

RNA-Interferenz-basierte Therapien bei Adenovirusinfektionen im immunsupprimierten Wirt

Vorgelegt von

Dipl.-Ing.

Katrin Schaar

geboren in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grads

Doktorin der Ingenieurwissenschaften

- Dr. Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss

Vorsitzende: Prof. Dr. Vera Meyer

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurreck

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster

3. Gutachter: Prof. Dr. Claus-Thomas Bock

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14.08.2017

Berlin, 2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Das Adenovirus | 1 |
| 1.1.1. Infektion und Pathogenese | 1 |
| 1.1.2. Aufbau des Virions | 1 |
| 1.1.3. Internalisierung des Viruspartikels | 3 |
| 1.1.4. Immunreaktion auf hAd5 | 3 |
| 1.1.5. Genomorganisation und Replikation von hAd5 | 4 |
| 1.1.6. Infektion im Tiermodell | 5 |
| 1.1.7. Antivirale Therapien | 6 |
| 1.2. RNA-Interferenz | 7 |
| 1.2.1. Behandlung einer Adenovirusinfektion mit RNAi | 10 |
| 1.3. Transgenbereitstellung mit viralen und nicht-viralen Vektoren | 11 |
| 1.3.1. Transgenbereitstellung mit Adeno-assoziierten Virusvektoren | 12 |
| 1.4. Ziel der Arbeit | 13 |
| 2. Material | 15 |
| 2.1. Chemikalien | 15 |
| 2.2. Enzyme | 16 |
| 2.3. Reagenzsysteme | 17 |
| 2.4. Lösungen und Puffer | 17 |
| 2.5. Nukleinsäuren | 18 |
| 2.5.1. DNA-Größenstandards | 18 |
| 2.5.2. Oligonukleotide | 18 |
| 2.5.3. Plasmide | 19 |
| 2.6. Antikörper | 21 |
| 2.7. Bakterienstämme und Medien | 21 |
| 2.8. Zelllinien und Medien | 21 |
| 2.9. Viren und virale Vektoren | 22 |
| 2.9.1. Viren | 22 |
| 2.9.2. Virale Vektoren | 22 |
| 2.10. Sonstige Materialien | 22 |
| 2.11. Geräte | 22 |
| 3. Methoden | 24 |
| 3.1. Arbeiten mit Bakterien | 24 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.1. | Herstellung chemisch kompetenter Bakterien | 24 |
| 3.1.2. | Transformation chemisch kompetenter Bakterien | 24 |
| 3.1.3. | Konservierung von Bakterien..... | 24 |
| 3.2. | DNA- und RNA-basierte Techniken..... | 24 |
| 3.2.1. | Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien..... | 25 |
| 3.2.2. | Gelelektrophorese | 25 |
| 3.2.3. | DNA-Extraktion aus Agarosegelen | 25 |
| 3.2.4. | Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Geweben | 25 |
| 3.2.5. | Isolierung von DNA aus Geweben..... | 25 |
| 3.3. | Klonierung | 26 |
| 3.3.1. | Restriktion von Plasmid-DNA..... | 26 |
| 3.3.2. | Dephosphorylierung von linearer DNA | 26 |
| 3.3.3. | Auffüllen von überhängenden Enden | 26 |
| 3.3.4. | Ligation | 26 |
| 3.4. | Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion | 27 |
| 3.4.1. | Reverse Transkription | 27 |
| 3.4.2. | Polymerase-Kettenreaktion | 27 |
| 3.4.3. | Quantitative real-time PCR | 28 |
| 3.5. | Sequenzierung von DNA | 29 |
| 3.6. | Design der antiadenoviralen artifiziellen microRNAs | 29 |
| 3.7. | Plasmidkonstruktion..... | 29 |
| 3.7.1. | Basisplamide..... | 29 |
| 3.7.2. | Plasmide zur Expression von GFP und amiR-Ad..... | 30 |
| 3.7.3. | Plasmide zur Expression einer amiR-Ad..... | 31 |
| 3.7.4. | Plasmide zur Expression mehrere amiR-Ad mit unterschiedlichen Zielgenen | 32 |
| 3.7.5. | Reporterplasmiden mit amiR-Ad-Zielsequenzen | 33 |
| 3.8. | Zellbiologische Methoden | 34 |
| 3.8.1. | Passagieren adhärenter Zellen | 34 |
| 3.8.2. | Konservierung von eukaryontischen Zellen | 34 |
| 3.8.3. | Aussaat von Zellen in Multiwellplatten..... | 34 |
| 3.8.4. | Transfektion von Zellen | 34 |
| 3.8.5. | Quantifizierung von Proteinexpression mit Durchflusszytometrie | 35 |
| 3.9. | Arbeiten mit Viralen Vektoren..... | 35 |
| 3.9.1. | Anzucht von Adeno-assoziierten Virusvektoren | 35 |
| 3.9.2. | Transduktion von Zellen | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.10. | Virologische Methoden | 38 |
| 3.10.1. | Anzucht von Adenoviren im kleinen Volumen | 38 |
| 3.10.2. | Anzucht von Adenoviren im großen Volumen | 38 |
| 3.10.3. | Bestimmung des Virustiters im Plaque Assay | 40 |
| 3.10.4. | Virustiterbestimmung mit qPCR | 40 |
| 3.10.5. | Infektion von Zellen | 41 |
| 3.10.6. | Ad5-Inhibierungsassay..... | 41 |
| 3.10.7. | Zellviabilitätsassay mit XTT | 41 |
| 3.11. | Evaluierung der amiR-Ad-basierten Therapie im immunsupprimierten Tiermodell | 41 |
| 3.11.1. | Studiendesign | 41 |
| 3.11.2. | Pilotversuch I: Infektion von immunsupprimierten syrischen Hamstern mit hAd5 | 42 |
| 3.11.3. | Pilotversuch II: Toleranz der Dosis von AAV2/9-amiR-Ad (6x) | 43 |
| 3.11.4. | Inhibierung der Replikation von hAd5 durch AAV2/9-exprimierte antivirale amiRs..... | 43 |
| 3.11.5. | Therapeutische Inhibierung von hAd5 im immunsupprimierten Wirt | 44 |
| 3.12. | Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse | 45 |
| 4. | Ergebnisse | 46 |
| 4.1. | Evaluation der amiR-Sequenzen im Reporterassay | 46 |
| 4.1.1. | Funktion der amiR-Ad nach Expression von einem Plasmid | 46 |
| 4.1.2. | Inhibierung des Reportergens mit Hilfe einer amiR-Ad | 47 |
| 4.1.3. | Konkatemere der amiR-Ad-kodierenden Sequenzen zur Effizienzerhöhung | 49 |
| 4.1.4. | Evaluierung von amiR-Ad-Konkatemeren verschiedener Längen und mit mehreren Zielgenen | 51 |
| 4.2. | Replikationsinhibierung von hAd5 mit scAAV2-exprimierten amiRs | 52 |
| 4.2.1. | Replikationsinhibierung ausgelöst durch eine AAV-Vektor-exprimierte amiR-Ad | 52 |
| 4.2.2. | Erhöhung der Effizienz der Replikationsinhibierung durch Konkatemere von amiR-Ad | 53 |
| 4.2.3. | Variation der Dosis von amiR-Ad in der Replikationsinhibierung | 54 |
| 4.2.4. | Limitierung der amiR-Ad in Bezug auf steigende Viruslast | 55 |
| 4.2.5. | Vergleich der Inhibierungspotentiale von amiR-pTP-E1A_2-Kombinationsvektoren.... | 56 |
| 4.2.6. | Expressionsstärke der amiR-Ad durch AAV-Vektoren..... | 59 |
| 4.2.7. | Einfluss von amiR-Ad auf die Viabilität hAd5-infizierter Zellen..... | 60 |
| 4.2.8. | Inhibierung der viralen mRNA-Expression durch amiR-Ad | 63 |
| 4.2.9. | Replikationsinhibierung in hepatischen HepaRG-Zellen | 64 |
| 4.3. | Einsatz von scAAV2/9-exprimierten amiRNAs in vivo zur Therapie von Adenovirusinfektion im immunsupprimierten Wirt | 66 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.3.1. | Pilotversuch 1: Infektionsverlauf in immunsupprimierten Syrischen Hamstern | 66 |
| 4.3.2. | Pilotversuch 2: Untersuchung der Toleranz von scAAV2/9-amiR-Ad (6x)..... | 72 |
| 4.3.3. | Prophylaktische Inhibierung von hAd5 durch scAAV2/9-exprimierte amiR-Ad in immunsupprimierten Syrischen Hamstern | 73 |
| 4.3.4. | Therapeutische Inhibierung von hAd5 durch scAAV2/9-exprimierte amiR-Ad in immunsupprimierten Syrischen Hamstern | 80 |
| 5. | Diskussion..... | 82 |
| 5.1. | Anti-adenovirale amiR-Ad inhibieren die Infektion in vitro | 83 |
| 5.2. | Etablierung des Tiermodells | 89 |
| 5.3. | Anti-adenovirale amiR-Ad inhibieren die hAd5-Replikation in vivo..... | 90 |
| 5.3.1. | Prophylaktische Applikation der amiR-Ad | 90 |
| 5.3.2. | Therapeutische Gabe der amiR-Ad | 92 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 95 |
| 7. | Summary | 97 |
| 8. | Anhang | 99 |
| 8.1. | Literaturverzeichnis | 99 |
| 8.2. | Verzeichnis eigener Publikationen..... | 113 |
| 8.3. | Plasmidkarten..... | 114 |
| 8.4. | Danksagung | IX |

Abkürzungsverzeichnis

| | Abkürzung | Bedeutung |
|----------|-----------|---|
| A | AAV | Adeno-assoziierte Viren |
| | Ad | Adenovirus |
| | ADP | Adenovirus Death Protein |
| | Ago2 | Argonauten-Protein 2 |
| | ALT | Alanin-Aminotransferase |
| | amiR | artifizielle microRNA |
| | AST | Aspartat-Aminotransferase |
| | ATP | Adenosintriphosphat |
| B | BCV | Brincidofovir |
| | bGH | bovine Growth Hormon |
| C | Cap | AAV-Gencluster mit essentiellen Genen für die Virusverpackung |
| | CAR | Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor |
| | CD | Cluster of Differentiation |
| | cDNA | complementary DNA |
| | CDV | Cidofovir |
| | CMV | Cytomegalie-Virus |
| | CP | Cyclophosphamid |
| D | DBP | DNA-bindendes Protein |
| | DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| | dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| | ds | doppelsträngig |
| E | EMA | Europäische Arzneimittelbehörde |
| F | FDA | Food and Drug Administration of the United States of America |
| | FSC | Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht |
| | FX | Blutgerinnungsfaktor X |
| G | GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| | GON | Groups of Nine, Verbund von Hexonproteinen |
| H | hAd5 | humanes Adenovirus 5 |
| | HE | Hämatoxylin-Eosin |
| | Hex | Hexonprotein |
| | HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| | HSC | Hämatopoetische Stammzelle(n) |
| | HSPG | Heparansulfatproteoglykan |
| I | i.p. | intraperitoneal |
| | i.v. | intravenös |
| | ITR | Inverted Terminal Repeat |
| M | MCS | Multiple Cloning Site |
| | MHC | Major Histocompatibility Complex |
| | miRNA | micro RNA |
| | MLP | Major Late Promoter |
| | MOI | Multiplicity of Infection |

| | | |
|----------|--------------|--|
| M | mRNA | Messenger RNA |
| N | NAb | Neutralisierender Antikörper |
| | NLR | Nucleotide-like Rezeptoren |
| | nt | Nukleotide |
| O | OD | Optische Dichte |
| P | p.i. | post infectio |
| | PBMC | Mononukleäre Zellen im peripheren Blut |
| | PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| | PEI | Polyethylenimin |
| | PFU | Plaque Forming Units |
| | piRNA | Piwi-interagierende RNA |
| | Pol | virale DNA-Polymerase |
| | Prot | virale Proteinase |
| | PRR | Mustererkennungsrezeptoren |
| | pTP | Vorläufer des Terminalen Proteins (Precursor) |
| Q | qPCR | quantitative PCR |
| R | Rep | AAV-Gencluster mit essentiellen Genen für die Virusreplikation |
| | RISC | RNA-induced Silencing Complex |
| | RNA | Ribonukleinsäure |
| | RNA Pol | DNA-abhängige RNA-Polymerase |
| | RNAi | RNA-Interferenz |
| | rRNA | ribosomale RNA |
| | RT-PCR | Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| S | s.c. | subkutan |
| | scAAV | self-complementary AAV |
| | sCAR | soluble, rekombinant hergestellte Virusrezeptorfalle |
| | shRNA | short hairpin RNA |
| | siRNA | short interfering RNA |
| | SSC | Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht |
| T | Th1 | Typ-1-T-Helferzellen |
| | TLR | Toll-like Rezeptoren |
| | TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| | TP | Terminales Protein |
| | TS | Target Site, Zielsequenz |
| U | UTR | nicht-translatierter Bereich |
| | UV | ultraviolett |
| | UZ | Ultrazentrifugation |
| V | vge | vector genome equivalents |
| | vp | Viruspartikel |

1. Einleitung

1.1. Das Adenovirus

Das humane Adenovirus 5 (hAd5) entstammt der Familie der *Adenoviridae*, welche aus sieben Spezies (A-G) und mehr als 67 Serotypen besteht (1). Der Serotyp 5 gehört zur Spezies C. Die erste Isolation und Beschreibung eines Adenovirus (Ad) gelang im Jahr 1953 aus menschlichem Adenoid-gewebe (2). Adenoviren infizieren viele post-mitotische Gewebe, z.B. Zellen der Leber, des Herzens, der Skelettmuskulatur und des Gehirns, in einer breiten Anzahl von Spezies (3). Sie sind weltweit endemisch, mit gewissen regionalen Abweichungen bezüglich der vorherrschenden Serotypen (4). Die Einteilung dieser Serotypen beruhte lange Zeit auf den entsprechenden Eigenschaften in der Serumneutralisation und im Hämagglutinationstest. Heute werden vermehrt Genomanalysen zur Typisierung herangezogen (5).

1.1.1. Infektion und Pathogenese

Die Infektion mit Adenoviren nimmt in der Regel einen milden Verlauf und ist innerhalb weniger Wochen auskuriert. Die Symptome unterscheiden sich abhängig vom konkreten Serotypen, mit dem man infiziert ist. Beispielsweise bewirken alle Vertreter der Spezies B und C Erkrankungen der oberen Atemwege, aber nur wenige davon auch eine Konjunktivitis. Nur Viren der Spezies D können eine Keratokonjunktivitis verursachen; eine Myokarditis wird nur von hAd7 und hAd21 (Spezies B) ausgelöst.

Infektionen mit hAd5 werden assoziiert mit Erkrankungen der oberen Atemwege, Keuchhusten, Hepatitis, Meningoenzephalitis sowie dem Auftreten einer disseminierten Erkrankung, bei der stark replizierende Viren in mehreren Organen nachweisbar sind (6).

Deutlich schwerer können die Verläufe für immunschwache Patienten, vor allem nach Transplantation von allogenen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sein. Besonders bei Kindern liegt eine hohe Inzidenz von bis zu 30 % bei hoher Sterblichkeitsrate (bis zu 80 %) vor (4,7–10). Als Risikofaktoren für eine tödlich verlaufende Infektion gelten disseminierter Befall, das Ausbleiben einer T-Zellantwort durch vorangegangene Depletion sowie die rapide Steigerung der Anzahl replizierender Viren. Häufig führt Multiorganversagen zum Tod des Patienten (9,10).

1.1.2. Aufbau des Virions

Das unbehüllte Virion von hAd5 hat einen Durchmesser von ca. 90 nm und eine molekulare Masse von etwa 150 MDa (11). Es besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, welches einen Nukleo-proteinkomplex mit einer linearen, doppelsträngigen DNA einbettet. Das Kapsid selbst setzt sich aus sieben verschiedenen Proteinen zusammen: Hexon (II), Pentonbasis (III), Fiber (IV), IIIa, VI, VIII und IX. Weitere Proteine bilden gemeinsam mit der DNA den Kernkomplex: IVa2, V, VII, Mu (X) und das Terminale Protein (TP) (12). Darüber hinaus kodiert die 36 kb lange DNA für diverse regulatorische Proteine, die die Expression steuern, wie z.B. die DNA-Polymerase (Pol) oder die Protease (Prot) (3).

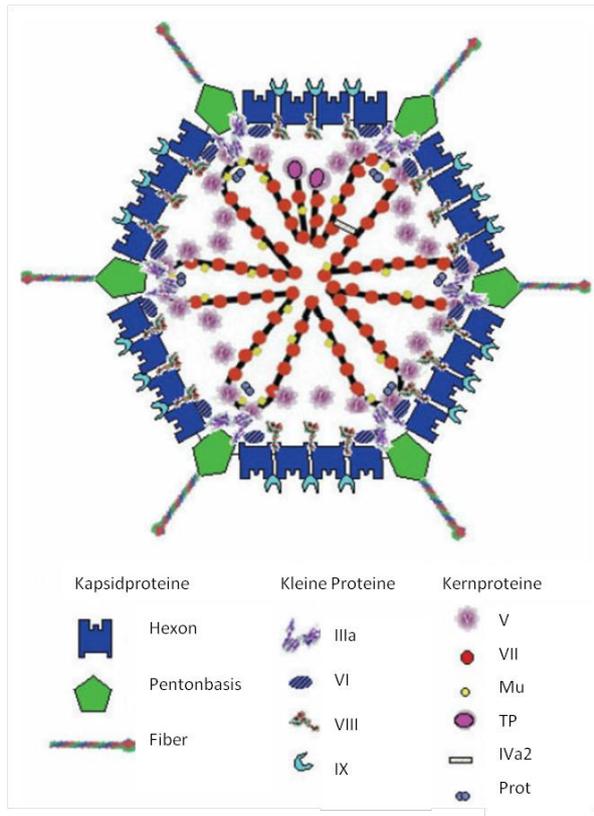


Abbildung 1: Aufbau des Ad-Virions. Der Querschnitt durch das Ad-Virion zeigt die DNA in Verbindung mit verschiedenen Proteinen eingebettet in ein Kapsid aus Hexon und Pentonbasisproteinen. Die Fibrillen ragen aus dem Kapsid heraus. Abbildung abgewandelt aus (13)

Das Kapsid besteht aus 252 Proteinen: 240 Hexonproteinen und 12 Pentonbasisproteinen, welche 12 Fibrillen verankern (14,15). Das Hexonprotein bildet je 12 pseudo-hexagonale Trimere an den 20 Facetten des Kapsids. Je nach relativer Anordnung werden sie als H1 (peripentonale Hexone) bis H4 bezeichnet. H1 wird von Protein VIII an die Pentonbasis gebunden. H2 bis H4 bilden zentrale sogenannte *Groups of Nine* (GON), welche drei turmartige Domänen an der Außenseite enthalten. Durch Assoziation von Protein IX sind diese GON extrem thermostabil (16). Das Hexonprotein ist je nach Virustyp unterschiedlich groß, das von hAd5 hat eine molekulare Masse von 105 kDa (17), für die Trimerbildung wird aber eine 100 kDa-Form verwendet (18). Die zwölf Spitzen des Kapsids werden von Pentonbasisproteinen gebildet. Das pentamerische Protein verankert eine trimerische Fibrille, die ca. 33 nm aus dem Kapsid herausragt (19–21). Die Fibrille bindet N-terminal kovalent an die Pentonbasis, auf Grund sterischer Hinderung werden aber nur drei Fibrillenproteine an fünf Pentonen gebunden (19). Der Fibrillenschaft besteht aus sich wiederholenden β -Spiralen, die in ein Fibrillenköpfchen münden (22). Dieses vermittelt sowohl die Trimerisierung der Fibrillenproteine als auch die Bindung des Viruspartikels an den zellulären Rezeptor. Als Alternative hierzu wurde im Fibrillenschaft ein Heparansulfat-Bindemotiv identifiziert (23). Im Bereich dieses KKTK (Lysin-Lysin-Threonin-Lysin)-Abschnitts gibt es eine variable Region der Fibrille, die einen Knick im Schaft bewirken kann, um die Bindung an Heparansulfat zu bewerkstelligen (24,25).

In der Pentonbasis gibt es außerdem ein RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure)-Motiv, das die Bindung an zelluläre Integrine als Korezeptoren vermittelt (26–28).

Das Protein V bildet eine Brücke zwischen dem Kapsidprotein VI, dem Kernprotein VII und der DNA (29). Das Protein VII ist stark basisch geladen und über die gesamte Länge der DNA in großen

Mengen daran gebunden (30). Das ebenfalls stark basische Protein Mu (31) übernimmt eine Histon-ähnliche Funktion. Die Proteine V, VII und Mu bilden eine nukleosomenartige Struktur (32). Modifikationen, wie Azetylierung und Phosphorylierung, können zu veränderter Struktur und Transkription führen (33,34). An die DNA sind wiederum weitere Proteine gebunden. An verschiedenen Stellen wird IVa2 gebunden, was für die Verpackung essentiell ist (35). Die Bindung von TP an den 5'-Enden der DNA sorgt für die Zirkularisierung des Genoms (36,37). Beide Proteine sind nur in extrem kleinen Mengen pro Virion vorhanden, genau wie die Protease (13).

1.1.3. Internalisierung des Viruspartikels

Nach der aerosolischen Aufnahme hat das Virion zunächst Kontakt mit den Schleimhäuten des Mund- und Rachenbereichs, der Bindehaut des Auges oder dem gastrointestinalen Trakt. Verschiedene physikalische Barrieren müssen überwunden werden, bevor eine Infektion stattfinden kann (38).

Eine suszeptible Zelle muss über das passende Set an Primär- und Korezeptoren verfügen. Adenoviren der Spezies A, C, E und F benutzen den Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (CAR) (39,40), die der Spezies B den ubiquitär exprimierten *Cluster of Differentiation* CD46 (41). Darüber hinaus können die Spezies B und D auch andere Rezeptoren verwenden, z.B. Sialinsäurerezeptoren (42). HAd2 und hAd5 können auch Heparansulfatproteoglykan (HSPG)-vermittelt infizieren (43,44).

Hat das Fiberköpfchen von hAd5 an CAR gebunden, muss zusätzlich das RGD-Motiv mit zellulären $\alpha\beta_3$ / $\alpha\beta_5$ Integrinen interagieren (45). Daraufhin werden PI3-Rho/GTPase-Wege aktiviert, welche zur Umformung des Zytoskeletts führen und die Aufnahme des Viruspartikels ermöglichen (46,47). Rezeptorbindung und Zellaufnahme sind in 5 – 10 min abgeschlossen (48).

Das Virus tritt in einem Clathrin-beschichteten Vesikel in die endosomale Route ein. Während der Ansäuerung des Endosoms, findet eine Konformationsänderung des Kapsids statt. Neben der teilweisen Entmantelung des Virions ist eine weitere Konsequenz die Zerstörung des Endosoms durch virale Proteine. Nach ca. 15 – 20 min wird das Virion ins Zellplasma entlassen (48). Durch Interaktion von Protein VI mit dem zellulären Motorprotein Dynein erfolgt ein Transport entlang von Mikrotubuli in die Nähe des Zellkerns. Der Exportfaktor CRM1 transportiert anschließend die virale DNA durch Interaktion mit dem nukleären Porenkomplex, Hitzeschockprotein Hsp70 und Histon H1 in den Kern hinein. Der gesamte Vorgang von Rezeptorbindung, Internalisierung, endosomalem *Escape* und Translokation in den Kern ist nach ca. 30 – 60 min abgeschlossen (48).

Für die Infektion *in vivo* ist vor allem die Virusaufnahme in die Leber von großer Bedeutung – diese geschieht jedoch CAR-unabhängig. Stattdessen bindet Faktor X (FX) der Blutgerinnungskaskade an die hypervariable Region des Hexonproteins. Der Komplex aus FX und hAd5 wird anschließend mit Hilfe von HSPG in die Leberzelle eingeschleust (43).

1.1.4. Immunreaktion auf hAd5

Das Immunsystem reagiert auf mehreren Ebenen auf eine Infektion mit Adenoviren. Lokal ausgeschüttete Defensine in den extrazellulären Fluiden von Nase und Lunge binden die Viren und verhindern das Entpacken oder die nachfolgende Signaltransduktion (49–51). Wird diese Barriere überwunden und die Blutbahn erreicht, werden zirkulierende Partikel in großen Mengen von den Gewebsmakrophagen der Leber (Kupffer-Zellen) aufgenommen. Diese induzieren daraufhin die Ausschüttung von Zyto- und

Chemokinen, um Leukozyten zu rekrutieren (52–54). In großen Mengen werden TNF α (Tumornekrosefaktor), IP10/CXCL10 und RANTES/CCL5 sekretiert (55,56). Diese sind experimentell binnen 2 h nach der Infektion nachweisbar; virale Gene werden aber von den Makrophagen nicht transkribiert. Die Expression wird intrazellulär nach dem Überwinden des Endosoms unterbrochen (57,58). Nach ca. 6 h ist auch von Nicht-Immunzellen eine erhöhte Sekretion von Chemo- und Zytokinen nachweisbar. Endothel- und Epithelzellen produzieren RANTES/CCL5, IL8/CXCL8 und IP10/CXCL10. Außerdem werden vermehrt Leukozytenadhäsionsmoleküle exprimiert (ICAM1, VCAM1) (59,60). Auch mononukleäre Zellen im peripheren Blut (PBMC) sekretieren Zytokine (TNF α , IL1 β , IL6, IL8/CXCL8, RANTES/CCL5) (58).

Des Weiteren sind zelluläre Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptor, PRR) an der Detektion und Bekämpfung von Viren beteiligt. *Toll-like* Rezeptoren (TLR) sind zellmembran- oder endosomal gebunden; ihre Aktivierung induziert entzündungsrelevante Signalkaskaden oder die Ausschüttung von Zytokinen. Von TLR2, 4 und 9 ist bereits eine tragende Rolle in der Bekämpfung von Ad Infektionen bekannt (61–63). Lektinrezeptoren sind entweder als soluble Moleküle oder auf Immunzellen verankerte PRR, die Zucker in Pathogenen binden (64,65). Relevante Vertreter sind hier Siglecs und Galectine, deren Expression durch eine Infektion mit Ad stark beeinflusst wird (66). Außerdem erkennen zytosolische DNA-Sensoren, z.B. NLR (*Nucleotide-like Receptor*), körperfremde DNA und induzieren die Bildung von Inflammasomen, die letztlich Caspase-1-abhängig zur Pyroptose, einer Form des programmierten Zelltods, führen (67,68).

Die Reaktion des angeborenen Immunsystems ist bis zu einem Sättigungsbereich dosis-abhängig (58,69) und vernichtet bis zu 80 % der eingedrungenen Viren innerhalb der ersten 24 h (70). Deutlich versetzt tritt die adaptive Immunantwort ein. Nach 5 – 7 d ist eine Th1-dominante T-Zellreaktion begleitet von einer Interferonantwort nachweisbar (71,72). Eine retrospektive Studie aus dem Jahr 2005 formulierte vor allem die Rekonstitution einer T-Zellantwort als maßgeblichen Faktor für das Überleben eines immunschwachen Patienten mit Ad-Infektion. Bei einigen Patienten konnten bereits vor der Transplantation von allogenen Stammzellen hohe Titer Ad-neutralisierender Antikörper (NAb) gefunden werden. Dennoch kam es teilweise zu disseminierten Infektion mit gleichbleibend niedrigen Lymphozytenzahlen und die Patienten verstarben. Bei kurierten Infektionen kam es parallel zum Ansteigen der Lymphozytenzahl und auch der NAb sowie zum Absinken der viralen Belastung im Blut (73). Entsprechende T-Zellen und auch die gebildeten NAb sind noch lange Zeit nachweisbar. Die Prävalenz von den stark kreuzreaktiven NAb in der Bevölkerung ist dabei regional sehr unterschiedlich. Die verbreiteten Serotypen (z.B. hAd2) erreichen bis zu 80 %, andere (z.B. hAd35) werden überhaupt nicht gefunden (74).

1.1.5. Genomorganisation und Replikation von hAd5

Einmal im Kern angelangt wird das Genom zur nukleären Matrix gebracht. TP formt einen festen Komplex mit dem CAD Pyrimidin Synthese Protein (75,76). Es beginnt die Transkription viraler Gene durch die zelluläre Maschinerie. Das Genom ist in frühe (E1 – E4), verzögerte (IVa2, IX, vaRNA 1 & 2) und späte Gene (L1 – L5) unterteilt. Die Gene der früh exprimierten Kassetten enthalten vor allem Stoffwechselmodulatoren und die Proteine der Replikationsmaschinerie. So interagieren die Genprodukte von E1A mit den Proteinen des NF κ B- und p53-Stoffwechsels, um die Replikation des Virus' zu begünstigen, zellulären Stoffwechsel zu hemmen und Apoptose zu inhibieren (3,77,78). Das 19K-Genprodukt von E1B funktioniert analog zu Bcl-2, indem es auf die Bax-Proteine einwirkt, die p53-aktiviert Apoptose und Nekrose einleiten können (79).

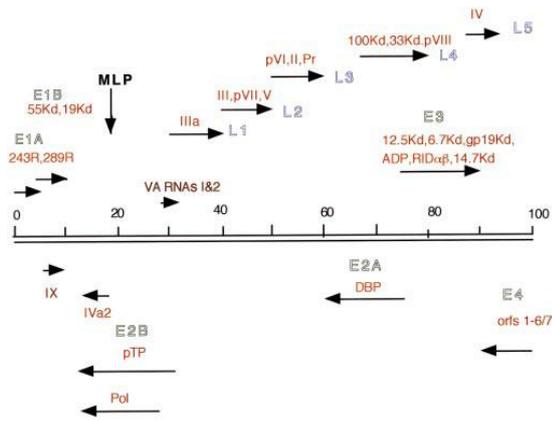


Abbildung 2: Genomorganisation von hAd5. Das Genom von hAd5 ist in frühe, verzögerte und eine spät exprimierte Gene unterteilt. Zunächst werden die frühen Gene E1A, E1B, E2A transkribiert. Deren Genprodukte modulieren den zellulären Stoffwechsel und wirken als Transkriptionsfaktoren für weitere virale Gene. Die Expression der verzögerten Gene, wie z.B. IVa2, ist essentiell für die Aktivierung des MLP, welcher die Transkription der späten Gene reguliert. Abbildung aus (3)

Die E2-Kassetten beinhalten die Gene der replikationsrelevanten Proteine: DNA-bindendes Protein (DBP, E2A), den Vorläufer des TP (pTP) und Pol (beide E2B) (80). Die Proteine, die von E3 kodiert werden, greifen in die Immunreaktion der Zellen ein. Gp19K lokalisiert sich im Endoplasmatischen Retikulum, bindet die schwere Kette des MHC I und verhindert so die Antigen-Präsentation (81). Das *Adenovirus Death Protein* (ADP) vermittelt eine effiziente Zelllyse zur Freisetzung der neu gebildeten Virionen (82). Die E4-Genprodukte inhibieren die Translation zellulärer Proteine und optimieren die virale Expression (83). Verzögert setzt die Expression von IVa2 und IX ein, deren Genprodukte aktivieren den *Major Late Promoter* (MLP), welcher seinerseits die Expression der späten Gene induziert (84,85). Dieser Vorgang ist bestimmt durch komplexe *Splicing-Events*, neue virale Partikel werden im Zellkern verpackt und anschließend die Zelllyse eingeleitet.

1.1.6. Infektion im Tiermodell

Viele verschiedene Studien untersuchten den Gewebetropismus von Adenoviren oder adenoviralen Vektoren *in vivo*, wofür unterschiedliche Tiermodelle herangezogen wurden. Adenoviren sind hoch spezifisch an eine bestimmte Spezies adaptiert und replizieren gewöhnlich nicht in anderen Spezies. So vermehrt sich hAd5 nur bedingt in Mäusen, Meerschweinchen, Murmeltieren (86) oder Baumwollratten (87,88). In Primärzellen von Hunden (89) und Schweinen (86) replizierte hAd5 wiederum gut. Auf Grund ihrer Größe und genetischen Diversität eignen sich diese Tiere allerdings nicht für *proof-of-concept*-Studien. Syrische Hamster wurden erstmals 1988 als permissives Modell für humane Ad beschrieben (90). Dieses erste Modell basierte allerdings auf einem intakten Immunsystem, was für das vorliegende Krankheitsbild, das sich an immunschwachen Patienten nach einer Transplantation orientierte, nicht geeignet war. Erst 2006 wurde dieses erste Modell durch den Einsatz von hAd5 als onkolytisches Virus in Syrischen Hamstern (91) genauer charakterisiert. Das Virus wurde in operativ induzierte, subkutane ektopische Tumore aus Hamsterzelllinien injiziert und später replizierende Partikel in Blut, Leber und Lunge gefunden. In beiden Fällen handelte es sich um immunkompetente Tiere, der Infektionsweg war einmal der natürlichen Infektion über aerosolische Aufnahme nachempfunden und einmal intratumoral eingeleitet.

Im Jahr 2008 wurde ein weiteres Modell vorgestellt, in welchem mit Hilfe pharmakologischer Suppression die Anzahl schnell-teilender Lymphozyten stark vermindert worden war (92). Weibliche Syrische

Hamster wurden im Alter von 5-6 Wochen mit Cyclophosphamid (CP) immunsupprimiert und eine Woche später mit $1,9 \times 10^{12}$ Viruspartikel (vp)/kg hAd5 infiziert. Die gewählte Dosis führte zu einer Mortalität von 50 % bei nicht behandelten Tieren. Nach 6 d konnte im Blut ein Virustiter von ca. 1×10^{10} vp/ml und in der Leber von etwa 6×10^8 vp/mg nachgewiesen werden. Dieser blieb stabil, selbst 18 d *post infectio* (*p.i.*) konnten noch replizierende Viren in der Leber gefunden werden. Der Wert von ALT im Serum war 4 d *p.i.* stark auf 4000 U/L erhöht. Nach 11 d betrug er noch ca. 150 U/L. In jedem Fall war er gegenüber den nicht infizierten Tieren signifikant erhöht, ebenso wie die Mengen von AST und Bilirubin im Serum.

1.1.7. Antivirale Therapien

Eine erfolgsversprechende Standardtherapie gibt es derzeit für immunsupprimierte hAd5-infizierte Patienten nicht. Vielmehr beruhen Behandlungen auf pharmakologischen Ansätzen mit geringer Erfolgsrate, dem Reduzieren der Immunsuppressiva, engmaschiger Überwachung sowie Palliativmedizin (93).

Bei früher Erkennung zeigte sich das Nukleotidanalogen Cidofovir (CDV) teilweise erfolgreich. Nach der Aktivierung durch intrazelluläre Kinasen wird das azyklische Molekül während der DNA-Replikation des Virus statt Cytosin inkorporiert und sorgt für einen Kettenabbruch. So wird die Aktivität der viralen DNA-Polymerase kompetitiv inhibiert, wobei die Affinität von CDV gegenüber der viralen DNA-Polymerase höher ist als zur zellulären (94–96). In klinischen Prüfungen konnte die Wirksamkeit von CDV bei früher Verabreichung nachgewiesen werden, vor allem in Kombination mit Reduktion der Immunsuppressiva. Bei ca. 26 % der behandelten Patienten stellten sich allerdings nephrotoxische Nebenwirkungen ein, deren Symptome auch noch nach dem Absetzen von CDV anhielten. Außerdem wird CDV mit Leukopenie und Neutropenie assoziiert (93,97,98).

Das Lipidkonjugat Brincidofovir (BCV) ist ein Derivat von CDV und birgt gegenüber seinem Vorgänger einige Vorteile. Es ist oral verfügbar und muss nicht intravenös (*i.v.*) verabreicht werden. Außerdem erreichte es eine höhere intrazelluläre Konzentration, gleichzeitig blieb die nephrotoxische Wirkung aus. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien zeigten eine mehr als zehnfache Verringerung der Viruslast bei zwei Dritteln der involvierten Patienten innerhalb einer Woche nach Behandlungsbeginn (7). Weitere Prüfungen bezüglich der Wirksamkeit von BCV gegenüber fünf verschiedenen Virusfamilien mit doppelsträngigem DNA-Genom werden derzeit durchgeführt.

Kürzlich wurden vorläufige Ergebnisse der offenen, multi-zentrischen Studie AdVise (Phase III) veröffentlicht. Diese betrachtete den Behandlungserfolg von BCV in Kindern und Erwachsenen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation und asymptomatischer/limitierter oder disseminierter Ad-Infektion. In der Kohorte mit systemisch vorkommenden Adenoviren wurde nach 60 d eine Sterblichkeit von 19 % in pädiatrischen und 43 % in erwachsenen Patienten ermittelt. Eine schnelle virologische Antwort auf die BCV-Therapie in Form von einer mindestens 100-fachen Reduktion von Virusgenomkopien im Blut oder nicht detektierbarer Virämie nach 4-6 Wochen führte zu einer signifikant verbesserten Überlebenschance 24 Wochen nach Behandlungsbeginn. 75 % der Kinder und 54 % der Erwachsenen, die als *Responder* klassifiziert worden waren, überlebten bis dahin, aber nur 29 % bzw. 15 % der *Non-Responder*. Bei 20 % der Kinder bzw. 29 % der Erwachsenen musste die Behandlung auf Grund von Nebenwirkungen abgebrochen werden. Zu den am häufigsten beobachteten zählten Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts; tödliche Ausgänge wurden durch Multiorganversagen, akute Abstoßungsreaktionen und Versagen des respiratorischen Trakts induziert. Nicht bekannt ist die Erfolgschance der Behandlung, also das Verhältnis von *Respondern* zu *Non-Respondern* (10).

Das Nukleosidanalogon Ribavirin zeigte vereinzelt Erfolge in der Behandlung von Ad-Infektion. In groß angelegten Studien konnte allerdings kein statistischer Zusammenhang hergestellt werden (99).

Größere Erfolge konnten mit der Transplantation von T-Zellen errungen werden. Als Risikofaktor für schwere und tödliche Verläufe der Ad-Infektion gelten die Unterdrückung einer T-Zellantwort und eine Anzahl von Lymphozyten von weniger als 300 pro Mikroliter im Blut. Eine *ex vivo* expandierte, autologe oder allogene T-Zellspende kann die Anzahl der Ad-reaktiven T-Zellen erhöhen und zum Beseitigen der Infektion beitragen. Eine Vielzahl von Studien bemüht sich derzeit die enormen Produktionszeiträume und -kosten dieser hochgradig personalisierten Behandlung zu verringern. In ersten klinischen Versuchen deuteten sich bereits Erfolge an, aber auch hier blieben letale Ausgänge nicht aus (1,73,100–104).

1.2. RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein hochgradig konservierter Vorgang post-transkriptionaler Genregulation, der erstmals 1998 formuliert worden ist (105). Die Wissenschaftler Fire und Mello erhielten für diese richtungsweisende Leistung im Jahr 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (106).

RNAi wird ausgelöst durch kurze, doppelsträngige RNA-Abschnitte, die sequenzspezifisch zum Abbau einer *Messenger* RNA (mRNA) oder zur Unterdrückung der Translation führen. Initial wurde der Prozess in den Nematoden *C. elegans* gezeigt (105), bis heute wurde er als Teil der angeborenen, antiviralen Immunabwehr in Pflanzen (107), Wirbellosen (108) und kürzlich auch in Säugern nachgewiesen (109,110).

Kurze RNAs werden in unterschiedliche Gruppen unterteilt: microRNAs (miRNA), *short interfering* RNAs (siRNA) und Piwi-interagierende RNAs (piRNAs). Letztere sind 25 – 33 Nukleotide (nt) lange RNAs, die von speziellen *Clustern* vorrangig während der Spermatogenese exprimiert werden. Sie wirken in Assoziation mit Piwi-Proteinen und sind essentiell für die Inhibierung von Retrotransposons und anderer repetitiver Elemente (111), die die Integrität des Genoms zerstören können. Im Gegenzug dazu sind miRNAs und siRNAs verantwortlich für die Regulation somatischer Genexpression. Beide werden endogen gebildet und ihre Reifung verläuft in ähnlichen Bahnen. Eine siRNA ist 21 – 25 nt lange RNA, die von einer Haarnadelstruktur (*short hairpin* RNA, shRNA), bestehend aus einer *sense* und einer *anti-sense* Sequenz verbunden durch eine Schleife, ausgeschnitten wird. Das Resultat ist ein doppelsträngiger Abschnitt mit jeweils 2 nt Überhang am 3'-Ende. Der Doppelstrang wird vom DICER-Proteinkomplex gebunden und der *Passenger* Strang abgebaut (112). Die Wahl des *Guide* und *Passenger* Strangs wird nach Gesichtspunkten der Thermodynamik getroffen; der am 5'-Ende weniger stabile Strang wird durch das Argonauten-Protein Ago2 abgebaut (113,114). Die siRNA aktiviert den RISC (*RNA-induced silencing complex*) und bindet sequenzspezifisch mit perfekter Komplementarität eine mRNA. Ago2 vermittelt als Bestandteil des RISC einen Schnitt der mRNA an der Position des 10. und 11. Nukleotids der siRNA. Anschließend wird die mRNA durch intrazelluläre Exonukleasen abgebaut (115). Der *Silencing* Komplex steht für weitere Reaktionen zur Verfügung.

Die Existenz von endogenen siRNAs in Wirbeltieren wurde lange diskutiert und kürzlich mit Hilfe von Sequenzierungstechnologien gezeigt. Es konnten DICER-Produkte ermittelt und dem Genom der Zelle zugeordnet werden (116).

Eine miRNA ist eine 21 – 23 nt lange RNA, die ähnlich wie siRNAs mehrere Reifeschritte durchläuft. Die primären Transkripte, pri-miRNAs, werden von RNA-Polymerase II (RNA Pol) gebildet (117) und im Zellkern mit einem 5'-*Cap* und 3'-poly-A-Schwanz versehen (118). Dieser doppelsträngige *Stem Loop* wird

von DROSHA-DGCR8 zu einer pre-miRNA prozessiert (119,120) und anschließend von Exportin-5 ins Zytoplasma gebracht (121). Die pre-miRNA wird in DICER eingeschleust, auf Grund des *Mismatches* zwischen *anti-sense* und *sense* Strang wird allerdings Ago2 nicht aktiviert. Der *Passenger* Strang wird ins Zytoplasma entlassen.

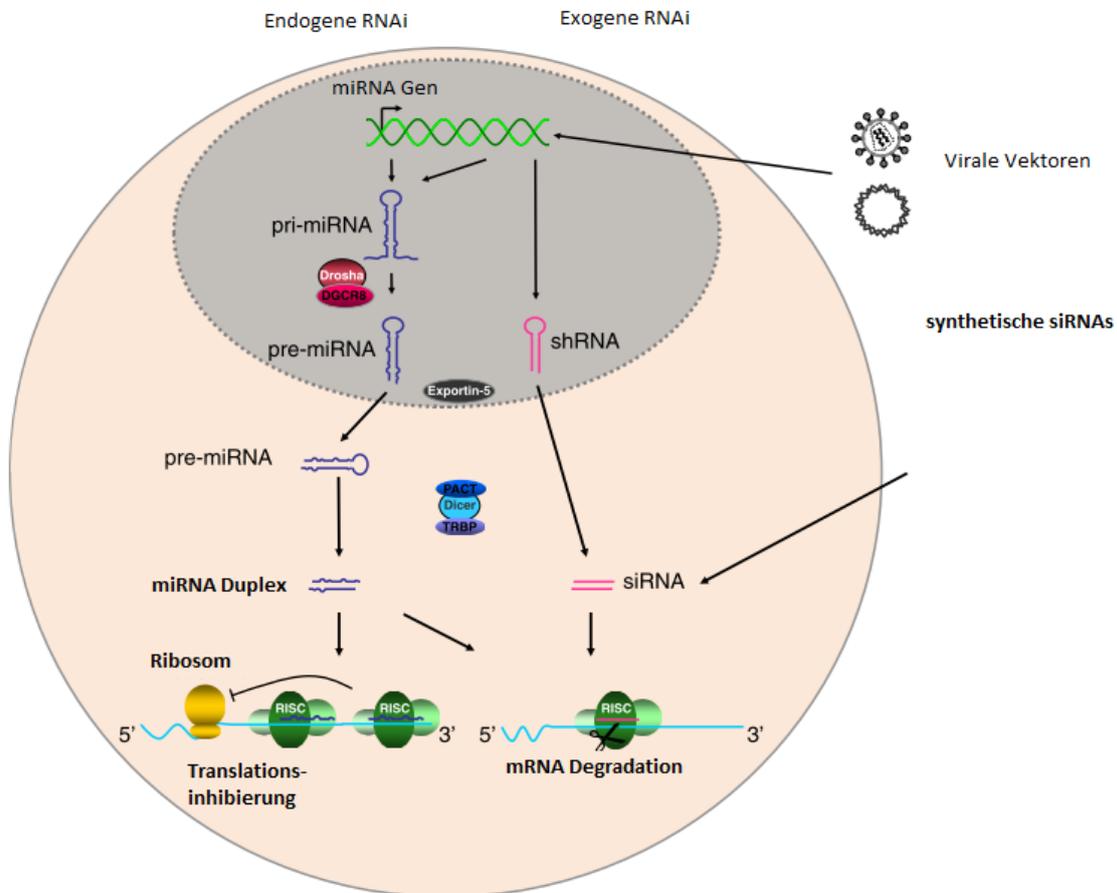


Abbildung 3: Prinzipien der endogenen und exogenen RNAi. Endogene miRNAs werden wie protein-kodierende Gene transkribiert und mit 5'-Cap und 3'-poly-A-Signal versehen. Pri-miRNAs werden von Drosha zu pre-miRNAs geschnitten und von Exportin-5 aus dem Zellkern herausgeschleust. Im Zytoplasma werden sie von DICER in Duplexe geschnitten und in den RISC inkorporiert. Exogene RNAi wird entweder durch Vektoren, die eine Transgenkassette in den Kern liefern, oder die Applikation reifer siRNAs induziert. Bei vollständiger Komplementarität der in RISC inkorporierten siRNA oder miRNA wird die korrespondierende mRNA degradiert, besteht ein Mismatch, wird die Translation inhibiert. Abbildung aus (122)

Mit Hilfe der miRNA werden nun ebenfalls mRNAs gebunden. Die korrespondierenden Zielsequenzen (*Target Site*, TS) befinden sich in der nicht translatierten Bereich des 3'-Endes (3'-UTR) der betreffenden mRNA, vollständige Komplementarität zur miRNA ist nicht notwendig, solange die Sequenzen im *Seed*-Bereich der miRNA übereinstimmen. Dieser befindet sich zwischen dem zweiten und siebten Nukleotid der 5'-Seite der miRNA (123). Weil die Sequenzen nicht in der gesamten Länge übereinstimmen müssen, wird auch hier Ago2 nicht aktiviert, die mRNA nicht geschnitten und abgebaut. Die Re-

pression der Translation geschieht vielmehr durch *Decapping*, Deadenylierung oder Abbau durch Exonukleasen (124). Daraus resultieren mehrere Eigenschaften des miRNA-vermittelten Gensilencings. Zum Einen können miRNA mehrere Transkripte regulieren, oft sind diese miteinander assoziiert, bspw. in einem Stoffwechselweg. Zum Anderen können verschiedene miRNAs dasselbe Transkript inhibieren, man spricht von miRNA-Familien. Je höher der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA ist, desto wahrscheinlicher ist die Aktivierung von Ago2 und damit ein siRNA-ähnliches *Silencing*. Auch umgekehrt müssen inkorporierte siRNAs nicht zwangsläufig ausschließlich vollständig komplementäre Sequenzen binden; es kann eine miRNA-ähnliche Inhibierung stattfinden (125). All diese Prozesse bedeuten letztlich, dass potentiell ungewollte Nebeneffekte an anderen Transkripten auftreten können. Zusätzlich zu diesen sequenzbasierten gibt es auch unspezifische Nebeneffekte, die durch mangelnde Bereitstellung endogener miRNAs auftreten (126). Bei der Expression von ektopten miRNAs oder siRNAs konkurrieren diese mit den endogenen um die zelluläre Maschinerie. Bei sehr starker Expression, wie sie bei RNA Pol III-bereitgestellten siRNAs der Fall ist, wird die die Herstellung essentieller endogener miRNAs so stark reduziert, dass es zu zelltoxischen Auswirkungen kommt (126,127).

Im direkten Vergleich werden miRNAs deutlich schwächer exprimiert als siRNAs. Das liegt vorrangig an der Expression durch RNA Pol II. Der Effekt in der Genregulation zeigte sich dennoch vergleichbar, was experimentell belegt werden konnte (126). Die potentiellen *Off-Target*-Effekte sind jedoch bei miRNA-Anwendungen größer. In der Gentechnik hat sich also eine neue Variante etabliert, die die Vorteile beider Methoden vereint: artifizielle microRNAs (amiR). Synthetische siRNA-Sequenzen werden in natürliche Expressionsumgebungen von pri-miRNAs eingebettet und intrazellulär gebildet. Die wirksame *anti-sense* Sequenz ist dabei vollständig komplementär zur Ziel-mRNA. Neben der schwächeren, nicht toxischen Expression bieten sich weitere Vorteile. Während siRNAs durch RNA Pol III ubiquitär gebildet werden, kann die Expression durch gewebespezifische RNA Pol II-Promotoren eingeschränkt werden. Gleichzeitig kann ein Reportgen als Marker kodiert und die Expression durch die Verwendung von Tet-Systemen regulierbar gestaltet werden. Ähnlich der natürlichen Ablesung von miRNAs als *Cluster* können auch mehrere amiRs von einem Transkript exprimiert werden (128).

In der Gentechnik findet RNAi auf unterschiedlichste Weise Anwendung. Ihr Nutzen ist sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der Formulierung neuer therapeutischer Ansätze unumstritten. Jedes Transkript – proteinkodierend oder nicht – kann Ziel einer Regulation durch RNAi sein, endogene miRNA eingeschlossen. So wurden vielfach Funktionsstudien für Gene und miRNAs (129,130) durchgeführt, aber auch korrespondierende miRNA-TS eingesetzt, um unerwünschte Prozesse durch natürliche, stark exprimierte miRNAs unterbinden zu lassen. Auf diese Weise kann ein Vektor-*Detargeting* vorgenommen werden, um den Tropismus eines viralen Partikels zu verändern, Transgenexpression aus bestimmten Organen zu eliminieren (131) oder auch die Replikation von onkolytischen Viren auf einen Tumor zu begrenzen (128,132). Ein derart attenuierter Vektor mit verringertem Toxizitätsprofil kann auch für Vakzinierungszwecke verwendet werden (133).

Darüber hinaus kann antivirale Therapie mit Hilfe von RNAi durchgeführt werden. Hier sind die viralen Transkripte das direkte Ziel. Synthetische siRNAs werden entwickelt, um die Expression essentieller viraler Gene zu regulieren. Dieser Weg wird häufig eingeschlagen, wenn es keine standardisierte pharmakologische Therapie gibt und die Auswirkungen der Infektion schwerwiegend sind. Der Ansatz zeigte sich in verschiedenen Studien bereits erfolgreich in der Inhibierung von Adenovirus (128,134–137), Coxsackievirus B3 (138), HIV-1 (122), Tollwutvirus (139), Porcines Reproduktives und Respirato-

risches Syndrom (140), Influenza A (141), Hepatitis C (142) und Respiratorisches Synzytial-Virus (143,144). Letztere Behandlung durchlief bereits eine klinische Prüfung der Phase II (145), obwohl die Ergebnisse vielversprechend waren, wurde die Studie zunächst nicht fortgesetzt.

1.2.1. Behandlung einer Adenovirusinfektion mit RNAi

In der ersten Studie, die einen RNAi-basierten Ansatz gegen Ad-Infektionen betrachtete, wurden fünf siRNAs entwickelt, deren Zielsequenzen in verschiedenen Bereichen der E1A mRNA lagen. Die zwei besonders wirksamen reduzierten den Gehalt der mRNA um 60 % bzw. 70 % und die Bildung von Virusnachkommen mindestens 3.000-fach (146). Nachfolgend wurden auch andere Gene für eine Regulation in Betracht gezogen. Neben E1A wurden siRNAs gegen die mRNA von Hexonprotein und IVa2 entwickelt (136). Von mehreren siRNAs pro Target inhibierte die jeweils effizienteste die Expression der entsprechenden viralen mRNA um ca. 75 %. Der Effekt der siRNAs auf die Bildung neuer Virionen war allerdings sehr unterschiedlich. Bei geringen Konzentrationen inhibierten siVa2 und siHexon die Bildung von Virionen um ca. 90 %; dagegen bewirkte siE1A keine signifikante Verringerung. Auch drastische Erhöhung der verwendeten Mengen von siRNAs führte nicht zu einem Angleichen der Effekte. Allerdings hatte die Inhibierung von E1A einen positiven Effekt auf das Zellüberleben. Nur wenn gleichzeitig E1A und ein weiteres virales Gen attackiert wurden, waren hAd5-infizierte Zellen effizient vor viral induzierter Lyse geschützt. Kurz darauf wurde eine Studie publiziert, in der noch weitere Gene als potentielle Ziele für RNAi involviert waren (135). Zusätzlich zu E1A, Hexonprotein und IVa2 wurden siRNAs gegen die mRNAs der DNA-Polymerase, Protease und pTP entwickelt. Aus mehreren Alternativen wurde wiederum die wirksamste ausgewählt und im Anschluss die Wirksamkeit der Regulation der verschiedenen Gene in Bezug auf die Virusreplikation untersucht. Die mRNAs der Zielgene wurden um 79 – 97 % reduziert, aber auch die mRNAs der Gene, die nicht inhibiert worden waren, wurden vermindert gefunden. Dieses Resultat korrelierte nur teilweise mit einer gesunkenen Anzahl viraler Nachkommen, war also nicht nur auf die insgesamt reduzierte Virusmenge zurückzuführen. Als besonders ungünstig erwies sich die Inhibierung der mRNA der Prot. Obwohl die Expression der mRNA sowie aller anderen untersuchten mRNAs hoch signifikant verringert worden war, wurden ähnlich viele neue Viruspartikel gebildet wie bei Kontroll-siRNA-behandelten Zellen. Die Inhibierung von Pol erwies sich als vielversprechend in Bezug auf Reduktion von mRNA und auch Virustiter. Additive Effekte durch die Kombination verschiedener siRNAs konnten nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf die Zellviabilität konnte nur siE1A auch ohne die Inhibierung weiterer viraler Gene zur beinahe vollständigen Erholung von infizierten Zellkulturen führen.

Im Nachfolgeprojekt derselben Gruppe wurden siRNAs als amiR verpackt und von adenoviralen Vektoren exprimiert. Es wurden mehrere amiRs gegen E1A, Pol und pTP entworfen, welche weitestgehend auf den siRNA-Sequenzen der Vorarbeiten beruhten (134). Überraschend war die zuvor von Kneidinger et al. als effizienteste siRNA (siPol) (135) identifizierte, als amiR nur noch begrenzt effektiv. Als wirkungsvoller stellte sich amiR-pTP heraus. Durch Verkettung mehrerer Expressionsumgebungen konnte der Effekt um ein 16-faches verstärkt werden, sodass das Level viraler DNA um 97,6 % sank (134). Die Expression von adenoviralen Vektoren war gewählt worden, weil diese dieselben Gewebe und Zellen infizieren konnten, wie das zu Grunde liegende Vollvirus. Eine Infektion mit Adenoviren bei gleichzeitiger Transduktion mit dem Vektor bewirkt eine Replikation des Vektors, was zur erhöhten Bereitstellung von amiRs führt.

In einer aktuellen Arbeit wurde untersucht, ob die Kombination von CDV, siRNAs und der solublen Virusrezeptorfalle sCAR additive Effekte auf die Virusinhibierung bewirkte (137). Es wurden mit

siE1A_4 und siVa2_2 (136) sowie siPol_2 (135) die jeweils erfolgreichsten siRNAs der jeweiligen Studien von Eckstein und Kneidinger benutzt. Eine Kombination mehrerer siRNAs bei konstanter Gesamtkonzentration erzeugte keine verbesserte Inhibierung, auch die dreifache Kombination aller siRNAs erreichte nicht das Potential der siPol allein. Die Kombination mit sCAR bewirkte in jedem Fall eine weitere signifikante Verringerung viraler DNA. Gemeinsam mit CDV konnte die virale DNA noch einmal signifikant um insgesamt 99,7 % reduziert werden (137).

1.3. Transgenbereitstellung mit viralen und nicht-viralen Vektoren

Das beherrschende Problem im Design der potentiellen Therapien ist das gerichtete und gesicherte Bereitstellen der funktionalen Moleküle in den gewünschten Zielzellen. Die Verabreichung von „nackten“ Nucleinsäuren ist nur begrenzt erfolgreich, z.B. für Erkrankungen am Auge (147) oder der Lunge (143,144). Gelangen sie in die Blutbahn, werden sie dort zügig von extrazellulären Nucleasen degradiert. Eine chemische Modifikation kann diesen Prozess retardieren, ohne die Potenz der siRNAs zu verringern (148). Darüber hinaus kommt es zu einer massiven Ausdünnung der verabreichten siRNAs/amiRs durch die notwendige Überwindung diverser physikalischer Barrieren, wie z.B. Endothelien oder Schleimhäute (38). Ideal wäre also ein Vektor, der zielgerichtet die betroffenen Zellen erreicht, dort die siRNAs oder amiRs in ausreichender Menge bereitstellt und keine Nebenwirkungen provoziert, sei es durch eine immunogene Reaktion auf den Vektor selbst oder *Off-Target*-Effekte durch die Nucleinsäure. Gegenwärtig werden verschiedene Ansätze verfolgt, dieses Ziel zu erreichen. Es werden virale und nicht-virale Vektoren sowie zunehmend Nanopartikel verwendet; jede Methode hat dabei individuelle Vor- und Nachteile.

Als Nanopartikel bezeichnet man einen Komplex aus Nucleinsäuren und einem weiteren Agens, das entweder Polymer- oder Lipid-basiert oder eine Kombination von beidem sein kann. Ein Beispiel für ein Polymer ist Polyethylenimin (PEI), welches stark positiv geladen ist. Es verbindet sich mit den anionischen Nucleinsäuren zu einem Polyplex und wird per Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die hohe Kapazität für Protonenpufferung verhindert die Degradierung der RNA im Endosom. Auf Grund der hohen Ladungsdichte werden die Polyplexe allerdings mit toxischen Effekten assoziiert (149). Ein verbessertes Sicherheitsprofil ergibt sich durch die Verwendung ungeladener Makromoleküle, z.B. von Cyclodextrin, einem zyklischen Glukosepolymer (150). Ein durch die FDA (Food and Drug Administration of the USA) zugelassenes Verfahren ist die Verwendung von Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA), einem Milchsäurederivat, das auch zur Herstellung von chirurgischem Nahtmaterial benutzt wird. Hier werden keine Polyplexe gebildet, sondern Nano- oder Mikropartikel mit Nucleinsäuren beladen. Dieser Vorgang ist oft wenig effizient, wie auch die Aufnahme in die Zelle (151). Die Verwendung von Lipid-basierten Nanopartikeln, wie z.B. Lipofectamin, ist nur begrenzt geeignet. Die hohe Immunogenität bei unspezifischer Verteilung der transportierten Nucleinsäuren stellen unvorteilhafte Parameter dar (152).

Plasmide als nicht-virale Vektoren wurden lange Zeit in Kombination mit Elektroporation *in vitro* (153) und *in vivo* (154) verwendet. Die Methode ist allerdings im Vergleich zu anderen wenig effizient. Die Expression von siRNAs kann aber für bis zu drei Monate nachgewiesen werden (154).

1.3.1. Transgenbereitstellung mit Adeno-assoziierten Virusvektoren

Auf Grund der Defizite der übrigen Methoden sind virale Vektoren seit langer Zeit im Fokus der Forschung. Für die Transgenlieferung mit eukaryontischen, viralen Vektoren stehen dreierlei Möglichkeiten zur Verfügung: lentivirale, adenovirale und Adeno-assoziierte Virusvektoren. Jedes System birgt individuelle Charakteristika und Risiken in der Anwendung.

Lentiviren gehören zu Familie der *Retroviridae* und enthalten eine Plusstrang-RNA, welche diploid in ein behülltes Viruskapsid verpackt wird (155). Die RNA wird nicht als Matrize für die direkte Proteintranslation genutzt, sondern zunächst in cDNA umgeschrieben, welche dann in den Zellkern transportiert und dort ins Genom der Wirtszelle integriert wird. Die anschließende Transkription und Translation werden von zellulären Proteinen bewerkstelligt. Lentiviren haben keinen lytischen Lebenszyklus; neu gebildete Partikel werden über Knospung in den extrazellulären Raum entlassen (156). Replikationsdefiziente lentivirale Vektoren sind geeignet, große und komplexe Gene für lange Zeit stabil zu exprimieren. Die Kapazität erreicht ca. 9,3 kb (157) und in *in vivo*-Studien konnten neben Leukozyten auch Hepatozyten, Neuronen und Myozyten transduziert werden (158–161). Problematisch sind die Immunreaktion auf die Vektorpartikel nach der Transduktion (162), genotoxische Veränderungen durch Integrationsläsionen (163) und epigenetische Veränderungen. Bei letzteren ist der Effekt bisher nicht abschätzbar (164). Maligne Transformationen sind in vielen Tiermodellen und auch in humanen Patienten beschrieben worden (165–168).

Adenovirale Vektoren teilen den Tropismus von Adenoviren und eignen sich für die transiente Expression von bis zu 35 kb doppelsträngiger DNA (169). Wie auch bei den lentiviralen Vektoren (170) wurden bis auf *in cis* agierende Verpackungssignale alle viralen Gene entfernt, für die Anzucht der „gutless“ Vektoren müssen diese *in trans* zur Verfügung gestellt werden (169). Das Genom wird ebenfalls in den Zellkern eingeschleust, liegt dort allerdings episomal vor (171). Auch bei adenoviralen Vektoren kommt es zu einer Reaktion des Immunsystems, welche vor allem von den Kapsidproteinen ausgelöst wird (54). Auf Grund der starken Sequestrierung durch die Kupffer-Zellen sind immer große Dosen erforderlich, die wiederum starke Immunreaktionen bis hin zu tödlichen Ausgängen provozieren (172,173). Trotz der Risiken beruhen ca. 21,2 % aller gentherapeutischen Studien in klinischen Phasen auf der Applikation von adenoviralen Vektoren (174).

Adeno-assoziierten Virusvektoren basieren auf Adeno-assoziierten Viren (AAV), welche zum Genus Dependovirus der Familie der *Parvoviridae* gehören. Deren Replikation ist abhängig von der Koinfektion mit einem Helfervirus, z.B. Adenovirus oder *Herpes simplex*. In Abwesenheit des Helfervirus ruhen AAV. Sie bestehen aus einem unbehüllten, ikosaedrischen Kapsid, welches eine 4,7 kb große, einzelsträngige DNA enthält. Diese wird eingefasst von invertierten Sequenzen (Inverted Terminal Repeats, ITR) (175). Nach der Rezeptor-vermittelten Infektion einer Wirtszelle über Endozytose (176) wird das Genom nach endosomalem *Escape* in den Zellkern geschleust, wo es weiterhin extrachromosomal vorliegt (177). Es erfolgt eine Zirkularisierung; es werden Konkatemere mit großer molekularer Masse gebildet (178). Vereinzelt kann es zu Integration in das Wirtsgenom kommen. Die Integration kann in allen Chromosomen erfolgen, wobei Bereiche mit offenem Chromatin bevorzugt werden. Für AAV-Wildtypen sind bestimmte *Hot Spots*, z.B. im Chromosom 19, bekannt, AAV-Vektoren unterliegen einem zufälligen Integrationsmuster (179,180). Die Frequenz der Integration liegt bei ca. $0,2 - 1 \times 10^{-3}$ pro infektiösem Genom. Da AAV-Vektoren oft in großem Überschuss eingesetzt werden, können bis zu 80 % der Wirtszellen die Vektor-DNA in ihr Genom aufnehmen. Die Frequenz der Integration liegt

deutlich unter der von lentiviralen Vektoren, bei denen der Prozess obligatorisch ist, aber über der von adenoviralen Vektoren (ca. 10^{-4} – 10^{-6} pro infektiöses Genom) (175).

Ist die Transgen-DNA in den Zellkern gelangt, erfolgt zunächst die Zweitstrangsynthese (181). Erst im Anschluss daran beginnt die Transkription. Vektoren mit selbst-komplementärem Genom (*self complementary*, scAAV) enthalten eine Mutation in einer ITR, was zur Faltung der DNA und Verpackung zweier Stränge führt (182). Die Transgenexpression setzt früher ein, weil keine Zweitstrangsynthese notwendig ist (183). Im Gegenzug wird die ohnehin geringe Kapazität der Vektoren noch einmal halbiert. Weil die Transgenkassette als einziges virales Element die ITRs enthält, kann sie problemlos in Kapside anderer Serotypen verpackt werden. Diese Pseudotypen enthalten beispielsweise die ITRs von AAV2 und die Verpackungsproteine von AAV6. Der resultierende Vektor wird mit AAV2/6 bezeichnet (184).

AAV sind immunogen, verursachen aber keinerlei human-pathogene Symptome. Sie infizieren je nach Serotyp eine große Anzahl an Geweben mit teilenden und nicht-teilenden Zellen, in denen sie sehr effizient persistieren können (185). Die Prävalenz von neutralisierenden Antikörpern ist unterschiedlich; für AAV2 beträgt sie 72 %, für AAV9 47 % (186). Vektoren, die die Kapsidproteine dieser Serotypen aufweisen, werden vom Immunsystem erkannt und bekämpft. Von AAV2 und AAV8 sind Epitope bekannt, die eine T-Zellantwort induzieren (187,188). Eine Möglichkeit zur Immunevasion ist die Erzeugung artifizierlicher Serotypen durch gerichtete Mutagenese. Durch so genanntes Kapsid-*Shuffling* können Pseudotypen-Pools generiert werden, die zufällig verschiedene Komponenten unterschiedlicher Serotypen enthalten können. Sie werden *in vitro* erzeugt (189), selektiert (190), aufgereinigt und charakterisiert. Diese Vektor-Chimären entgehen verstärkt neutralisierenden Antikörpern (NAb) *in vitro* und *in vivo* (191,192), der Tropismus ist ebenfalls verändert und muss für jede Chimäre neu definiert werden. Eine weitere Option ist die Verwendung von „leeren“ Decoy-Kapsiden. Diese enthalten keine DNA und konkurrieren mit den Transgen-tragenden Kapsiden um die NAb. Die Wahrscheinlichkeit, die gewünschten Zielzellen effizient zu transduzieren, erhöht sich (193).

AAV-Vektoren wurden und werden in zahlreichen klinischen Studien eingesetzt, um Transgene in verschiedenen Organen bereitzustellen. Ansätze zur Therapie von Hämophilie B (194,195), zystischer Fibrose (196) und auch Alzheimer (197–199) wurden bereits untersucht. Ihnen gemein ist das gute Sicherheitsprofil, erkennbar durch die Abwesenheit von Nebenwirkungen, sowie die monatelange Expression des Transgens. Vor allem aber die AAV2-basierten Therapien bewiesen sich als unwirksam. Im Jahr 2012 wurde mit AAV1-LPL^{S447X} erstmals eine Gentherapie durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) zugelassen, welche die Behandlung von Lipoprotein-Lipase-Defizienz ermöglicht (200).

1.4. Ziel der Arbeit

Eine Infektion mit hAd5 verläuft in der Regel mild und ist in wenigen Wochen auskuriert. Trifft es jedoch einen immunschwachen Patienten, sind die Perspektiven deutlich schlechter. Betroffen sind vor allem Kinder nach Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder soliden Organen. Diese erwarten einen deutlich schwereren Verlauf, oft disseminiert die Infektion und der Tod durch Multiorganversagen kann die Konsequenz sein. Eine erfolgversprechende, standardisierte pharmakologische Behandlung gibt es derzeit nicht, empfohlen wird die Gabe von Nukleotidanaloga, die teilweise Reduzierung der Immunsuppressiva sowie unterstützende Palliativtherapie.

In der experimentellen Forschung sind in den vergangenen Jahren vielversprechende Fortschritte im Bereich der Pharmakologie und der Gentherapie erarbeitet worden, welche neue Perspektiven eröffnen. Auch wenn die Ergebnisse der klinischen Prüfungen von BCV bereits Positives erhoffen lassen, bildet diese Behandlungsmöglichkeit noch immer keine breit anwendbare Basis. Wie bei vielen anderen Chemotherapien gibt es eine Gruppe von Patienten, die auf das Medikament nicht ansprechen. Auch die Transplantation von autologen oder allogenen T-Zellen stellt eine Option dar. Auf Grund der langen Produktionszeiträume und hohen Kosten ist sie aber im Moment nur eine Einzelfalllösung und keine massentaugliche Variante.

Der gentherapeutische Ansatz mittels RNAi hat in verschiedenen *in vitro*-Studien bereits erste Erfolge erbracht. Verschiedene adenovirale Gene wurden mit Hilfe von siRNAs oder amiRs inhibiert. Bisher gibt es aber noch kein Expressionssystem, welches risikoarm die Expression der RNA gewährleisten kann. Außerdem wurde eine Behandlung basierend auf RNAi noch nie in einem permissiven Tiermodell beschrieben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine anti-adenovirale Therapie mit Hilfe von RNAi zu erarbeiten. Hierfür werden verschiedene siRNAs mit unterschiedlichen Zielgenen im viralen Genom aus den bereits publizierten Studien von Gürlevik et al. (128), Kneidinger et al. (135), Eckstein et al. (136) und Ibrisimovic et al. (134) übernommen, teilweise modifiziert und als amiR verwendet. Diese amiRs werden dann von AAV *in vitro* exprimiert und in Bezug auf ihre Fähigkeit virale Replikation zu inhibieren und die Zellviabilität infizierter Kulturen zu erhöhen analysiert.

Die wirksamsten amiRs werden ausgewählt und Kombinationsvektoren erstellt, welche in unterschiedlicher Konfiguration jeweils mehrere kodierende Sequenzen derselben oder unterschiedlicher amiRs enthalten. Zwei Vektoren werden anschließend in einem permissiven, immunsupprimierten Tiermodell hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials untersucht.

2. Material

2.1. Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

| Substanz | Hersteller |
|-------------------------------------|--|
| EDTA | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Tris-EDTA | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| dNTPs | Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH |
| PEG 8000 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Agarose, low gelling temperature | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Universal-Agarose | Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH |
| Kristallviolett | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| DMSO | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Hydrocortison | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Humanes Insulin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| PBS 1x | PAA Laboratories GmbH |
| PBS 10x | PAA Laboratories GmbH |
| Trypsin 0,25 %/EDTA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Natriumpyruvat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| SDS | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol | Fisher Scientific GmbH |
| Ethanol | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Iso-Propanol | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| DEPC-gereinigtes Wasser | Fisher Scientific GmbH |
| Iodixanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Magnesiumchlorid, MgCl ₂ | Carl Roth GmbH & Co. KG |

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| Kaliumchlorid, KCl | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Natriumchlorid, NaCl | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Polyethylenimin, PEI | Polysciences Europe |
| Triton-X | Carl Roth GmbH & Co. KG |
| Hepes | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| NP40 Lysepuffer | VWR International GmbH |
| Cäsiumchlorid, CsCl | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |
| Bovines Serumalbumin, BSA | Carl Roth GmbH & Co. KG |

2.2. Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|---|--|
| T4 DNA Ligase | New England Biolabs GmbH |
| DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragment | New England Biolabs GmbH |
| Alkaline Phosphatase | New England Biolabs GmbH |
| DNase I | New England Biolabs GmbH |
| Benzonase | Merck KGaA |
| Pfu Ultra Polymerase | Agilent Technologies |
| Taq Polymerase | Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH |
| Restriktionsendonukleasen, diverse | New England Biolabs GmbH |
| Taq DNA PolymeraseDNA-Polymerase | Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH |
| Calf Intestine Phosphorylase (CIP) | New England Biolabs GmbH |

2.3. Reagenzsysteme

Tabelle 3: Verwendete Reagenzsysteme

| Reagenzsystem | Hersteller |
|--|------------------------|
| Cell Proliferation Kit (XTT) | Roche Diagnostics |
| peqGOLD Plasmid Mini Kit | VWR International GmbH |
| Plasmid Plus Midi Kit | QIAGEN GmbH |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | QIAGEN GmbH |
| EndoFree Plasmid Mega Kit | QIAGEN GmbH |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Fisher Scientific GmbH |
| QIAQuick Gel Extraction Kit | QIAGEN GmbH |
| Dual-Luciferase Reporter System | Promega GmbH |
| TRIzol® Reagent | Fisher Scientific GmbH |
| Tissue DNA Mini Kit | VWR International GmbH |
| AST (GOT) Liquid Stable Reagent | Fisher Scientific GmbH |
| ALT (GPT) Liquid Stable Reagent | Fisher Scientific GmbH |
| Custom Design microRNA TaqMan Assay | Fisher Scientific GmbH |

2.4. Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Puffer und -konzentrate

| Lösung | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------------------|
| 10x Phosphate Buffered Saline (PBS) | PAA Laboratories GmbH |
| SsoFast EvaGreen Supermix 2x | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| TAE | Carl Roth GmbH & Co. KG |

TBS: 1,5 M NaCl, 30 mM KCl, 250 mM Tris-EDTA

PBS-T: 1x PBS, 0,1 % Tween-20

PBS-MK: 1x PBS, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl

2.5. Nukleinsäuren

2.5.1. DNA-Größenstandards

Tabelle 5: Verwendete DNA-Größenstandards

| DNA-Größenstandard | Hersteller |
|--------------------|--------------------------|
| 100 bp-Marker | New England Biolabs GmbH |
| 1 kb-DNA ladder | VWR International GmbH |
| 2-log DNA ladder | New England Biolabs GmbH |

2.5.2. Oligonukleotide

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' |
|----------------------|---------------------------------|
| miR-extraction 2 s | GTCAAGGCCGCATCTCGAG |
| miR-extractions 2 as | CCATGAGGCCCAGATCGAT |
| GFP intern s | CCGCACCTTCACCAAGTACC |
| bGH-4265-ClaI as | GTTATCGATTAGACCCCAGCTGGTTCTT |
| GFP 1121 s | ACATCAACCTGATCGAGGAG |
| amiR-E1A_1-TS s | TCGAGCCTTTGGACTTGAGCTGTAAAGTTT |
| amiR-E1A_1-TS as | AAACTTTACAGCTCAAGTCCAAAGGC |
| amiR-E1A_2-TS s | TCGAGCTGTGTCTAGAGAATGCAATAGTTT |
| amiR-E1A_2-TS as | AAACTATTGCATTCTCTAGACACAGC |
| amiR-E1A_3-TS s | AAACAAAATCTGCGAAACCGCCTCCC |
| amiR-E1A_3-TS as | TCGAGGAAGGGATTGACTTACTCACTGTTT |
| amiR-E1A_4-TS s | TCGAGCCACGGAGGTGTTATTACCGAGTTT |
| amiR-E1A_4-TS as | AAACTCGGTAATAACACCTCCGTGGC |
| amiR-E1A_5-TS s | TCGAGGAAGGGATTGACTTACTCACTGTTT |
| amiR-E1A_5-TS as | AAACAGTGAGTAAGTCAATCCCTTCC |
| amiR-pTP-TS s | TCGAGTTGATTCTGTGCGAACTCTCTTGTTT |
| amiR-pTP-TS as | AAACAAGAGAGTTCGACAGAATCAAC |

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| amiR-Pol-TS s | TCGAGGCGTCCAACCATATCATCCAAGTTT |
| amiR-Pol-TS as | AAACTTGGATGATATGGTTGGACGCC |
| amiR-IVa2-TS s | TCGAGGACGTTAGTGATCCCAGAAATGTTT |
| amiR-IVa2-TS as | AAACATTTCTGGGATCACTAACGTCC |
| amiR-Hex-TS s | TCGAGAGCTAGAAAGTCAAGTGGAAAGTTT |
| amiR-Hex-TS as | AAACTTCCACTTGACTTTCTAGCTC |
| CMV Enhancer 364f | TGGAGTTCGCGTTACATAACTTAC |
| CMV Enhancer 429r | CTATTGTCGTTACTATGGGAACATAC |
| Hexon DNA forw | GCT GCA TGA TTA ATT TCA GTT TCG |
| Hexon DNA rev | AAC CGT GTG CTG GAC ATG GC |
| 18S rRNA-DNA forw | GGT GGA GCG ATT TGT CTG GT |
| 18S rRNA-DNA rev | TGG GAA TTC CTC GTT CAT GG |
| pTP forw | CGG CGC AGG TCT TTG TAG |
| pTP rev | CAC GCA TGG GAG GAA GAG |
| E1A forw | CTT GGG TCC GGT TTC TAT GC |
| E1A rev | CCC GTA TTC CTC CGG TGA TA |

2.5.3. Plasmide

Basisplasmide

pscAAV-GFP (201)

psiCHECK2 (Promega GmbH)

pJET1.2 (Fisher Scientific GmbH)

Synthetisierte Plasmide

12ABOLRP_9xmiR155-Konstrukt_pMK-RQ

12ABWQOP-amiPol-miR7-pMA-T

AAV-Shuttleplasmide

pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x)*
pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x)
pscAAV-(GFP)-amiR-Con (1x) / (3x) / (6x)
pscAAV-(GFP)-amiR-E1A_1 (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-E1A_2 (1x) / (3x)
pscAAV-(GFP)-amiR-E1A_3 (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-E1A_4 (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-E1A_5 (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-pTP (1x) / (3x) / (6x)
pscAAV-(GFP)-amiR-Hex (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-IVa2 (1x)
pscAAV-(GFP)-amiR-Pol (1x)
pscAAV-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x)
pscAAV-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)
pscAAV-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x)
pscAAV-3x (amiR-E1A_2-pTP)
pscAAV-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x)

Kontrollplasmide

psiCHECK2-amiR-E1A_1-TS
psiCHECK2-amiR-E1A_2-TS
psiCHECK2-amiR-E1A_3-TS
psiCHECK2-amiR-E1A_4-TS
psiCHECK2-amiR-E1A_5-TS
psiCHECK2-amiR-pTP-TS
psiCHECK2-amiR-Hex-TS
psiCHECK2-amiR-IVa2 -TS
psiCHECK2-amiR-Pol-TS

2.6. Antikörper

Anti-Adenovirus Antibody [M58 + M73] (ab3648) Abcam plc.

2.7. Bakterienstämme und Medien

E. coli XL-10 Gold (Stratagene, USA):

TetR _(mcrA)183 _(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96

relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ_M15 Tn10 (TetR) Amy CamR]

Tabelle 7: Verwendete Nährmedien für Bakterien

| Komponente | Hersteller |
|--------------------|---------------------------------------|
| LB-Medium (Lennox) | Carl Roth GmbH & Co. KG GmbH & Co. KG |
| LB-Agar (Lennox) | Carl Roth GmbH & Co. KG GmbH & Co. KG |
| Kanamycin | Carl Roth GmbH & Co. KG GmbH & Co. KG |
| Ampizillin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |

2.8. Zelllinien und Medien

Tabelle 8: Verwendete Nährmedien eukaryontische Zellen

| Zelllinie | Herkunft | Medium |
|--------------------|-------------------------------------|--|
| HeLa | Humanes Zervixkarzinom | DMEM High Glucose (PAA) +1 % L-Glutamin |
| Huh7 | Humanes Leberzellkarzinom | DMEM High Glucose (PAA) + 1% L-Glutamin |
| HEK293, HEK293T | Humane, embryonale Nierenzellen | DMEM High Glucose (PAA) + 1 % Natriumpyruvat + 1 % L-GLutamin |
| HepaRG | Terminal differenzierte Leberzellen | William's E (Glutamax) + 5 µg/ml Insulin + 50 µM Hydrokortison Differenzierungsmedium: + 2 % DMSO |
| HepG2 | Humanes Leberzellkarzinom | RPMI 1640 (PAA) |

Alle Medien wurden mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin angesetzt.

2.9. Viren und virale Vektoren

2.9.1. Viren

Humanes Adenovirus 5

2.9.2. Virale Vektoren

AdV-GFP

scAAV2-GFP

scAAV2-GFP-amiR-Ad (1x)

scAAV2-amiR-Ad (1x) – (6x)

scAAV2/9-amiR-Ad (6x)

2.10. Sonstige Materialien

Tabelle 9: Verwendetes Material

| Material | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| OptiSeal 344625 | Beckman Coulter GmbH |
| OptiSeal 361625 | Beckman Coulter GmbH |
| Amicon Ultra 100K Centrifugal Filter Units | Merck KGaA |
| Microplates 96 Well – white | Berthold Technologies GmbH & Co KG |
| DNA-Ladepuffer | VWR International GmbH |
| Sephadex NAP-25 | GE Healthcare |
| DEPC-Wasser | Sigma-Aldrich Chemie GmbH |

2.11. Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|---------------------------|
| Tischzentrifuge Heraeus Fresco 17 | Fisher Scientific GmbH |
| Advanced Centrifuge J-E | Beckman Coulter GmbH |
| Power Pack basic | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Transilluminator UV solo Imaging System | Biometra GmbH |
| Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 | Carl Zeiss GmbH |

| | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| V-650 Spectrophotometer | Jasco Inc. |
| NanoDrop 2000 | Peqlab Biotechnologie GmbH |
| Advanced Primus 25 Thermal Cycler | Peqlab Biotechnologie GmbH |
| C1000 Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories GmbH |
| Ultrazentrifuge | Beckman Coulter GmbH |
| MACSQuant YBG | Miltenyi Biotec GmbH |
| Gewebehomogenisator VDI 12 | VWR International GmbH |

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit Bakterien

3.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Nachzucht chemisch kompetenter Bakterien wurden 5 µl *E. coli* X-Gold in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 2 ml der Übernachtskultur wurden zu 250 ml LB-Medium gegeben und antibiotikafrei bis zu einer Zelldichte von OD (595 nm) 0,5 weiter inkubiert.

Nach der Überführung in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen und zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde bei 5.000 U/min (Advanced Centrifuge J-E), 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die generierten Zellpellets wurden in 50 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und vereinigt. Es wurde wiederum zentrifugiert (3.000 U/min, 0 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert, bevor letztmalig zentrifugiert wurde (3.000 U/min, 0 °C, 5 min). Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter, steril filtrierter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 14 % Glycerin resuspendiert, in vorgekühlte Gefäße aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Vor der Verwendung der Zellen erfolgte ein funktionaler Test. Zum einen wurde eine Transformation imitiert, ohne jedoch DNA oder RNA zuzugeben. Nach Ausstrich auf Ampizillin- und Kanamycin-haltige Agarplatten durften hierbei keine Kolonien gebildet werden. Zum anderen wurde ein Plasmid transformiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt. Bei zufrieden stellender Antibiotikaresistenz der nicht transformierten Zellen und Effizienz der Probetransformation wurden die Zellen für weitere Klonierungen freigegeben.

3.1.2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* X-Gold wurde das Prinzip der Hitzeschock-transformation angewandt. Dafür wurden 50 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, die Ligationsmischung zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Für exakt eine Minute wurde der Ansatz auf 42 °C erhitzt und anschließend 3 min eisgekühlt. Nach Zugabe von 700 µl antibiotikafreiem LB-Medium wurde 45 min bei 37 °C und 300 U/min geschüttelt. 200 µl der Suspension wurde auf eine LB-Agarplatte mit 0,1 % Ampizillin (finale Konzentration 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Sollten Minikulturen angeimpft werden, wurde eine Kolonie von der Agarplatte in 3 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampizillin (finale Konzentration 100 µg/ml) übertragen und über Nacht bei 37 °C und 120 U/min inkubiert. Größere Volumina für Midi-, Maxi- oder Megapräparationen wurden jeweils 1:1.000 aus der Übernachtskultur angeimpft und ebenfalls über Nacht bei denselben Bedingungen inkubiert.

3.1.3. Konservierung von Bakterien

Transformierte Bakterien wurden langfristig bei -80 °C gelagert und ihrem Medium 30 % Glycerin zugesetzt.

3.2. DNA- und RNA-basierte Techniken

Der Gehalt DNA- bzw. RNA-haltiger Lösungen wurde in jedem Fall mit NanoDrop 2000 quantifiziert. DNA wurde bei -20 °C, RNA bei -80 °C gelagert.

3.2.1. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Je nach erforderlicher Plasmidmenge wurden unterschiedliche Reagenzsysteme zur Isolation der DNA aus Suspensionen transformierter Bakterien verwendet. Kleine Mengen wurden aus 1,5 ml Minikulturen mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Mini Kits isoliert, größere aus 50 ml (Plasmid Plus Midi Kit), 200 ml (EndoFree Plasmid Maxi Kit) oder 1.000 ml (EndoFree Plasmid Mega Kit).

3.2.2. Gelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe wurden aus DNA-haltigen Lösungen mit Hilfe von Agarosegelen die Bestandteile aufgetrennt. Das Prinzip beruhte auf elektrostatischen Anziehungskräften der negativ geladenen DNA und der positiv geladenen Kathode im angelegten Spannungsfeld. Große Fragmente wurden in der Agarosematrix stärker verzögert als kleine, was zu einer Aufspaltung von gemischten DNA-Molekülen gemäß ihrer Nukleotidanzahl führte. Die Porengröße der Agarosematrix beeinflusste maßgeblich die mögliche Auflösung der DNA-Fragmente. Je höher der Anteil an Agarose, desto besser konnten auch kleine Fragmente mit geringen Größenunterschieden zueinander getrennt dargestellt werden. Abhängig vom Spektrum der erwarteten Bandengrößen wurden Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,7 bis 1,2 % (w/v) verwendet.

Zur Visualisierung des Bandenmusters wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt (finale Konzentration 25 µg/ml). Der Fluoreszenzfarbstoff interkalierte in doppelsträngige Nukleinsäuren, absorbierte Licht im UV- und emittierte im sichtbaren Bereich. Nach Bindung an DNA wurde die Fluoreszenz um ein Vielfaches erhöht, so dass eine visuelle Auswertung der Gele unter UV-Licht möglich war. DNA-reiche Umgebungen erschienen hell, die Gelmatrix dunkel. Die Intensität der Signale war direkt proportional zur Menge der DNA-Moleküle sowie deren Nukleotidanzahl.

Die Unterscheidung der Banden nach ihrer Größe wurde ermöglicht durch die Verwendung eines DNA-Größenstandards. Dieser enthielt DNA-Fragmente definierter Größe und Menge, die sich in der Gelmatrix auftrennten und als Referenz dienten.

3.2.3. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Einige Anwendungen erforderten die Rückgewinnung einer DNA-Bande aus dem Agarosegel. Zu diesem Zweck wurde unter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell ein möglichst kleiner Bereich ausgeschnitten und das Gelstück im entsprechenden Puffer unter Wärmeeinwirkung aufgeschmolzen. Mit Hilfe des QIAQuick Gel Extraction Kits wurde die DNA nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Geweben

Gesamt-RNA wurde aus eukaryontischen Zellen und Geweben mit Hilfe von TRIzol® Reagent isoliert. Das Medium adhärenter Zellen wurde entfernt und der Zellrasen mit 1 ml TRIzol® Reagent pro 10 cm² Kulturfläche abgelöst. Gewebstücke wurden in 1 ml TRIzol® Reagent zerstoßen. Im weiteren Prozess wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren.

3.2.5. Isolierung von DNA aus Geweben

Für die Isolierung von DNA aus Gewebestücken wurde ein kleines Stück eines Organs eingewogen und die DNA mit Hilfe des Tissue DNA Mini Kits (peqlab) nach Herstellerangaben extrahiert. Betrag des

Gewicht mehr als 40 mg, wurden die empfohlenen Puffermengen verdoppelt und der Ansatz auf zwei DNA-bindende Säulen verteilt. Die Eluate wurden schlussendlich wieder vereint.

3.3. Klonierung

3.3.1. Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Überführung einer DNA-Sequenz von einem Plasmid zum anderen waren zunächst die Linearisierung des Ursprungsplasmids und das Ausschneiden des gewünschten Fragments notwendig. Durch Restriktionsendonukleasen, welche gemäß einer spezifischen Erkennungssequenz doppelsträngige DNA schneiden, konnten dezidierte Schnittmuster erstellt werden. Je nach Enzym entstanden glatte Enden (*blunt ends*) oder Überhänge am 5'- oder 3'-Ende (*sticky ends*).

Die Ansätze für die Restriktion wurden im empfohlenen Puffer des Herstellers New England Biolabs angesetzt und mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert sowie ggf. im Anschluss durch Hitze inaktiviert.

3.3.2. Dephosphorylierung von linearer DNA

Nach der Restriktion sollten zwei DNA-Fragmente - ein Vektorkonstrukt und ein Insert - miteinander neu verbunden werden. Mitunter waren aber nicht nur die Enden, die zur Ligation vorgesehen waren komplementär, sondern auch die Überhänge des Vektors zueinander. In diesem Fall konnte es zu einer Religation des Vektors kommen, ohne dass ein Insert eingefügt worden ist. Um diesen Vorgang zu vermeiden, bot es sich an, die endständigen 5'-Phosphate abzuspalten. Dieser Vorgang konnte enzymatisch mit der *Calf Intestine Phosphatase* durchgeführt werden. Die linearisierte Vektor-DNA wurde nach Herstellerangaben dephosphoryliert und anschließend mit der unbehandelten, linearisierten Insert-DNA ligiert. Die Bereitstellung einer 5'-Phosphatgruppe durch das *Insert* und einer 3'-Hydroxylgruppe durch den Vektor stellte ausreichende Bedingungen für die T4 DNA Ligase dar, um die Fragmente zu verbinden.

3.3.3. Auffüllen von überhängenden Enden

Bei vielen Restriktionen entstanden Überhänge, die nicht komplementär zueinander waren, so dass ein Ligation nicht stattfinden konnte. In diesem Fall wurden die *sticky ends* aufgefüllt. Der Einsatz des DNA-Polymerase I, Large (Klenow) Fragments bewirkte das Auffüllen von 5'-Überhängen durch dessen Polymeraseaktivität an entsprechenden Enden in Anwesenheit von dNTPs. 3'-Überhänge wurden hingegen durch die Exonukleaseaktivität abgebaut. Im Resultat entstanden durch beide Prozesse stumpfe Enden.

Ein solches *Blunting* vor dem Einfügen eines *Inserts* erforderte immer eine Dephosphorylierung, da das Risiko der Rezirkularisierung des Vektors sehr hoch war. Desweiteren war eine genaue Überprüfung der Orientierung des eingefügten *Inserts* zwingend notwendig. Durch *sticky ends* wurde oft nur eine Möglichkeit der Insertion zugelassen, während *blunt ends* sowohl 3'-5'- als auch 5'-3'-Orientierung des *Inserts* zuließen.

3.3.4. Ligation

Ligasen sind Enzyme, welche zwei Moleküle miteinander verbinden. Die T4 DNA Ligase verbindet unter Verbrauch von ATP die Enden von DNA-Fragmenten miteinander. Dabei werden sowohl glatte Enden miteinander ligiert als auch Enden mit passenden Überhängen. Das Enzym bildet eine Diesterbindung

zwischen 5'-Phosphaten und 3'-Hydroxylgruppen nahe gelegener DNA-Stränge. Außerdem vermag es Einzelstrangbrüche in doppelsträngiger DNA oder DNA/RNA-Komplexen zu reparieren.

Ligationen wurden stets in empfohlenem Puffer und bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ligation von überhängenden Enden erfolgte in 10 min, die Ligation von glatten Enden in 2 h. Vektor und Insert lagen im molaren Verhältnis von 1:3 vor.

3.4. Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

3.4.1. Reverse Transkription

In der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird ein komplementäres DNA-Molekül zu einer RNA-Matrix gebildet; eine *complementary* DNA (cDNA). Je nach Anwendung kann entweder die Gesamtheit der RNA mit Hilfe von zufälligen Hexamer-Primern, die Gesamtheit der mRNA mit Hilfe von oligo-dT-Primern oder eine spezifische RNA umgeschrieben werden. Soll eine besondere RNA als cDNA abgebildet werden, bedarf es eines DNA-Primers, welcher in der 3'-Region der RNA bindet und als Ausgangspunkt für die Reverse Transkriptase dient, welche den Primer in 3'-5'-Richtung verlängert. In jedem Fall entsteht ein DNA/RNA-Komplex, der im Verlauf der RT-PCR stabil bleibt. Bei vollständiger Umschreibung ist die entstehende cDNA also sowohl qualitativ als auch quantitativ ein Abbild der zu Grunde liegenden RNA.

Soll ein cDNA von kurzen RNA-Molekülen, z.B. siRNAs, gewonnen werden, muss ein sehr langer Primer mit einem internen Stem-Loop verwendet werden. Sechs Nukleotide bilden am 3'-Ende der RNA einen komplementäre Überhang, weitere 55 Nukleotide formen eine Haarnadelstruktur, die Stabilität verleiht und die entstehende cDNA erheblich verlängert. Dies erleichtert die Amplifikation für die nachfolgende quantitative PCR (qPCR).

Zum Nachweis der Expression viraler Gene wurde Gesamt-RNA von infizierten Zellen oder Geweben mit TRIzol nach Herstellerangaben isoliert. 5 µg RNA wurden mit DNaseI (NEB) behandelt und jeweils 2 µg RNA mit Hilfe von Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben.

Die Expression der amiRs wurde quantifiziert, nachdem 200 ng Gesamt-RNA nach DNaseI-Verdau durch Zugabe von spezifischen Stem-Loop-Primern zum Reaktionsmix in cDNA umgeschrieben worden war.

Puffer, Reverse Transkriptase, dNTPs sowie ggf. die *Random Hexamer Primer* entstammten dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Fisher Scientific). Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Expression von amiRs wurde mit Hilfe eines Custom Design microRNA TaqMan Assays (Fisher Scientific) quantifiziert.

3.4.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Technik der PCR wurde verwendet, um DNA Fragmente nachzuweisen oder einen bestimmten DNA-Abschnitt zu amplifizieren. Im Falle eines Nachweises wurde mit Taq-Polymerase gearbeitet. Sollte im Anschluss an die PCR eine Klonierung des Amplifikats erfolgen, wurde die PfuUltra-Polymerase, welche über *Proof Reading* Aktivität verfügte, eingesetzt. Die Konzentration der Primer und dNTPs wurde so gewählt, dass sie im optimalen Bereich für die jeweilige Polymerase lagen. Puffer und Konzentration des Templates wurden ebenfalls nach Herstellerangaben zugesetzt. Zunächst erfolgte ein initiales Erhitzen der Proben auf 95°C, um Doppelstränge zu trennen. Anschließend wurde die An-

nealingtemperatur, die auf die bindenden Bereiche der Primer abgestimmt war, eingestellt. Die Zeitdauer für die folgende Elongation wurde maßgeblich bestimmt durch die Länge des gewünschten Amplifikats. Sie betrug zwischen 30 und 90 s und wurde bei 72 °C durchgeführt. Diese Abfolge wurde dreißig bis vierzig Mal wiederholt.

Der Nachweis der erfolgreichen PCR wurde mit Hilfe von Agarosegelen durchgeführt und mit einem Transilluminator dokumentiert.

3.4.3. Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative oder *real-time* PCR wird durchgeführt, um die Häufigkeit des Vorkommens eines bestimmten DNA-Abschnitts zu ermitteln. Das Grundprinzip unterscheidet sich nicht von der PCR, jedoch wird vor oder nach jedem Amplifikationszyklus der Gehalt an DNA im Reaktionsansatz indirekt bestimmt. Hierfür werden verschiedene Systeme angeboten. Sie alle basieren auf speziellen Kombinationen aus Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden und/oder Reaktionslösungen, die fluoreszierende Farbstoffe enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan-Sonden-basierte und SYBR-GREEN-basierte Ansätze gewählt. In einem qPCR-Ansatz mit TaqMan-Sonden werden zusätzlich zu den Amplifikationsprimern Oligonukleotide beigemischt, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Zusätzlich zum fluoreszierenden FAM am 5'-Ende trägt die Sonde ein Quencher-Molekül am 3'-Ende. Während der Anlagerungsphase jedes PCR-Zyklus lagern sich die Sonden an den jeweils komplementären DNA-Strang an. In der anschließenden Amplifikation werden gebundene Sonden hydrolysiert. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoff und Quencher räumlich voneinander getrennt und ein Signal wird detektierbar. Die Bindung der Sonde erfolgt sequenzspezifisch und nur gebundene Sonden können hydrolysiert werden; daher verringert der Einsatz von TaqMan-Sonden die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Nebenprodukten durch unspezifische Bindung der Amplifikationsprimer erheblich.

In qPCR-Ansätzen mit SYBR-GREEN wird kein zusätzliches Nachweismolekül verwendet. Der Reaktionsmix enthält aber den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-GREEN, der unspezifisch in jede doppelsträngige Nucleinsäure interkaliert. Problematisch kann hierbei sein, dass Nebenprodukte ebenfalls detektiert werden; dieser Ansatz erfordert also eine exakte Optimierung der Amplifikationsprimer um nur das gewünschte Amplikon anzureichern.

Die Rohdaten einer qPCR enthalten unabhängig vom Nachweissystem so genannte Ct-Werte. Diese geben an, in welchem Zyklus der qPCR sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant vom Messhintergrund unterscheidet, also einen Schwellenwert (*cycle threshold*) überschreitet. Diese Ct-Werte werden verwendet, um die ursprüngliche Menge des DNA-Targets zu bestimmen. In einer absoluten Quantifizierung werden in jeder Messung Standardproben mit bekannter Menge des Amplikons mitgeführt. Mit Hilfe der entsprechenden Werte werden Regressionsgeraden erstellt und der DNA-Gehalt der unbekanntenen Proben errechnet.

In der relativen Quantifizierung wird zusätzlich zu dem eigentlich Zielgen noch ein weiteres, möglichst konstant exprimiertes Gen quantifiziert. Dieses ist in der Regel ein zelluläres Haushaltsgen, wie 18S rRNA-DNA oder β -Actin. Die Ct-Werte werden dann mit Hilfe der $\Delta\Delta$ Ct-Methode miteinander ins Verhältnis gesetzt und die Expression des Zielgens zu einem Referenzgen relativiert.

3.5. Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics, Berlin auf Basis der Sanger-Methode durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von entsprechender Software, wie BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA), mit den zu Grunde liegenden Plasmidkarten verglichen.

3.6. Design der antiadenoviralen artifiziiellen microRNAs

Die publizierten Sequenzen verschiedener siRNAs, shRNAs und amiRs wurden zum Teil angepasst, um den Anforderungen für die Expression von einer amiR-Expressionskassette zu genügen. Das Sequenz-design wurde von Milena Kraus im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt (202).

Tabelle 11: Sequenzen, Modifikationen und Herkunft der amiRs. Modifikationen: Neu eingefügte Nukleotide sind unterstrichen, Verkürzungen sind durchgestrichen. Rot markierte Nukleotide zeigen den *Mismatch* zwischen *anti-sense* und *sense*-Strang.

| amiR | Anti-sense Sequenz 5' – 3' | Sense Sequenz 5' – 3' | Herkunft / Quelle |
|-------|--|--------------------------------|----------------------|
| E1A_1 | <u>UUU</u> ACA GCU CAA <u>GUC</u> CAA AGG | CCU UUG GA--U GAG CUG UAA A | siE1A_1 aus (136) |
| E1A_2 | <u>U</u> AU UGC AUU CUC UAG <u>ACA</u> CAG | CUG UG--U AGA GAA UGC AAU A | siE1A_2 aus (136) |
| E1A_3 | U UCG GUA AUA ACA <u>CCU</u> CCG <u>UGG</u> | CCA CGG A--UG UUA UUA CCG A | siE1A_4 aus (136) |
| E1A_4 | AAA AUC UGC <u>GAA</u> ACC GCC UCC | GGA GGC GGU-- CGC AGA UUU U | shRE1A-736 aus (128) |
| E1A_5 | AAA AGU GAG UAA <u>GUC</u> <u>AAU</u> CCC UUC | GAA GGG AU--A CUU ACU CAC U | shRE1A-785 aus (128) |
| pTP | AAG AGA GUU <u>CGA</u> <u>CAG</u> AAU CAA | UUG AUU CU--C GAA CUC UCU U | pTP-mi5 aus (134) |
| Pol | UUG GAU GAU <u>AUG</u> <u>GUU</u> GGA CGC | GCG UCC AA--A UAU CAU CCA A | Pol-mi7 aus (134) |
| IVa2 | U AUU UCU GGG <u>AUC</u> <u>ACU</u> AAC GUC <u>GUC</u> | GAC GUU AG--A UCC CAG AAA U | siIVa2_2 aus (136) |
| Hex | <u>UUU</u> CCA CUU <u>GAC</u> <u>UUU</u> CUA <u>GCU</u> | AGC UAG AA--U CAA GUG GAA A | siHexon_4 aus (136) |

3.7. Plasmidkonstruktion

3.7.1. Basisplamide

Als Basis für die Klonierungen wurden verschiedene Plasmide verwendet. pscAAV-GFP ist ein AAV-Shuttleplasmid, welches die beiden *Inverted Terminal Repeats* (ITR) des AAV2, einen CMV-Promoter und die GFP-Expressionskassette enthält. Eine der beiden ITRs weist eine Deletion auf, was zur Dimerisierung der im AAV verpackten DNA-Sequenz führt. Ohne diese Deletion würde nur ein Abschnitt in einen monomeren AAV verpackt, so entstehen scAAV. Der Vorteil der doppelsträngigen DNA im AAV ist die schnellere Expression des Transgens, der Nachteil liegt in der Halbierung der Verpackungskapazität.

Der kommerziell erhältliche Vektor psiCHECK2 (Promega) wurde verwendet, um die Plasmide für die Reporterassays zu erzeugen. Dieses Plasmid enthält zwei Expressionskassetten, welche aus jeweils

einem Promoter, einem Luciferasetransgen und einem poly-A-Signal bestehen. Die *Renilla* Luciferase verfügt in der 3'-UTR eine *Multiple Cloning Site* (MCS), die *Firefly* Luciferase nicht.

Ebenfalls kommerziell erhältlich ist der Vektor pJet1.2 (Fisher Scientific). Es handelt sich um ein linearisiertes *blunt end* Plasmid, welches zur Zwischenklonierung von *blunt end* DNA-Fragmenten, bspw. PCR-Produkten, verwendet wird.

Alle Basisplasmide enthalten ein Ampizillinresistenzgen und einen bakteriellen Replikationsursprung.

3.7.2. Plasmide zur Expression von GFP und amiR-Ad

Als Ausgangspunkt für alle folgenden Klonierungen wurden zwei Plasmide synthetisiert, welche entweder neun verschiedene Expressionskassetten für amiR-Ad oder drei verschiedene für amiR-Con enthielten. Aus dem Plasmid 12ABOLRP_9xmiR155-Konstrukt_pMK-RQ wurden per Amplifikation mit dem Primerpaar miR-Extraktion 2-s und miR-Extraktion 2-as die amiR-Ad-kodierenden Abschnitte extrahiert. Das PCR-Produkt sowie der Vektor pscAAV-GFP wurden gleichermaßen mit *XhoI* und *Clal* geschnitten und in einem Ligationsansatz zu pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x)* verbunden. Dieses Plasmid enthielt unter anderem eine amiR-Pol, welche sich als fehlerhaft herausstellte und in einem späteren Klonierungsschritt ersetzt wurde. Hierfür wurde die korrekte Sequenz der amiR-Pol in einem neuen Plasmid synthetisiert (12ABWQOP_amiPol-miR7_pMA-T). Synthesepiasmid und pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x)* wurden gleichermaßen mit *NheI* und *BamHI* restringiert und zum nun korrekten pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) ligiert.

Für die Konstruktion des Kontrollplasmids wurde vom synthetisierten Plasmid 12ABWQOP_amiPol-miR7_pMA-T ebenfalls per PCR die amiR-Con Expressionskassetten amplifiziert, das PCR-Produkt mit *XhoI* und *Clal* restringiert und in den gleichermaßen linearisierten Vektor pscAAV-GFP ligiert. Der resultierende Vektor pscAAV-GFP-amiR-Con (3x) sowie das PCR-Produkt wurden mit *BglII* und *Clal* geschnitten, um pscAAV-GFP amiR-Con (6x) zu erhalten.

Aus pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) wurden über verschiedene Wege Plasmide konstruiert, die nur eine amiR-Ad und GFP exprimieren. pscAAV-GFP-amiR-E1A_1 und pscAAV-GFP-amiR-E1A_2 wurden generiert, indem zunächst ein Abschnitt von pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) amplifiziert, das PCR-Produkt restringiert und in einen entsprechend linearisierten Vektor kloniert wurde. Für die Generation von pscAAV-GFP-amiR-E1A_1 wurde das Primerpaar GFP intern-s und bGH-4265-as-*Clal* verwendet, das PCR-Produkt mit *XhoI* und *Clal* restringiert und das ebenso linearisierte Vektorgerüst von pscAAV-GFP-amiR-Con (3x) ligiert. Für pscAAV-GFP-amiR-E1A_2 wurde das Primerpaar GFP 1121-s und bGH-4265-as-*Clal* verwendet, das PCR-Produkt mit *BglII* und *BclI* restringiert und in *Clal/XhoI*-geschnittenes pscAAV-GFP ligiert.

pscAAV-GFP-amiR-Pol wurde erzeugt, indem pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) mit *AvrII* und *NheI* restringiert und über die homologen Überhänge religiert wurde.

Alle weiteren Plasmide des Typs pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x) wurden mit Hilfe von aufeinander folgenden Restriktionen und Zwischenklonierung generiert. In Tabelle 12 sind alle Vektoren sowie die Restriktionsenzyme beider Klonierungsschritte aufgeführt.

Tabelle 12: Klonierungsstrategie von pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x) aus pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x). pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) wurde zunächst mit der Enzymkombination der 1. Klonierung geschnitten und nach Transformation und Isolation der Zwischenklonierung mit der Enzymkombination der 2. Klonierung geschnitten.

| Plasmid | Restriktionsenzyme 1. Klonierung | Restriktionsenzyme 2. Klonierung |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| pscAAV-GFP-amiR-E1A_3 | <i>Bam</i> HI/ <i>Bst</i> BI | <i>Avr</i> II/ <i>Bg</i> II |
| pscAAV-GFP-amiR-E1A_4 | <i>Bam</i> HI/ <i>Pme</i> I | <i>Avr</i> II/ <i>Bst</i> BI |
| pscAAV-GFP-amiR-E1A_5 | <i>Xho</i> I/ <i>Pme</i> I | <i>Bst</i> Z17I/ <i>Bam</i> HI |
| pscAAV-GFP-amiR-pTP | <i>Sal</i> I/ <i>Xho</i> I | <i>Spe</i> I/ <i>Bam</i> HI |
| pscAAV-GFP-amiR-Hex | <i>Bst</i> Z17I/ <i>Avr</i> II | <i>Sal</i> I/ <i>Bam</i> HI |
| pscAAV-GFP-amiR-IVa2 | <i>Avr</i> II/ <i>Spe</i> I | <i>Nhe</i> I/ <i>Bam</i> HI |

Für die Erzeugung von pscAAV-GFP-amiR-Con (1x) wurde pscAAV-GFP-amiR-Con (3x) mit *Nru*I und *Bam*HI restringiert, die von *Bam*HI generierten *sticky ends* mit Hilfe von Klenow-Fragment aufgefüllt und der Vektor religiert.

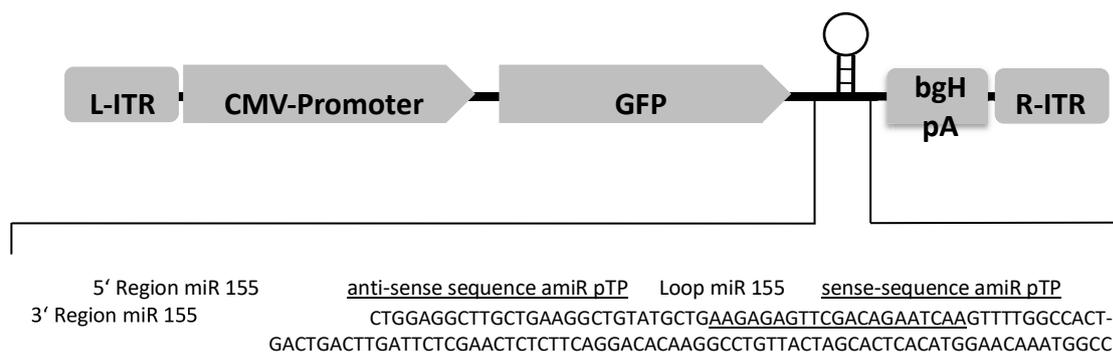


Abbildung 4: Struktur von pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x). Die Transgenkassette enthält einen CMV-Promoter, die kodierende Sequenz von GFP sowie die amiR-Ad Expressionsumgebung (bestehend aus der 5'-Region der miR-155, anti-sense Sequenz der amiR-Ad, Loop-Region der miR-155, sense-Sequenz der amiR-Ad und 3'-Region der miR-155) und ein bGH-pA. Die Sequenz wird flankiert von ITRs von AAV2, von denen eine Mutation aufweist, die die Faltung in einen scAAV ermöglicht.

3.7.3. Plasmide zur Expression einer amiR-Ad

Alle Vektoren wurden ebenfalls ohne die GFP-Expressions-kassette bereitgestellt. In den meisten Fällen genügte eine Restriktion mit *Eco*RI und *Xho*I sowie anschließendes Auffüllen der Überhänge und Religation. Auf diese Weise wurden pscAAV-amiR-Ad (9x), pscAAV-amiR-E1A_1, pscAAV-amiR-E1A_3, pscAAV-amiR-E1A_4, pscAAV-amiR-Hex, pscAAV-amiR-IVa2, pscAAV-amiR-Pol, pscAAV-amiR-Con (1x), pscAAV-CMV, pscAAV-amiR-Con (3x) und pscAAV-amiR-Con (6x) erstellt. Die Herstellung von pscAAV-amiR-E1A_5 und pscAAV-amiR-pTP erforderten wiederum einen zweistufigen Restriktionsverdau von pscAAV9-GFP-amiR-Ad (9x) mit Zwischenklonierung. Für pscAAV-amiR-E1A_5 wurde zunächst mit *Bst*Z17I und *Bam*HI und anschließend mit *Eco*RI und *Pme*I restringiert; für pscAAV-amiR-pTP erst mit *Spe*I und *Bam*HI und danach mit *Eco*RI und *Sal*I.

In einer PCR mit dem Primerpaar GFP 1121-s und bGH-4265-*Cl*aI wurde die gesamte amiR-Expressions-kassette von pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) amplifiziert und das PCR-Produkt mit *Bg*II und *Bcl*I geschnitten. Es wurde in das mit *Eco*RI und *Xho*I linearisierte Vektorgerüst von pscAAV-GFP eingefügt, um pscAAV-amiR-E1A_2 zu generieren.



Abbildung 5: Struktur von pscAAV-amiR-Ad (1x). Die Transgenkassette enthält einen CMV-Promoter sowie die amiR-Ad Expressionsumgebung und ein bgH-pA. Die Sequenz wird flankiert von ITRs von AAV2.

Alle bisher beschriebenen Plasmide wurden von Milena Kraus im Rahmen ihrer Diplomarbeit hergestellt (202).

3.7.4. Plasmide zur Expression mehrere amiR-Ad mit unterschiedlichen Zielgenen

Es wurde bereits vielfach beschrieben, dass die Erhöhung der exprimierten Kopienzahl von amiRs zu einer Verbesserung der Effizienz des *Silencings* führte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Vektoren generiert, die Kombinationen von Expressionskassetten enthielten. Dafür wurden zwei weitere Plasmide synthetisiert: pMK-*EcoRI-SpeI*-amiR-pTP (3x)-*NheI-ClaI* und pMK-*EcoRI*-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-*NheI-ClaI*. Das erste wurde mit *EcoRI* und *ClaI* restringiert und in den ebenso geschnittenen Vektor pscAAV-GFP eingefügt, um pscAAV-amiR-pTP (3x) zu erhalten. Dieser Vektor wurde dann mit *EcoRI* und *SpeI* geschnitten und das mit *EcoRI* und *NheI* aus dem Synthesepiasmid ausgeschnittene Insert *EcoRI*-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-*NheI* inseriert. Der resultierende Vektor wurde mit pscAAV-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x) bezeichnet. pscAAV-amiR-pTP (3x) war ebenfalls die Grundlage für pscAAV-amiR-pTP (6x). Das Vektorgerüst wurde mit *NheI* und *ClaI* geschnitten und das Insert *SpeI*-amiR-pTP (3x)-*ClaI* eingefügt. Diese Vektoren wurden von Dr. Anja Geisler (Mitglied der Arbeitsgruppe Fechner, Fachgebiet Angewandte Biochemie) hergestellt.

Eine Reihe Vektoren wurde generiert, die ausschließlich die amiR-pTP und die amiR-E1A_2 exprimierten. Zunächst wurde ein Plasmid synthetisiert, welches drei Kopien der amiR-E1A_2-kodierenden Sequenz sowie drei alternierende Abschnitte der amiR-E1A_2 und amiR-pTP enthielt (pMK-*NheI-EcoRI*-amiR-E1A_2 (3x)-*HindIII-EcoRI-SpeI*-3x (amiR-E1A_2-pTP)-*NheI*). Restriktion des Synthesepiasmids und von pscAAV-amiR-pTP (3x) mit *EcoRI* generierte das Gerüst und das Insert für pscAAV-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x). Wurden die beiden Ausgangsplasmide mit *NheI* und *HindIII* geschnitten, konnte pscAAV-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) kloniert werden. Wurde dieses Plasmid mit *EcoRI* geschnitten und das verbleibende Gerüst religiert, erhielt man pscAAV-amiR-E1A_2 (3x). pscAAV-3x (amiR-E1A_2-pTP) mit alternierenden kodierenden Sequenzen wurde hergestellt, indem das Synthesepiasmid sowie pscAAV-amiR-pTP (3x) mit *EcoRI* und *NheI* restringiert wurden und Vektorgerüst und Insert ligiert wurden.

Zusätzlich zu den Vektoren, die alle amiR-Sequenzen als einziges Transkript exprimierten, wurden Shuttleplasmide erstellt, welche über einen bidirektionalen Promoter zwei Transkripte erzeugten. Hierfür wurde zunächst eine DNA-Sequenz synthetisiert, welche einen minimalen CVM-Promoter CMVmin, je drei Abfolgen der amiR-IVa2 und E1A_2 sowie ein SV40 poly-A-Signal enthielt (pMK-*MluI*-CMVmin-*EcoRV*-amiR-IVa2 (3x)-*BstZ171*-amiR-E1A_2 (3x)-*PmeI*-SV40 pA-*MluI*). Nachdem das synthetisierte Plasmid und pscAAV-amiR-pTP (3x) gleichermaßen mit *MluI* geschnitten wurde, konnte als Zwischenschritt pscAAV-SV40 pA-amiR-E1A_2 (3x)-IVa2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x)-bgH erstellt werden. Über Verdau mit *BstZ171* und *EcoRV* und Religation wurde pscAAV-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x) hergestellt.

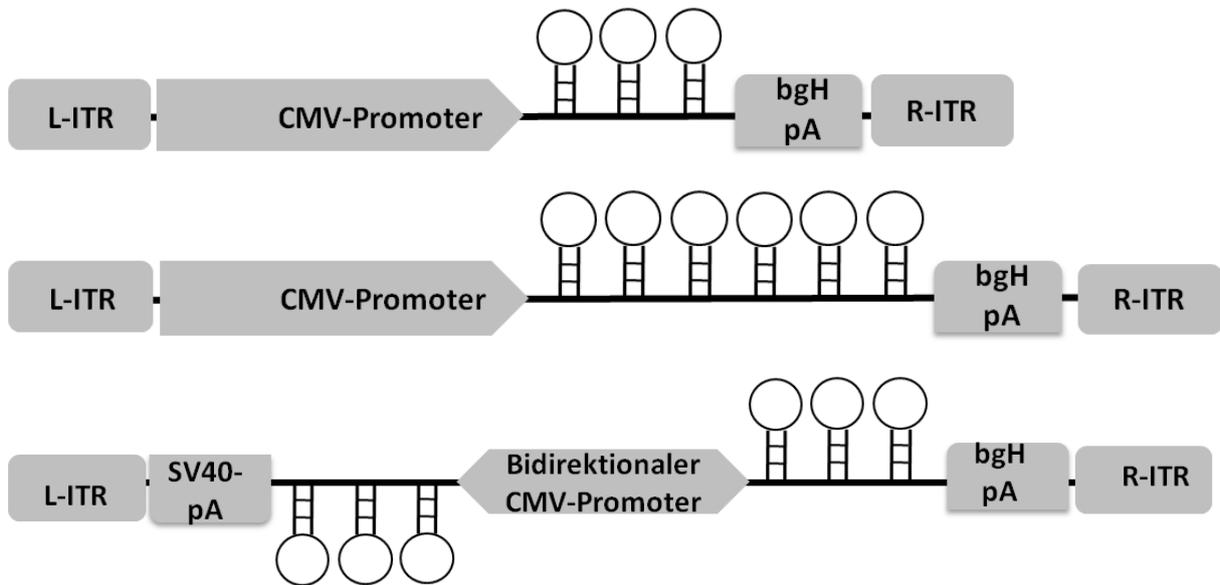


Abbildung 6: Struktur von pscAAV-GFP-amir-Ad (3x) / (6x) / amir-Ad (3x)-bidCMV-amir-Ad (3x). Die Transgenkassette enthält einen CMV-Promoter sowie drei bzw. sechs amir-Ad und ein bgH-pA. Im Falle der bidirektionalen Expression werden jeweils drei amir-Ad-Umgebungen *upstream* und *downstream* des Promoters kloniert. Die gesamte Transgenkassette wird jeweils flankiert von ITRs von AAV2.

3.7.5. Reporterplasmiden mit amir-Ad-Zielsequenzen

Eine Serie von Reporterplasmiden wurde auf Basis von psiCHECK2 kloniert. Komplementäre DNA-Oligonukleotide wurden vermischt, erhitzt und schrittweise abgekühlt, so dass ein *Annealing* stattfinden konnte. Die kurzen doppel-strängigen DNA-Moleküle wiesen ein *sticky end* am 5'-Ende mit Überhängen passend zu *XhoI*-Schnitten und ein *blunt end* am 3'-Ende mit *PmeI*-Schnittstelle auf. psiCHECK2 wurde über eben diese Enzyme linearisiert und die ds-DNA inseriert. Nach der Transkription enthielt die mRNA der *Renilla*-Luciferase in ihrer 3'-UTR eine Sequenz, welche vollständig komplementär zum anti-sense Strang der entsprechenden amir-Ad war.

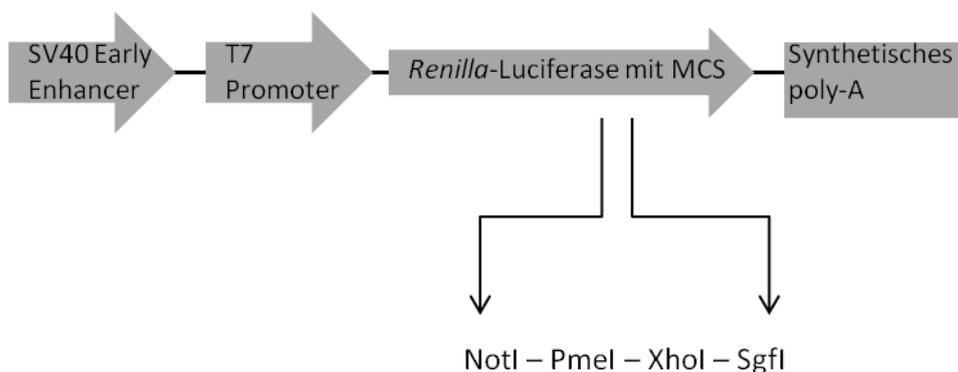


Abbildung 7: Struktur von psiCHECK2-amir-Ad-TS. In die *Multiple Cloning Site* in der 3'-UTR der *Renilla*-Luciferase wurde eine amir-Ad-Zielsequenz kloniert.

3.8. Zellbiologische Methoden

3.8.1. Passagieren adhärenter Zellen

Adhärente Zellkulturen wachsen in einer Schicht auf dem Boden eines ggf. beschichteten Kulturgefäßes. Wird dieser *Monolayer* sehr dicht bzw. konfluent, tritt eine Kontaktinhibierung des Zellwachstums auf oder die Zellen überwachsen sich und bilden *Multilayer* und andere dreidimensionale Strukturen. In der Erhaltungszellkultur sind solche Effekte in der Regel nicht erwünscht und die Zellen werden passagiert und ausgedünnt. Hierfür wird zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit ausreichend PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, ohne zweiwertige Ionen) gespült. Anschließend wird Trypsin (0,25 % in EDTA) zugegeben und 3 – 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Trypsin ist eine Proteinase, welche die membranständigen Proteine spaltet und zur Abrundung und Ablösung der Zellen führt. Bei zu langer Inkubation werden jedoch auch Zellmembranen zerstört. Um dies zu vermeiden, wird die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt und ggf. die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3 min). Ein Teil der Zellen wird nach gründlicher Resuspension neu ausgesät und weiter kultiviert, der Rest entweder verworfen oder für entsprechende Experimente verwendet.

3.8.2. Konservierung von eukaryontischen Zellen

Zur Aufbewahrung wurden eukaryontischen Zellen nach der Passage pelletiert und in einem Gemisch aus FKS und 10 % DMSO resuspendiert. Aliquots von je 1 ml wurden zunächst in einem iso-Propanol gefüllten Behälter über Nacht auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Sollte die Kultur wieder reaktiviert werden, wurde ein Aliquot aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3 min). Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in ein Gefäß ausgesät. Nach 4 h wurde das Medium noch einmal gewechselt und die Zellen danach nach Bedarf passagiert.

3.8.3. Aussaat von Zellen in Multiwellplatten

Für die definierte Aussaat von Zellen wurden diese nach der Passage zunächst gezählt. Hierfür wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet und die Anzahl nach Herstellerangaben bestimmt.

Anschließend wurde die Zellsuspension nach Bedarf verdünnt und die Vertiefungen der entsprechenden Multiwellplatte gefüllt. Nach einer gewissen Wachstumszeit, i.d.R. über Nacht, stand die besiedelte Platte zur Verfügung. Um subkonfluente Monolayer zu erreichen wurde die Zellzahl bei der Aussaat adäquat verringert.

3.8.4. Transfektion von Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen ektopter Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen. Hierfür werden Agentien verwendet, die an die Nukleinsäuren binden, deren Ladung neutralisieren und die Aufnahme per Endozytose ermöglichen. Das Transfektionsagens Polyethylenimin (PEI) ist ein hochmolekularer, positiv geladener Stoff. Zunächst wurde er im molekularen Verhältnis von 1:3 mit DNA in Rohmedium oder 150 mM NaCl 15 min präinkubiert und anschließend die Lösung vorsichtig auf ca. 60 % konfluente Zellen, die mit wenig Kulturmedium bedeckt waren, getropft. Die Lösung aus PEI und Nukleinsäure sollte dabei 10 % des Gesamtvolumens nicht übersteigen. Die Transfektionsmethode mit PEI ist äußerst robust und für doppelsträngige, einzelsträngige, lineare und zirkuläre DNA sowie RNA geeignet.

3.8.5. Quantifizierung von Proteinexpression mit Durchflusszytometrie

Adhärente Zellen wurden zunächst mit Trypsin geerntet und in der Zentrifuge pelletiert (300 x g, 5 min). Sie wurden einmal in PBS resuspendiert und wiederum pelletiert. Anschließend wurden die Pellets in 200 µl PBA resuspendiert und 30 min dunkel auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde pelletiert, einmal mit PBA gewaschen und wieder pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl PBA resuspendiert und dunkel bei 4 °C gelagert.

Für die Quantifizierung von GFP-Expression wurden wie oben beschrieben permeabilisierte und fixierte Zellen im MACSQuant VYB analysiert. In der Durchflusszytometrie wurden verschiedene Parameter erfasst, das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* FSC), das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter* SSC) und die Fluoreszenz von GFP. FSC bezeichnete die Beugung von Licht im flachen Winkel und war ein Maß für das Zellvolumen, während SSC die Brechung von Licht im rechten Winkel darstellte und ein Maß für Granularität war. Zur Einstellung der Messparameter wurde zunächst eine Probe nicht fluoreszierender Zellen genutzt, um angemessene Bereiche für FSC und SSC zu ermitteln. Eine kompakte Population wurde so festgelegt, dass möglichst viele Zellen der Probe darin enthalten waren. Für die Messung der Fluoreszenz wurde die zuvor festgelegte Population übernommen und ein Schwellenwert festgelegt. Unterhalb dieses Schwellenwerts wurde die Fluoreszenz als negativ angenommen. Ein Fehler von 0,5 % der Zellen wurde als falsch-positiv akzeptiert. Der Messwert für die Gesamtheit von 99,5 % der Kontrollzellen, welche GFP nicht exprimierten, befand sich unterhalb des Schwellenwerts.

Nach der Einstellung der Parameter wurden alle Proben mit denselben Einstellungen analysiert und anschließend der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen berechnet.

3.9. Arbeiten mit Viralen Vektoren

3.9.1. Anzucht von Adeno-assoziierten Virusvektoren

Für die Herstellung von AAV wurden ein AAV-Shuttleplasmid und ein (mehrere) Helferplasmid(e) gemeinsam in HEK 293T Zellen mit Hilfe von PEI transfiziert. Das/Die Helferplasmid(e) stellen hierfür die notwendigen *Rep* und *Cap* Gene *in trans* zur Verfügung. Nach erfolgreicher Kotransfektion werden daraufhin die DNA-Sequenzen innerhalb der ITRs dimerisch in AAV-Partikel verpackt. Der entstehende Pseudotyp enthält die ITRs von AAV2, die Verpackungsproteine sind abhängig vom Helferplasmid von einem anderen Serotyp. Der entstehende AAV wird beispielsweise als dimerischer scAAV2/9 bezeichnet.

Für die Produktion in Zellkulturschalen mit 15 cm Durchmesser wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen ausgesät. Diese erreichten am nächsten Tag eine Konfluenz von 75 – 80 %. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen vorbereitet, die eine enthielt gelöste DNA in NaCl und die andere PEI in NaCl. Je nach herzustellendem Pseudotyp wurden auf Grund von Erfahrungswerten andere Mengen verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Mengen von AAV-Shuttleplasmiden und Helferplasmiden in 15 cm Zellkulturschalen

| Pseudotyp | Lösung A (pro Schale) | Lösung B (pro Schale) |
|-----------|--|--|
| scAAV2 | 6 µg pscAAV + 18 µg pDP in 1 ml 150 mM NaCl | 24 µl PEI (2,58 µg/µl) in 1 ml 150 mM NaCl |
| scAAV2/6 | 6 µg pscAAV + 18 µg pDP6rs in 1 ml 150 mM NaCl | 24 µl PEI (2,58 µg/µl) in 1 ml 150 mM NaCl |

| Pseudotyp | Lösung A (pro Schale) | Lösung B (pro Schale) |
|-----------|---|--|
| scAAV2/9 | 10 µg pscAAV + 10 µg p5E18VP2/9 + 18 µg pHelper in 1 ml 150 mM NaCl | 38 µl PEI (2,58 µg/µl) in 1 ml 150 mM NaCl |

Beide Lösungen wurden miteinander vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zwischen DNA und PEI zu ermöglichen. Anschließend wurden 2 ml des Transfektionsansatzes auf eine Zellkulturschale tropfenweise verteilt und 3 d inkubiert.

Wurden AAV in großen Mengen benötigt, wurde die Produktion in 800 cm² Rollerflaschen durchgeführt. Diese wurden zunächst mit 35 ml Collagen beschichtet (30 min, 37 °C, 0,2 U/min). Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen und danach ca. 6 x 10⁷ Zellen in 200 ml Kulturmedium ausgesät und zwei Tage inkubiert (37 °C, 0,2 U/min). Auch für diese Variante der Produktion wurden AAV-Shuttleplasmid und Helferplasmid(e) mit Hilfe von PEI in 150 mM NaCl kotransfiziert.

Tabelle 14: Verwendete Mengen von AAV-Shuttleplasmiden und Helferplasmiden in Rollerflaschen

| Pseudotyp | Lösung A (pro Rollerflasche) | Lösung B (pro Rollerflasche) |
|-----------|--|------------------------------|
| scAAV2 | 7ml 150mM NaCl 30µg pscAAV 90µg pDG | 7ml 150mM NaCl 120µl PEI |
| scAAV2/6 | 7ml 150mM NaCl 30µg pscAAV 90µg pDP6 | 7ml 150mM NaCl 120µl PEI |
| scAAV2/9 | 7ml 150mM NaCl 50µg pscAAV 90µg pHelper 90µg p5E18VP2/9 | 7ml 150mM NaCl 230µl PEI |

Die beiden Lösungen wurden vereint, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und jeweils 14 ml pro Rollerflasche zugegeben, aus der zuvor 60 ml Kulturmedium entfernt wurde. Es wurde für 3 d inkubiert (37 °C, 0,2 U/min).

Die Zellen wurden wie zur Passage geerntet. Der Überstand wurde zunächst in Zentrifugenbechern gesammelt, der Zellrasen mit PBS gespült und anschließend die Zellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA abgelöst. Sowohl der Überstand als auch die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert (300 x g, 10 – 30 min) und die Pellets aus bis zu vier Rollerflaschen in PBS vereinigt und resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Pellet in 12 – 14 ml (bei vier Rollerflaschen) resuspendiert.

Der Zellkulturüberstand wurde aufbewahrt, um eventuell freigesetzte AAV daraus fällen zu können. Die Zellernte von den Schalen erfolgte nach demselben Protokoll, Volumina wurden entsprechend angepasst. Die produzierte AAV-Menge einer Rollerflasche entspricht dabei etwa 10 Zellkulturschalen.

Die in PBS resuspendierten Zellen wurden entweder bei -80 °C gelagert oder durch viermaliger einfrieren und auftauen (-80 °C, 37 °C) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (4.700 x g, 30 min für 15 ml Falconröhrchen oder 6.000 x g, 15 min für Eppendorfgefäße). Der Überstand wurde überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (4.700 x g, 30 min oder 10.000 x g, 15 min). Anschließend wurde der Überstand mit Benzonase gereinigt (250 U/ml, 1 h, 37 °C) und wiederum zentrifugiert (4.700 x g, 20 min oder 10.000 x g, 10 min). Der Überstand wurde nach der Überführung 1:1 mit PBS verdünnt. AAV-Produktionen für *in vitro* Anwendungen waren zu diesem Zeitpunkt bereit zur Quantifizierung und Verwendung. Sollten mit den AAVs *in vivo*-Experimente ausgeführt werden, erfolgte noch eine Reinigung im Iodixanol-Gradienten.

Sollten aus dem Zellkulturüberstand AAVs gefällt werden, wurde nach der Abtrennung der Zellen 2 ml 2,5 M CaCl₂ pro 100 ml Überstand zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (4.700 x g, 30 min), die Überstände gesammelt und vereint. Anschließend wurden 60 ml steril filtrierte 1,86 M NaCl/24 % PEG-Lösung pro 100 ml Überstand zugegeben und 72 h bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (3.000 x g, 30 min) wurden die Pellets in 5 ml NaCl-Hepes vereint, zentrifugiert (10.000 x g, 15 min) und in 7 ml PBS resuspendiert. Auch hier wurde mit Benzonase behandelt, verdünnt und anschließend im Iodixanolgradienten gereinigt.

Die Reinigung im Gradienten mit Iodixanol erforderte die Herstellung von vier verschiedenen Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Diese wurden dann in einem Zentrifugationsgefäß untergeschichtet:

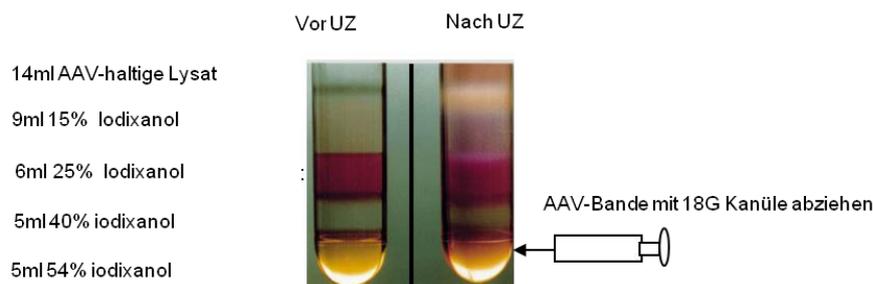


Abbildung 8: Aufbau des Iodixanol-Gradienten zur Reinigung von AAV-Partikeln. Iodixanolösungen mit unterschiedlicher Konzentration wurden zunächst unterschichtet, anschließend die Vektorlösung aufgetropft. Während der Zentrifugation reichern sich die AAV-Partikel in der farblosen Bande der 40 %-igen Lösung an. UZ = Ultrazentrifugation

Im Anschluss wurde der Deckel des Gefäßes entfernt und mit Hilfe einer Spritze und Kanüle seitlich durch die Gefäßwand gestochen und die Bande mit 40 % Iodixanol-Konzentration, in der sich die AAVs anreicherten, abgezogen. Die Lösung wurde mindestens 1:10 in PBS-MK verdünnt und anschließend die AAVs in einer Amicon Ultra-Säule nach Herstellerangaben aufkonzentriert.

Unabhängig davon, ob die AAV-haltige Lösung im Gradienten gereinigt worden war, wurde der Gehalt an Vektorgenomen in der Lösung quantifiziert. Jeweils 10 µl wurden zunächst im 100 µl Reaktionsansatz mit 1 U DNaseI (NEB) 12 h inkubiert (37 °C) und im Anschluss durch Zugabe von 1,2 mM EDTA (finale Konzentration) und Hitze die DNaseI inaktiviert (10 min, 65 °C). Im nächsten Schritt wurden die Proteinhüllen der Vektoren durch Behandlung mit Proteinase K zerstört. Der Reaktionsansatz bestand

aus 339 µl TBS-Puffer, 1 µl Proteinase K (20 µg/µl), 50 µl 10 % SDS und 10 µl 500 mM EDTA sowie 100 µl DNaseI-behandelter AAV-Lösung. Es wurde eine Stunde bei 37 °C und 350 U/min inkubiert. In der Fällungsreaktion wurde 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben und die Mischung für eine Minute kräftig mit dem Vortex gemischt. Während der Zentrifugation (12.000 x g, 5 min) trennten sich eine wässrige, farblose und eine rote, organische Phase. Zu der wässrigen Phase wurden 2 Vol. Ethanol gegeben sowie eine NaCl-Konzentration von 33 mM eingestellt. Nach einer Inkubationsphase von 30 min bis 12 h bei -20 °C wurde die DNA abzentrifugiert (12.000 x g, 15 min) und der Überstand verworfen. Es wurde mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen und noch einmal zentrifugiert (12.000 x g, 5 min). Nach 15-minütiger Lufttrocknung des Pellets wurde dieses in 20 - 50 µl DEPC-gereinigtem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

Die gelöste DNA wurde mit Hilfe einer absoluten qPCR-Quantifizierung auf den Gehalt der Vektorgenome analysiert. Pro 20 µl-Messansatz wurden SsoFast EvaGreen Supermix (2x), die Primer CMV Enhancer-329F und CMV Enhancer-462R (jeweils 100 nM) und 2 µl Probe oder Standard gemischt. Als Standard diente eine Plasmidverdünnungsreihe, welche eine bekannte Anzahl Plasmidkopien pro Mikroliter enthielt. Das verwendete Plasmid war pscAAV-CMV, welches einen Promoter aufwies, aber kein Transgen kodierte. Das qPCR-Programm lautete wie folgt: 2min 50°C, 10min 95°C, 40 Zyklen à 15s 95°C, 1min 60°C. Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurve erstellt. An Hand der Ct-Werte der Standardreihe wurde auf die DNA-Konzentrationen der eingesetzten AAV-haltigen Proben geschlossen. Die Einheit der Konzentration lautet *vector genome equivalents* pro Mikroliter (vge/µl).

3.9.2. Transduktion von Zellen

Unter Transduktion versteht man das Einbringen von ektopter DNA durch virale Vektoren. Hierfür wird dem Kulturmedium eine definierte Menge an Vektoren beigemischt und zu den Zellen gegeben. Im Fall der Transduktion von AAVs wird die Vektorlast mit vge/Zelle angenommen. Je nach Transduktionseffizienz des jeweiligen AAV-Pseudotypen wurde im Bereich von 1.000 – 100.000 vge/Zelle gearbeitet. Je nach Design des Experiments wurde die Transduktion in Rohmedium ohne FKS, was einen Mediumwechsel nach einer gewissen Inkubationszeit erforderte, oder in Vollmedium durchgeführt. In diesem Fall konnte der Transduktionsansatz auf den Zellen verbleiben.

3.10. Virologische Methoden

3.10.1. Anzucht von Adenoviren im kleinen Volumen

Für alle *in vitro*-Experimente mit hAd 5 wurden die Virusanzuchten intern geleistet. Es wurden 90 % konfluente HeLa Zellen in T175 Zellkulturflaschen mit $2,5 \times 10^6$ PFU hAd5 in 10 ml serumfreiem Medium infiziert. Nach einer Stunde Inkubation wurden 30 ml Kulturmedium zugegeben und solange inkubiert, bis der Zellrasen vollständig lysiert worden war. Die Überstände wurden dreimal eingefroren und aufgetaut (-80 °C, 37 °C) und zweimal zentrifugiert (3.000 U/min, 15 min). Anschließend wurden sie in kleine Volumina aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Der Virustiter wurde im Plaque Assay bestimmt.

3.10.2. Anzucht von Adenoviren im großen Volumen

Viruspartikel, welche in Tierversuchen eingesetzt werden sollten, erforderten einen höheren Reinheitsgrad als im zuvor beschriebenen Ablauf gewährleistet werden könnte. Diese Anzucht wurde in Zusammenarbeit mit Xiaomin Wang (Arbeitsgruppe Poller, Charité Berlin) durchgeführt.

Zunächst wurde das Virus mehrfach amplifiziert, dann aus Zelllysaten ausgefällt und durch mehrere Zentrifugationsschritte aufgereinigt und konzentriert.

In T25-Zellkulturflaschen wurden ca. 90 % konfluente HEK293-Zellen mit 3×10^{10} vp hAd5 in Low-Glucose-Medium (2 % FKS, 1 % Penizillin/Streptomycin, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % L-Glutamin) infiziert. Zur Kontrolle der fortschreitenden Zelllyse wurde eine zweite T25-Flasche mit nicht infizierten Zellen mitgeführt. Nach 4 – 5 Tagen Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) waren die Zellen der infizierten Kultur vollständig lysiert. 1,5 ml des Lysats wurden in 15 ml frisches Medium gegeben und damit drei weitere konfluente T25-Flaschen mit HEK293-Zellen infiziert und wiederum abgewartet, bis die Zellen vollständig lysiert worden waren. Die Überstände der drei Zellkulturflaschen wurden vereint und 15 ml mit 165 ml frischem Medium vermischt. Diese Mischung wurde zur Infektion von HEK293-Zellen in neun vollständig konfluenten T175-Flaschen benutzt.

Nach kompletter Lyse des Zellrasens wurden die Überstände in einem sterilen Gefäß gesammelt und einige 1,5 ml Aliquots als Virus-Starter für spätere Präparationen eingefroren. Zum vollständigen Abbau der Zellmembranen wurde NP40-Lösung in einer finalen Konzentration von 0,5 % zugegeben und langsam geschwenkt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das gesamte Volumen auf Zentrifugationsgefäße verteilt und für 20 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden danach wieder vereint und mit 0,5 Vol. 2,5 M NaCl/20 % PEG 8000 vermischt. Durch Inkubation bei 4 °C wurde über Nacht das Virus aus dem Überstand gefällt.

Am nächsten Morgen wurde noch einmal zentrifugiert (4 °C, 20 min, 16.000 x g) und die Überstände verworfen. Die entstandenen Pellets wurden in 3,5 – 4 ml TBS vereint und wiederum zentrifugiert (3.000 U/min, 10 min). Währenddessen wurden 2 g CsCl in ein 15 ml Falcon-Röhrchen eingewogen und anschließend der Überstand nach der Zentrifugation mit dem CsCl vermischt. Abschließend wurde die Dichte der Lösung exakt auf 1,34 g/ml eingestellt. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde zentrifugiert (3.000 U/min, 10 min, 4 °C) und anschließend die Überstände in zwei Beckmann-Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden exakt gegeneinander austariert und mit Hilfe eines Schweißgerätes verschlossen. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 3 h bei 90.000 U/min im dafür vorgesehenen Rotor (TLA-120). Die Röhrchen wurden mit den entsprechenden Adaptern arretiert. Nach der Zentrifugation wurde das Vakuum in den Röhrchen mittels einer Kanüle gebrochen, indem im oberen Bereich ein Loch in das Gefäß gestochen wurde. Etwa auf halber Höhe des Gefäßes hatte sich eine weiße Schicht herausgebildet, in welcher sich das Virus angereichert hatte. Diese wurde nun mit Hilfe einer 1 ml-Insulinspritze abgezogen und überführt. Das Gesamtvolumen aus beiden Röhrchen sollte einen Milliliter nicht überschreiten.

Die Viruslösung wurde auf eine mit TBS equilibrierte Sephadex-25-Säule gegeben und mit 6 ml TBS eluiert. Das Eluat wurde in 12 Fraktion à 500 µl gesammelt und deren Optische Dichte bei 260 nm gemessen. Von jedem Aliquot wurde hierfür eine Zehnfachverdünnung angefertigt. Fraktionen mit OD > 0,5 wurden vereinigt, wiederum verdünnt und die Optische Dichte gemessen. Daraus berechnete sich die Partikelzahl pro Mikroliter wie folgt:

$$VP/\mu l = OD_{260\text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^9$$

Zur Stabilisierung der Lösung während der Lagerung wurden 1 µg/µl BSA zugegeben und anschließend aliquotiert. Das Virus wurde bei -80 °C gelagert.

Zur Überprüfung des Potentials des Virus wurden noch einmal konfluente HEK293 Zellen einer T25-Zellkulturflasche mit 3×10^{10} VP infiziert. Die Zellen sollten nach 3 – 4 Tagen vollständig lysiert sein.

3.10.3. Bestimmung des Virustiters im Plaque Assay

Für die Virustiterbestimmung wurden 3×10^6 HEK293 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zum nächsten Tag inkubiert. Sie sollten beinahe vollständig konfluent wachsen, aber keinesfalls zu dicht liegen. Die zu bestimmende Probe wurde dekadisch in DMEM Low Glucose mit 2 % FKS verdünnt, jeweils 900 µl pro Well inokuliert und 2 h inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit wurden 6 ml 5 % Low Melting Agarose in der Mikrowelle verflüssigt und auf 42 °C temperiert. Zusätzlich wurde DMEM High Glucose mit 5 % FKS auf 37 °C temperiert. Agarose und Medium wurden miteinander vermischt und genutzt, um den Zellrasen nach Entfernung der Inokulationslösung zu überschichten. Nach 15 – 20 min bei Raumtemperatur war die Agarose ausgehärtet und die Platte wurde 7 – 14 d bei 37 °C inkubiert.

In dieser Zeit replizierte das Virus in den Zellen und lysierte diese, um benachbarte Zellen zu infizieren. Entsprechende Areale werden als Löcher im Zellrasen mit angrenzenden Zellen, die einen virus-induzierten zytopathischen Effekt aufweisen, sichtbar. Sie werden ausgezählt und mit dem Verdünnungsfaktor im Inokulationsmedium und dessen Volumen ins Verhältnis gesetzt. Man erhält die Einheit Plaque Forming Units pro Milliliter (PFU/ml).

$$\text{Titer in PFU/ml} = \text{Anzahl Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Inokulationsvolumen in ml}$$

3.10.4. Virustiterbestimmung mit qPCR

Für Proben mit sehr kleinem Virustiter wurde eine andere Variante der Bestimmung der Anzahl der infektiösen Viren gewählt. Es erfolgte zunächst eine Amplifikation der Viren auf HeLa Zellen. 60.000 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät und mit 300 µl serumfreien Medium und virushaltiger Probe infiziert. Nach 4 h Inkubation wurde das Medium gewechselt und 2 d weiter kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen, der Zellrasen mit PBS gespült und die Zellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA abgelöst. Die Reaktion wurde mit Vollmedium abgestoppt und die Suspension zentrifugiert (300 x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 100 µl PBS resuspendiert und durch viermaliges Einfrieren und Auftauen (-80 °C, 37 °C) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min) und der Überstand abgenommen. Ein Teil wurde 1:10 in PBS verdünnt und die enthaltenen Viren durch Hitze inaktiviert (95 °C, 5 min).

Die verdünnten, inaktivierten Überstände wurden in einer qPCR auf ihren Gehalt viraler Hexon DNA und zellulärer 18S rRNA-DNA untersucht. Im Vorfeld wurde ein Adenovirusstandard erstellt. Hierfür wurde eine definierte Menge PFU zur Infektion benutzt und nach demselben Protokoll amplifiziert, aufgereinigt und in der qPCR analysiert. Arbeitete man mit Überständen aus Zelllysaten wurde der Sso Fast EvaGreen qPCR Mastermix (2x) (Biorad) verwendet. In 10 µl Gesamtvolumen wurden Mastermix, je 200 mM Primer und Probe vermischt und folgende PCR gefahren: 95 °C, 3 min; 40 Zyklen à 95 °C, 15 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s. Am Ende der Amplifikation wurde eine Schmelzkurve im Bereich von 65 bis 95 °C erstellt. Dieses PCR-Programm ist das Standardprogramm für alle Quantifizierungen von adenoviraler DNA.

Die ΔCt -Werte aus Hexon-DNA und 18S rRNA-DNA sowie die eingesetzte Virusmenge wurden genutzt um eine Standardgerade zu erzeugen, durch welche man auf den Virustiter der Proben schließen konnte.

3.10.5. Infektion von Zellen

Die Infektion von eukaryontischen Zellen wurde ähnlich wie Transduktion mit definierter Menge an Viruspartikeln durchgeführt. Es wurde eine bestimmte *Multiplicity of Infection* (MOI) eingestellt, welche das Vielfache der Viruslast pro Zelle darstellt. Virusstocklösungen wurden entsprechend verdünnt und auf Zellen gegeben. Dies geschah je nach experimentellem Design in serumfreiem Medium, was einen Mediumwechsel erforderte, oder in Vollmedium.

3.10.6. Ad5-Inhibierungsassay

Im Adenovirus-Inhibierungsassay wurde untersucht, ob die Replikation des Ad durch amiR-Ad verringert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen in Multiwell-Platten ausgesät und bei vollständiger Konfluenz mit 1.000 oder 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad transduziert. Zusätzlich wurden sie mit hAd5 infiziert (MOI 0,05). Die Transduktion fand entweder prophylaktisch oder therapeutisch statt, also vor oder nach der Infektion. Zwei Tage nach der Infektion wurde das Kulturmedium verworfen, einmal mit PBS gespült und die Zellen in PBS durch viermaliger Einfrieren und Auftauen (-80 °C, 37 °C) lysiert. Nach Transfer der Proben in Eppendorfgefäße wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (6.000 x g, 10 min) und die Überstände in neue Gefäße überführt. Ein Teil wurde 1:10 in PBS verdünnt und die infektiösen Partikel durch Hitze inaktiviert (95 °C, 5 min).

In einer qPCR-Analyse wurde der Gehalt an viraler Hexon-DNA und zellulärer 18S rRNA-DNA ermittelt und nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode relativ ausgewertet.

3.10.7. Zellviabilitätsassay mit XTT

Zellviabilitätsassays sind von verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich. Das hier verwendete Cell Proliferation Kit II (XTT) von Roche beruht auf der Quantifizierung des mitochondrialen Stoffwechsels viabler Zellen. Der gelbe Farbstoff XTT wird zu orange-farbigem Formazan prozessiert, was das Absorptionsspektrum bei UV-Licht des Zellkulturüberstands verändert. Die Intensität der Färbung korreliert dabei direkt mit der Anzahl viabler Zellen.

Nach Aussaat von HeLa-Zellen in 96-Well-Platten wurden diese zunächst mit 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad transduziert und fünf Stunden später mit hAd5 (MOI 1) infiziert. Nach fünf Tagen wurde das Viabilitätsassay mit XTT nach Herstellerangaben ausgeführt und die Absorption der Zellkulturüberstände nach 4 h Inkubationszeit ausgelesen. Von den Messwerten wurde zunächst ein Blindwert abgezogen, der generiert wurde durch die Lyse von konfluenten Zellen mit 0,05 % Triton-X, denen ebenfalls die XTT-Agenzien zugefügt wurden. Anschließend wurden die Blindwert-korrigierten Messwerte zu den Werten von unbehandelten Mock-Zellen ins Verhältnis gesetzt.

3.11. Evaluierung der amiR-Ad-basierten Therapie im immunsupprimierten Tiermodell

3.11.1. Studiendesign

Nach Abschluss der *in vitro* Versuchsreihen wurden die zwei erfolgversprechendsten Vektoren im großen Maßstab als AAV2/9-Pseudotypen von der Firma ViGene Biosciences, Maryland, USA produziert. Sie wurden benutzt, um im permissiven, immunsupprimierten Tiermodell die Inhibierung von hAd5 zu

zeigen. Das primäre Ziel war es, die Last replizierender Viren in der Leber zu reduzieren. Zusätzlich wurden weitere Daten erhoben, um die Gesamtheit des Infektionsstatus zu erfassen. Neben den Verlaufsdaten, wie Körpergewicht und Allgemeinzustand, gehörte dazu die Histologie verschiedener Organe, um pathologische Veränderung durch die Infektion festzustellen. Außerdem wurde als Maß für die Lebertoxizität der Serumgehalt der Enzyme AST und ALT quantifiziert. Letztlich wurden auch die DNA und RNA aus verschiedenen Organen aufgearbeitet und virale Gene bzw. deren Expression quantifiziert.

3.11.2. Pilotversuch I: Infektion von immunsupprimierten syrischen Hamstern mit hAd5

Das Tiermodell wurde vollständig neu etabliert und somit lagen keinerlei Referenzdaten vor, mit welchem Krankheitsverlauf zu rechnen war. Aus diesem Grund wurde in einer Pilotstudie mit zwölf Tieren ausschließlich die Adenovirusinfektion gesetzt und der Verlauf der Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Männliche Syrische Hamster im Alter von 4 Wochen wurden von der Firma Charles River bezogen. Nach einwöchiger Adaptionszeit wurde mit der medikamentösen Immunsuppression durch Cyclophosphamid (CP) begonnen. Als initiale Dosis wurden 140 mg/kg intraperitoneal (*i.p.*) injiziert, danach zweimal wöchentlich 100 mg/kg. Nach 14 d wurden alle 12 Tiere mit 4×10^{11} vp/kg hAd5 infiziert. Hierfür wurde unter Isoflurannarkose mittels eines Hautschnitts die *Vena jugularis* freigelegt und das in PBS verdünnte Virus *i.v.* appliziert. Der Hautschnitt wurde je nach Größe mit ein bis zwei Heften genäht und zur Analgesie Carprosol (5 mg/kg) subkutan (*s.c.*) verabreicht. Durch das zügige Abfluten des Narkosegases waren die Tiere binnen weniger Minuten wieder bei vollem Bewusstsein und zeigten keinerlei Beeinträchtigung.

Die Immunsuppression wurde auch nach der Infektion weiter aufrechterhalten. Nach 3, 7 und 14 d wurden jeweils vier Tiere mit 6 – 8 % Kohlenstoffdioxid getötet und die verschiedene Organe sowie kardiales Blut durch Herzpunktion entnommen.

Histologie

Teile von Organen wurden in Gewebegittern in 4 % Formaldehyd gelagert. Im Anschluss wurden sie in Paraffin eingebettet und nach Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung auf pathologische Veränderungen untersucht. Die aufbereiteten Daten wurden von Prof. Dr. Robert Klopffleisch, Freie Universität Berlin, Institut für Tierpathologie zur Verfügung gestellt.

Bestimmung des Virustiters

Teile von Organen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und gewogen. Anschließend wurden sie in 2 ml serumfreiem Medium mit dem Gewebehomogenisator VDI 12 (VWR) homogenisiert und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen (-80 °C, 37 °C) aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (5.000 x g, 10 min) wurde der Überstand transferiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden die Proben 1:10 in serumfreiem Medium verdünnt und HeLa Zellen nach dem Protokoll „Virustiterbestimmung mit qPCR“ (Kapitel 3.10.4) infiziert. Dasselbe Protokoll wurde für die Virustiterbestimmung im Serum angewendet.

DNA-Quantifizierung

Aus kleinen Gewebestücken (< 40 mg) wurde mit Hilfe des Tissue DNA Mini Kits (peqlab) nach Herstellerangaben DNA isoliert. Jeweils 50 ng wurden in einer qPCR auf die enthaltene Menge viraler Hexon-DNA und zellulärer 18S rRNA-DNA untersucht.

Serum-AST/-ALT

Die Menge von AST und ALT im Serum wurde nach den Protokollen Infinity ALT (GPT) Liquid Stable Reagent und AST (GOT) Liquid Stable Reagent (ThermoScientific) bestimmt.

3.11.3. Pilotversuch II: Toleranz der Dosis von AAV2/9-amiR-Ad (6x)

In der Literatur ist beschrieben, dass eine hohe Menge ektooper kurzer RNAs, welche in den siRNA oder microRNA Stoffwechsel eingreifen, zu zytotoxischen Reaktionen führen kann (127). Daher wurde in einer zweiten Pilotstudie sowohl die Toleranz der immunsupprimierten Hamster gegenüber der Dosis von 5×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-Ad (6x) als auch die korrekte Expression der amiR-pTP überprüft.

Vier 4 Wochen alte, weibliche Syrische Hamster wurden nach Adaptionszeit mit scAAV2/9-amiR-pTP (6x) transduziert. Die Applikation der Vektoren erfolgte *i.v.* in die *V. jugularis*. Es wurde wieder mit Isoflurannarkose und Analgesie mit Carprosol gearbeitet. Zeitgleich wurde die Immunsuppression nach bekanntem Schema begonnen. Zwei Wochen nach der Transduktion wurden die Tiere getötet und Organe entnommen. Es wurde eine histologische Beurteilung der Leber vorgenommen und RNA isoliert, um die Expression der amiR-pTP nachzuweisen

RNA Isolation und amiR-Nachweis

RNA wurde aus Geweben mit Hilfe von TRIzol isoliert. Für den Nachweis von amiRs aus Gesamt-RNA wurde RT-PCRs mit *Stem Loop* Primern durchgeführt und anschließend entsprechende Amplifikate in der qPCR generiert. Es wurden jeweils 200 ng Gesamt-RNA umgeschrieben.

3.11.4. Inhibierung der Replikation von hAd5 durch AAV2/9-exprimierte antivirale amiRs

In der ersten Wirkstudie wurden 30 männliche Hamster im Alter von 4 Wochen immunsupprimiert, prophylaktisch mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert und mit hAd5 infiziert. Nach Adaptionszeit wurden die 30 Tiere in 5 Gruppen eingeteilt, wie in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Einteilung der experimentellen Gruppen

| Gruppe | scAAV2/9-amiR-Ad (6x) | hAd5 |
|--------|-----------------------|------|
| 1 | NaCl | NaCl |
| 2 | NaCl | x |
| 3 | Con (6x) | x |
| 4 | pTP (6x) | x |
| 5 | pTP (3x) – E1A_2 (3x) | x |

Gruppe 1 stellte die Kontrollgruppe ohne AAV und ohne Virusinfektion dar. Die Tiere wurden ebenfalls immunsupprimiert und an den entsprechenden Tagen scheinoperiert. Statt AAV- oder Viruslösung wurde ihnen 0,9 %-iges NaCl injiziert. Der Schaden und Leiden, welche durch Operationen und Injektionen verursacht werden könnten, wurden an diesen Tieren beobachtet. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten keine AAV-Injektion, sondern nur die Virusinfektion. Diese Gruppe zeigte den Einfluss des Virus in Abwesenheit eines AAVs. Gruppe 3 zeigte den Einfluss einer AAV-Transduktion und der Expression einer Kontroll-amiR. Die eigentlichen Messgruppen 4 und 5 bekamen entweder scAAV2/9-amiR-pTP (6x) oder scAAV2/9-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x).



Wie schematisch dargestellt wurden den Tieren an Tag 1 mit 5×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-Ad (6x) bzw. NaCl *i.v.* injiziert. Wie zuvor erfolgte dies in die *V. jugularis* unter Isoflurannarkose und mit anschließender Analgesie. An Tag 0 wurde ebenfalls das Immunsuppressionsregime begonnen.

An Tag 14 wurden die Hamster mit 4×10^{11} vp/kg hAd5 infiziert. Die Injektion der Viren bzw. des NaCl bei Gruppe 1 erfolgte *i.v.* in die *V. jugularis* unter Isoflurannarkose und mit nachfolgender Carprosol-Behandlung. An Tag 21 (7 d *p.i.*) wurden die Tiere mit Kohlenstoffdioxid getötet und die Organe sowie Blut entnommen.

Für das primäre Ziel, den Nachweis der Verringerung des Virustiters in der Leber, wurde eine Virustiterbestimmung mit qPCR durchgeführt. Auch für weitere Organe, wie Lunge, Herz, Milz, und Serum wurde diese Analyse durchgeführt. Außerdem wurden die entsprechenden Gewebe histologisch begutachtet und aus ihnen DNA und RNA isoliert. Es wurde die Häufigkeit viraler und vektorierter DNA sowie die Expression viraler Gene und der amiRs auf RNA-Ebene festgestellt.

3.11.5. Therapeutische Inhibierung von hAd5 im immunsupprimierten Wirt

In der zweiten Wirkstudie wurden wiederum 30 männliche Syrische Hamster im Alter von 4 Wochen immunsupprimiert und nach 14 d zeitgleich mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert und mit hAd5 infiziert. Nach einer Woche wurden die Tiere zur Organentnahme getötet.



Die Dosierungen und Applikationsformen wurden für diesen Versuch ebenso gewählt wie für die prophylaktische Wirkstudie. Nur die Virusdosis wurde auf 4×10^{10} vp/kg reduziert. Für den Vorgang der Infektion und Transduktion wurden Vektoren und Viren direkt vor der Gabe gemischt.

cDie Probenahme wurde auf Blut und Leberstücke reduziert und anschließend die Virustiter, DNA- und RNA-Vorkommen viraler Nukleinsäuren sowie die Expression der amiR-Ad evaluiert. Außerdem

wurden Teiler der Leber immunhistologisch bewertet und die Rate freier Leberenzyme im Serum bestimmt.

3.12. Statistische Bewertung der Versuchsergebnisse

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 erstellt. Ergebnisse aus *in vitro*-Versuchsreihen wurden zunächst mit Hilfe eines Shapiro-Wilks-Tests auf Normalverteilung überprüft. Bei gegebener Normalverteilung und gleicher Standardabweichung wurden Unterschiede zwischen den Mittelwerten von Versuchsgruppen mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests ermittelt. Als Nullhypothese wurde Gleichheit der Mittelwerte angenommen; das Konfidenzintervall wurde mit 95 % gewählt. Abhängig von der Testentscheidung, welche mit Hilfe des p-Werts angegeben wurde, wurden unterschiedliche Signifikanzniveaus eingeteilt. Diese sind jeweils in den Beschriftungen der Abbildungen angegeben.

In vitro-Versuche wurden jeweils mehrfach unabhängig voneinander wiederholt. Die Versuchszahl *n* ist ebenfalls in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

Ergebnisse, die aus *in vivo*-Experimenten stammen, wurden ebenfalls auf Normalverteilung und gleiche Standardabweichung überprüft. Konnte nicht gewährleistet werden, dass die Daten aus normalverteilten Grundgesamtheiten stammten, wurde ein anderer Test als der T-Test für die Bestimmung der Signifikanzen von Unterschieden von Gruppenmittelwerten der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Auch hier sind die unterschiedlichen Signifikanzniveaus sowie die Anzahl der Analysenwiederholungen in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Evaluation der amiR-Sequenzen im Reporterassay

4.1.1. Funktion der amiR-Ad nach Expression von einem Plasmid

Im initialen Versuch wurden die Plasmide pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) und jeweils eine Variante von psiCHECK2-amiR-Ad-TS, welche eine Zielsequenz enthielt, kotransfiziert und nach 48 h die Aktivität der beiden auf dem Reporterplasmid enthaltenen Luciferasen ermittelt und ins Verhältnis gesetzt. Die Kontroll-amiR wurde mit jedem Zielsequenzplasmid individuell kotransfiziert, die jeweiligen Messwerte dienten zur Relativierung der Inhibierung. Jede der neun verschiedenen amiR-Ad wurde funktional exprimiert, erkannte ihre Zielsequenz in der mRNA der 3'-UTR der *Renilla*-Luciferase und induzierte ein RNAi-basiertes Gen-Silencing. Jede amiR-Ad bewirkte eine Reduktion der Reporteraktivität um 68 - 90 %, die höchste Effizienz zeigten die amiR-pTP (89,5 %) und amiR-Hex (87,8 %). Die geringste Effizienz wurde bei amiR-E1A_1 (67,8 %) gemessen. Dennoch war die Inhibierung in jedem Fall statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle.

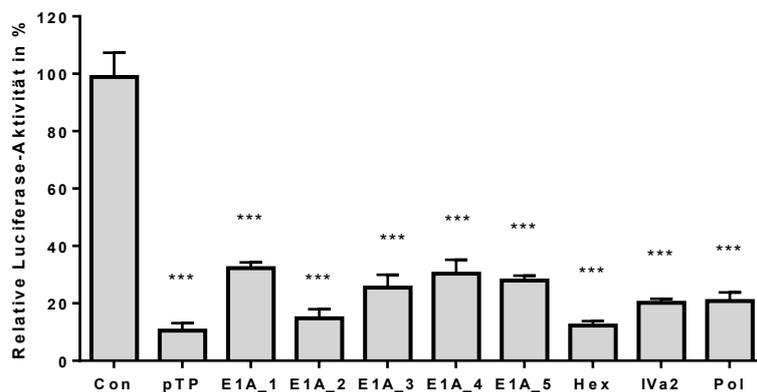


Abbildung 9: Reporterassay mit pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x). 35.000 HeLa-Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. 350 ng pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) und 50 ng psiCHECK2-amiR-Ad-TS wurden mit PEI transfiziert, nach 2 d die Zellen lysiert und ein Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit pscAAV-GFP-amiR-Con (6x) und dem entsprechenden Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert worden waren. Abgebildet: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,001 ***

Ausgehend von pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) wurden die Plasmide kloniert, welche neben GFP nur jeweils eine amiR-Ad exprimierten. Diese wurden ebenfalls in einem Reporterassay auf ihre Funktionalität hin untersucht. Wie im vorangegangenen Experiment wurden jeweils pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x) und das korrespondierende Zielsequenz-Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert und die Inhibierung der Funktionalität der *Renilla*-Luciferase gemessen. Jede amiR wurde vom jeweiligen Vektor funktional exprimiert und regulierte die Expression und nachfolgend die Funktion des Reportergens signifikant. Die Effizienz der Inhibierung variierte gegenüber dem ersten Experiment. Zwar erwies sich wiederum die amiR-pTP als die effizienteste (91,8 %), die amiRs mit der geringsten Effizienz waren aber andere: amiR-IVa2 (74,7 %) und E1A_4 (76,9 %). Insgesamt wurden bei jeder amiR größere Inhibierungen erreicht, wenn pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x), statt pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) verwendet wurde. Es könnte sich um einen Hinweis handeln, dass durch das erheblich längere Transkript von pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) die Prozessierung der reifen amiRs nicht im selben Maß gewährleistet worden war wie im Fall des Plasmids, welches nur eine amiR neben GFP exprimierte.

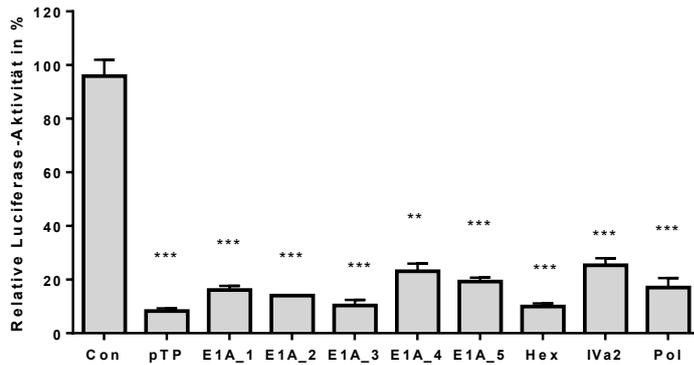


Abbildung 10: Reporterassay mit pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x). 35.000 HeLa-Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. 350 ng pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x) und 50 ng psiCHECK2-amiR-Ad-TS wurden mit PEI transfiziert, nach 2 d die Zellen lysiert und ein Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit pscAAV-GFP-amiR-Con (1x) und dem entsprechenden Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert worden waren. Abbildung vorab publiziert in (213).
Abgebildet: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

4.1.2. Inhibierung des Reportergens mit Hilfe einer amiR-Ad

Basierend auf den Plasmiden, welche die Information für GFP und eine amiR-Ad enthielten, wurden dimerische scAAV2-Partikel hergestellt, um damit im Anschluss HEK293 Zellen zu transduzieren. Gleiche Volumina nicht quantifizierter AAV-Lösungen wurden verwendet und die Expression des Fluoreszenzfarbstoffs beobachtet. Als Kontrolle für die erfolgreiche Transduktion wurden Zellen mit scAAV2-GFP ohne amiR-Ad transduziert. Hier wurde eine nahezu vollständige Transduktion der Zellkultur beobachtet. Im Vergleich dazu war die Expression von GFP in allen anderen Proben deutlich geringer. Die Zellen waren zwar beinahe vollständig transduziert, die Fluoreszenz des GFP war aber weniger intensiv, was im Zusammenhang mit einer geringeren Expressionsstärke oder zeitlich verzögerter Expression im Vergleich zum Vektor ohne amiR-Ad stehen könnte. Die Effizienz der Transduktion der verschiedenen Vektoren untereinander war vergleichbar, was auf ähnliche Expression von sowohl dem Reportergen GFP als auch der amiR-Ad hinwies. Die Abwesenheit fluoreszierender Zellen zeigte, dass die Transgenkassette von pscAAV-GFP-amiR-Ad (9x) erwartungsgemäß zu groß war, um in einem dimerischen AAV-Partikel verpackt zu werden.

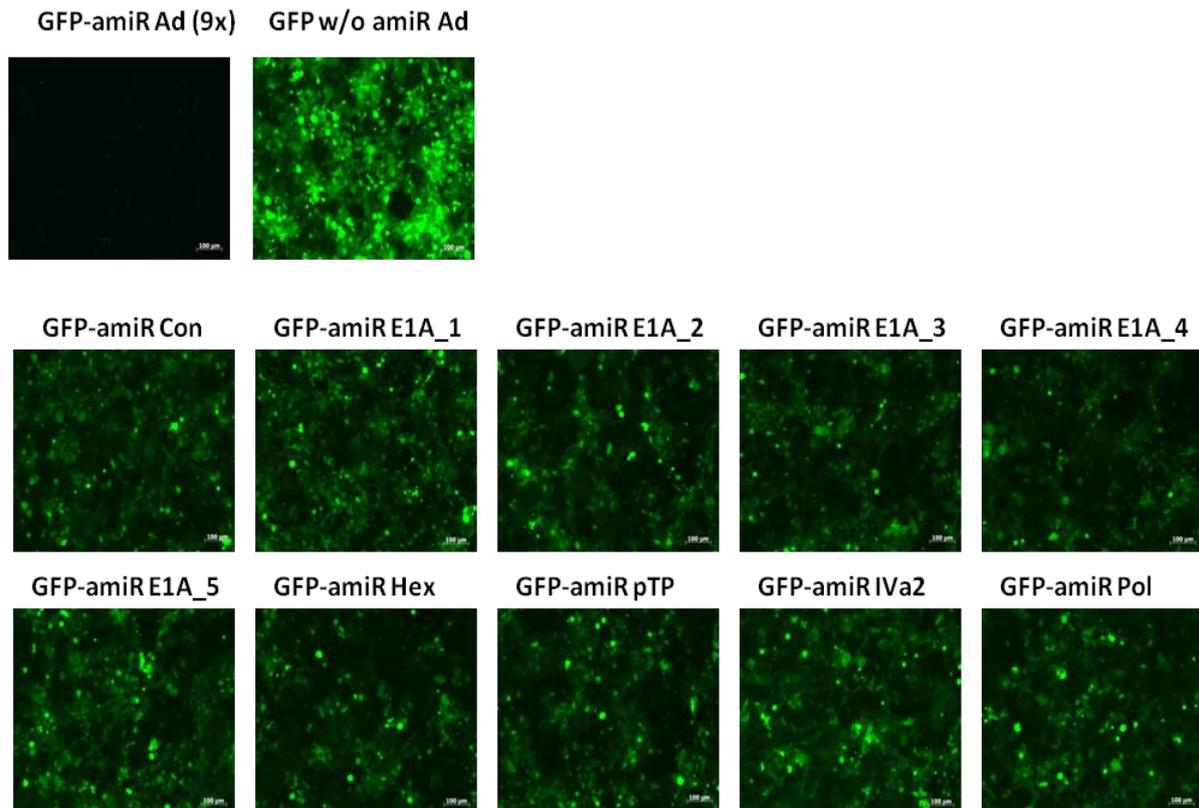


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der GFP-Expression von scAAV2-GFP-amiR-Ad (1x) transduzierten Zellen. Konfluente HEK293-Zellen wurden mit gleichen Volumina von AAV-haltigen Zelllysaten transduziert und 72 h danach die Expression von GFP mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Vergrößerung 1:100. Die transduzierten Zellen wurden verwendet, um ein weiteres Reporterassay mit Zielsequenzplasmiden zu erstellen. Alle amiRs konnten funktional auch von scAAV2-Vektoren exprimiert werden und über Bindung an ihre jeweilige Zielsequenz die Expression des Reportergens signifikant inhibieren. Allerdings zeigte sich erstmals eine starke Varianz zwischen den Vektoren, bzw. den amiRs. Während die amiR-pTP eine hohe Effizienz von etwa 87 % Inhibition bewirkte, zeigte die amiR-IVa2 nur eine Effizienz von ca. 42 %.

Nachdem die Expression der amiRs von scAAV2-Vektoren sichergestellt worden war, wurde die GFP-kodierende Sequenz aus allen AAV-Shuttle-Plasmiden entfernt. Mit dieser Strategie wurden zwei Ziele verfolgt: zum einen wurde Kapazität in der Transgenkassette gewonnen, um mehrere amiRs exprimieren zu können, zum anderen wurde ein eventueller negativer wechselseitiger Effekt der Expression von GFP und der amiR ausgeschlossen. Im Gegenzug ging der Kontrollmechanismus, welcher durch das Reporter gen gegeben war, verloren. Da aber gezeigt werden konnte, dass eine sehr hohe Transduktionseffizienz der Zellkultur vorlag und alle amiR-Ad funktional exprimiert worden waren, konnte für die folgenden Experimente darauf verzichtet werden.

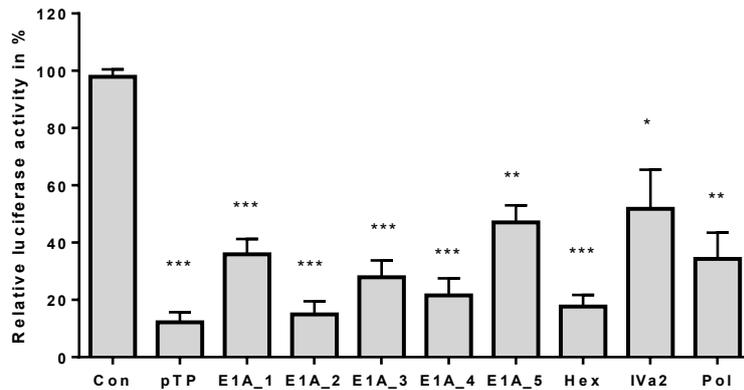


Abbildung 12: Reporter-genassay mit scAAV2-GFP-amiR-Ad (1x). Konfluente HEK293-Zellen wurden mit gleichen Volumina von AAV-haltigen Zelllysaten transduziert und 72 h inkubiert. Die transduzierten Zellen wurden geteilt und mit psiCHECK2-amiR-Ad-TS transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen lysiert und ein Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit scAAV2-GFP-amiR-Con (1x) und dem entsprechenden Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert worden waren. Abbildung vorab publiziert in (213).

Abgebildet: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

4.1.3. Konkatemere der amiR-Ad-kodierenden Sequenzen zur Effizienzerhöhung

In der Literatur wird beschrieben, dass die Verkettung von microRNA-kodierenden Sequenzen zu einer verstärkten Inhibierung der regulierten mRNA führt (134). Dieser Effekt sollte auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommen. Zu diesem Zweck wurden zunächst AAV-Shuttle-Plasmide kloniert, die drei aneinander gereihete Sequenzen derselben amiR aufwiesen: pscAAV-amiR-pTP (3x) und pscAAV-amiR-E1A_2 (3x). Die Wahl fiel auf diese beiden amiRs, da sie im vorangegangenen Reporter-genassay nach Expression durch den dimerischen AAV die höchste Inhibierung des Reportergens er-wirkten. Außerdem wurde in früheren Arbeiten bereits gezeigt, dass das Attackieren von E1A mit siR-NAs zusammen mit einem viralen Gen der Replikations- und/oder Verpackungsmaschinerie einen po-sitiven Effekt auf die Viabilität der infizierten Zellen hatte (135,136).

In einem Kotransfektionsexperiment wurde die Wirksamkeit der beiden AAV-Shuttle-Plasmide gegen-über dem Reporterplasmid mit einer entsprechenden Zielsequenz untersucht. Es zeigte sich, dass beide Kombinationsplasmide die Effizienz des *Silencings* der Luciferase gegenüber dem Plasmid mit nur einer amiR-Sequenz deutlich steigern konnten. Außerdem wurde ersichtlich, dass obwohl die Zielsequenzen in der 3'-UTR des Reportergens vollständig homolog zur anti-sense Sequenz der amiR gestaltet worden waren, die Inhibierung der jeweiligen amiR nicht gleichermaßen effizient ablief. Trotz der Verwendung gleicher Mengen amiR exprimierender Plasmide fand eine geringere Inhibierung der Reporter-genexpression durch pscAAV-amiR-E1A_2 (3x) als durch pscAAV-amiR-pTP (3x) statt. Gründe hierfür könnten in unterschiedlich starker Expression oder verschieden effizienter Prozessierung der amiRs liegen.

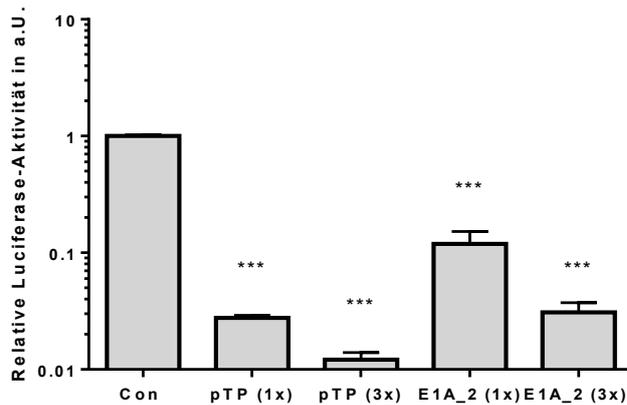


Abbildung 13: Reporterassay mit pscAAV-amiR-Ad (1) – (3x). 35.000 HeLa-Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät und am Tag darauf mit 350 ng pscAAV-amiR-Ad (1x) – (3x) und 50 ng psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Dual Luciferase Reporter Assay ausgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit scAAV2-amiR-Con (1x) und dem entsprechenden Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert worden waren
Abgebildet: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,001 ***

Nachdem die Verlängerung der Transgenkassette auf drei Abfolgen der amiR-Sequenz guten Erfolg erzielte, wurde exemplarisch für die amiR-pTP noch ein weiteres Konstrukt angefertigt, welches sechs kodierende Sequenzen enthielt. Im Kotransfektionsexperiment zeigte sich jedoch, dass keine weitere Verbesserung der Inhibierung gegenüber pscAAV-amiR-pTP (3x) eintrat.

Daraufhin wurde das Verhältnis der transfizierten Plasmide zueinander verschoben. Es wurde weniger amiR-exprimierendes und mehr Reporterplasmid verwendet, damit sollte die sehr starke Inhibierung gebremst und ausgeschlossen werden, dass man sich in einem gesättigten Bereich der RNAi befindet. Es konnte dennoch keine Verbesserung des Inhibierungspotentials von pscAAV-amiR-pTP (6x) gegenüber pscAAV-amiR-pTP (3x) ermittelt werden, im Gegenteil: die Inhibierung ausgelöst durch drei amiR-pTP Abfolgen war jeweils besser. Je mehr amiR-exprimierendes Plasmid eingesetzt wurde, desto stärker wurde die Inhibierung unabhängig von der Anzahl der enthaltenen amiR-kodierender Sequenzen.

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob eine Kombination von amiR-pTP- und amiR-E1A_2-kodierender Sequenzen möglich wäre und additive Effekte im Hinblick auf die Replikationsinhibierung von hAd5 eintraten.

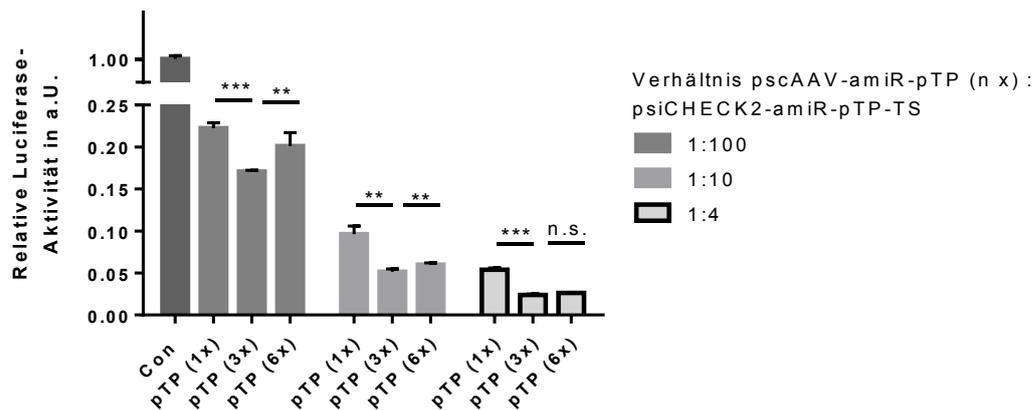


Abbildung 14: Reporterassay mit pscAAV-amiR-pTP (1x) – (6x). 35.000 HeLa-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit 400 ng, 50 ng oder 5 ng pscAAV-amiR-pTP (1x) – (6x) und 100 ng psiCHECK2-amiR-pTP-TS kotransfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen lysiert und ein Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit scAAV2-amiR-Con (1x) – (6x) und dem Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-pTP-TS kotransfiziert worden waren. Abgebildet: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 **, p < 0,0001 ***

4.1.4. Evaluierung von amiR-Ad-Konkatemeren verschiedener Längen und mit mehreren Zielgenen

Zunächst wurden verschiedene AAV-Shuttle-Plasmide erzeugt, welche in unterschiedlicher Anordnung jeweils drei Kopien der amiR-pTP und der amiR-E1A_2 exprimierten. Durch die Variation der Reihenfolge im Expressionsschema sollte ausgeschlossen werden, dass die Position der jeweiligen Haarnadelschleife im Vektor sich negativ auf die Menge reifer amiRs auswirken könnte.

Tabelle 16: Übersicht über die amiR-pTP-E1A_2-Kombinationsvektoren

| Vektor: pscAAV-amiR-Ad | Zielgen im hAd5-Genom | Anzahl amiR pro Zielgen |
|----------------------------|-----------------------|--|
| Con (3x) | Nicht vorhanden | 3 |
| pTP (3x) | pTP | 3 |
| E1A_2 (3x) | E1A | 3 |
| Con (6x) | Nicht vorhanden | 6 |
| pTP (6x) | pTP | 6 |
| pTP (3x)-E1A_2 (3x) | pTP, E1A | 3 |
| E1A_2 (3x)-pTP (3x) | pTP, E1A | 3 |
| E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x) | E1A, IVa2, pTP | 2 (E1A, verschiedene <i>Targets</i>), 1 (IVa2), 3 (pTP) |
| E1A_2 (3x)-bidCMV-pTP (3x) | pTP, E1A | 3 |
| 3x (E1A_2-pTP) | pTP, E1A | 3 |

Alle generierten Plasmide wurden im Kotransfektionsexperiment auf ihre Expression der amiRs untersucht. Es zeigte sich, dass alle Vektoren ihre jeweiligen amiRs funktional herstellten. Auffällig war, dass die Inhibierung mittels amiR-E1A_2 immer weniger effizient war als mit amiR-pTP. Wie aber bereits aus der Übertragung des Reportergergenassays von plasmid- zu AAV-basierten amiRs ersichtlich war, konnte sich die Effizienz des *Silencings* maßgeblich verändern, wenn die Expressionsplattform sich änderte. Die Verhältnisse aus diesem plasmid-basierten Reportergergenassay stellten also zunächst nur eine Orientierungsgrundlage über die generelle Funktion der amiRs dar. Zur Abschätzung der tatsächlichen quantitativen Wirksamkeit waren sie nur sehr begrenzt geeignet.

Da das AAV-Shuttle-Plasmid zusammen mit nur einem Zielsequenzplasmid transfiziert worden war, konnte aus diesem Experiment auch nicht auf potentielle additive Effekte geschlossen werden.

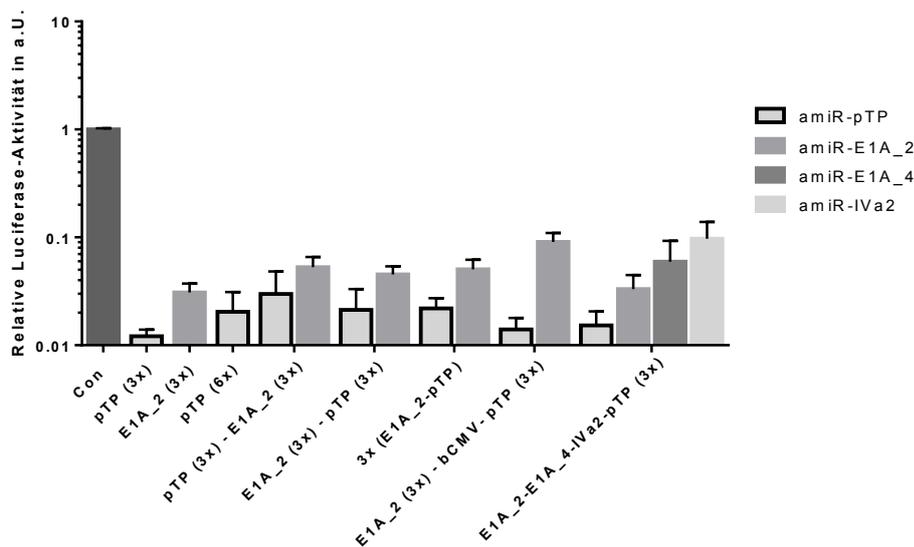


Abbildung 15: Reportergergenassay mit pscAAV-amiR-Ad (3x) – (6x). 35.000 HeLa-Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 350 ng pscAAV-amiR-Ad (6x) mit 50 ng psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen lysiert und das Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Messwerte der inhibierten Proben wurden ins Verhältnis gesetzt zu Zellpopulationen, welche mit scAAV2-amiR-Con (3x) - (6x) und dem entsprechenden Reporterplasmid psiCHECK2-amiR-Ad-TS kotransfiziert worden waren. Alle inhibierten Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber der Kontrolle.

Aufgetragen: Mittelwert und SEM, n = 3, p < 0,001 ***

4.2. Replikationsinhibierung von hAd5 mit scAAV2-exprimierten amiRs

Zur Untersuchung der Replikationsinhibierung wurden in allen Experimenten HeLa-Zellen mit quantifizierten, AAV-haltigen Lösungen transduziert und mit getiterten, hAd5-haltigen Lösungen infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände nach Zentrifugation per qPCR auf ihren Gehalt viraler Hexon-DNA und zellulärer 18S rRNA-DNA untersucht. Die Rohwerte wurden nach $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

4.2.1. Replikationsinhibierung ausgelöst durch eine AAV-Vektor-exprimierte amiR-Ad

Zunächst wurden ausgewählte Vektoren untersucht, die nur eine amiR-Ad exprimierten und im scAAV2-basierten Reportergergenassay vielversprechende Resultate erbracht hatten. Darüber hinaus wurden auch amiR-Ad betrachtet, deren Zielgen auf Grund seiner geringen Proteinkopienzahl im Viruspartikel von essentieller Bedeutung war. Die Verminderung eines essentiellen Proteins, welches

ohnehin nur sehr wenig vorhanden war, stellte eine besonders markante Schwachstelle im Verlauf der Virusreplikation dar.

Im ersten Experiment wurden zwei unterschiedliche Dosen verwendet. In der niedrigeren Dosis von 1.000 vge/Zelle zeigte sich eine Verringerung der viralen DNA um 76 % bei den mit scAAV2-amiR-pTP (1x) transduzierten Zellen, die aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle war. Nach Erhöhung der Dosis auf 10.000 vge/Zelle verstärkte sich die Inhibierung auf 89 % und war nunmehr signifikant. Mit Hilfe der hohen Dosis konnte ebenfalls durch Einsatz der amiR-IVa2 eine signifikante Verringerung der adenoviralen DNA um 61 % bewirkt werden. Alle anderen untersuchten amiRs beeinflussten die virale Replikation nicht.

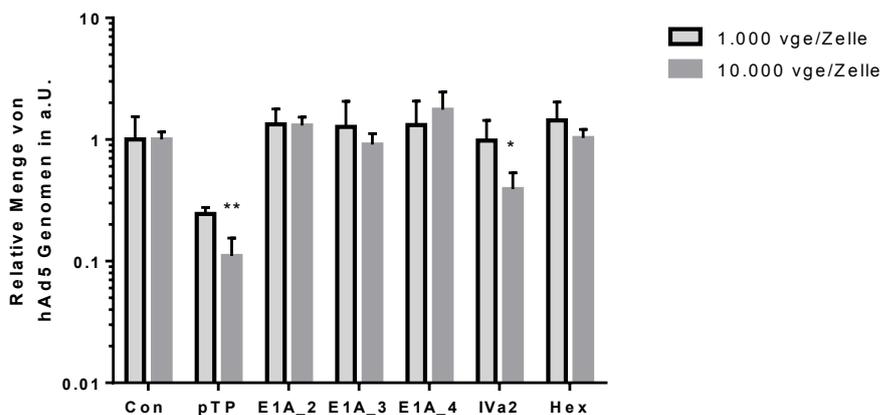


Abbildung 16: Replikationsinhibierungsassay mit scAAV2-amiR-Ad (1x). 35.000 HeLa-Zellen wurden 1.000 oder 10.000 vge/Zelle transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDct-Methode ins Verhältnis gesetzt. Teile der Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *, p < 0,01 **

4.2.2. Erhöhung der Effizienz der Replikationsinhibierung durch Konkatemere von amiR-Ad

Konfluente HeLa-Zellen wurden mit scAAV2-amiR-pTP (3x) oder scAAV2-amiR-pTP (6x) transduziert und 5 h vor der Transduktion, zeitgleich oder 5 h nach der Transduktion mit hAd5 (MOI 0,05) infiziert. Nach der Analyse der Menge viraler DNA in den Überständen der Zelllysate konnte festgestellt werden, dass beide Vektoren eine signifikante Verringerung der viralen DNA in den entsprechenden Zellpopulationen bewirkten. Unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion wurde das stabilste Ergebnis mit der größten Inhibierung durch scAAV2-amiR-pTP (6x) erreicht. Sie lag zwischen 90,6 und 92,8 %. Allerdings unterschied sich das Potential dieses Vektors kaum von dem von scAAV2-amiR-pTP (3x). Dessen Resultate zeigten aber eine höhere Varianz abhängig vom Zeitpunkt der Transduktion und lagen zwischen 79,4 und 88,7 %. Dieses Bild spiegelte das Ergebnis des Kotransfektionsexperiments der AAV-Shuttle-Plasmide mit dem Zielsequenz-tragenden Reporterplasmid wieder, in dem ebenfalls keine weitere Steigerung der Inhibierung durch Erhöhung der Anzahl der amiR-pTP-kodierender Sequenzen von drei auf sechs eintrat.

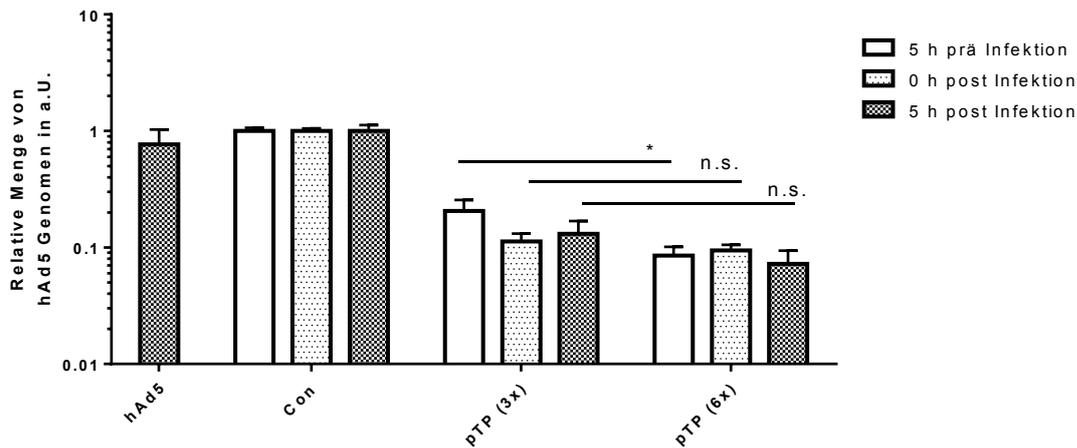


Abbildung 17: Replikationsinhibierungssassay mit scAAV2-amiR-pTP (3x) – (6x). 35.000 HeLa-Zellen wurden mit 1.000 vge/Zelle transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDCT-Methode ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerter aller inhibierter Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber der Kontrolle. Teile der Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,05 *

Nur bei prophylaktischer Transduktion der Zellen funktioniert die Inhibierung durch scAAV2-amiR-pTP (3x) signifikant schlechter (79,4 % gegenüber 90,6 %) als bei scAAV2-amiR-pTP (6x). Die Menge viraler DNA glich sich an, Differenzen waren nicht mehr signifikant (zeitgleiche Infektion und Transduktion: p = 0,29; therapeutische Transduktion: p = 0,11). Wenn durch prophylaktische Verabreichung mehr Zeit für die Expression und Prozessierung reifer amiRs zur Verfügung stand, war es sinnvoll den Vektor einzusetzen, der mehr amiR-pTP-kodierende Abschnitte enthielt. Sobald die Expression der amiR mit der der viralen Proteine um die zelluläre Maschinerie konkurrierte, egalisierte sich der erwartete Effekt, der durch die zusätzlichen Sequenzen eintreten sollte. Gemessen an der klinischen Situation war aber der Ansatz der therapeutischen Transduktion, eine Behandlung einer bereits eingetretenen Infektion, wirklichkeitsgetreu. Hier unterschieden sich die Inhibierungen, welche durch scAAV2-amiR-pTP (3x) und (6x) ausgelöst worden waren, nicht. Der Eindruck aus den Reporterassays bestätigte sich in den Replikationsinhibierungsexperimenten. Es stand aus zu klären, ob drei kodierende Sequenzen für amiR-pTP grundsätzlich ausreichend waren und durch zusätzliches Einbringen von drei weiteren amiR-Umgebungen mit anderem Zielgen ein additiver Effekt generiert werden könnte.

4.2.3. Variation der Dosis von amiR-Ad in der Replikationsinhibierung

Wie bei vielen medizinischen und pharmakologischen Fragestellungen ist auch in der Gentherapie die Bedeutung der korrekt gewählten Dosierung des Vektors erheblich. Arbeitet man mit sehr geringen Mengen, kann die Wirkung eventuell nicht gezeigt werden. Zu hohe Dosierungen können allerdings Effekte erzielen, die in einem Sättigungsbereich liegen, was die differenzierte Darstellung von Resultaten erschweren kann. Außerdem können die Vektoren selbst oder das exprimierte Transgen zytotoxische Erscheinungen provozieren, die wiederum das Ergebnis verfälschen. Die angemessene Dosierung ist die, die eine verlässliche Beurteilung von Resultaten erlaubt, ohne unerwünschte Nebeneffekte zu verursachen. Im Idealfall arbeitet man in einem Bereich, der die Erfassung von abweichenden Effekten zwischen verschiedenen Vektoren ermöglicht.

Um diese Fragestellung zu beantworten wurde mit Hilfe des Vektors scAAV-amiR-pTP (3x) ein Dosiseskulationsexperiment durchgeführt. Konfluente HeLa-Zellen wurden transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Die Dosis der Vektoren variierte von 0 bis 50.000 vge/Zelle.

Die Menge viraler DNA reduzierte sich schrittweise mit steigender Partikelzahl transduzierter AAV. Bis zu einem gesättigten Bereich, der bei 10.000 vge/Zelle erreicht wurde, führte beinahe jede Erhöhung der verwendeten AAV zu einer signifikanten Verringerung der Viruslast von Stufe zu Stufe. Bei Einsatz von 100 vge/Zelle wurde die Menge viraler DNA um 68,1 % reduziert. Bei 1.000 vge/Zelle wurde eine Reduktion von 93,2 % und bei 50.000 vge/Zelle schließlich 99,4 %.

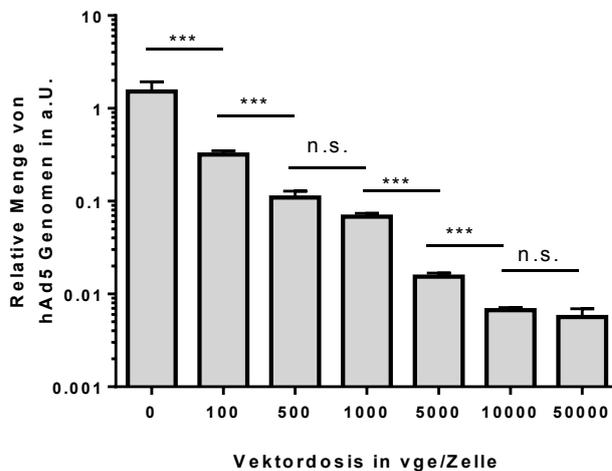


Abbildung 18 : Dosiseskulation mit scAAV2-amiR-pTP (3x). 35.000 HeLa Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit verschiedenen Dosen scAAV2-amiR-pTP (3x) transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDCT-Methode ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerter aller inhibierter Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber der Kontrolle. Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 ***

Das Experiment zeigt, dass die im Versuch zuvor gewählte Dosis von 1.000 vge/Zelle optimal war, um Effekte in der Inhibierung darzustellen. Die Reduktion der viralen DNA gegenüber der Kontrolle war signifikant, gleichzeitig befand man sich nicht in einem gesättigten Bereich.

4.2.4. Limitierung der amiR-Ad in Bezug auf steigende Viruslast

In der logischen Konsequenz wurde als nächstes das Potential der vektorexprimierten amiR-pTP bezüglich einer steigenden Viruslast untersucht. Wiederum wurden HeLa-Zellen mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-pTP (3x) transduziert und gleichzeitig mit steigenden Mengen hAd5 infiziert. Die MOI variierte von 0 bis 1.

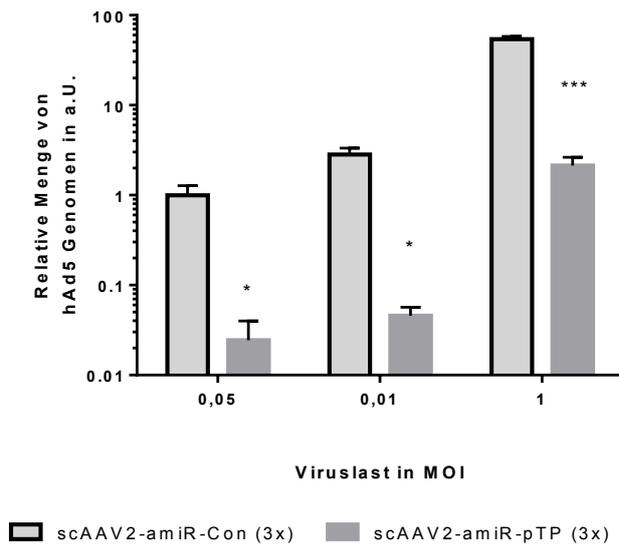


Abbildung 19: Dosisescalation mit hAd5. 35.000 HeLa Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-pTP (3x) transduziert und zeitgleich mit verschiedenen Dosen hAd5 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDCT-Methode ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerter aller inhibierter Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber der Kontrolle
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *, p < 0,001 ***

Wie erwartet stieg die nachweisbare Menge viraler DNA mit zunehmender Viruslast, welche initial zur Infektion eingesetzt worden war. Bei jeder Virusdosis war eine Reduktion der viralen DNA um etwa 1,5 log-Stufen zu beobachten, die in jedem Fall signifikant (***) gegenüber der Kontrolle war. Das vorliegende Ergebnis unterstrich das hohe Potential der Therapie mit amiRs. Selbst bei einer Viruslast, die ausreichte um die gesamte Population initial zu infizieren (MOI 1), konnte eine Reduktion der viralen DNA von 96,06 % mit Hilfe von AAV-exprimierten amiR-pTP vermittelt werden. Für die nachfolgenden Experimente wurde dennoch die niedrigste Dosis von MOI 0,05 gewählt. Zur Infektion wurden Überstände von lysierten Zellkulturen verwendet, die ohne weitere Aufreinigung wieder eingesetzt worden waren. Diese enthielten neben hAd5 auch weitere Bestandteile, die möglicherweise negativen Einfluss auf die Experimente haben könnten. Wurde die Viruslast gering gehalten, war das nötige Volumen Lysat ebenfalls gering und der Einfluss potentiell schädigender Stoffe minimiert.

4.2.5. Vergleich der Inhibierungspotentiale von amiR-pTP-E1A_2-Kombinationsvektoren

Eine große Anzahl unterschiedlicher Vektoren mit mehreren amiR-kodierenden Sequenzen wurde hinsichtlich ihres Potentials die Replikation von hAd5 zu inhibieren untersucht. Bei der Klonierung wurden verschiedene Strategien verfolgt: es wurden Vektoren entwickelt, die mehrere amiRs mit demselben Zielgen exprimierten, Vektoren, die mehrere amiRs gegen zwei Zielgene exprimierten, und ein Vektor, der insgesamt vier Zielgene hatte, die Anzahl der zugehörigen amiRs variierte innerhalb dieses Vektors.

Tabelle 16: Übersicht über enthaltenen amiR-Ad-Expressionskassetten in den Kombinationsvektoren

| Vektor: scAAV-amiR-Ad | Zielgen im hAd5-Genom | Anzahl amiR pro Zielgen |
|----------------------------|-----------------------|--|
| Con (3x) | Nicht vorhanden | 3 |
| pTP (3x) | pTP | 3 |
| E1A_2 (3x) | E1A | 3 |
| Con (6x) | Nicht vorhanden | 6 |
| pTP (6x) | pTP | 6 |
| pTP (3x)-E1A_2 (3x) | pTP, E1A | 3 |
| E1A_2 (3x)-pTP (3x) | pTP, E1A | 3 |
| E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x) | E1A, IVa2, pTP | 2 (E1A, verschiedene Targets), 1 (IVa2), 3 (pTP) |
| E1A_2 (3x)-bidCMV-pTP (3x) | pTP, E1A | 3 |
| 3x (E1A_2-pTP) | pTP, E1A | 3 |

Das Ziel war die Identifikation des idealen Aufbaus des Vektors, so dass eine maximale Replikationsinhibierung und gleichzeitig größtmögliche Verbesserung der Viabilität von infizierten Zellen erreicht werden konnte. Zu diesem Zweck wurden konfluente HeLa-Zellen mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (3x) - (6x) transduziert. Zeitgleich, 5 h vor oder 5 h nach der Transduktion wurden die Zellen mit hAd5 (MOI 0,05) infiziert.

Zunächst wurde bestimmt, welches Potential die verschiedenen Vektoren in Bezug auf die Inhibierung der adenoviralen Replikation hatten. Beinahe alle konnten die Menge von hAd5 Genomen in den infizierten Zellkulturen signifikant verringern. Die Inhibierung lag zwischen 49,6 % durch scAAV2-3x amiR (E1A_2-pTP) und 93,1 % durch scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x). Beim selben Vektor konnten sich aber abhängig von der zeitlichen Relation von Transduktion und Infektion die Ergebnisse mitunter stark voneinander unterscheiden.

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass ein siRNA- oder amiR-basiertes *Silencing* von E1A keine nennenswerten Effekte auf die Virusreplikation hatte (135–137,146). Erwartungsgemäß konnte mit scAAV2-amiR-E1A_2 (3x) keinerlei Verringerung der viralen DNA verursacht werden.

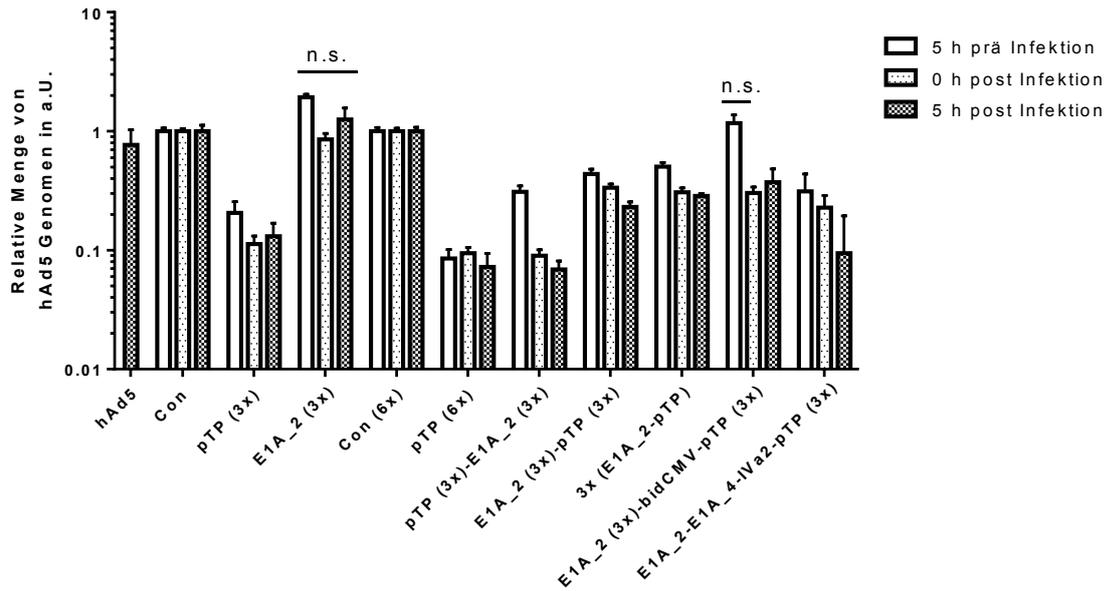


Abbildung 20: Replikationsinhibierung mit scAAV2-amiR-Ad (3x) – (6x). 35.000 HeLa Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (3x) – (6x) transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDct-Methode ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerter aller inhibierter Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber der Kontrolle, es sei denn in der Abbildung anders angegeben. Teile der Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 ***

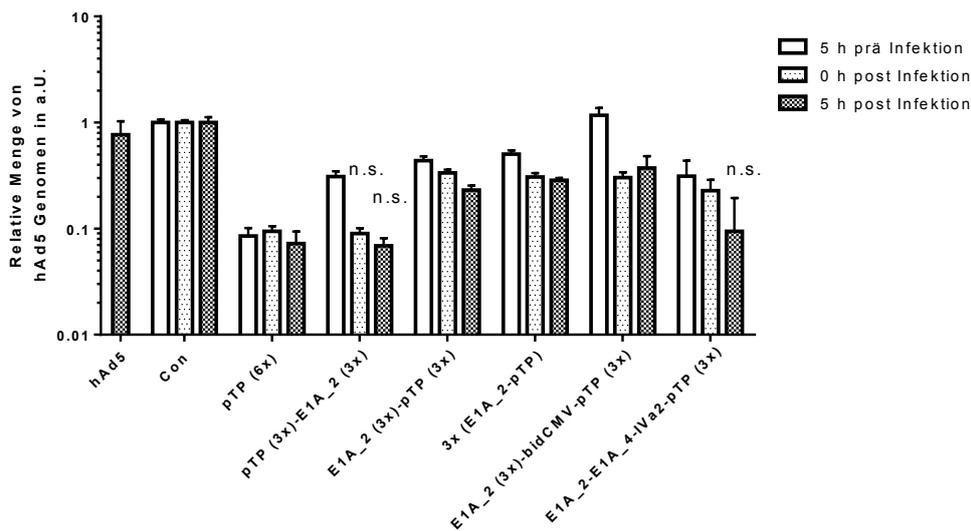


Abbildung 21: Replikationsinhibierung mit scAAV2-amiR-Ad (6x). 35.000 HeLa Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (6x) transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDct-Methode ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerter aller inhibierter Proben sind signifikant (***) verringert gegenüber scAAV-amiR-pTP (6x), es sei denn anderes angegeben. Teile der Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 ***

Die Vektoren, die neben drei Kopien der kodierenden Sequenz der amiR-pTP auch amiRs gegen E1A exprimierten, bewirkten unterschiedlichen großen Erfolg in der Inhibierung. Am besten funktionierte hier der Vektor scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x). Wenn die Zellen zeitgleich oder 5 h nach der Infektion transduziert worden waren, betrug die Inhibierung 91,0 bzw. 93,1 % und unterschied sich nicht von scAAV2-amiR-pTP (6x). Der Vektor, der als einziger mehr als zwei Zielgene regulierte, scAAV2-amiR-E1A_2-E1A_4-IVA2_pTP (3x), konnte bei therapeutischer Transduktion ebenfalls eine hohe Inhibierungseffizienz von 90,6 % demonstrieren und unterschied sich dabei nicht von scAAV-amiR-pTP (6x). Kein weiterer Vektor reduzierte die virale Replikation in ähnlichem Maß und erreichte eine Inhibierung, die größer war als 76,9 % (scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x), 5 h therapeutisch transduziert). Die übrigen Vektoren, die eine signifikante Inhibierung gegenüber der Kontrolle bewirkten, erzielten ausschließlich Resultate, die signifikant schlechter waren als bei scAAV2-amiR-pTP (6x).

4.2.6. Expressionsstärke der amiR-Ad durch AAV-Vektoren

Im Replikationsinhibierungsexperiment wurde festgestellt, dass der Erfolg der Inhibierung durch AAV-exprimierte amiR-Ad sehr unterschiedlich ausfiel. Ein Grund hierfür könnte unterschiedliche starke Expression der amiR von den individuellen Vektoren sein. Um diese Fragestellung zu ergründen wurden HeLa-Zellen mit scAAV2-amiR-Ad (1x) – (6x) transduziert und nach zwei Tagen RNA isoliert. Aus dieser wurde der Gehalt der amiR-pTP sowie amiR-E1A_2 relativ zur snU6RNA quantifiziert.

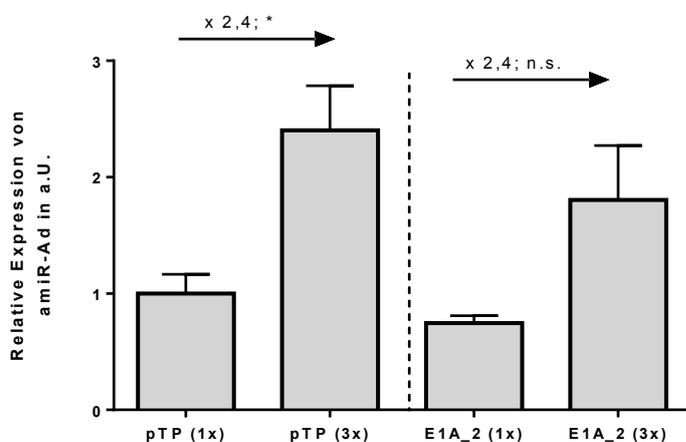


Abbildung 22: Relative Expression von amiR-pTP und amiR-E1A_2 von scAAV-amiR-Ad (1x) - (3x). Es wurden 35.000 HeLa-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (1x) – (3x) transduziert. Die Zellen wurden 2 d später geerntet und RNA mit TRIzol isoliert. Aus 200 ng Gesamt-RNA wurde die Expression von amiR-pTP und amiR-E1A_2 relativ quantifiziert. Abbildung vorab publiziert in (213).

Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *

Zunächst wurde ermittelt, in welchem Maß sich die Menge exprimierter amiR durch die Konkatemerisierung der amiR-kodierenden Sequenzen veränderte. Die Verlängerung der Transgenkassette von einer auf drei amiR-Umgebungen verursachte für beide amiRs eine Zunahme der Expression um den Faktor 2,4. Dies bedeutete einen signifikanten Anstieg der Expression im Falle der amiR-pTP bzw. zumindest eine Tendenz dazu für die amiR-E1A_2. Die Mittelwerte der Expressionsdaten von scAAV2-amiR-E1A_2 (1x) und (3x) waren zwar nicht signifikant unterschiedlich, wiesen aber eine klare Tendenz dahin auf (p < 0,1).

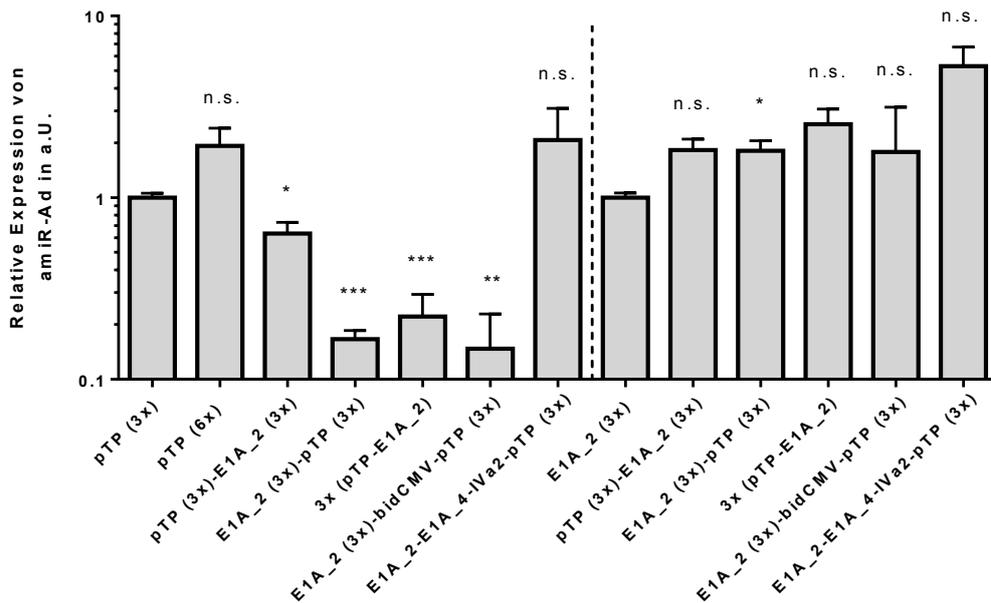


Abbildung 23: Relative Expression von amiR-pTP und amiR-E1A_2 von scAAV-amiR-Ad (3x) - (6x). Es wurden 35.000 HeLa-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (3x) – (6x) transduziert. Die Zellen wurden 2 d später geerntet und RNA mit TRizol isoliert. Aus 200 ng Gesamt-RNA wurde die Expression von amiR-pTP und amiR-E1A_2 relativ quantifiziert. Abbildung vorab publiziert in (213).

Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

Im Vergleich der Kombinationsvektoren konnten besonders im Fall der amiR-pTP markante Unterschiede in der Expression der amiR ausgemacht werden. Im Vergleich zu scAAV2-amiR-pTP (3x) erhöhte sich die Menge an amiR-pTP bei scAAV2-amiR-pTP (6x) um den Faktor 1,9; der Unterschied war nicht signifikant. Durch den Vektor scAAV2-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x) wurde die Expression in ähnlichem Maß (2,1-mal) erhöht. Auch hier war die Differenz nicht signifikant. Alle anderen Vektoren stellen aber jeweils deutlich weniger amiR-pTP zur Verfügung. Deren Gehalt reduzierte sich um mindestens 36,7 % (scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)), maximal um 83,3 % (scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-pTP (3x)).

Ganz anders verhielt es sich im Fall der amiR-E1A_2. Verglichen mit scAAV2-amiR-E1A_2 (3x) wurde von jedem anderen Vektor mehr amiR-E1A_2 exprimiert. Der Faktor betrug zwischen 1,8 (scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x)) und 5,3 (scAAV2-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x)). Bis auf einen Fall waren Unterschiede auf Grund relativ starker Varianz nicht signifikant.

4.2.7. Einfluss von amiR-Ad auf die Viabilität hAd5-infizierter Zellen

Der Einfluss von verminderter viraler Genexpression ausgelöst durch RNAi zeigt sich auf verschiedenen Ebenen. Zunächst steht der Effekt der verminderten Replikation und reduzierter Bildung von Virusnachkommen im Vordergrund. Außerdem wird aber auch in die Interaktion der viralen Proteine mit der Wirtszelle eingegriffen. Immunmodulatorische Effekte werden verändert, der Einfluss des Virus sinkt. E1A ist eines der viralen Proteine mit sehr hoher Interaktion mit dem Zellstoffwechsel. So konnte immer wieder gezeigt werden, dass eine Inhibierung von E1A sich positiv auf die Viabilität der infizierten Zellen auswirkte, auch wenn keine Verringerung der Virusreplikation eintrat (135,136).

Wie auch im Hinblick auf ihr Potential virale Replikation zu inhibieren, wurden die amiR-Ad daraufhin untersucht, ob sie die Viabilität infizierter Zellen steigern konnten. Hierfür wurden konfluente HeLa-Zellen mit 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (1x)-(6x) transduziert und zeitgleich mit hAd5 MOI 1 infiziert. Nach fünf Tagen wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt und die Messwerte zu unbehandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

4.2.7.1. Veränderung der Zellviabilität von hAd5-infizierten Zellen durch eine amiR-Ad

Als erstes wurden exemplarisch für einige amiR-Ad untersucht, ob bereits eine amiR-kodierende Sequenz zu einer Verbesserung des Zellüberlebens beiträgt. Infizierte Zellen, die mit dem Kontrollvektor transduziert worden waren, wiesen nach fünf Tagen eine Viabilität von 34,3 % auf. Einzig die amiR-pTP zeigte einen signifikanten Anstieg auf 82,0 %. Die ebenfalls betrachteten amiR-E1A_2, -E1A_3, -E1A_4, -IVa2 und -Hex bewirkten keinerlei Veränderung. Die Viabilität der entsprechenden Kulturen lag zwischen 16,3 % (amiR-Hex) und 35,8 % (amiR-IVa2).

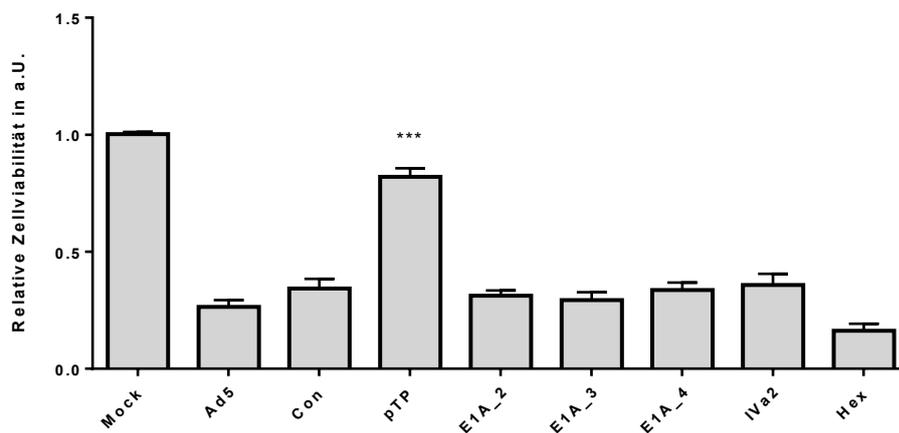


Abbildung 24: Zellviabilitätsassay mit scAAV2-amiR-Ad (1x). 35.000 HeLa-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (1x) transduziert und gleichzeitig mit hAd5 MOI 1 infiziert. Nach 5 d wurde das Zellviabilitätsassay (XTT) durchgeführt und die Messwerte auf Mock-behandelte Zellen normiert. Abbildung vorab publiziert in (213). Aufgetragen: Mittelwert mit SEM, n = 4, p < 0,001 ***

4.2.7.2. Einfluss von amiR-Ad-Konkatemeren auf die Viabilität infizierter Zellen

Die Vektoren mit mehreren amiR-kodierenden Sequenzen wurden ebenfalls bezüglich ihres Potentials zur Verbesserung der Zellviabilität untersucht. Die Verkettung der amiR-pTP-Umgebungen von einer zu drei bewirkte eine signifikante Verbesserung (82,0 % zu 100 %), die die Viabilität der Kultur vollständig wiederherstellte. Eine weitere Verlängerung auf sechs Kopien amiR-pTP erzielte zwar eine geringere Verbesserung der Viabilität (92,9 %), der Unterschied zu scAAV2-amiR-pTP (3x) war aber nicht signifikant. Diese Resultate gaben die der Replikationsinhibierungsexperimente zuverlässig wieder. Auch hier war die Erhöhung von einer auf drei Expressionskassetten essentiell, die von drei auf sechs zu vernachlässigen. Anders als zuvor verhielten sich aber die Vektoren, die amiR-E1A_2 exprimierten. Im Replikationsinhibierungsassay zeigten sich alle Vektoren, die ausschließlich die amiR-E1A_2 exprimierten, wirkungslos. In Bezug auf die Viabilität war der Vektor mit einer Kopie amiR-E1A_2 noch ebenso wirkungslos, die Viabilität der Zellkultur betrug 31,2 %. Drei Kopien führten aber eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle herbei (77,5 %).

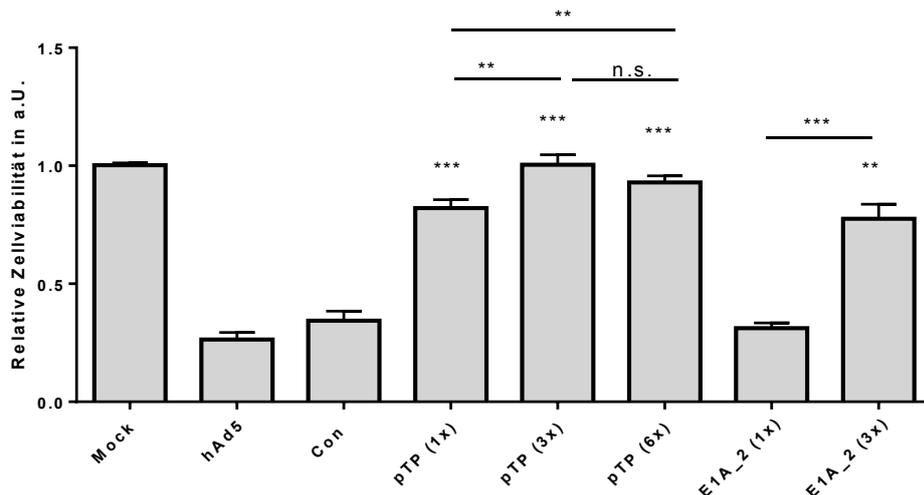


Abbildung 25: Zellviabilitätsassay mit scAAV2-amiR-Ad (1x) - (6x). 35.000 HeLa-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (1x) - (6x) transduziert und gleichzeitig mit hAd5 MOI 1 infiziert. Nach 5 d wurde das Zellviabilitätsassay (XTT) durchgeführt und die Messwerte auf Mock-behandelte Zellen normiert. Abbildung vorab publiziert in (213).

Aufgetragen: Mittelwert mit SEM, n = 4, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

4.2.7.3. Einfluss von Multi-Target-Vektoren auf die Zellviabilität infizierter Zellen

Im vorangegangenen Experiment konnte bereits gezeigt werden, wie effektiv die Viabilität von infizierten Zellen erhöht werden konnte, indem nur E1A oder pTP reguliert wurden. Im Folgenden wurden noch die Vektoren untersucht, die die Expression beider Gene regulierten. Im Replikationsinhibitionsexperiment wurde hAd5 in beinahe allen Fällen signifikant inhibiert. Daher war es überraschend, dass die Viabilität nicht bei allen Populationen signifikant anstieg. Die geringste Steigerung der Viabilität wurde ermittelt, wenn scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x) (65,1 %) und scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x) (50,3 %) verwendet worden waren. Im letzteren Fall war die Inhibition nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Guter Erfolg konnte durch die Vektoren scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) (84,2 %), scAAV2-3x amiR (E1A_2-pTP) (77,2 %) und scAAV2-amiR-E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x) (76,3 %) erzielt werden. Aber nur einer der Vektoren, der amiRs gegen pTP und E1A exprimierte, erreichte einen ähnlichen Erfolg wie scAAV2-amiR-pTP (6x). Wie bereits im beschriebenen Replikationsinhibitionsexperiment waren nur die Messwerte von scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) mit denen von scAAV2-amiR-pTP (6x) vergleichbar.

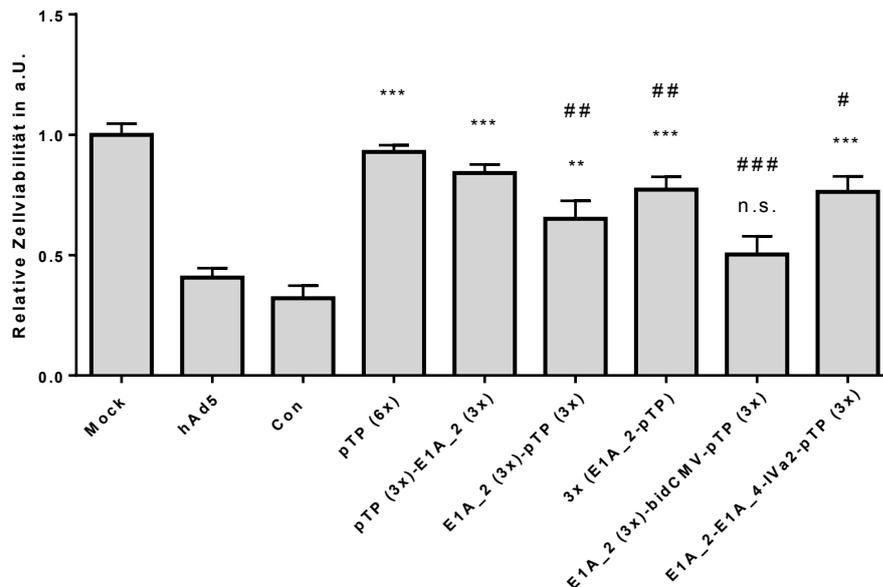


Abbildung 26: Zellviabilitätsassay mit scAAV2-amiR-Ad (1x) - (6x). 35.000 HeLa-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit 10.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (1x) - (6x) transduziert und gleichzeitig mit hAd5 MOI 1 infiziert. Nach 5 d wurde das Zellviabilitätsassay (XTT) durchgeführt und die Messwerte auf Mock-behandelte Zellen normiert. Abbildung vorab publiziert in (213).

Aufgetragen: Mittelwert mit SEM, n = 4, p < 0,01 **, p < 0,001 ***, jeweils zu scAAV-amiR-Con (6x); p < 0,05 #, p < 0,01 ##, p < 0,001 ###, jeweils zu scAAV-amiR-pTP (6x)

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten konnte allein durch die Inhibierung von E1A ein starker Anstieg der Anzahl lebender Zellen in den infizierten Zellkulturen ermittelt werden (135), obwohl die Menge viraler DNA nicht sank. Die Eingriffe der amiRs in den viralen Lebenszyklus wirkten sich also abhängig vom Zielgen sehr unterschiedlich aus. War ein Gen der Replikationsmaschinerie betroffen, wie etwa pTP, konnte ein starker Effekt in der Menge der neugebildeten Virionen gezeigt werden. Im Falle von E1A waren vor allem die Fähigkeiten des Virus' mit der Zelle und deren Stoffwechsel zu interagieren betroffen.

Von den in Betracht gezogenen Vektoren zeichneten sich scAAV2-amiR-pTP (6x) und scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) als besonders vielversprechend aus. Sie regulierten sowohl die virale Replikation als auch die Interaktion mit dem Zellzyklus hochsignifikant zum Vorteil der infizierten Zellpopulation.

4.2.8. Inhibierung der viralen mRNA-Expression durch amiR-Ad

Zusätzlich zur Analyse des Potentials der Vektoren im Hinblick auf Inhibierung der viralen Replikation und Verbesserung der zellulären Viabilität wurde die Verminderung des eigentlichen Ziels, der viralen mRNA, untersucht. Dazu wurde die Expression verschiedener mRNAs herangezogen. Die Hexon mRNA wurde nicht reguliert; Veränderungen in ihrer Expressionsstärke waren somit auf eine grundsätzliche Verringerung der Viruslast zurückzuführen. Außerdem wurde die Menge der beiden regulierten Transkripte, pTP mRNA und E1A mRNA, quantifiziert. Das Experiment wurde lediglich als Vorversuch für die Auswertung der mRNA Expression *in vivo* durchgeführt, auf Grund der geringen Anzahl Replikate wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

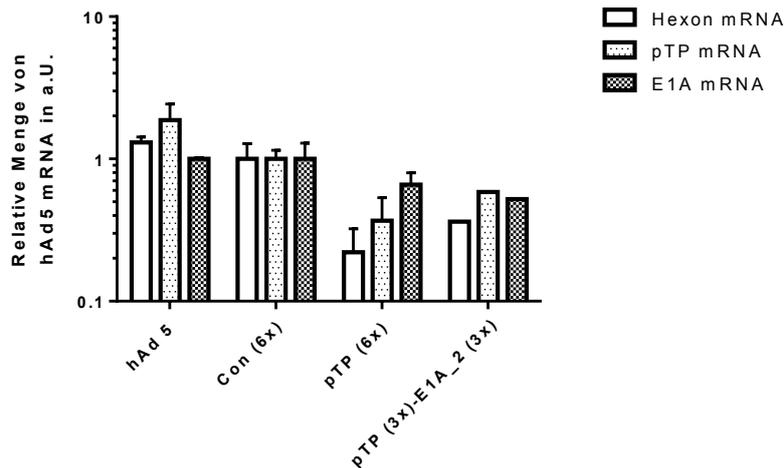


Abbildung 27: hAd5-Inhibierung - mRNA Expression. 70.000 HeLa-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit 1.000 vge/Zelle scAAV2-amiR-Ad (6x) transduziert und gleichzeitig mit hAd5 MOI 0,05 infiziert. Nach 2 d wurde die Gesamt-RNA mit TRizol geerntet und die Expression von Hexon mRNA, pTP mRNA und E1A mRNA sowie zellulärer 18S rRNA in einer RT-qPCR quantifiziert. Messwerte wurden mit der DDcT-Methode ausgewertet. Aufgetragen: Mittelwert & STABW, n=2 (n=1 bei scAAV-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x))

Es wurde ersichtlich, dass alle viralen mRNAs durch Transduktion mit scAAV2-amiR-Ad (6x) inhibiert worden waren. Die Hexon mRNA, welche quantifiziert worden war, um die gesamte Inhibierung abzuschätzen, wurde am stärksten reduziert. Der Vektor scAAV2-amiR-pTP (6x) inhibierte sie um 77,9 %, scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) noch um 63,7 %. Die pTP mRNA wurde stärker durch den Vektor inhibiert, der ausschließlich amiR-pTP exprimierte (63,1 % gegenüber 41,4 %). Die E1A mRNA wiederum stärker durch den Vektor, der sowohl amiR-pTP als auch amiR-E1A_2 herstellte (34,0 % gegenüber 47,9 %).

4.2.9.Replikationsinhibierung in hepatischen HepaRG-Zellen

Um die Inhibierung durch amiR weiter an die reale Situation heranzuführen, wurde das Replikationsinhibierungsexperiment mit den amiR-pTP-E1A_2-Kombinationsvektoren in HepaRG-Zellen wiederholt. Es handelte sich um Progenitorzellen, deren Morphologie und Metabolismus im ausdifferenzierten Zustand in vielerlei Hinsicht derer von Hepatozyten glich.

HepaRG-Zellen wurden ausgesät und nach zwei Wochen Inkubation mit Hilfe von DMSO differenziert. Nach weiteren zwei Wochen wurde das Replikationsinhibierungsassay analog zum Ablauf in HeLa-Zellen durchgeführt und ausgewertet.

Zwischen den beiden Zelllinien ähnelten sich die Ergebnisse prinzipiell. Insgesamt blieb der Erfolg der Inhibierung hinter dem in HeLa-Zellen zurück. Ein Grund hierfür könnte die geringere Transduktionseffizienz von AAV2 in HepaRG sein. Im Vorfeld wurden verschiedene Pseudotypen von AAV mit einer GFP-Transgenkassette transduziert, die Zellen permeabilisiert und die Fluoreszenzintensität in einer FACS Analyse quantifiziert. AAV2 transduzierte 61,91 % der HepaRG-Zellen. Die Effizienz in HeLa-Zellen war mit mehr als 90 % deutlich höher (201), demnach exprimierten mehr Zellen amiR-Ad.

Tabelle 17: Transduktionseffizienz in HepaRG-Zellen mit verschiedenen AAV-Pseudotypen

| AAV Pseudotyp | Anteil von GFP-exprimierenden Zellen in % |
|----------------------|--|
| 1 | 17,7 |
| 2 | 61,91 |
| 3 | 12,3 |
| 4 | 0,71 |
| 5 | 4,26 |
| 6 | 72,61 |
| 8 | 0,98 |
| 9 | 0,38 |

Bei prophylaktischer Transduktion konnte nur mit Hilfe von scAAV2-amiR-pTP (6x) eine signifikante Reduktion der viralen Replikation um 56,7 % bewirkt werden. Alle anderen untersuchten Vektoren überschritten die Signifikanzgrenze nicht. Die höchste Inhibierung von 79,4 % wurde bei zeitgleicher Applikation von Virus und Vektor mit Hilfe von scAAV2-amiR-pTP (6x) erzielt. In einem vergleichbaren Bereich von 71,1 % war scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x). Auch scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-pTP (3x) (62,3 %) und der Vektor mit abwechselnder Folge von amiR-E1A_2 und amiR-pTP (59,4 %) reduzierten die virale Replikation. Bei den Vektoren mit bidirektionalem Promoter und dem Vektor mit drei verschiedenen Zielgenen konnte keine signifikante Verminderung viraler DNA bei zeitgleicher Infektion und Transduktion gemessen werden.

Zum spätesten untersuchten Transduktionszeitpunkt wurde die Inhibierung im Regelfall schlechter als bei den anderen Zeitpunkten. Dennoch war sie für fast alle betrachteten Vektoren (außer scAAV2-3x amiR (E1A_2-pTP)) signifikant und lag zwischen 70,6 % (scAAV2-amiR-pTP (6x)) und 28,2 % (scAAV2-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x)).

Der Vektor, der drei kodierenden Abschnitten der amiR-pTP enthielt, zeigte eine stabile Inhibierung der viralen Replikation von nicht weniger als 42,7 % unabhängig vom Zeitpunkt der Transduktion. Wie bereits im entsprechenden Experiment in HeLa-Zellen führte die Transduktion von scAAV2-amiR-E1A_2 (3x) zu keiner Inhibierung der Replikation.

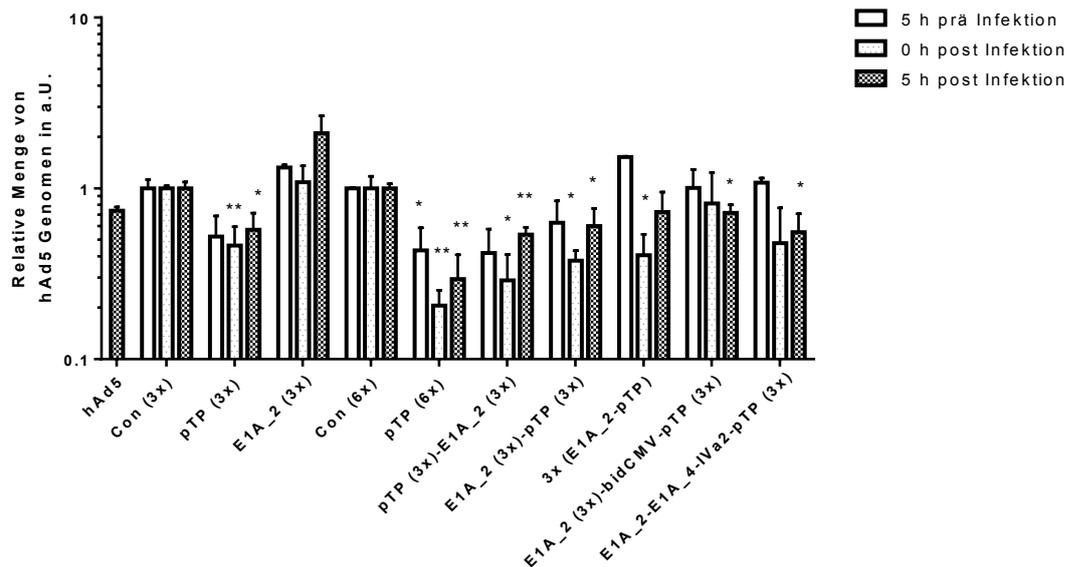


Abbildung 28: Replikationsinhibierungsassay mit scAAV-amiR-Ad (3x) – (6x) in HepaRG-Zellen. 35.000 HepaRG-Zellen wurden ausgesät und 14 d später für weitere 2 Wochen mit 2 % DMSO differenziert. Die Zellen wurden mit $3,5 \times 10^7$ vge scAAV2-amiR-Ad (3x) – (6x) transduziert und gleichzeitig mit 1.750 PFU hAd5 infiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen in PBS lysiert und die Überstände per qPCR auf virale Hexon-DNA und zelluläre 18S rRNA-DNA analysiert. Die Messwerte wurden nach DDCT-Methode ins Verhältnis gesetzt.

Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,05 *, p < 0,01 **

4.3. Einsatz von scAAV2/9-exprimierten amiRNAs *in vivo* zur Therapie von Adenovirusinfektion im immunsupprimierten Wirt

Zusammenfassend aus den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen wurden die Vektoren scAAV2-amiR-pTP (6x) und scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) ausgewählt, um ihr Potential in einem immunsupprimierten, permissiven Tiermodell im Hinblick auf die Inhibierung der Adenovirusreplikation zu untersuchen. Das geplante Tiermodell musste hierfür vollständig neu etabliert werden. Das in der Literatur beschriebene Modell, das im Labor von William Wold (92) entwickelt worden war, sah die Infektion von Syrischen Hamstern mit einer Dosis von $1,9 \times 10^{12}$ vp/kg hAd5 vor, was der halbletalen Dosis entsprach. Ein derart schweres Krankheitsbild sollte allerdings nicht induziert werden, da zunächst eine *proof of concept*-Studie zur generellen Wirksamkeit der amiR-Ad durchgeführt werden sollte. Dafür musste die verabreichte Virusdosis reduziert und das Modell demnach neu charakterisiert werden.

4.3.1. Pilotversuch 1: Infektionsverlauf in immunsupprimierten Syrischen Hamstern

Für die Charakterisierung des Infektionsverlaufs wurden 12 männliche, 4 Wochen alte Tiere nach 10 Tagen Adaptionszeit mit Cyclophosphamid (CP) immunsupprimiert. Nach zwei Wochen wurden sie mit hAd5 infiziert und jeweils 4 Tiere nach 3, 7 und 14 d zur Organ- und Blutentnahme getötet. Auf Grund der großen Diversität der Körpergewichte war eine Einteilung der Tiere in homogene Gruppen nur sehr begrenzt möglich. Ein Tier musste 10 d *p.i.* vorzeitig getötet werden. Sowohl die Gewichtsabnahme als auch das Allgemeinbefinden hatten kritische Werte überschritten. Die Daten, die von diesem Tier erhoben worden waren, wurden nicht für die Auswertung herangezogen.

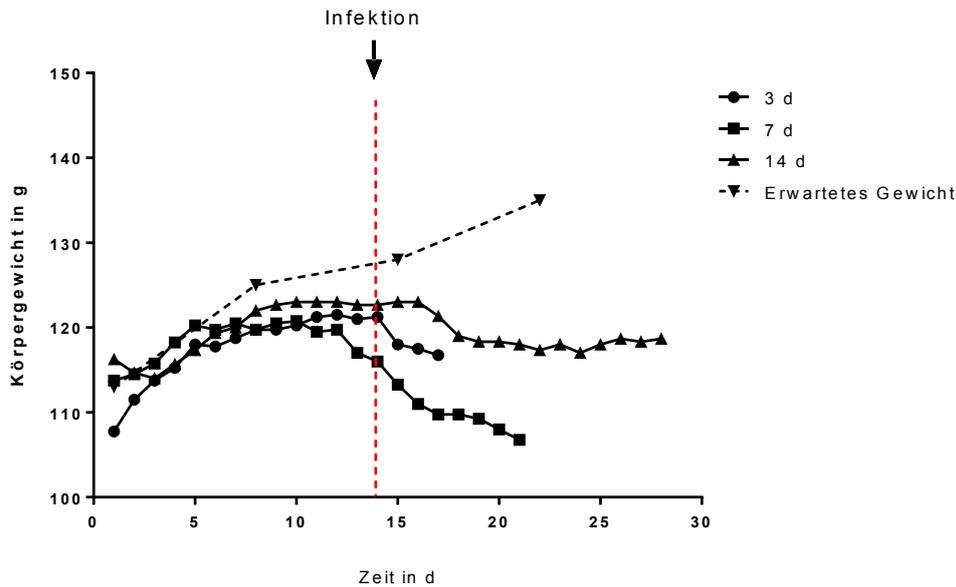


Abbildung 29: Pilotversuch 1 – Gewichtsverläufe. 12 männliche, 4 Wochen alte Hamster wurden nach 10 Tagen Adaptionzeit immunsupprimiert, nach 2 Wochen mit hAd5 infiziert und jeweils 4 Tiere nach 3, 7 und 14 d zur Blut- und Organentnahme getötet. Sie wurden täglich gewogen. Aufgetragen: Mittelwert der Gruppe

Nach Beginn der Immunsuppression nahmen die Tiere zunächst an Gewicht zu, nach etwa einer Woche stagnierte der Verlauf. Nach der Infektion trat ein Gewichtsverlust ein, der teilweise mit leicht vermindertem Allgemeinbefinden auftrat. Etwa 10 d nach der Infektion nahmen die verbliebenen Tiere langsam wieder zu. Gesunde, unbehandelte Tiere sollten laut Züchterangaben kontinuierlich Gewicht zunehmen. Die durchschnittliche Progression des Körpergewichts wurde hierfür bestimmt und auf die Realdaten angewandt.

Für die histologische Beurteilung wurden Leber, Lunge, Herz, Niere und Milz herangezogen. Die Schwere der pathologischen Veränderung wurde auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet, wobei 0 keine und 3 schwere Schäden mit mittelgradigen, multifokalen Nekrosen bedeutete.

Es zeigte sich, dass 3 d nach der Infektion die pathologischen Veränderungen in der Leber als geringgradig anzusehen sind. Im weiteren Verlauf erhöhte sich der Wert, bei einem Tier wurde der maximal mögliche Wert vergeben. Die Schädigungen im Lebergewebe veränderten sich nicht wesentlich, wenn die Infektion mehr als eine Woche zurücklag. Auf Grund der geringen Fallzahlen wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen.

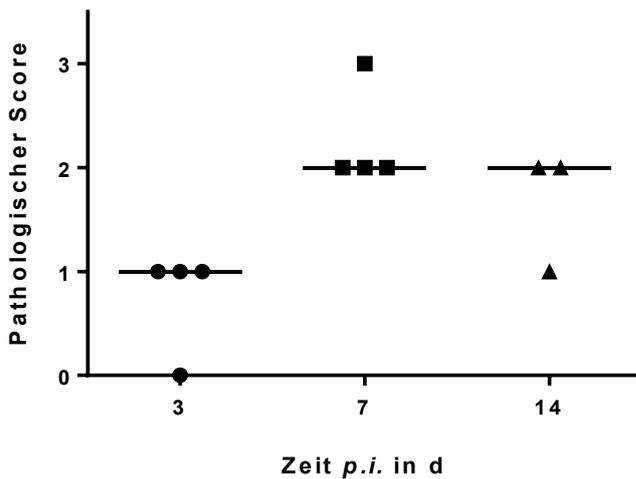


Abbildung 30: Pilotversuch 1 – Histologie der Leber. Teile der Leber wurden für die histologische Bewertung herangezogen und ein pathologischer Score auf der Skala von 0 bis 3 erstellt. Aufgetragen: Einzelwerte und Median.



Abbildung 31: Pilotversuch 1 – HE-Färbung der Gewebeschnitte. Teile der Organe wurden in Paraffin eingebettet und angefärbt. Abgebildet sind Ausschnitte der nach 7 d entnommenen Organe. Leber (links) zeigt nekrotische Areale, Leber (rechts) Einschlusskörperchen. Das Pankreas zeigt Inselzellnekrosen. Die Milz ist depletiert durch die CP-Behandlung. Herz, Niere und Lunge sind unverändert.

Die übrigen Organe, die für die histologische Bewertung präpariert worden waren, zeigten nur vereinzelte Auffälligkeiten im Pankreas (jeweils ein Tier mit geringen oder mittelgradigen Inselnekrosen). In Folge der Immunsuppression waren alle untersuchten Milzproben depletiert. Der Zustand veränderte sich 14 d nach der Infektion wieder und alle Tiere zeigten eine Repopulation der Milz mit Immunzellen.

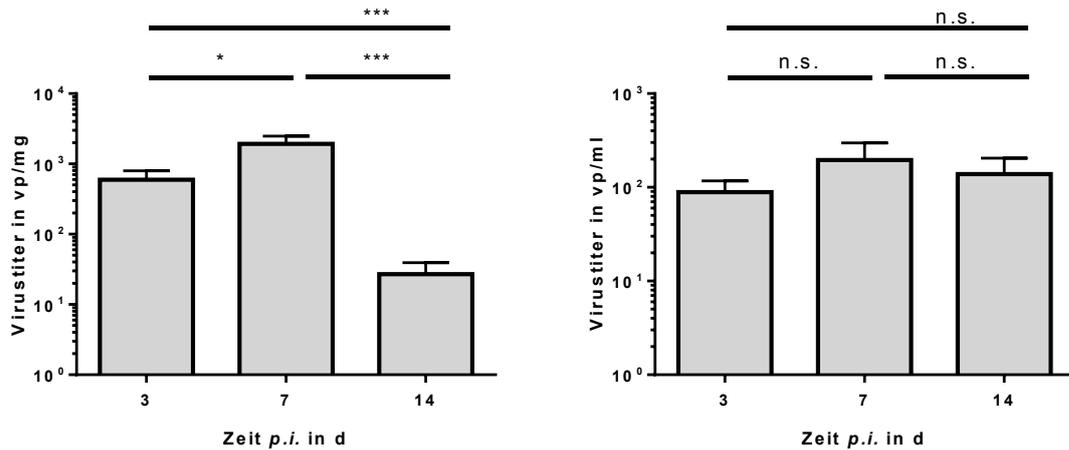


Abbildung 32: Pilotversuch 1 – Virustiter in Leber (links) und Serum (rechts). Leberstücke wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und Überstände zur Infektion von HeLa-Zellen genutzt. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert, aus den Lysaten wurde hAd5-DNA absolut quantifiziert. Serum wurde direkt zur Infektion genutzt. Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,05 *, p < 0,001 ***

Die Virustiter in Organen und im Serum wurden wie unter 3.11.2 beschrieben absolut quantifiziert. Die Viruslast in der Leber lag an Tag 3 bei 600 vp/mg, erhöhte sich zu Tag 7 auf 1.900 vp/mg und fiel danach ab auf 27 vp/mg an Tag 14. Jede Veränderung über den zeitlichen Verlauf war dabei jeweils signifikant zum vorangegangenen Messpunkt. Im Serum verhielt es sich anders. Der Virustiter war insgesamt geringer und veränderte sich kaum im Verlauf. Er lag im Durchschnitt bei etwa 100 vp/ml.

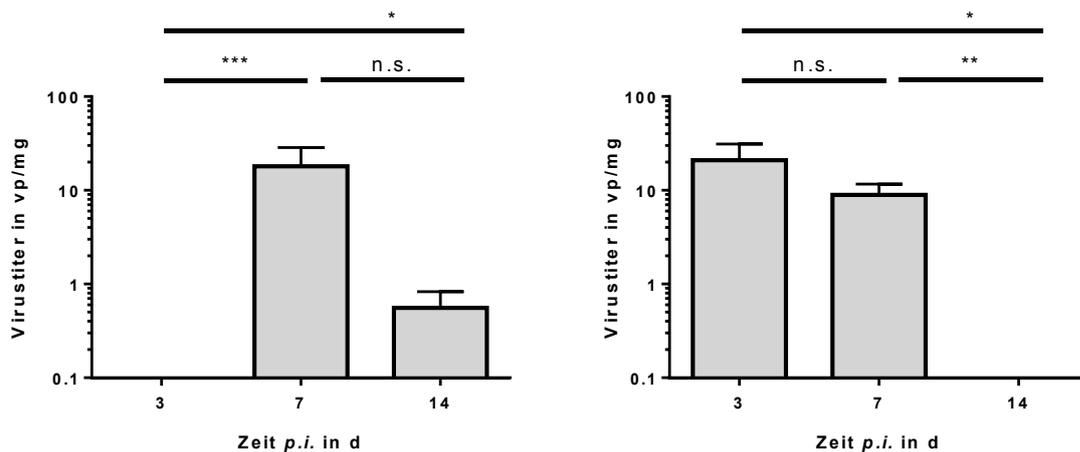


Abbildung 33: Pilotversuch 1 – Virustiter in Herz (l.o.) und Milz (r.o.). Organstücke wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und Überstände zur Infektion von HeLa-Zellen genutzt. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert, aus den Lysaten wurde hAd5-DNA absolut quantifiziert. Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,05 *, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

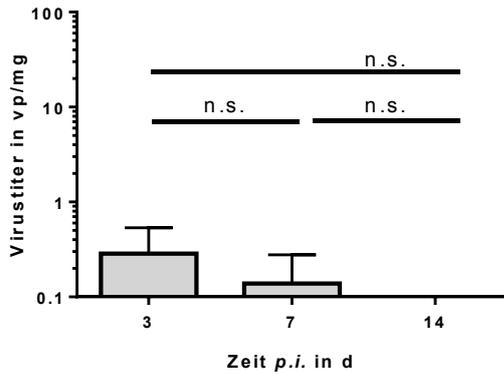


Abbildung 34: Pilotversuch 1 – Virustiter in der Lunge. Organstücke wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und Überstände zur Infektion von HeLa-Zellen genutzt. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert, aus den Lysaten wurde hAd5-DNA absolut quantifiziert.
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s.

In den übrigen untersuchten Organen wurden weit geringere Virustiter und sehr unterschiedliche Verteilungsmuster ermittelt. Im Herz war erst 7 d *p.i.* überhaupt replizierendes Virus nachzuweisen (18 vp/mg), nach 14 d fiel es auf irrelevante Mengen (weniger als 1 vp/mg) ab. In der Milz konnte bereits nach 3 d Virus gefunden werden (21 vp/mg), die Menge reduzierte sich mit der Zeit auf 9 vp/mg. Beim letzten Messpunkt war kein Virus mehr nachweisbar. In der Lunge waren generell nur kleinste Mengen Virus (weniger als 1 vp/mg) nachweisbar.

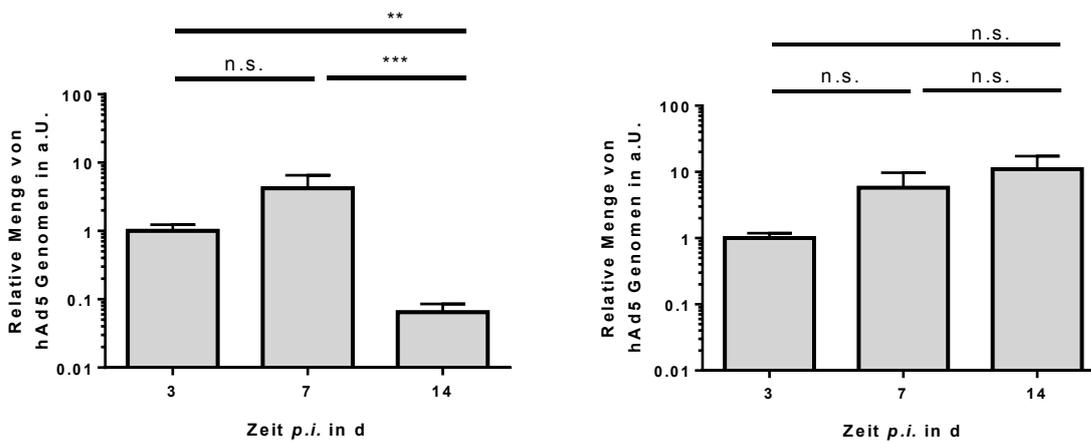


Abbildung 35: Pilotversuch 1 – virale DNA in Leber und Herz. DNA wurde aus Organstücken mit DNA Tissue Mini Kit isoliert und die Menge adenoviraler Hexon-DNA relativ quantifiziert.
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,01 **, p < 0,001 ***

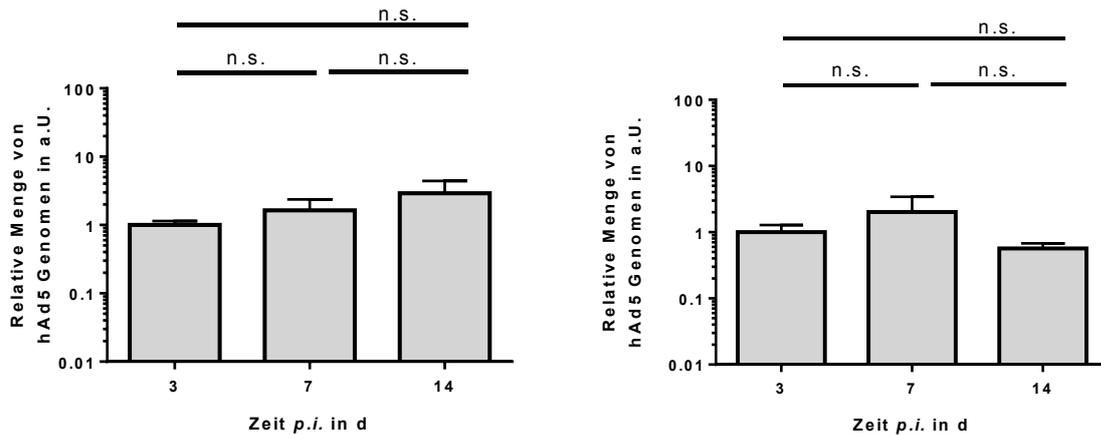


Abbildung 36: Pilotversuch 1 – virale DNA in Milz und Lunge. DNA wurde aus Organstücken mit DNA Tissue Mini Kit isoliert und die Menge adenoviraler Hexon-DNA relativ quantifiziert. Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s.

Die Isolation von DNA aus den Teilen von Leber, Herz, Milz und Lunge brachte ebenfalls verschiedene Erkenntnisse. In jedem Organ ließ sich virale DNA nachweisen, die Verlaufskurven unterschieden sich aber. In der Leber wurde nach 7 d 4,2-mal mehr virale DNA nachgewiesen als am Tag 3, nach 14 Tagen 10-mal weniger als an Tag 3. Der Verlauf ähnelt stark dem der gemessenen Virustiter. Dies war in den anderen Organen nicht der Fall. Die virale DNA lag zu allen Messzeitpunkten in ähnlichen Mengen vor. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten waren innerhalb eines Organs nie signifikant. Lediglich die Reduktion viraler DNA in der Leber zwischen Tag 7 und 14 war signifikant.

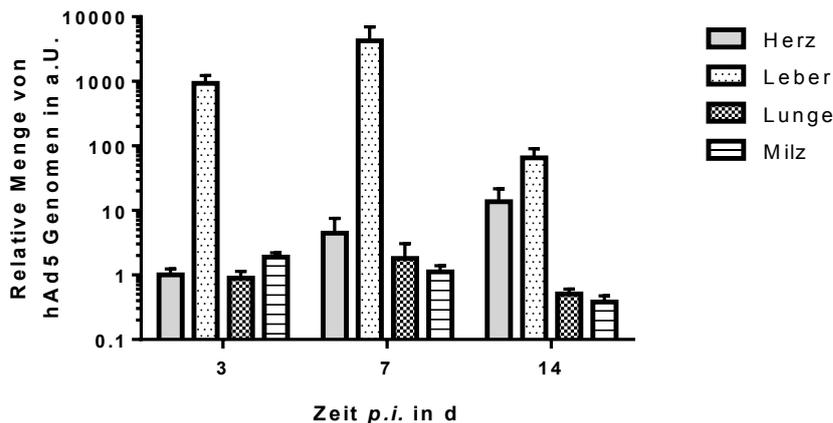


Abbildung 37: Virale DNA in Leber, Herz, Milz und Lunge im Vergleich. DNA wurde aus Organstücken mit DNA Tissue Mini Kit isoliert und die Menge adenoviraler Hexon-DNA relativ quantifiziert. Aufgetragen: Mittelwert & SEM

Im direkten Vergleich der Organe untereinander wurde auffällig, dass die Menge viraler DNA in der Leber deutlich größer war als in allen anderen Organen. An den Tagen, an denen besonders hohe Virustiter festgestellt wurde, war die Leber mehr als 900-mal stärker mit viraler DNA belastet als jedes andere Organ. Selbst am letzten Messpunkt, als kaum noch replizierende Viren gefunden werden

konnten, konnte noch fünfmal mehr Hexon-DNA im DNA-Isolat der Leber als in dem von Herz-Gewebe detektiert werden.

4.3.2. Pilotversuch 2: Untersuchung der Toleranz von scAAV2/9-amiR-Ad (6x)

In einem weiteren Pilotversuch wurde die Toleranz der Syrischen Hamster gegenüber AAV2/9-exprimierten amiR-Ad untersucht. Vier weibliche, 4 Wochen alte Tiere wurden nach 10 d Adaptionzeit mit CP immunsupprimiert. Sie wurden mit 5×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-pTP (6x) transduziert. Weitere zwei Wochen später wurden die Tiere zur Organentnahme getötet. Teile der Leber, dem primären Zielorgan von AAV9, wurden histologisch begutachtet. Außerdem wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Bereichen der Leber isoliert und die Expression von amiR-pTP quantifiziert.

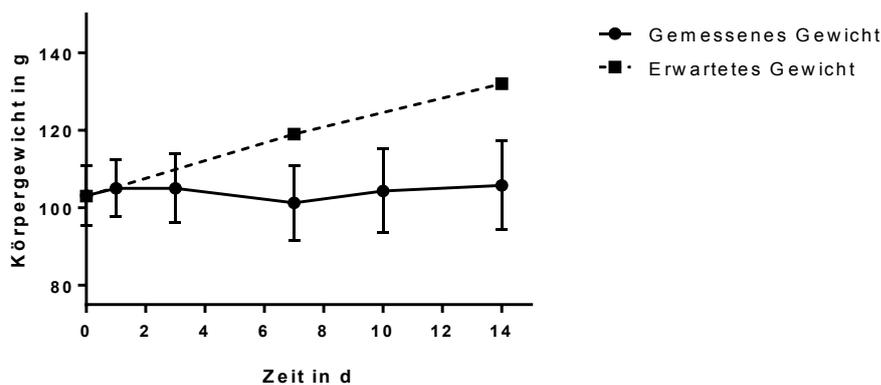


Abbildung 38: Pilotversuch 2 – Gewichtsverlauf. 4 weibliche, 4 Wochen alte Syrische Hamster wurden nach 10 d Adaptionzeit mit CP immunsupprimiert und mit 4×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-pTP (6x) transduziert. Das Körpergewicht wurde zweimal pro Woche ermittelt. Aufgetragen: Mittelwert & SEM.

Das Körpergewicht der Hamster veränderte sich im untersuchten Zeitraum nur minimal. Wie bereits zuvor beobachtet, bremste die Immunsuppression das erwartete Wachstum der Tiere, durch die unterbrochene Linie dargestellt. Zum letzten Beobachtungszeitpunkt lag der Mittelwert 25 % unter dem Erwartungswert, der sich auch die Daten des Tierzüchters bezog. Unter normalen Bedingungen würden die Jungtiere zügig Gewicht zulegen, durch die Behandlung mit Immunsuppression, Vollnarkose und Operation stagnierte das Gewicht jedoch. Das Allgemeinbefinden der Tiere war aber absolut unauffällig. Auch die histologische Bewertung der Leberschnitte bestätigte diesen Eindruck.

Bei zwei Tieren wurden überhaupt keine pathologischen Veränderungen des Lebergewebes festgestellt, die anderen beiden zeigten geringgradige Nekrosen.

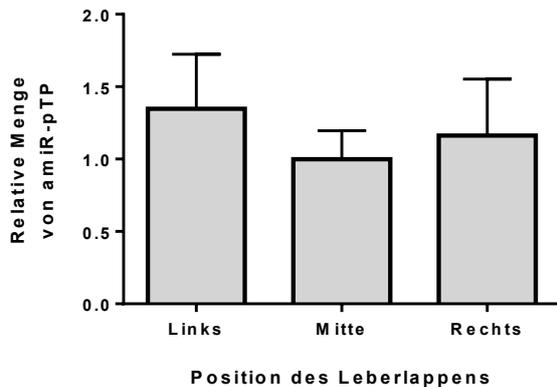


Abbildung 39: Pilotversuch 2 – Expression der amiR-pTP in verschiedenen Bereichen der Leber. Aus jeweils einer Gewebeprobe des linken, mittleren und rechten Leberlappens wurde mit TRIzol Gesamt-RNA gewonnen. Die Expression von amiR-pTP wurde in je 200 ng RNA per RT-qPCR quantifiziert. Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 2.

Die Expressionsanalyse der amiR-pTP in verschiedenen Bereichen der Leber zeigte, dass keine relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Leberlappen vorlagen. Die Transduktion des Gewebes war also als gleichmäßig anzusehen, was an der ebenso gleichmäßigen Expression des Transgens ersichtlich wurde.

Die Transduktion mit AAV9 konnte erfolgreich durchgeführt werden und in der Folge wurde die amiR-pTP gleichmäßig in verschiedenen Arealen der Leber exprimiert. Pathologische Veränderungen traten bei einigen Tieren auf, waren aber nicht schwerwiegend. Die hohe Dosis AAV-Partikel wurde also weitestgehend toleriert, gravierende Reaktionen auf die Applikation blieben aus.

4.3.3. Prophylaktische Inhibierung von hAd5 durch scAAV2/9-exprimierte amiR-Ad in immunsupprimierten Syrischen Hamstern

Nachdem die beiden Pilotversuche abgeschlossen worden waren, wurde der erste Hauptversuch gestartet. In diesem sollte untersucht werden, ob amiR-Ad nach prophylaktischer Gabe die Replikation von hAd5 im immunsupprimierten, permissiven Modell inhibieren könnten.

Es wurden 30 männliche, 4 Wochen alte Syrische Hamster in 5 Gruppen eingeteilt. Nach 10 d Adaptionszeit wurden sie mit Hilfe von CP wie zuvor beschrieben behandelt. Außerdem wurden sie mit 5×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-Ad (6x) bzw. physiologischer Kochsalzlösung (Gruppen 1 und 2) *i.v.* transduziert. Nach weiteren 2 Wochen wurden sie mit 4×10^{11} vp/kg hAd5 bzw. physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe 1) *i.v.* infiziert. Die Tiere wurden 7 d *p.i.* getötet und verschiedene Organe sowie Blut entnommen. Bei fünf Hamstern konnten in keiner Analyse Zeichen einer Infektion gefunden werden. Deren Daten wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es handelte sich dabei um jeweils zwei Tiere aus den unbehandelten Gruppen (2 & 3) sowie eines aus der Gruppe, welche mit scAAV2/9-amiR-pTP (6x) transduziert worden war.

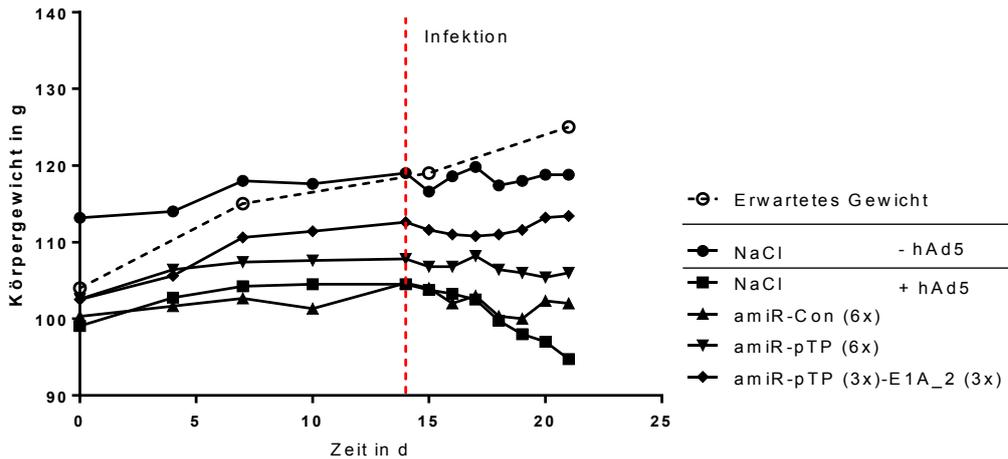


Abbildung 40: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – Gewichtsverläufe. 30 männliche, 4 Wochen alte Hamster wurden nach 10 d Adaptionszeit mit CP immunsupprimiert und mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert. Nach 2 Wochen wurden sie mit hAd5 infiziert und eine Woche *p.i.* getötet. Das Gewicht wurde zunächst zweimal pro Woche, nach der Infektion täglich kontrolliert.

Aufgetragen: Mittelwerte der Gruppen

Wie bereits im zweiten Pilotversuch beobachtet, stoppte die Behandlung mit CP sowie die Transduktion die erwartete Gewichtszunahme. Im Verlauf der zwei Wochen nach der ersten Operation stagnierte das Gewicht bei praktisch allen Tieren. Nach der Infektion mit hAd5 verloren vor allem die unbehandelten Tiere an Gewicht. Die Kontrollgruppe erholte sich jedoch leicht von diesem Rückgang. Die Hamster, die mit amiR-Vektoren transduziert worden waren, verloren auch nach der Infektion kaum an Gewicht. Der Verlauf glich dem der nicht infizierten Tiere, welche ausschließlich Natriumchlorid verabreicht bekommen hatten.

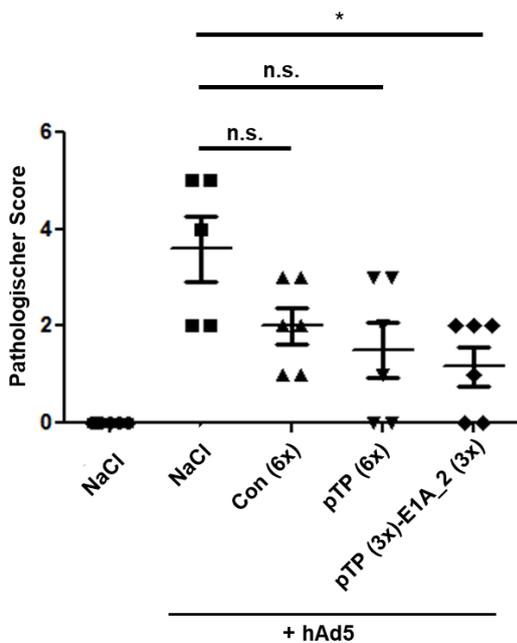


Abbildung 41: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – Pathologische Bewertung der Leberschnitte. Teile der Leber wurden für die histologische Bewertung herangezogen und ein pathologischer Score auf der Skala von 0 bis 5 erstellt. Abbildung vorab publiziert in (213).

Aufgetragen: Einzelwerte und Median.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Lebergewebeschnitte zeigte, dass bei den unbehandelten Tieren etwa 10 % der Zellen mit Adenoviren infiziert waren. Das exemplarisch ausgewählte Gewebe eines Kontrollvektor-transduzierten Tieres wies ebenfalls nur wenige infizierte Zellen auf. Eine sichtbare Reduktion der angefärbten Zellen trat auf, sobald einer der amiR-Ad exprimierenden Vektoren transduziert wurde. Die pathologische Bewertung der Gewebeschnitte aus der Leber deutete auch auf eine leichte Verbesserung des Gewebezustands durch die Behandlung der Infektion mit amiR-Ad hin. Diese war allerdings nur in Bezug auf nicht transduzierte Tiere und nur für eine Gruppe signifikant. Die Gabe eines AAV-Vektors führte bereits zu einer Verringerung des durchschnittlichen pathologischen Scores.

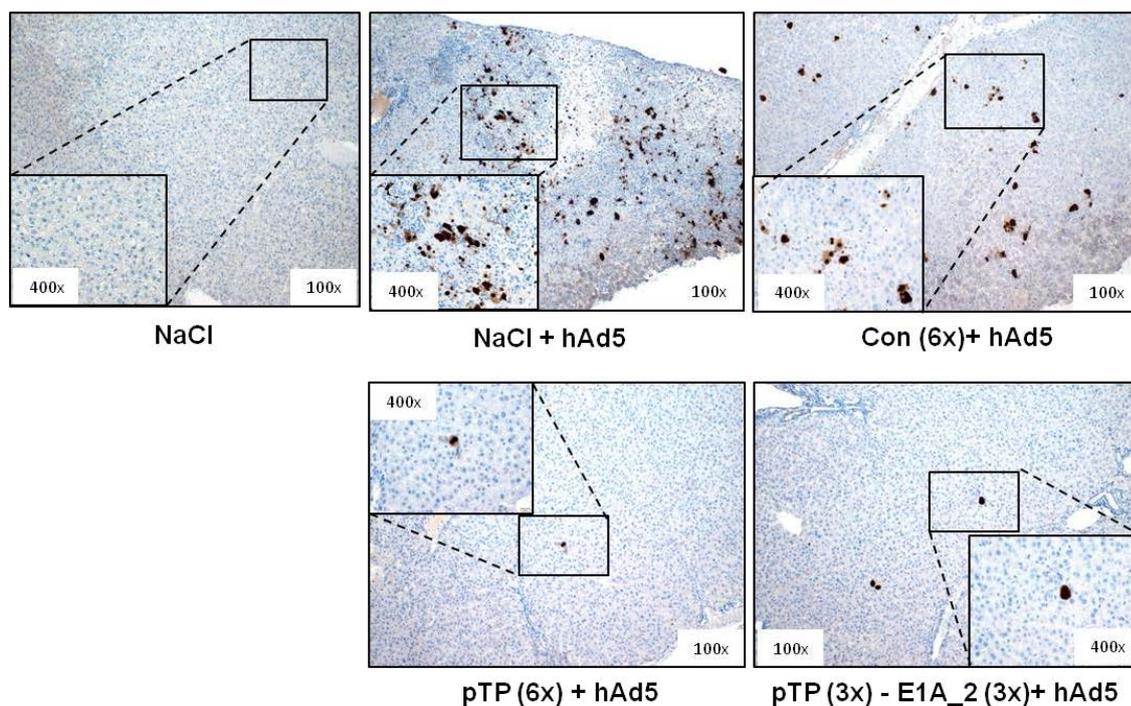


Abbildung 42: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* - Immunhistochemische Anfärbung der Leberschnitte. Gewebestücke wurden nach Entnahme in 4 % Paraformaldehyd gelagert, in Paraffin eingebettet und der Anteil virusinfizierter Zellen mit Hilfe eines antiadenoviralen Antikörpers in einer immunhistochemischen Färbung sichtbar gemacht. 1. Reihe: scheinoperiert; 2. Reihe links: infizierte Tiere, rechts: Transduktion mit Kontrollvektor und Infektion; 3. Reihe links: scAAV2/9-amiR-pTP (6x) und Infektion, rechts: scAAV2/9-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) und Infektion. Abbildung vorab publiziert in (213).

Die wichtigste Kenngröße des Versuchs war der Virustiter in der Leber. Es wurden wiederum Organstücke homogenisiert, ein Zellaufschluss durchgeführt und mit den Überständen Zellen infiziert. Die absolute Quantifizierung der replizierenden Viren ergab eine starke Reduktion in beiden Tiergruppen, die mit einem der beiden untersuchten Vektoren transduziert worden waren. Bei den nicht infizierten und nicht transduzierten Tieren konnten keine replizierenden Viren detektiert werden. Die beiden Kontrollgruppen, die infiziert worden waren und entweder nicht transduziert bzw. den Kontrollvektor erhalten hatten, zeigten einen Virustiter von $9,4 \times 10^3$ vp/mg bzw. $1,3 \times 10^4$ vp/mg. In der Gruppe, die den Vektor scAAV2/9-amiR-pTP (6x) verabreicht bekommen hatte, wurde der Virustiter signifikant auf $7,4 \times 10^2$ vp/mg reduziert. Der andere untersuchte Vektor, der amiR-pTP und amiR-E1A_2 exprimierte, reduzierte den Titer in einem ähnlichen Maß auf $9,6 \times 10^2$ vp/mg. Dies entsprach einer Reduktion von 94,5 % bzw. 92,8 %.

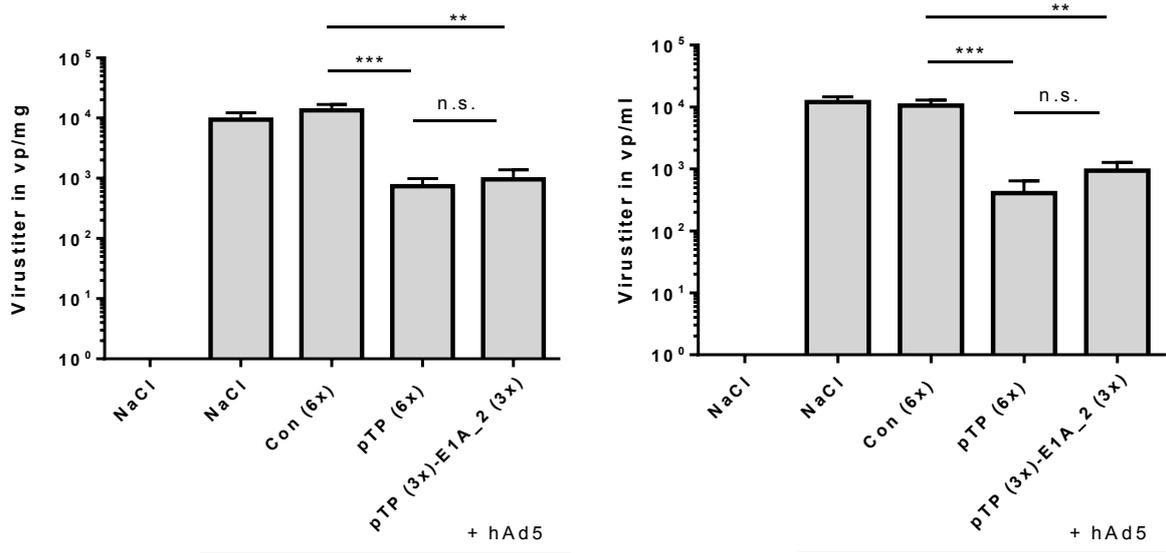


Abbildung 43: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – Virustiter in der Leber (links) und im Serum (rechts). Leberstücke wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und Überstände zur Infektion von HeLa-Zellen genutzt. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert, aus den Lysaten wurde hAd5-DNA absolut quantifiziert. Serum wurde direkt zur Infektion genutzt. Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,01 **, p < 0,001 ***

Ein ähnliches Bild präsentierte sich bei der Analyse des Virustiters im Serum. Auch hier wurde in der Gruppe der Tiere, die ausschließlich NaCl erhalten hatten, kein replizierendes Virus gefunden. In den unbehandelten Gruppen lag der Titer bei $1,2 \times 10^4$ vp/ml (kein Vektor) bzw. $1,1 \times 10^4$ vp/ml (amiR-Con). In den behandelten Gruppen reduzierte sich die Menge viraler Partikel jeweils signifikant auf $4,1 \times 10^2$ vp/ml (amiR-pTP (6x)) bzw. $9,4 \times 10^2$ vp/ml (amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)). Dies entsprach einer Reduktion von 96,1 % und 91,1 %.

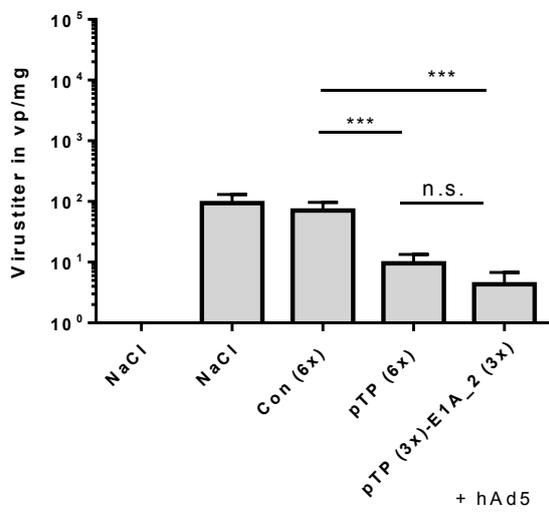


Abbildung 44: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – Virustiter im Herzgewebe. Organstücke wurden homogenisiert, die Zellen aufgeschlossen und Überstände zur Infektion von HeLa-Zellen genutzt. Nach 2 d Inkubation wurden die Zellen geerntet und lysiert, aus den Lysaten wurde hAd5-DNA absolut quantifiziert. Abbildung vorab publiziert in (213).
 Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 ***

Im Herzgewebe wurde ein deutlich niedrigerer Titer als in der Leber und im Serum ermittelt. Er lag bei 94 vp/mg (ohne Vektor) bzw. 71 vp/mg (amiR-Con). Dieser wurde durch die Transduktion auf 10 vp/mg (amiR-pTP (6x)) und 4 vp/mg (amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)) signifikant reduziert. Dies entsprach einer Verminderung um 86,5 % und 93,9 %.

Nach den Erkenntnissen aus dem Pilotversuch 1 wurde DNA nur aus der Leber präpariert. Der Gehalt an viraler DNA war in den beiden unbehandelten Gruppen sehr ähnlich. Bei den behandelten Tieren reduzierte er sich signifikant um 99,4 % (amiR-pTP (6x)) bzw. 98,9 % (amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)).

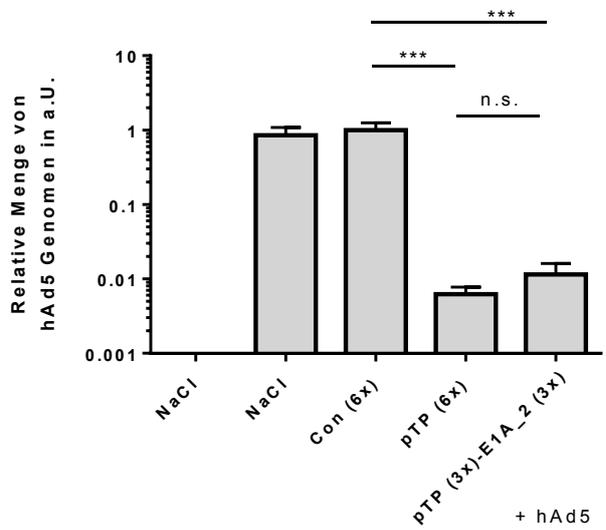


Abbildung 45: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – virale DNA in der Leber. DNA wurde aus Organstücken mit DNA Tissue Mini Kit isoliert und die Menge adenoviraler Hexon-DNA relativ quantifiziert. Abbildung vorab publiziert in (213). Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p > 0,05 n.s., p < 0,001 ***

Auch die Expression der mRNA von E1A und pTP wurde untersucht. Aus Teilen der Leber wurde mit TRIzol RNA isoliert und die Transkripte quantifiziert. Die mRNA von beiden Proteinen war in allen infizierten Tieren nachweisbar. Die pTP mRNA war in den unbehandelten Gruppen beinahe gleich stark vorhanden. In den Tieren, die amiR-Ad erhielten, war der Gehalt signifikant reduziert um 87,4 % (amiR-pTP (6x)) bzw. um 83,7 % (amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)).

Die mRNA von E1A war in nicht transduzierten Tieren etwa 2,9-mal mehr vorhanden als bei den Tieren, die den Kontrollvektor erhalten hatten. Die behandelten Tiere wiesen gegenüber der Kontrolle wiederum einen signifikanten Unterschied von 81,2 % bzw. 97,2 % auf. Durch die Reduktion der Viren reduzierte sich auch die Menge der viralen Transkripte. Demnach verminderte sich die Menge der E1A mRNA, auch wenn sie kein direktes Ziel der RNAi war. Deutlich stärker fiel die die Reduktion der E1A mRNA aus, wenn sie direktes Ziel der RNAi war. So konnte der Gehalt von E1A mRNA durch die amiR-Ad noch einmal um weitere 16 % reduziert werden. Dieser Unterschied zeigte eine starke Tendenz zur Signifikanz (p = 0,064).

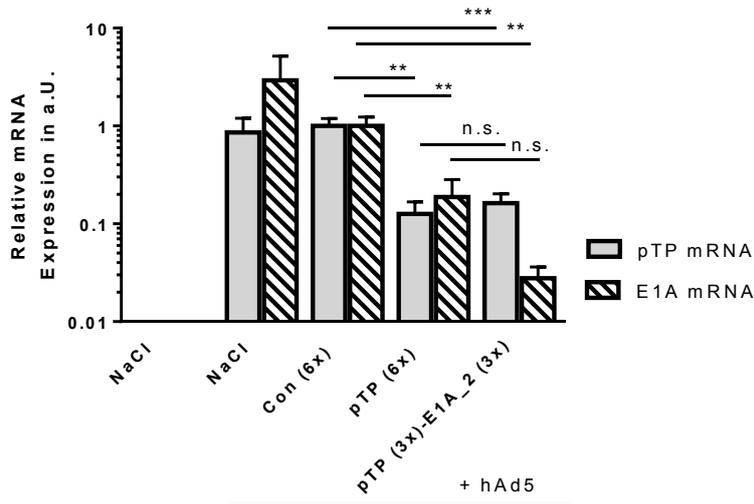


Abbildung 46: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – virale mRNA-Expression in der Leber. Gewebestücke wurden in TRIzol homogenisiert und Gesamt-RNA isoliert. 2 µg RNA wurde für eine RT-qPCR verwendet, um virale E1A-mRNA und pTP-mRNA relativ zu quantifizieren. Abbildung vorab publiziert in (213). Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,01 **, p < 0,001 ***

In den RNA-Isolaten der Leber konnten beide amiR-Ad nachgewiesen werden. Die Expression von amiR-pTP war 8,6-mal höher in der Gruppe, die scAAV2/9-amiR-pTP (6x) erhalten hatte, als bei den scAAV2/9-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x)-transduzierten Tieren. Der Vektor, welcher beide amiRs exprimierte, induzierte eine ähnlich starke Expression beider amiRs. Allerdings war die amiR-E1A_2 etwas häufiger (1,6-mal) vorhanden.

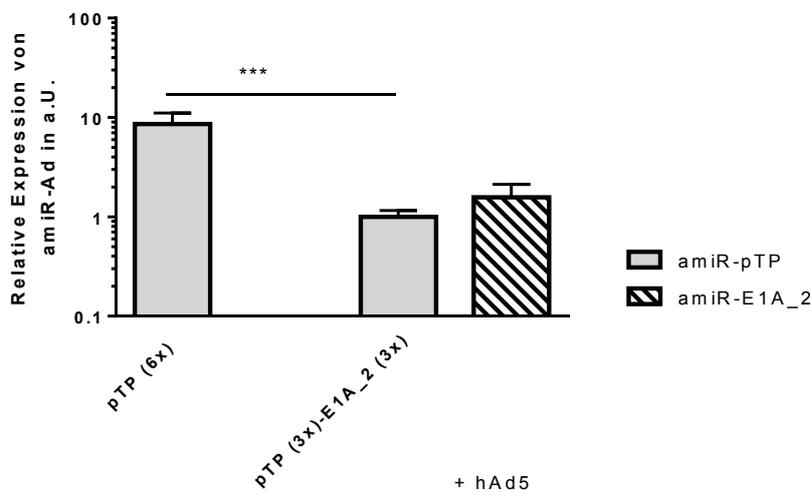


Abbildung 47: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – amiR-Expression in der Leber. Gewebestücke wurden in TRIzol homogenisiert und Gesamt-RNA isoliert. 200 ng RNA wurde für eine RT-qPCR verwendet, um amiR-pTP und amiR-E1A_2 relativ zu quantifizieren. Abbildung vorab publiziert in (213). Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 3, p < 0,001 ***

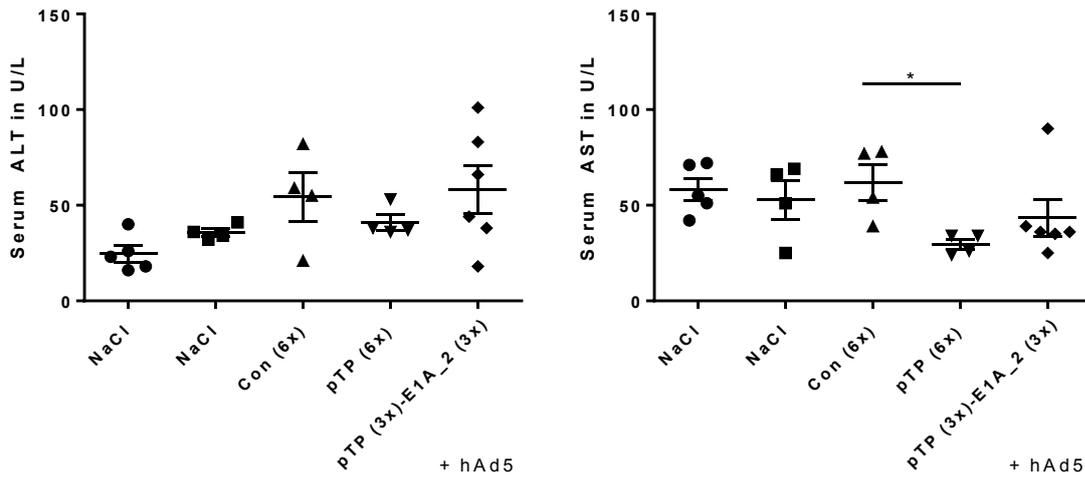


Abbildung 48: Prophylaktische Inhibierung *in vivo* – Serum ALT (links) und AST (rechts). Den Tieren wurde kardiales Blut entnommen und nach der Gerinnung das Serum abgenommen. Die Aktivität der Leberenzyme ALT und AST wurde quantifiziert. Aufgetragen: Einzelwerte der Tiere, Mittelwert und SEM, n = 2, p < 0,05 *

Um das Bild zu vervollständigen, wurde noch die Menge freier Leberenzyme im Serum quantifiziert. Diese bildete eine direkte Rückschlussmöglichkeit auf einen potentiellen Leberschaden. Lag dieser vor, erhöhte sich die Menge freier Leberenzyme im Serum. Durch die Behandlung mit amiR-Ad könnte sie wieder gesenkt werden. Für gesunde, erwachsene Menschen wurde ein Wert von 10-35 U/L (ALT) bzw. 5-35 U/L (AST) als normal angesehen. In diesem Bereich lagen auch die nicht infizierten Kontrolltiere aus der Vergleichsmodell von Toth und Wold (92).

Für das Enzym ALT konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen gefunden werden. Betrachtete man das andere Leberenzym AST, stellte man ein ähnliches Bild fest. Die Mittelwerte nicht infizierter Tiere (58,2 U/L), von nicht transduzierten (52,8 U/L) und Kontrollvektor-behandelten (62,0 U/L) unterschieden sich nicht signifikant. Durch die Behandlung mit den amiR-Ad-Vektoren verringerte er sich leicht, im Falle von scAAV2/9-amiR-PTP (6x) sogar signifikant auf 29,5 U/L. Der andere Vektor verringerte ihn auf 43,5 U/L. Allerdings lagen beide Werte unterhalb derer der nicht infizierten Gruppe.

4.3.4. Therapeutische Inhibierung von hAd5 durch scAAV2/9-exprimierte amiR-Ad in immunsupprimierten Syrischen Hamstern

Nachdem die Wirksamkeit der amiR-Ad im prophylaktischen Versuch prinzipiell gezeigt worden war, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob ein wirklichkeitsgetreuerer Aufbau möglich wäre. Für klinische Anwendungen wäre eine therapeutische Wirksamkeit der anti-adenoviralen Behandlung von deutlich höherer Relevanz als eine prophylaktische. Daher wurde der Versuchsaufbau abgeändert. Dieses Mal fanden Transduktion und Infektion der immunsupprimierten Hamster zeitgleich statt. Es wurden 30 männliche, 4 Wochen alte Hamster nach 10 d Adaptionszeit mit CP immunsupprimiert. Nach weiteren zwei Wochen wurden sie mit 5×10^{13} vge/kg scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert. Zwei Gruppen erhielten statt AAV-Lösung physiologische Kochsalzlösung. Zeitgleich wurde mit 4×10^{10} vp/kg hAd5 infiziert. Eine Gruppe erhielt wiederum statt hAd5-Lösung physiologische Kochsalzlösung. Die Virusdosis wurde zum vorangegangenen Experiment reduziert, da ein geringerer antiviraler Effekt erwartet wurde. Eine Woche nach der Infektion wurden die Tiere zur Blut- und Organentnahme getötet. Ein Tier musste vorzeitig auf Grund seines schlechten Allgemeinbefindens noch vor der Infektion aus dem Versuch genommen werden. Sein Zustand stand in keiner Verbindung mit dem Experiment.

Die Gewichtsverläufe der Tiere erschienen unerwartet. Die typische Stagnation der Körpergewichte blieb aus. Im Gegenteil: die Hamster nahmen gemäß den Angaben des Züchters zu. Selbst nach der Infektion gewannen sie an Gewicht.

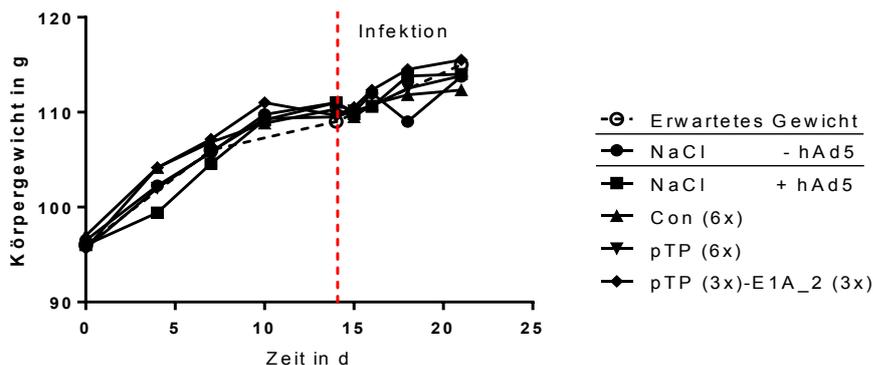


Abbildung 49: Therapeutische Inhibierung *in vivo* – Gewichtsverläufe. 30 männliche, 4 Wochen alte Hamster wurden nach 10 d Adaptionszeit mit CP immunsupprimiert. Nach 2 Wochen wurden sie mit hAd5 infiziert und mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert. Eine Woche *p.i.* wurden sie getötet. Das Gewicht wurde zweimal pro Woche kontrolliert. Aufgetragen: Mittelwerte der Gruppen

Bei der Analyse der Virustiter zeigte sich ebenfalls ein unerwartetes Ergebnis. Sowohl im homogenisierten Lebergewebe als auch im Serum waren bei der überwiegenden Anzahl der Hamster keine replizierenden Viren nachweisbar. Selbst bei den unbehandelten Gruppen, bei denen nach den Ergebnissen des vorangegangenen Versuchs ein Virustiter von etwa 1×10^4 vp/mg bzw. vp/ml erwartet worden war, konnte kein solcher Nachweis erbracht werden.

Aus jeweils zwei Leberstücken wurde DNA isoliert und adenovirale Hexon-DNA quantifiziert, welche in allen infizierten Gruppen nachweisbar war. Die Inhibierung durch die amiR-Ad war deutlich geringer als im prophylaktischen Versuchsaufbau. Der Vektor scAAV2/9-amiR-pTP (6x) verringerte die Hexon-

DNA um 52,1 %, der Vektor scAAV2/9-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) noch um 45,3 %. Die Verminderung war in beiden Fällen signifikant, der Unterschied zwischen den Gruppen nicht.

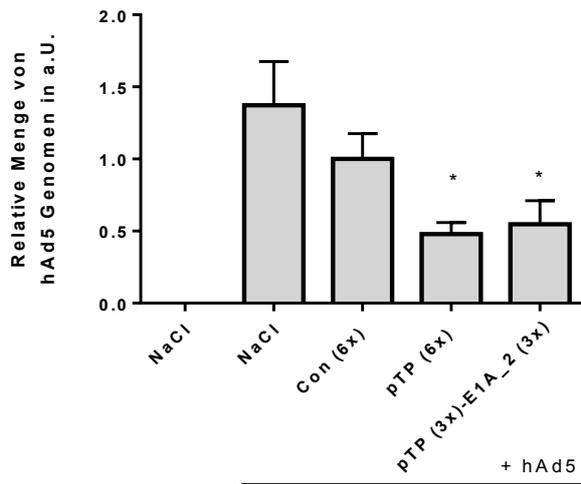


Abbildung 50: Therapeutische Inhibierung *in vivo* – Virale DNA in der Leber. DNA wurde aus Organstücken mit DNA Tissue Mini Kit isoliert und die Menge adenoviraler Hexon-DNA relativ quantifiziert. Abbildung vorab publiziert in (213). Aufgetragen: Mittelwert & SEM, n = 4, p < 0,05 *

5. Diskussion

Adenoviren sind endemisch in der ganzen Welt. Regional unterscheiden sich die vorherrschenden Serotypen (4). Eine Infektion verläuft in der Regel mild und ist nach wenigen Wochen auskuriert. Betroffen sind vor allem Kinder und Heranwachsende, aber auch Erwachsene können erkranken. Abhängig vom Serotypen unterscheidet sich die Symptomatik, wobei häufig die oberen Atemwege involviert sind, auch die Leber, das Herz oder das Hirn können infiziert werden (6).

Bedenklich ist die Situation bei immunschwachen Patienten. Hier sind die Verläufe oft schwerer, häufig führt die Infektion zum Tod durch Multiorganversagen. Besonders anfällig sind Kinder, meist tritt die Virusinfektion in Folge einer weiteren ernsthaften Grunderkrankung, wie z.B. Leukämie, auf (7–10). Das pharmakologische Unterdrücken von Teilen des Immunsystems zur Durchführung einer Transplantation von Blutstammzellen ermöglicht die zügige Ausbreitung von Infektionskrankheiten. Bis heute gibt es kein standardisiertes Behandlungsprotokoll, lediglich die Empfehlung zur Gabe von Nukleotidanaloga zur Unterbrechung der viralen Replikation, Reduktion der Immunsuppressiva und Durchführung von Palliativmaßnahmen (93).

Weitere experimentelle Ansätze zeigten bereits Erfolg in prä-klinischen und klinischen Studien. Zum einen kann eine anti-virale Behandlung erfolgen, z.B. durch pharmakologische Bekämpfung des Virus oder RNAi-basierte Strategien. Zum anderen kann bei immungeschwächten Patienten das Immunsystem durch die Transplantation von autologen oder allogenen, anti-adenoviralen T-Zellen oder die Verabreichung von neutralisierenden Antikörpern unterstützt werden.

Die Nukleosidanaloga Ribavirin und Cidofovir (CDV) waren lange Zeit die einzigen Möglichkeiten zur Behandlung. In breit angelegten Studien konnte jedoch eine statistisch signifikante Wirksamkeit von Ribavirin widerlegt werden (99). CDV zeigte zwar einen gewissen kurativen Erfolg, jedoch sind wiederholt nephrotoxische Nebenwirkungen beschrieben (93,97,98). Durch die Gabe von Brincidofovir (BCV), einem Lipidkonjugat von CDV, konnten einige der Probleme vermieden werden. Es ist oral verfügbar, erreicht höhere intrazelluläre Konzentration und reichert sich nicht in den Nieren an (7). Obwohl der Erfolg in der Behandlung von Patienten mit systemischer Adenovirusinfektion nachgewiesen ist, kommt es weiterhin zu letalen Ausgängen (10).

Die Transplantation von T-Zellen stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Behandlung dar. T-Zellen werden vom Spender oder Patienten entnommen, *in vitro* mit Ad-Epitopen aktiviert und expandiert. Kommt es nach der Infusion beim Patienten zu einer weiteren Expansion, ist die Aussicht auf Heilung groß. Allerdings ist dringend erforderlich, die Zeiträume und Kosten für die Produktion der Zellen zu verringern und möglicherweise Zellbanken für „*Off-the-shelf*“-Produkte zu etablieren (1,73,100–104).

RNA-Interferenz-basierte Therapien sind in vielen *in vitro*-Studien erfolgreich durchgeführt worden. Durch das Design spezifischer siRNAs wird die Expression essentieller adenoviraler Gene gedrosselt, was die Produktion viraler Nachkommen verringern kann. Kritisch sind hierbei die Evaluierung von geeigneten Zielgenen, das Design der siRNA sowie die zielgerichtete Verabreichung. Es hat sich gezeigt, dass eine Inhibierung von E1A nur bedingt erfolgreich ist. Die entsprechende mRNA wurde zwar erfolgreich reduziert, der Effekt im Hinblick auf Neubildung von Virusnachkommen war hingegen zu vernachlässigen. Dennoch konnte die Viabilität der infizierten Zellen verbessert werden (135–137,146). Gemessen an der Neubildung von Virionen zeichneten sich eine siRNA gegen Pol (135) und eine amiR

gegen pTP (134) besonders aus. Eine geeignete Expressionsplattform ist bisher nicht entwickelt worden, um siRNAs oder amiRs zielgerichtet in die infizierten Zellen zu bringen. Die Zellen der Leber stellen das hauptsächliche Ziel der Viren dar. Sie werden zunächst in den Gewebemakrophagen, den Kupffer-Zellen, gebunden, danach replizieren sie stark in den Hepatozyten (3). Ein geeigneter Vektor transduziert also gezielt die Leber und teilt darüber hinaus im besten Fall den Tropismus von Adenoviren. Ibrsimovic et al. hatten einen adenoviralen Vektor basierend auf hAd5 verwendet (134), der natürlich den gesamten Tropismus von hAd5 teilte. Davon ist aber abzuraten, weil im Fall einer Transkomplementierung des Vektors durch das Vollvirus Nachkommen mit unbekanntem genetischen Veränderungen entstehen können.

Diese Problematik sollte in der vorliegenden Arbeit überwunden werden. Es wurden amiRs gegen E1A, pTP, IVa2, Hexonprotein und Pol entwickelt, von AAV-Vektoren exprimiert und ihr Potential *in vitro* analysiert. Es wurden Kombinationsvektoren hergestellt, die mehrere amiR-kodierende Sequenzen enthielten und die zwei vielversprechendsten in einem permissiven, immunsupprimierten Infektionsmodell *in vivo* untersucht.

5.1. Anti-adenovirale amiR-Ad inhibieren die Infektion *in vitro*

Verschiedene Gene von hAd5 waren bereits Ziel von RNAi-basierten Inhibierungen. Aus den jeweiligen Arbeiten wurden die ausgewählt, die das höchste Potential zeigten (128,134–136). Insgesamt neun verschiedene siRNAs, shRNAs oder amiRs wurden untersucht. Diese hatten ihre Zielsequenz in fünf verschiedenen Genen, welche an unterschiedlichen Zeitpunkten des Replikationszyklus eine tragende Rolle spielen. E1A wird als erstes adenovirales Gen transkribiert, moduliert den zellulären Metabolismus und verstärkt die Transkription weiterer viraler Gene (3,77,78). Eine Inhibierung mit RNAi war zwar erfolgreich bezüglich der Reduktion der viralen mRNA, der Effekt auf die Neubildung von Virionen war aber zu vernachlässigen (146). Im Gegenzug konnte nur durch die Inhibierung von E1A, teilweise in Kombination mit weiteren Genen, eine infizierte Zellkultur effizient vor viral induzierter Lyse geschützt werden (135,136). Pol und pTP werden von derselben Genkassette, E2B, transkribiert. Die virale DNA-abhängige DNA-Polymerase (Pol) repliziert das episomale Genom als Grundbaustein neuer Virionen. Das Terminale Protein (TP) bindet kovalent an die 5'-Enden des Doppelstrangs und bewirkt dessen Zirkularisierung während der Verpackung (36,37,80). Ebenso wie das verzögert exprimierte IVa2 liegt TP nur in geringer Proteinkopienzahl pro Virion vor. IVa2 hat zum einen eine essentielle Rolle während der Replikation als Transkriptionsfaktor für den *Major Late Promoter*, zum anderen ist es im Virion an die DNA angelagert und trägt zur Konformation bei (35). Das Hexonprotein stellt den Hauptteil der Kapsidproteine (14,15). Die Inhibierung der Gene der Replikationsmaschinerie hatte bisher unterschiedlich starken Erfolg. Für die Minimierung der Virusreplikation war dieser Ansatz essentiell, jedoch in Bezug auf eine mögliche Steigerung der Zellviabilität nicht. Diese gelang nur bei gleichzeitiger Regulation von E1A (134–136).

Um den Effekt der amiR-Ad in Bezug auf die Virusreplikation zu erhöhen, wurden mehrerer amiR-Ad-kodierender Sequenzen zu einem Cluster verbunden. Der Erfolg dieser Strategie wurde *in vitro* mehrfach gezeigt. Mit einem p53-abhängigen, adenoviralen, onkolytischen Vektor, welcher shRNAs mit unterschiedlichen Zielgenen exprimiert, konnte die Lyse von A549-Zellen um ca. 50 % reduziert werden (128). Deutlich erfolgreicher war die Verkettung von sechs amiR-pTP-Sequenzen in einem adenoviralen Vektor. Dieser verringerte die Bildung von Virionen um 97,6 % (134). Noch effizienter war bisher nur die Kombinationstherapie, welche die Behandlung mit der Virusrezeptorfalle sCAR, Cidofovir und einer

Dreifachkombination aus siRNAs gegen IVa2, E1A und Pol vereinte. Die Verbindung all dieser Ansätze verringerte die Viruslast um 99,7 % (137).

Auf Grund der geringeren Toxizität von amiRs im Vergleich zu siRNAs bei ähnlicher Effizienz (126) fiel die Entscheidung im Vorfeld auf amiRs für die Durchführung des Versuchsvorhabens. Neun verschiedene, publizierte siRNAs, shRNAs oder amiRs (128,134,136) wurden ausgewählt und teilweise um wenige Nukleotide verändert, um dem Muster der natürlichen miR-155 zu entsprechen. Deren Expressionsumgebung wurde verwendet, um die amiRs bereitzustellen. Sowohl im Plasmid-basierten als auch im AAV-basierten Reporterassay wurden alle amiRs funktional exprimiert und regulierten das Reportergen durch die Bindung an die entsprechende, vollständig komplementäre Zielsequenz (TS) in der 3'-UTR der mRNA einer Luciferase. Im Plasmid-basierten Reporterassay lag die Inhibierung durch die amiRs zwischen 92 % (amiR-pTP) und 77 % (amiR-E1A_4). Bei Expression der amiRs von AAV2-Vektoren unterschieden sich die Effizienzgrade der einzelnen amiRs bereits deutlich. Konnte amiR-pTP die Expression der *Renilla* Luciferase noch um 88 % verringern, gelang es mit amiR-IVa2 trotz vollständiger Komplementarität der TS nur um 48 %. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch schon Kneidinger et al. (135) und Ibrisimovic et al. (134). Auch hier kam es bereits in den Reporterassays zu kleineren und größeren Varianzen zwischen den einzelnen untersuchten siRNAs bzw. amiRs. Abhängig von der Sequenz der kurzen RNA bzw. ihrer korrespondierenden TS kann es zur Ausprägung von Sekundärstrukturen kommen, was sowohl die Inkorporierung in den RISC als auch die Bindung einer mRNA erschweren kann. Außerdem ist der Prozess des Designs von amiR noch nicht vollständig verstanden. Obwohl es bereits viele Vorgaben und Richtlinien dazu gibt, kann es noch immer zu unvorhersehbaren Schwierigkeiten kommen, welche eine nicht optimale Expression und Prozessierung zur Folge haben und eine verringerte Funktion bewirken kann. Ein Hinweis, wie stark eine minimal veränderte Sequenz die Funktion einer kurzen RNA verändern kann, findet sich im direkten Vergleich der beiden aufeinander folgenden Studien. Ausgehend von Kneidingers siRNAs wurden amiRs generiert, indem jeweils der anti-sense Strang um vier Nukleotide gekürzt wurde. Daraufhin veränderte sich im anschließenden Reporterassay die Wirksamkeit der jeweiligen amiR in der Regulation des Reportergens. Die wirksamste siRNA gegen Pol zeigte als amiR nicht die höchste Effizienz im Vergleich zu anderen amiRs gegen Pol (134,135). Die Veränderung der *anti-sense* Sequenz einer kurzen RNA, um sie an ein anderes Expressionssystem anzupassen, führte zu Veränderungen in der Effizienz.

Die bereits im AAV-basierten Reporterassay sichtbaren Unterschiede in der Effizienz der Inhibierung der Luciferase bestätigten sich in der Replikationsinhibierung von hAd5. Nur die im Reporterassay besonders stark wirksame amiR-pTP konnte bei niedriger AAV2-Dosierung von 1.000 vge/Zelle bereits einen sichtbaren, wenn auch nicht signifikanten Effekt produzieren. Bei Dosiserhöhung auf 10.000 vge/Zelle erfolgte eine signifikante Inhibierung um 89 %. Überraschend führte auch amiR-IVa2 zu einer signifikanten Inhibierung von 61 %. Diese gehörte im Reporterassay noch zu den amiRs, welche weniger gut abgeschnitten hatten. Hier ist ein möglicher Zusammenhang zwischen Proteinkopienzahl und Funktion zu suchen. Kneidinger et al. (135) zeigten, dass eine starke Inhibierung im Reporterassay sowie effiziente Verringerung der Hexon mRNA von mehr als 80 % dennoch zur Folge hatte, dass die virale Replikation praktisch ungestört ablief. Das Hexonprotein ist in großer Anzahl im Kapsid vorhanden, so dass selbst eine erhebliche Verringerung der mRNA die Translation nicht derartig inhibierte, dass es zu einem Engpass für die Zusammenstellung neuer Kapside führte. Allerdings ist dieser Zusammenhang nicht generell auf alle Proteine übertragbar. Analog dazu hatte die Inhibierung der pTP mRNA zu einem sehr starken Einfluss auf die Bildung neuer Virionen. Das Terminale Protein

liegt nur ein sehr geringer Kopienzahl vor, bereits eine geringe Auslenkung des Systems hat weitreichende Folgen. Ein weiteres Protein, welches nur in geringer Kopienzahl vorliegt, die Protease, zeigte jedoch nicht den analogen Effekt. Eine starke Inhibierung der mRNA führte nicht zu einer starken Verringerung von neuen Virionen. Offenbar sind weitere Faktoren, z.B. die mRNA *Turnover-Rate*, im Verlauf der Proteinsynthese ausschlaggebend für die Effizienz des gesamten Prozesses.

Einzig von der Anzahl an Proteinkopien pro Virion bzw. der Proteinfunktion auf den Erfolg einer Inhibierung der Translationsinhibierung via RNAi zu schließen, ist also nicht möglich. Weiterhin ist es nicht möglich, vom Erfolg einer amiR in einem Reporterassay auf ihr tatsächliches Potential in der Inhibierung der Virusreplikation zu schließen. Einige Transkripte, z.B. E1A, sind sehr robust in Bezug auf einen Angriff durch RNAi und bilden weiterhin ausreichende Mengen mRNA, die die entsprechende Funktion im viralen Lebenszyklus erfüllen, andere sind anfälliger bereits für geringe Störungen der Transkription, was zu einer verminderten Funktion führen kann.

Im Viabilitätsassay bewirkte allein die amiR-pTP eine signifikante Verbesserung des Überlebens von infizierten Zellkulturen. Alle anderen amiRs erreichten keine Veränderung gegenüber den Kontrollvektor-transduzierten Zellen. In einem ähnlichen experimentellen Aufbau konnten Kneidinger et al. verbesserte Viabilität induziert durch siRNAs gegen Pol, pTP, Hex, Prot und vor allem gegen E1A finden. Nur IVa2-si bot keinen Schutz vor viral induzierter Lyse (135). Die Ergebnisse von Eckstein et al. boten einen anderen Eindruck. Hier konnten nur die Kombination aus siRNAs gegen E1A und einer weiteren siRNA gegen IVa2 oder Hex Zelllyse effektiv aufhalten. Hier wurde allerdings kein metabolisches Assay angewendet, welches schlussendlich eine photometrische Analyse erforderte, sondern ein *Cell Killing Assay* angefertigt (136). Dieses basiert auf dem Fixieren und Anfärben von adhären Zellen. Im Verlauf der diversen Waschschrte können leicht Zellen abgewaschen werden, welche eventuell noch aktiven Stoffwechsel betreiben. Die unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen erschweren den Vergleich und die Interpretation der jeweiligen, teilweise konträren Ergebnisse.

Die amiRs blieben im Viabilitätsassay hinter den Ergebnissen der siRNAs ein wenig zurück. Es wurde nicht detailliert untersucht, inwieweit sich die intrazellulären Konzentrationen von kurzen RNAs unterschieden. Möglicherweise wurde durch die Transfektion der siRNAs eine größere Menge bereitgestellt als durch die Expression von amiR-Umgebungen.

Um die Effizienz der amiR-basierten Behandlung zu erhöhen, wurden mehrere amiR-kodierende Sequenzen verkettet. In verschiedenen Arbeiten wurden damit schon gute Erfolge beschrieben. Gürlevik et al. verbanden mehrere shRNAs in einem p53-abhängigen Expressionscluster. Es wurden shRNAs gegen E1A (zwei verschiedene Zielsequenzen), pIX (E1B), E4 (zwei Zielsequenzen), pTP sowie pTP/Pol exprimiert. Dieser *Multi-Target*-Vektor verringerte die Replikation von hAd5 signifikant (128). Ein anderer Ansatz wurde von Ibrisimovic et al. verfolgt. Hier wurde dieselbe amiR verkettet, die Menge der exprimierten, reifen amiR quantifiziert und auch das Inhibierungspotential ermittelt. Durch die Erhöhung der Anzahl der amiR-kodierenden Sequenzen nahm das Level reifer amiRs stark zu. Der Effekt der amiRs nahm aber nicht im selben Maße zu. Erst bei drei amiR-Sequenzen war eine signifikante Reduktion der Luciferase-Expression im Reporterassay zu verzeichnen, die sich durch sechs Sequenzen noch einmal steigerte. Nur bei der Verwendung von sechs amiR-pTP-kodierenden Bereichen konnte die Bildung neuer Virionen mehr als 100-fach reduziert werden (134). Aus der Arbeit von Gürlevik et al. ist nicht ohne weiteres abzuschätzen, welchen Einfluss die Verkettung von mehreren Expressionsumgebungen auf die virale Replikation hatte. Es wurden lediglich Ergebnisse aus Reporterassays

mit jeweils einer shRNA sowie aus Replikationsinhibierungsassays mit vollständigen Clustern präsentiert. Es ist also nicht bekannt, welchen Einfluss eine einzelne shRNA auf die Replikation von hAd5 hatte (128).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Vektoren hergestellt, welche mehrere kodierende Sequenzen von amiR-pTP und amiR-E1A_2 enthielten. Darüber hinaus wurde ein Vektor erstellt, der verschiedene Gene als Ziel hatte und jeweils eine amiR gegen IVa2, zwei gegen E1A (mit unterschiedlichen Zielsequenzen) und drei gegen pTP enthielt. Diese amiRs wurden gezielt ausgewählt, weil sie sowohl in den eigenen Experimenten hohes Potential unter Beweis stellten, als auch aus der Literatur mit guten Ergebnissen beschrieben worden waren. Die Inhibierung von E1A trug wiederholt zur Verbesserung der Zellviabilität bei (135,136). Mit amiR-E1A_2 und -E1A_4 wurden die beiden ausgewählt, die im Reporterassay nach Expression vom AAV-Vektor die größte Inhibierung gezeigt haben. Die amiR-IVa2 war neben amiR-pTP die einzige, die eine signifikante Verringerung der Virusreplikation eines Vollvirus bewirken konnte, obwohl die Ergebnisse der Reporterassays diese Voraussage nicht zugelassen hatten.

Zunächst wurde im Reporterassay mit Hilfe von Plasmidexpression das erhöhte Potential gegenüber der Expression der Luciferase ermittelt. Beide Vektoren, die jeweils drei Abfolgen der amiR-pTP oder amiR-E1A_2 enthielten, waren dem Plasmid mit nur einer amiR signifikant überlegen. Allerdings wurde mit Hilfe von sechs amiR-pTP Kopien keine weitere Steigerung der Inhibierung des Reportergens erreicht. Auch die Verschiebung der Verhältnisse der miteinander transfizierten Plasmide erbrachte nicht diesen Effekt. Es wurde immer weniger amiR-exprimierendes Plasmid bei konstanter Menge Reporterplasmid verwendet, um potentielle Unterschiede deutlicher aufzeigen zu können. Selbst bei einem Massenüberschuss des Reporters von 100:1 konnte kein relevanter Unterschied zwischen pscAAV-amiR-pTP (3x) und -amiR-pTP (6x) gefunden werden.

In einem anderen Ansatz wurde ähnlich dem Aufbau von Gürlevik (128) ein *Multi-Target*-Vektor entworfen, der eine amiR gegen IVa2, zwei gegen E1A mit verschiedenen Zielsequenzen und drei amiRs gegen pTP exprimiert. Außerdem wurden Kombinationsvektoren entwickelt, welche jeweils mehrere amiR-E1A_2-Kopien und amiR-pTP Kopien enthielten. Im Reporterassay zeigten sie alle eine starke Inhibierung der Luciferase, die aber nur eine Zielsequenz enthielt, auf additive Effekte durch Kombination der amiRs konnte hier nicht geschlossen werden. Wurden mehrere Kopien einer amiR exprimiert, wurde die Aktivität des Reporters um mindestens 95 % verringert, die einzelnen amiRs im *Multi-Target*-Vektor vermochten eine Inhibierung von mindestens 90 % zu erreichen.

Alle Vektoren, die mehrere amiRs exprimierten wurden ebenfalls im Replikationsinhibierungsassay untersucht. Auf Grund der hohen Effizienz im Reporterassay wurde für die Transduktion die niedrigere Dosis von 1.000 vge/Zelle gewählt. Zunächst wurden nur die beiden Vektoren, welche drei oder sechs Kopien der amiR-pTP enthielten, betrachtet. Sie wurden entweder 5 h vor, zeitgleich oder 5 h nach der Infektion transduziert. Ähnlich wie im Reporterassay waren kaum Unterschiede in der Inhibierung auszumachen. Nur bei prophylaktischer Bereitstellung der Vektoren bewirkten die zusätzlichen Expressionsumgebungen einen signifikanten Vorteil.

Von den Vektoren, die neben amiR-pTP auch amiR-E1A_2 exprimierten, versagte lediglich einer in der Inhibierung der Replikation von Vollviren. Bei ausschließlicher Expression von amiR-E1A_2 konnte keinerlei Verringerung der Viruslast gegenüber Kontrollen ermittelt werden. Alle anderen Vektoren bewirkten zumindest eine gewisse Verringerung von mindestens 50 %, maximal 93 %. Es zeigte sich, dass

nur ein pTP/E1A-Kombinationsvektor die Virusreplikation ähnlich stabil inhibierte wie die Vektoren, die nur amiR-pTP exprimierten. Dieser enthielt ebenfalls drei kodierende Sequenzen für amiR-pTP direkt *downstream* des Promoters und anschließend drei weitere für amiR-E1A_2. In umgekehrter Reihenfolge unterschied sich die Viruslast bereits signifikant. Gürlevik et al. hatten hierzu bereits Ergebnisse veröffentlicht, die besagten, dass das Inhibierungspotential einer shRNA abnahm, je weiter entfernt vom Promoter sie sich in einem *Cluster* aus shRNAs befand. Direkt *downstream* des Promoters betrug die Inhibierung noch etwa 75 %, wurde die shRNA erst an Position 8 kodiert, betrug die Inhibierung nur noch 60 % (128). Ein derartiger Positionseffekt könnte auch bei anderen Expressionsplattformen als adenoviralen Vektoren eintreten. Dieser Sachverhalt wurde genauer beleuchtet, indem die Menge von AAV2 bereitgestellter, reifer amiRs quantifiziert wurde.

Bei therapeutischer Transduktion mit merklichem Zeitversatz zur Infektion bewirkte auch der *Multi-Target*-Vektor eine mit scAAV2-amiR-pTP (6x) vergleichbare Reduktion der Replikation. In den übrigen Aufbauten allerdings nicht.

Analog zu den Vektoren mit einer amiR wurden die Kombinationsvektoren dem Zellviabilitätsassay unterzogen. Es zeigte sich wiederum, dass die Verlängerung von einer zu drei kodierenden Sequenzen sowohl für amiR-pTP als auch für amiR-E1A_2 eine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens bedeutete. Mit Hilfe von amiR-pTP (3x) wurde sogar ein Zustand herbeigeführt, der dem von nicht infizierten Zellen glich. Naturgemäß konnten durch weitere drei amiR-pTP Umgebungen keine weitere Steigerung erreicht werden. Im Falle der amiR-E1A_2 wurde erst durch die Verkettung dreier kodierender Bereiche überhaupt erst eine signifikante Erhöhung der Viabilität erreicht. Hier zeigte sich die Dosisabhängigkeit der RNAi. Nur wenn entsprechend viele Expressionsumgebungen für die amiR-E1A_2 kodiert wurden, konnten ausreichend kurze RNAs bereitgestellt werden, um die Modellierung des zellulären Metabolismus, ausgelöst durch die Genprodukte von E1A, umzukehren. Es zeigte sich, dass sich die Menge exprimierter amiRs durch drei kodierende Bereiche gegenüber einem um den Faktor 2,4 erhöht hatte. Ibrsimovic et al. hatten eine deutlich größere Zunahme der amiR-Level gefunden. Bereits durch eine zweite Kopie hatte sich die Menge reifer amiRs verfünffacht. Allerdings wurde diese Menge nicht zu einer zellulären kurzen RNA relativiert und darüber hinaus fand die Expression von einem Plasmid statt. Die Daten sind also nur sehr begrenzt vergleichbar (203).

Im Zellviabilitätsassay bewiesen sich fast alle amiR-pTP-E1A_2-Kombinationsvektoren als wirkungsvoll. Nur der Vektor mit bidirektionaler Expression erreichte keine signifikante Verbesserung. Dieser hatte auch schon im Replikationsinhibierungsassay schlecht abgeschnitten. Neben scAAV2-amiR-pTP (6x) erreichte wieder der Vektor mit je drei Kopien amiR-pTP und amiR-E1A_2 in dieser Reihenfolge die besten Ergebnisse, welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Ein möglicher Grund für die abweichende Wirkung in allen betrachteten Experimenten liegt in der unterschiedlich starken Expression der amiR-pTP von den einzelnen Vektoren. Verglichen mit scAAV2-amiR-pTP (3x) war sie bei nahezu allen Kombinationsvektoren deutlich reduziert. Nur der Vektor mit sechs amiR-pTP Sequenzen und der *Multi-Target*-Vektor stellten vergleichbare Mengen reifer amiR zur Verfügung. Bei scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x) war die Expression leicht reduziert, aber dennoch die Abweichung signifikant. Alle übrigen zeigten eine stark verminderte Bereitstellung der amiR-pTP. Diese spielt aber den dominanten Part in der Inhibierung der Replikation und hat daher auch die größte Auswirkung in der Reduktion der viral induzierten Toxizität. Durch die insgesamt stark verminderte Viruslast wird die Zellviabilität massiv erhöht. Wenn nun also die amiR-pTP nur geringfügig exprimiert wurde, wurde in der Folge die Replikation des Virus nur wenig inhibiert und dieser Effekt auch im Viabilitätsassay sichtbar.

Im Gegenzug wurde die amiR-E1A_2 von allen Vektoren etwa gleich stark exprimiert. Fraglich ist hierbei, warum der *Multi-Target*-Vektor, der nur eine kodierende Sequenz der amiR-E1A_2 enthielt, diese auf sogar höherem Niveau bereitstellte, als der Vektor mit drei Kopien. Es bleibt weiterhin zu klären, warum die Kombinationsvektoren im Zellviabilitätsassay nicht mindestens das Ergebnis des Vektors, der ausschließlich die Expression von E1A regulierte, einstellte. Die Kombinationsvektoren inhibierten die Replikation um mindestens 50 %. Darüber hinaus wurde die Zellviabilität nur durch die Regulation von E1A gegenüber der Kontrolle stark gesteigert. Wenn also die Vektoren, die eigentlich beide Effekte kombinieren sollten, diese Ergebnisse nicht zu erreichen vermögen, muss ein anderes Problem vorliegen. Die stark verringerte Expression der amiR-pTP kann die verringerte Effizienz der Vektoren in der Replikationsinhibierung erklären. Diese stellt den Hauptteil des Effekts für die Verbesserung der Zellviabilität. Es bleibt offen, warum die gleich stark zur Verfügung gestellte amiR-E1A_2 nicht mindestens denselben Effekt erreicht wie bei scAAV2-amiR-E1A_2. Möglicherweise bilden die Transkripte in bestimmten Anordnungen komplizierte Sekundärstrukturen, die die Prozessierung in reife amiRs erschweren oder verzögern. Vor allem die Expression von E1A muss zu einem frühen Zeitpunkt unterbrochen werden. Wenn für den ersten Replikationszyklus ausreichend E1A zur Verfügung steht, wird der Effekt der RNAi durch die exponentielle Vervielfältigung der Viren zunichte gemacht. Wird durch eine langsamere Prozessierung die Bereitstellung der amiR-E1A_2 verzögert, ist eine Translationsinhibierung nicht mehr effektiv und die Erhöhung der Zellviabilität lässt wieder nach.

Um die reale Situation *in vitro* noch ein wenig besser abzubilden, wurde das Replikationsinhibierungsassay mit den Kombinationsvektoren in hepatischen Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse deckten sich weitestgehend mit den Erkenntnissen, die in HeLa-Zellen gewonnen worden waren. Das größte Potential bewiesen wiederum die Vektoren scAAV2-amiR-pTP (6x) sowie scAAV2-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x). Die Ergebnisse blieben insgesamt hinter denen der aus HeLa-Zellen zurück. Die Transduktionseffizienz der AAV2-Serotypen war etwas niedriger als bei HeLa-Zellen, so dass die Infektion nicht im selben Maß bekämpft werden konnte. Grundsätzlich konnte aber die Funktion der Therapie mit AAV2-exprimierten amiR-Ad in final differenzierten HepaRG-Zellen gezeigt werden.

Weitere wichtige Erkenntnisse wurden aus den Dosisescalationsexperimenten gewonnen. Zunächst wurden steigende Mengen scAAV2-amiR-pTP (3x) transduziert und die Inhibierung der Replikation untersucht. Es zeigte sich, dass bereits sehr kleine Menge Vektor eine signifikante Reduktion der Viruslast bewirkten. Über weite Bereiche zeichnete sich eine dosisabhängige Inhibierung ab. Je mehr Vektor zugegeben wurde, desto stärker der Effekt. Erst bei 50.000 vge/Zelle schien eine Sättigung erreicht zu sein; die restliche Menge an Virusgenomkopien sank nicht weiter. Mit Hilfe der AAV-exprimierten amiRs konnte die Replikation mindestens 100-fach reduziert werden. Mit der mittleren Dosis von 1.000 vge/Zelle wurde anschließend die Dosis der Adenoviren variiert. Im Fenster von MOI 0,05 bis 1 stieg die Viruslast stetig an. Darüber hinaus trat starke Lyse auf. Weil mit diesem Assay allerdings nur intrazelluläre Viruspartikel erfasst wurden, konnten Messwerte mit einer MOI > 1 nicht mehr berücksichtigt werden, da große Mengen Viruspartikel in das Medium abgegeben worden waren. Bei jedem Messpunkt gelang eine Inhibierung der Replikation von mindestens 96 %. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Therapie auch in höheren Dosisbereichen von hAd5 noch effektiv war. Bei der Variation der Vektormenge zeigte sich aber die Abhängigkeit der Inhibierung von der Menge der vorhandenen Vektoren. Es ist also anzunehmen, dass bei zunehmender Viruslast und konstanter Menge Vektoren die Inhibierung schlussendlich nachlassen würde. Dieser Effekt konnte mit dem durchgeführten Experiment nicht belegt werden, weitere Analysen wären hierfür notwendig.

In der Zusammenfassung der *in vitro*-Experimentreihen bewiesen sich zwei Vektoren als ähnlich effizient in der Inhibierung der Adenovirusreplikation sowie der Verbesserung der Zellviabilität infizierter Kulturen. Diese beiden Vektoren enthielten entweder sechs kodierende Sequenzen für amiR-pTP oder jeweils drei für amiR-pTP und amiR-E1A_2. Die überzeugenden Daten sowohl aus den eigenen Experimenten wie auch aus der Literatur (134,136) bildeten die Basis für die Auswahl der Vektoren, um sie anschließend in einem permissiven, immunsupprimierten Tiermodell zu untersuchen.

5.2. Etablierung des Tiermodells

Adenoviren sind stark an eine Spezies adaptiert, ein Tiermodell zu finden, welches den Krankheitsverlauf im Menschen abbildet, stellte sich in der Vergangenheit als problematisch heraus. Viele Studien wurden in immunsupprimierten Mäusen durchgeführt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass humane Adenoviren nur bedingt in Mauszellen replizieren, im lebenden Modell war die Infektion abortiv (204). Darüber hinaus stellte die notwendige Immunsuppression keine angemessene Voraussetzung dar, um verschiedene Vorerkrankungen zu simulieren. Einzig die Virusaufnahme bei schwachem Immunsystem konnte abgebildet werden (205). Es wurden weitere Modelle in Betracht gezogen. Baumwollratten zeigten sich semi-permissiv für die Infektion mit hAd5. Onkolytische Adenoviren replizierten in Tumoren aus Rattenzelllinien in einem Immunkompetenten Modell nach aerosolischer Aufnahme (206). Nach intrakranieller Infektion konnten Viren im Gehirn, Leber, Lunge und Blut gefunden werden. Nach ca. 14 d sank deren Menge. Die Menge der Viren überstieg die von Syrischen Hamstern bei gleicher Applikationsroute und -menge (88). In einer früheren Studie in Baumwollratten konnte nach aerosolischer Aufnahme von hAd5 allerdings gezeigt werden, dass die Pathologie der Infektion vom Immunangriff auf die Viren herrührte und dass es keine vollständige Virusreplikation in infizierten Geweben gab (87).

Der Syrische Hamster gilt heute als Standardmodell und wird der semi-permissiven Baumwollratte vorgezogen. Er ist permissiv für die Infektion mit humanen Adenoviren und die Infektion produziert einen vergleichbaren Verlauf. In der erstmaligen Beschreibung entwickelten die Tiere nach aerosolischer Verabreichung eine Infektion der Lunge (90). Später wurde eine systemische Infektion, nachweisbar in Blut, Lunge und Leber nach endotrachealer Infektion beschrieben (91). Toth et al. entwickelten das Modell weiter. Sie unterdrückten das Immunsystem, vorrangig T-Helfer-Zellen und B-Zellen (207), und verabreichten die Viren *i.v.* in die *Vena jugularis*. Die gewählte, halbletale Dosis von $1,9 \times 10^{12}$ vp/kg induzierte eine systemische Infektion, nachweisbar durch hohe Titer replizierender Viren in Blut, Leber, Pankreas und Speicheldrüsen sowie erhöhter Werte von Serum-AST und -Bilirubin (92).

In einer weiteren Studie wurden Primärzellen verschiedener Spezies mit hAd5 infiziert. Dabei stellte sich das Schwein als ideales Modelltier heraus. Das Virus replizierte sehr gut in verschiedenen Organen und erreichte dabei jeweils höhere Titer als bei jeder anderen Spezies, Syrische Hamster eingeschlossen. Die Titer waren vergleichbar mit denen aus suszeptiblen, humanen Zelllinien. Auch im *in vivo*-Versuch bestätigte sich die Permissivität von Schweinen für hAd5 (86).

Das in der vorliegenden Arbeit neu etablierte Tiermodell hielt sich im Allgemeinen an den Parametern des von Toth et al. formulierten. Die deutlich niedrigere Virusdosis führte jedoch zu erheblich geringeren Symptomen. Bedeutete die höhere Virusdosis noch 50 % Letalität bei unbehandelten Tieren, konnte im niedrigeren Dosisbereich von 2×10^{11} vp/kg keine Veränderung des Allgemeinbefindens der nicht behandelten gegenüber nicht infizierten Tieren festgestellt werden. Die induzierten Virustiter waren aber deutlich geringer. Konnten Toth et al. noch einen Serum-Titer von $1,6 \times 10^6$ vp/ml und in

der Leber von 7×10^8 vp/mg verursachen, gelang durch Reduktion der Dosis um das Fünffache noch der Nachweis von $2,0 \times 10^2$ vp/ml bzw. $1,9 \times 10^3$ vp/mg. Die Verringerung der zur Infektion verwendeten Menge um das Fünffache führt zu einer erheblichen verminderten Anzahl Viren. Durch die starke Sequestrierung von Adenoviren in den Gewebsmakrophagen gibt es keine lineare Beziehung zwischen der Dosis und der sich entwickelnden Infektion.

In der Immunhistologie wurde ersichtlich, dass nur ein kleiner Teil der Hepatozyten infiziert war. Der resultierende Gewebeschaden war in so geringem Umfang, dass keine Erhöhung der Leberenzyme AST und ALT im Serum nachzuweisen war.

Darüber hinaus konnte festgehalten werden, dass das Körpergewicht nur bedingt geeignet war, um daran ein Abbruchkriterium zu definieren. Dieser Vorgang stellte die gängige Praxis im Tierversuchsgenehmigungsprozedere dar. Meist wurde ein Gewichtsverlust von 20 % gegenüber gesunden Tieren als Zeichen schweren Leidens und als Grund den Versuch abubrechen eingruppiert. In diesem Fall musste aber eine Reduktion des Gewichts um sogar mehr als 20 % ohne weitere Merkmale eines schlechten Gesundheitszustands nicht als ein solches Charakteristikum verstanden werden.

Zusammenfassend wurden aus dem ersten Pilotversuch viele Erkenntnisse gewonnen. Zunächst war es gelungen, das Immunsystem der Hamster erfolgreich pharmakologisch zu supprimieren. Bis zu sieben Tage nach der Infektion waren alle Tiere nachweislich immungeschwächt, erkennbar an der Depletion der Milz. Die Verabreichung von 4×10^{11} vp/kg hAd5 *i.v.* induzierte eine milde Infektion, die sich systemisch ausbreitete. In verschiedenen relevanten Organen, besonders der Leber, sowie im Serum konnten replizierende Viruspartikel gefunden werden. Die Viruslast war 7 d nach der Infektion am größten. Auch die histologischen Schnitte dieses Zeitpunkts wurden mit den höchsten Scores bewertet. Dennoch waren die Schäden am Organ nicht so groß, dass sich die Leberenzyme AST und ALT im Serum in erhöhten Mengen nachweisen ließen. Auch das Allgemeinbefinden der Tiere war unauffällig. Insgesamt konnte also ein moderates Infektionsmodell etabliert werden, welches zur Erforschung des Inhibierungspotentials von amiR-Ad genutzt werden sollte.

5.3. Anti-adenovirale amiR-Ad inhibieren die hAd5-Replikation *in vivo*

5.3.1. Prophylaktische Applikation der amiR-Ad

Betrachtet man die Ansätze zur Therapie von akuten Adenovirusinfektion in immunsupprimierten Patienten, treten vor allem das Nukleotidanalogen BCV sowie die Transplantation von allogenen T-Zellen in den Vordergrund. BCV wird intrazellulär zu seiner reifen Form, Cidofovir, prozessiert und wird während der viralen DNA-Replikation inkorporiert. Daraufhin kommt es zum Kettenabbruch und die Herstellung neuer Virionen wird gehemmt (94–96). Durch die chemische Modifikation ist BCV als Lipidkonjugat oral verfügbar, erreicht höhere intrazelluläre Konzentrationen als CDV und wird nicht mehr mit nierenschädigender Wirkung assoziiert (7). Die kürzlich veröffentlichten Daten aus einer Phase-III-Studie zeigten, dass sowohl Kinder als auch Erwachsene mit Hilfe von BCV akute, mitunter disseminierte Infektionen auskurieren können. Dennoch gab es weiterhin Patienten, die auf die Behandlung nicht ansprachen oder während der Behandlung verstarben. Daten über die *Responder*-Rate der Therapie sind bisher nicht zugänglich (10).

Auf dem Gebiet der allogenen T-Zell-Therapie sind ebenfalls große Fortschritte gemacht worden. Die anfänglich sehr langen Produktionszeiträume sind durch verbesserte Verfahren erheblich verkürzt worden und es gibt erste Bemühungen, T-Zellen als „*Off-the-shelf*“-Produkte zu lagern. Es wurden Patienten erfolgreich behandelt, oft auch mit T-Zell-Pools, die Epitope verschiedener Viren erkannten

und eine Immunantwort gegen Co-Infektionen induzierten (1,73,100–104). Dies ist ein erheblicher Vorteil gegenüber pharmakologischen Behandlungen. BCV ist zwar reaktiv gegenüber mehreren Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom, T-Zellen können aber gegen beliebige Viren eingesetzt werden. Ein nicht unerheblicher Anteil der Patienten profitiert von einer solchen Behandlung, die potentiell alle Infektion bekämpfen kann und nicht nur eine ausgewählte. Die Behandlung mit T-Zellen erfordert allerdings eine sehr genaue Charakterisierung der Kompatibilität von Spender und Empfänger. Es kann zu Abstoßungsreaktionen kommen und letztlich sind die erforderlichen Zeiträume für die Bereitstellung der angemessenen Menge von Zellen noch immer sehr groß. Bei einer disseminierten Adenovirusinfektion mit sehr hohen Virustitern ist die Wahrscheinlichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass der Betroffene nicht so lange auf eine verfügbare Therapie warten kann.

Es besteht weiterhin erhöhter Bedarf an neuen therapeutischen Möglichkeiten, die schnell für eine Mehrheit der Patienten mit gutem Erfolg anwendbar sein soll. Die Verwendung von AAV-Vektoren wurde in verschiedenen Studien mit gutem Erfolg gezeigt. Entweder wurde durch das transportierte Transgen eine Funktion gestört oder ein Mangel kompensiert, sodass sich das zu Grunde liegende Krankheitsbild stark verbesserte (194–199). Gleichzeitig sind die Partikel nur wenig immunogen (185), integrieren nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit ins Wirtsgenom (179,180) und stellen das Transgen für einen langen Zeitraum zur Verfügung. Da sie endemisch sind, kann der Patient aber bereits neutralisierende Antikörper haben, die einen Einsatz des entsprechenden Serotyps in Frage stellen (186). Für diesen Fall wäre es notwendig, einen anderen Serotypen, Pseudotypen oder eine artifizielle Chimäre zu verwenden. Dieser neue Partikel muss über denselben oder zumindest ähnlichen Tropismus und Transduktionseffizienz verfügen, um das Transgen mit gleichbleibender Qualität zur Verfügung zu stellen.

Dass antivirale RNAi *in vivo* prinzipiell durch das Einbringen von kurzen RNAs induzierbar ist, wurde kürzlich gezeigt. Artifizielle microRNAs gegen Influenza A wurden generiert und mit Hilfe eines adenoviralen Vektors exprimiert. Eine prophylaktische Verabreichung zeigte im Mausmodell gute Erfolge gegen verschiedene Serotypen des Virus (141). Die Verabreichung von antiviralen amiRs von Plasmiden schützte neugeborene Mäuse vor der Infektion verschiedener Serotypen der Maul- und Klauenseuche (208). Auch der *Knock down* endogener Transkripte war möglich durch den Einsatz von Vektor-exprimierten amiRs (209). Darüber hinaus gibt es derzeit wenige Daten zur Wirksamkeit von antiviralen, artifiziellen microRNAs in Säugern. Für die Anwendung von shRNAs ist die Datenlage zwar dichter, aber die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Der Aufbau der Expressionskassetten unterscheidet sich grundlegend, die Expression selbst ist viel stärker und belastet die Bereitstellung zellulärer miRNAs, was zu toxischen Effekten führen kann.

Im zweiten Pilotversuch wurden toxische Nebenwirkungen durch die Expression der amiR sowie die Verabreichung von AAV9 Partikeln ausgeschlossen. Es gab minimale Veränderungen in der Leber, die aber toleriert werden konnten. Im nächsten Schritt wurde nun also die eigentliche Frage des Versuchsvorhabens beleuchtet: können die amiRs eine Adenovirusinfektion bekämpfen? Hierfür wurden 30 männliche Hamster immunsupprimiert und mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert. Kontrollgruppen erhielten anstelle der Vektorlösung physiologische Kochsalzlösung. Eine Gruppe erhielt den Kontrollvektor, eine scAAV2/9-amiR-pTP (6x) und eine Gruppe scAAV2/9-amiR-pTP (3x)-E1A_2 (3x). Nach zwei Wochen wurden die Tiere mit hAd5 infiziert und nach weiteren sieben Tagen zur Organ- und Blutentnahme getötet.

Das Allgemeinbefinden der Tiere war auf Grund der geringen Virusdosis wie erwartet gut, nur die un- behandelten Tiere verloren an Gewicht und erholten sich davon bis Versuchsende nicht. Die Virustiter in Leber und Serum waren ca. 10 – 50-fach höher als noch im Pilotversuch. Möglicherweise beein- flusste die zweite Operation das Immunsystem in einer Weise, die die Virusreplikation begünstigte, z.B. durch die erhöhte Bildung von Blutgerinnungsfaktoren, welche auch zur Infektion von Hepatozyten dienten. Betrachtet man nun die klinische Situation humaner Patienten, so wird im Regelfall nach einer Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen oder von Organen engmaschig auf verschiedene Virusinfektionen getestet. Sind mehr als 1.000 virale Kopien/ml im Blut des Patienten nachweisbar, wird empfohlen, die Behandlung mit Cidofovir zu beginnen und ggf. die Immunsuppression zu redu- zieren (93). Der Virustiter der Kontrollgruppe im Serum befand sich mit $1,1 \times 10^4$ vp/ml genau im Grenzbereich, ab dem die Behandlung der Infektion begonnen werden sollte.

Der Virustiter in der Leber und auch im Serum reduzierte sich durch die Behandlung mit beiden Vek- toren um mindestens eine Logstufe. Unterschiede zwischen den Gruppen, die jeweils einen amiR-Ad- Vektor erhalten hatten, waren dabei nicht signifikant. Ganz ähnlich präsentierten sich die weiteren erhobenen Daten. In DNA- und RNA-Isolaten reduzierten sich die viralen Bestandteile jeweils signifi- kant, auch der Virustiter im Herzgewebe verringerte sich.

Die Werte der Leberenzyme AST und ALT im Serum waren grundsätzlich im Bereich nicht infizierter Tiere. Es blieb also fraglich, ob die Verringerung des AST-Levels tatsächlich auf einen geringeren Scha- den der Leber hinwies. Im Fall der nicht infizierten Gruppe konnte keinerlei pathologische Veränderung in der immunhistologischen Bewertung detektiert werden. Die Werte der AST/ALT-Analyse befanden sich im Bereich gesunder Tiere, wie sie vom Hersteller vorgegeben waren. Jede Verringerung lag in eben diesem Bereich. Die Messmethode war also für dieses Infektionsmodell zu vernachlässigen. Es mangelte an Spezifik, um derart kleine Unterschiede als solche auch bewerten zu können.

In allen Untersuchungen unterschieden sich die Behandlungserfolge zwischen den beiden betrachte- ten Vektoren kaum. Weder die Menge replizierender Viren, noch die Belastung mit viraler DNA oder die Veränderung des Gewebes wurde durch den einen oder anderen Vektor stärker oder schwächer verändert. In weiterführenden Experimenten steht aus zu klären, ob sich die Effekte der beiden Vek- toren durch eine höhere Virusbelastung signifikant voneinander unterscheiden würden.

5.3.2. Therapeutische Gabe der amiR-Ad

Der Versuch zur therapeutischen Inhibierung orientierte sich vollständig am Ablauf, der zuvor für die prophylaktische Inhibierung gewählt worden war. Wiederum wurden 30 Syrische Hamster immu- nsupprimiert, nur wurde dieses Mal die Infektion zeitgleich zur Transduktion gesetzt. Zwei Wochen nach Beginn der Suppression wurden die Tiere infiziert und transduziert, nach einer weiteren Woche zur Organentnahme getötet.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Effizienz der amiR-Behandlung schwächer ausfallen würde als im prophylaktischen Versuch, da weniger Zeit zur Verfügung stand, um signifikante Mengen amiR-Ad zu exprimieren. Aus diesem Grund wurde die verabreichte Virusdosis verringert, um nicht zu riskieren, dass eine antivirale Wirkung nicht aufgezeigt werden könnte.

Eben durch die Reduktion der Dosis wurden die Grenzen des Modells erreicht. Es konnte kein replizie- rendes Virus mehr in Blut oder Leber gefunden werden, einzig Daten zum DNA-Gehalt von Leberge- webe konnten erhoben werden. Beide Vektoren verringerten die Menge adenoviraler Hexon-DNA um

mindestens 45 %, Unterschiede zwischen den Gruppen waren wiederum nicht signifikant. Wie erwartet fiel der Effekt tatsächlich deutlich geringer aus als im prophylaktischen Modell, eine Wiederholung des gesamten Versuchs mit einer höheren Virusdosis sei aber dennoch angeraten, um auch die übrigen Parameter, wie Virustiter, mRNA-Reduktion und Immunhistologie, erheben zu können. Gegebenenfalls sollten mehr als sechs Tiere pro Versuchsgruppe verwendet werden, um auch kleine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen ausreichend auflösen zu können.

Der Vergleich der Behandlung mit amiR-Ad zum Erfolg anderer Studien ist nicht ohne weiteres möglich. In der Studie zur Wirksamkeit von BCV wurde mit einer deutlich höheren Infektionsdosis gearbeitet, die einen schwereren Krankheitsverlauf induzierte. Die gemessenen Virustiter in Leber und Serum waren mindestens 10.000-mal größer als im hier erarbeiteten Modell. Die Wirkung des erprobten Medikaments war dadurch umso eindrucksvoller, als dass bei vielen Tieren bereits kurze Zeit nach der Gabe von BCV überhaupt keine replizierenden Viren mehr nachweisbar waren. Die replikationsinhibierende Wirkung des Nukleotidanalogs war anscheinend so stark, dass die Virusvermehrung entscheidend gestört werden konnte. Dadurch konnten auch sehr schwere Infektionen binnen kurzer Zeit kuriert werden, ohne eine Behandlung einer Begleit- oder Primärerkrankung zu unterbrechen (92). Im humanen Versuch zeigte sich ein ähnliches Bild. Patienten, die eine virologische Antwort auf BCV entwickelten, kurierten die Infektion innerhalb von Wochen aus. Todesfälle in dieser Gruppe basierten nur noch in Ausnahmen auf der Infektion selbst, vielmehr waren andere Faktoren ausschlaggebend. Allerdings gab es eine nicht näher bezifferte Gruppe von Patienten, bei denen die Behandlung nicht anschlug (10).

Für die Behandlung von Patienten mit allogenen T-Zellen standen nur sehr wenige Daten zur Verfügung. In zwei kürzlich publizierten Studien wurden jeweils kleine Zahlen von Patienten mit multireaktiven T-Zellen, die die Epitope verschiedener Viren erkannten, behandelt. Diese Patienten waren i.d.R. zuvor durch eine erfolglose Behandlung mit CDV gegangen. Beinahe alle Patienten zeigten eine vollständige Antwort auf die Behandlung mit antiviralen T-Zellen und blieben mehrere Monate virusfrei. Allerdings erhöhte sich das Risiko für die Reaktivierung einer anderen persistenten Infektion, die nicht von den verabreichten T-Zellen bekämpft wurde, und das Risiko für eine Abstoßungsreaktion. Die Produktionszeiträume für eine ausreichende Menge Zellen lag zwischen 10 und 35 d, die Ausbeute an Zellpopulationen, die auch gegen alle Epitope reaktiv waren, wie es erwartet wurde, war relativ gering (210,211). All diese beschriebenen Fälle hatten eine Gemeinsamkeit: eine sehr schwere Infektion wurde beinahe vollständig auskuriert, falls der Patient ein *Responder* für die gewählte Therapie war. Dem gegenüber steht nun die neu entwickelte Therapiemöglichkeit, die den Mechanismus der antiviralen RNAi ausnutzt. Die natürliche RNAi ist dabei keineswegs ein Mechanismus, der Genexpression vollständig ausschaltet, sondern eher für die Feinabstimmung zuständig. So ist es verständlich, dass auch bei sehr starker Expression keine vollständige Inhibierung einer viralen Replikation stattfinden kann. Im vorliegenden Experiment zeigte sich eine Verringerung der viralen Last von einer Behandlungswürdigen Infektion auf ein als ungefährlich betrachtetes Niveau. Bedenkt man die exponentielle Vervielfältigung von Viren ist dies bereits ein beachtlicher Erfolg. Es bleibt zu analysieren, bis zu welchem Schweregrad der Infektion eine Therapie mit amiR-Ad möglich und sinnvoll ist. Hierfür wäre ein Dosisescalationsexperiment mit variabler Infektionsdosis von Nöten. Ein weiterer Vorteil könnte darin liegen, dass bei höheren Virusbelastungen Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden untersuchten Vektoren auftreten könnten.

Perspektivisch sollte über die Kombination des Therapieansatzes mit anderen Strategien nachgedacht werden. Röger et al. zeigten eine Verringerung von Adenovirus-DNA in der Leber von Mäusen durch

die Virusrezeptorfalle sCAR um 65 % (205). Diese ist vor allem auf die verhinderte Infektion der Zelle durch Absättigung der Rezeptorbindestellen der Fiber zurückzuführen. Durch die Verschmelzung mit dem Fc-Teil von Immunglobulinen wird der Partikel für das Immunsystem opsoniert und von Makrophagen vernichtet. Für die Bekämpfung einer Infektion mit Coxsackievirus B3 wurde ein Ansatz beschrieben, der RNAi und die Gabe von sCAR vereinte. Es konnten additive Effekte der beiden Therapeutika nachgewiesen werden, welche sich positiv auf das Krankheitsbild auswirkten. Die viral induzierte Myokarditis wurde gemindert, die Anzahl der Viruspartikel im Herzen verringerte sich und die physiologischen Parameter der Herztätigkeit verbesserten sich (138). Eine Bekämpfung der adenoviralen Infektion gelang durch eine ähnliche Kombinationstherapie aus sCAR, einem siRNA-Cocktail und CDV. Pozzutto et al. konnten zeigen, dass diese Mischung die Replikation *in vitro* um 99,7 % inhibierte (137). Eine solche Verbindung mit amiRs statt siRNAs könnte in einem permissiven Tiermodell zu weiterer Verringerung der Viruslast führen.

Auch eine Veränderung der Darreichungsform der amiRs sollte überdacht werden. Potentiell wäre es auch möglich, nicht-virale Vektoren zu verwenden. Gerade im Hinblick auf ein späteres Zulassungsverfahren könnte beispielsweise eine Applikation per Nanopartikel eine höhere Akzeptanz finden (142,212). Darüber hinaus könnte die Expression stärker auf das Zielorgan Leber zugeschnitten werden. Hierfür kann ein organspezifischer Promoter verwendet werden und zusätzlich ein *Detargeting* mit Hilfe von Zielsequenzen endogener miRNAs vorgenommen werden. Die Zielsequenzen von miRNAs, die in anderen stark transduzierten Organen (z.B. Herz oder Gehirn), häufig exprimiert werden, können in die Transgenkassette eingebracht werden und verhindern dadurch die Expression der amiRs in anderen Organen als der Leber (131).

6. Zusammenfassung

Infektionen mit humanen Adenoviren verlaufen meist mild und sind nach wenigen Wochen auskuriert. Vor allem die oberen Atemwege sind betroffen, abhängig vom Serotypen können sich auch andere Symptome ergeben. Liegt eine weitere Erkrankung vor, die mit einer natürlichen oder pharmakologisch induzierten Schwächung des Immunsystems einhergeht, z.B. nach Transplantationsprozeduren, verlaufen die Erkrankungen schwerer, Infektionen können disseminieren und das Risiko, an Multiorganversagen zu sterben, erhöht sich drastisch. Derzeit existiert keine Standardtherapie und die empfohlene Verabreichung von Nukleosidanaloga, intensivmedizinischer Betreuung und Palliativmedizin stellt keine befriedigende Option für die Betroffenen dar. Zwei besonders Erfolg versprechende Ansätze befinden sich noch in der Phase der Erforschung. Das Nukleotidanalogen Brincidofovir (BCV) durchlief kürzlich eine Phase-III-Studie, die zu positiven Ergebnissen kam. Sprachen Patienten binnen kurzer Zeit auf die Behandlung an, war die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie die Infektion überwinden konnten. In der Gruppe der *Non-Responder* waren weiterhin zahlreiche Todesfälle zu verzeichnen. Darüber hinaus wurden sehr eindrucksvolle Studien mit allogenen T-Zell-Spenden präsentiert. T-Zellen wurden von Spendern isoliert, *ex vivo* für Adenovirus-Epitope geprimt und expandiert. Anschließend wurden sie dem Patienten infundiert. Mit Hilfe dieses Ansatzes war es möglich, teilweise multiple Infektionen verschiedener Viren gleichzeitig erfolgreich zu behandeln. Auch hier gab es kein vollständiges Ansprechen aller eingeschlossenen Patienten auf die Therapie, unter den Respondern waren die Aussichten auf Heilung sehr gut. Bemühungen, die Verfügbarkeit der T-Zellen als „Off-the-shelf-Produkte“ zu erhöhen, sowie die Produktionszeiträume und –kosten zu senken, werden intensiv verfolgt.

In einem anderen Ansatz wurde das Prinzip der RNA Interferenz ausgenutzt, um die virale Replikation zu unterbinden. Spezifische siRNAs wurden entwickelt, die ihre Zielsequenz in den mRNAs verschiedener, essentieller, viraler Gene hatten. Bei Anwesenheit von mRNA und siRNA, wurde die Translation des viralen Proteins inhibiert, indem die mRNA abgebaut wurde. Erste *in vitro*-Studien unterstrichen das hohe Potential des Ansatzes. Besonders auffällig war die Inhibierung der Replikation von hAd5 durch den Einsatz von sechs miteinander verketteten Expressionsumgebungen einer amiR, die die Expression von pTP regulierte. Mit Hilfe eines adenoviralen Vektors konnte die Bildung neuer Virionen *in vitro* um 97,6 % vermindert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden publizierte siRNA-, shRNA- oder amiR-Sequenzen zum Teil minimal verändert, um mit Hilfe der Expressionsumgebung der natürlichen miR-155 bereitgestellt werden zu können. Neun verschiedene amiRs mit Zielsequenzen in den mRNAs von fünf viralen Genen wurden erstellt und ihr Potential zur Inhibierung der Adenovirus-Replikation untersucht. Nach eingehender Analyse der Vektoren mit einer Kopie einer amiR-Expressionsumgebung wurden diverse Kombinationsvektoren erstellt, die gleichzeitig amiRs gegen pTP und / oder E1A exprimierten. Zwei der unterschiedlich konfigurierten Vektoren erwiesen sich als ähnlich hilfreich in Hinblick auf die Verringerung der Virusreplikation und der Verbesserung der Viabilität infizierter Zellen. Der eine Vektor entsprach weitestgehend dem von Ibrisimovic et al. vorgestellten, welcher sechs Kopien der amiR-pTP exprimierte. Die amiR-pTP wurde aus dieser Arbeit übernommen und war auch nach Expression von scAAV2-Vektoren, statt von adenoviralen Vektoren, weiterhin sehr effizient. Der andere Vektor exprimierte neben drei Kopien amiR-pTP noch drei weitere Kopien amiR-E1A_2. Sowohl hinsichtlich der Virusreplikation als auch der Viabilität unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Vektoren nicht signifikant voneinander. Sie wurden ausgewählt, in einem immunsupprimierten, permissiven Tiermodell auf ihr Potential zur Virusinhibierung untersucht zu werden.

An Hand der verfügbaren Daten aus der Literatur wurde ein Modell Syrischer Hamster entwickelt, welche pharmakologisch immunsupprimiert wurden. Sie wurden prophylaktisch mit scAAV2/9-amiR-Ad (6x) transduziert und eine Woche später mit hAd5 infiziert. Analysen zeigten eine disseminierte Infektion mit replizierenden Viren in Serum, Leber, Herz und in geringen Mengen in der Milz. Der Gewebeschaden war sehr gering, ca. 5 – 10 % der Leberzellen waren infiziert. Daraus resultierend waren keine gewebetoxischen Effekte zu beobachten. Durch den Einsatz beider amiR-Ad-Vektoren wurde die Infektion auf ein Maß reduziert, das als klinisch unbedenklich betrachtet wird. Ähnlich wie schon in den *in vitro*-Studien konnten nur wenige Unterschiede zwischen den beiden Vektoren gefunden werden. Einzig die immunhistologischen Schnitte legten eine stärkere Wirkung des Vektors nahe, der sowohl amiR-pTP als auch amiR-E1A_2 exprimierte. Es konnte also experimentell belegt werden, dass drei Expressionsumgebungen von amiR-pTP kombiniert mit drei weiteren für amiR-E1A_2 eine Verringerung der Virusinfektion induzierten, die in Bezug auf die Reduktion von Virusnachkommen in Leber und Serum, der Reduktion viraler DNA in der Leber und auch in der Bewertung der pathologischen Gewebeschäden die größten Verbesserungen gegenüber nicht behandelten Kontrollen zeigten.

Die signifikante Verringerung der Infektion kann zukünftig beispielsweise durch die Kombination mit anderen therapeutischen Ansätzen. So würde eine hAd5-Infektion auf mehreren Ebenen attackiert. Bereits vor dem Zelleintritt könnten mit Hilfe einer löslichen Virusrezeptorfalle Viruspartikel gebunden werden, welche dann nicht mehr für eine Infektion zur Verfügung stünden. Gemeinsam mit der Reduktion der Replikation der verbliebenen Viren durch amiR-Ad-induzierte RNAi würde der Effekt idealerweise stärker reduziert als durch die Einzelkomponenten allein. Beide Therapien zeichneten sich tierexperimentell durch die Abwesenheit von Nebenwirkungen aus.

Im Bereich der Behandlungen, die bereits stärker erforscht worden sind – BCV und T-Zell-Transplantation, sind enorme Fortschritte gemacht worden. Beide Ansätze zeigten aber Lücken, wiesen Patientengruppen aus, die darauf nicht ansprachen, und waren z.T. mit Nebenwirkungen verbunden, die ihrerseits schwerwiegende Konsequenzen darstellten. Mit der Erforschung der antiviralen RNAi wird ein weiterer konsequenter Schritt in die Richtung einer gut verträglichen Therapie mit breiter Anwendungsbasis unternommen. Das Wirkprinzip konnte in dieser Studie eindrucksvoll demonstriert werden, viele weitere Aspekte können in zukünftigen näher beleuchtet werden, um sowohl das Tiermodell zu verbessern als auch die Möglichkeiten der Anwendung von Kombinationstherapien zu erforschen.

7. Summary

Human Adenoviruses usually cause mild infections and are cleared by the immune system within a few weeks. In most cases, the upper respiratory tract is affected; depending on the serotype other symptoms may additionally occur. In presence of another disease that causes a depletion of the immune system, e.g. after transplantation procedures, infections can cause more serious symptoms, spread over the body, and the risk to die from multi-organ failure increases drastically. These days, there is no agreement on a standard therapy, while the recommended administration of nucleotide analogs, hospitalization in intensive care units and palliative care do not present a satisfying option. Two rather promising approaches are still being tested. The nucleotide analog Brincidofovir (BCV) was recently evaluated in phase III clinical trial. First positive results were published stating a high probability for virus clearance if the patient quickly responded to therapy. Among the non-responders several deaths occurred due to the infections, whereas deaths among responders were usually due to other causes.

Impressive studies exploiting allogenic T-cell transplantation were presented as well. T-cells were isolated from donors, primed and expanded *ex vivo*, and finally infused to infected patients. Using this approach, multiple concomitant virus infections could be treated at the same time. However, there were patients who did not respond to the therapy, whereas among the responders chances for complete clearance of the infection were very good. These days, measurements are taken to reduce time and costs of production and to facilitate T-cells as “off the shelf” therapy.

Viral infections can also be inhibited based on the principle of RNAi. Sequence-specific siRNAs finding their target sites within different crucial viral mRNAs have been developed. In presence of both, mRNA and siRNA, the translation of the viral protein is inhibited by degradation of the mRNA. Several *in-vitro* studies underlined the efficacy of that approach. Especially remarkable was the inhibition of hAd5 replication by concatemerization of six expression cassettes of an amiR targeting pTP. Using an adenoviral vector assembly of new virions could be inhibited by 97.6 %.

In this study, the published sequences of anti-adenoviral siRNAs, shRNAs or amiRs were altered to fit the amiR-expression cluster mimicking the natural environment of miR-155. Nine different amiRs were designed to find their respective target sites in the mRNAs of five adenoviral mRNAs, and their potential to inhibit viral replication was evaluated. After careful analysis of the efficacy of single-copy amiR-vectors combinations of amiR-expression clusters were designed to enhance the efficiency. The new vectors expressed amiR-pTP and / or amiR-E1A_2 concomitantly; they differed in their respective configuration of expression cassettes. Two of them proved exceptionally potency regarding inhibition of virus replication and improvement of cell viability of infected cultures. One of them contained six copies of amiR-pTP as published by Ibrisimovic et al.; the other expressed three copies of amiR-pTP and another three of amiR-E1A_2. The results obtained from both vectors never showed statistically significant differences between each other. They were chosen to be evaluated for their inhibition capability in an immunosuppressed, permissive animal model.

According to literature data, a Syrian hamster model was established. Concomitant to pharmacologic suppression of the immune system, they were transduced with scAAV2/9-amiR Ad (6x), and two weeks thereafter infected with hAd5. Analyses showed a disseminated infection with replicating particles in serum, liver, heart and spleen one week *p.i.* The pathologic damage of liver tissue was minor, as only 5 – 10 % of the cells were infected resulting in no visible toxic effects on the tissue. The administration

of either one of the two vectors reduced the infection to a level that is considered clinically unremarkable. Similar to the *in vitro*-experiments, the differences in between the vectors were negligible, except for the immunohistochemistry, in which the vector targeting pTP and E1A performed slightly better. These results suggest that the combination of three expression cassettes of amiR-pTP and amiR-E1A_2 induced an inhibition of hAd5-infection detectable on the level of virus titer in liver and serum, viral DNA in and histopathologic assessment of liver tissue was superior to the treatment with the previously published vector target pTP, exclusively.

The proposed therapy may be combined with others, e.g. the virus receptor trap sCar, resulting in an attack on the infection on multiple levels. The receptor trap prevents viruses from cell entry by binding the cell attachment receptors and presenting them to immune cells via its Fc portion. Given the additional reduction of virus replication based on RNAi, the effect on virus replication and infection treatment might ideally be higher than caused by single approach treatments. In addition to their high efficacy, both therapies did not induce adverse events during animal trials.

Among the more researched treatments using BCV or T-cells, enormous progress has been made. On the other hand, both approaches could not be presented to be flawless. There were patients not responding during clinical trials, and sometimes adverse events occurred, presenting serious problems themselves. Further investigation of RNAi as a potential antiviral therapy is another important step towards a well tolerable therapy with a broad spectrum of applications. This study serves as a proof-of-principle examination of the potential of antiviral RNAi *in vivo*; many more aspects should be scope of future projects improving the underlying animal model as well as the potential implementation of combined therapies.

8. Anhang

8.1. Literaturverzeichnis

1. Freimüller C, Stemberger J, Artwohl M, Germeroth L, Witt V, Fischer G, et al. Selection of adenovirus-specific and Epstein-Barr virus-specific T cells with major histocompatibility class I streptamers under Good Manufacturing Practice (GMP)-compliant conditions. *Cytotherapy*. 2015;17(7):989–1007.
2. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953 Dec;84(3):570–3.
3. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 2000 Nov;81(Pt 11):2573–604.
4. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):441–62.
5. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, Dela Cruz WP, Riedel B, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):5978–84.
6. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):704–15.
7. Florescu DF, Pergam S a., Neely MN, Qiu F, Johnston C, Way S, et al. Safety and Efficacy of CMX001 as Salvage Therapy for Severe Adenovirus Infections in Immunocompromised Patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(5):731–8.
8. Kampmann B, Cubitt D, Walls T, Naik P, Depala M, Samarasinghe S, et al. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(4):595–603.
9. Ganzenmueller T, Buchholz S, Harste G, Dammann E, Trenchel R, Heim A. High lethality of human adenovirus disease in adult allogeneic stem cell transplant recipients with high adenoviral blood load. *J Clin Virol*. 2011 Sep;52(1):55–9.
10. Chimerix Announces Presentation at IDWeek™ of Detailed 24-Week Results from AdVise Trial of Brincidofovir for the Treatment of Adenovirus Infection in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplant Recipients (NASDAQ:CMRX) [Internet]. 2016.
11. van Oostrum J, Burnett RM. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J Virol*. 1985 Nov;56(2):439–48.
12. Anderson CW. The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions. *Virology*. 1990 Jul;177(1):259–72.
13. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*. 2009;90(1):1–20.
14. Home RW, Brenner S, Waterson AP, Wildy P. The icosahedral form of an adenovirus. *J Mol Biol*. 1959;1(1):84–IN15.
15. Valentine RC, Pereira HG. Antigens and structure of the adenovirus. *J Mol Biol*. 1965 Aug;13(1):13–20.
16. Colby WW, Shenk T. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. *J Virol*. 1981 Sep;39(3):977–80.

17. Rux JJ, Burnett RM. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *Mol Ther*. 2000 Jan;1(1):18–30.
18. Cepko CL, Sharp PA. Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a nonvirion protein. *Cell*. 1982 Dec;31(2 Pt 1):407–15.
19. Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell*. 2005 Jan 7;17(1):121–35.
20. van Raaij MJ, Mitraki A, Lavigne G, Cusack S. A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature*. 1999 Oct 28;401(6756):935–8.
21. Xia D, Henry LJ, Gerard RD, Deisenhofer J. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure*. 1994 Dec 15;2(12):1259–70.
22. Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther*. 2004 Dec;15(12):1167–76.
23. Smith TAG, Idamakanti N, Rollence ML, Marshall-Neff J, Kim J, Mulgrew K, et al. Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther*. 2003 May 20;14(8):777–87.
24. Mitraki A, Miller S, van Raaij MJ. Review: conformation and folding of novel beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple beta-spiral and triple beta-helix. *J Struct Biol*. 137(1–2):236–47.
25. Wu E, Pache L, Von Seggern DJ, Mullen T-M, Mikyas Y, Stewart PL, et al. Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol*. 2003 Jul;77(13):7225–35.
26. Chiu CY, Mathias P, Nemerow GR, Stewart PL. Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6759–68.
27. Stewart PL, Chiu CY, Huang S, Muir T, Zhao Y, Chait B, et al. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J*. 1997 Mar 17;16(6):1189–98.
28. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993 Apr 23;73(2):309–19.
29. Matthews DA, Russell WC. Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J Gen Virol*. 1995 Aug;76 (Pt 8):1959–69.
30. Russell WC, Precious B. Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides. *J Gen Virol*. 1982 Nov;63 (Pt 1):69–79.
31. Anderson CW, Young ME, Flint SJ. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology*. 1989 Oct;172(2):506–12.
32. Sung MT, Cao TM, Coleman RT, Budelier KA. Gene and protein sequences of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 May;80(10):2902–6.
33. Blair GE, Russell WC. Identification of a protein kinase activity associated with human adenoviruses. *Virology*. 1978 May 1;86(1):157–66.

34. Tsuzuki J, Luftig RB. An unexpected effect of divalent cations on the adenovirus endogenous protein kinase: alteration in the specificity of phosphorylation. *Virus Res.* 1985 Mar;2(2):95–105.
35. Ostapchuk P, Hearing P. Control of adenovirus packaging. *J Cell Biochem.* 2005;96:25–35.
36. Rekosh DM, Russell WC, Bellet AJ, Robinson AJ. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell.* 1977 Jun;11(2):283–95.
37. Ruben M, Bacchetti S, Graham F. Covalently closed circles of adenovirus 5 DNA. *Nature.* 1983 Jan 13;301(5896):172–4.
38. Fechner H, Haack a, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, et al. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* 1999;6(9):1520–35.
39. Coyne CB, Bergelson JM. CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005 Apr 25;57(6):869–82.
40. Philipson L, Pettersson RF. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;273:87–111.
41. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Liszewski MK, Atkinson JP, Lieber A. Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus. *J Virol.* 2005 Jun;79(12):7503–13.
42. Short JJ, Pereboev A V, Kawakami Y, Vasu C, Holterman MJ, Curiel DT. Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology.* 2004 May 1;322(2):349–59.
43. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, et al. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell.* 2008;132(3):397–409.
44. Dehecchi MC, Melotti P, Bonizzato A, Santacatterina M, Chilosi M, Cabrini G. Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol.* 2001 Sep;75(18):8772–80.
45. Mathias P, Wickham T, Moore M, Nemerow G. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6811–4.
46. Li E, Stupack D, Bokoch GM, Nemerow GR. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):8806–12.
47. Li E, Stupack D, Klemke R, Cheresch DA, Nemerow GR. Adenovirus endocytosis via alpha(v) integrins requires phosphoinositide-3-OH kinase. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):2055–61.
48. Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):477–86.
49. Smith JG, Silvestry M, Lindert S, Lu W, Nemerow GR, Stewart PL. Insight into the Mechanisms of Adenovirus Capsid Disassembly from Studies of Defensin Neutralization. Sherry B, editor. *PLoS Pathog.* 2010 Jun 24;6(6):e1000959.
50. Smith JG, Nemerow GR. Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human α -Defensins. *Cell Host Microbe.* 2008 Jan 17;3(1):11–9.

51. Snijder J, Reddy VS, May ER, Roos WH, Nemerow GR, Wuite GJL. Integrin and Defensin Modulate the Mechanical Properties of Adenovirus. *J Virol.* 2013 Mar 1;87(5):2756–66.
52. Alemany R, Curiel DT, Suzuki K. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol.* 2000 Nov 1;81(11):2605–9.
53. Mok H, Palmer D, Ng P, Barry M. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol Ther.* 2005 Jan;11(1):66–79.
54. Muruve DA. The Innate Immune Response to Adenovirus Vectors. *Hum Gene Ther.* 2004 Dec;15(12):1157–66.
55. Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, Libermann TA. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther.* 1999 Apr 10;10(6):965–76.
56. Otake K, Ennist DL, Harrod K, Trapnell BC. Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses. *Hum Gene Ther.* 1998 Oct 10;9(15):2207–22.
57. Zsengellér Z, Otake K, Hossain SA, Berclaz PY, Trapnell BC. Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J Virol.* 2000 Oct;74(20):9655–67.
58. Higginbotham JN, Seth P, Blaese RM, Ramsey WJ. The Release of Inflammatory Cytokines from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *In Vitro* Following Exposure to Adenovirus Variants and Capsid. *Hum Gene Ther.* 2002 Jan 1;13(1):129–41.
59. Rafii S, Dias S, Meeus S, Hattori K, Ramachandran R, Feuerback F, et al. Infection of endothelium with E1(-)E4(+), but not E1(-)E4(-), adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ Res.* 2001 May 11;88(9):903–10.
60. Stark JM, Amin RS, Trapnell BC. Infection of A549 cells with a recombinant adenovirus vector induces ICAM-1 expression and increased CD-18-dependent adhesion of activated neutrophils. *Hum Gene Ther.* 1996 Sep 10;7(14):1669–81.
61. Cerullo V, Seiler MP, Mane V, Brunetti-Pierri N, Clarke C, Bertin TK, et al. Toll-like Receptor 9 Triggers an Innate Immune Response to Helper-dependent Adenoviral Vectors. *Mol Ther.* 2007 Feb;15(2):378–85.
62. Appledorn DM, Patial S, McBride A, Godbehere S, Van Rooijen N, Parameswaran N, et al. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):2134–44.
63. Doronin K, Flatt JW, Di Paolo NC, Khare R, Kalyuzhniy O, Acchione M, et al. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science.* 2012 Nov 9;338(6108):795–8.
64. Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and Nonself-Recognition by C-Type Lectins on Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2004 Apr;22(1):33–54.

65. Cerliani JP, Stowell SR, Mascanfroni ID, Arthur CM, Cummings RD, Rabinovich GA. Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: galectins and glycans in innate immunity. *J Clin Immunol*. 2011 Feb 24;31(1):10–21.
66. Trinh H V, Grossmann J, Gehrig P, Roschitzki B, Schlapbach R, Greber UF, et al. iTRAQ-Based and Label-Free Proteomics Approaches for Studies of Human Adenovirus Infections. *Int J Proteomics*. 2013;2013:581862.
67. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM. Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci*. 2012 Jun 26;109(26):10558–63.
68. Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM. Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 30;109(44):E3008-17.
69. Tibbles LA, Spurrell JCL, Bowen GP, Liu Q, Lam M, Zaiss AK, et al. Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. *J Virol*. 2002 Feb;76(4):1559–68.
70. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate Immune Mechanisms Dominate Elimination of Adenoviral Vectors Following *In Vivo* Administration. *Hum Gene Ther*. 1997 Jan 1;8(1):37–44.
71. Yang Y, Ertl HC, Wilson JM. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):433–42.
72. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4407–11.
73. Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, Beersma MFC, Claas ECJ, Veltrop-Duits L a, et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis*. 2005;191:520–30.
74. Aste-Amézaga M, Bett AJ, Wang F, Casimiro DR, Antonello JM, Patel DK, et al. Quantitative adenovirus neutralization assays based on the secreted alkaline phosphatase reporter gene: application in epidemiologic studies and in the design of adenovector vaccines. *Hum Gene Ther*. 2004 Mar;15(3):293–304.
75. Angeletti PC, Engler JA. Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *J Virol*. 1998 Apr;72(4):2896–904.
76. Fredman JN, Engler JA. Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro. *J Virol*. 1993 Jun;67(6):3384–95.
77. Kannabiran C, Morris GF, Labrie C, Mathews MB. The adenovirus E1A 12S product displays functional redundancy in activating the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *J Virol*. 1993 Jan;67(1):507–15.
78. Grand RJ, Turnell AS, Mason GG, Wang W, Milner AE, Mymryk JS, et al. Adenovirus early region 1A protein binds to mammalian SUG1-a regulatory component of the proteasome. *Oncogene*. 1999 Jan 14;18(2):449–58.

79. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 1996 Feb 15;10(4):461–77.
80. Hay RT, Freeman A, Leith I, Monaghan A, Webster A. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;199 (Pt 2):31–48.
81. Bennett EM, Bennink JR, Yewdell JW, Brodsky FM. Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5049–52.
82. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol.* 1996 Apr;70(4):2296–306.
83. Halbert DN, Cutt JR, Shenk T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.* 1985 Oct;56(1):250–7.
84. Backström E, Kaufmann KB, Lan X, Akusjärvi G. Adenovirus L4-22K stimulates major late transcription by a mechanism requiring the intragenic late-specific transcription factor-binding site. *Virus Res.* 2010;151(2):220–8.
85. Lutz P, Kedinger C. Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J Virol.* 1996;70(3):1396–405.
86. Jogler C, Hoffmann D, Theegarten D, Grunwald T, Überla K, Wildner O. Replication Properties of Human Adenovirus In Vivo and in Cultures of Primary Cells from Different Animal Species. *J Virol.* 2006;80(7):3549–58.
87. Prince GA, Porter DD, Jenson AB, Horswood RL, Chanock RM, Ginsberg HS. Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J Virol.* 1993 Jan;67(1):101–11.
88. Sonabend AM, Ulasov I V, Han Y, Rolle CE, Nandi S, Cao D, et al. Biodistribution of an oncolytic adenovirus after intracranial injection in permissive animals: a comparative study of Syrian hamsters and cotton rats. *Cancer Gene Ther.* 2009 Apr;16(4):362–72.
89. Ternovoi V V, Le LP, Belousova N, Smith BF, Siegal GP, Curiel DT. Productive replication of human adenovirus type 5 in canine cells. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):1308–11.
90. Hjorth RN, Bonde GM, Pierzchala WA, Vernon SK, Wiener FP, Levner MH, et al. A new hamster model for adenoviral vaccination. *Arch Virol.* 1988;100(3–4):279–83.
91. Thomas MA. Syrian Hamster as a Permissive Immunocompetent Animal Model for the Study of Oncolytic Adenovirus Vectors. *Cancer Res.* 2006;66(3):1270–6.
92. Toth K, Spencer JF, Dhar D, Sagartz JE, Buller RML, Painter GR, et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(20):7293–7.
93. WY Ip W, Qasim W. Management of Adenovirus in Children after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Adv Hematol.* 2013;2013(Table 1):1–12.
94. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev Med Virol.* 18(6):357–74.

95. Legrand F, Berrebi D, Houhou N, Freymuth F, Faye A, Duval M, et al. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Mar;27(6):621–6.
96. Sellar RS, Peggs KS. Management of multidrug-resistant viruses in the immunocompromised host. *Br J Haematol*. 2012 Mar;156(5):559–72.
97. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, Matthes-Martin S, Einsele H, Bleakley M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(6):481–6.
98. Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, Wagner J, Filicko J, Ferber A, et al. Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jan;13(1):74–81.
99. Lankester AC, Heemskerk B, Claas ECJ, Schilham MW, Beersma MFC, Bredius RGM, et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis*. 2004 Jun 1;38(11):1521–5.
100. Feucht J, Opherk K, Lang P, Kayser S, Hartl L, Bethge W, et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. *Blood*. 2015 Mar 19;125(12):1986–94.
101. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, Lion T, Fuhrer M, Hamprecht K, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2006;134:64–76.
102. Wold WSM, Dvm KT, Wold WSM, Toth K. Expert Opinion on Pharmacotherapy New drug on the horizon for treating adenovirus New drug on the horizon for treating adenovirus. 2015;6566(December):12–7.
103. Tischer S, Priesner C, Heuft H-G, Goudeva L, Mende W, Barthold M, et al. Rapid generation of clinical-grade antiviral T cells: selection of suitable T-cell donors and GMP-compliant manufacturing of antiviral T cells. *J Transl Med*. 2014;12(1):336.
104. Themeli M, Rivière I, Sadelain M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy. *Cell Stem Cell*. 2015 Apr 2;16(4):357–66.
105. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806–11.
106. All Nobel Prizes in Physiology or Medicine [Internet]. 2016.
107. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*. 2006 Jul 7;313(5783):68–71.
108. Aliyari R, Wu Q, Li H-W, Wang X-H, Li F, Green LD, et al. Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host Microbe*. 2008 Oct 16;4(4):387–97.
109. Maillard P V., Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, et al. Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells. *Science* (80-). 2013;342(6155):235–8.

110. Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding S-W. RNA Interference Functions as an Antiviral Immunity Mechanism in Mammals. *Science* (80-). 2013;342(6155):231–4.
111. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Apr;12(4):246–58.
112. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411(6836):494–8.
113. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209–16.
114. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199–208.
115. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001 Jan 15;15(2):188–200.
116. Okamura K, Lai EC. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Sep;9(9):673–8.
117. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
118. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957–66.
119. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
120. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016–27.
121. Bollman KM, Aukerman MJ, Park M-Y, Hunter C, Berardini TZ, Poethig RS. HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*. 2003 Apr;130(8):1493–504.
122. Liu YP, Berkhout B. MiRNA cassettes in viral vectors: Problems and solutions. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2011;1809(11–12):732–45.
123. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005 Mar;3(3):e85.
124. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010 Sep;11(9):597–610.
125. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Acids*. 2015;4(9):e252.
126. Borel F, van Logtenstein R, Koornneef A, Maczuga P, Ritsema T, Petry H, et al. In vivo knock-down of multidrug resistance transporters ABCC1 and ABCC2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs. *J RNAi Gene Silenc*. 2011;7(1):434–42.
127. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):537–41.

128. Gurlevik E, Woller N, Schache P, Malek NP, Wirth TC, Zender L, et al. p53-dependent antiviral RNA-interference facilitates tumor-selective viral replication. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(12):e84–e84.
129. Zhang W, Kong G, Zhang J, Wang T, Ye L, Zhang X. MicroRNA-520b inhibits growth of hepatoma cells by targeting MEKK2 and cyclin D1. *PLoS One.* 2012;7(2):e31450.
130. Kato M, Wang L, Putta S, Wang M, Yuan H, Sun G, et al. Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF- β -induced collagen expression in kidney cells. *J Biol Chem.* 2010 Oct 29;285(44):34004–15.
131. Geisler a, Jungmann a, Kurreck J, Poller W, Katus H a, Vetter R, et al. microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther.* 2011;18(May 2010):199–209.
132. Kelly EJ, Hadac EM, Greiner S, Russell SJ. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med.* 2008 Nov;14(11):1278–83.
133. Kim D-S, Nam J-H. Application of attenuated coxsackievirus B3 as a viral vector system for vaccines and gene therapy. *Hum Vaccin.* 2011 Apr;7(4):410–6.
134. Ibrišimović M, Kneidinger D, Lion T, Klein R. An adenoviral vector-based expression and delivery system for the inhibition of wild-type adenovirus replication by artificial microRNAs. *Antiviral Res.* 2013;97(1):10–23.
135. Kneidinger D, Ibrišimović M, Lion T, Klein R. Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery. *Antiviral Res.* 2012;94(3):195–207.
136. Eckstein A, Gröbl T, Geisler A, Wang X, Pinkert S, Pozzuto T, et al. Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res.* 2010;88:86–94.
137. Pozzuto T, Röger C, Kurreck J, Fechner H. Enhanced suppression of adenovirus replication by triple combination of anti-adenoviral siRNAs, soluble adenovirus receptor trap sCAR-Fc and cidofovir. *Antiviral Res.* 2015;120:72–8.
138. Stein EA, Pinkert S, Becher PM, Geisler A, Zeichhardt H, Klopffleisch R, et al. Combination of RNA interference and virus receptor trap exerts additive antiviral activity in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Infect Dis.* 2015 Feb 15;211(4):613–22.
139. Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. *Antiviral Res.* 2009;84(1):76–83.
140. Xiao S, Wang Q, Gao J, Wang L, He Z, Mo D, et al. Inhibition of highly pathogenic PRRSV replication in MARC-145 cells by artificial microRNAs. *Virol J.* 2011;8(1):491.
141. Zhang H, Tang X, Zhu C, Song Y, Yin J, Xu J, et al. Adenovirus-mediated artificial microRNAs targeting matrix or nucleoprotein genes protect mice against lethal influenza virus challenge. *Gene Ther.* 2015;(October 2014):1–10.
142. Chandra PK, Kundu AK, Hazari S, Chandra S, Bao L, Ooms T, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Mol Ther.* 2012 Sep;20(9):1724–36.

143. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 11;107(19):8800–5.
144. Zamora MR, Budev M, Rolfe M, Gottlieb J, Humar A, Devincenzo J, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 15;183(4):531–8.
145. NCT00658086 auf clinicaltrials.gov [Internet]. 2016.
146. Chung YS, Kim MK, Lee WJ, Kang C. Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. *Arch Virol*. 2007;152:1305–14.
147. Moreno-Montañés J, Sádaba B, Ruz V, Gómez-Guiu A, Zarranz J, González MV, et al. Phase I clinical trial of SYL040012, a small interfering RNA targeting β -adrenergic receptor 2, for lowering intraocular pressure. *Mol Ther*. 2014 Jan;22(1):226–32.
148. Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*. 2004 May;10(5):766–71.
149. Neuberger P, Kichler A. Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Adv Genet*. 2014;88:263–88.
150. Hu-Lieskovan S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):8984–92.
151. Wang W, Cai Y, Zhang G, Liu Y, Sui H, Park K, et al. Sophoridine-loaded PLGA microspheres for lung targeting: preparation, in vitro, and in vivo evaluation. *Drug Deliv*. 2016 Sep 30;1–7.
152. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*. 2006 Aug 10;114(1):100–9.
153. Juffermans LJM, Meijering BDM, Henning RH, Deelman LE. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of small interfering RNA into primary endothelial cells is more effective than delivery of plasmid DNA. *Ultrasound Med Biol*. 2014 Mar;40(3):532–40.
154. Eefting D, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, Kaijzel EL, Que I, et al. Prolonged in vivo gene silencing by electroporation-mediated plasmid delivery of small interfering RNA. *Hum Gene Ther*. 2007 Sep;18(9):861–9.
155. Hibbert CS, Mirro J, Rein A. mRNA molecules containing murine leukemia virus packaging signals are encapsidated as dimers. *J Virol*. 2004 Oct;78(20):10927–38.
156. Cloyd MW. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Baron S, editor. Galveston (TX, USA): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
157. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):9873–80.
158. Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11382–8.

159. Naldini L, Blömer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):263–7.
160. Kafri T, Blömer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*. 1997 Nov;17(3):314–7.
161. Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol*. 1997 Sep;71(9):6641–9.
162. Agudo J, Ruzo A, Kitur K, Sachidanandam R, Blander JM, Brown BD. A TLR and non-TLR mediated innate response to lentiviruses restricts hepatocyte entry and can be ameliorated by pharmacological blockade. *Mol Ther*. 2012 Dec;20(12):2257–67.
163. Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med*. 1992 Oct 1;176(4):1125–35.
164. Yamagata Y, Parietti V, Stockholm D, Corre G, Poincignon C, Touleimat N, et al. Lentiviral transduction of CD34(+) cells induces genome-wide epigenetic modifications. *PLoS One*. 2012;7(11):e48943.
165. Li Z, Düllmann J, Schiedmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):497.
166. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008 Sep;118(9):3132–42.
167. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003 Oct 17;302(5644):415–9.
168. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):198–204.
169. Amalfitano A. Next-generation adenoviral vectors: new and improved. *Gene Ther*. 1999 Oct;6(10):1643–5.
170. Berkowitz RD, Hammarskjöld ML, Helga-Maria C, Rekosh D, Goff SP. 5' regions of HIV-1 RNAs are not sufficient for encapsidation: implications for the HIV-1 packaging signal. *Virology*. 1995 Oct 1;212(2):718–23.
171. Palmer DJ, Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2005 Jan;16(1):1–16.
172. Tao N, Gao GP, Parr M, Johnston J, Baradet T, Wilson JM, et al. Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther*. 2001 Jan;3(1):28–35.
173. Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*. 1999 Dec 17;286(5448):2244–5.
174. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [Internet]. 2016.

175. McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of Adeno-Associated Virus (AAV) and Recombinant AAV Vectors. *Annu Rev Genet.* 2004;38(1):819–45.
176. Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 2000 Mar;74(6):2777–85.
177. Johnson JS, Samulski RJ. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol.* 2009 Mar;83(6):2632–44.
178. Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol.* 1980 Feb;33(2):739–48.
179. Huser D, Gogol-Doring A, Chen W, Heilbronn R. Adeno-Associated Virus Type 2 Wild-Type and Vector-Mediated Genomic Integration Profiles of Human Diploid Fibroblasts Analyzed by Third-Generation PacBio DNA Sequencing. *J Virol.* 2014;88(19):11253–63.
180. Kaepffel C, Beattie SG, Fronza R, van Logtenstein R, Salmon F, Schmidt S, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med.* 2013;19(7):889–91.
181. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 1996 May;70(5):3227–34.
182. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 2001 Aug;8(16):1248–54.
183. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* 2003 Dec;10(26):2112–8.
184. Grimm D. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther.* 2003;7(6):839–50.
185. Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 2005 Mar 27;23(3):321–8.
186. Kotterman M a, Schaffer D V, Biology C. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2014;15(7):445–51.
187. Mingozzi F, Maus M V, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JEJ, et al. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):419–22.
188. Madsen D, Cantwell ER, O'Brien T, Johnson PA, Mahon BP. Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1. *J Gen Virol.* 2009 Nov;90(Pt 11):2622–33.
189. Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, et al. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol.* 2008 Jun;82(12):5887–911.
190. Lisowski L, Dane AP, Chu K, Zhang Y, Cunningham SC, Wilson EM, et al. Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature.* 2014 Feb 20;506(7488):382–6.

191. Maheshri N, Koerber JT, Kaspar BK, Schaffer D V. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol.* 2006 Feb;24(2):198–204.
192. Perabo L, Endell J, King S, Lux K, Goldnau D, Hallek M, et al. Combinatorial engineering of a gene therapy vector: directed evolution of adeno-associated virus. *J Gene Med.* 2006 Feb;8(2):155–62.
193. Mingozzi F, Anguela XM, Pavani G, Chen Y, Davidson RJ, Hui DJ, et al. Overcoming preexisting humoral immunity to AAV using capsid decoys. *Sci Transl Med.* 2013 Jul 17;5(194):194ra92.
194. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):342–7.
195. Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula E V, Vargas JA, Smith P, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther.* 2006 Sep;14(3):452–5.
196. Flotte TR, Zeitlin PL, Reynolds TC, Heald AE, Pedersen P, Beck S, et al. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther.* 2003 Jul 20;14(11):1079–88.
197. Marks WJ, Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, et al. Safety and tolerability of intraputaminally delivered CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 2008 May;7(5):400–8.
198. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet (London, England).* 2007 Jun 23;369(9579):2097–105.
199. Carlsson T, Björklund T, Kirik D. Restoration of the striatal dopamine synthesis for Parkinson's disease: viral vector-mediated enzyme replacement strategy. *Curr Gene Ther.* 2007 Apr;7(2):109–20.
200. Glybera, INN-alipogene tiparvovec [Internet]. 2012.
201. Sipo I, Hurtado Picó A, Wang X, Eberle J, Petersen I, Weger S, et al. An improved Tet-On regulatable FasL-adenovirus vector system for lung cancer therapy. *J Mol Med (Berl).* 2006;84(3):215–25.
202. Kraus, Milena (Technische Universität Berlin FAB. Entwicklung und Analyse antiadenoviraler artifizieller microRNAs. Technische Universität Berlin; 2015.
203. Ibršimović M, Lion T, Klein R. Combinatorial targeting of 2 different steps in adenoviral DNA replication by herpes simplex virus thymidine kinase and artificial microRNA expression for the inhibition of virus multiplication in the presence of ganciclovir. *BMC Biotechnol.* 2013;13:54.
204. Halldén G, Hill R, Wang Y, Anand A, Liu T-C, Lemoine NR, et al. Novel immunocompetent murine tumor models for the assessment of replication-competent oncolytic adenovirus efficacy. *Mol Ther.* 2003 Sep;8(3):412–24.

205. Röger C, Pozzuto T, Klopffleisch R, Kurreck J, Pinkert S, Fechner H. Expression of an engineered soluble coxsackievirus and adenovirus receptor by a dimeric AAV9 vector inhibits adenovirus infection in mice. *Gene Ther.* 2015;22(6):458–66.
206. Toth K, Spencer JF, Tollefson AE, Kuppaswamy M, Doronin K, Lichtenstein DL, et al. Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 2005 Jan;16(1):139–46.
207. Huan X-H, Lin Y-P, Gao T, Chen R-Y, Fan Y-M. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(9):1293–7.
208. Chang Y, Dou Y, Bao H, Luo X, Liu X, Mu K, et al. Multiple microRNAs targeted to internal ribosome entry site against foot-and-mouth disease virus infection in vitro and in vivo. *Virology.* 2014 Jan 6;11:1.
209. Osório L, Gijssbers R, Oliveras-Salvá M, Michiels A, Debysers Z, Van den Haute C, et al. Viral vectors expressing a single microRNA-based short-hairpin RNA result in potent gene silencing in vitro and in vivo. *J Biotechnol.* 2014 Jan;169:71–81.
210. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, Tzannou I, Liu H, Martinez C, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med.* 2014 Jun 25;6(242):242ra83.
211. Ma CKK, Blyth E, Clancy L, Simms R, Burgess J, Brown R, et al. Addition of varicella zoster virus-specific T cells to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus tri-specific T cells as adoptive immunotherapy in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* 2015;17(10):1406–20.
212. Scamporrin A, Polyak D, Krivitsky A, Satchi-Fainaro R. Achieving successful delivery of oligonucleotides - from physico-chemical characterization to in vivo evaluation. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):1294–309.
213. Schaar K, Geisler A, Kraus M, Pinkert S, Pryshliak M, Spencer JF, et al. Anti-adenoviral Artificial MicroRNAs Expressed from AAV9 Vectors Inhibit Human Adenovirus Infection in Immunosuppressed Syrian Hamsters. *Mol Ther Nucl Acids.* 2017 (8)

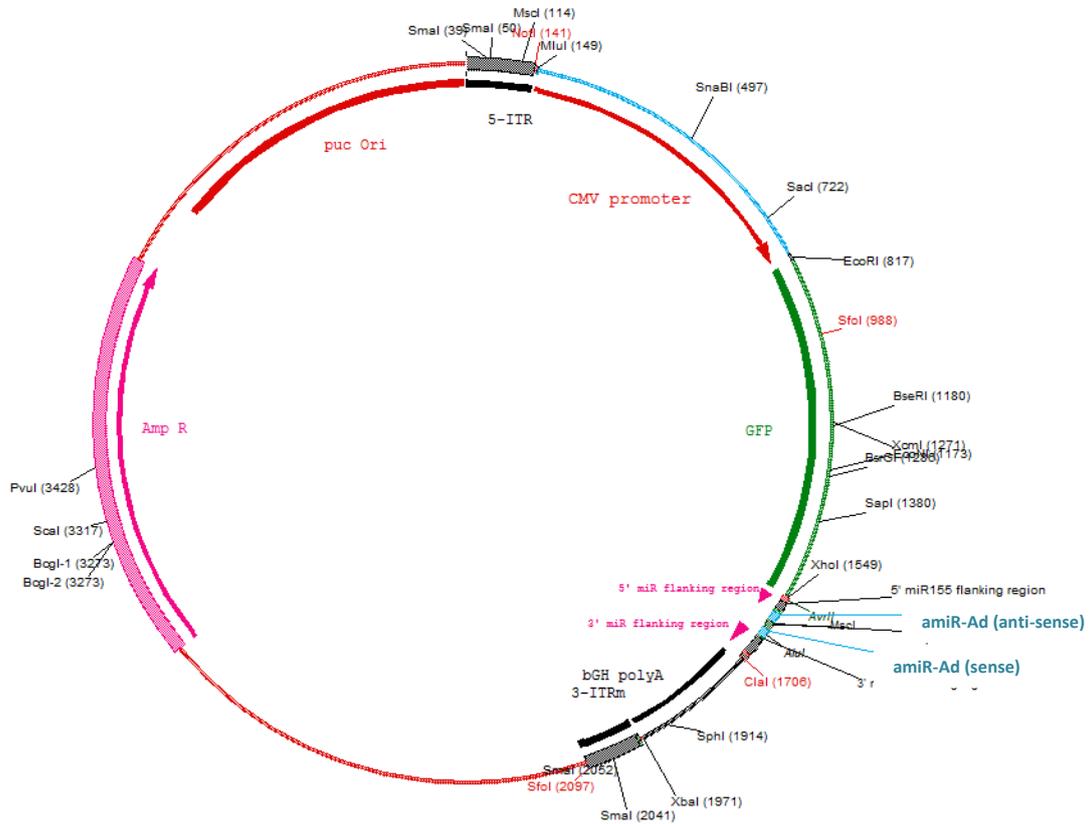
8.2. Verzeichnis eigener Publikationen

Schaar, K., Röger, C., Pozzuto, T., Kurreck, J., Pinkert, S., Fechner, H.: Biological antivirals for treatment of adenovirus infections; *Antiviral Therapies*, 2016; 21(7): 559-566. doi: 10.3851/IMP3047

Schaar, K., Geisler, A., Kraus, M., Kurreck, J., Toth, K., Klopffleisch, R., Wold, W.S., Fechner, H.: Anti-adenoviral artificial microRNAs expressed from AAV9 vectors inhibit disseminated human adenovirus infection in immunosuppressed Syrian hamsters, *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep 15;8:300-316. doi: 10.1016/j.omtn.2017.07.002. Epub 2017 Jul 8.

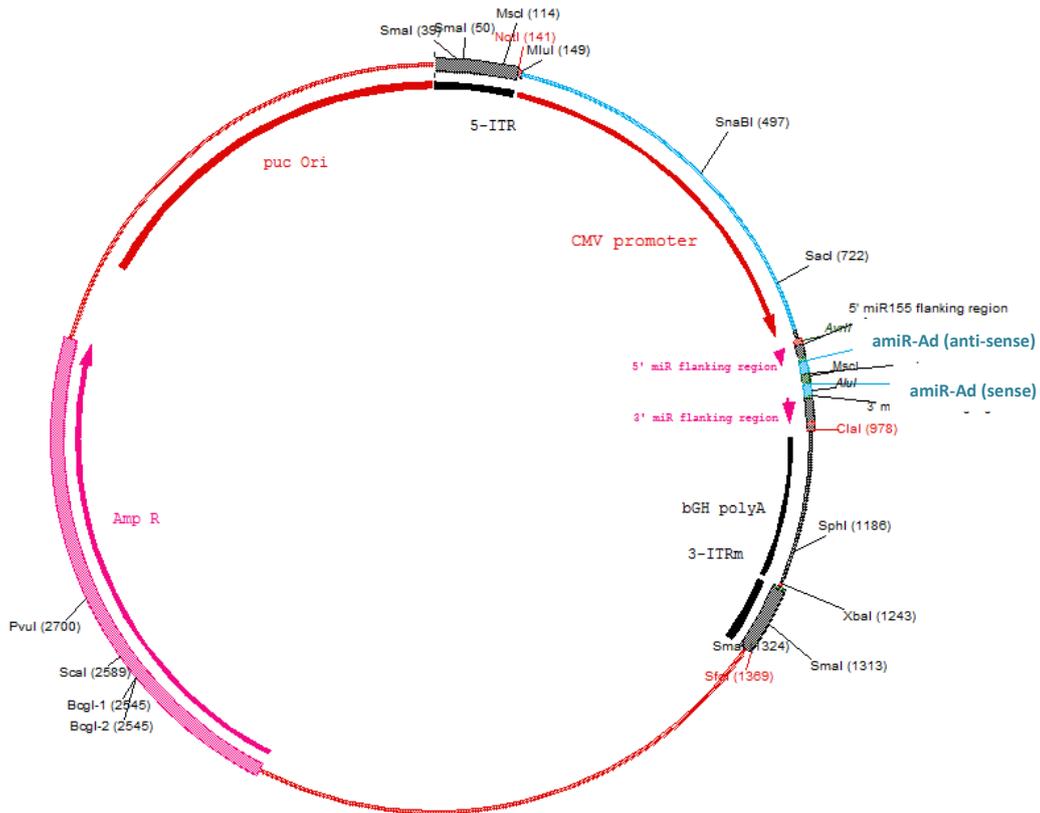
8.3. Plasmidkarten

pscAAV-GFP-amiR-Ad (1x)



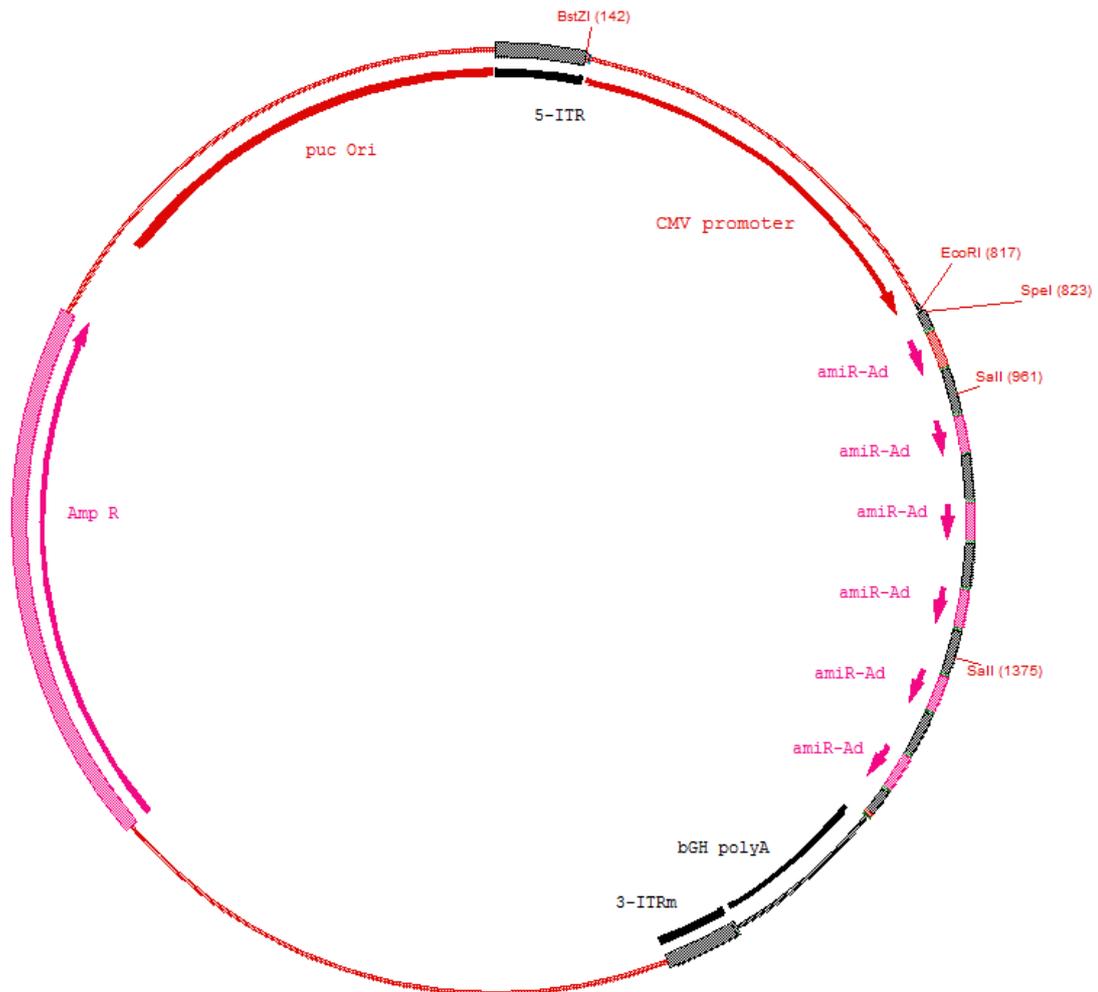
| amiR | Anti-sense Sequenz 5' – 3' | Sense Sequenz 5' – 3' |
|-------|---------------------------------|-----------------------------|
| E1A_1 | UUU ACA GCU CAA GUC CAA AGG | CCU UUG GA--U GAG CUG UAA A |
| E1A_2 | UAU UGC AUU CUC UAG ACA CAG | CUG UG--U AGA GAA UGC AAU A |
| E1A_3 | UCG GUA AUA ACA CCU CCG UGG | CCA CGG A--UG UUA UUA CCG A |
| E1A_4 | AAA AUC UGC GAA ACC GCC UCC | GGA GGC GGU-- CGC AGA UUU U |
| E1A_5 | AGU GAG UAA GUC AAU CCC UUC | GAA GGG AU--A CUU ACU CAC U |
| pTP | AAG AGA GUU CGA CAG AAU CAA | UUG AUU CU--C GAA CUC UCU U |
| Pol | UUG GAU GAU AUG GUU GGA CGC | GCG UCC AA--A UAU CAU CCA A |
| Iva2 | AUU UCU GGG AUC ACU AAC GUC GUC | GAC GUU AG--A UCC CAG AAA U |
| Hex | UUU CCA CUU GAC UUU CUA GCU | AGC UAG AA--U CAA GUG GAA A |

pscAAV-amiR-Ad (1x)



| amiR | Anti-sense Sequenz 5' – 3' | Sense Sequenz 5' – 3' |
|-------|---------------------------------|-----------------------------|
| E1A_1 | UUU ACA GCU CAA GUC CAA AGG | CCU UUG GA--U GAG CUG UAA A |
| E1A_2 | UAU UGC AUU CUC UAG ACA CAG | CUG UG--U AGA GAA UGC AAU A |
| E1A_3 | UCG GUA AUA ACA CCU CCG UGG | CCA CGG A--UG UUA UUA CCG A |
| E1A_4 | AAA AUC UGC GAA ACC GCC UCC | GGA GGC GGU-- CGC AGA UUU U |
| E1A_5 | AGU GAG UAA GUC AAU CCC UUC | GAA GGG AU--A CUU ACU CAC U |
| pTP | AAG AGA GUU CGA CAG AAU CAA | UUG AUU CU--C GAA CUC UCU U |
| Pol | UUG GAU GAU AUG GUU GGA CGC | GCG UCC AA--A UAU CAU CCA A |
| IVa2 | AUU UCU GGG AUC ACU AAC GUC GUC | GAC GUU AG--A UCC CAG AAA U |
| Hex | UUU CCA CUU GAC UUU CUA GCU | AGC UAG AA--U CAA GUG GAA A |

pscAAV-amiR-Ad (6x)



pscAAV-amiR-Ad (6x)

Con (6x)

pTP (6x)

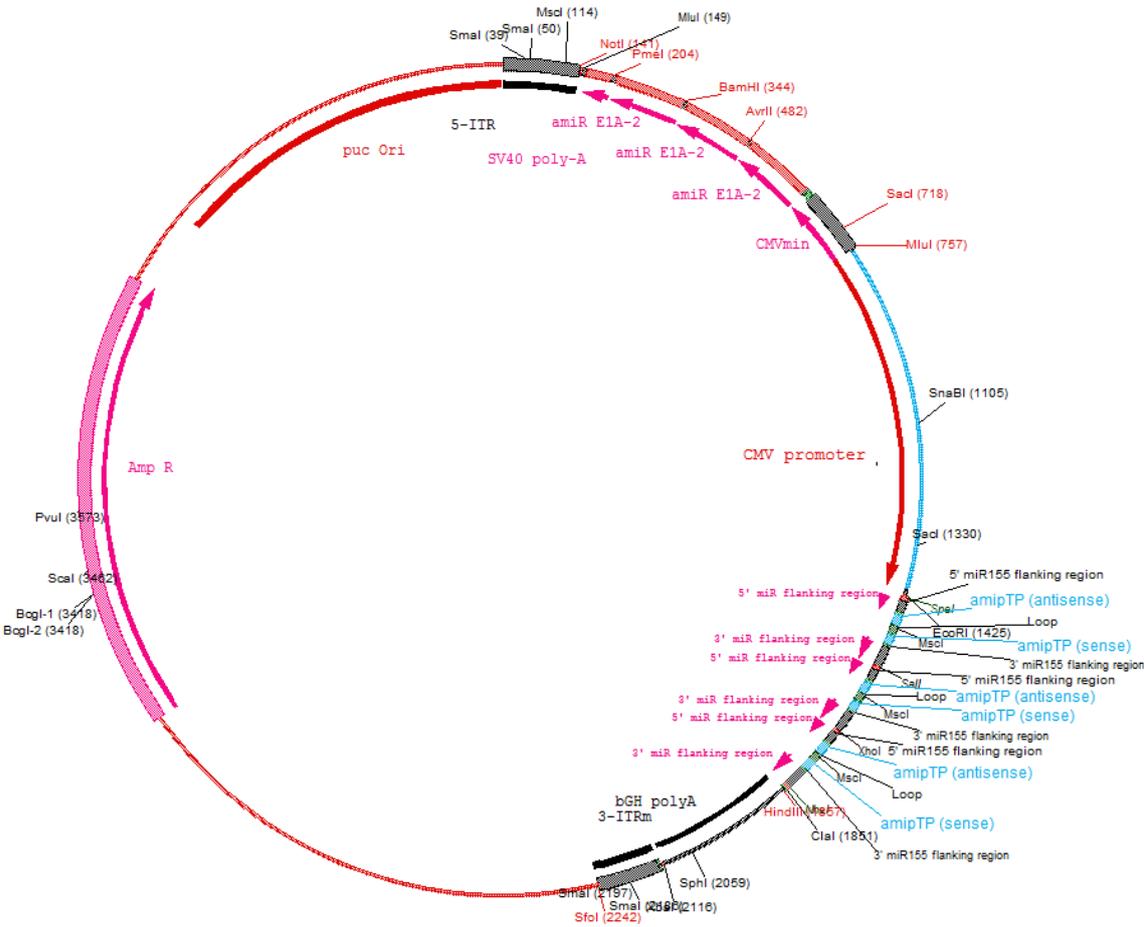
pTP (3x)-E1A_2 (3x)

E1A_2 (3x)-pTP (3x)

E1A_2-E1A_4-IVa2-pTP (3x)

3x (E1A_2-pTP)

pscAAV-amiR-E1A_2 (3x)-bidCMV-amiR-pTP (3x)



pscAAV-amiR-Ad (6x)

E1A_2 (3x)-bidCMV-pTP (3x)

8.4. Danksagung

Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich vielen Menschen danken, die die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jens Kurreck für die Gelegenheit bedanken, mich so intensiv mit dem Thema auseinanderzusetzen. Außerdem bedanke ich mich für den Rat, die Supervision und natürlich die Begutachtung der Dissertation.

Großer Dank gilt Dr. Henry Fechner, der mit unerschütterlicher Zuversicht immer an mich und das Projekt geglaubt hat und letztlich weder Kosten noch Mühen gescheut hat, einen erfolgreichen Abschluss zu finden. Ich bedanke mich für das uneingeschränkte Vertrauen in meine Person und Fähigkeiten, das es mir erlaubte, weitestgehend selbstständig zu arbeiten und dadurch viele zusätzliche Dinge zu erlernen, zu erfahren und zu erleben.

Neben Dr. Fechner war es auch Dr. Sandra Pinkert, die immer mit gutem Rat zur Stelle war und oftmals wertvolle neue Ansichten beisteuerte. Ohne ihre Erfahrungswerte im virologischen Bereich wäre so manche Engstelle auf dem Weg zu einer Sackgasse geworden.

Ich möchte mich auch bei den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fechner, die mich tatkräftig unterstützt haben, bedanken, allen voran Dr. Anja Geisler und Milena Kraus für ihre geleisteten Vorarbeiten, die die Basis des gesamten Projekts bildeten. Darüber hinaus möchte ich unbedingt unserer Assistentin Babette Dieringer danken, die jederzeit das Lächeln wieder zurückgebracht hat.

Weiterhin möchte ich die Beiträge der Arbeitsgruppe um William S.M. Wold (St. Louis University School of Medicine), von Robert Klopffleisch (Freie Universität Berlin) und Xiaomin Wang (Charité Berlin) würdigen. Ihre Beiträge bei der Vorbereitung und Durchführung der *in vivo*-Studien waren jeweils essentiell und haben mich sehr weit vorangebracht.

Für die Begutachtung der Arbeit möchte ich Prof. Dr. Lauster und Prof. Dr. Bock herzlich danken. Außerdem danke ich Prof. Dr. Meyer für die Leitung der Prüfungskommission.

Großer Dank gilt Annett Lorenz und noch einmal Dr. Sandra Pinkert, die sich die Zeit genommen haben, die Arbeit vorab zu lesen und viele Verbesserungsvorschläge beigesteuert haben.

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen Freunden und meiner Familie bedanken, die sich immer für den Fortschritt der Arbeit interessierten und mit mir dem Ende dieser aufwühlenden Zeit entgegengegangen sind.