Collins** 2000. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut*. **46**:344-9.

**Barbulescu, K., C. Becker, J.F. Schlaak, E. Schmitt, B.K. Meyer-zum and M.F. Neurath** 1998. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol*. **160**:3642-3647.

**Benihoud, K., I. Saggio, P. Opolon, B. Salone, F. Amiot, E. Connault, C. Chianale, F. Dautry, P. Yeh and M. Perricaudet** 1998. Efficient, repeated adenovirus-mediated gene transfer in mice lacking both tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha. *J Virol*. **72**:9514-25.

**Bett, A.J., W. Haddara, L. Prevec and F.L. Graham** 1994. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**:8802-6.

- Bett, A.J., L. Prevec and F.L. Graham** 1993. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol.* **67**:5911-21.
- Bickston, S.J. and F. Cominelli** 2000. Recombinant interleukin 10 for the treatment of active Crohn's disease: lessons in biologic therapy. *Gastroenterology.* **119**:1781-3.
- Booth, C. and C.S. Potten** 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest.* **105**:1493-9.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-54.
- Brewer, J.M., M. Conacher, C.A. Hunter, M. Mohrs, F. Brombacher and J. Alexander** 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol.* **163**:6448-54.
- Buchsacher, G.L., Jr. and F. Wong-Staal** 2000. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood.* **95**:2499-504.
- Burnett, R.M., M.G. Grutter and J.L. White** 1985. The structure of the adenovirus capsid. I. An envelope model of hexon at 6 Å resolution. *J Mol Biol.* **185**:105-23.
- Camoglio, L., A.A. te Velde, A. de Boer, F.J. ten Kate, M. Kopf and S.J. van Deventer** 2000. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol.* **30**:1486-95.
- Campbell, N., X.Y. Yio, L.P. So, Y. Li and L. Mayer** 1999. The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol Rev.* **172**:315-24.
- Cao, R., J. Farnebo, M. Kurimoto and Y. Cao** 1999. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *Faseb J.* **13**:2195-202.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* **263**:802-5.
- Chang, J.T., B.M. Segal, K. Nakanishi, H. Okamura and E.M. Shevach** 2000. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol.* **30**:1113-9.
- Cheng, D.Y., J.K. Kolls, D. Lei and R.A. Noel** 1997. In vivo and in vitro gene transfer and expression in rat intestinal epithelial cells by E1-deleted adenoviral vector. *Hum Gene Ther.* **8**:755-64.



- Chirmule, N., K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian and J. Wilson** 1999. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* **6**:1574-83.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**:156-9.
- Christ, M., B. Louis, F. Stoeckel, A. Dieterle, L. Grave, D. Dreyer, J. Kintz, D. Ali Hadji, M. Lusky and M. Mehtali** 2000. Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther.* **11**:415-27.
- Chroboczek, J. and B. Jacrot** 1987. The sequence of adenovirus fiber: similarities and differences between serotypes 2 and 5. *Virology.* **161**:549-54.
- Cichon, G., H.H. Schmidt, T. Benhidjeb, P. Loser, S. Ziemer, R. Haas, N. Grewe, F. Schnieders, J. Heeren, M.P. Manns, P.M. Schlag and M. Strauss** 1999. Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anemia and erythroblastosis in rabbits. *J Gene Med.* **1**:360-71.
- Claesson, M.H., S. Bregenholt, K. Bonhagen, S. Thoma, P. Moller, M.J. Grusby, F. Leit-hauser, M.H. Nissen and J. Reimann** 1999. Colitis-inducing potency of CD4+ T cells in immunodeficient, adoptive hosts depends on their state of activation, IL-12 responsiveness, and CD45RB surface phenotype. *J.Immunol.* **162**:3702-3710.
- Colgan, S.P., R.M. Hershberg, G.T. Furuta and R.S. Blumberg** 1999. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:13938-43.
- Comoy, E.E., A. Capron and G. Thyphronitis** 1998. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. *Scand J Immunol.* **47**:444-52.
- Crystal, R.G.** 1992. Gene therapy strategies for pulmonary disease. *Am J Med.* **92**:44S-52S.
- D'Andrea, A., M. Rengaraju, N.M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S.H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg and et al.** 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* **176**:1387-98.
- Danthinne, X. and E. Werth** 2000. New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther.* **7**:80-7.

- Darnell, J.E., Jr.** 1997. STATs and gene regulation. *Science*. **277**:1630-5.
- Davidson, N.J., S.A. Hudak, R.E. Lesley, S. Menon, M.W. Leach and D.M. Rennick** 1998. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. *J.Immunol.* **161**:3143-3149.
- Dexter, D.L., E.N. Spremulli, Z. Fligiel, J.A. Barbosa, R. Vogel, A. VanVoorhees and P. Calabresi** 1981. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med.* **71**:949-56.
- Dokland, T.** 1999. Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell Mol Life Sci.* **56**:580-603.
- Duchmann, R., I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe and K.H. Meyer zum Buschenfelde** 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* **102**:448-55.
- Duchmann, R., E. Schmitt, P. Knolle, K.H. Meyer zum Buschenfelde and M. Neurath** 1996. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol.* **26**:934-8.
- Elsing, A. and H.G. Burgert** 1998. The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:10072-7.
- Fais, S., M.R. Capobianchi, F. Pallone, P. Di Marco, M. Boirivant, F. Dianzani and A. Torsoli** 1991. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. *Gut.* **32**:403-7.
- Fallaux, F.J., O. Kranenburg, S.J. Cramer, A. Houweling, H. Van Ormondt, R.C. Hoeben and A.J. Van Der Eb** 1996. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* **7**:215-22.
- Farrar, J.D., J.D. Smith, T.L. Murphy, S. Leung, G.R. Stark and K.M. Murphy** 2000. Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat Immunol.* **1**:65-9.
- Fishman, S.J., N.R. Feins, R.J. D'Amato and J. Folkman** 2000. Thalidomide for Crohn's disease. *Gastroenterology.* **119**:596.

- Fuss, I.J., M. Neurath, M. Boirivant, J.S. Klein, C. de la Motte, S.A. Strong, C. Fiocchi and W. Strober** 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.* **157**:1261-70.
- Galbiati, F., L. Rogge and L. Adorini** 2000. IL-12 receptor regulation in IL-12-deficient BALB/c and C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.* **30**:29-37.
- Galon, J., C. Sudarshan, S. Ito, D. Finbloom and J.J. O'Shea** 1999. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol.* **162**:7256-62.
- Gao, G.P., Y. Yang and J.M. Wilson** 1996. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver- directed gene therapy. *J Virol.* **70**:8934-43.
- Gewirtz, A.M., D.L. Sokol and M.Z. Ratajczak** 1998. Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood.* **92**:712-36.
- Gordon, J.W. and F.H. Ruddle** 1985. DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow--a review. *Gene.* **33**:121-36.
- Gottschalk, U. and S. Chan** 1998. Somatic gene therapy. Present situation and future perspective. *Arzneimittelforschung.* **48**:1111-20.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell and R. Nairn** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* **36**:59-74.
- Graham, F.L. and A.J. van der Eb** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **52**:456-67.
- Grogan, J.L., M. Mohrs, B. Harmon, D.A. Lacy, J.W. Sedat and R.M. Locksley** 2001. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity.* **14**:205-15.
- Gross, V., T. Andus, I. Caesar, M. Roth and J. Scholmerich** 1992. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology.* **102**:514-9.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, V.J. de and M.G. Roncarolo** 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* **389**:737-742.
- Gunzburg, W.H. and B. Salmons** 1995. Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today.* **1**:410-7.

- Habib, N.A., C.E. Sarraf, R.R. Mitry, R. Havlik, J. Nicholls, M. Kelly, C.C. Vernon, D. Gueret-Wardle, R. El-Masry, H. Salama, R. Ahmed, N. Michail, E. Edward and S.L. Jensen** 2001. E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors. *Hum Gene Ther.* **12**:219-26.
- Haj-Ahmad, Y. and F.L. Graham** 1986. Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *J Virol.* **57**:267-74.
- Harvey, B.G., S. Worgall, S. Ely, P.L. Leopold and R.G. Crystal** 1999. Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther.* **10**:2823-37.
- He, T.C., S. Zhou, L.T. da Costa, J. Yu, K.W. Kinzler and B. Vogelstein** 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:2509-14.
- Helgeland, L., J.T. Vaage, B. Rolstad, T.S. Halstensen, T. Midtvedt and P. Brandtzaeg** 1997. Regional phenotypic specialization of intraepithelial lymphocytes in the rat intestine does not depend on microbial colonization. *Scand J Immunol.* **46**:349-57.
- Hermiston, M.L. and J.I. Gordon** 1995. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science.* **270**:1203-7.
- Herrada, G. and D.J. Wolgemuth** 1997. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J Cell Sci.* **110**:1543-53.
- Hershberg, R.M. and L.F. Mayer** 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today.* **21**:123-8.
- Hoffman, R.** 1999. Progress in the development of systems for in vitro expansion of human hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol.* **6**:184-91.
- Hoffman, R.** 1999. Progress in the development of systems for in vitro expansion of human hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol.* **6**:184-91.
- Hogaboam, C.M., B.A. Vallance, A. Kumar, C.L. Addison, F.L. Graham, J. Gauldie and S.M. Collins** 1997. Therapeutic effects of interleukin-4 gene transfer in experimental inflammatory bowel disease. *J.Clin.Invest.* **100**:2766-2776.
- Horvath, J. and J.M. Weber** 1988. Nonpermissivity of human peripheral blood lymphocytes to adenovirus type 2 infection. *J Virol.* **62**:341-5.

- Huang, M.R., M. Olsson, A. Kallin, U. Pettersson and T.H. Totterman** 1997. Efficient adenovirus-mediated gene transduction of normal and leukemic hematopoietic cells. *Gene Ther.* **4**:1093-9.
- Hubbard, J. and C.M. Surawicz** 1999. Etiological role of mycobacterium in Crohn's disease: An assessment of the literature. *Dig Dis.* **17**:6-13.
- Ihle, J.N.** 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol.* **13**:211-7.
- Ihle, J.N. and I.M. Kerr** 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**:69-74.
- Ilan, Y., H. Saito, N.R. Thummala and N.R. Chowdhury** 1999. Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis.* **19**:49-59.
- Israel, B.F., R.J. Pickles, D.M. Segal, R.D. Gerard and S.C. Kenney** 2001. Enhancement of Adenovirus Vector Entry into CD70-Positive B-Cell Lines by Using a Bispecific CD70-Adenovirus Fiber Antibody. *J Virol.* **75**:5215-21.
- Jewell, D.P.** 1993. Ulcerative colitis, p. 1305-1327. *In* Sleisenger, and Fordtran (eds), *Gastrointestinal disease*. Saunders Company, Philadelphia.
- Jouanguy, E., R. Doffinger, S. Dupuis, A. Pallier, F. Altare and J.L. Casanova** 1999. IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol.* **11**:346-51.
- Kanai, T., M. Watanabe, A. Okazawa, K. Nakamaru, M. Okamoto, M. Naganuma, H. Ishii, M. Ikeda, M. Kurimoto and T. Hibi** 2000. Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology.* **119**:1514-23.
- Kaplan, M.H., Y.L. Sun, T. Hoey and M.J. Grusby** 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4- deficient mice. *Nature.* **382**:174-7.
- Kasamatsu, H. and A. Nakanishi** 1998. How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu Rev Microbiol.* **52**:627-86.
- Kawachi, S., Z. Morise, S.R. Jennings, E. Conner, A. Cockrell, F.S. Laroux, R.P. Chervenak, M. Wolcott, H. van der Heyde, L. Gray, L. Feng, D.N. Granger, R.A. Specian and M.B. Grisham** 2000. Cytokine and adhesion molecule expression in SCID mice reconstituted with CD4+ T cells. *Inflamm Bowel Dis.* **6**:171-80.
- Kelsall, B. and W. Strober** 1995. Host defenses at mucosal surfaces, p. 299-332. *In* E. A. Rich, B. Fleischer, L. B. Schwartz, Shearer, and W. Strober (eds), *Clinical Immunology*,

Principles and Practise. Mosby, St. Louis.

**Kerneis, S., A. Bogdanova, E. Colucci-Guyon, J.P. Kraehenbuhl and E. Pringault** 1996. Cytosolic distribution of villin in M cells from mouse Peyer's patches correlates with the absence of a brush border. *Gastroenterology*. **110**:515-21.

**Koedood, M., A. Fichtel, P. Meier and P.J. Mitchell** 1995. Human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early enhancer/promoter specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. *J Virol*. **69**:2194-207.

**Kornbluth, A., P. Salomon and D.B. Sacchar** 1993. Crohn's disease, p. 1270-1292. *In* Sleisenger, and Fordtran (eds), *Gastrointestinal disease*. Saunders Company, Philadelphia.

**Krebs, D.L. and D.J. Hilton** 2000. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci*. **113**:2813-9.

**Kung, T.T., H. Jones, G.K. Adams, 3rd, S.P. Umland, W. Kreutner, R.W. Egan, R.W. Chapman and A.S. Watnick** 1994. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. **105**:83-90.

**Kunisada, K., S. Negoro, E. Tone, M. Funamoto, T. Osugi, S. Yamada, M. Okabe, T. Kishimoto and K. Yamauchi-Takahara** 2000. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:315-9.

**Lachmann, R.H. and S. Efstathiou** 1999. Gene transfer with herpes simplex vectors. *Curr Opin Mol Ther*. **1**:622-32.

**Laky, K., L. Lefrancois, E.G. Lingenheld, H. Ishikawa, J.M. Lewis, S. Olson, K. Suzuki, R.E. Tigelaar and L. Puddington** 2000. Enterocyte expression of interleukin 7 induces development of gammadelta T cells and Peyer's patches. *J Exp Med*. **191**:1569-80.

**Lamont, A.G. and L. Adorini** 1996. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today*. **17**:214-7.

**Lanfranchi, G.A. and A. Tragnone** 1992. Serum and faecal tumour necrosis factor-alpha as marker of intestinal inflammation. *Lancet*. **339**:1053.

**Lau, C., H.E. Soriano, F.D. Ledley, M.J. Finegold, J.H. Wolfe, E.H. Birkenmeier and S.J. Henning** 1995. Retroviral gene transfer into the intestinal epithelium. *Hum Gene Ther*. **6**:1145-51.

**Lawless, V.A., S. Zhang, O.N. Ozes, H.A. Bruns, I. Oldham, T. Hoey, M.J. Grusby and M.H. Kaplan** 2000. Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling



pathways. *J Immunol.* **165**:6803-8.

**Leon, R.P., T. Hedlund, S.J. Meech, S. Li, J. Schaack, S.P. Hunger, R.C. Duke and J. DeGregori** 1998. Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:13159-64.

**Linß, H. and J. Fanghänel** 1999. *Histologie : Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie.* Walter de Gruyter, Berlin, New York.

**Liu, B., J. Liao, X. Rao, S.A. Kushner, C.D. Chung, D.D. Chang and K. Shuai** 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:10626-31.

**Loeffler, M., R. Stein, H.E. Wichmann, C.S. Potten, P. Kaur and S. Chwalinski** 1986. Intestinal cell proliferation. I. A comprehensive model of steady-state proliferation in the crypt. *Cell Tissue Kinet.* **19**:627-45.

**Loser, P., G.S. Jennings, M. Strauss and V. Sandig** 1998. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate- early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol.* **72**:180-90.

**MacDonald, T.T. and G. Monteleone** 2001. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol.* **22**:244-7.

**Mathias, P., T. Wickham, M. Moore and G. Nemerow** 1994. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* **68**:6811-4.

**McGrory, W.J., D.S. Bautista and F.L. Graham** 1988. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology.* **163**:614-7.

**McInnes, I.B., J.A. Gracie, B.P. Leung, X.Q. Wei and F.Y. Liew** 2000. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today.* **21**:312-5.

**Meran, J.G.** 1990. [First somatic human gene therapy in the USA approved]. *Diskussionsforum Med Ethik*:2 p. following 428.

**Mikkelsen, T.R., B. Chapman, N. Din, J. Ingerslev, P. Kristensen, K. Poulsen and J.P. Hjorth** 1992. Expression of a cytomegalovirus IE-1-factor VIII cDNA hybrid gene in transgenic mice. *Transgenic Res.* **1**:164-9.

**Miller, C.R., D.J. Buchsbaum, P.N. Reynolds, J.T. Douglas, G.Y. Gillespie, M.S. Mayo, D. Raben and D.T. Curiel** 1998. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res.* **58**:5738-48.

- Modrow, S. and D. Falke** 1997. Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg.
- Monteleone, G., L. Biancone, R. Marasco, G. Morrone, O. Marasco, F. Lizza and F. Pallone** 1997. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. **112**:1169-1178.
- Morral, N., W. O'Neal, K. Rice, M. Leland, J. Kaplan, P.A. Piedra, H. Zhou, R.J. Parks, R. Velji, E. Aguilar-Cordova, S. Wadsworth, F.L. Graham, S. Kochanek, K.D. Carey and A.L. Beaudet** 1999. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**:12816-21.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin and R.L. Coffman** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. **136**:2348-57.
- Mountain, A.** 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*. **18**:119-28.
- Naeger, L.K., J. McKinney, A. Salvekar and T. Hoey** 1999. Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *J Biol Chem*. **274**:1875-8.
- Nemerow, G.R.** 2000. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology*. **274**:1-4.
- 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**:725-34.
- Nemunaitis, J., I. Ganly, F. Khuri, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples, L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye and D. Kirn** 2000. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res*. **60**:6359-66.
- Nermut, M.V.** 1975. Fine structure of adenovirus type 5. I. Virus capsid. *Virology*. **65**:480-95.
- Neurath, M.F.** 2000. Immunotherapy of inflammatory bowel diseases: current concepts and future perspectives. *Arch Immunol Ther Exp*. **48**:81-4.
- Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, E. Stuber and W. Strober** 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. **182**:1281-90.
- Neurath, M.F., I. Fuss, M. Pasparakis, L. Alexopoulou, S. Haralambous, B.K. Meyerzum, W. Strober and G. Kollias** 1997. Predominant pathogenic role of tumor necrosis

factor in experimental colitis in mice. *Eur.J.Immunol.* **27**:1743-1750.

**Neurath, M.F., S. Pettersson, K.H. Meyer zum Buschenfelde and W. Strober** 1996. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med.* **2**:998-1004.

**Niessner, M. and B.A. Volk** 1995. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol.* **101**:428-35.

**Nishio, O., K. Sakae, Y. Ishihara, S. Isomura and S. Inouye** 1992. Adenovirus infection and specific secretory IgA responses in the intestine of infants. *Microbiol Immunol.* **36**:623-31.

**Oida, T., K. Suzuki, M. Nanno, Y. Kanamori, H. Saito, E. Kubota, S. Kato, M. Itoh, S. Kaminogawa and H. Ishikawa** 2000. Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells. *J Immunol.* **164**:3616-26.

**Okamura, H., H. Tsutsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori and et al.** 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* **378**:88-91.

**O'Shea, J.J.** 1997. Jaks, STATs, cytokine signal transduction, and immunoregulation: are we there yet? *Immunity.* **7**:1-11.

**Ouyang, W., N.G. Jacobson, D. Bhattacharya, J.D. Gorham, D. Fenoglio, W.C. Sha, T.L. Murphy and K.M. Murphy** 1999. The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:3888-93.

**Pages, F., A. Berger, S. Lebel-Binay, F. Zinzindohoue, C. Danel, B. Piqueras, O. Carriere, N. Thiounn, P.H. Cugnenc and W.H. Fridman** 2000. Proinflammatory and antitumor properties of interleukin-18 in the gastrointestinal tract. *Immunol Lett.* **75**:9-14.

**Pahl, H.L., M. Sester, H.G. Burgert and P.A. Baeuerle** 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol.* **132**:511-22.

**Panis, Y., A.R. Rad, O. Boyer, D. Houssin, J.L. Salzmann and D. Klatzmann** 1996. Gene therapy for liver tumors. *Surg Oncol Clin N Am.* **5**:461-73.

**Parrello, T., G. Monteleone, S. Cucchiara, I. Monteleone, L. Sebkova, P. Doldo, F. Lizza and F. Pallone** 2000. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's

disease. *J Immunol.* **165**:7234-9.

**Parronchi, P., P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli and S. Romagnani** 1997. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am.J.Pathol.* **150**:823-832.

**Perdue, M.H.** 1999. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am J Physiol.* **277**:G1-5.

**Petitclerc, D., J. Attal, M.C. Theron, M. Bearzotti, P. Bolifraud, G. Kann, M.G. Stin-nakre, H. Pointu, C. Puissant and L.M. Houdebine** 1995. The effect of various introns and transcription terminators on the efficiency of expression vectors in various cultured cell lines and in the mammary gland of transgenic mice. *J Biotechnol.* **40**:169-78.

**Philipson, L.** 1984. Structure and assembly of adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* **109**:1-52.

**Pizarro, T.T., M.H. Michie, M. Bentz, J. Woraratanadharm, M.F. Smith, Jr, E. Foley, C.A. Moskaluk, S.J. Bickston and F. Cominelli** 1999. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J.Immunol.* **162**:6829-6835.

**Podolsky, D.K.** 1991. Inflammatory bowel disease (1). *N Engl J Med.* **325**:928-37.

**Podolsky, D.K.** 1991. Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med.* **325**:1008-16.

**Powrie, F. and R.L. Coffman** 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today.* **14**:270-4.

**Powrie, F., M.W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L.B. Caddle and R.L. Coffman** 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* **1**:553-62.

**Present, D.H., P. Rutgeerts, S. Targan, S.B. Hanauer, L. Mayer, R.A. van Hogeand, D.K. Podolsky, B.E. Sands, T. Braakman, K.L. DeWoody, T.F. Schaible and S.J. van Deventer** 1999. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med.* **340**:1398-405.

**Presky, D.H., H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C.Y. Wu, M.K. Gately and U. Gubler** 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta- type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:14002-7.

**Raper, S.E., Z.J. Haskal, X. Ye, C. Pugh, E.E. Furth, G.P. Gao and J.M. Wilson** 1998.

Selective gene transfer into the liver of non-human primates with E1- deleted, E2A-defective, or E1-E4 deleted recombinant adenoviruses. *Hum Gene Ther.* **9**:671-9.

**Rath, H.C., H.H. Herfarth, J.S. Ikeda, W.B. Grenther, T.E. Hamm, Jr., E. Balish, J.D. Taurog, R.E. Hammer, K.H. Wilson and R.B. Sartor** 1996. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* **98**:945-53.

**Rath, H.C., J.S. Ikeda, H.J. Linde, J. Scholmerich, K.H. Wilson and R.B. Sartor** 1999. Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology.* **116**:310-319.

**Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J.P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* **2**:361-7.

**Riviere, I., H.F. Gallardo, A.B. Hagani and M. Sadelain** 2000. Retroviral-mediated gene transfer in primary murine and human T- lymphocytes. *Mol Biotechnol.* **15**:133-42.

**Roelvink, P.W., G. Mi Lee, D.A. Einfeld, I. Kovesdi and T.J. Wickham** 1999. Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science.* **286**:1568-71.

**Rogler, G., M. Hausmann, D. Vogl, E. Aschenbrenner, T. Andus, W. Falk, R. Andreesen, J. Scholmerich and V. Gross** 1998. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol.* **112**:205-15.

**Romagnani, P., F. Annunziato, M.C. Baccari and P. Parronchi** 1997. T cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr.Opin.Immunol.* **9**:793-799.

**Romano, G., C. Pacilio and A. Giordano** 1999. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells.* **17**:191-202.

**Rothkotter, H.J., R. Pabst and M. Bailey** 1999. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vet Immunol Immunopathol.* **72**:157-65.

**Rowe** 1953. *Proc Soc Exp Biol Med.* **84**:570-573.

**Ruther, U., C. Nunnensiek, H.A. Muller, H. Bader, U. May and P. Jipp** 1998. Interferon alpha (IFN alpha 2a) therapy for herpes virus-associated inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease). *Hepatogastroenterology.* **45**:691-699.

- Sakai, T., M. Matsuoka, M. Aoki, K. Nosaka and H. Mitsuya** 2001. Missense mutation of the interleukin-12 receptor beta1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection. *Blood*. **97**:2688-2694.
- Salmi, M. and S. Jalkanen** 1999. Molecules controlling lymphocyte migration to the gut. *Gut*. **45**:148-53.
- Sambucetti, L.C., J.M. Cherrington, G.W. Wilkinson and E.S. Mocarski** 1989. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *Embo J*. **8**:4251-8.
- Sandborn, W.J. and S.B. Hanauer** 1999. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm.Bowel.Dis.* **5**:119-133.
- Sands, B.E., S. Bank, C.A. Sninsky, M. Robinson, S. Katz, J.W. Singleton, P.B. Miner, M.A. Safdi, S. Galandiuk, S.B. Hanauer, G.W. Varilek, A.L. Buchman, V.D. Rodgers, B. Salzberg, B. Cai, J. Loewy, M.F. DeBruin, H. Rogge, M. Shapiro and U.S. Schwertschlag** 1999. Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology*. **117**:58-64.
- Sartor, R.B.** 1997. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res.Immunol.* **148**:567-576.
- Schagger, H. and G. von Jagow** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**:368-79.
- Schenkel, S.** 1995. *Transgene Tiere*. Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Schmidt, G.H., M.M. Wilkinson and B.A. Ponder** 1985. Cell migration pathway in the intestinal epithelium: an in situ marker system using mouse aggregation chimeras. *Cell*. **40**:425-9.
- Schmitt, E., E. Rude and T. Germann** 1997. The immunostimulatory function of IL-12 in T-helper cell development and its regulation by TGF-beta, IFN-gamma and IL-4. *Chem Immunol.* **68**:70-85.
- Schreiber, S., M. Campieri, J.F. Colombel, S.J. van Deventer, B. Feagan, R. Fedorak, A. Forbes, M. Gassull, J.P. Gendre, R.A. van Hogezaand, R. Lofberg, R. Modigliani, F. Pallone, W. Petritsch, C. Prantera, D. Rampton, F. Seibold, M. Vatn, M. Zeitz and P. Rutgeerts** 2001. Use of anti-tumour necrosis factor agents in inflammatory bowel disease. European guidelines for 2001-2003. *Int J Colorectal Dis.* **16**:1-11; discussion 12-3.



- Schreiber, S., S. Nikolaus, H. Malchow, W. Kruis, H. Lochs, A. Raedler, E.G. Hahn, T. Krummenerl and G. Steinmann** 2001. Absence of efficacy of subcutaneous antisense ICAM-1 treatment of chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology*. **120**:1339-46.
- Schuler, M., R. Herrmann, J.L. De Greve, A.K. Stewart, U. Gatzemeier, D.J. Stewart, L. Laufman, R. Gralla, J. Kuball, R. Buhl, C.P. Heussel, F. Kommoss, A.P. Perruchoud, F.A. Shepherd, M.A. Fritz, J.A. Horowitz, C. Huber and C. Rochlitz** 2001. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*. **19**:1750-8.
- Schultz, M. and R.B. Sartor** 2000. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol*. **95**:S19-21.
- Schultz, M., S.L. Tonkonogy, R.K. Sellon, C. Veltkamp, V.L. Godfrey, J. Kwon, W.B. Grenther, E. Balish, I. Horak and R.B. Sartor** 1999. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am.J.Physiol*. **276**:G1461-G1472.
- Sellon, R.K., S. Tonkonogy, M. Schultz, L.A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D.M. Rennick and R.B. Sartor** 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect.Immun*. **66**:5224-5231.
- Shamah, S.M. and C.D. Stiles** 1995. Transdominant negative mutations. *Methods Enzymol*. **254**:565-76.
- Shanahan, F.** 1999. Intestinal lymphoepithelial communication. *Adv Exp Med Biol*. **473**:1-9.
- Simpson, S.J., S. Shah, M. Comiskey, Y.P. de Jong, B. Wang, E. Mizoguchi, A.K. Bhan and C. Terhorst** 1998. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med*. **187**:1225-34.
- Smits, H.H., J.G. Rietschoten, C.M. Hilkens, R. Sayilir, F. Stiekema, M.L. Kapsenberg and E.A. Wierenga** 2001. IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *Eur J Immunol*. **31**:1055-65.
- Strauss, M.** 1994. Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Ther*. **1**:156-64.

- Swisher, S.G., J.A. Roth, J. Nemunaitis, D.D. Lawrence, B.L. Kemp, C.H. Carrasco, D.G. Connors, A.K. El-Naggar, F. Fossella, B.S. Glisson, W.K. Hong, F.R. Khuri, J.M. Kurie, J.J. Lee, J.S. Lee, M. Mack, J.A. Merritt, D.M. Nguyen, J.C. Nesbitt, R. Perez-Soler, K.M. Pisters, J.B. Putnam, Jr., W.R. Richli, M. Savin, M.K. Waugh and et al.** 1999. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* **91**:763-71.
- Szabo, S.J., A.S. Dighe, U. Gubler and K.M. Murphy** 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med.* **185**:817-24.
- Szabo, S.J., N.G. Jacobson, A.S. Dighe, U. Gubler and K.M. Murphy** 1995. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity.* **2**:665-75.
- Targan, S.R., S.B. Hanauer, S.J. van Deventer, L. Mayer, D.H. Present, T. Braakman, K.L. DeWoody, T.F. Schaible and P.J. Rutgeerts** 1997. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N.Engl.J.Med.* **337**:1029-1035.
- Thierfelder, W.E., J.M. van Deursen, K. Yamamoto, R.A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld and J.N. Ihle** 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature.* **382**:171-4.
- Thomas, D.R., G.W. Philpott and B.M. Jaffe** 1974. Prostaglandin E (PGE) control of cell proliferation in vitro: characteristics of HT-29. *J Surg Res.* **16**:463-5.
- Trapnell, B.C. and M. Gorziglia** 1994. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol.* **5**:617-25.
- Verhagen, C.E., T. de Boer, H.H. Smits, F.A. Verreck, E.A. Wierenga, M. Kurimoto, D.A. Lammas, D.S. Kumararatne, O. Sanal, F.P. Kroon, J.T. van Dissel, F. Sinigaglia and T.H. Ottenhoff** 2000. Residual Type 1 Immunity in Patients Genetically Deficient for Interleukin 12 Receptor beta1 (IL-12Rbeta1). Evidence for an il- 12rbeta1-independent pathway of il-12 responsiveness in human t cells. *J Exp Med.* **192**:517-528.
- Visconti, R., M. Gadina, M. Chiariello, E.H. Chen, L.F. Stancato, J.S. Gutkind and J.J. O'Shea** 2000. Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood.* **96**:1844-52.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:615-9.

- Walther, W. and U. Stein** 2000. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*. **60**:249-71.
- Wan, Y.Y., R.P. Leon, R. Marks, C.M. Cham, J. Schaack, T.F. Gajewski and J. DeGroot** 2000. Transgenic expression of the coxsackie/adenovirus receptor enables adenoviral-mediated gene delivery in naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:13784-9.
- Wang, K.S., D.A. Frank and J. Ritz** 2000. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*. **95**:3183-90.
- Watanabe, M., Y. Ueno, T. Yajima, S. Okamoto, T. Hayashi, M. Yamazaki, Y. Iwao, H. Ishii, S. Habu, M. Uehira, H. Nishimoto, H. Ishikawa, J. Hata and T. Hibi** 1998. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J.Exp.Med.* **187**:389-402.
- Watanabe, M., Y. Ueno, M. Yamazaki and T. Hibi** 1999. Mucosal IL-7-mediated immune responses in chronic colitis-IL-7 transgenic mouse model. *Immunol Res*. **20**:251-9.
- Webster, A., I.R. Leith, J. Nicholson, J. Hounsell and R.T. Hay** 1997. Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *J Virol*. **71**:6381-9.
- Wickham, T.J., G.M. Lee, J.A. Titus, G. Sconocchia, T. Bakacs, I. Kovesdi and D.M. Segal** 1997. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J Virol*. **71**:7663-9.
- Wickham, T.J., D.M. Segal, P.W. Roelvink, M.E. Carrion, A. Lizonova, G.M. Lee and I. Kovesdi** 1996. Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol*. **70**:6831-8.
- Wickham, T.J., E. Tzeng, L.L. Shears, 2nd, P.W. Roelvink, Y. Li, G.M. Lee, D.E. Brough, A. Lizonova and I. Kovesdi** 1997. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol*. **71**:8221-9.
- Williams, J.L., J. Garcia, D. Harrich, L. Pearson, F. Wu and R. Gaynor** 1990. Lymphoid specific gene expression of the adenovirus early region 3 promoter is mediated by NF-kappa B binding motifs. *Embo J*. **9**:4435-42.
- Wilson, J.M.** 1996. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med*. **334**:1185-7.
- Wirtz, S. and M.F. Neurath** 2000. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. **15**:144-60.

- Wolf, S.F., P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick and et al.** 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* **146**:3074-81.
- Wong, W.M., R. Poulson and N.A. Wright** 1999. Trefoil peptides. *Gut.* **44**:890-5.
- Xu, X., Y.L. Sun and T. Hoey** 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science.* **273**:794-7.
- Yamamoto, K., F.W. Quelle, W.E. Thierfelder, B.L. Kreider, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, O. Silvennoinen and J.N. Ihle** 1994. Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol.* **14**:4342-9.
- Yang, Y., H.C. Ertl and J.M. Wilson** 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity.* **1**:433-42.
- Ye, X., M.B. Robinson, C. Pabin, M.L. Batshaw and J.M. Wilson** 2000. Transient depletion of CD4 lymphocyte improves efficacy of repeated administration of recombinant adenovirus in the ornithine transcarbamylase deficient sparse fur mouse. *Gene Ther.* **7**:1761-7.
- Zheng, C., B.J. Baum, M.J. Iadarola and B.C. O'Connell** 2000. Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat Biotechnol.* **18**:176-80.
- Zhong, Z., Z. Wen and J.E. Darnell, Jr.** 1994. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:4806-10.

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALUM	Aluminiumkaliumsulfat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein-1
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
BGH	bovine growth hormone
bp	Basenpaare
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
BSA	bovines Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAR	Cosackie- und Adenovirusrezeptor
CD	cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Con A	Concanavallin A
cpm	counts pro minute
CFA	complete Freund' s adjuvans
CMV	Zytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	Dinitrophenyl
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
FFU	fluorescence forming units
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
GALT	darmassoziierte lymphatische Gewebe
GAS	gamma-interferon activation site
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HBSS	Hanks Balanced Salt solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-I-piperazinethansulfonsäure
HeBS	Hepes buffered saline
HIV	human immundeficiency virus
HPO	horseshoe peroxidase
ICE	IL-1 $\beta$ converting enzyme (Caspase-1)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
iIEL	intestinale, intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
ITR	inverted terminal repeat
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria Bertani
LCR	Locus-Control-Regionen
Lck	Proteintyrosinkinase p56lck
LiCl	Lithiumchlorid
LPMC	Lamina Propria mononuclear cells
LPS	Lipopolysaccharid



Lsg.	Lösung
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg, ml	Milligramm, Milliliter
$\mu\text{Ci}$	Mikrocurie
$\mu\text{g}$ , $\mu\text{l}$	Mikrogramm, Mikroliter
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
MHC	major histocompatibility complex
MMTV	mouse moloney tumor virus
NaOH	Natriumhydroxid
min	Minute
mM	Millimol
MOI	multiply of infection
mRNA	Messenger-RNA
ms	Milisekunden
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromol
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaJ	Natriumjodid
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF- $\kappa\text{B}$	nuclear factor $\kappa\text{B}$
NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligonucleotid Desoxy-Thymidin
p.A	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque forming units
pg	Pikogramm

PHA	Phytohämagglutinin
p.i.	post infection
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAG (-1, 2)	rekombinationsaktivierende Gene
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S.	Seite
s	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	saline sodium citrate (Natriumchlorid/Natriumcitrat)
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV-40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TH	T-Helferzelle
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TMB	Trimethylbenzidin
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TYK	Tyrosinkinase
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volumen

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## Publikationsliste

**Wirtz, S. and M.F. Neurath** 2000. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* **15**:144-60.

**Atreya, R., Mudter, J., S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schuetz, B. Bartsch, M.B. Holtmann, C., J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, Y. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, S. Rose-John and M.F. Neurath** 2000. Blockade of IL-6 trans-signaling abrogates established experimental colitis in mice by suppression of T cell resistance against apoptosis. *Nat.Med.*

**Becker, C., K. Barbulescu, S. Wirtz, K.H. Meyer zum Buschenfelde, S. Pettersson and M.F. Neurath** 1999. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr.* **8**:115-27.

**Wirtz, S., P.R. Galle and M.F. Neurath** 1999. Efficient gene delivery to the inflamed colon by local administration of recombinant adenoviruses with normal or modified fibre structure. *Gut.* **44**:800-7.

**Wirtz, S., S. Finotto, S. Kanzler, A.W. Lohse, M. Blessing, H.A. Lehr, P.R. Galle and M.F. Neurath** 1999. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol.* **162**:1884-8.

**Neurath M.F., X. Ma, S. Pettersson (mit Beiträgen von V. Arulampalam, K. Barbulescu, C. Becker und S. Wirtz):** DNA/Protein Interaktionen. Labor im Focus, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1997.

**Neurath M.F., C. Becker, K. Barbulescu, S. Wirtz and K.H. Meyer zum Büschenfelde** 1996. Characterization of different DNA polymerases and ligases in ligation-mediated PCR for optimized in vivo footprinting. PCR Bibliographie anlässlich des ‚PCR Award for young scientists‘. Biochemica Information Sonderheft, Boehringer Mannheim GmbH.