

**Für meine Mädels und EMI.**

**Umschlagbild:** „PIWI-Protein mit siRNA“

PDB-Datenbank (<http://www.pdb.org>), PDB-ID: 2BGG,  
„*THE STRUCTURE OF A PIWI PROTEIN FROM ARCHAEOGLOBUS  
FULGIDUS COMPLEXED WITH A 16NT SIRNA DUPLEX.*“

Copyright: © 2011 Diana Rothe  
Druck: epubli GmbH, Berlin, [www.epubli.de](http://www.epubli.de)

*Printed in Germany*

# **RNA-Interferenz-basierte Strategien zur Inhibition von Picornaviren**

vorgelegt von  
Diplom-Biochemikerin  
**Diana Rothe**  
aus Berlin

von der der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung der des akademischen Titels

Doktorin der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

**Promotionsausschuss:**

Prof. Dr. Jens Kurreck  
Prof. Dr. Claus-Thomas Bock  
Prof. Dr. Roland Lauster

**Tag der wissenschaftlichen Aussprache:** 30. Mai 2011

Berlin 2011

**D 83**



<b>1. Einleitung</b> .....	4
<b>1.1 RNA-Interferenz</b> .....	5
1.1.1 Mechanismus .....	5
1.1.2 Design von artifiziellen siRNAs .....	8
1.1.3 Vektorexpression von siRNAs .....	9
1.1.4 <i>Delivery</i> -Systeme für RNAi-Anwendungen .....	10
1.1.5 AAV-basierte Vektoren für RNAi-Anwendungen .....	12
1.1.6 Therapeutische RNAi-Ansätze/Klinische Studien.....	14
<b>1.2 Picornaviren</b> .....	16
1.2.1 Aufbau.....	17
1.2.2 Reproduktionszyklus ( <i>Life Cycle</i> ) .....	18
1.2.3 Enteroviren.....	20
<b>2. Zielsetzung</b> .....	22
<b>3. Material und Methoden</b> .....	23
<b>3.1 Material</b> .....	23
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Chemikalien.....	24
3.1.3 Enzyme und Molekularbiologische Kits .....	24
3.1.4 Molekulargewichtsmarker .....	25
3.1.5 Bakterienstämme .....	25
3.1.6 Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	25
3.1.7 Medien für die Molekularbiologie .....	25
3.1.8 Puffer und Lösungen für den Western Blot .....	25
3.1.9 Lösungen für den Iodixanol-Gradienten.....	26
<b>3.2 Oligonucleotide und siRNAs</b> .....	27
3.2.1 siRNA-Sequenzen .....	27
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden</b> .....	29
3.3.1 Konzentrationsbestimmungen .....	29
3.3.2 Klonierungen .....	29
3.3.3 Primer Extension .....	31
3.3.4 Baustein-Klonierungen .....	32
3.3.5 Transformationen.....	32
3.3.6 <i>Colony-Screening</i> .....	33
3.3.7 DNA-Plasmid-Isolation aus Bakterien.....	33
3.3.8 RNA-Isolation und reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	34
3.3.9 <i>Real-time</i> quantitative PCR.....	34

<b>3.4 Zellkulturmethoden</b> .....	35
3.4.1 Zelllinien .....	35
3.4.2 Zellkultur .....	35
3.4.3 Transfektionen .....	35
3.4.4 Transduktionen .....	37
<b>3.5 Proteinchemische Methoden</b> .....	37
3.5.1 Western Blot .....	37
3.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung .....	39
3.5.3 Durchflusszytometrie .....	40
<b>3.6 Dual-Luciferase-Assay</b> .....	40
<b>3.7 Virologische Methoden</b> .....	41
3.7.1 Plaque-Assay.....	41
3.7.2 Plaque-Reduktions-Assay .....	41
3.7.3 Virus-Propagation-Assay.....	42
3.7.4 Zellviabilitäts-Assay.....	43
<b>3.8 AAV-Vektorproduktion und -Quantifizierung</b> .....	45
3.8.1 AAV-Vektorproduktion .....	45
3.8.2 AAV2-Vektor-Quantifizierung .....	46
<b>3.9 Bioinformatik</b> .....	47
<b>3.10 Statistik</b> .....	47
<b>4. Ergebnisse</b> .....	48
<b>4.1 Strang-spezifische Inhibition von Picornaviren</b> .....	48
<b>4.2 Design von effizienten antiviralen siRNAs</b> .....	53
<b>4.3 Paralleles Klonieren von shRNA-Expressionskassetten gegen die     RdRP des EV-30</b> .....	61
<b>4.4 siRNA-vermittelte <i>Downregulation</i> von endogen exprimiertem DAF</b> .....	64
<b>4.5 Inhibition des EV-30 durch <i>Downregulation</i> von endogen     exprimiertem DAF</b> .....	68
<b>4.6 Inhibition von EV-30 durch die Kombination von wirksamen siRNAs</b> .....	71
<b>4.7 Baustein-Prinzip für die Herstellung von Mehrfach-Expressionsvektoren</b> .....	75

---

<b>4.8</b>	<b>AAV-Vektor-vermittelte <i>Downregulation</i> von endogen exprimiertem DAF .....</b>	<b>78</b>
<b>4.9</b>	<b>AAV-Vektor-vermittelte Inhibition von EV-30 .....</b>	<b>81</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>Strang-spezifische Inhibition von Picornaviren .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2</b>	<b>Design von wirksamen antiviralen siRNAs .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3</b>	<b>siRNA-vermittelte <i>Downregulation</i> von endogen exprimiertem DAF .....</b>	<b>90</b>
<b>5.4</b>	<b>AAV-vermittelte Inhibition von EV-30 .....</b>	<b>92</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>106</b>
	Anhang 1: Plasmidkarten .....	106
	Anhang A: Verzeichnis der Abkürzungen .....	108
	Anhang B: Danksagung .....	111
	Anhang C: Eigene Veröffentlichungen .....	112

# 1. Einleitung

Virusinfektionen gehören zu den größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit. Sie lösen nicht nur eine Vielzahl schwerer Erkrankungen aus, sondern erfahren aufgrund von fortschreitender Globalisierung auch eine rasche weltweite Ausbreitung. Die für das Jahr 2010 von der Weltgesundheitsorganisation aufgezeichneten Krankheitsausbrüche (WHO, 2010) sprechen eine deutliche Sprache: Vor allem in ärmeren Regionen, in denen eine flächendeckende Impfversorgung fehlt und Mensch und Tier oftmals sehr nah beieinander leben, werden das Entstehen speziesübergreifender Varianten wie dem Vogelgrippe-Virus (H5N1) und die Verbreitung von Infektionskrankheiten begünstigt. Beispielsweise gibt es mehr als 500 Millionen Menschen weltweit, die eine chronische Infektion mit dem Hepatitis-Virus Typ B (HBV) oder Typ C (HCV) aufweisen (WHO, 2010). Viele von ihnen sterben an den Folgeerkrankungen, wie zum Beispiel Leberzirrhose oder hepatozellulären Karzinomen. Mit einer Sterberate von fast 100% zählt auch das vom HI-Virus (*human immunodeficiency virus*, HIV) ausgelöste erworbene Immunschwäche-Syndrom (*Acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) zu den größten globalen Gesundheitsproblemen. Weltweit lebten im Jahr 2008 über 33 Millionen Menschen mit dem Erreger, etwa 3 Millionen infizierten sich neu (UNAIDS, 2009). Die Behandlungsoptionen für viele virale Erkrankungen sind nach wie vor stark begrenzt. Bis zum heutigen Tage gibt es keine wirksamen Vakzine gegen HCV oder HIV, die präventiv verabreicht werden könnten. Die wirksamste Therapie von HCV besteht in der Gabe von pegyliertem Interferon  $\alpha$  in Kombination mit dem Virostatikum Ribavarin. Gegen HIV wird eine Kombination von drei oder mehr antiretroviralen Medikamenten eingesetzt, um das Entstehungsrisiko von (multi)resistenten HIV-Varianten zu minimieren. Diese Art der Kombinationstherapie (*highly active anti-retroviral therapy*, HAART) hat, wie auch die HCV-Therapie, starke Nebenwirkungen. Daher ist die Entwicklung neuer, sicherer und effizienter antiviraler Therapien notwendig. RNA-Interferenz (RNAi) gilt dabei als vielversprechender Ansatz, da hierbei virale RNA in infizierten Zellen zerstört werden kann, ohne dass normale zelluläre Prozesse zu stark beeinflusst werden.

## 1.1 RNA-Interferenz

Im Jahre 1998 wurden überraschende Ergebnisse aus den Untersuchungen am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* veröffentlicht: Die Injektion langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden führte zu einer starken Unterdrückung der Expression solcher Gene, deren mRNA eine komplementäre Sequenz zur eingebrachten RNA aufwies (Fire et al., 1998). Dieses Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) konnte kurz darauf auch in vielen anderen Organismen, wie beispielsweise in *Drosophila melanogaster*, beobachtet werden. Nur kurze Zeit später konnte dieser Mechanismus mit artifiziellen kleinen dsRNA-Molekülen, sogenannten *short interfering RNAs* (siRNA) auch in Säugerzellen induziert werden (Elbashir et al., 2001). Normalerweise wird dsRNA im Zuge des antiviralen Verteidigungsmechanismus erkannt und führt zu einer potenten Immunantwort (Karpala et al., 2005). Mit der Entwicklung chemisch synthetisierbarer siRNAs eröffneten sich erstmals auch neue therapeutische Möglichkeiten. So konnte in den folgenden *in vivo*-Studien nicht nur gezeigt werden, dass siRNAs wirksam die Expression eines Transgens mit komplementärer mRNA unterdrücken (McCaffrey et al., 2002), sondern auch, dass sie ein großes therapeutisches Potential besitzen: In einem Maus-Modell mit Autoimmunhepatitis (AIH) konnten die Tiere vor der Entwicklung einer Leberzirrhose geschützt werden, indem sie mit einer siRNA gegen die Fas-mRNA behandelt wurden (Song et al., 2003). Bereits ein Jahr später folgte die erste klinische Studie zur siRNA-basierten Behandlung von altersbedingter Makula-Degeneration. Die schnellen Entwicklungen auf dem Gebiet der RNAi zeigen die hohen Erwartungen, die an dieses neue Werkzeug geknüpft sind. Bereits 2006, also weniger als 10 Jahre nach ihrer bahnbrechenden Entdeckung der RNAi, wurden Andrew Fire und Craig Mello mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie ausgezeichnet.

### 1.1.1 Mechanismus

Auf der Basis ihres Vorläufers können zwei Hauptkategorien kleiner dsRNA-Moleküle unterschieden werden, die eine post-transkriptionelle Unterdrückung der Genexpression (*post transcriptional gene silencing*, PTGS) durch RNAi auslösen können. Wird lange dsRNA als Antwort auf virale Infektionen oder nach dem Einbringen von artifizieller dsRNA geschnitten, entstehen siRNAs, also kurze doppelsträngige RNA-Moleküle. Die Expression von Genom-codierenden Stem-Loop-Strukturen führt dagegen zu sogenannten *micro-RNAs* (miRNA), wobei in den letzten Jahren weitere kleine endogene RNAs gefunden wurden. Dazu gehören unter anderem PIWI-interacting RNAs (piRNAs) und *endogenous* siRNAs (endo-siRNAs oder esiRNAs).

**siRNA-vermittelte RNAi (Abbildung 1.1a)**

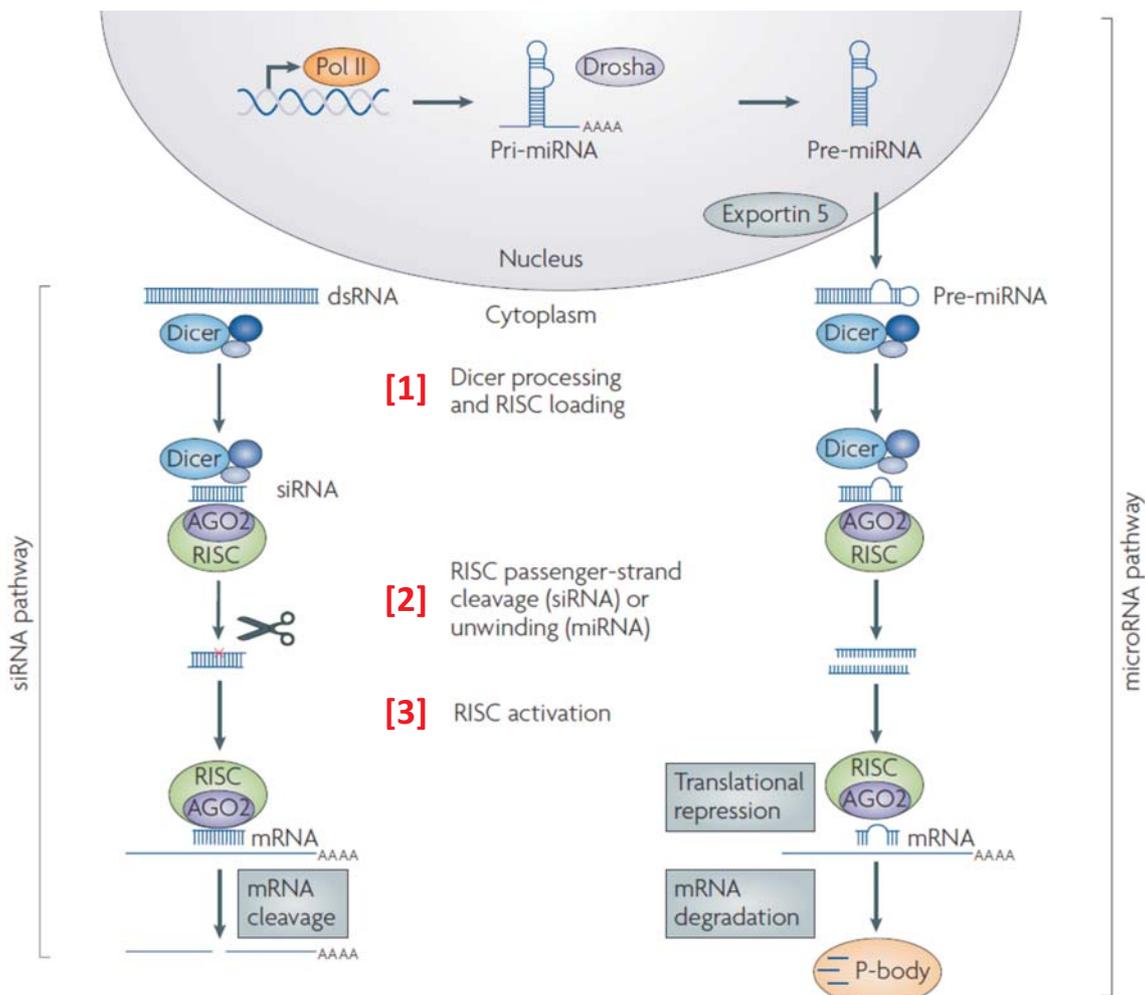
Lange dsRNA, wie sie beispielsweise bei der Replikation von RNA-Viren oder bei einer (zufälligen) Zusammenlagerung von langen komplementären Sequenzen entstehen, werden im Cytoplasma von dem Enzym Dicer in kurze dsRNA-Moleküle zerschnitten (Bernstein et al., 2001). Dicer ist eine Endoribonuclease der Ribonuclease III (RNase III)-Familie und enthält neben einer PAZ-Domäne zwei katalytisch aktive RNaseIII-Domänen, welche miteinander zu einem internen Dimer assoziieren (Zhang et al., 2004). Es entstehen die etwa 21-25 Nucleotide langen siRNAs, die typische RNaseIII-Produkte sind. Charakteristisch dafür sind Mono-Phosphatgruppen an den beiden 5'-Enden und zwei Nucleotide lange Überhänge und Hydroxylgruppen an beiden 3' Enden (MacRae und Doudna, 2007). Die siRNA wird durch einen Vorläuferkomplex des *RNA-induced silencing complex* (*RISC-loading complex*, pre-RISC) gebunden, der aus Dicer, einem Argonauten-Protein (AGO) und einem dsRNA-Bindeprotein besteht (Hutvagner und Simard, 2008). Im Schlüsselschritt der Überführung des pre-RISC in den aktiven Zustand (*RNA-induced silencing complex*, holo-RISC) wird die Helix der siRNA entwunden und AGO schneidet einen der beiden Stränge (*Passenger-Strang*), der dann aus dem Komplex freigesetzt wird. Hierbei bestimmt die thermodynamische Asymmetrie entlang der siRNA, welcher Strang im RISC zurückgehalten (*Guide-Strang*) beziehungsweise welcher verworfen wird (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der aktivierte RISC sucht im Transkriptom nach homologen Sequenzen, wobei AGO den *Guide-Strang* der siRNA benutzt, um mit einer Ziel-RNA zu assoziieren, die eine perfekt komplementäre Sequenz aufweist. Besitzt AGO eine Endonuclease-Aktivität, wird die Ziel-RNA geschnitten (Song et al., 2004) und so aus dem Komplex entlassen. Der aktivierte RISC mit dem geladenen *Guide-Strang* bleibt erhalten und kann weitere Ziel-RNA binden und schneiden.

**miRNA-vermittelte RNAi (Abbildung 1.1b)**

Neben siRNAs können auch miRNAs eine RNA-Interferenz auslösen. Es wurden mehr als 100 verschiedene miRNAs in Organismen wie Pflanzen oder auch dem Menschen (Bentwich et al., 2005; Lagos-Quintana et al., 2003) entdeckt und die Aufklärung ihrer Funktionen ist Gegenstand der derzeitigen Forschung (Krol et al., 2010). Heute geht man davon aus, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Regulation der zelleigenen Proteinsynthese einnehmen.

Die Vorläufer von miRNAs sind im Genom codiert und werden gewöhnlich durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Die entstehenden Primärtranskripte (pri-miRNAs) bilden typische *stem-loop* Strukturen aus und tragen am 5'-Ende ein 7-Methylguanosin-Cap (m<sup>7</sup>G) und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz (Poly-A). Sie werden im Kern durch die RNaseIII-

Aktivität des Enzyms Drosha in etwa 65-70 Nucleotide lange *precursor* miRNAs geschnitten (pre-miRNAs) (Lee et al., 2003), die eine charakteristische Haarnadelstruktur (*hairpin*) ausbilden. In Abhängigkeit von der Spezies interagiert Drosha mit Cofaktoren, die über eine dsRNA-Bindedomäne an dsRNA binden können (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004).



**Abbildung 1.1: siRNA- und miRNA-vermittelte RNAi** (modifiziert nach de Fougères et al., 2007)

**a) siRNA-vermittelte RNAi.** [1] Lange dsRNA wird durch das RNaseIII-Enzym Dicer zu kleinen dsRNA-Molekülen (siRNAs) prozessiert. [2] Die dsRNA-Duplex wird entwunden und einer der beiden Stränge (*Guide*-Strang) wird in einen ternären Protein-Komplex geladen, der als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. [3] RISC sucht im Transkriptom nach homologen Sequenzen und der geladene *Guide*-Strang führt die im RISC enthaltene Endonuclease (AGO) zu einer komplementären Sequenz auf der Ziel-RNA. Diese wird geschnitten und nach Freisetzung aus dem RISC degradiert.

**b) miRNA-vermittelte RNAi.** [1] Die Polymerase II transkribiert endogen codierte pri-miRNAs, die durch Drosha zu pre-miRNAs geschnitten werden. Nach dem Exportin-5 vermittelten Transport vom Zellkern in das Cytoplasma werden sie durch Dicer zu reifen miRNAs prozessiert. Nach Entwinden der miRNA-Helix und Bindung des einen der beiden miRNA-Stränge entsteht ein aktiver Ribonucleoprotein-Komplex, der je nach Komplementarität des gebundenen miRNA-Stranges zur Ziel-RNA die Translationsinhibition oder den Abbau der mRNA vermittelt.

Die pre-miRNAs werden über Exportin-5 (Exp-5) in Anwesenheit des Cofaktors Ran-GTP über die Kernporen der Kernmembran aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Dort dienen sie Dicer als Substrat, der die pre-miRNAs zu reifen miRNAs prozessiert. Durch die Interaktion von Dicer mit einem Cofaktor, der eine dsRNA-Bindedomäne enthält, wird die miRNA-Duplex entwunden und es entsteht ein, dem holo-RISC sehr ähnlicher, aktiver Ribonucleoprotein-Komplex (miRNP). Beim Menschen besteht dieser Komplex aus dem Argonauten-Protein AGO2, dem RNaseIII-Enzym DICER1 und dessen Cofaktor TRBP, der über eine dsRNA-Bindedomäne verfügt (Gregory et al., 2005). Abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen dem *Guide*-Strang der miRNA und der Ziel-mRNA wird diese (miRNP-vermittelt) entweder geschnitten (Hutvagner und Zamore, 2002), deren Translation blockiert oder ihre Degradierung begünstigt (Eulalio et al., 2007; Filipowicz et al., 2008; Huntzinger und Izaurralde, 2011).

### 1.1.2 Design von artifiziellen siRNAs

Seit der Entdeckung, dass RNAi mit Hilfe kurzer, chemisch synthetisierter siRNAs auch in Säugerzellen ausgelöst werden kann (Elbashir et al., 2001), geht man der Frage nach, welche Kriterien eine siRNA zu erfüllen hat, um spezifisch und hochwirksam die Expression eines Zielgens zu unterdrücken. Obwohl prinzipiell sowohl der Sense- als auch der Antisense-Strang der siRNA in den RISC eingebaut werden kann, zeigten erste Untersuchungen, dass dies nicht gleichberechtigt geschieht, sondern der Strang im RISC zurückbehalten wird, der das thermodynamisch instabilere, das heißt AT-reichere, 5'-Ende aufweist (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). In einer weiterführenden Studie konnten diese Erkenntnisse bestätigt und zusätzliche Kriterien identifiziert werden, die wirksame siRNAs auszeichnen (Reynolds et al., 2004). Trotz sorgfältigem Design unter Berücksichtigung der sogenannten Reynolds-Kriterien erhielt man in der Praxis jedoch auch häufig siRNAs, die nicht in der Lage waren, ihr entsprechendes Zielgen zu inhibieren. Es ist daher offenkundig, dass es weitere Kriterien geben muss, die die Effizienz einer siRNA bestimmen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Fähigkeit des Antisense-Stranges einer siRNA, stabile Sekundärstrukturen auszubilden, ihre Wirksamkeit beeinflusst (Patzel et al., 2005). Unstrukturierte Antisense-Stränge vermittelten hierbei eine hocheffiziente Unterdrückung der Genexpression, während die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen des Antisense-Stranges die siRNA-Aktivität verminderte. Ein weiterer Aspekt ist nicht auf die Charakteristika der siRNA selbst bezogen, sondern beschäftigt sich mit den thermodynamischen Eigenschaften der Ziel-RNA. Bereits 2004 wurde erkannt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Bindungen innerhalb der Ziel-Sequenz und der Effizienz, diese zu inhibieren,

gibt (Luo und Chang, 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Effizienz einer siRNA von der Zugänglichkeit ihrer Ziel-Sequenz abhängig ist und direkt mit der lokalen freien Energie  $\Delta G$  korreliert (Schubert et al., 2005b). Welcher der genannten Kriterien den größten Einfluss auf die Effizienz einer siRNA hat, bleibt offen. Es ist anzunehmen, dass weitere Faktoren identifiziert werden, mit denen das Zusammenspiel von siRNA und Ziel-RNA genauer erklärt werden kann.

### 1.1.3 Vektorexpression von siRNAs

Der RNAi-Effekt von chemisch synthetisierten siRNAs ist meist nicht von langer Dauer, da sie mit der Zeit intrazellulär abgebaut werden. Für eine mögliche therapeutische Anwendung ist es daher von Vorteil, siRNAs von einem Vektor aus zu generieren. Eine der ersten dazu entwickelten Methoden umfasste einen Expressionsvektor, der eine sogenannte short-hairpin RNA (shRNA) von einem Polymerase III-Promotor aus transkribierte (Paddison et al., 2002). Die Expressionskassette bestand dabei aus einem U6-Promotor und einer DNA-Sequenz, die für Sense- und Antisense-Strang der siRNA, getrennt durch eine Loop-Sequenz, codierte. Die shRNA wird, in Analogie zu miRNAs, vom Zellkern in das Cytoplasma exportiert und vermittelt über den RNAi-*Pathway* die Unterdrückung komplementärer Ziel-Sequenzen. In vivo konnte die Effizienz derartiger shRNA-Expressionsvektoren schon ein Jahr später bestätigt werden (Hemann et al., 2003).

Eine Weiterentwicklung stellen Expressionsvektoren dar, bei denen die shRNA durch eine Polymerase II transkribiert wird. Dafür wird die durch endogene miRNAs ausgelöste, natürliche RNAi simuliert, indem die miRNA durch eine artifizielle Sequenz ersetzt, aber die entsprechende miRNA-Umgebung erhalten bleibt (Zeng et al., 2002). Wie bei der miRNA-vermittelten RNAi (siehe **Abschnitt 1.1.1**) wird von einem Polymerase II-Promotor aus ein Primärtranskript generiert, welches durch Drosha geschnitten und als pre-miRNA in das Cytoplasma exportiert wird. Dort wird sie weiter von Dicer prozessiert und vermittelt über den weiteren RNAi-*Pathway* die Unterdrückung komplementärer Ziel-Sequenzen. Diese Technologie wurde beispielsweise dazu verwendet, shRNA-Bibliotheken zu generieren, die eine systematische Analyse von RNAi-induzierten Phenotypen in Säugerzellen ermöglicht (Silva et al., 2005).

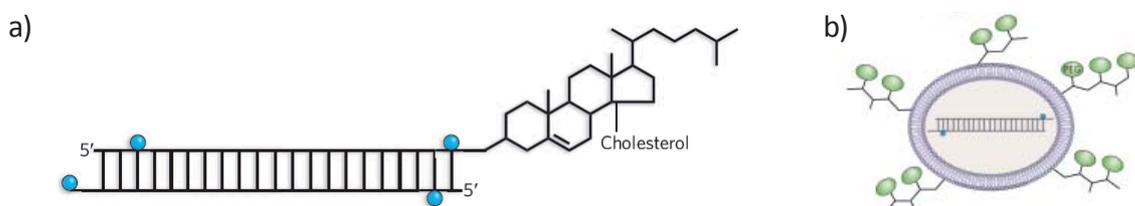
### 1.1.4 *Delivery*-Systeme für RNAi-Anwendungen

Für therapeutische Zwecke müssen siRNAs an den Wirkungsort (Gewebe, Zielzellen) gelangen. Allerdings können siRNAs aufgrund ihrer negativen Ladung und Größe Zellmembranen nicht besonders gut passieren. Daher sind in den vergangenen Jahren verschiedene Transportsysteme entwickelt worden, wobei hierbei prinzipiell in nicht-virale und virale Transportsysteme unterschieden wird.

#### Nicht-virale Transportsysteme

Für den Transport (*Delivery*) von chemisch synthetisierten siRNAs steht heute eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, zu denen beispielsweise die Verpackung in Nanopartikel, die Ausbildung von Komplexen mit kationischen Lipiden, Antikörper-Konjugation und die Kopplung an Cholesterin oder Aptamere gehören. Im folgenden werden zwei interessante *Delivery*-Systeme für Leberzellen beschrieben, detaillierte Ausführungen finden sich in den Übersichtsartikeln von Kurreck (2009) und Castanotto und Rossi (2009).

Leberzellen können sehr gut mit Cholesterin-gekoppelten siRNAs erreicht werden. Das lipophile Cholesterin ist dabei kovalent an das 3'-Ende des Sense-Stranges der siRNA gebunden (**Abbildung 1.2a**). In einem Maus-Modell konnte bereits das effiziente *Delivery* einer Cholesterin-gekoppelten siRNA in Leberzellen (und in das Jejunum, einem Teil des Dünndarms) nach intravenöser Gabe gezeigt werden. Die siRNA vermittelte dabei effizient die *Downregulation* des Apolipoproteins B (ApoB). Infolgedessen sank der Gehalt an ApoB im Plasma und damit auch der Cholesterinspiegel im Blut (Soutschek et al., 2004). Ein zweiter effizienter Ansatz für das *Delivery* von siRNAs in die Leber stellen sogenannte SNALPs (*stable nucleic acid lipid particles*) dar (**Abbildung 1.2b**). Dabei ist die siRNA in eine kationische oder neutrale Lipidhülle eingekapselt, die wiederum mit PEG-Lipid-Konjugaten umhüllt ist. SNALPs sind sehr stabil und wurden bereits erfolgreich verwendet, um eine ApoB-siRNA in Primaten zu testen (Zimmermann et al., 2006).



**Abbildung 1.2: Beispiele nicht-viraler *Delivery*-Systeme.** (Castanotto und Rossi, 2009)

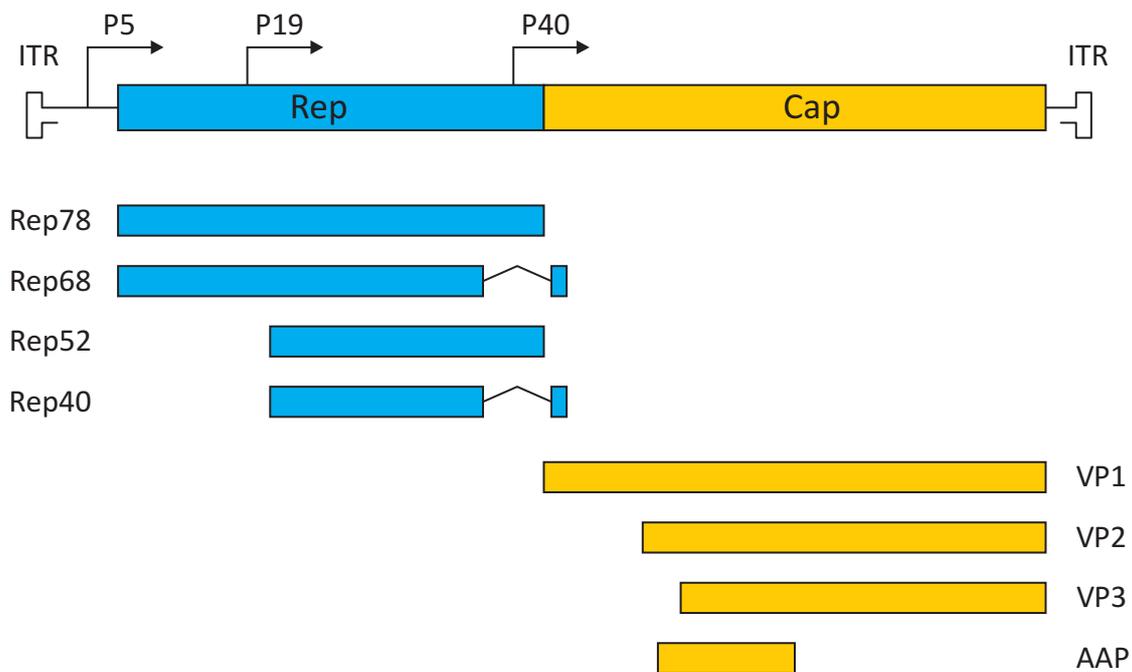
**a)** Cholesterin-gekoppelte siRNA. Cholesterin ist kovalent an das 3'-Ende der siRNA gekoppelt. **b)** SNALPs. Die siRNA in eine kationische oder neutrale Lipidhülle eingekapselt. PEG-Lipid-Konjugate umhüllen die Lipidhülle.

### **Virale Transportsysteme**

Eine Alternative zu einer siRNA-vermittelten RNAi ist die Expression artifizierlicher shRNAs oder miRNAs (**Abschnitt 1.1.3**). Für ein virales *Delivery* werden die Expressionskassetten, bestehend aus Polymerase II-oder III-Promotor und der shRNA beziehungsweise miRNA in das Rückgrat von viralen Vektoren eingefügt. Durch die Vermittlung einer langfristigen shRNA-Expression weist diese Methode einen deutlichen Vorteil gegenüber nicht-viralen Transportsystemen auf, wenn sie gegen viral verursachte chronische Erkrankungen wie AIDS oder Hepatitis eingesetzt wird. Die viralen Vektoren sind meist so verändert, dass sie sich im Wirtsorganismus/der Zielzelle nicht mehr vermehren können, da essentielle Gene für ihre Replikation aus dem Virusgenom entfernt wurden. Die heute gängigsten viralen Transportsysteme haben ihren Ursprung in der Gentherapie und umfassen Retrovirale Vektoren, Adenovirale Vektoren und Vektoren auf der Basis von Adeno-assoziierten Viren (AAV). Die Studien der Vergangenheit zeigen, dass es kein ideales *Delivery*-System für alle RNAi-Anwendungen gibt. So wurden beispielsweise die zu den Retroviralen Vektoren gehörenden Lentiviren verwendet, um eine shRNA-vermittelte RNAi in Mäusen zu induzieren. Die shRNA war gegen das Onkogen *K-Ras* gerichtet und dessen effiziente *Downregulation* führte zur Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen (Brummelkamp et al., 2002). Adenovirale Vektoren zeigten sich dagegen effizient, eine Unterdrückung von Ziel-mRNA im zentralen Nervensystem zu vermitteln (Xia et al., 2004). Im Folgenden soll nun näher auf AAV-basierte Vektoren eingegangen werden, da sich diese in den letzten Jahren für RNAi-Anwendungen als besonders geeignet und flexibel einsetzbar erwiesen haben.

### 1.1.5 AAV-basierte Vektoren für RNAi-Anwendungen

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind einzelsträngige DNA-Viren ohne Hülle, die zur Familie der *Parvoviridae* gehören. Sie haben keine bekannte Pathogenität und benötigen für ihre Replikation ein Helfervirus, wie zum Beispiel das Adeno- oder Herpesvirus. Das Wildtyp-AAV-Genom, welches für vier nicht-Strukturproteine (Rep) und vier Strukturproteine (Cap) codiert, wird beiderseits durch inverse terminale Wiederholungen (*inverted terminal repeat*, ITR) flankiert (**Abbildung 1.3**). Diese bilden über komplementäre Basenpaarungen charakteristische T-förmige Haarnadel-Strukturen aus (zusammengefasst in Daya und Berns, 2008). Die Rep-Proteine, die unter anderem für die Replikation und die Verpackung notwendig sind, werden von den Promotoren P5 und P19 aus generiert. Die Expression der Capsidproteine VP1-VP3 und des erst kürzlich identifizierten *Assembly Activating*-Proteins AAP (Sonntag et al., 2010) erfolgt dagegen durch den Promotor P40.

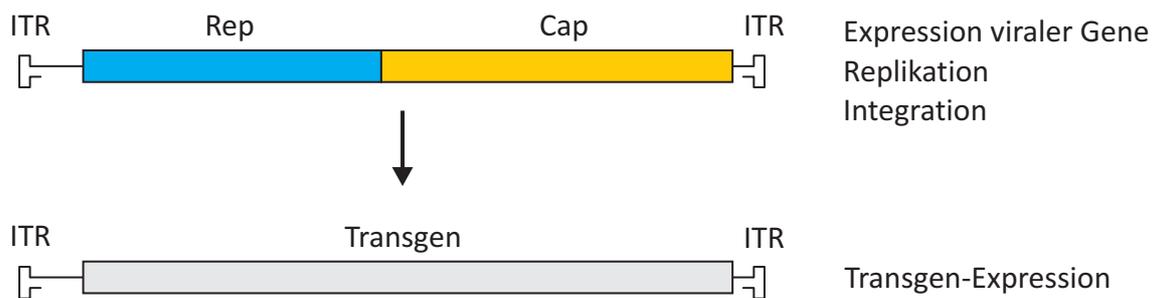


**Abbildung 1.3: Genom-Organisation des Wildtyp-AAV2-Genoms** (schematisch).

Die Gene für Rep- und Cap-Proteine werden durch *inverted terminal repeats* (ITR) flankiert. Von den drei Promotoren P5, P19 und P40 aus werden die verschiedenen Rep- und Cap-Transkripte generiert, welche nachfolgend gespleißt werden.

In den für die Gentherapie entwickelten rekombinanten Adeno-assoziierte Virus (rAAV)-Vektoren sind die Gene für Rep und Cap entfernt worden und schaffen so den Platz für das Transgen, das bis zu 4,7 Kilobasen (kb) groß sein kann (**Abbildung 1.4**). Die ITRs bleiben erhalten, da sie für die Verpackung essentiell sind. Für Replikation und Verpackung müssen

Rep und Cap von einem Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellt werden. Die Wirksamkeit von rAAV-Vektoren ist stark von den einzelnen Schritten der AAV-Infektion abhängig. Dazu konnte gezeigt werden, dass sowohl ineffizientes *Trafficking* (Hauck et al., 2004) als auch die Doppelstrangsynthese (Ferrari et al., 1996) limitierende Faktoren der AAV-Genexpression darstellten.



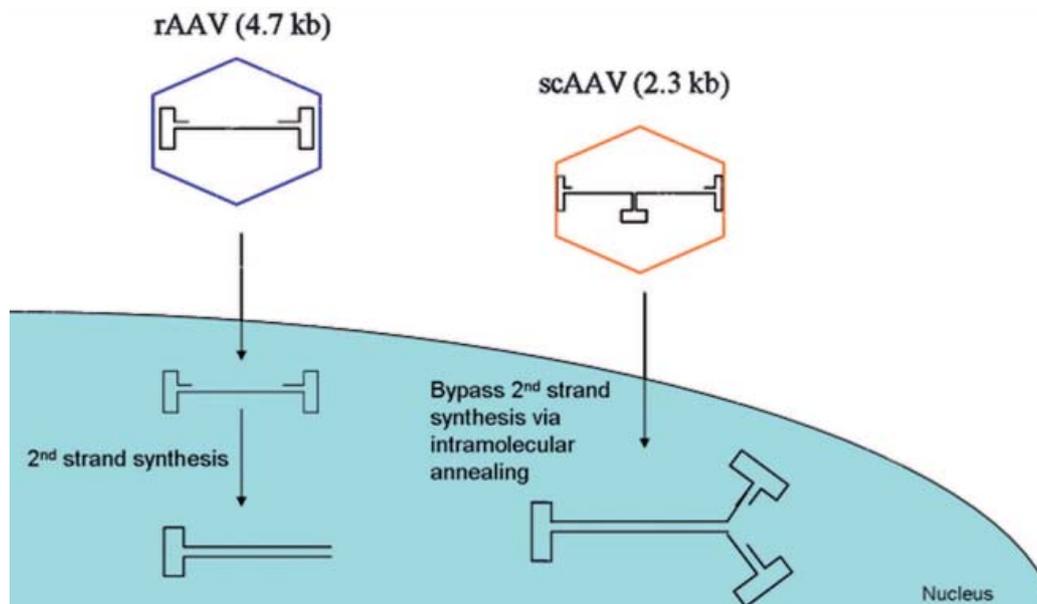
**Abbildung 1.4: Herstellung von rAAV-Vektoren für die Gentherapie.**

Rep- und Cap-Gene werden aus dem Wildtyp-AAV entfernt und können durch ein Transgen ersetzt werden. Damit verlieren die rAAV-Vektoren auch ihre Fähigkeit, in das Wirtsgenom zu integrieren oder sich zu replizieren. Die ITRs bleiben erhalten, da sie das Verpackungssignal enthalten.

Mit der Entwicklung von selbst-komplementären AAV-Vektoren (*self-complementary AAV vector*, scAAV) konnte das Problem der stark verzögerten Expression des Transgens, die durch die Doppelstrangsynthese verursacht wird, gelöst werden (McCarty et al., 2001). Die scAAV-Vektoren können sich selbst so falten, dass vorübergehend dsDNA entsteht, die transkribiert werden kann (**Abbildung 1.5**). Allerdings wird theoretisch die maximale Größe des Transgens im Gegensatz zu rAAV-Vektoren halbiert (etwa 2,3 kb). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass DNA mit einer Größe von bis zu 3,3 kb verpackt werden kann (Wu et al., 2007). Für therapeutische RNAi-Anwendungen eignen sich solche Vektoren besonders gut. So führt die scAAV-vermittelte Expression einer shRNA zu einer schnellen und potenten RNAi-Antwort und kann damit für antivirale Ansätze genutzt werden. Andererseits spielt das Größenlimit keine große Rolle, da eine einzelne shRNA-Expressions-kassette in der Regel weitaus kleiner als 1 kb ist.

Mit der Entdeckung neuer AAV-Serotypen und ihrer molekularen Charakterisierung wurden die Voraussetzungen für die Generierung von pseudotypisierten AAV-Vektoren geschaffen, da die jeweiligen Capsidproteine eine bestimmte Zellspezifitäten vermitteln können. So kann das Virusgenom eines ITR-Serotyps in unterschiedliche Capside anderer Serotypen verpackt werden (Grimm and Kay, 2003). Dieser Ansatz erlaubt einen breiten Gewebetropismus, der bei therapeutischen RNAi-Anwendungen von Vorteil ist, da eine

shRNA beispielsweise nur in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird und somit Nebenwirkungen vermieden werden können.



**Abbildung 1.5: Vergleich von rAAV- mit scAAV-Vektoren.** (Daya und Berns, 2008)

Konventionelle rAAV-Vektoren sind auf zelluläre Faktoren angewiesen, um den Doppelstrang zu synthetisieren. Daher kommt es zu einer verzögerten Expression des Transgens in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit. Neuartige scAAV-Vektoren können diesen Schritt umgehen, da sie sich selbst zu einem Doppelstrang falten können. Daher kann das Transgen umgehend exprimiert werden.

### 1.1.6 Therapeutische RNAi-Ansätze/Klinische Studien

Der überaus rasche Weg von der Entdeckung der RNAi bis in die Klinik zeigt die hohen therapeutischen Erwartungen, die an diese neue Methode geknüpft sind. Im Folgenden werden einige Beispiele von RNAi-basierten Medikamenten beschrieben, die sich zur Zeit in klinischen Studien befinden (**Tabelle 1.1**).

Die erste klinische Studie mit einer siRNA wurde bereits 2004 initiiert. Das Medikament Bevasiranib (Opko Health) soll die Neovaskularisation von Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (AMD) aufhalten, indem eine Injektion einer spezifischen siRNA in das Auge die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) inhibiert. Das Medikament hat die klinischen Phasen I und II erfolgreich durchlaufen, die klinische Phase III wurde jedoch vorzeitig 2009 eingestellt. Einen Einfluss auf diese Entscheidung hatte wahrscheinlich auch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass die *Downregulation* von VEGF möglicherweise nicht auf einen RNAi-Effekt zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf eine unspezifische Aktivierung des

*Toll-like-Rezeptors 3 (TLR3)* mit nachfolgender Aktivierung von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-12 (IL-12) (Kleinman et al., 2008).

ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) war die erste antivirale siRNA, die in einer klinischen Studie getestet wurde. Sie ist gegen das Nucleoprotein-Gen des humanen respiratorischen Synzytial-Virus (*respiratory syncytial virus*, RSV) gerichtet, ein Virus, das Erkrankungen der oberen Atemwege auslöst. Die antivirale Wirkung von ALN-RSV01 wurde bereits in einer klinischen Phase II-Studie untersucht, in der Lungen-transplantierte, RSV-infizierte Patienten über ein Aerosol die siRNA verabreicht bekamen.

Ein weiteres Beispiel einer möglichen klinischen RNAi-Anwendung ist die Behandlung von Krebserkrankungen. Die Firma Calando Pharmaceuticals untersucht in einer klinischen Phase I-Studie eine siRNA, die gegen die M2-Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase (RRM2) gerichtet ist, ein Enzym, das für die Synthese von DNA-Bausteinen benötigt wird. Das Medikament soll gegen solide Tumore eingesetzt werden.

**Tabelle 1.1: RNAi in klinischen Studien.** (modifiziert nach Kurreck, 2009 und Castanotto und Rossi, 2009)

Medikament	Firma	Erkrankung	Status
Sirna-027	Merck/Sirna	AMD	Phase II
RTP801i-14	Quark Pharm.	AMD	Phase I/II
ALN-RSV01	Alnylam Pharm.	RSV	Phase II
NUC B1000	Nucleonics Inc.	HBV	Phase I
SPC3649	Santaris Pharma.	HCV	Phase I
Anti-tat/rev shRNA	Benitec/City of Hope	HIV/AIDS	Phase I
CALAA-01	Calando Pharma	Solide Tumoren	Phase I
ATN-RNA	Senetek PLC	Glioblastoma multiforme	Phase I
AKli-5	Quark Pharma	Akutes Nierenversagen	Phase I
TD101	TransDerm Inc.	Pachyonychia congenita	Phase I

## 1.2 Picornaviren

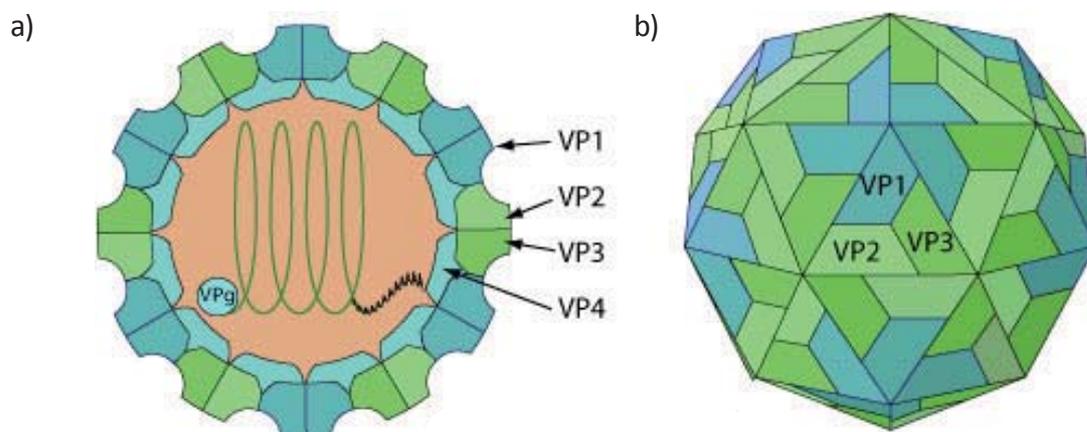
Picornaviren gehören zu den Einzelstrang-RNA-Viren (ssRNA) mit positiver Orientierung. Der Name leitet sich von „pico“ und „RNA“ ab und beschreibt eine wesentliche Eigenschaft dieser Viren: Mit einem Genom von 7200-8500 Kilobasen (kb) gehören Sie mit zu den kleinsten RNA-Viren überhaupt. Die Familie *Picornaviridae* wird in 12 Genera klassifiziert (ICTV, Stand 2010), zu der die **Tabelle 1.2** eine Übersicht gibt. Die beiden wohl bekanntesten Vertreter sind das Rhinovirus als Erreger einer klassischen Erkältung und das Poliovirus, Auslöser der Poliomyelitis (Polio) und besser bekannt unter dem Begriff Kinderlähmung, welches aufgrund der WHO-Impfkampagne zur weltweiten Ausrottung von Polio im Fokus des öffentlichen Interesses steht. Neben der taxonomischen Einteilung können Picornaviren auch hinsichtlich ihrer Säurestabilität unterschieden werden. So infizieren säurelabile Erreger, wie zum Beispiel Rhinoviren nur die oberen Atemwege, während Infektionen des Verdauungstrakts von säurestabilen Vertretern wie den Enteroviren erfolgen, da die Infektiosität durch das saure Milieu des Magens nicht oder nur wenig beeinflusst wird.

**Tabelle 1.2:** Die Familie *Picornaviridae*. (ICTV, Stand 2010)

	Spezies
Enterovirus	Human enterovirus A-D, Bovine enterovirus, Porcine enterovirus B, Simian enterovirus A, Human rhinovirus A-C
Cardiovirus	Encephalomyocarditis virus, Theilovirus
Aphthovirus	Equine rhinitis A virus, Foot and mouth disease virus, Bovine rhinitis B virus
Hepatovirus	Hepatitis A virus
Parechovirus	Human parechovirus, Ljungan virus
Erbovirus	Equine rhinitis B virus
Korbuvirus	Aichi virus, Bovine kobuvirus
Teschovirus	Porcine teschovirus
Sapelovirus	Porcine sapelovirus, Simian sapelovirus, avian sapelovirus
Senecavirus	Seneca Valley virus
Tremovirus	Avian encephalomyelitis virus
Avihepatovirus	Duck hepatitis A virus

### 1.2.1 Aufbau

Picornaviren haben keine Membranhülle und bilden mit Hilfe der vier viralen Proteine VP1-4 Nucleocapside mit einem Durchmesser von etwa 30 nm aus, die eine typische Ikosaeder-Struktur annehmen (**Abbildung 1.6a**). Manchmal enthalten die Viruspartikel mit VP0 ein weiteres Virusprotein, aus dem nach proteolytischer Spaltung die Proteine VP2 und VP4 erhalten werden. Die Virionen bestehen aus je 60 Einheiten der Proteine VP1-VP4. Die am Aufbau eines Protomers (**Abbildung 1.6b**) beteiligten drei Proteine VP1, VP2 und VP3 bilden die Oberfläche des Ikosaeders, VP4 ist an der Innenseite der Partikel lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert.

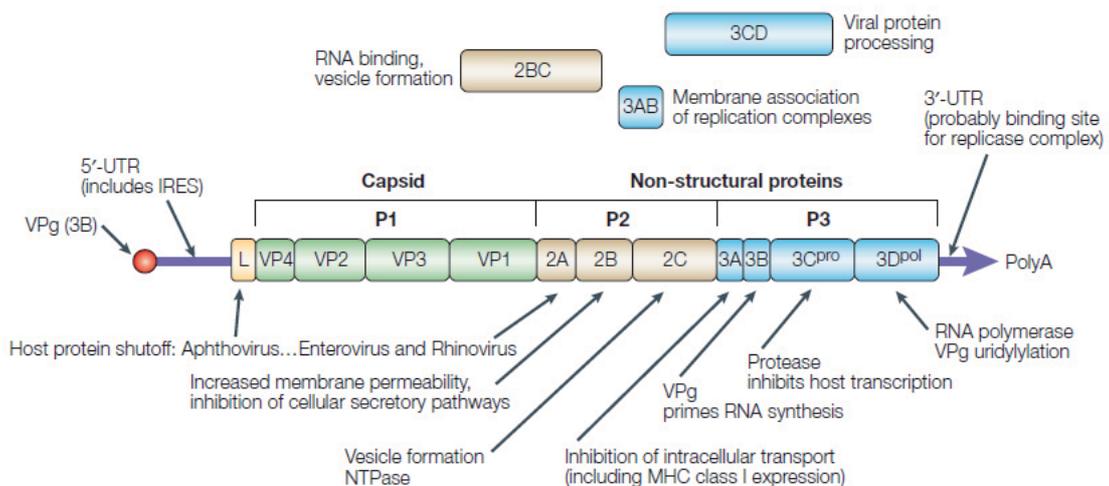


**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung eines Picornavirus-Partikel.** (Swiss Institute of Bioinformatics)

**a)** Die Oberfläche bilden die Virusproteine VP1, VP2 und VP3. Das Virusprotein VP4 liegt an der Innenseite und ist mit der Virus-RNA assoziiert. An das 5'-Ende der Virus-RNA ist ein kleines Virusprotein gebunden (VPg). **b)** Je ein VP1, VP2 und VP3 bilden ein Protomer.

Das einzelsträngiges Plus-Strang-RNA-Genom (+ ssRNA) von Picornaviren wird von zwei nicht-translatierten Bereichen (*untranslated region*, UTR), der 5'-UTR und der 3'-UTR, begrenzt (**Abbildung 1.7**). Es enthält einen einzigen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der für ein Vorläuferprotein codiert, welches bereits während seiner Synthese proteolytisch in die verschiedenen viralen Komponenten gespalten wird. Die 5'-UTR enthält einen Sequenzabschnitt, der die Aktivität einer *internal ribosome entry site* (IRES) hat. Diese ist durch die Bildung definierter Sekundärstrukturen gekennzeichnet und ermöglicht eine CAP-unabhängige Translation des Virusgenoms. Die Virus-RNA ist am 5'-Ende kovalent an ein kleines, viruscodiertes Protein (*viral protein genome linked*, VPg) gebunden, das 3'-Ende der genomischen RNA ist typischerweise polyadenyliert.

Die für das Vorläuferprotein codierende Sequenz wird in die drei Bereiche P1, P2 und P3 eingeteilt (**Abbildung 1.7**). P1 codiert ausschließlich für Capsid-Proteine, wobei einige (aber nicht alle) Genera ein zusätzliches als Leader bezeichnetes Protein (L-Protein) besitzen, das an der Stilllegung der Wirtszell-Proteinsynthese beteiligt ist. Dem P1-Bereich folgt P2, der für Nicht-Struktur-Proteine codiert und vor allem die Informationen für RNA-Bindung und die Vesikel-Ausbildung enthält. Der P3-Bereich trägt Gene für die RNA-Synthese und die Prozessierung der viralen Proteine.



**Abbildung 1.7:** Picornavirus-Genom, schematisch. (Whitton et al., 2005)

### 1.2.2 Reproduktionszyklus (*Life Cycle*)

Die Infektion einer Wirtszelle wird durch zelluläre Rezeptoren vermittelt (**Abbildung 1.8**). Für viele Picornaviren sind diese identifiziert und molekular gut charakterisiert. Sie binden bevorzugt an Oberflächenproteine, die der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie angehören. Ein Großteil der Serotypen des Rhinovirus (*major group*) interagieren zum Beispiel mit dem glycosylierten Zelloberflächenprotein ICAM (*intercellular adhesion molecule*, CD54), die zu den Enteroviren gehörenden Coxsackieviren binden an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), der ebenfalls Mitglied der Ig-Superfamilie ist. Coxsackieviren der Subgruppe B interagieren nicht nur mit CAR, sondern verwenden das Oberflächenprotein DAF (*decay accelerating factor*, CD55) als Co-Rezeptor. Die zelluläre Aufgabe von DAF ist der Schutz der Zellen vor der Lyse durch das Komplementsystem.

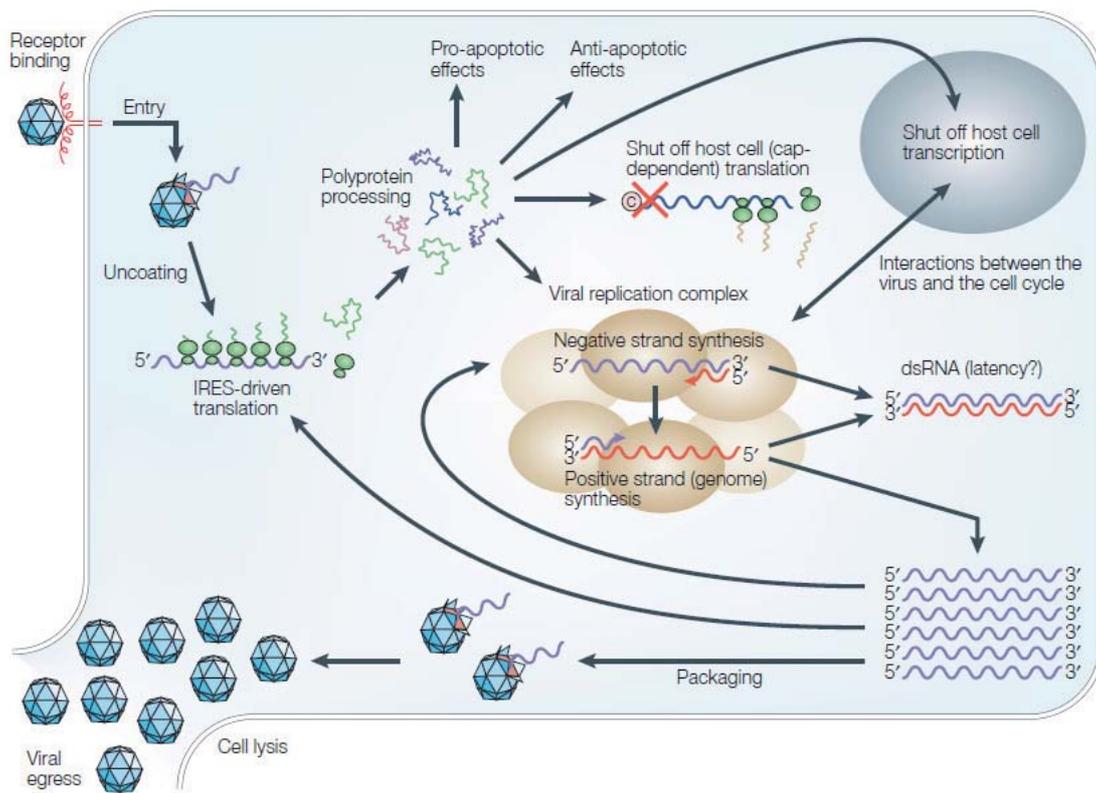


Abbildung 1.8: Picornavirus *Life Cycle*, schematisch. (Whitton et al., 2005)

Nach Adsorption an einen Rezeptor erfolgen strukturelle Umlagerungen des Viruscapsids, die letztlich zu einer Freisetzung der viralen RNA in die Wirtszelle führt. Sofort beginnt die IRES-abhängige Translation des Polyproteins und damit die Synthese viraler Proteine. Dabei wird auch die 3D RNA-abhängig RNA-Polymerase (RdRP, 3D<sup>Pol</sup>) synthetisiert, die das Plus-Strang-Genom in einen komplementären Minus-Strang umschreibt, der dann wiederum als Matrize für die Plus-Strang-Synthese dient. Bei der zellulären Nucleinsäure-Synthese tritt kein derartiger Prozess auf, da der Zelle die dafür notwendigen Enzyme fehlen. Daher ist es für Picornaviren essentiell, dass sie die RdRP selbst codieren und zu einem aktiven Enzym prozessieren. Die RdRP ist das am höchsten konservierte Polypeptid innerhalb der Familie der Picornaviren, allerdings erzeugt sie bei der Synthese von RNA-Strängen etwa einen Fehler pro 2000 Basen. Neu synthetisierte RNA-Plus-Stränge werden in Procapside verpackt, die aus VP1, VP3 und VP0 bestehen, wobei VP0 ein Vorläuferprotein von VP2 und VP4 ist. Nach einer initialen proteolytischen Spaltung werden die entstandenen Viruspartikel über Zelllyse freigesetzt.

### 1.2.3 Enteroviren

Humane Enteroviren werden in vier Spezies (A-D) unterteilt. Eine Infektion verursacht meist grippeähnliche Symptome, die mit Durchfall einhergehen kann. Die Übertragung erfolgt meist oral-fäkal, selten auch durch Tröpfcheninfektion. Schwere Infektionen mit Enteroviren sind selten, führen aber dann gehäuft zu Hirnhautentzündungen (Meningitis). Persistierende Enterovirus-Infektionen wurden vor allem bei Patienten mit erblichen oder erworbenen Immundefekten beobachtet.

Ein wichtiger Vertreter humaner Enteroviren ist das Coxsackievirus. Es ist nach der Stadt benannt, in der Gilbert Dalldorf im Jahr 1947 neugeborenen Mäusen virushaltiges Material spritzte und damit Lähmungserscheinungen bei den Tieren hervorrief. Einige Spezies innerhalb dieser Gattung können schwere Krankheiten auslösen, wie zum Beispiel Coxsackieviren der Subgruppe B. Diese Viren sind maßgeblich für die Entstehung der viralen Herzmuskelentzündungen (Myokarditis) verantwortlich (Baboonian et al., 1997). Bei Neugeborenen ist diese Form der Myokarditis oft tödlich und tritt meist bei einer Infektion während der Geburt auf, wenn die Mutter noch keine Antikörper gegen das Coxsackievirus gebildet hat. Neben der akuten Myokarditis wird auch eine chronische Verlaufsform (dilatative Kardiomyopathie, DCM) diskutiert, die vorwiegend bei erwachsenen Patienten auftritt und möglicherweise Folge einer persistierenden Coxsackievirus-Infektion ist (Chapman und Kim, 2008). Viele DCM-Patienten zeigen eine fortschreitende Herzinsuffizienz, die in der Folge auch häufig eine Herztransplantation notwendig macht.

Echoviren (*enteric cytopathic human orphan*) wurden erstmals 1951 aus Kindern mit einer nichtparalytischen Poliomyelitis (heute unter aseptischer Meningitis bekannt) isoliert (Robbins et al., 1951). Bis dato sind mehr als 20 Serotypen des Echovirus bekannt, die unterschiedliche Krankheitssymptome hervorrufen können. Am häufigsten treten aseptische Meningiten auf, die mit Kopfschmerzen, Fieber und Erbrechen einhergehen. Ausbrüche von Echoviren werden vor allem im Sommer und Herbst beobachtet, wo sie wahrscheinlich auch im Wasser übertragen werden. Der Mensch gilt als einzig bekanntes Reservoir. Bis heute sind nur einige Echovirus-Serotypen hinsichtlich ihrer Struktur und biochemischen Eigenschaften charakterisiert worden. So konnte zum Beispiel die Zellrezeptor-Virus-Interaktion der Echovirus-Serotypen 7 und 12, die die Grundlage für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle sind, bereits mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen weitestgehend aufgeklärt werden (He et al., 2002; Pettigrew et al., 2006). Man nahm an, dass viele, wenn nicht alle Echoviren den *decay accelerating factor* (DAF) als zellulären Rezeptor verwenden, um eine Zelle zu infizieren. Es sind jedoch eine Reihe von Arbeiten erschienen, die Zweifel an der Verwendung eines universalen Rezeptors

aufkommen ließen. So wurde gezeigt, dass zum Beispiel das Echovirus 1 an eine Unter-einheit des Integrins VLA-2 bindet (Bergelson et al., 1992; Bergelson et al., 1993). Andere Echoviren können möglicherweise DAF binden, verwenden aber einen anderen, noch unbekanntes Primär-Rezeptor (Powell et al., 1998).

Bis heute gibt es kaum Therapie-Optionen für die Behandlung von Picornavirus-Infektionen (Barnard, 2006). Eine Studie konnte den wirksamen Einsatz von Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) gegen eine enteroviral- (oder adenoviral)-assoziierte Form der DCM zeigen (Kuhl et al., 2003). Nach Behandlung wies das Myokard der Patienten keine Entero- oder Adenoviren mehr auf und wichtige Herz-Parameter verbesserten sich. Allerdings hat IFN- $\beta$  eine allgemeine immunstimulierende Wirkung und ist nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Virus, wie zum Beispiel das mit der DCM-assoziierte CVB3, gerichtet. Es ist daher notwendig, neue Therapieformen, wie beispielsweise RNAi-basierte, zu entwickeln, um in Zukunft gezielt Viruserkrankungen behandeln zu können.

## 2. Zielsetzung

Viruserkrankungen stellen ein stetig wachsendes medizinisches Problem dar, da es kaum wirksame und spezifische Behandlungsoptionen gibt. Die Inhibition von Viren mittels RNA-Interferenz (RNAi) hat sich in den letzten Jahren als ein neuer und vielversprechender therapeutischer Ansatz erwiesen. Allerdings fehlen trotz intensiver Forschung nach wie vor geeignete Methoden und Ansätze zur Inhibition einer Vielzahl klinisch relevanter Viren.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung neuer RNAi-Strategien gegen zwei wichtige Vertreter der Picornavirus-Familie:

1. Während ihrer Replikation liegt neben viraler Plus-Strang-RNA auch Minus-Strang-RNA in infizierten Zellen vor. Deshalb sollte zunächst am Beispiel des klinisch relevanten Coxsackievirus B3 (CVB3) geklärt werden, welcher der beiden Stränge inhibiert werden muss, um eine deutliche Reduktion der Viruslast zu erreichen.
2. Neben spezifischen RNAi-Strategien gegen das virale Genom bietet sich auch die Möglichkeit an, die Expression des entsprechenden zellulären Eintrittsrezeptors zu unterdrücken und so die Virusausbreitung zu verhindern. Mit Hilfe von siRNAs, die gegen den *Decay Accelerating Factor* (DAF) gerichtet waren, sollte untersucht werden, ob das Echovirus 30 (EV-30) den Rezeptor DAF benutzt, um in die Wirtszelle zu gelangen und ob durch die Unterdrückung der DAF-Expression ein signifikanter Schutz der Zellen vor EV-30 und seiner Verbreitung erreicht werden kann.
3. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Entwicklung einer Methode, mit deren Hilfe schnell und kostengünstig hochwirksame antivirale siRNAs erhalten werden können. Dabei sollten durch die Kombination von bekannten Kriterien siRNAs erhalten werden, die erfolgreich die Replikation des EV-30 verhindern können, indem die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) inhibiert wird. Für eine mögliche therapeutische Anwendung sollte ein effizientes Delivery-System auf Basis von AAV-Vektoren etabliert werden, das die zelluläre Expression einer oder mehrerer siRNAs in Form von *short hairpin* RNA (shRNA) ermöglicht. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Vereinfachung der Kombination von shRNA-Expressions-kassetten, die sowohl gegen virale Zielsequenzen als auch gegen zelluläre, für das Virus essentielle, Faktoren gerichtet sind. Damit sollte verhindert werden, dass antivirale siRNAs durch Mutationen in der Zielsequenz unwirksam werden und so das Auftreten von *Escape*-Mutanten begünstigen.

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Geräte

Blotapparatur	Semi-Dry Electroblotter SEDEC M (Peqlab, Erlangen) TransBlot SD Semi-Dry (Bio-Rad, München)
Brutschrank	Heracell (Heraeus-Kendro, Langenselbold) C150 (Binder, Tuttlingen)
Durchflusszytometrie	Beckmann Coulter Epics XL MCL (Beckmann, Krefeld)
Elektrophorese	Agarosegel- und PAGE-Kammern (Bio-Rad, München)
Fluoreszenzmikroskop	IX50 S1F (Olympus, Hamburg) Axiovert 200 M (Carl Zeiss, Jena)
Geldokumentation	Quantity One (Bio-Rad, München)
Heiz-/Thermoblock	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
Luminometer	TD 20/20 (Promega, Mannheim)
Mikroplatten-Reader	Sunrise (Tecan, Crailsheim)
Spektrophotometer	HP8452 (Hewlett Packard, Böblingen) NanoPhotometer (Implen, München)
Thermocycler	UNO II Thermoblock (Biometra, Göttingen) 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Darmstadt) Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim)
Zellkulturbank	Herasafe (Heraeus-Kendro, Langenselbold)
Zentrifugen	Tischzentrifuge (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) Kühlzentrifuge J2-21 (Beckmann, München) Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B Plus (Thermo Fisher Scientific) Sigma 3-16(P)K (Sigma, Osterode am Harz) Heraeus Fresco (Thermo Fisher Scientific)
Ultrazentrifugen	Beckmann (München) und Sorvall (Thermo Fisher Scientific)

### 3.1.2 Chemikalien

Standardchemikalien und Labormaterialien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Nunc (Wiesbaden), Greiner Bio-One (Essen), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Roche (Mannheim) oder Sigma-Aldrich (München). Die Medien für die Zellkultur stammten von der Firma PAA Laboratories (Coelbe).

### 3.1.3 Enzyme und Molekularbiologische Kits

Alle Enzyme und Molekularbiologischen Kits wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Plasmid-Isolation	Qiagen (Hilden), Amersham/GE Healthcare (Freiburg) Macherey-Nagel (Düren), Invitex (Berlin)
DNA-Ligation	Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Frankfurt/Main) Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas, St. Leon-Rot)
DNaseI	RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Mannheim)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant Promega (Mannheim)
Taq-Polymerase	Roboklon (Berlin), Promega (Mannheim)
PCR-Aufreinigung	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Gel-Extraktion	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), Qiagen (Hilden) Macherey-Nagel (Düren)
Dual-Luciferase-Assay	Promega (Mannheim)
ECL-Western Blotting Substrat	Pierce/Thermo Fisher Scientific
qPCR Master Mix	SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt) LightCycler DNA Master SYBR Green (Roche, Mannheim)
Zellviabilitäts-Assay	Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Mannheim)

### 3.1.4 Molekulargewichtsmarker

- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 1 kb DNA Ladder und 25 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- DNA Molecular Weight Marker XIV, 100-1500 bp (Roche, Mannheim)

### 3.1.5 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- *E. coli* One Shot Stbl3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

### 3.1.6 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

- LB-Medium: 1% w/v Bacto-Trypton, 0,5% w/v Hefeextrakt, 1% w/v NaCl  
Das Medium wurde 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Selektion transformierter *E. coli* wurden 100 µg/ml Ampicillin zugefügt.
- LB-Agar: LB Medium + 1,5% v/w Agar

### 3.1.7 Medien für die Molekularbiologie

- 10× TBE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): 1 M Tris, 900 mM Boric Acid, 10 mM EDTA
- DNA-Auftragspuffer: 1× TBE und Glycerin im Verhältnis 1:1, 0,1% w/v Bromphenolblau
- Agarosegelelektrophorese-Laufpuffer: 1× TBE

### 3.1.8 Puffer und Lösungen für den Western Blot

- 4× Upper Gel Buffer (UgB): 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 4× Lower Gel Buffer (LgB): 375 mM Tris-HCl (pH 8,8)
- 30% AMBA: Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1  
(Carl Roth, Karlsruhe)
- SDS-Laufpuffer: 1× Ratiophorese SDS-PAGE, 1:10 Verdünnung (Carl Roth, Karlsruhe)
- Lysispuffer: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% w/v SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0,01% w/v Bromphenolblau
- SemiDry Blot Puffer: 47,9 mM Tris, 38,9 mM Glycin, 10% Tween 20, 0,038% w/v SDS, 20% Methanol
- Ponceau-Rot: 0,2% Ponceau S, 3% Essigsäure
- TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
- TTBS: TBS + 0,1% Tween 20
- 5% Blotto: 5% Magermilchpulver in TBS

- Polyacrylamid-Gele:

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12,5%	15%	4%
H <sub>2</sub> O	4,2 ml	3,3 ml	2,5 ml	6,2 ml
4× LgB	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
4× UgB	-	-	-	2,5 ml
30% AMBA	3,3 ml	4,2 ml	5,0 ml	1,3 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	40 µl	30 µl	200 µl
TEMED	15 µl	12 µl	10 µl	20 µl

### 3.1.9 Lösungen für den Iodixanol-Gradienten

- PBS-MK: 1× PBS, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5M NaCl
- 0,5% Phenolrot (Carl Roth, Karlsruhe) in PBS-MK
- 60% Iodixanol-Lösung (OptiPrep Density Gradient Medium, Sigma-Aldrich, München)
- Herstellung der Iodixanol-Lösungen:

	Iodixanol-Lösung			
	15%, 1 M NaCl	25%	40%	54%
PBS-MK	27,5 ml	28 ml	16,5 ml	5 ml
60% Iodixanol-Lösung	12,5 ml	20 ml	33 ml	45 ml
5 M NaCl	10 ml	-	-	-
0,5% Phenolrot	-	500 µl	-	150 µl
Gesamtvolumen	50 ml	48,5 ml	49,5 ml	50,15 ml

Die Iodixanol-Lösungen wurden, wie in **Abbildung 3.4** dargestellt, mit einer sterilen Kanüle in einem OptiSeal-Röhrchen (Beckmann Coulter, Krefeld) unterschichtet.

## 3.2 Oligonucleotide und siRNAs

Primer wurden von Tib Molbiol (Berlin) synthetisiert, längere Oligonucleotide wurden von Purimex (Grevenstein) bezogen. Die siRNAs gegen humanes DAF (**Tabelle 3.3**) wurden als *SMARTpool package* auf Basis der Dharmacon-Kriterien bezogen (Dharmacon, jetzt Thermo Fisher Scientific). Alle weiteren siRNAs mit symmetrischen Überhängen kamen, sofern nicht anders angegeben, von Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Die Kontroll-siRNA, die keine Homologien zur einer Zielsequenz des menschlichen Genoms hat, wurde von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

### 3.2.1 siRNA-Sequenzen

Die in den eckigen Klammern angegebenen Desoxythymidine stellen die Überhänge der siRNA dar.

Die verwendete Kontroll-siRNA (Qiagen, Hilden), die keine Homologien zu Zielsequenzen des humanen Genoms aufweist, hatte folgende Sequenz:

Strang 1: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U [TT] -3'

Strang 2: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A [TT] -3'

**Tabelle 3.1: siRNAs gegen die RdRP des EV-30.** (GenBank Acc. No. AF311938)

Name		siRNA-Sequenz	Position im Genom
siRdRP1	S:	AUU AGC AAC UCU CGA UAU C [TT]	6203-6221
	AS:	GAU AUC GAG AGU UGC UAA U [TT]	
siRdRP2	S:	ACU UGA GGA UGC AGU AUA C [TT]	6239-6257
	AS:	GUA UAC UGC AUC CUC AAG U [TT]	
siRdRP3	S:	AAA GAC CUG GCG AAA UUG A [TT]	6357-6375
	AS:	UCA AUU UCG CCA GGU CUU U [TT]	
siRdRP4	S:	AAA GGC UAU GGU UUG AUA A [TT]	6996-7014
	AS:	UUA UCA AAC CAU AGC CUU U [TT]	
siRdRP5	S:	UAA GGA GAC UAA CUA CAU A [TT]	6731-6749
	AS:	UAU GUA GUU AGU CUC CUU A [TT]	
siRdRP6	S:	GCU UAU GGU GAU GAC GUU A [TT]	6927-6945
	AS:	UAA CGU CAU CAC CAU AAG C [TT]	

**S:** Sense-Strang, **AS:** Antisense-Strang

**Tabelle 3.2: siRNAs gegen die RdRP des CVB3.** (*GenBank Acc. No. M33854*)

Name	siRNA-Sequenz (5'-3')	Position im Genom
CVB3-siRdRP2	CUA AGG ACC UAA CAA AGU U [TT]	6315-6333
	AAC UUU GUU AGG UCC UUA G [TT]	
siRev1	GUA AUC AAA UGC UAU GAG A [TT]	6594-6612
	UCU CAU AGC AUU UGA UUA C [TT]	
siRev2	UAC CAG CUU CAG CGA GUA A [TT]	6937-6955
	UUA CUC GCU GAA GCU GGU A [TT]	
siRev3	UAG CAU UAG UGU CCU AAU U [TT]	6825-6843
	AAU UAG GAC ACU AAU GCU A [TT]	

Das *SMARTpool package* der Firma Dharmacon enthielt DAF-spezifische siRNAs (**Tabelle 3.3**) mit symmetrischen UU (RNA)-Überhängen, die für initiale Screening-Experimente verwendet wurden. Für nachfolgende Experimente wurden die siRNAs mit symmetrischen TT (DNA)-Überhänge bei der Firma Eurofins MWG Operon nachbestellt. Dabei wurden keine Effizienz-Unterschiede zwischen beiden Überhängen festgestellt.

**Tabelle 3.3: siRNAs gegen DAF.** (*GenBank Acc. No. NM\_000574*)

Name	siRNA-Sequenz	Position im Genom
siDAF2	S: GAA GAG UUC UGC AAU CGU A [NN]	517-535
	AS: UAC GAU UGC AGA ACU CUU C [NN]	
siDAF3	S: UAA CAC AGG GUA CAA AUU A [NN]	816-834
	AS: UAA UUU GUA CCC UGU GUU A [NN]	
siDAF5	S: GGC AGU CAA UGG UCA GAU A [NN]	496-514
	AS: UAU CUG ACC AUU GAC UGC C [NN]	
siDAF6	S: AAU ACG AAA UGG UCA GAU U [NN]	750-768
	AS: AAU CUG ACC AUU UCG UAU U [NN]	

**S:** Sense-Strang, **AS:** Antisense-Strang

**[NN]:** UU oder TT

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Konzentrationsbestimmungen

Plasmid-Konzentrationen wurden durch zwei unabhängige Messungen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer HP8452 bestimmt. Dabei wurde näherungsweise angenommen, dass 1 OD = 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Nach der Anschaffung des NanoPhotometers (Implen) wurden die Plasmid-Konzentrationen nach einem optischen Verfahren des Gerätes bestimmt.

#### 3.3.2 Klonierungen

##### *Coxsackievirus B3-RdRP in Plus-Strang- bzw. Minus-Strang-Orientierung*

Für die Klonierung der Coxsackievirus B3 (CVB3)-RdRP in Plus-Strang- bzw. in Minus-Strang-Orientierung in den psiCHECK-2-Vektor (Promega, Mannheim) wurde der Vektor pcDNA3.1/NT-GFP-CVB3-RdRP verwendet, der die cDNA der viralen RdRP des CVB3 in Plus-Strang-Orientierung enthielt (Schubert et al., 2005a). Für eine Amplifikation in Plus-Strang-Orientierung wurden die PCR-Primer CCG CTC GAG AGG TGA AAT AGA ATT TAT TG und ATA GTT TAG CGG CCG CAA AGG AGT CCA ACC verwendet. Für eine Amplifikation in Minus-Strang-Orientierung wurden die PCR-Primer CCG CTC GAG AAA GGA GTCCAA CCA CTT CC und ATA GTT TAG CGG CCG CAG GTG AAA TAG AAT TTA TTG verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Not*I geschnitten und in die *multiple cloning site* (MCS) des psiCHECK-2-Vektors ligiert und befanden sich damit in der 3'-UTR des Renilla-Luciferase-Gens (**Abbildung 4.2**).

##### *Echovirus 30-RdRP in Plus-Strang-Orientierung*

Die 1386 Basen lange Sequenz der RdRP des EV-30 wurde mittels Vergleich homologer Bereiche des Echovirus 7 bestimmt. Die cDNA der RdRP des EV-30 wurde durch reverse Transkription und Amplifikation viraler RNA erhalten. Dafür wurden die PCR-Primer TGA GGT GAA ATC GAA TTC ATT und AAA AGA GTC TAG CCA CTT CC verwendet, die den Basen 5952-5969 beziehungsweise 7337-7318 der EV-30 Sequenz entsprechen (*GenBank Accession No.* AF311938). Die Klonierung der cDNA in den Vektor pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO (Invitrogen) erfolgte nach Herstellerangaben.

In vorangegangenen Versuchen konnte eine erhöhte GFP-Expression beobachtet werden, wenn ein translationales Stopp-Codon *upstream* der Ziel-Sequenz eingefügt wurde. Diese Sequenz (TGA) ist in den PCR-Primern unterstrichen.

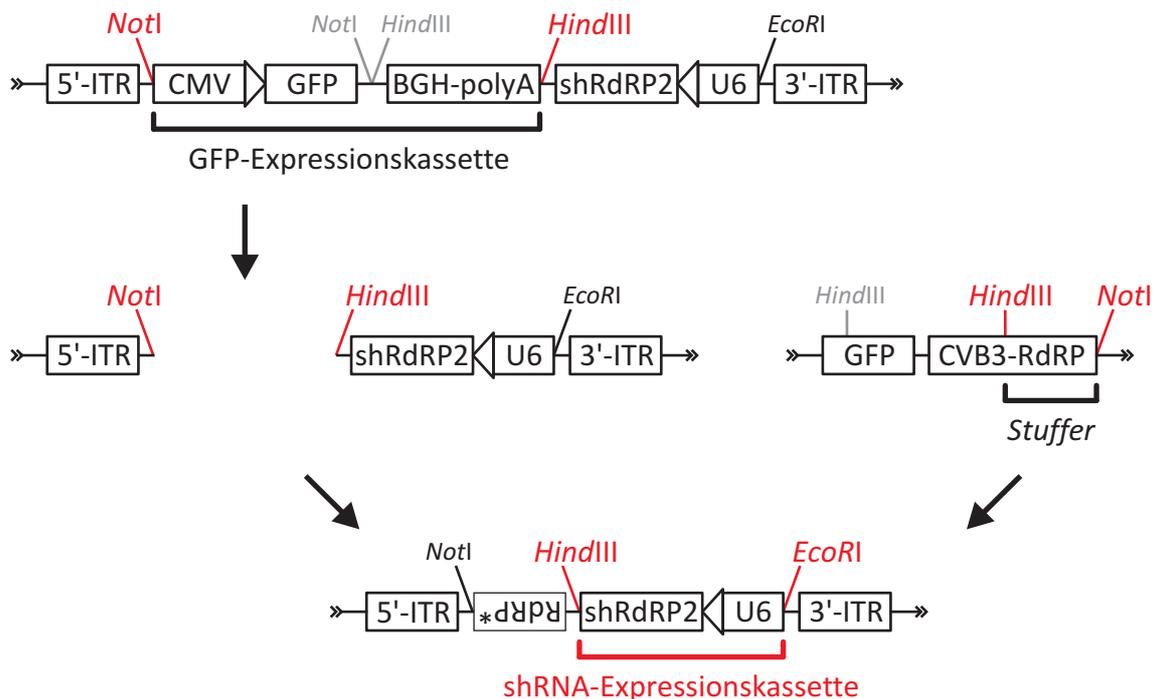
### cDNA des humanen DAF

Die codierende Sequenz von DAF wurde durch reverse Transkription und Amplifikation von HeLa-RNA erhalten. Dafür wurden die PCR-Primer TGA ATG ACC GTC GCG CGG CCG und CTA AGT CAG CAA GCC CAT GG verwendet, die den Basen 247-264 beziehungsweise 1392-1373 der human DAF mRNA-Sequenz entsprechen (*GenBank Accession No.* NM\_000574). Die Klonierung der cDNA in den Vektor pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO (Invitrogen) erfolgte nach Herstellerangaben.

Wiederum wurde ein translationales Stopp-Codon *upstream* der Ziel-Sequenz eingefügt, um die GFP-Expression zu verstärken.

### Shuttle-Plasmid für die AAV-Vektorproduktion

Das Original-*Shuttle*-Plasmid (pscAAV-GFP) für die AAV-Vektorproduktion (Fechner et al., 2008) wurde zunächst modifiziert, indem die GFP-Expressionskassette (CMV-Promoter, GFP-Sequenz und BGH-PolyA) unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *NotI* und *HindIII* gegen eine 657 bp lange *Stuffer*-Sequenz ausgetauscht wurde (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1: Klonierung des Shuttle-Plasmids für die AAV-Vektorproduktion.**

Die GFP-Expressionskassette wurde aus dem Original-*Shuttle*-Plasmid *pscAAV-GFP* (Fechner et al., 2008) entfernt und durch eine 657 Basenpaare lange *Stuffer*-Sequenz (RdRP\*), die aus dem Vektor pcDNA3.1/NT-GFP-CVB3-RdRP stammt (Schubert et al., 2005a) ersetzt.

ITR: *inverted terminal repeat*, CMV: Promotor des Cytomegalie-Virus (human), GFP: Grün fluoreszierendes Protein, BGH-PolyA: Polyadenylierungssignal des *Bovine growth hormone*

Diese stammte aus dem bereits genannten Vektor pcDNA3.1/NT-GFP-CVB3-RdRP und ist nicht funktionell. Das resultierende Plasmid enthielt neben der *Stuffer*-Sequenz weiterhin die shRNA-Expressionskassette des pscAAV-GFP (muriner U6-Promotor und CoxB3 RdRP2-shRNA), welche nachfolgend über die beiden Schnittstellen *EcoRI*- und *HindIII* gegen shRNA-Expressionskassetten gegen die RdRP des EV-30 beziehungsweise gegen humanes DAF ausgetauscht werden konnten.

### 3.3.3 Primer Extension

Der ssDNA-Pool, bestehend aus je 50 pmol der sechs Oligo-Templates (**Tabelle 3.4**), wurde mit 20 pmol des Universal-Primers versetzt und der Gesamtansatz für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Annealing-Reaktion erfolgte durch nachfolgendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur. Nachfolgend wurden 5 Units der Phi29-Polymerase (New England Biolabs, Mannheim) zur Annealing-Reaktion gegeben und mit 1× Phi29-Polymerase-Puffer, 200 µM dNTPs und 200 µg/ml BSA zu einem 20 µl-Ansatz ergänzt. Dieser wurde 10 Minuten bei 30°C im Thermoblock inkubiert (Extension-Reaktion) und die Phi29-

**Tabelle 3.4: Oligonucleotid-Sequenzen für die parallele Klonierung.**

DNA-Sequenzen, die für den Sense- und Antisense-Strang der shRNA codieren, sind fett hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'-3')
shRdRP1	GCGCGGATCCC <b>ATTAGCAACTCTCGATATCTTCAAGAGAGATATCGAGAGTTGCTAAT</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
shRdRP2	GCGCGGATCCC <b>ACTTGAGGATGCAGTATACTTCAAGAGAGTATACTGCATCCTCAAGT</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
shRdRP3	GCGCGGATCCC <b>AAAGACCTGGCGAAATTGATTCAAGAGATCAATTCGCCAGGTCTTT</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
shRdRP4	GCGCGGATCCC <b>AAAGGCTATGGTTTGATAATTCAAGAGATTATCAAACCATAGCCTTT</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
shRdRP5	GCGCGGATCCC <b>GTAAGGAGACTAACTACATATTCAAGAGATATGTAGTTAGTCTCCTTA</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
shRdRP6	GCGCGGATCCC <b>GCTTATGGTGATGACGTTATTCAAGAGATAACGTCATCACCATAAGC</b> TTTTTTGGAACAATTGAAGCTT
Universal-Primer: CGCGAAGCTTCAATTGTTCC	

Polymerase anschließend 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Der hergestellte dsDNA-Pool wurde 20 Stunden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III bei 37°C geschnitten. Der Vektor *pSilencer2.1 neo-stuffer* (**Anhang 1**) wurde zwei Stunden bei 37°C mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in einem 1%igen Agarosegel, das 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und der so linearisierte Vektor mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) eluiert. Die anschließende Ligation von linearisiertem *pSilencer2.1 neo* mit dem geschnittenen dsDNA-Pool erfolgte mit der T4-Quick-Ligase (New England Biolabs, Mannheim) nach Herstellerangaben. Die Transformation erfolgte in *One Shot TOP10* kompetente *E. coli* Bakterien.

### 3.3.4 Baustein-Klonierungen

Die für die Baustein-Klonierungen verwendete shDAF2-Expressionskassette stammte aus dem Vektor *pSilencer 2.1 neo-shDAF2* (**Anhang 1**). Dieser Vektor wurde nach Protokoll des Herstellers (Ambion, jetzt Applied Biosystems) für die Klonierung von shRNA-codierenden Sequenzen in den *pSilencer2.1-U6 neo* hergestellt. Folgende Oligonucleotide wurden dafür verwendet:

a) 5'-GATCCC**GAAGAGTTCTGCAATCGT**ATTCAAGAGAT**ACGATTGCAGAACTCTTCTTTTTT**GGACAATTGA-3'

b) 5'-AGCTTCAATTGTTCCAAAAAGAAGAGTTCTGCAATCGTATCTCTTGAATACGATTGCAGAACTCTTCG-3'.

Die DNA-Sequenzen, die für den Sense- und Antisense-Strang der shRNA (shDAF2) codieren, sind fett hervorgehoben. Der *pSilencer2.1-U6 neo* Vektor, der für eine Kontroll-shRNA exprimiert, die keine Homologien zu Zielsequenzen des humanen Genoms aufweist, wurde ebenfalls von der Firma Ambion bezogen. Die DNA-Sequenzen, die für den Sense- und Antisense-Strang der Kontroll-shRNA codieren, sind in der Plasmid-Karte (**Anhang 1**) dargestellt.

### 3.3.5 Transformationen

*Allgemein (Reporter-Plasmide, Shuttle-Plasmide für die AAV-Vektorproduktion etc.)*

Pro Transformation wurde ein 100 µl Bakterien-Aliquot (*E. coli* One Shot TOP10 oder Stbl3) auf Eis aufgetaut und dieses anschließend mit 1,5 µl einer 1,42 mM β-Mercaptoethanol-Lösung versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis von 20 Minuten. Anschließend wurde der Ligationsansatz (2 µl) hinzugegeben. Es folgte eine weitere 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 60 Sekunden bei 42°C. Nachdem die Bakterien

für 3 Minuten auf Eis inkubiert wurden, folgte die Zugabe von 700 µl LB-Medium. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Minuten horizontal im Thermoblock geschüttelt (200 rpm) und danach pelletiert (5 Minuten, 6000g). Etwa 700 µl des Überstandes wurden abgenommen und die Bakterien konnten in dem verbliebenen Medium resuspendiert werden. Dieser Ansatz wurde auf LB-Agar Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### *Primer Extension*

In Anlehnung an das allgemeine Transformationsprotokoll (**Abschnitt 3.4.1**) wurden 1,5 bis 2 µl eines Ligationsansatzes zu je 50 µl *E. coli* One Shot TOP10 (aus TOPO-TA Cloning Kit) gegeben, die zuvor auf Eis aufgetaut wurden. Der Ansatz wurde 15 bis 25 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C und die nachfolgende Zugabe von 250 µl LB-Medium. Nachdem die Bakterien mindestens ein halbe Stunde horizontal im Thermoblock geschüttelt wurden (200 rpm), konnte der Transformationsansatz auf LB-Agar Platten, die das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden.

#### **3.3.6 Colony-Screening**

Um zu überprüfen, ob eine Bakterien-Kolonie das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthält, wurden neben Testrestriktionen auch Colony-PCRs durchgeführt. Dafür wurden die gepickten Klone in je 60 µl 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen. Von dieser Lösung wurden je 2 µl für eine nachfolgende PCR eingesetzt.

Der Ansatz für die Colony-PCR von Bakterien-Kolonien, die aus der Klonierung nach Primer Extension (**Abschnitt 3.3.3**) erhalten wurden, enthielt 1 Unit der Taq-Polymerase, einen Puffer mit einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 1,5 mM, 200 µM dNTPs und je 250 pmol der Primer *T7 Promotor*: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG und *pSirevSeqPr*: AGG CGA TTA AGT TGG GTA. Für eine anschließende DNA-Isolation wurden 45 µl der NaCl-Lösungen zu 3 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben und die transformierten Bakterien bei 37°C und 200 rpm über Nacht vermehrt.

#### **3.3.7 DNA-Plasmid-Isolation aus Bakterien**

Die Plasmid-Isolationen geringer Mengen an DNA erfolgten aus 1 bis 2 ml Bakterienkultur mit dem *GFX Micro-Plasmid-Prep-Kit* (Amersham) oder dem *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (Invitek). Die Plasmid-Isolationen größerer Mengen an DNA erfolgte aus 100 bis 200 ml Bakterien-Kultur mit dem *QIAfilter Midi Plasmid Kit* (Qiagen) oder mit dem *NucleoBond Xtra Midi Plus* (Macherey-Nagel).

### 3.3.8 RNA-Isolation und reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für den Nachweis der DAF-Expression wurde zunächst Gesamt-RNA aus transfizierten und nicht-transfizierten RD-Zellen (siehe **Abschnitt 3.4.3**) mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert. Anschließend wurde die isolierte RNA mit DNaseI (Promega, Mannheim) nach Herstellerprotokoll behandelt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen.

Die cDNA (*complementary DNA*), die als Ausgangsmaterial für die PCR benötigt wird, kann mit Hilfe einer Reversen Transkriptase erhalten werden, ein virales Enzym, das anhand einer RNA-Matrize DNA synthetisieren kann. Dafür wurde die RNA mit 0,25 µM Primer *CD55rev2*: 5'-CTA AGT CAG CAA GCC CAT GG-3' für 5 Minuten bei 70°C und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 200 Units der Reversen Transkriptase, dNTPs und Puffer nach Herstellerangaben (Promega, Mannheim) hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte für eine Stunde bei 55°C. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert und die cDNA konnte anschließend für die *Real-time* quantitative PCR (**Abschnitt 3.3.9**) verwendet werden.

### 3.3.9 *Real-time* quantitative PCR

Die *Real-time* quantitative PCR ist eine moderne Methode zur Quantifizierung von DNA, wobei die Amplifikation der DNA in „Echtzeit“ geschieht. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR green* verwendet, der unspezifisch in dsDNA eingebaut wird. Dadurch kann anhand der Zunahme des Fluoreszenz-Signals die Zunahme an Produkten (amplifizierte DNA-Fragmente) detektiert werden. In der frühen Phase der PCR werden die DNA-Fragmente exponentiell vermehrt, während sich der Prozess zu einem linearen Wachstum verlangsamt, wenn das Produkt akkumuliert. In der späten Phase der PCR sind die störenden Einflüsse so groß, dass die Amplifikation zum Stillstand kommt. Für eine Quantifizierung eignet sich die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt, aber die Vermehrung der DNA-Fragmente noch exponentiell ist: Dies ist der sogenannte  $C_t$ -Wert (*Cycle of threshold*).

#### *Nachweis der DAF-Expression auf RD-Zellen*

Aus der Amplifikation der aus RNA-Isolation und reverser Transkription erhaltenen cDNA (**Abschnitt 3.3.8**) konnten Rückschlüsse auf die Expression von DAF-mRNA auf RD-Zellen gezogen werden. Dafür wurde die cDNA mit je 0,25 µM der Primer *CD55fw\_qP*: 5'-TGG CCT TCC CCC AGA TGT A-3' und *CD55rev\_qP*: 5'-GAA AAC TTG TAC GGC CTT CCA A-3' unter Zugabe des *SYBR Green* PCR Master Mix amplifiziert.

### 3.4 Zellkulturmethoden

#### 3.4.1 Zelllinien

- Cos-7: African green monkey kidney, ACC 60 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig)
- HEK293: Human embryonal kidney, ACC 305 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig)
- HEK293FT: Human embryonal kidney, expressing simian virus 40 (SV40) large T antigen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- HeLa: Human cervix carcinoma, ACC57 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig)
- HeLa (Wis): Human cervix carcinoma, Wisconsin strain (Dr. R. Rueckert, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)
- RD: Human rhabdomyosarcoma, CCL-136 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)

#### 3.4.2 Zellkultur

Cos-7-, HeLa- und RD-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) kultiviert, das zusätzlich 10% fötales Kälberserum (FKS), 2 mM Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren und die Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) enthielt.

HEK293- und HEK293FT-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) mit einem erhöhten Glucosegehalt von 4,5 g/l kultiviert, das zusätzlich 10% FKS, 2 mM Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren und die Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) enthielt.

Alle verwendeten Zelllinien (**Abschnitt 3.4.1**) wuchsen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.4.3 Transfektionen

*Cotransfektion eines Luciferase-Reporter-Plasmids (CVB3-RdRP in Plus-Strang- oder Minus-Strang-Orientierung) mit siRNAs gegen die CVB3-RdRP*

Es wurden je  $7 \times 10^4$  Cos-7-Zellen pro Vertiefung in 500 µl Antibiotika-freiem Medium in 24 *well*-Platten eingesät. 20-24 Stunden später wurden je 0,8 µg Reporter-Plasmid (psiCHECK-2-Vektor mit der RdRP des CVB3 in Plus-Strang- oder in Minus-Strang-Orientierung) mit verschiedenen Konzentrationen der in **Tabelle 3.2** angegebenen siRNAs cotransfiziert. Dafür wurde pro Transfektion 2,5 µl Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 47,5 µl OptiMEM vermischt und dieser Ansatz für 5 Minuten

stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 50 µl OptiMEM gegeben, das auch Reporter-Plasmid und gegebenenfalls eine siRNA enthielt. Der Gesamtansatz (100 µl) wurde für mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten Cos-7-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

*Cotransfektion eines GFP-Reporter-Plasmids (EV-30-RdRP in Plus-Strang-Orientierung) mit siRNAs gegen die RdRP des EV-30*

Es wurden je  $7 \times 10^4$  Cos-7-Zellen oder  $1,5 \times 10^5$  RD-Zellen pro Vertiefung in 500 µl Antibiotika-freiem Medium in 24 well-Platten eingesät. 20-24 Stunden später wurden 0,8 µg des Reporter-Plasmids (pcDNA3.1 NT-GFP mit der RdRP des EV-30) mit den in **Tabelle 3.1** angegebenen siRNAs cotransfiziert. Dafür wurde pro Transfektion 2 µl Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 48 µl OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vermischt und dieser Ansatz für 5 Minuten stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 50 µl OptiMEM gegeben, das das Reporter-Plasmid und gegebenenfalls eine siRNA enthielt. Der Gesamtansatz (100 µl) wurde für mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten Cos-7-Zellen oder RD-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

*Cotransfektion eines GFP-Reporter-Plasmids (EV-30-RdRP in Plus-Strang-Orientierung) mit shRNA-exprimierenden Plasmiden gegen die RdRP des EV-30 (paralleles Klonieren)*

Es wurden je  $1,5 \times 10^5$  RD-Zellen pro Vertiefung in 500 µl Antibiotika-freiem Medium in 24 well-Platten eingesät. Einen Tag später wurden 0,4 µg des Reporter-Plasmids (pcDNA3.1 NT-GFP\* mit der RdRP des EV-30) mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden, die aus parallelem Klonieren (**Abschnitt 4.3**) hervorgingen und gegen die RdRP des EV-30 gerichtet waren, cotransfiziert. Dafür wurde pro Transfektion 1,5 µl Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 48,5 µl OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vermischt und dieser Ansatz für 5 Minuten stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 50 µl OptiMEM gegeben, das das Reporter-Plasmid und gegebenenfalls einen shRNA-exprimierenden Vektor enthielt. Der Gesamtansatz (100 µl) wurde mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten RD-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Bei dem Reporter-Plasmid pcDNA3.1 NT-GFP\* handelt es sich um eine modifizierte Variante des Reporter-Plasmids pcDNA3.1 NT-GFP. Die GFP-Expressionskassette wurde gegen ein EmGFP (*Emerald green fluorescent protein*) ausgetauscht.

### *Cotransfektion eines GFP-Reporter-Plasmids (EV-30-RdRP in Plus-Strang-Orientierung) mit shRNA-Doppelexpressions-Plasmiden (Bausteinprinzip)*

Es wurden je  $1 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium in 24 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Cotransfektion, die prinzipiell so erfolgte, wie sie für shRNA-exprimierende Plasmide (paralleles Klonieren) beschrieben wurde.

### *Cotransfektion eines GFP-Reporter-Plasmids (DAF-cDNA) mit siRNAs gegen DAF*

Es wurden je  $1 \times 10^5$  RD-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium in 24 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später wurden 0,8  $\mu$ g des Reporter-Plasmids (pcDNA3.1 NT-GFP mit der DAF-cDNA) mit den in **Tabelle 3.3** angegebenen siRNAs cotransfiziert. Dafür wurde pro Transfektion 2  $\mu$ l Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 48  $\mu$ l OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vermischt und dieser Ansatz für 5 Minuten stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 50  $\mu$ l OptiMEM gegeben, das das Reporter-Plasmid und gegebenenfalls eine siRNA enthielt. Der Gesamtansatz (100  $\mu$ l) wurde für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten RD-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.4.4 Transduktionen**

Es wurden je  $1 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Medium mit Antibiotika in 24 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transduktion mit den shRNA-exprimierenden AAV-Vektoren. Dafür wurden diese mit Medium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Virusgenomen/ $\mu$ l (Vg/ $\mu$ l) verdünnt, und es folgte die Zugabe von 10  $\mu$ l pro *well* (entspricht 1000 Vg/Zelle) oder 50  $\mu$ l pro *well* (entspricht 5000 Vg/Zelle). Anschließend wurden die Zellen 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **3.5 Proteinchemische Methoden**

### **3.5.1 Western Blot**

Als Western Blot bezeichnet man den Transfer von Proteinen auf eine (Träger-)Membran. Die Visualisierung bestimmter Proteine kann nach Transfer über eine Immundetektion erfolgen. Dafür wird die Membran zunächst mit einem, für das zu visualisierende Antigen spezifischen, Primär-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem

Sekundär-Antikörper, der an den Fc-Teil des Primär-Antikörpers binden kann (siehe auch **Abbildung 3.2**). Durch Kopplung an Enzyme oder Substrate kann hierüber die Detektion erfolgen.

Nach erfolgter Transfektion oder Transduktion der Zellen (**Abschnitt 3.4.3** oder **Abschnitt 3.4.4**) wurde das Medium vollständig abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und mit je 30  $\mu$ l Lysispuffer aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Nach der Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden diese mittels Blotapparatur auf eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham/GE Healthcare) übertragen. Nach Waschen und Blocken der Membran folgte eine Inkubation mit einem primären Antikörper in TTBS (siehe **Tabelle 3.6** für eingesetzte Primär- und Sekundär-Antikörper und ihre Verdünnungen). Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert war, inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz (ECL Western Blotting Substrat, Pierce/Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurde die Membran durch Waschen mit TTBS gestrippt und konnte mit einem Antikörper gegen Actin inkubiert werden. Der dazu verwendete sekundäre Antikörper war ebenfalls mit HRP konjugiert.

**Tabelle 3.6: Eingesetzte Primär- und Sekundär-Antikörper für die Immundetektion.**

	$\alpha$ GFP	$\alpha$ DAF	$\alpha$ Actin
<b>Primär-Antikörper</b>	1:5000	1:1000	1:5000
<b>Sekundär-Antikörper</b>			
GAM-HRP			1:5000
GAR-HRP	1:5000	1:5000	

### **Primär-Antikörper**

- $\alpha$ GFP: Antikörper gegen GFP aus Kaninchen (Anti-GFP, rabbit serum, polyclonal, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- $\alpha$ DAF: Antikörper gegen DAF aus Kaninchen, CD55, H-319 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz, CA, USA)
- $\alpha$ Actin: Antikörper gegen Actin aus der Maus (Anti-Actin, Clone C4, Millipore, Billerica, MA, USA)

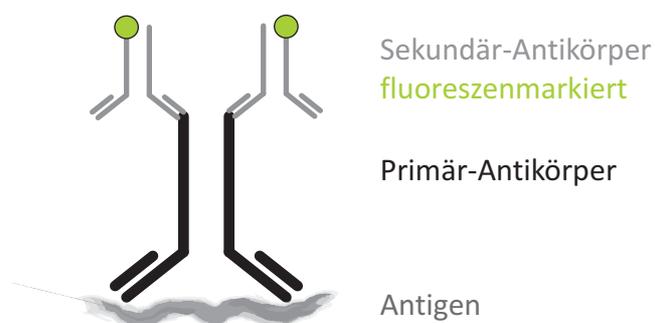
### Sekundär-Antikörper

- GAM-HRP: ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase conjugated, Pierce/Thermo Fisher Scientific (Stammlösung 400 µg/ml, Arbeitslösung für Antikörper-Verdünnungen: 10 µg/ml)
- GAR-HRP: ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxidase conjugated, Pierce/Thermo Fisher Scientific (Stammlösung 400 µg/ml, Arbeitslösung für Antikörper-Verdünnungen: 10 µg/ml)

### 3.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können bestimmte Komponenten einer Zelle, wie zum Beispiel Proteine sichtbar gemacht werden. Dafür werden in der Regel fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die spezifisch an entsprechende Antigene binden. Allgemein unterscheidet man die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung. Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz-Methode bindet zunächst ein spezifischer Primär-Antikörper an das Antigen (**Abbildung 3.3**). Anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper eingesetzt, der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist.

Es wurden HeLa- und RD-Zellen so in je eine 96 *well*-Platte eingesät, dass sie am folgenden Tag konfluent gewachsen waren, wobei das Einsaat-Volumen pro Vertiefung 100 µl betrug. Das Medium der konfluenten Zellen wurde zunächst abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des DAF-spezifischen Antikörpers *CBL-511* (Chemicon, CA, USA), gelöst in jeweils 50 µl 3% BSA in PBS, für 30 Minuten auf einem Schüttler. Anschließend wurde der Antikörper entfernt und 3 mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 0,1 µg pro *well* des FITC-gelabelten Sekundärantikörpers aus der Maus (*Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Fluorescein conjugate*, Upstate, VA, USA).



**Abbildung 3.2: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung**

Der Primär-Antikörper bindet spezifisch an das Antigen. An einen gegen den Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper ist ein Fluorophor gekoppelt.

### 3.5.3 Durchflusszytometrie

Es wurden je  $1,75 \times 10^5$  RD-Zellen pro Vertiefung in 1 ml Antibiotika-freiem Medium in 12 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit den in **Tabelle 3.3** angegebenen siRNAs. Dafür wurden pro Transfektion 4  $\mu$ l Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 96  $\mu$ l OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vermischt und dieser Ansatz wurde für 5 Minuten stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 100  $\mu$ l OptiMEM gegeben, in dem die siRNA zuvor verdünnt wurde. Der Gesamtansatz (200  $\mu$ l) wurde für mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten RD-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 0,2% EDTA in PBS geerntet und mit je 0,1  $\mu$ g des DAF-spezifischen Antikörpers *CBL-511* (Chemicon, CA, USA) für mindestens 12 Stunden bei 4°C in 3% BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1  $\mu$ g eines FITC-gelabelten Sekundär-Antikörpers aus der Maus inkubiert (*Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Fluorescein conjugate*, Upstate, VA, USA). Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 3% BSA in PBS resuspendiert. Die so präparierten Proben wurden anschließend in einem Coulter Epics XL MCL (Beckmann, Krefeld) analysiert. Die daraus erhaltenen Daten wurden mit dem Programm WINMDI2.9 ausgewertet.

### 3.6 Dual-Luciferase-Assay

Den beiden Enzymen Firefly- und Renilla-Luciferase werden Substrate zur Verfügung gestellt, die sie umsetzen können. In Abhängigkeit ihrer, in einer Probe vorhandenen Proteinmenge entsteht dabei Licht. Diese Lichtereignisse werden in einem festgelegten Zeitraum gezählt.

Für die durchgeführten Luciferase-Assays wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) verwendet, das das Messen von Firefly- und Renilla-Luciferase aus einer Probe ermöglicht. Die Zellen wurden passiv mit einem mitgelieferten Lysispuffer unter Schwenken 15 Minuten aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Proben 1× eingefroren und wieder aufgetaut. Nachfolgend wurden diese je nach Messbereich verdünnt und die Lichtereignisse wurden mittels Luminometer nach Zugabe von 50  $\mu$ l LARII (enthält das Substrat für die Firefly-Luciferase) bzw. 50  $\mu$ l Stop&Glo Reagenz (enthält das Substrat für die Renilla-Luciferase) in mindestens zwei Messungen bestimmt.

## 3.7 Virologische Methoden

### 3.7.1 Plaque-Assay

Der Plaque Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Viruslast in einer Probe. Der Titer des Virus wird ausgedrückt in der Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten pro ml (*plaque forming units*, p.f.u./ml).

#### *Plaque-Titer EV-30, RD-Zellen*

Es wurden pro Vertiefung je  $6 \times 10^5$  RD-Zellen in 2 ml serumhaltigem Medium in eine 6 well-Platte (Costar) eingesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 1 ml hergestellten Virusverdünnungen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$ ) in serumfreiem Medium für eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Eagle's MEM, das 0,7% Difco-Agar (BD, Sparks, MD, USA) enthielt, überschichtet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit 0,04% Neutralrot angefärbt. Der Virus-Titer (in p.f.u./ml) wurde durch das Zählen der Plaques bestimmt.

### 3.7.2 Plaque-Reduktions-Assay

#### *Plaque-Reduktions-Assay CVB3, HeLa (Wis)-Zellen*

Es wurden je  $1,5 \times 10^5$  HeLa (Wis)-Zellen pro Vertiefung in 500 µl Antibiotika-freiem Medium, das einen reduzierten FKS-Gehalt von 5% aufwies, in 24 well-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit je 100 nM der in **Tabelle 3.2** angegebenen siRNAs (wie in **Abschnitt 3.4.3** beschrieben, jedoch ohne eine Transfektion des Reporter-Plasmids). Vier Stunden nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit je 250 µl von 10fach Verdünnungen des CVB3 (*Nancy*, ATCC no. VR-30) infiziert, so dass je nach Verdünnung eine m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 10 bis 50 p.f.u./well erreicht wurden. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgenommen und es folgte die Inkubation der Zellen mit dem in serumfreiem Medium verdünnten Virus für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde der Infektionsansatz von den Zellen entfernt und die Zellen wurden mit Eagle's MEM, das 0,7% Difco-Agar (BD, Sparks, MD, USA) enthielt, überschichtet. Drei Tage nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 0,025% (w/v) Neutralrot angefärbt und die Virus-Titer (p.f.u./ml) durch Zählen der Plaques bestimmt.

### 3.7.3 Virus-Propagation-Assay

Für den direkten Nachweis des Effekts der siDAF2-vermittelten DAF-*Downregulation* auf die Replikation des EV-30 wurde ein Virus-Propagation-Assay in RD- beziehungsweise in HEK293-Zellen durchgeführt.

#### *Virus-Propagation-Assay EV-30, RD-Zellen*

Es wurden je  $8,75 \times 10^4$  RD-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium, das einen reduzierten FKS-Gehalt von 5% aufwies, in 24 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit 100 nM siDAF2, 100 nM Kontroll-siRNA oder ohne siRNA. Dafür wurde pro Transfektion 2  $\mu$ l Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 48  $\mu$ l OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vermischt und dieser Ansatz für 5 Minuten stehen gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 50  $\mu$ l OptiMEM gegeben, das die zu transfizierende siRNA enthielt. Der Gesamtansatz (100  $\mu$ l) wurde für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten RD-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l/*well* einer Verdünnung des EV-30 (*Bastianni*, ATCC no. VR-322) infiziert, so dass eine m.o.i. von 0,1 p.f.u./Zelle erreicht wurde. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgenommen, und es folgte die Inkubation der Zellen mit dem in serumfreiem Medium verdünnten EV-30 für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Der Virusansatz wurde anschließend entfernt und es folgte die Zugabe von je 500  $\mu$ l/*well* Medium mit 5% FKS. Der virale Replikationszyklus wurde einen Tag nach Infektion gestoppt, indem die Zellen dreimal eingefroren und aufgetaut wurden. Die Überstände wurden auf konfluent gewachsenen RD-Zellen austitriert. Dafür wurden je  $1,25 \times 10^5$  RD-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium mit reduziertem FKS-Gehalt von 5% in 24 *well*-Platten eingesät. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit je 250  $\mu$ l von 10fach Verdünnungen der Überstände, die nach der Zelllyse durch Frieren und Tauen erhalten wurden, inkubiert. Dafür wurde das Medium der Zellen abgenommen und die Überstände wurden in serumfreiem Medium verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Überstands-Lösungen abgenommen und die Zellen wurden mit 500  $\mu$ l/*well* Eagle's Medium, welches 0,73% Difco-Agar (BD, Sparks, MD, USA) enthielt, überschichtet. Drei Tage nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 10% Trichloressigsäure für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde der Overlay entfernt und die Zellen wurden mit 0,5% Kristallviolett (in PBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt.

Abschließend wurden die Vertiefungen mit PBS gewaschen und nachfolgend getrocknet. Die Virus-Titer (in p.f.u./ml) wurde durch das Zählen der Plaques bestimmt.

#### *Virus-Propagation-Assay EV-30, HEK293-Zellen*

Es wurden je  $1,25 \times 10^5$  HEK293-Zellen pro Vertiefung in 500  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium in 24 *well*-Platten eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit 100 nM siDAF2, 100 nM Kontroll-siRNA oder ohne siRNA wie für den Virus-Propagation-Assay EV-30, RD-Zellen beschrieben.

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 250  $\mu$ l/*well* einer Verdünnung des EV-30 infiziert, wie es für den Virus-Propagation-Assay von EV-30 in RD-Zellen beschrieben ist.

Die Überstände wurden auf konfluent gewachsenen HEK293-Zellen austitriert. Es wurden je  $5 \times 10^5$  HEK293-Zellen pro Vertiefung in 1 ml Antibiotika-freiem Medium in 12 *well*-Platten eingesät. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit je 500  $\mu$ l von 10fach Verdünnungen der Überstände, die nach der Zellyse durch Frieren und Tauen erhalten wurden, inkubiert. Dafür wurde das Medium der Zellen abgenommen und die Überstände wurden in serumfreien Medium verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Überstands-Lösungen abgenommen und die Zellen wurden mit 1 ml/*well* Eagle's Medium, welches 0,73% Difco-Agar (BD, Sparks, MD, USA) enthielt, überschichtet. Drei Tage nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit 10% Trichloressigsäure für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde der Overlay entfernt und die Zellen wurden mit 0,5% Kristallviolett (in PBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Abschließend wurden die Vertiefungen mit PBS gewaschen und nachfolgend getrocknet. Die Virus-Titer (in p.f.u./ml) wurde durch das Zählen der Plaques bestimmt.

#### **3.7.4 Zellviabilitäts-Assay**

Der XXT-Test ist eine photometrische Nachweismethode für die Zellviabilität, die auf der Spaltung des gelben Tetrazolium-Salzes XTT zu dem orangefarbenen Farbstoff Formazan beruht. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysiert und verläuft demnach nur in stoffwechselaktiven Zellen.

#### *siRNAs gegen die RdRP des EV-30, RD-Zellen*

$3 \times 10^4$  RD-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 100  $\mu$ l Antibiotika-freiem Medium in 4fach-Ansätzen in eine 96 *well*-Platte eingesät. Die Transfektion mit den in **Tabelle 3.1** angegebenen siRNAs erfolgte mit 0,3% Lipofectamine2000 (Invitrogen) pro *well* nach

Herstellerangaben über vier Stunden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 0,1 m.o.i des EV-30 in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Anschließend erfolgte das Entfernen des Virus und die Zugabe von 100 µl Medium pro well. Die Viabilität der Zellen wurde zu definierten Zeitpunkten durch Zugabe von 50 µl/well des XTT-Reagenz (*Cell Proliferation Kit II, Roche*) mittels Absorptionsmessung bestimmt.

#### *Dosis-Wirkungskurve siRdRP4 und siRdRP5, RD-Zellen*

3 × 10<sup>4</sup> RD-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 100 µl Antibiotika-freiem Medium in 4fach-Ansätzen in eine 96 well-Platte eingesät. Die Transfektion von verschiedenen siRdRP4- beziehungsweise siRdRP5-Konzentrationen erfolgte mit 0,3% Lipofectamine2000 (Invitrogen) pro well nach Herstellerangaben über vier Stunden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 0,1 m.o.i des EV-30 in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Anschließend erfolgte das Entfernen des Virus und die Zugabe von 100 µl Medium pro well. Die Viabilität der Zellen wurde zwei Tage nach Infektion durch Zugabe von 50 µl/well des XTT-Reagenz (*Cell Proliferation Kit II, Roche*) mittels Absorptionsmessung bestimmt.

#### *siRNAs gegen DAF, RD-Zellen*

1 × 10<sup>4</sup> RD-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 100 µl Antibiotika-freiem Medium in 4fach-Ansätzen in eine 96 well-Platte eingesät. Die Transfektion mit den in **Tabelle 3.3** angegebenen siRNAs erfolgte mit 0,3% Lipofectamine2000 (Invitrogen) pro well nach Herstellerangaben. Es folgte eine Inkubation von mindestens 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für die Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 0,1 m.o.i des EV-30 in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Anschließend erfolgte das Entfernen des Virus und die Zugabe von 100 µl Medium pro well. Die Viabilität der Zellen wurde zu definierten Zeitpunkten durch Zugabe von 50 µl/well des XTT-Reagenz (*Cell Proliferation Kit II, Roche*) mittels Absorptionsmessung bestimmt.

#### *Dosis-Wirkungskurve siDAF2, RD-Zellen*

1,75 × 10<sup>4</sup> RD-Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in 100 µl Antibiotika-freiem Medium in 4fach-Ansätzen in eine 96 well-Platte eingesät. Die Transfektion der Zellen mit verschiedenen siDAF2-Konzentrationen erfolgte mit 0,3% Lipofectamine2000 (Invitrogen) pro well nach Herstellerangaben. Es folgte eine Inkubation von mindestens 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für die Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 0,1 m.o.i des EV-30 in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und

5% CO<sub>2</sub> infiziert. Anschließend erfolgte das Entfernen des Virus und die Zugabe von 100 µl Medium pro *well*. Die Viabilität der Zellen wurde zwei Tage nach Infektion durch Zugabe von 50 µl/*well* des XTT-Reagenz (*Cell Proliferation Kit II, Roche*) mittels Absorptionsmessung bestimmt.

#### *scAAV2-Vektor vermittelte Inhibition von EV-30, RD-Zellen*

Es wurden je 1 x 10<sup>4</sup> RD-Zellen pro Vertiefung in 100 µl Medium in 4fach-Ansätzen in eine 96 *well*-Platte eingesät. Einen Tag später erfolgte die Transduktion der Zellen mit 1000 oder 5000 scAAV2-Vektorgenomen pro Zelle (Vg/Z). Drei Tage nach Transduktion wurden die Zellen mit 0,1 m.o.i des EV-30 in serumfreiem Medium für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Anschließend erfolgte das Entfernen des Virus und die Zugabe von 100 µl Medium pro *well*. Die Viabilität der Zellen wurde zwei Tage nach Infektion durch Zugabe von 50 µl/*well* des XTT-Reagenz (*Cell Proliferation Kit II, Roche*) mittels Absorptionsmessung bestimmt.

## **3.8 AAV-Vektorproduktion und -Quantifizierung**

### **3.8.1 AAV-Vektorproduktion**

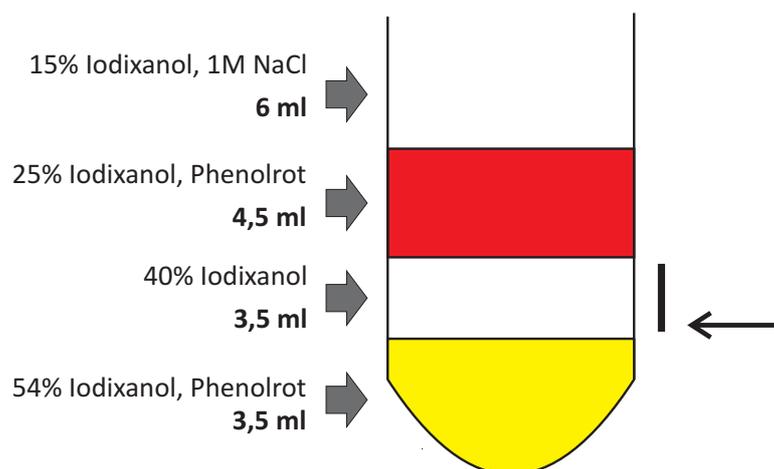
Für die Produktion von AAV2-Vektoren wurde eine mutierte Variante des AAV2-Genoms verwendet, die eine schnelle und potente Expression des Transgens ermöglicht. Diese sogenannten scAAV-Vektoren (McCarty et al., 2001) können sich selbst so falten, dass vorübergehend dsDNA entsteht, die transkribiert werden kann.

Es wurden je 2-3 × 10<sup>6</sup> HEK293FT-Zellen pro Flasche in 20 ml Antibiotika-freiem Medium in drei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen eingesät. Einen Tag später erfolgte die Cotransfektion mit dem scAAV2-*Shuttle*-Plasmid und dem AAV2-Verpackungsplasmid (pDG, Plasmid Factory, Bielefeld). Pro Transfektion wurden 48 µl Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in 1,5 ml OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) für 5 Minuten inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend zu 1,5 ml OptiMEM gegeben, das 4,8 µg scAAV2-*Shuttle*-Plasmid und 14,4 µg AAV2-Verpackungsplasmid enthielt. Der Gesamtansatz (3 ml) wurde für mindestens 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend auf die eingesäten HEK293FT-Zellen gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Etwa 48-72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dafür wurde zunächst 1 ml pro Flasche einer Trypsin/EDTA-Lösung in jede 75 cm<sup>2</sup> Flasche gegeben und die Zellen für 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in PBS resuspendiert. Für die nachfolgende Iodixanol-Gradientenzentrifugation wurden Zellsuspensionen drei identisch transfizierter 75 cm<sup>2</sup> Flaschen in 10 ml PBS vereinigt.

Die in PBS gelösten Zellen wurden aufgeschlossen, indem sie zunächst bei -70°C eingefroren und anschließend bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut wurden. Dieser Frieren/Tauen-Zyklus wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 g wurde der Überstand auf einen vorbereiteten Iodixanol-Gradienten überführt. Es folgte eine zweistündige Ultrazentrifugation im Rotor 70Ti (Beckmann) bei 18°C und 49.000 rpm. Die farblose Virusbande, die sich zwischen der 25%igen und 54%igen Iodixanol-Schicht befand, wurde mit einer 18G-Kanüle abgezogen (**Abbildung 3.3**) und die erhaltenen scAAV2-Vektoren wurden nachfolgend quantifiziert.



**Abbildung 3.4: Iodixanol-Gradient.** (schematisch nach Zolotukhin et al., 1999)

Nach Zentrifugation wurde mit einer 18G-Kanüle oberhalb der 54%-40% Iodixanol-Grenzschicht eingestochen (Pfeil) und die farblose Virus-Bande (schwarzer Balken) abgezogen.

### 3.8.2 AAV2-Vektor-Quantifizierung

Für eine Quantifizierung der produzierten scAAV2-Vektoren mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) mussten diese zunächst mit einer geeigneten Methode aufgeschlossen werden. Dafür wurden 4 µl scAAV-Vektor mit 16 µl PBS verdünnt und dieser durch Zugabe von 20 µl einer 2M NaOH-Lösung aufgeschlossen (Veldwijk et al., 2002). Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 65°C und die anschließende Neutralisation des scAAV2-Vektor-Lysats mit 38 µl einer 1M HCl-Lösung.

Für die nachfolgende qPCR wurden jeweils 2 µl einer 1:10 beziehungsweise einer 1:100 Verdünnung des scAAV2-Vektor-Lysats eingesetzt. Neben dem *SYBR Green* PCR Master Mix ergänzten die Primer ATA ACA GGA TGC ACC AGG AAG G und ATG ACA CCA GCA GAT AAG GGA GAG in einer Endkonzentration von jeweils 300 nM den PCR-Ansatz. Als Standard wurden die entsprechenden *scAAV2-Shuttle*-Plasmide verwendet.

### 3.9 Bioinformatik

Für das Design von wirksamen siRNAs gegen die RdRP des EV-30 wurden die in **Tabelle 3.7** angegebenen siRNA-Designer verwendet.

**Tabelle 3.7:** Liste der Internet-basierten Algorithmen für das Design von siRNAs.

siRNA-Designer	Internet-Adresse
Dharmacon	<a href="http://www.dharmacon.com/DesignCenter">http://www.dharmacon.com/DesignCenter</a>
Invitrogen	<a href="https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress">https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress</a>
MWG-Biotech	<a href="http://www.eurofinsdna.com">http://www.eurofinsdna.com</a> (Registrierung erforderlich)

### 3.10 Statistik

Die sigmoidalen Kurven, aus denen die IC<sub>50</sub>-Werte für siRdRP4, siRdRP5 und siDAF2 erhalten wurden, wurden mit der folgenden Hill-Funktion gefittet:

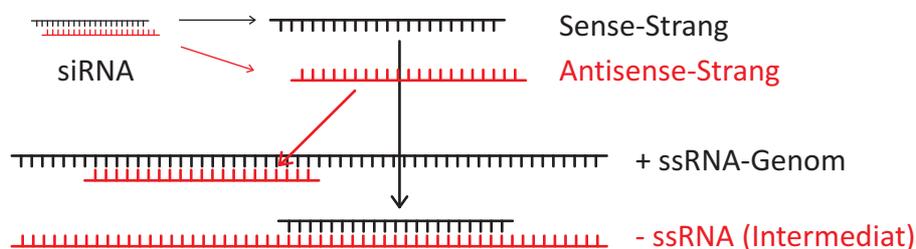
$$y = V_{max} \frac{x^n}{k^n + x^n}$$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Strang-spezifische Inhibition von Picornaviren

Ein wichtiger Vertreter der Picornaviren ist das Coxsackievirus B3 (CVB3); ein Herzpathogen, das schwere Herzmuskel-Entzündungen hervorrufen kann. In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits eine effiziente siRNA identifiziert, die die Replikation von CVB3 in Zellkultur stark einschränkt (Schubert et al., 2005a). Diese siRNA, nachfolgend als CVB3-siRdRP2 bezeichnet, ist gegen die Region des (Plus-Strang, +ssRNA) Virusgenoms gerichtet, die für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) codiert. Der Sense-Strang der siRNA könnte jedoch auch gegen den intermediär auftretenden Minus-Strang (-ssRNA) wirken, da diese ebenfalls komplementär zueinander sind (**Abbildung 4.1**).

Welcher der beiden Stränge der siRNA in den RISC eingebaut wird und damit den Abbau von komplementärer RNA vermittelt, hängt in erster Linie von den thermodynamischen Eigenschaften der siRNA selbst ab (Reynolds et al., 2004). Das von Reynolds und Kollegen vorgeschlagene Punktesystem (**Tabelle 4.1**) berücksichtigt acht identifizierte Kriterien, die die Funktionalität einer siRNA beeinflussen. Für die theoretische Beurteilung, ob eine siRNA wirksam ist, erhält diese für bestimmte Sequenz-bezogene Eigenschaften des Sense-Stranges Punkte (oder einen Punktabzug). Wird eine Punktzahl von mindestens 6 erreicht, kann von einer funktionalen siRNA ausgegangen werden: Der Antisense-Strang der siRNA wird in den RISC eingebaut und vermittelt die effiziente Unterdrückung der Expression komplementärer (Ziel)sequenzen. Für die oben genannte CVB3-siRdRP2 erhält man für den Antisense-Strang, der komplementär zum genomischen Plus-Strang ist, 8 Punkte. Für den Sense-Strang, der wiederum komplementär zum intermediär auftretenden Minus-Strang



**Abbildung 4.1: Bindungsmöglichkeiten einer siRNA an Picornaviren-RNA**

Der Antisense-Strang der siRNA ist komplementär zum Plus-Strang-RNA-Genom (+ssRNA-Genom), während der nach Transkription des Plus-Strang-RNA-Genoms intermediär auftretende virale Minus-Strang (-ssRNA) eine Zielsequenz für den Sense-Strang darstellt.

ist, erhält man nur 4 Punkte. Demnach wird mit hoher Wahrscheinlichkeit der Antisense-Strang der CVB3-siRdRP2 in den RISC eingebaut und wirkt spezifisch gegen den viralen Plus-Strang.

**Tabelle 4.1: Punktesystem basierend auf den thermodynamischen Eigenschaften einer siRNA.**

Punktesystem nach Reynolds et al., 2004. Die Positionen beziehen sich auf den Sense-Strang (5'-3') der siRNA.

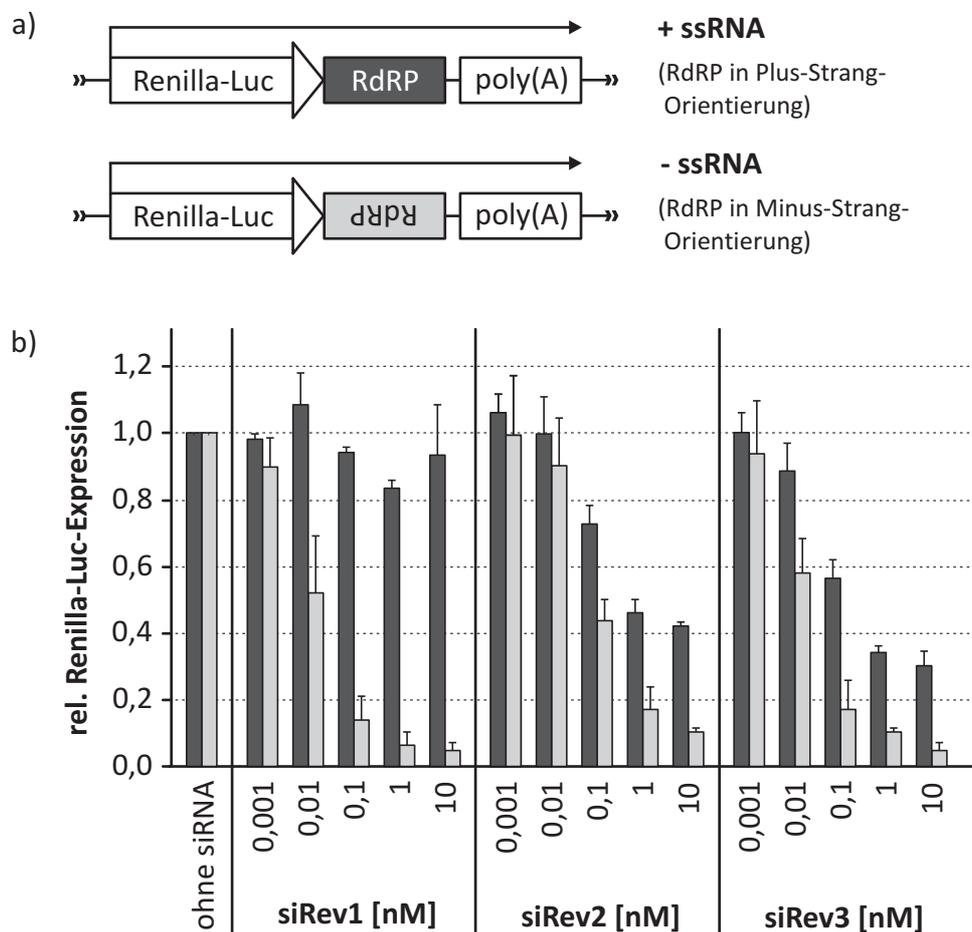
Kriterium	Punkte
GC-Gehalt zwischen 30% und 52% (in der 19mer siRNA-Duplex)	1 Punkt
A oder U an den Positionen 15-19	1 Punkt pro Position
Fehlen von <i>internal repeats</i> ( $T_m < 20\text{ °C}$ )	1 Punkt
A an Position 19	1 Punkt
A an Position 3	1 Punkt
U an Position 10	1 Punkt
G oder C an Position 19	- 1 Punkt
G an Position 13	- 1 Punkt

Die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten führten zu der Frage, ob die Unterdrückung des während der CVB3-Replikation auftretenden Minus-Stranges möglicherweise besser geeignet ist, um die Virusausbreitung zu verhindern. Zum Beispiel liegen die genomischen Plus-Stränge von CVB3 in akut infizierten Zellen in einem etwa 100fachen Überschuss gegenüber der Minus-Stränge vor (Hohenadl et al., 1991; Klingel et al., 1992). Demnach könnte es weitaus einfacher sein, die vergleichsweise geringe Anzahl an Minus-Strängen in infizierten Zellen zu degradieren und somit die Bildung neuer Virus-RNA zu unterbinden.

Mit Hilfe des via Internet frei zugänglichen siRNA-Designers der Firma Dharmacon (**Tabelle 3.5**) wurden drei siRNAs (siRev1-3) ausgewählt, deren thermodynamische Eigenschaften theoretisch zu einer Minus-Strang-Selektivität führen (mehr als 6 Punkte nach **Tabelle 4.1**). Die Strang-Präferenz der siRNAs wurde nachfolgend mittels Luciferase-Assay untersucht. Dafür wurde das subgenomische Fragment der RdRP von CVB3 entweder in Plus-Strang- oder in Minus-Strang-Orientierung in die 3'-UTR eines Renilla-Luciferase-Reporters kloniert (**Abbildung 4.2a**).

Die **Abbildung 4.2b** zeigt die Inhibition der Renilla-Luciferase-Expression durch siRev1-3, wobei eine Normierung auf die konstitutive Expression der Firefly-Luciferase desselben Vektors erfolgte. Die Ergebnisse bestätigen die theoretisch vorausgesagten Aktivitäten der

drei siRNAs gegen die RdRP in Minus-Strang-Orientierung: Alle drei siRNAs zeigten eine deutliche Abnahme der Reporter-Expression mit Zunahme der siRNA-Konzentration. Schon eine sehr geringe Konzentration von 1 nM war bei allen drei siRNAs ausreichend, um die Expression des entsprechenden Reporters um circa 80-90% zu unterdrücken. Dagegen variierten die Aktivitäten, die RdRP in Plus-Strang-Orientierung zu inhibieren, erheblich. So wurde mit 10 nM siRev1 lediglich eine Inhibition der Reporter-Expression von etwa 10% erreicht, während es mit 10 nM siRev3 etwa 70% waren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass siRev1 grundsätzlich Minus-Strang-spezifisch wirkt, während siRev2 auch eine erhebliche Aktivität gegen den Plus-Strang innehat und siRev3 ein starker Inhibitor



**Abbildung 4.2: Strang-Spezifität von siRev1-3.**

Unterdrückung der Luciferase-Reporter-Expression durch siRev1-3. **a)** Die Zielsequenz (RdRP) wurde in zwei verschiedenen Orientierungen in die 3'-UTR des Luciferase-Reporters (Renilla-Luc) kloniert, die **b)** entweder zu Plus-Strang-Transkripten (dunkelgraue Balken) oder Minus-Strang-Transkripten (hellgraue Balken) der RdRP führten. Die Lumineszenz der Renilla-Luciferase wurde für jedes Experiment individuell auf die Firefly-Luciferase-Aktivität normiert.

Die Abbildung ist der Publikation Schubert et al., 2007 entnommen und enthält Daten von Experimenten, die von Dr. Steffen Schubert durchgeführt wurden.

der Expression von Plus- und Minus-Strang ist. Ein Vergleich mit den theoretischen Strang-Spezifitäten zeigt, dass die tatsächliche Aktivität einer siRNA gegen den Plus- oder Minus-Strang mit der dafür berechneten Punktzahl korreliert (**Tabelle 4.2**). Beispielsweise erhält man für siRev1, wenn als Zielsequenz der Plus-Strang angenommen wird, 5 Punkte. Dieser Wert liegt unterhalb des Schwellenwertes von 6 Punkten für funktionale siRNAs. Tatsächlich zeigte siRev1 im Luciferase-Assay nur eine sehr geringe Effizienz, den Plus-Strang zu inhibieren. Im Gegensatz dazu wiesen siRev2 und siRev3 mit 6 Punkten auch eine deutliche Aktivität gegen den Plus-Strang auf.

**Tabelle 4.2: Strang-Präferenzen von siRev1-3 beziehungsweise CVB3-siRdRP2.**

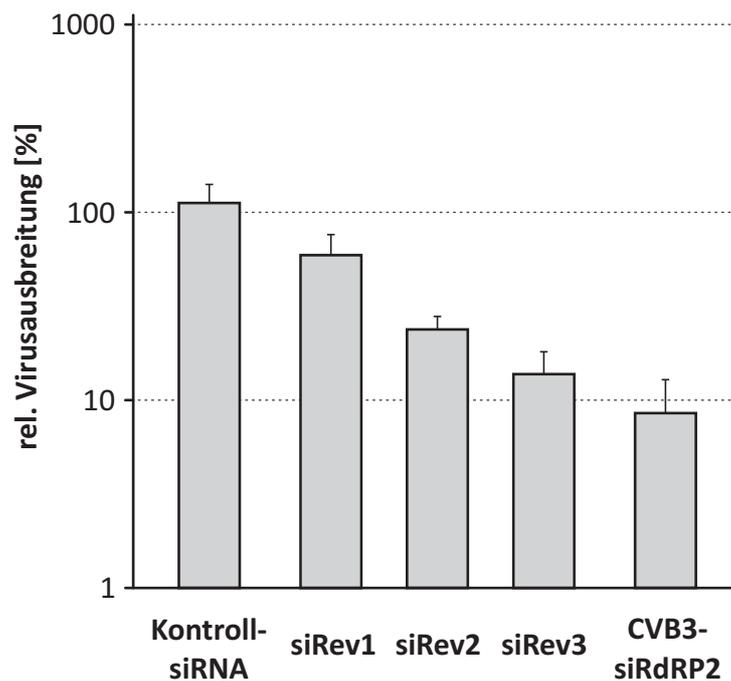
Erwartete und ermittelte Strang-Präferenzen der siRNAs gegen den genomischen RNA-Plus-Strang und den intermediär auftretenden RNA-Minus-Strang von CVB3.

	Erwartete Strang-Spezifität (Punkte nach Reynolds et al., 2004)		Ermittelte Strang-Spezifität (siehe Abbildung 4.2)	
	Plus-Strang	Minus-Strang	Plus-Strang	Minus-Strang
CVB3-siRdRP2	8	4	x	
siRev1	5	8		x
siRev2	6	7	x	x
siRev3	6	8	x	x

Zusammen mit der CVB-siRdRP2 waren nun vier siRNAs vorhanden, deren Spezifitäten von einer Plus-Strang-Inhibition (CVB3-siRdRP2) zu einer fast ausschließlichen Präferenz für den Minus-Strang variierten (siRev1). Diese siRNAs wurden nachfolgend in einem Plaque-Reduktions-Assay verwendet, um festzustellen, welche Strategie gegen die Ausbreitung des CVB3 die erfolgreichste ist: Die Inhibition des genomischen RNA-Plus-Stranges, des intermediär auftretenden viralen Minus-Stranges oder sogar beider Stränge. Der Einfluss der siRNAs auf die virale Ausbreitung, bezogen auf die virale Replikation von CVB3 in nicht-transfizierten Zellen, ist in **Abbildung 4.3** gezeigt. Die Transfektion von 100 nM CVB3-siRdRP2 oder siRev3 resultierte in einer deutlichen Inhibition der CVB3-Replikation, während siRev1 und siRev2 keinen beziehungsweise nur einen geringen protektiven Effekt aufwiesen.

Interessanterweise korrelierte die Effizienz der Virusinhibition im Plaque-Reduktions-Assay mit der Fähigkeit der entsprechenden siRNA, die Expression des viralen Plus-Stranges zu unterdrücken (**Abbildung 4.2** und **Abbildung 4.3**). So hatte siRev1, deren Wirksamkeit fast

ausschließlich auf die RdRP in Minus-Strang-Orientierung begrenzt war, keinen Einfluss auf die CBV3-Replikation. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass gegen den genomischen Plus-Strang von Picornaviren gerichtete siRNAs besser geeignet sind, die Virusausbreitung zu inhibieren, als Minus-Strang-spezifische siRNAs. Im folgenden Abschnitt werden, basierend auf der Strang-Präferenz, weitere Kriterien hinzugezogen, die das Design von wirksamen antiviralen siRNAs erleichtern sollen.



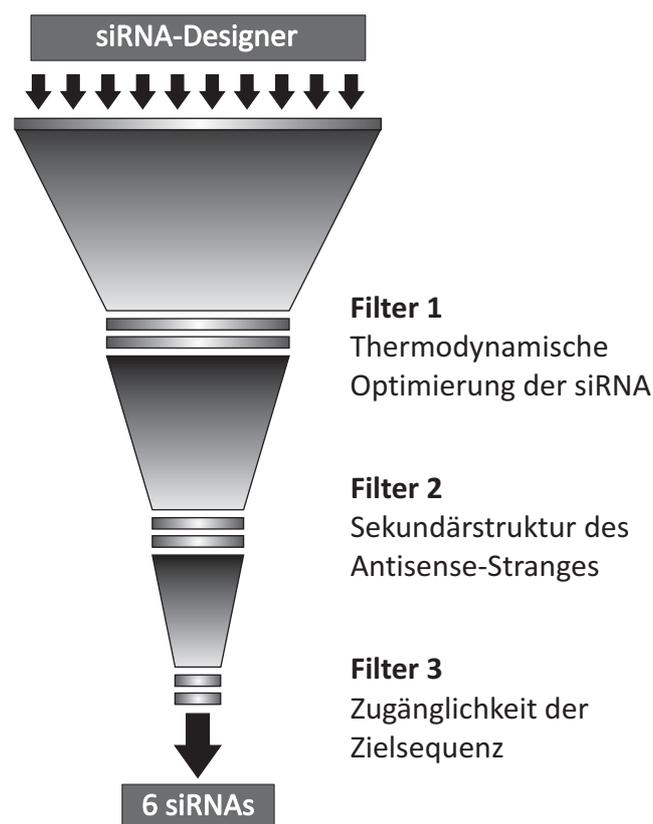
**Abbildung 4.3: Antiviraler Effekt von siRev1-3 beziehungsweise CVB3-siRdRP2.**

Relative Ausbreitung von CVB3 in einem Plaque-Reduktions-Assay mit je 100 nM der entsprechenden siRNA. Die relative Virusausbreitung wurde auf Virus-infizierte Zellen ohne siRNA normalisiert.

Die Abbildung ist der Publikation Schubert et al., 2007 entnommen und enthält Daten von Experimenten, die von Denise Werk durchgeführt wurden.

## 4.2 Design von effizienten antiviralen siRNAs

In den letzten Jahren sind durch intensive Forschungsarbeit umfangreiche RNAi-Bibliotheken entstanden, so dass heute für fast alle zellulären Zielsequenzen von Mensch, Maus oder Ratte validierte siRNAs bekannt und/oder kommerziell erhältlich sind. Dagegen gestaltet sich das Auffinden von effizienten siRNAs gegen virale Ziel-RNA oftmals schwierig. Einerseits gibt es eine große Vielfalt an DNA- und RNA-Viren, die sich durch Mutationen ihres Genoms schnell an veränderte Bedingungen anpassen können, andererseits sind gut konservierte Regionen des Virus-Genoms aufgrund ihrer starken Strukturierung oftmals schwer für RNAi-Ansätze zugänglich. Um dennoch wirksame antivirale siRNAs zu erhalten, wurde eine Methode entwickelt, die auf einem Filter-Prinzip basiert (**Abbildung 4.4**). Dabei wurden nicht nur die thermodynamischen Kriterien der siRNA berücksichtigt, sondern auch die Zugänglichkeit der Ziel-RNA und eine mögliche Ausbildung einer Sekundärstruktur des Antisense-Stranges der siRNA.



**Abbildung 4.4: Systematische Selektion von siRNAs, die gegen die RdRP des EV-30 gerichtet sind.**

Im ersten Schritt erfolgte die Filterung der siRNAs zunächst hinsichtlich ihrer thermodynamischen Eigenschaften (Reynolds et al., 2004). Anschließend wurden solche siRNAs aus dem Pool entfernt, deren Antisense-Strang stabile Sekundärstrukturen ausbildete. Abschließend wurde die Zugänglichkeit der Zielsequenz der verbleibenden siRNAs untersucht.

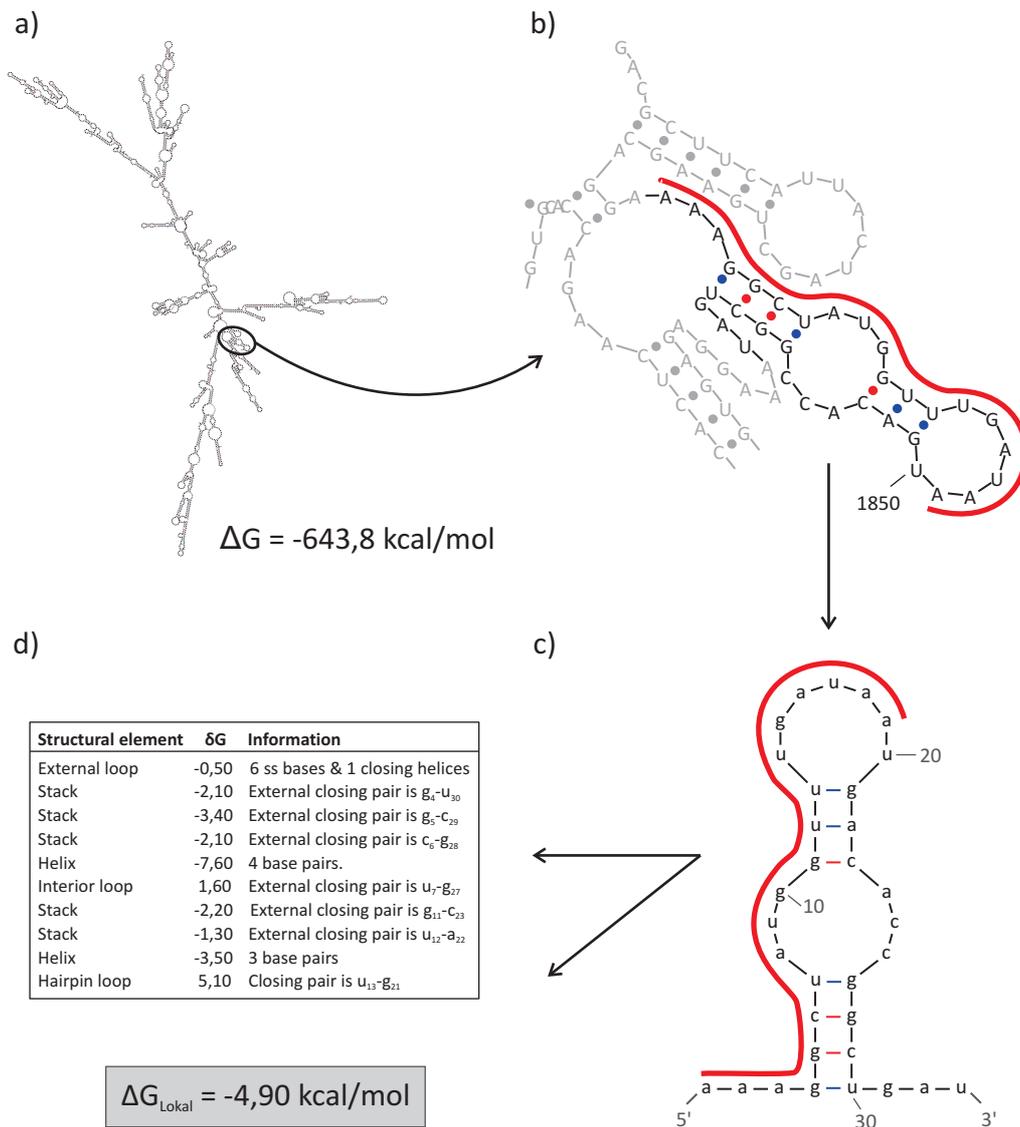
Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

Im ersten Schritt wurden drei verschiedene, im Internet frei zugängliche siRNA-Designer (**Tabelle 3.5**) verwendet, um potentielle siRNAs, die gegen die RdRP des Echovirus 30 (EV-30) gerichtet sind, zu erhalten. Pro siRNA-Designer wurden die vorgeschlagenen 10 besten siRNAs ausgewählt, wobei das Design entweder auf thermodynamischen Kriterien oder, wie im Fall des siRNA-Designers der Firma Invitrogen, auf geheimen Algorithmen basierte. Um unspezifische Bindungen an endogene Zielsequenzen zu verhindern, wurde die BLAST-Option der siRNA-Designer verwendet. Der resultierende siRNA-Pool wurde nachfolgend hinsichtlich der thermodynamischen Eigenschaften gefiltert, indem alle siRNAs, die weniger als sechs Punkte des von Reynolds und Kollegen vorgeschlagenen Punktesystems (**Tabelle 4.1**) erreichten, aus dem Pool entfernt wurden. Eine Ausnahme bildeten hier die vom siRNA-Designer der Firma Invitrogen vorgeschlagenen siRNAs, da sie auf einem geheimen Design-Algorithmus basierten und maximal vier Punkte aufwiesen.

Der zweite Schritt bestand in der Filterung der verbleibenden siRNAs hinsichtlich der möglichen Ausbildung einer Sekundärstruktur ihres Antisense-Stranges, da dies die Effizienz einer siRNA negativ beeinflussen kann (Patzel et al., 2005). Dafür wurden die Sequenzen der siRNA-Antisense-Stränge mit Hilfe von *mfold3.2* (Zuker, 2003) gefaltet und für erhaltene potentielle Strukturen die entsprechende Änderung der Freien Energie ( $\Delta G$ ) bestimmt. Ist  $\Delta G$  negativ, weist dies auf die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur hin, währenddessen  $\Delta G > 0$  ein Indikator für instabile Sekundärstrukturen ist und damit der Anteil an nicht-gefalteter Einzel-Strang-RNA sehr hoch. Die Vorhersage von mindestens einer stabilen Sekundärstruktur, indiziert durch  $\Delta G_{\text{Antisense}} < 0$ , führte zum Entfernen der entsprechenden siRNA aus dem Pool.

Die nach letzter Filterung verbliebenen siRNAs wurden im finalen Schritt hinsichtlich der Zugänglichkeit ihrer Zielsequenz untersucht. Für eine siRNA ist eine RNA umso besser zugänglich, je instabiler die (lokal) ausgebildete Sekundärstruktur ihrer komplementären Zielsequenz ist (Schubert et al., 2005b; Westerhout and Berkhout, 2007). Für die Bestimmung der lokalen RNA-Strukturen wurde zunächst die vollständige Ziel-RNA, bestehend aus der fusionierten mRNA aus GFP und RdRP des EV-30, mittels *mfold3.2* (Zuker, 2003) gefaltet. Dies führte zu einer Vielzahl von Vorschlägen möglicher Sekundärstrukturen für die vollständige Ziel-RNA. Je negativer die für eine bestimmte Struktur berechnete Änderung der Freien Energie  $\Delta G$  ist, desto wahrscheinlicher ist auch ihre Ausbildung. Mit der stabilsten der vorhergesagten Sekundärstrukturen (**Abbildung 4.5a**) wurden anschließend die Zielsequenzen der verbleibenden siRNAs aus dem Pool analysiert. Dafür wurden alle Basen, die an der Ausbildung der jeweiligen lokalen Struktur beteiligt waren, bestimmt (**Abbildung 4.5b**). Die *in silico* Faltung des entsprechenden

lokalen Strukturmotivs mit dem „Free energy determination tool“ der *mfold3.2* Software (**Abbildung 4.5c**) lieferte eine gute Näherung von  $\Delta G_{\text{Lokal}}$ , die die Stabilität der lokalen Sekundärstruktur widerspiegelte und somit als Maß für die Zugänglichkeit einer Zielsequenz dienen konnte. Es wurden daher alle siRNAs aus dem Pool entfernt, deren Zielsequenzen zu Strukturen mit stark negativen  $\Delta G_{\text{Lokal}}$  führten. Als Grenzwert hierfür wurden -25 kcal/mol gewählt. Aus dem ursprünglich aus 30 siRNAs bestehenden Pool verblieben nach Selektion sechs potentiell wirksame siRNAs gegen die RdRP des EV-30 (**Tabelle 3.1**).



**Abbildung 4.5:** Zugänglichkeit der Zielsequenz für siRdRP4.

**a)** Sekundärstruktur des stabilsten RdRP-GFP-Transkripts nach Faltung der vollständigen Ziel-RNA mit *mfold3.2*. **b)** Lokale Struktur der Zielsequenz für siRdRP4. Basen, die komplementär zum Antisense-Strang der siRNA sind, wurden durch die rote Linie angedeutet. Schwarz gekennzeichnete Basen wurden für die *in silico* Faltung in **c)** verwendet. **d)** Die Änderung der Freien Energie  $\Delta G_{\text{Lokal}}$  kann aus den Strukturelementen der *in silico* gefalteten lokalen Struktur berechnet werden.

Für eine erste Einschätzung der Aktivität der sechs selektierten siRNAs, nachfolgend als siRdRP1-6 bezeichnet, wurden diese in einem GFP-Reporter-Assay untersucht. Dafür wurde die cDNA der RdRP des EV-30 in einen Expressionsvektor hinter das Gen, das für den Reporter GFP codiert, kloniert (**Abbildung 4.6**). Die Co-Transfektion des GFP-Reporter-



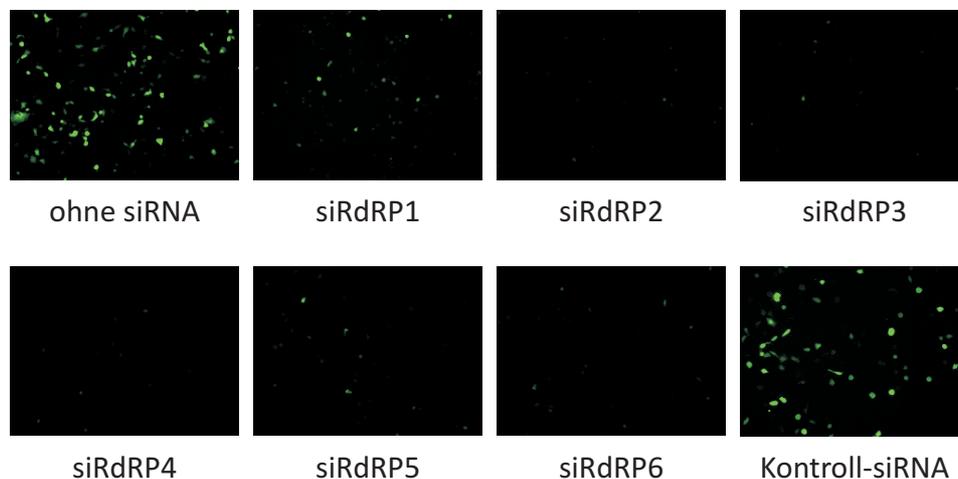
**Abbildung 4.6: GFP-Reporter-Konstrukt**

Die RdRP des EV-30 wurde hinter die codierende Sequenz des Reporters GFP kloniert.

Konstrukts mit effizienten siRNAs führt zur Spaltung der RNA-Zielsequenz und damit zu einer instabilen Gesamt-mRNA, deren nachfolgende Degradierung in einer verminderten GFP-Expression resultiert.

Es müsste demnach indirekt anhand von Fluoreszenzaufnahmen ein erster Eindruck

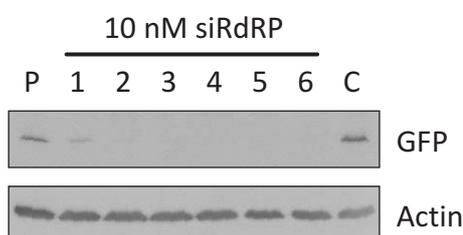
gewonnen werden, ob die selektierten siRNAs effizient die Expression der RdRP des EV-30 inhibieren können. Wie die **Abbildung 4.7** zeigt, führte die Co-Transfektion von 0,8 µg des GFP-Reporters mit je 10 nM siRdRP1-6 in Cos-7 Zellen zu einer deutlich verminderten GFP-Expression. Die Co-Transfektion mit einer Kontroll-siRNA hatte dagegen keinen Einfluss auf die GFP-Expression. In Zellen, die mit 10 nM siRdRP1 co-transfiziert wurden, konnte jedoch im Vergleich zu siRdRP2-6 noch ein schwaches GFP-Signal beobachtet werden.



**Abbildung 4.7: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung eines GFP-Reporter-Assay mit siRdRP1-6.**

Cos-7-Zellen wurden mit 0,8 µg des GFP-RdRP-Plasmids und je 10 nM der siRdRP1-6 co-transfiziert. Die Degradierung der RdRP resultierte in einer verminderten GFP-Expression.

Die Ergebnisse des nachfolgend durchgeführten Western Blots bestätigten die vorherigen fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen (**Abbildung 4.8**). So reduzierten fünf der sechs siRNAs (siRdRP2-6) die GFP-Expression fast vollständig, während siRdRP1 nur eine partielle Inhibition hervorrufen konnte. Die densitometrische Analyse der Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten zeigte eine etwa 90%ige Reduktion der GFP-Expression durch siRdRP2-4 und siRdRP6, eine 72%ige Reduktion durch siRdRP5 und eine 48%ige Reduktion durch siRdRP1 (**Tabelle 4.3**). Demnach zeigten fünf der sechs selektierten siRNAs im GFP-Reporter-Assay eine hohe Wirksamkeit gegen die RdRP des EV-30 mit einer Inhibition des Reporters von über 70%.



**Abbildung 4.8: Western Blot eines GFP-Reporter-Assay mit siRdRP1-6.**

RD-Zellen wurden mit 0,8 µg des GFP-RdRP-Plasmids und je 10 nM der siRdRP1-6 co-transfiziert. Eine Degradierung der RdRP führte zu einer verminderten GFP-Expression. P: Transfektion von 0,8 µg GFP-RdRP-Plasmid ohne siRNA; C: Transfektion von 0,8 µg GFP-RdRP-Plasmid mit 10 nM Kontroll-siRNA. Actin-Banden sind als Ladekontrolle gezeigt.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

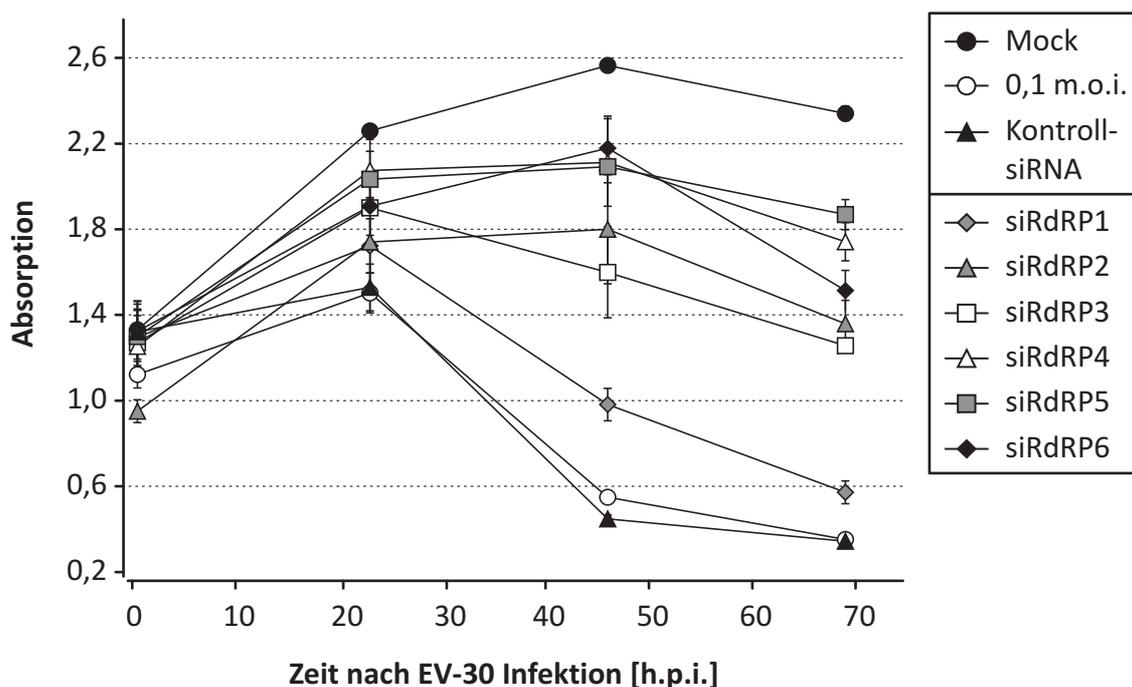
**Tabelle 4.3: Relative Inhibition der GFP-Expression durch siRdRP1-6.**

Die Normierung erfolgte anhand der Bandenintensität der Kontroll-siRNA.

	relative GFP-Inhibition
siRdRP1	48%
siRdRP2	90%
siRdRP3	89%
siRdRP4	94%
siRdRP5	72%
siRdRP6	90%

Die entscheidende Untersuchung, ob mit Hilfe der Filter-basierten Methode wirksame siRNAs gegen die RdRP des EV-30 selektiert werden konnten, ist die Evaluation der antiviralen Aktivität dieser siRNAs in einem Assay mit dem infektiösen Virus. Dafür wurden RD-Zellen mit 100 nM siRdRP1-6 transfiziert und vier Stunden später mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Eine m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 0,1 entspricht dem (theoretischen) Einsatz von einem Viruspartikel pro 10 eingesäte Zellen. Eine halbe Stunde beziehungsweise 23, 46 und 69 Stunden nach Infektion (h.p.i.) konnte die Zellviabilität mittels XTT-Test bestimmt werden. Dabei korreliert die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes XTT mit der Vitalität der Zellen: Je höher die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm, desto vitaler die Zellen. Im Falle von unbehandelten Virus-infizierten Zellen kam es infolge des Infektionszyklus zu einer schnellen Zellyse und damit zu einer stark verminderten Zellviabilität nach zwei

Tagen (**Abbildung 4.9**). Die mit der Kontroll-siRNA vorbehandelten Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf der Zellviabilität wie unbehandelte Virus-infizierte Zellen, was durch einen starken Abfall der Absorption am Tag 2 nach Infektion gekennzeichnet ist. Dagegen schützten die selektierten siRNAs mit Ausnahme von siRdRP1 die Zellen vor einer schnellen Lyse durch das EV-30, indiziert durch hohe Zellviabilitäten 46 Stunden nach Infektion.

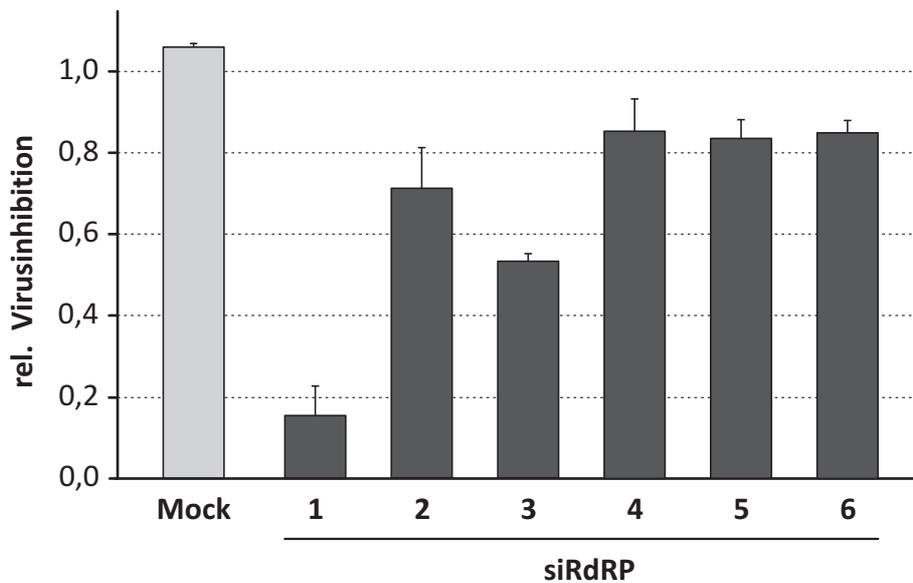


**Abbildung 4.9: Viabilität von EV-30 infizierten RD-Zellen, die zuvor mit siRdRP1-6 transfiziert wurden.**

RD-Zellen wurden mit je 100 nM siRdRP1-6 transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Die Absorption, gemessen bei einer Wellenlänge von 492 nm, korreliert direkt mit der Zellviabilität. Mock: unbehandelte, nicht infizierte Zellen.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

Um ein Maß für die antivirale Wirksamkeit jeder siRNA zu erhalten, wurde die jeweilige relative Inhibition der Virusreplikation aus drei unabhängigen Versuchen anhand der entsprechenden Zellviabilitäten zwei Tage nach Infektion berechnet (**Abbildung 4.10**). Dabei konnte eine gute Korrelation mit den Ergebnissen des GFP-Reporter-Assays (**Abbildung 4.7**) beobachtet werden. Fünf der sechs selektierten siRNAs (siRdRP2-6) waren nicht nur wirksame Inhibitoren der GFP-RdRP-Expression, sondern hatten auch eine starke antivirale Aktivität. Dagegen konnte siRdRP1 die GFP-RdRP-Expression nur zu etwa 50% inhibieren und zeigte einen deutlich geringeren protektiven Effekt gegenüber der Zellyse durch EV-30. Die Charakteristika der selektierten siRNAs und ihrer inhibitorischen Effekte im GFP-Reporter-Assay als auch im Virus-Assay sind in **Tabelle 4.4** zusammengefasst.



**Abbildung 4.10: Relative Inhibition der Replikation des EV-30.**

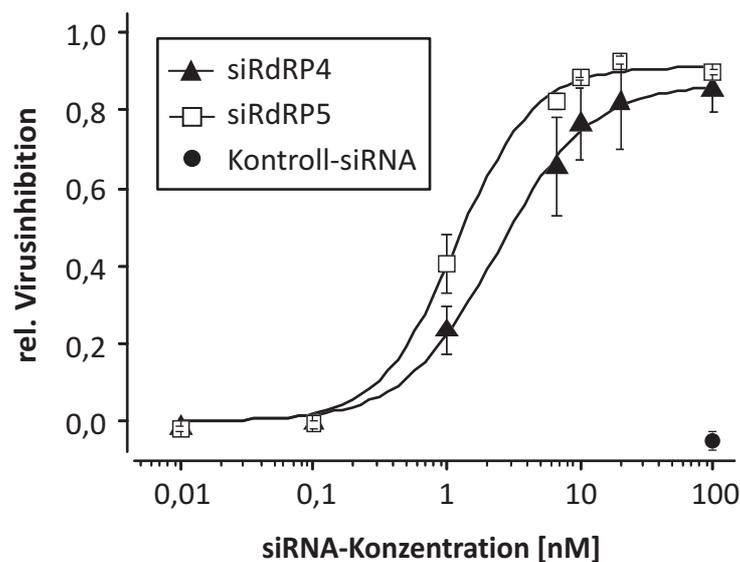
RD-Zellen wurden mit je 100 nM siRdRP1-6 transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Die relative Virusinhibition wurde aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, berechnet. Es sind Mittelwerte und Standard-Abweichungen aus drei unabhängigen Versuchen, jeder als 4fach-Bestimmung, dargestellt. Mock: unbehandelte, nicht infizierte Zellen.

**Tabelle 4.4: Charakteristika der selektierten siRNAs gegen die RdRP des EV-30.**

	siRNA-Designer (Firma)	Punkte (Reynolds)	$\Delta G_{\text{Antisense}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{Lokal}}$ (kcal/mol)	Inhibition	
					Reporter	Virus
siRdRP1	MWG	6	+1,6	-5,21	48%	23%
siRdRP2	MWG	6	+0,9	-6,61	90%	66%
siRdRP3	Dharmacon	7	+1,6	-1,4	89%	56%
siRdRP4	Dharmacon	7	+2,3	-4,9	94%	83%
siRdRP5	Dharmacon	4	+2,2	-23,3	72%	82%
siRdRP6	Invitrogen	8	+2,2	-3,3	90%	86%

Um die Virusinhibition näher zu quantifizieren, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente für zwei der wirksamsten siRNAs, siRdRP4 und siRdRP5, durchgeführt. Dafür wurden RD-Zellen mit unterschiedlichen siRdRP4- beziehungsweise siRdRP5-Konzentrationen transfiziert und nach 24 Stunden mit je 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. Aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, konnte die jeweilige relative Virusinhibition berechnet werden. Diese wurde gegen die entsprechende Konzentration an transfizierter siRNA

(siRdRP4 beziehungsweise siRdRP5) aufgetragen. Die **Abbildung 4.11** zeigt eine deutliche konzentrationsabhängige Inhibition des EV-30 durch siRdRP4 beziehungsweise siRdRP5. Dabei ist der antivirale Effekt umso größer, je höher die entsprechend eingesetzte siRNA-Konzentration ist. Der sigmoidale Fit mit der Hill-Funktion lieferte einen  $IC_{50}$ -Wert, definiert als Konzentration der halbmaximalen Inhibition der Zelllyse durch das Virus, für siRdRP4 von  $2,35 \pm 0,25$  nM und für siRdRP5 von  $1,18$  nM  $\pm 0,07$  nM. Die Kontroll-siRNA hatte dagegen keinen antiviralen Effekt, wie für die höchste Konzentration dargestellt ist.



**Abbildung 4.11: Dosis-Wirkungs-Kurve von siRdRP4 und siRdRP5.**

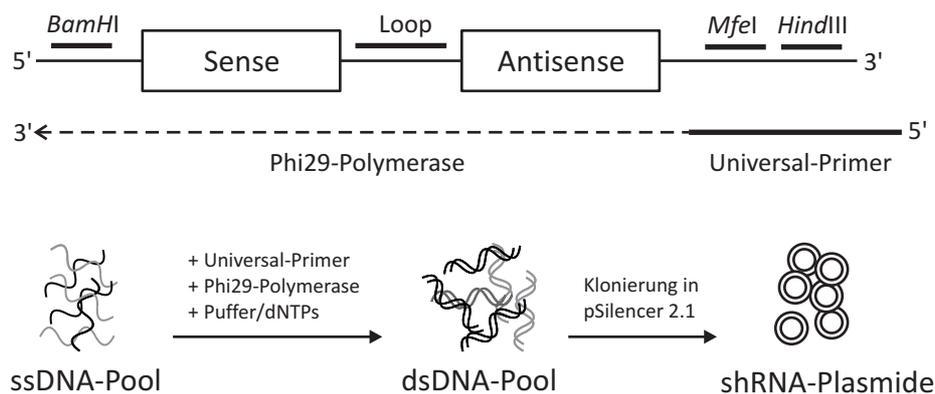
RD-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an siRdRP4 beziehungsweise siRdRP5 transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. Die relative Virusinhibition wurde aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, berechnet. Es sind die Mittelwerte und Standard-Abweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen, jeder als 4fach-Bestimmung, dargestellt.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

Die systematische Selektion von siRNAs nach dem Filter-Prinzip hat sich als erfolgreich erwiesen, hocheffiziente siRNAs gegen das Echovirus 30 zu erhalten. Die Methode ist nicht nur für das Echovirus 30 anwendbar, sondern ist auch auf andere Viren übertragbar.

### 4.3 Paralleles Klonieren von shRNA-Expressionskassetten gegen die RdRP des EV-30

Wie der vorangegangene Abschnitt zeigt, können mit Hilfe bekannter Design-Kriterien und nachfolgender Selektion wirksame siRNAs gegen die virale RNA identifiziert werden. Für eine längerfristige Unterdrückung der viralen Genexpression und für mögliche therapeutische Anwendungen werden allerdings virale shRNA-Expressionsvektoren benötigt. Eine wirksame siRNA in die entsprechende shRNA-codierende Sequenz zu überführen, gestaltet sich jedoch schwierig, da bis heute nur wenig über Faktoren bekannt ist, die die Effizienz einer shRNA bestimmen. Das Klonieren von vielen verschiedenen, potentiell wirksamen shRNA-codierenden Sequenzen, die erst dann hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet werden können, ist ein zeit- und kostenintensiver Prozess. Daher wurde ein schnelles Verfahren entwickelt, das die gleichzeitige Herstellung verschiedener shRNA-Expressionsvektoren erlaubt: Das parallele Klonieren von shRNA-Expressionskassetten (**Abbildung 4.12**).



**Abbildung 4.12: Paralleles Klonieren von verschiedenen shRNA-codierenden Sequenzen.**

Die einzelsträngigen DNA-Oligonucleotide (ssDNA) enthalten die codierenden Sequenzen für den Sense- und Antisense-Strang der shRNA. Sense- und Antisense-Strang sind durch eine konstante Loop-Sequenz voneinander getrennt. Die Phi29-Polymerase generiert nach Bindung des Universal-Primers an die konstante Region am 3'-Ende aller ssDNA-Templates den doppelsträngigen DNA (dsDNA)-Pool, der nachfolgend in den Expressionsvektor *pSilencer 2.1-U6 neo* kloniert wird.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

Die Grundlage bildeten sechs kurze einzelsträngige DNA-Oligonucleotide (**Tabelle 3.4**), nachfolgend als ssDNA-Templates bezeichnet, die für den Sense- und Antisense-Strang der entsprechenden siRNA gegen die RdRP des EV-30 (siRdRP1-6, **Abschnitt 4.2** und **Tabelle 3.1**) codieren. Neben einer konstanten Loop-Sequenz wiesen alle ssDNA-Templates am 3'-Ende eine invariante Sequenz auf, an die der Universal-Primer (**Tabelle 3.4**) binden kann. Für das nachfolgende parallele Klonieren in den Expressionsvektor *pSilencer 2.1-U6*

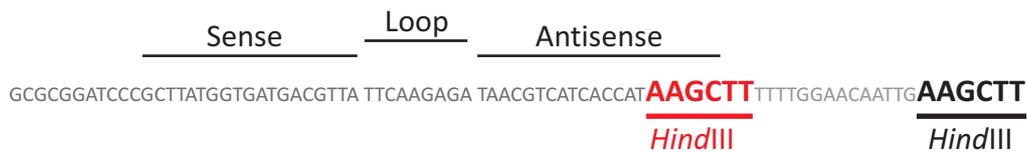
*neo* wurden alle Konstrukte mit einer *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Hind*III-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. Eine zusätzlich eingefügte *Mfe*I-Schnittstelle bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Doppel- oder Mehrfach-Expressions-kassetten herzustellen (siehe **Abschnitt 4.7**).

Die Doppelstrang-Synthese (dsDNA) erfolgte durch Inkubation der sechs verschiedenen ssDNA-Templates zusammen mit dem Universal-Primer und der Phi29-Polymerase. Diese DNA-Polymerase kombiniert in einer Extension-Reaktion eine hohe Effizienz mit einer geringen Fehlerrate (McIntyre and Fanning, 2006). Der resultierende dsDNA-Pool wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten, in den *pSilencer 2.1-U6 neo* ligiert und nachfolgend in *E. coli* transformiert. Zufällig ausgewählte Klone wurden sequenziert, wobei ungefähr zwei Drittel der Klone eine korrekte Sequenz zeigten (**Tabelle 4.5**), während die anderen Mutationen und Deletionen aufwiesen. Insgesamt wurden für fünf der sechs shRNA-codierenden Plasmide korrekte Klone erhalten.

**Tabelle 4.5:** Ergebnisse der Sequenzierung von Plasmiden, die mittels parallelem Klonieren erhalten wurden.

shRNA-Plasmid	Sequenzierte Klone	Klone mit korrekter Sequenz
shRdRP1	2	1
shRdRP2	2	1
shRdRP3	4	4
shRdRP4	3	2
shRdRP5	3	3
shRdRP6	4	0
<b>Summe</b>	<b>18</b>	<b>11</b>

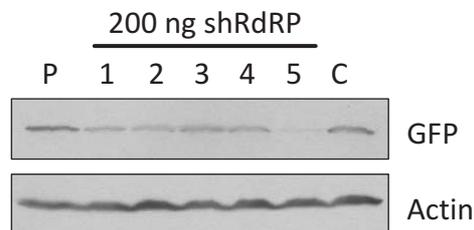
Eine nachfolgende nähere Sequenzanalyse zeigte, dass die für die shRdRP6 codierende DNA-Sequenz eine weitere *Hind*III-Schnittstelle trägt (**Abbildung 4.13**). Deshalb konnten nur Klone mit einer verkürzten Sequenz erhalten werden.



**Abbildung 4.13: Sequenz des einzelsträngigen DNA-Oligonucleotides, das für die shRdRP6 codiert.**

Durch die Überführung der siRdRP6 in die shRNA-codierende Sequenz ist eine zweite *HindIII*-Schnittstelle (rot markiert) entstanden. Die Klonierung via *BamHI* und *HindIII* in den *pSilencer 2.1-U6 neo* führte daher zu Plasmiden, die eine verkürzte shRdRP6 exprimieren.

Die Effizienz der shRNA-codierenden Plasmide shRdRP1-5, die Expression der RdRP des EV-30 zu unterdrücken, wurde nachfolgend in einem GFP-Reporter-Assay untersucht. Dafür wurde das in **Abschnitt 4.1** beschriebene GFP-Reporter-Konstrukt (**Abbildung 4.6**) mit je einem der fünf shRNA-Expressionsplasmide co-transfiziert. Eine wirksame shRNA führt zur Spaltung der Zielsequenz in der mRNA und bewirkt damit auch die Unterdrückung der GFP-Expression. Wie der Western Blot in **Abbildung 4.14** zeigt, reduzierten alle fünf shRNAs deutlich die Expression des Reporters. Im Falle von shRdRP5 erfolgte sogar eine Inhibition der GFP-Expression auf ein Niveau unterhalb des Detektionslevels.



**Abbildung 4.14: Western Blot eines GFP-Reporter-Assay mit shRdRP1-5.**

RD-Zellen wurden mit 400 ng GFP-Reporter-Plasmid und je 200 ng der shRNA-codierenden Plasmide (shRdRP1-5) gegen die RdRP des EV-30 co-transfiziert. Eine Degradierung der RdRP führt zu einer verminderten GFP-Expression. P: Transfektion von 400 ng GFP-Reporter-Plasmid ohne shRNA-codierenden Plasmid; C: Co-Transfektion von 400 ng GFP-Reporter-Plasmid und 200 ng Kontroll-shRNA-Plasmid. Actin-Banden sind als Ladekontrolle gezeigt.

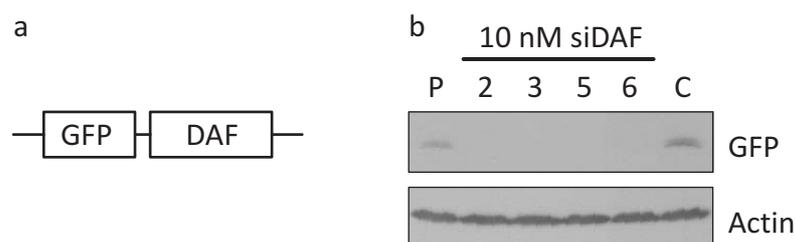
Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

Basierend auf den selektierten antiviralen siRNAs gegen die RdRP des EV-30 (**Abschnitt 4.2**) konnten durch die gerichtete und schnelle Methode des parallelen Klonierens fünf shRNA-Expressionsplasmide generiert werden. Diese wiesen in einem GFP-Reporter-Assay eine hohe Effizienz bezüglich der Unterdrückung der Expression der RdRP des EV-30 auf (**Abbildung 4.14**).

#### 4.4 siRNA-vermittelte *Downregulation* von endogen exprimiertem DAF

Die Wirksamkeit einer antiviralen siRNA kann verloren gehen, wenn Mutationen in ihrer Zielsequenz auftreten. Um das Risiko zu minimieren, dass solche sogenannten *Escape*-Mutanten auftreten, werden neben kombinatorischen antiviralen Ansätzen auch siRNAs verwendet, die gegen zelluläre Faktoren gerichtet sind. Ein Beispiel hierfür sind Rezeptoren oder Co-Rezeptoren, die zwar essentiell für den viralen Lebenszyklus, aber entbehrlich für die Zelle selbst sind. Viren können zwar auch so mutieren, dass sie einen anderen (Co-)Rezeptor oder Wirtsfaktor verwenden können, allerdings ist hierfür die Wahrscheinlichkeit deutlich geringer. Für das EV-30 konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welche zellulären Faktoren für den Eintritt des Virus in eine Wirtszelle benötigt werden. Obwohl eine Vielzahl von Enteroviren den *decay accelerating factor* (DAF) als primären Eintritts-Rezeptor verwenden (Bergelson et al., 1994), konnte dies für EV-30 nicht abschließend bestätigt werden (Powell et al., 1998).

Da im Unterschied zu antiviralen siRNAs für fast jedes zelluläre Gen validierte siRNAs kommerziell erhältlich sind, wurden vier siRNAs gegen humanes DAF (*SMARTpool package* der Firma Dharmacon), nachfolgend als siDAF2, 3, 5 und 6 bezeichnet, in einem GFP-Reporter-Assay hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersucht. In Analogie zu den Experimenten in **Abschnitt 4.2** wurde die DAF-cDNA hinter die codierende Sequenz des Reporters GFP kloniert (**Abbildung 4.15a**). Die Co-Transfektion des GFP-Reporters mit jeder der vier siRNAs gegen humanes DAF führte zu einer starken Abnahme der GFP-Expression im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA co-transfiziert wurden (**Abbildung 4.15b**).



**Abbildung 4.15: Western Blot eines GFP-Reporter-Assay mit siDAF2, 3, 4 und 6.**

RD-Zellen wurden mit 800 ng GFP-Reporter-Plasmid und je 10 nM der siRNAs gegen humanes DAF (*SMARTpool package* der Firma Dharmacon) co-transfiziert. Eine Degradierung der DAF-mRNA führt zu einer verminderten GFP-Expression. P: Transfektion von 800 ng GFP-Reporter-Plasmid ohne siRNA; C: Co-Transfektion von 800 ng GFP-Reporter-Plasmid und 10 nM Kontroll-siRNA. Actin-Banden sind als Ladekontrolle gezeigt.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

Im nächsten Schritt wurden alle vier, im GFP-Reporter-Assay sehr wirksamen siRNAs des *SMARTpool package* gegen humanes DAF hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht, endogenes DAF zu unterdrücken. Dafür wurden HeLa-Zellen, von denen aus der Literatur bekannt ist, dass sie viel DAF exprimieren (Thomas and Lublin, 1993), mit je 100 nM siRNA transfiziert und diese nach etwa 48 Stunden für die Analyse im Western Blot geerntet. Wie die **Abbildung 4.16** zeigt, variierte die Wirksamkeit der vier siRNAs, die Expression des endogenen DAF in HeLa-Zellen zu unterdrücken. Im Vergleich zu den Ergebnissen des GFP-Reporter-Assay (**Abbildung 4.15b**) führte die Transfektion von siDAF2, siDAF5 und siDAF6 zu einer starken Unterdrückung der DAF-Expression, während siDAF3 nur einen geringen inhibitorischen Effekt ausübte.



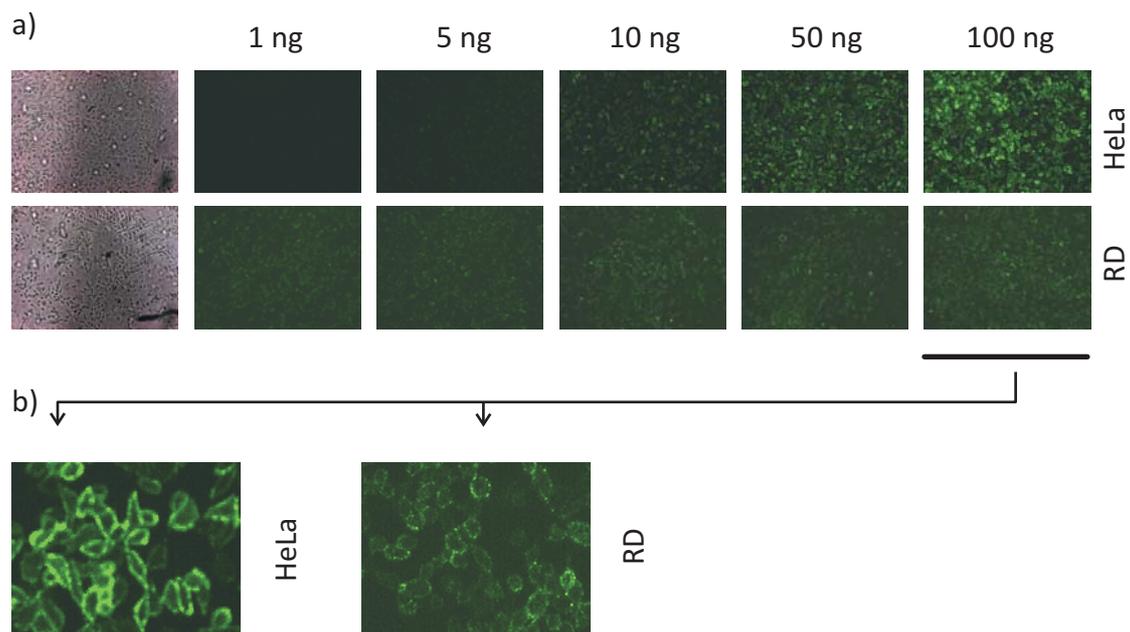
**Abbildung 4.16: Western Blot der siRNA-vermittelten Downregulation von endogenem DAF**

HeLa-Zellen wurden mit je 100 nM der vier siRNAs gegen humanes DAF (*SMARTpool package* der Firma Dharmacon) transfiziert. -: Transfektion ohne siRNA; C: Transfektion von 100 nM Kontroll-siRNA. Actin-Banden sind als Ladekontrolle gezeigt.

Für die Untersuchung der Rolle von DAF für die Ausbreitung des EV-30 ist es essentiell, die *Downregulation* von endogenem DAF auch in RD-Zellen nachzuweisen, da Vorversuche zeigten, dass sich RD-Zellen gut, HeLa-Zellen jedoch schlecht mit dem Virus infizieren ließen (nicht gezeigt). Für einen entsprechenden Western Blot wurden zwei verschiedene Antikörper getestet, wobei mit keinem von beiden ein Nachweis des von RD-Zellen exprimierten DAF möglich war. Deshalb wurde mittels Reverser Transkription von Gesamt-RNA und nachfolgender quantitativer PCR (qPCR) zunächst überprüft, ob RD-Zellen DAF exprimieren. Mit DAF-spezifischen Primern (**Tabelle 3.6**) konnte das erwartete Produkt erhalten werden, woraus sich schließen lässt, dass auch RD-Zellen DAF exprimieren (nicht gezeigt).

Für den nachfolgenden Vergleich der DAF-Expression auf RD- und HeLa-Zellen wurde eine auf der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung basierende Methode etabliert. Aufgrund der Kopplung des Zweitantikörpers an einen fluoreszierenden Farbstoff, wie beispielsweise FITC, kann das auf den Zellen lokalisierte DAF mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Wie **Abbildung 4.17a** zeigt, führte die Inkubation von HeLa-Zellen mit zunehmender Menge Primärantikörper (1-100 ng) auch zu einer Erhöhung des Fluoreszenz-Signals. Dieser Effekt konnte bei RD-Zellen nicht beobachtet werden, obwohl (im Gegensatz zu HeLa-Zellen)

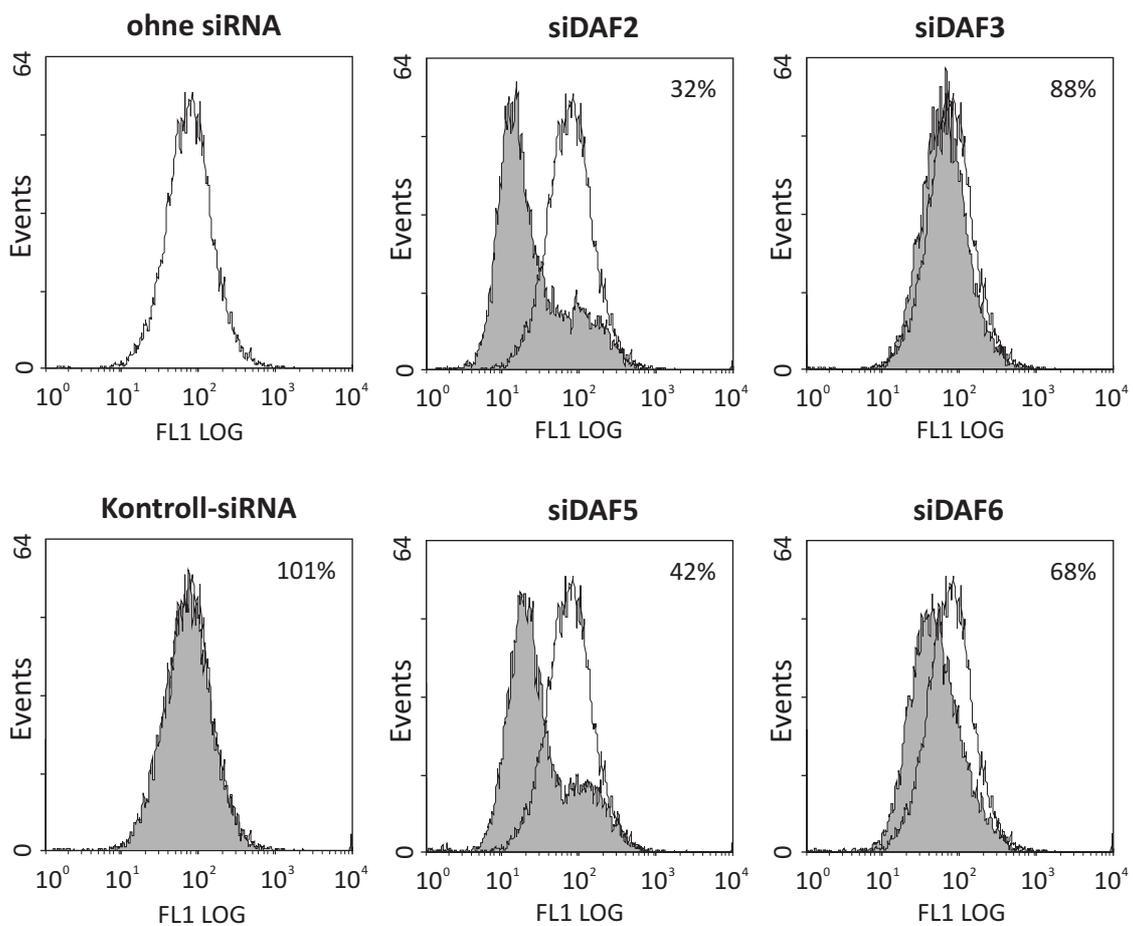
bereits mit 1 ng Primärantikörper Fluoreszenz-Signale detektiert werden konnten. Eine genaue fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass DAF sowohl bei HeLa- als auch bei RD-Zellen vorwiegend in der Zellmembran lokalisiert ist (**Abbildung 4.17b**). Die Ergebnisse wiesen auf eine starke DAF-Expression in HeLa-Zellen im Vergleich zu RD-Zellen hin, wobei sich hinsichtlich der DAF-Lokalisation in beiden Zelllinien keine Unterschiede feststellen ließen.



**Abbildung 4.17: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von endogenem DAF auf HeLa- und RD-Zellen.**

**a)** HeLa- und RD-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen eines DAF-spezifischen Primärantikörpers und 100 ng eines FITC-gelabelten Sekundärantikörpers inkubiert. **b)** Ausschnitte der Inkubation mit 100 ng Primärantikörper wurden vergrößert, um die Lokalisation des Fluoreszenz-Signals in HeLa- und RD-Zellen in der Zellmembran zu verdeutlichen.

Entsprechend konnte der Nachweis der siRNA-vermittelten Downregulation von DAF auf RD-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) durchgeführt werden. Dafür wurden die Zellen nach Transfektion mit je 100 nM der vier siRNAs gegen DAF analysiert. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede in den siRNA-Aktivitäten (**Abbildung 4.18**). Im Vergleich zu Zellen, die ohne siRNA transfiziert wurden reduzierten siDAF2 und siDAF5 die DAF-Expression auf etwa 30% beziehungsweise 40%, während siDAF3 und siDAF6 nur eine moderate Effizienz zeigten, endogen exprimiertes DAF zu inhibieren.



**Abbildung 4.18: FACS-Analyse der *Downregulation* von endogem DAF.**

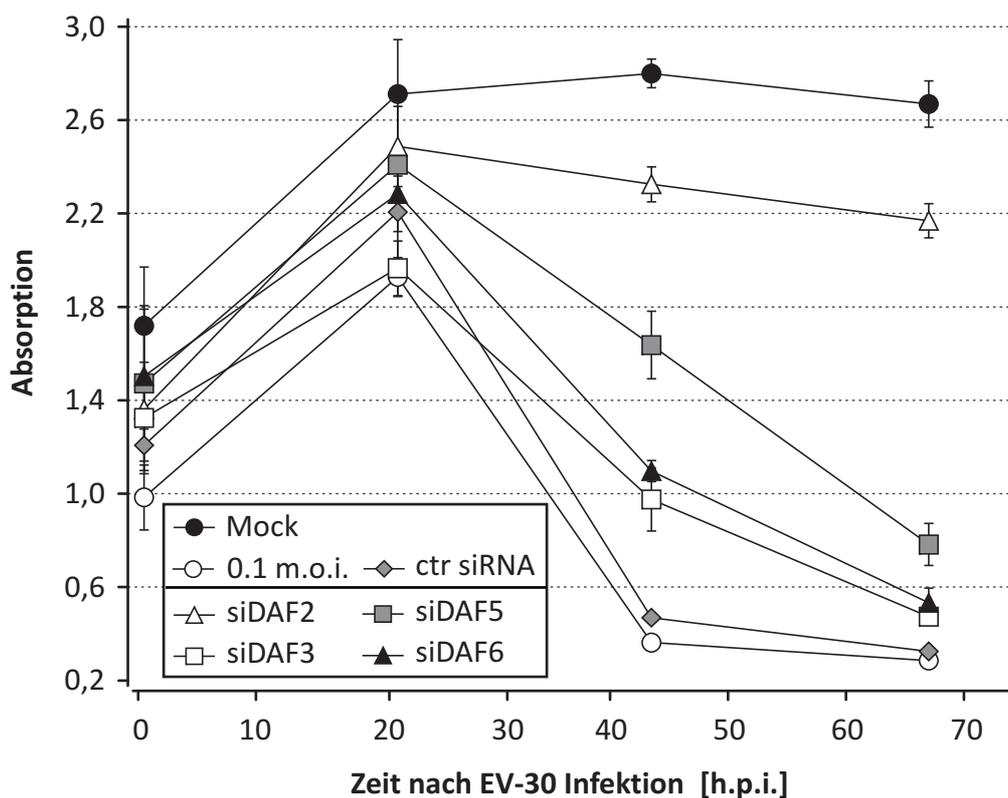
RD-Zellen wurden mit je 100 nM siRNA transfiziert (graue Fläche unter der Kurve). Die relative DAF-Expression nach siRNA-Transfektion resultiert aus der Normalisierung auf die DAF-Expression in RD-Zellen ohne siRNA (transparente Fläche unter der Kurve).

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

In diesem Abschnitt wurden vier siRNAs in Hinblick auf ihre Wirksamkeit gegen (endogenes) DAF untersucht, da dieser Rezeptor ein möglicher wichtiger zellulärer Faktor für das EV-30 darstellt. Eine der untersuchten siRNAs (siDAF2) erwies sich dabei als besonders effizient, die endogene DAF-Expression zu unterdrücken.

#### 4.5 Inhibition des EV-30 durch *Downregulation* von endogen exprimiertem DAF

Der nächste Schritt, die Rolle von DAF für EV-30 aufzuklären, bestand in der Klärung der Frage, ob die *Downregulation* von endogenem DAF RD-Zellen vor der Ausbreitung des EV-30 schützt. Dafür wurden die Zellen mit je 100 nM der vier gegen DAF gerichteten siRNAs transfiziert und drei Tage später mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. In Analogie zu den in **Abschnitt 4.2** beschriebenen Experimenten wurden nachfolgend die Zellviabilitäten zu verschiedenen Zeitpunkten mittels XTT-Test bestimmt. Unbehandelte Virus-infizierte Zellen (0,1 m.o.i.) zeigten bereits nach zwei Tagen eine stark reduzierte Zellviabilität, die auf eine schnelle Zellyse infolge des EV-30 Infektionszyklus zurückzuführen ist (**Abbildung 4.19**). Die mit Kontroll-siRNA vorbehandelten Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf der Zellviabilität wie unbehandelte Virus-infizierte Zellen, was durch einen starken Abfall der Absorption am Tag 2 nach Infektion gekennzeichnet ist. Dagegen schützte die Transfektion



**Abbildung 4.19:** Viabilität von EV-30 infizierten RD-Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen DAF transfiziert wurden.

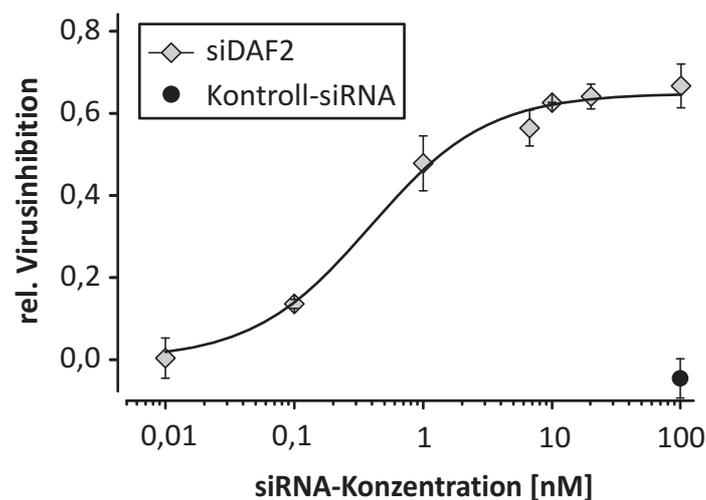
RD-Zellen wurden mit je 100 nM siRNA gegen DAF (siDAF2, 3, 5 und 6) transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Die Absorption, gemessen bei einer Wellenlänge von 492 nm, korreliert direkt mit der Zellviabilität. Mock: Unbehandelte, nicht-infizierte Zellen.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

von siDAF2 die Zellen in hohem Maße vor einer schnellen Lyse durch EV-30, während sich die Wirksamkeit der anderen DAF-spezifischen siRNAs nach zwei Tagen bereits deutlich verringerte.

Insgesamt korrelierte der aus **Abbildung 4.19** abzuleitende protektive Effekt der vier DAF-siRNAs gegenüber einer EV-30 Infektion mit ihrer Fähigkeit, die Expression von endogenem DAF zu unterdrücken. Die wirksamste siRNA, siDAF2, konnte die DAF-Expression auf etwa 30% reduzieren (**Abbildung 4.18**) und bewirkte einen starken antiviralen Effekt, der sich in einer hohen Zellviabilität widerspiegelte, die über drei Tage weitestgehend konstant blieb. Eine Transfektion mit der zweitbesten siRNA, siDAF5, führte zu einer moderaten Viabilität von RD-Zellen, die allerdings nach zwei Tagen stark abfiel. Dagegen zeigten beide siRNAs, die wenig effizient waren, die DAF-Expression zu unterdrücken (siDAF3 und siDAF6) auch einen sehr schwachen protektiven Effekt gegenüber einer EV-30 Infektion.

Nachfolgend durchgeführte Dosis-Wirkungs-Experimente für die wirksamste siRNA, siDAF2, unterstreichen die Beobachtung einer direkten Korrelation von DAF-Downregulation und Virusinhibition. Es wurden RD-Zellen mit unterschiedlichen siDAF2-Konzentrationen transfiziert und nach drei Tagen mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. Aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, konnte die relative Virusinhibition berechnet und gegen die entsprechende siDAF2-Konzentration aufgetragen werden. **Abbildung 4.20** zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibition von EV-30 durch siDAF2: Je mehr siRNA eingesetzt wird, desto besser ist der antivirale Effekt. Der sigmoidale Fit mit der Hill-

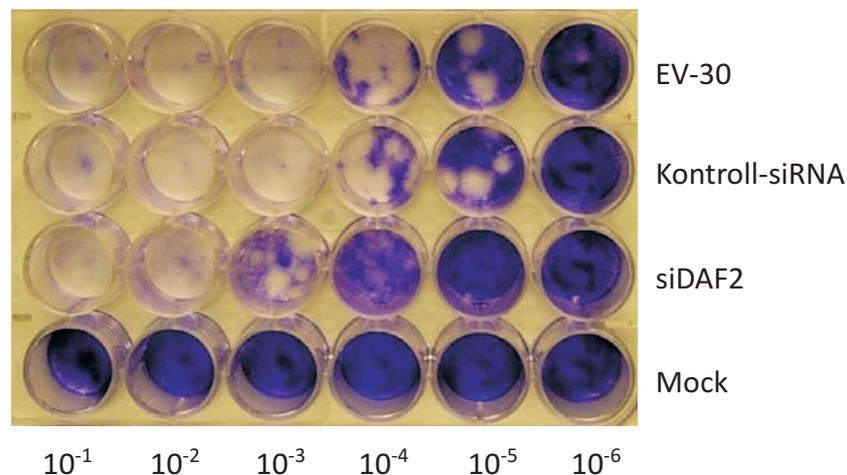


**Abbildung 4.20: Dosis-Wirkungskurve von siDAF2.**

RD-Zellen wurden mit ansteigender Konzentration an siDAF2 transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. Die relative Virusinhibition wurde aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, berechnet. Es sind die Mittelwerte und Standard-Abweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen, jeder als 4fach-Bestimmung, dargestellt.

Funktion lieferte einen  $IC_{50}$ -Wert, definiert als Konzentration der halbmaximalen Inhibition der Zelllyse durch das Virus, für siDAF2 von  $0,39 \pm 0,07$  nM. Die Kontroll-siRNA hatte keinen antiviralen Effekt, wie die Darstellung der höchsten eingesetzten Konzentration zeigt. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch eine *Downregulation* von DAF die Viabilität der Zellen nach Infektion mit EV-30 positiv beeinflusst wird.

In den folgenden Experimenten wurde überprüft, ob der protektive Effekt von siDAF2 (**Abbildung 4.19**) tatsächlich mit einer reduzierten Replikation von EV-30 einhergeht. Dafür wurden RD-Zellen mit 100 nM siDAF2 oder der Kontroll-siRNA transfiziert und drei Tage später mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert. Der virale Replikationszyklus wurde einen Tag nach Infektion gestoppt, und die Zelllysate konnten anschließend auf RD-Monolayern titriert werden. Obwohl EV-30 keine zählbaren Plaques formt, zeigt die **Abbildung 4.21** eine deutliche Verringerung der Viruslast um etwa eine Größenordnung ( $\log_{10}$ -Stufe) im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (EV-30) beziehungsweise zu Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

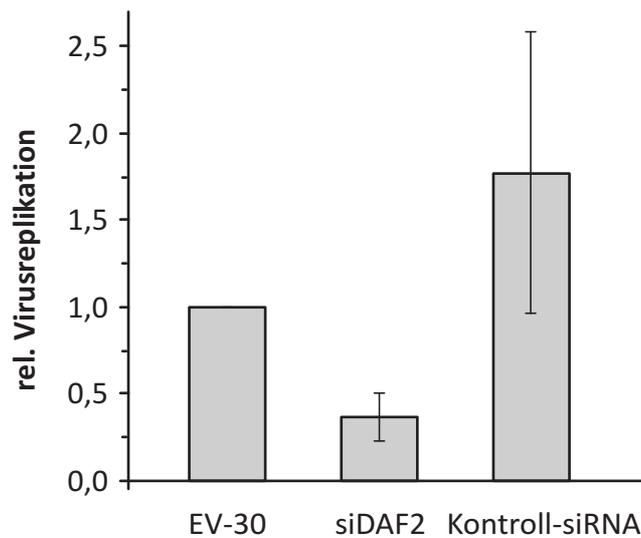


**Abbildung 4.21: Effekt der DAF-Downregulation auf die Replikation von EV-30 in RD-Zellen.**

RD-Monolayer wurden mit 10-fach Verdünnungen von Zelllysaten infiziert, die zuvor mit 100 nM siDAF2 oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert wurden. Mock: unbehandelte, nicht infizierte RD-Zellen; EV-30: unbehandelte, infizierte RD-Zellen.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

Die Verifikation der Effekte der DAF-*Downregulation* auf die Replikation des EV-30 erfolgte in einer weiteren Zelllinie. Nach Transfektion mit 100 nM siDAF2 konnte auch in HEK293-Zellen eine deutliche Reduktion der Virusreplikation beobachtet werden (**Abbildung 4.22**).



**Abbildung 4.22: Virus-Propagation-Assay von EV-30 in HEK293-Zellen.**

HEK293-Monolayer wurden mit 10-fach Verdünnungen von Zelllysaten infiziert, die zuvor mit 100 nM siDAF2 oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit 0,1 m.o.i. EV-30 infiziert wurden. EV-30: unbehandelte, infizierte RD-Zellen.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2009 entnommen.

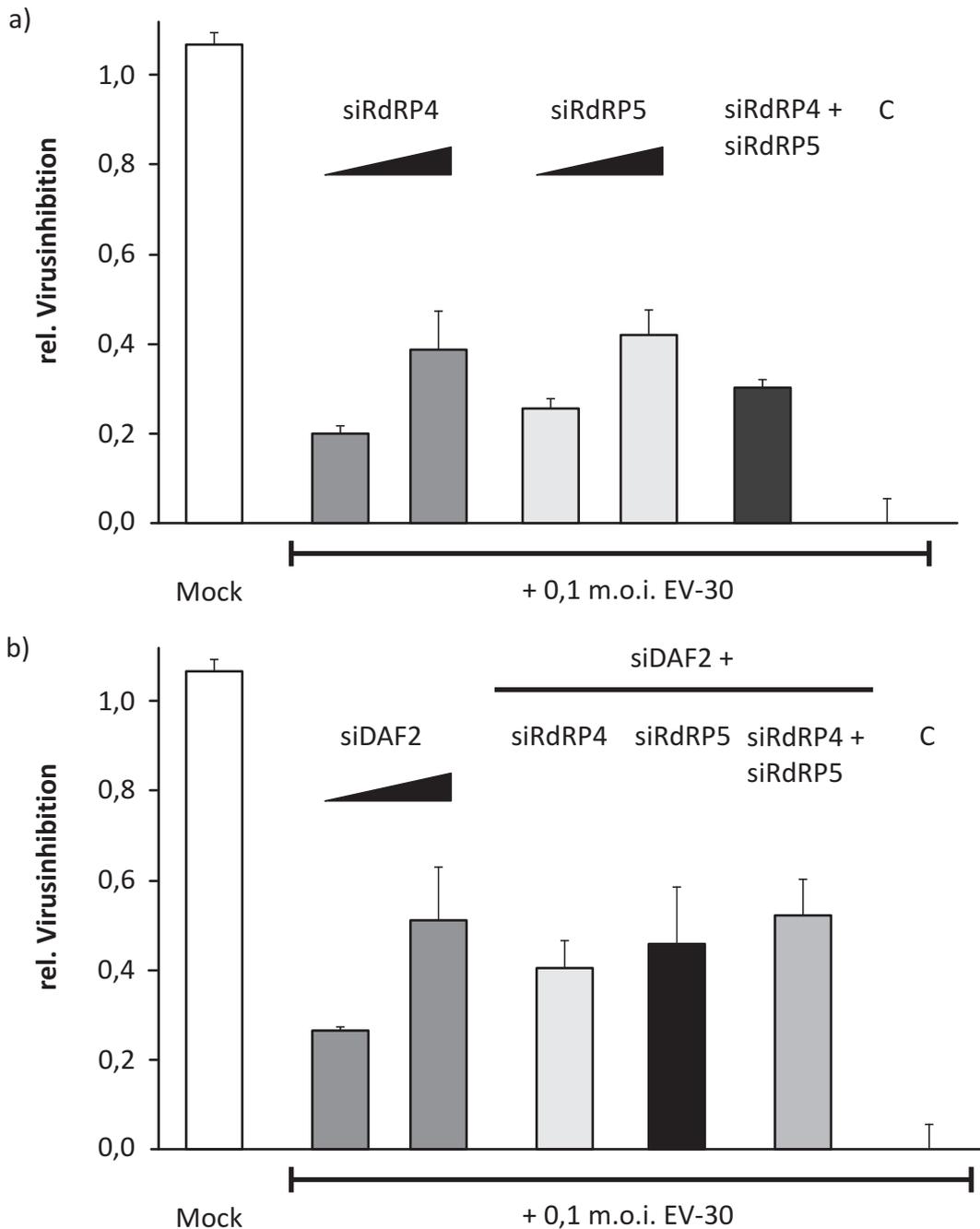
Die Ergebnisse der Virusausbreitungsversuche (*Virus-Propagation-Assay*) in zwei unabhängigen Zelllinien bestätigten, dass eine *Downregulation* von DAF die Ausbreitung von EV-30 inhibiert. Durch eine effiziente *Downregulation* von DAF kann, wie dieser Abschnitt zeigte, ein ausgeprägter antiviraler Effekt erreicht werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass DAF essentiell für die Ausbreitung des EV-30 ist.

## 4.6 Inhibition von EV-30 durch die Kombination von wirksamen siRNAs

Mit siRdRP4, siRdRP5 und siDAF2 standen nun drei effiziente siRNAs zur Verfügung, mit denen ein wirksamer Schutz gegen die Ausbreitung des EV-30 in Zellen erreicht werden konnte. Während siDAF2 die Zellen durch eine *Downregulation* der zellulären DAF-Expression vor der Infektion mit EV-30 schützt, sind siRdRP4 und RdRP5 starke Inhibitoren der Virusreplikation. Für die Untersuchung von möglichen additiven oder synergistischen Effekten, die aus den unterschiedlichen Angriffspunkten der siRNAs resultieren könnten, wurden siRdRP4, siRdRP5 und siDAF2 in verschiedenen Kombinationen gegen das EV-30 eingesetzt. Dafür wurde ein Konzentrationsbereich gewählt, in dem für alle drei siRNAs die maximal mögliche Virusinhibition noch nicht erreicht wird (vergleiche **Abbildung 4.11** und **4.20**): Jeweils 1,5 nM und 3 nM bei Anwendung einer einzelnen siRNA, jeweils 1,5 nM siRNA

bei einer Kombination von zwei siRNAs und jeweils 1 nM siRNA bei einer Kombination von drei siRNAs. Die höchste eingesetzte Konzentration betrug somit unabhängig von möglichen siRNA-Kombinationen 3 nM. Als Maß für die antivirale Wirksamkeit jeder siRNA oder einer Kombination von zwei oder drei siRNAs wurde die jeweilige relative Virusinhibition aus drei unabhängigen Versuchen anhand der entsprechenden Zellviabilitäten zwei Tage nach Infektion mit EV-30 bestimmt (**Abbildung 4.23**). Die Ergebnisse unterstreichen die bereits gezeigte konzentrationsabhängige Inhibition des EV-30: Mit Zunahme der siRNA-Konzentration (1,5 nM versus 3 nM) erhöhte sich auch die relative Inhibition des EV-30. Durch die Kombination der beiden antiviralen siRNAs (je 1,5 nM siRdRP4 und siRdRP5) konnte jedoch keine Verbesserung der relativen Virusinhibition erreicht werden (**Abbildung 4.23a**). Die Wirksamkeit des kombinatorischen Ansatzes, die Ausbreitung des EV-30 zu verhindern, war sogar etwas geringer als die Transfektion der Zellen mit einer einzigen siRNA. Die **Abbildung 4.23b** zeigt die Ergebnisse von möglichen Kombinationen der gegen eine zelluläre Zielsequenz gerichteten siDAF2 mit beiden antiviralen siRNAs. Hier konnte durch kombinatorische siRNA-Ansätze zwar kein höherer protektiver Effekt bei gleicher siRNA-Endkonzentration (3 nM) festgestellt werden, nach Transfektion der Kombination aus drei siRNAs (1 nM pro siRNA) wurde allerdings ein ähnlich hoher Wert für die relative Virusinhibition von etwa 50% erreicht wie für 3 nM siDAF2 allein.

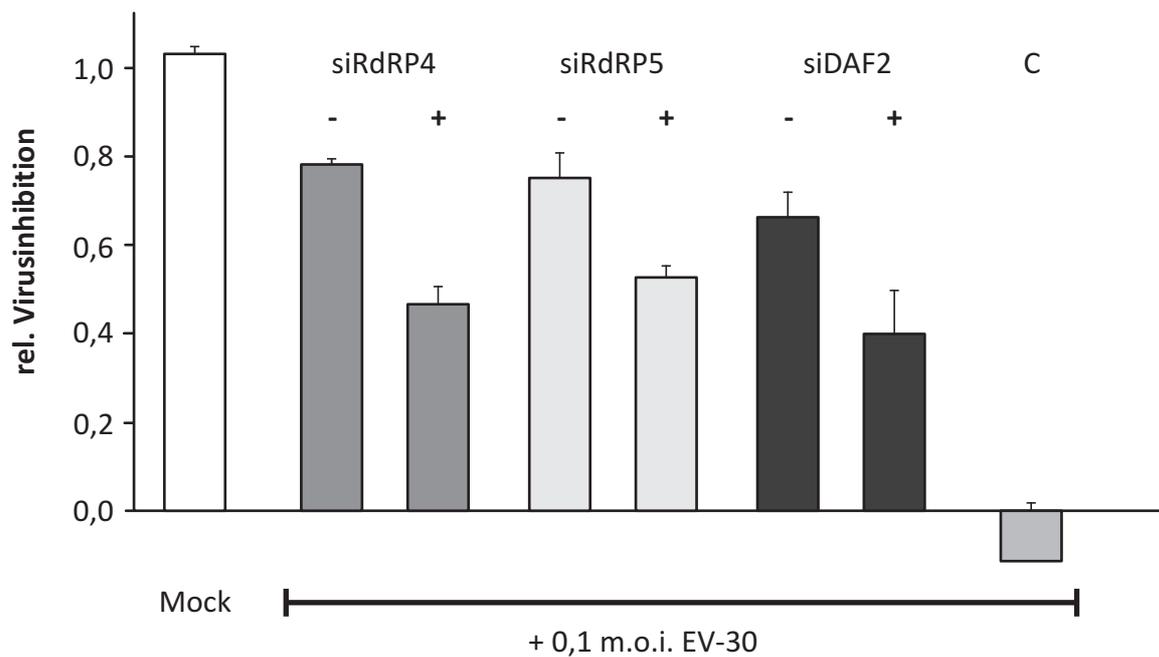
Die Ergebnisse der siRNA-Kombinationsexperimente führten zu der Frage, warum keine additiven Effekte bei der Kombination der beiden antiviralen siRNAs zu beobachten waren (**Abbildung 4.23a**). Möglicherweise konkurrieren die beiden siRNAs um Komponenten der RNAi-Maschinerie und vermindern dadurch die Aktivität der jeweils anderen siRNA. Deshalb wurden in einem weiteren Experiment die drei wirksamen siRNAs (siDAF2, siRdRP4 und siRdRP5) mit jeweils einer nicht-wirksamen siRNA kombiniert. Diese siRNA hat keine Homologien zu einer Zielsequenz des menschlichen Genoms oder des EV-30 und sollte daher keine antiviralen Effekte vermitteln können (Kontroll-siRNA). Für die Kombination wurde hier ein Konzentrationsbereich gewählt, in dem für alle drei wirksamen siRNAs die maximal mögliche Virusinhibition bereits erreicht wird (vergleiche **Abbildung 4.11** und **4.20**). In Analogie zu den bereits beschriebenen Experimenten wurde die jeweilige relative Virusinhibition anhand der entsprechenden Zellviabilitäten zwei Tage nach Infektion mit EV-30 berechnet (**Abbildung 4.24**). Dabei zeigte sich deutlich der Einfluss der Kontroll-siRNA auf die Aktivität der entsprechenden siRNAs. Durch die Kombination einer wirksamen siRNA mit der Kontroll-siRNA verminderte sich die relative Virusinhibition um etwa 20-35%.



**Abbildung 4.23: Inhibition von EV-30 durch Kombination von siRNAs**

RD-Zellen wurden mit siRdRP4, siRdRP5, siDAF2 oder mit einer Kombination aus zwei oder drei siRNAs transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Die relative Virusinhibition wurde aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, berechnet. Es sind Mittelwerte und Standard-Abweichungen aus drei unabhängigen Versuchen, jeder als 4fach-Bestimmung, dargestellt. Mock: unbehandelte, nicht infizierte Zellen; C: infizierte Zellen, die mit 3 nM einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

**a)** Kombination von zwei antiviralen siRNAs. Für die Transfektion einzelner siRNAs wurden jeweils 1,5 nM und 3 nM eingesetzt. Für die Kombination wurden jeweils 1,5 nM pro siRNA verwendet. **b)** Kombination von antiviralen mit Rezeptor-spezifischen siRNAs. Für die Transfektion von siDAF2 wurden jeweils 1,5 nM und 3 nM eingesetzt. Für die Kombination von siDAF2 mit einer antiviralen siRNA wurden jeweils 1,5 nM pro siRNA, für die Kombination mit beiden antiviralen siRNAs jeweils 1 nM pro siRNA verwendet.



**Abbildung 4.24: Einfluss der Kontroll-siRNA auf wirksame siRNAs gegen EV-30**

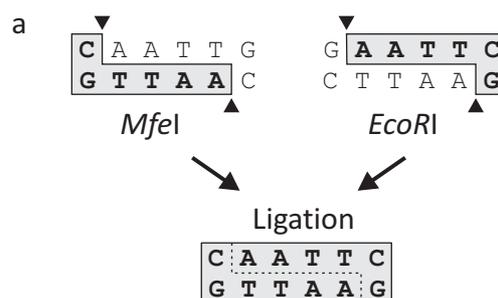
RD-Zellen wurden mit je 50 nM siRdRP4, siRdRP5, siDAF2 (-) oder in Kombination mit 50 nM Kontroll-siRNA (+) transfiziert und nachfolgend mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Die relative Virusinhibition wurde aus den Zellviabilitäten, die zwei Tage nach Infektion ermittelt wurden, berechnet. Es sind Mittelwerte und Standard-Abweichungen aus drei unabhängigen Versuchen, jeder als 4fach-Bestimmung, dargestellt. Mock: unbehandelte, nicht infizierte Zellen; C: infizierte Zellen, die mit 50 nM einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Wie die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, führte die Kombination von effizienten siRNAs gegen die RdRP des EV-30 und der DAF-spezifischen siRNA nicht zu einer Verbesserung des antiviralen Effekts (**Abbildung 4.23**). Die Kombination mit einer nicht-wirksamen siRNA verminderte dagegen deutlich die Aktivität der wirksamen siRNAs (**Abbildung 4.24**), was auf eine mögliche Konkurrenz der eingesetzten siRNAs um Komponenten der RNAi-Maschinerie hinweist (RISC-Sättigung). Daher sollten die für Kombinationsansätze verwendeten siRNAs schon *per se* eine hohe Effizienz gegen ihre (virale) Zielsequenz zeigen.

### 4.7 Baustein-Prinzip für die Herstellung von Mehrfach-Expressionsvektoren

Die Kombination von siRNAs resultierte zwar nicht in einem verbesserten Schutz der Zellen gegenüber einer Infektion mit EV-30, führte aber auch nicht zu einem wesentlichen Verlust der antiviralen Wirkung (siehe **Abschnitt 4.6**). Diese Strategie kann daher von Vorteil sein, um das Risiko des Auftretens von *Escape*-Mutanten stark zu minimieren.

Für eine längerfristige Wirkung der kombinatorischen siRNAs müssen diese als shRNAs von einem Vektor aus exprimiert werden. Dafür sollte eine Methode entwickelt werden, mit der in einem Vektor beliebig viele shRNA-Expressionskassetten zielgerichtet miteinander kombiniert werden können. Dafür wurde die zusätzliche *MfeI*-Schnittstelle verwendet, die *downstream* der shRNA-codierenden Sequenzen eingefügt wurde (**Abbildung 4.12**). Die Restriktion mit *MfeI* ergibt einen Überhang, der kompatibel mit dem durch das Schneiden mit *EcoRI* entstehenden Überhangs ist (**Abbildung 4.25a**). Die resultierende Sequenz nach Ligation beider Enden wird von beiden Restriktionsenzymen nicht mehr erkannt.



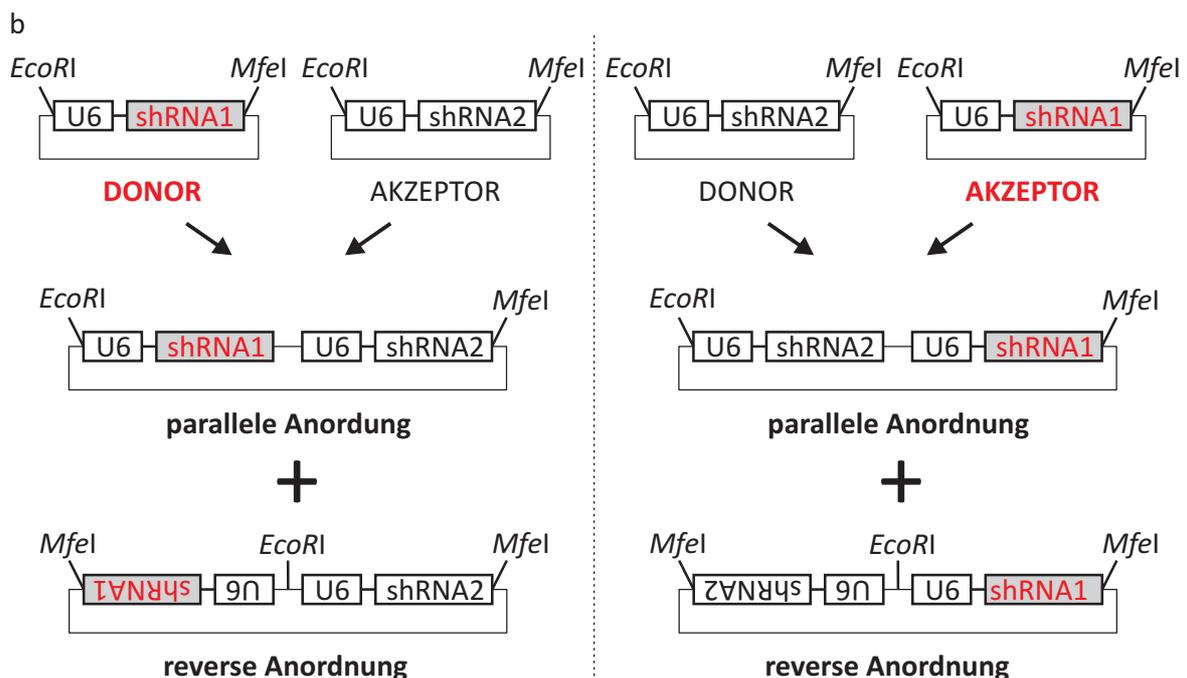
**Abbildung 4.25: Baustein-Prinzip für die einfache Kombination von shRNA-Expressionskassetten.**

a) Die Restriktion mit *MfeI* und *EcoRI* resultiert in miteinander kompatiblen Enden. Die nach Ligation erhaltene Sequenz ist nicht mehr für Restriktionsenzyme zugänglich.

Die Abbildung 4.25a ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

Der erste Schritt des Baustein-Prinzips (**Abbildung 4.25b**) besteht aus der Restriktion des Donor-Plasmids mit *MfeI* und *EcoRI*. Das Akzeptor-Plasmid, welches schon mindestens eine shRNA-Expressionskassette enthält, wird mittels *EcoRI* linearisiert. Die Ligation der shRNA-Expressionskassette aus dem Donor-Plasmid in das linearisierte Akzeptor-Plasmid ergibt den siRNA-Doppelexpressionsvektor (SiDEx). Im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen SiDEx (Schubert et al., 2005) erlaubt das Klonieren nach dem Baustein-Prinzip eine volle Flexibilität bezüglich der Kombination von ausgewählten shRNA-Expressionskassetten. Zusätzlich gibt es keine Begrenzung in der Anzahl der Expressionskassetten, die hintereinander kloniert werden können.

Das Klonieren von zwei shRNA-Expressionskassetten nach dem Baustein-Prinzip zu einem SiDEx kann theoretisch zu vier verschiedenen Expressionsvektoren führen (**Abbildung 4.25b**). In Abhängigkeit von der Wahl des Donors entstehen zwei Varianten parallel orientierter shRNA-Expressionskassetten und zwei mögliche Versionen einer reversen Anordnung. Für die Möglichkeit, weitere shRNA-Expressionskassetten ohne viel Aufwand in einen bestehenden SiDEx zu klonieren, eignen sich jeweils nur die Vektoren mit parallel orientierten shRNA-Expressionskassetten, da sie in ihrem Aufbau der Struktur eines Donor- beziehungsweise eines Akzeptor-Plasmids entsprechen, die beide durch eine Begrenzung der shRNA-Expressionskassetten via *MfeI*- und *EcoRI*-Schnittstellen gekennzeichnet sind. Die Orientierung konnte dabei einfach mittels Restriktion der entstandenen Vektoren mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* überprüft werden, da jede zusätzliche shRNA-Expressionskassette nur dann zu einem etwa 400 bp längeren Fragment führt, wenn diese parallel angeordnet ist (**Abbildung 4.26**).



**Abbildung 4.25: Baustein-Prinzip für die einfache Kombination von shRNA-Expressionskassetten.**

b) Mögliche Anordnungen der shRNA-Expressionskassetten. Das Klonieren von zwei shRNA-Expressionskassetten zu einem SiDEx nach dem Baustein-Prinzip führt theoretisch zu vier verschiedenen Expressionsvektoren. In Abhängigkeit von der Wahl des Donors (linke beziehungsweise rechte Seite der Abbildung) können beide shRNA-Expressionskassetten parallel oder reverse angeordnet sein.

Die Abbildung 4.25a ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

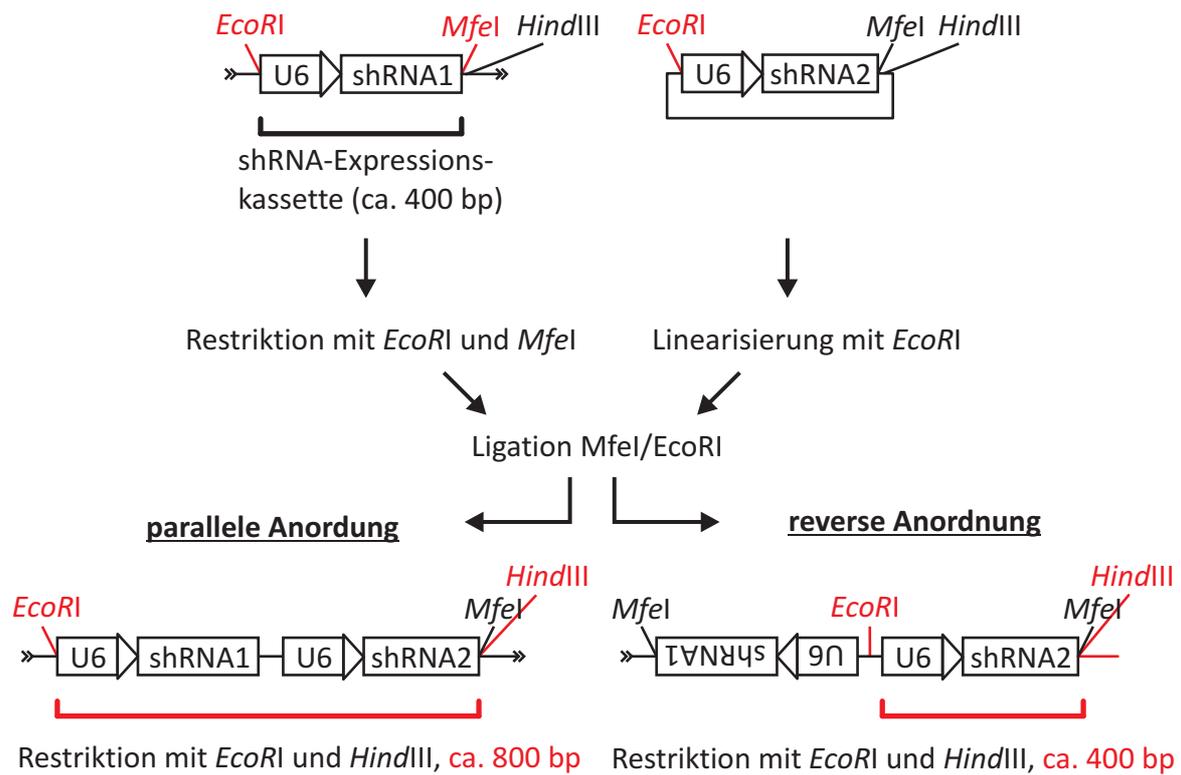
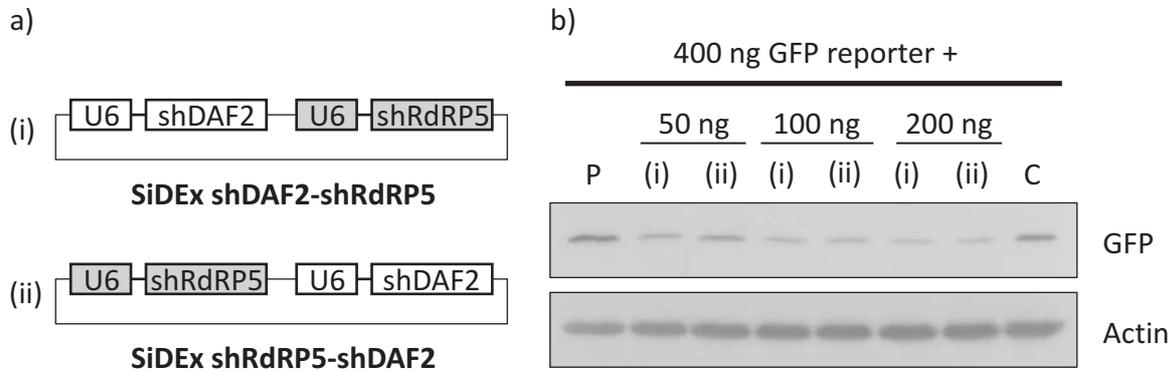


Abbildung 4.26: Baustein-Prinzip. Nachweis der Orientierung der Expressionskassetten.

Für die langfristige und effiziente Inhibition des EV-30 wurden nach Baustein-Prinzip zwei shRNA-Expressionskassetten miteinander kombiniert, die ihre jeweiligen Zielsequenzen in einem GFP-Reporter-Assay wirksam inhibieren konnten und/oder einen deutlich protektiven Effekt in Versuchen mit dem EV-30 aufwiesen: Die antivirale shRdRP5 (**Abbildung 4.10** und **4.14**) und die gegen das zelluläre DAF gerichtete siDAF2 (**Abbildung 4.19**). In Abhängigkeit vom entsprechenden Donor-Plasmid wurden je zwei shRNA-Expressionsvektoren erhalten, von denen entsprechend der Klonierungsstrategie des Baustein-Prinzips nur solche Klone sequenziert wurden, die eine mittels Testrestriktion nachgewiesene parallele Anordnung der shRNA-Expressionskassetten aufwiesen (**Abbildung 4.25** und **Abbildung 4.26**).

Die zwei SiDEx-Varianten wurden anschließend in einem GFP-Reporter-Assay hinsichtlich der Effizienz, die Expression der RdRP des EV-30 zu unterdrücken, untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit 400 ng des GFP-Reporters (**Abbildung 4.6**) und aufsteigenden Konzentrationen (50-200 ng) an SiDEx shRdRP5-shDAF2 beziehungsweise SiDEx shDAF2-shRdRP5 (**Abbildung 4.27a**) co-transfiziert. Der nachfolgend durchgeführte Western Blot zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der GFP-Expression durch die shRdRP5-Expressionskassette beider Versionen (**Abbildung 4.27b**). Es konnten keine signifikanten

Effizienz-Unterschiede zwischen den beiden SiDEx-Varianten SiDEx-shRdRP5-shDAF2 und SiDEx-shDAF2-shRdRP5 beobachtet werden.



**Abbildung 4.27: Baustein-Prinzip. Wirksamkeit der shRdRP5-Expressionskassette in beiden SiDEx-Varianten.**

**a)** Eine parallele Anordnung der shRNA-Expressionskassetten führt zu (i) SiDEx shDAF2-shRdRP5 und (ii) SiDEx shRdRP5-shDAF2. **b)** Western Blot eines GFP-Reporter-Assay mit beiden, in **a)** dargestellten SiDEx-Varianten. HeLa-Zellen wurden mit 400 ng des GFP-RdRP-Reporter-Plasmids und unterschiedlichen Konzentrationen (50-200 ng) SiDEx in der Anordnung (i) oder (ii) co-transfiziert. P: Transfektion von 400 ng GFP-RdRP-Plasmid ohne SiDEx; C: Co-Transfektion von 400 ng GFP-RdRP-Plasmid und 200 ng Kontroll-shRNA-Plasmid. Actin-Banden sind als Ladekontrolle gezeigt.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

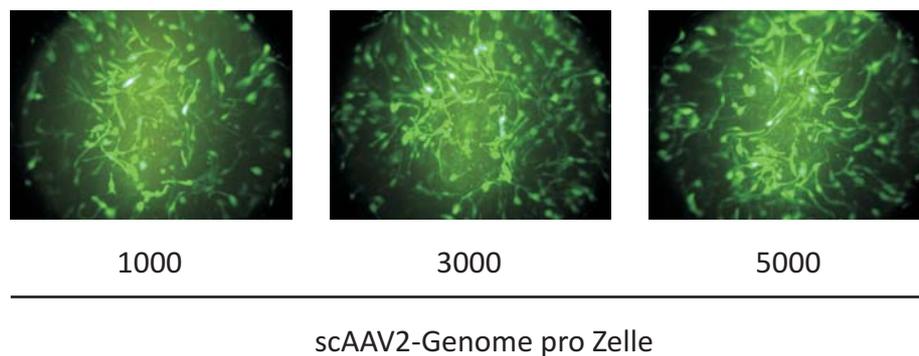
Aufgrund der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Anordnung beider shRNA-Expressionskassetten im Vektor oder aber das Verwenden des gleichen Promotors keinen Einfluss auf die Wirksamkeit beider shRNAs hatte. Für nachfolgende Experimente wurde deshalb nur einer der beiden Vektoren, der SiDEx-shRdRP5-shDAF2, verwendet.

#### 4.8 AAV-Vektor-vermittelte *Downregulation* von endogen exprimiertem DAF

Der Erfolg von RNAi als eine neue antivirale Therapie hängt vor allem davon ab, wirksame shRNA-Expressionskassetten effizient in Zielzellen einzubringen (*Delivery-Systeme*) und dort durch eine langfristige und potente shRNA-Produktion die Ausbreitung eines Virus stark einzuschränken. Hierfür eignen sich beispielsweise selbstkomplementäre AAV-Vektoren (scAAV), die eine schnelle und starke Expression eines Transgens in Zielzellen vermitteln können (McCarty et al., 2001). Dabei entscheidet der Serotyp des AAV-Vektors darüber, welche Zellen erreicht, also transduziert, werden (Zelltropismus).

Zunächst wurde untersucht, ob ein scAAV-Vektor mit dem Genom und Capsid-Proteinen

des Serotypen 2 in der Lage ist, effizient sowohl HeLa- als auch RD-Zellen zu transduzieren. Dafür kam ein (von Dr. Henry Fechner zur Verfügung gestellter) scAAV2-Vektor (Serotyp 2) zur Anwendung, der für die Bestimmung der Transduktionseffizienz den Reporter GFP exprimiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass nahezu alle RD-Zellen mit scAAV2-GFP transduziert wurden (**Abbildung 4.28**). In Übereinstimmung mit der Literatur (McCarty et al., 2001) führte auch die Transduktion von HeLa-Zellen mit scAAV2-GFP zu einer schnellen und potenten Expression von GFP (nicht gezeigt).



**Abbildung 4.28: Nachweis der Transduktionseffizienz von scAAV2 in RD-Zellen.**

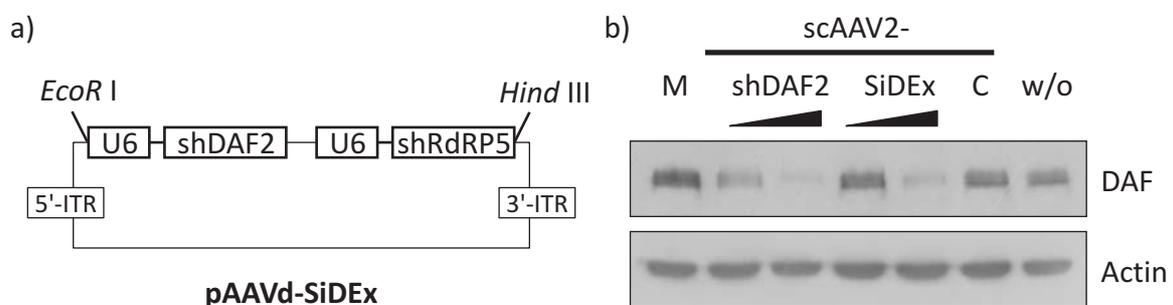
RD-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (angegeben mit scAAV2-Genome pro Zelle) eines GFP-exprimierenden scAAV2 transduziert.

Sowohl die Transduktion der RD-Zellen als auch die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden von Mitarbeitern der AG Dr. Henry Fechner durchgeführt.

Auf Basis der initialen Experimente wurden die wirksamen shRNA-Expressionskassetten shDAF2, shRdRP5 oder die Kombination der beiden, SiDEx shRdRP5-shDAF2, in ein AAV-*Shuttle*-Plasmid (**Abbildung 4.29a**) kloniert und diese dann in scAAV2-Vektoren verpackt. Dafür wurden 293FT-Zellen mit dem entsprechenden AAV-*Shuttle*-Plasmid und dem AAV2-Verpackungsplasmid co-transfiziert. Nach 2 bis 3 Tagen konnten die Zellen geerntet werden, in denen sich nun die in scAAV2-Vektoren verpackten shRNA-Expressionskassetten befanden. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die scAAV2-Vektorpartikel in einem Iodixanol-Gradienten aufkonzentriert und gereinigt (**Abbildung 3.4**). Die Quantifizierung der erhaltenen scAAV2-Vektoren erfolgte nach Aufschluss der Viruspartikel mittels qPCR (siehe **Abschnitt 3.8.2**).

Für einen funktionellen Nachweis der shDAF2-Expressionskassette in produzierten scAAV-Vektoren wurden HeLa-Zellen mit scAAV2-shDAF2 und scAAV2-SiDEx-shRdRP5-shDAF2 transduziert. Wie die **Abbildung 4.29b** zeigt, konnte bereits mit 1000 Vektorgenomen pro Zelle (Vg/Z) des scAAV2-shDAF2 eine deutliche *Downregulation* von endogenem

DAF beobachtet werden, die sich mit Erhöhung der eingesetzten scAAV2-Konzentration noch verstärkte. Der Einsatz von 1000 Vg/Z des scAAV2-Vektors, der sowohl shDAF2- als auch shRdRP5-Expressionskassette trägt (scAAV2-SiDEx), führte dagegen zu einer schwachen Inhibition der DAF-Expression auf HeLa-Zellen. Diese Beobachtung kann, in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Kombinationsexperimenten (siehe **Abschnitt 4.6**), gut mit einer Sättigung des RISC erklärt werden. Die Aktivität von shDAF2 wird dabei durch Konkurrenz mit shRdRP5 um Komponenten der RNAi-Maschinerie vermindert. Mit einer erhöhter scAAV2-SiDEx-Konzentration von 5000 Vg/Z kann allerdings eine deutliche *Downregulation* von DAF erreicht werden (**Abbildung 4.29b**). Die Transduktion mit einem scAAV2-Vektor, der eine Kontroll-shRNA exprimiert (C), zeigte keine inhibitorischen Effekte.



**Abbildung 4.29: scAAV2-Vektor-vermittelte Expression von shDAF2 und shRdRP5**

**a)** Shuttle-Plasmid für die Produktion von scAAV-Vektoren. Zwei *inverted terminal repeats* (ITR) flankieren die shRNA-Expressionskassette(n). **b)** HeLa-Zellen wurden mit 1000 Vg/Z beziehungsweise 5000 Vg/Z der scAAV2-Vektoren transduziert, die entweder shDAF2 (scAAV2-shDAF2) allein oder shDAF2 in Kombination mit shRdRP5 (scAAV2-SiDEx) exprimieren. M: mit einem leeren scAAV2-Vektor transduzierte Zellen; C: Zellen, die mit 5000 Vg/Z eines scAAV2-Vektors transduziert wurden, die eine Kontroll-shRNA exprimieren; w/o: unbehandelte Zellen.

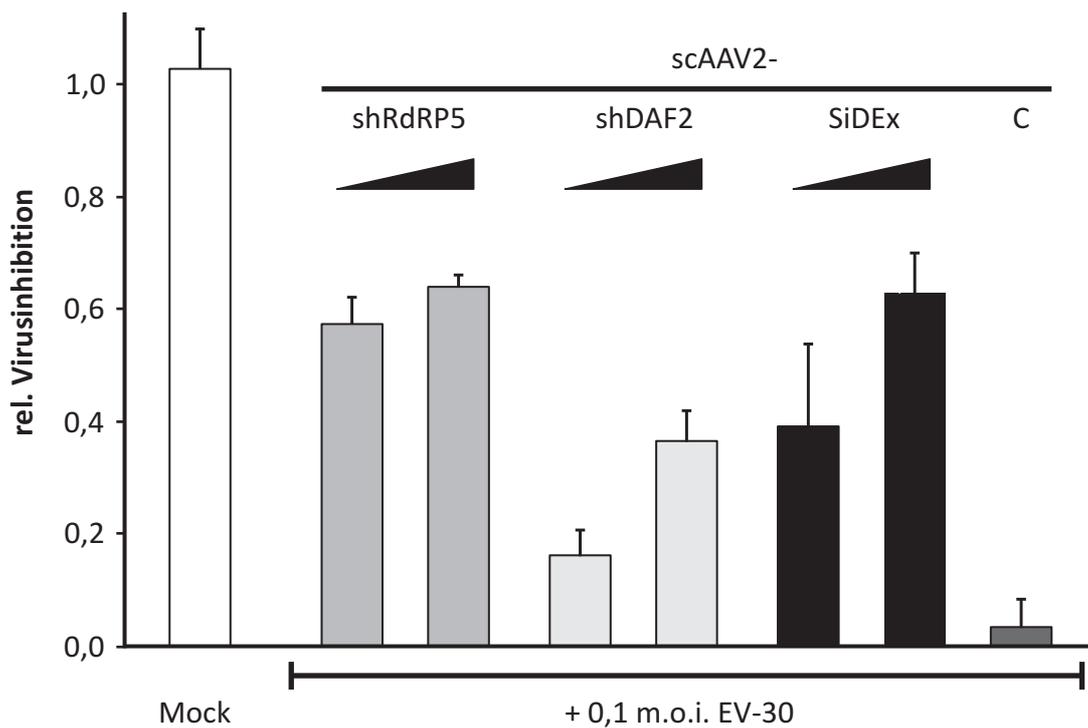
Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

Die Wirksamkeit der scAAV2-Vektoren konnte anhand der *Downregulation* von endogenem DAF bestätigt werden. Beide shDAF2-exprimierenden scAAV2-Vektoren vermittelten mit 5000 Vg/Z eine effiziente Inhibition der DAF-Expression in HeLa-Zellen.

### 4.9 AAV-Vektor-vermittelte Inhibition von EV-30

Wie die vorangegangenen Abschnitte zeigen, konnten mit der antiviralen siRdRP5 und der gegen endogenes DAF gerichteten siDAF2 zwei außerordentlich wirksame siRNAs identifiziert werden, die die Ausbreitung des EV-30 in Zellkultur stark einschränken. Die scAAV2-Vektor-vermittelte Expression der entsprechenden shRNAs bietet einerseits die Möglichkeit einer hohen Transduktionsrate von Zielzellen, die mit einer langfristigen Expression der jeweiligen siRNA einhergeht. Andererseits können beide shRNAs in einem Doppel-Expressions-System (SiDEx) kombiniert werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass virale *Escape*-Mutanten auftreten, stark vermindert wird; auch, weil eine der beiden siRNAs (siDAF2) gegen eine zelluläre Zielsequenz gerichtet ist.

Für den Nachweis der antiviralen Wirksamkeit der Einzel- und Doppel-Expressionsvektoren wurden RD-Zellen mit shRNA-exprimierenden scAAV2-Vektoren transduziert und drei Tage



**Abbildung 4.30: scAAV2-Vektor-vermittelte Inhibition von EV-30**

RD-Zellen wurden mit 1000 Vg/Z oder 5000 Vg/Z scAAV2-Vektoren transduziert, die entweder shDAF2 (scAAV2-shDAF2), shRdRP5 (scAAV2-shRdRP5) oder beide shRNAs gleichzeitig (scAAV2-SiDEx) exprimieren. 48 Stunden nach Infektion mit 0,1 m.o.i. EV-30 wurden die Zellviabilitäten bestimmt und daraus die relative Virusinhibition berechnet. Die Werte sind auf Zellen normalisiert, die mit einem leeren scAAV2-Vektor transduziert wurden. Die Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte aus drei unabhängigen Versuchen. Mock: unbehandelte, nicht infizierte Zellen; C: infizierte Zellen, die mit 5000 Vg/Z eines scAAV2-Vektors vorbehandelt wurden, der eine Kontroll-shRNA exprimiert.

Die Abbildung ist (grafisch modifiziert) der Publikation Rothe et al., 2010 entnommen.

später mit 0,1 m.o.i. des EV-30 infiziert. Aus Zellviabilitäten, die 48 Stunden nach Infektion mittels XTT-Test bestimmt wurden, konnte der protektive Effekt abgeleitet werden, der sich als relative Virusinhibition ausdrücken lässt (**Abbildung 4.30**). Die Vorbehandlung der Zellen mit 1000 Vg/Z des shRdRP5-exprimierenden scAAV2-Vektors (scAAV2-shRdRP5) führte zu einer deutlichen Inhibition von EV-30, die sich mit einer Erhöhung der eingesetzten scAAV2-Konzentration auf 5000 Vg/Z noch verstärkte. Dagegen resultierte die Transduktion mit 1000 Vg/Z des shDAF2-exprimierenden scAAV2-Vektors (scAAV2-shDAF2) in einer moderaten Inhibitionseffizienz, die sich allerdings mit 5000 Vg/Z fast verdoppeln ließ. Die Vorbehandlung der Zellen mit 5000 Vg/Z des scAAV2-Vektors, der sowohl die shDAF2- als auch die shRdRP5-Expressions-kassette trägt (scAAV2-SiDEx) hatte im Vergleich zu scAAV2-shDAF2 einen starken antiviralen Effekt. Dieser entsprach in etwa der relativen Inhibition von EV-30, die erreicht wird, wenn die Zellen mit 5000 Vg/Z scAAV2-shRdRP5 vorbehandelt werden.

Der Einsatz der beschriebenen scAAV2-Vektoren resultierte in einer deutlichen Inhibition der Ausbreitung des EV-30 in Zellkultur. Die besten antiviralen Effekte wurden mit scAAV2-shRdRP5 und dem kombinatorischen scAAV2-SiDEx erreicht (**Abbildung 4.30**). Letzterer eignet sich durch seine Kombination mit der DAF-spezifischen shRNA besonders für eine längerfristige Anwendung gegen das EV-30, weil weniger Escape-Mutanten zu erwarten sind.

## 5. Diskussion

In den letzten Jahren hat sich RNA-Interferenz als ein geeigneter Ansatz zur Hemmung der Virusausbreitung *in vitro* und *in vivo* etabliert (Colbere-Garapin et al., 2005; Haasnoot und Berkhout, 2006; Haasnoot et al., 2003; Ryther et al., 2005; Schubert und Kurreck, 2006). Nach wie vor stellen dabei effizientes siRNA-Delivery und das Auftreten von *Escape*-Mutanten wichtige Herausforderungen dar, die es für die mögliche therapeutische Anwendung zu lösen gilt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zum einen, dass für eine wirksame Inhibition von Picornaviren die siRNAs gegen den viralen Plus-Strang gerichtet sein sollten. Zum anderen wurde eine Methode entwickelt, mit der schnell und kostengünstig hocheffiziente antivirale siRNAs selektiert werden können. Für eine langfristige Expression dieser siRNAs konnte eine neuartige Klonierungsmethode etabliert werden, die es erlaubt, viele verschiedene shRNA-Expressionsvektoren in einem parallelen Ansatz herzustellen. Diese können dann wiederum miteinander kombiniert werden, um das Risiko des Auftretens von *Escape*-Mutanten zu minimieren. Mit der Verpackung der shRNA-Doppel- oder Mehrfach-Expressionsvektoren in AAV-Vektoren (*Delivery*) kann eine langfristige und effiziente shRNA-Expression, und damit wirksame Virusinhibition erreicht werden. Außerdem konnte durch DAF-spezifische siRNAs der Rezeptor für das Echovirus 30 identifiziert werden.

### 5.1 Strang-spezifische Inhibition von Picornaviren

Viele medizinisch relevante Viren besitzen ein RNA-Genom in Plus-Strang-Orientierung, unter ihnen die Familien *Picornaviridae* (zum Beispiel Polio-, Coxsackie- und Rhinoviren), *Flaviviridae* (zum Beispiel Hepatitis-C-Virus) und *Coronaviridae*. Diese Viren stellen ein besonders attraktives Ziel für RNA-Interferenz (RNAi)-Anwendungen dar, da ihr genomischer Plus-Strang direkt als mRNA dient und dieser gut zugänglich für einen siRNA-vermittelten Abbau ist.

In den vergangenen Jahren ist es bereits erfolgreich gelungen, mittels RNAi die Vermehrung des zur Familie der Picornaviren gehörenden Coxsackievirus B3 (CVB3) zu hemmen (Ahn et al., 2005; Merl et al., 2005; Schubert et al., 2005a; Werk et al., 2005; Yuan et al., 2005). Eine Weiterentwicklung und Optimierung des antiviralen RNAi-Ansatzes ist allerdings nur dann möglich, wenn kritische Virus-spezifische Schritte im Lebenszyklus identifiziert werden,

an denen der Erreger besonders anfällig für einen Angriff durch RNAi ist. Mögliche Ziele für siRNAs können die nach Eindringen des Virus in die Zelle eingebrachte freigesetzte virale RNA, der als mRNA dienende genomische Plus-Strang des Virus oder aber die für die Replikation notwendige RNA in Minus-Strang-Orientierung sein. Es gibt viele Hinweise dafür, dass die erfolgreichste Strategie gegen die Virusausbreitung die Verwendung von siRNAs ist, die gegen die virale genomische RNA in Plus-Strang-Orientierung gerichtet sind. Dabei blieb bislang unklar, ob diese überhaupt allgemein für RNAi-Ansätze zugänglich ist, da die virale genomische RNA in Viruspartikeln vorliegen oder durch die Bindung an Proteine geschützt sein kann.

Während der Replikation werden von Plus-Strang-RNA-Viren eine kleine Anzahl von RNA-Strängen synthetisiert, die in Minus-Strang-Orientierung vorliegen. Diese dienen während der Replikation als Matrize für die Synthese weiterer mRNA und genomischer RNA. In Zellen, in denen sich Picornaviren aktiv replizieren, tritt der Plus-Strang in einem etwa 25-100 fachen Überschuss zum Minus-Strang auf (Giachetti und Semler, 1991; Hohenadl et al., 1991; Klingel et al., 1992; Novak und Kirkegaard, 1991). Die große Anzahl von Plus-Strängen mittels siRNAs zu degradieren könnte deshalb schwieriger sein als die in geringer Anzahl auftretenden Minus-Stränge. Theoretisch sollte jede siRNA gegen beide viralen RNA-Stränge wirken, da der Sense-Strang der siRNA komplementär zum viralen Minus-Strang und der Antisense-Strang komplementär zum viralen Plus-Strang ist (**Abbildung 4.1**). Allerdings wurde in der Praxis häufig eine funktionale Asymmetrie beider siRNA-Stränge aufgrund der thermodynamischen Eigenschaften der Duplex beobachtet, die die Wirksamkeit einer siRNA beeinflusst (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Daher hat eine siRNA mit einem effizienten Antisense-Strang oftmals einen sehr viel weniger wirksamen Sense-Strang.

Die wichtige und noch unbeantwortete Frage ist, welcher der beiden viralen RNA-Stränge als Zielsequenz für eine RNAi-vermittelten Abbau besser geeignet ist, um die Virusausbreitung effizient zu unterdrücken. Oder sollte hierfür eine antivirale siRNA die Fähigkeit besitzen, beide Stränge mit gleicher Effizienz zu degradieren?

Für die Klärung dieser Frage wurden zunächst siRNAs entworfen, die eine klare Präferenz für einen der beiden viralen RNA-Stränge von CVB3 hatten. Grundlage dafür war ein rationales siRNA-Design, welches auf dem von Reynolds und Kollegen vorgeschlagenen Punktesystem basiert (Reynolds et al., 2004). Alle drei siRNAs (siRev1-3) zeigten dabei Werte von größer als 6 für die Minus-Strang-Spezifität, so dass eine hohe Effizienz, den Minus-Strang zu inhibieren, zu erwarten war (**Tabelle 4.2**). Die theoretisch vorausgesagten Aktivitäten der siRNAs gegen den Minus-Strang konnten durch einen Reporter-Assay bestätigt werden

(**Abbildung 4.2**): Schon eine geringe Konzentration war ausreichend, um die Expression des Reporters fast vollständig zu unterdrücken. Zwei der drei siRNAs (siRev2-3) zeigten auch eine Aktivität gegen den viralen Plus-Strang, während siRev1 ausschließlich gegen den viralen Minus-Strang wirksam war. In einem Plaque-Reduktions-Assay mit dem infektiösen CVB3 zeigte sich, dass siRNAs, die im Reporter-Assay ausschließlich (siRev1) oder vorwiegend (siRev2) gegen den viralen Minus-Strang wirksam waren, nur eine äußerst geringe inhibitorische Wirkung hatten (**Abbildung 4.3**). Die siRNA, die effizient gegen beide Strang-Orientierungen war (siRev3), zeigte eine verbesserte antivirale Wirksamkeit, während der höchste Schutz der Zellen durch die siRNA vermittelt wurde, die eine hohe Aktivität gegen den Plus-Strang hatte (CVB3-siRdRP2). Schließt man die Ergebnisse des Reporter-Assay (**Abbildung 4.2**) in die Betrachtung ein, kann angenommen werden, dass der geringe protektive Effekt der beiden siRNAs mit Minus-Strang-Präferenz gegen CVB3 (siRev1 und siRev2) nicht durch ein ineffizientes Beladen des siRNA-Sense-Stranges in den RISC verursacht wird. Vielmehr ist dieser darauf zurückzuführen, dass die siRNAs nicht in der Lage sind, den viralen Plus-Strang zu degradieren.

Für die Überlegenheit der Inhibition des viralen Plus-Stranges gegenüber dem intermediär auftretenden Minus-Strang können drei Erklärungen gegeben werden:

(1) Erstens fungiert RISC als eine Sequenz-spezifische Endonuklease mit einem  $K_M$ -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (Haley und Zamore, 2004). Möglicherweise liegt die Konzentration der in einer infizierten Zelle vorhandenen RNA-Minus-Stränge unterhalb dieses  $K_M$ -wertes, so dass eine Degradierung dieser Stränge nicht oder nur unvollständig erfolgt.

(2) Zweitens wurde beobachtet, dass die Replikation von Picornaviren in Komplexen stattfindet, die intrazellulär mit Membranvesikeln assoziiert sind (Egger et al., 2000). Daher kann spekuliert werden, dass die als Matrize dienenden RNA-Minus-Stränge durch das Membran-System, verschiedene Proteine und/oder im Entstehen begriffene RNA-Plus-Stränge während der Replikation abgeschirmt werden und daher möglicherweise nicht für RISC zugänglich sind. Im Gegensatz dazu verlassen synthetisierte RNA-Plus-Stränge die Replikationskomplexe wahrscheinlich als mRNA und sind demnach zugänglich für einen RNAi-vermittelten Abbau.

(3) Drittens wurde vor einiger Zeit gezeigt, dass durch Mutationen des viralen Genoms (außerhalb der Zielsequenz der siRNA) alternative RNA-Strukturen entstehen können, die gegen eine siRNA-vermittelte Unterdrückung resistent sind (Westerhout et al., 2005). Es ist daher vorstellbar, dass der Minus-Strang, beispielsweise durch Bindung an Proteine, eine Konformation einnimmt, die für RNAi nicht zugänglich ist. Die Idee einer Plus-Strang-

Präferenz für Picornaviren wird von einer Studie zu der RNAi-vermittelten Inhibition der Poliovirus-Replikation unterstützt (Gitlin et al., 2005). Das Virus wurde so modifiziert, dass es in der 5'-UTR die Zielsequenz der miRNA let-7 in Sense- oder Antisense-Orientierung enthielt, sodass die endogen exprimierte miRNA let-7 entweder mit der viralen Plus-Strang-RNA oder mit der viralen Minus-Strang RNA interferiert. Dabei konnte eine deutliche Verminderung der Virusreplikation in Virus-RNA transfizierten Zellen beobachtet werden, wenn diese RNA Plus-Strang-Charakter hatte. Obwohl die Wirkweisen von miRNAs und siRNAs eng miteinander verwandt sind, könnte der miRNA-Mechanismus jedoch auch von anderen Faktoren als denen, wie sie für siRNAs bekannt sind, abhängen. Darüber hinaus verwendeten Gitlin und Kollegen kein Wildtyp-Virus sondern ein künstlich verändertes Virus, das möglicherweise auch unnatürliche Effekte bewirken könnte. Exogen applizierte siRNAs lassen dagegen eine detaillierte Charakterisierung der siRNA-Wirkung gegen das Wildtyp-Coxsackievirus B3 bei unterschiedlichen Konzentrationen zu.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden drei Minus-Strang-spezifische siRNAs (siRev1-3) entworfen, deren vorausgesagte Strang-Präferenz im Reporter-Assay bestätigt werden konnte. Dabei konnte zusammen mit der CVB3-siRdRP2 eine definierte Gruppe von siRNAs erhalten werden, die speziell gegen einen der beiden viralen RNA-Stränge oder gegen beide Stränge gleichzeitig aktiv sind. Die Untersuchung hinsichtlich ihrer Effizienz, die Ausbreitung von CVB3 zu unterdrücken, zeigte eine klare Plus-Strang-Präferenz: Die antivirale Wirkung wurde ausschließlich durch die siRNA-Aktivität gegen den viralen RNA-Plus-Strang vermittelt. Diese Vorliebe ist höchstwahrscheinlich in der Virus-Biologie begründet, so dass andere Plus-Strang-RNA-Viren möglicherweise ähnlich resistent gegenüber RNAi-Ansätzen sind, die gegen den viralen Minus-Strang gerichtet sind. Diese Schlussfolgerungen können daher von Wert für die Entwicklung von antiviralen RNAi-Strategien gegen eine große Anzahl klinisch relevanter Krankheitserreger sein.

## **5.2 Design von wirksamen antiviralen siRNAs**

Während siRNAs gegen nahezu jedes zelluläres Zielgen kommerziell erhältlich sind, bleibt das Design von wirksamen siRNAs gegen Viren weiterhin eine anspruchsvolle und zeitintensive Aufgabe. Da die nicht-translatierenden Regionen (UTRs) von Picornaviren in hohem Maße konserviert sind, stellen sie ein attraktives Ziel für RNAi-Ansätze dar. Allerdings berichteten verschiedene Gruppen über ein Scheitern der Bemühungen, die 5'-UTR des Coxsackievirus B3 (CVB3) mittels RNAi zu erreichen (Kim et al., 2007; Merl

und Wessely, 2007; Werk et al., 2005; Yuan et al., 2005). Diese Schwierigkeiten sind höchstwahrscheinlich in der stark ausgeprägten Sekundärstruktur der IRES begründet und intensive Bemühungen sind notwendig, um dieses Problem zu lösen (Dutkiewicz et al., 2008). Für die codierenden Regionen eines Picornavirus-Genoms gilt, dass die für nicht-strukturelle Proteine codierenden Sequenzen weniger wahrscheinlich Mutationen tolerieren als solche, die für strukturelle Proteine codieren. Daher wurde die RdRP als Zielregion für einen antiviralen RNAi-Ansatz ausgewählt.

Für das Design von siRNAs sind in den letzten Jahren verschiedene Kriterien vorgeschlagen worden (zusammengefasst in Kurreck, 2006). In einer der ersten Studien zu diesem Thema wurde beispielsweise gezeigt, dass die thermodynamischen Eigenschaften einer siRNA ihre Wirksamkeit bestimmen (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Entsprechend diesen Modellen wird die relative thermodynamische Stabilität der zwei Enden einer gegebenen siRNA bestimmen, welcher der beiden Stränge in den RISC eingebaut wird. Andere Gruppen beobachteten einen maßgeblichen Einfluss der Ziel-RNA-Struktur auf die Inhibitionseffizienz einer siRNA (Overhoff et al., 2005; Schubert et al., 2005b). Auch die Struktur der siRNA selbst kann einen Einfluss auf ihre Wirksamkeit ausüben. So wurde gezeigt, dass eine siRNA mit einem Antisense-Strang, der keine stabilen Sekundärstrukturen ausbildete, effizienter war als siRNAs mit strukturierten Antisense-Strängen (Patzel et al., 2005). Um die Erfolgsrate für das Auffinden von wirksamen antiviralen siRNAs ohne Durchführung eines kostenintensiven und zeitaufwendigen *Screenings* zu erhöhen, wurden alle drei bekannten Parameter, die die Effizienz einer siRNA bestimmen können, für eine systematische Selektion berücksichtigt.

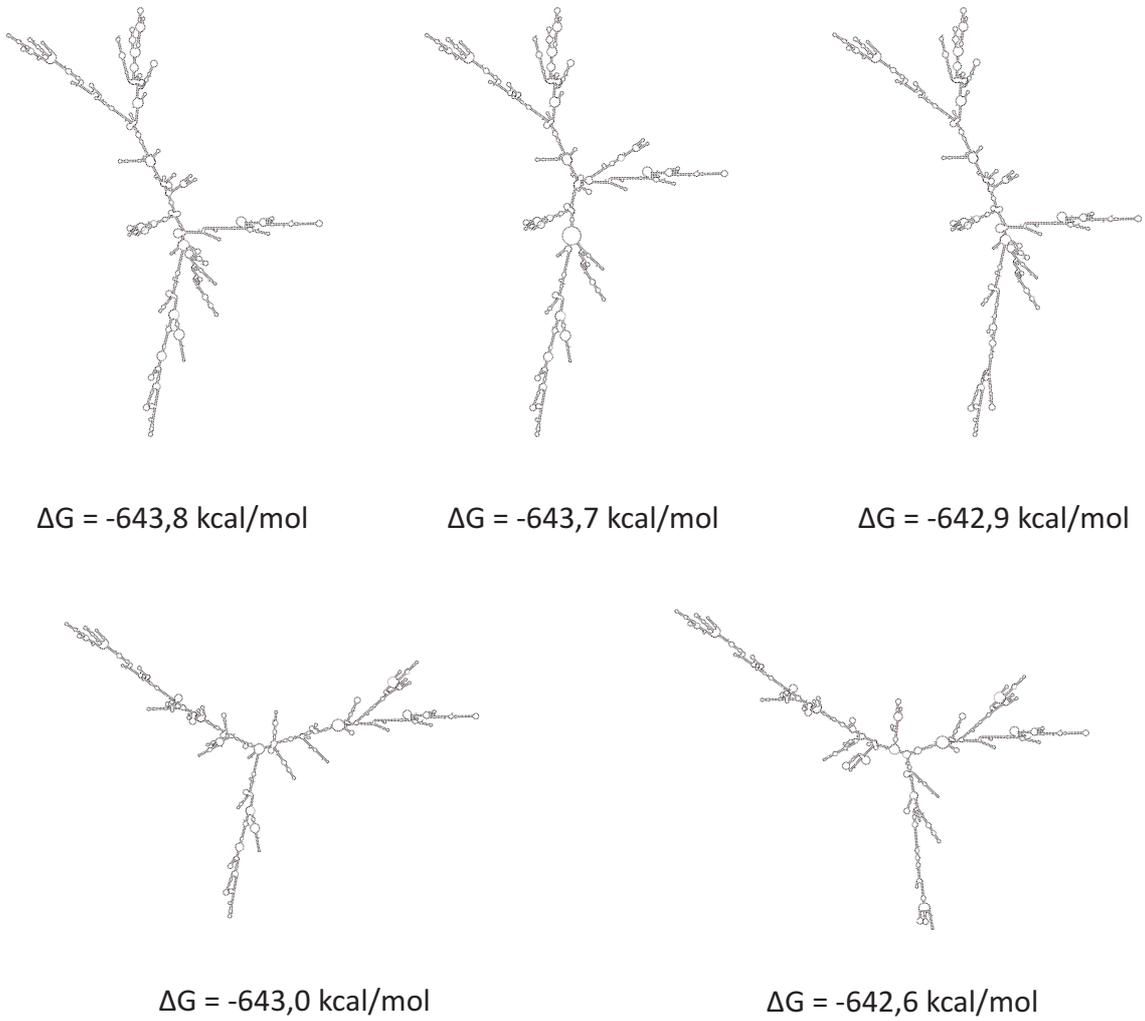
Basierend auf im Internet frei zugänglichen siRNA-Designer wurden insgesamt 30 siRNAs entsprechend eines Punktesystems für potentiell wirksame siRNAs bewertet (Reynolds et al., 2004). Nur jene siRNAs, die diesen ersten Filter passierten, wurden weiter untersucht, indem die freie Energie ihres Antisense-Stranges  $\Delta G_{\text{Antisense}}$  berechnet wurde (**Abbildung 4.4**). Ein positiver Wert zeigte an, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit keine Ausbildung einer störenden Sekundärstruktur des Antisense-Stranges zu erwarten ist. Schließlich wurde auch die Sekundärstruktur der Ziel-RNA vorhergesagt und deren lokale freie Energie  $\Delta G_{\text{Lokal}}$  berechnet (**Abbildung 4.5**). Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass niedrige  $\Delta G_{\text{Lokal}}$ -Werte, vorzugsweise mit Energien von weniger als -15 kcal/mol, zu einer maximalen RNAi-Effizienz führen (Schubert et al., 2005b; Westerhout und Berkhout, 2007).

Im GFP-Reporter-Assay zeigten fünf der sechs selektierten siRNAs schon bei sehr geringen Konzentrationen eine hohe *silencing*-Wirksamkeit (**Abbildung 4.7** und **4.8**). Die verminderte

Aktivität von siRdRP1 im GFP-Reporter-Assay hatte erhebliche Auswirkungen auf die Virusinhibition (**Abbildung 4.9** und **4.10**) und zeigt, dass es von entscheidender Bedeutung ist, hochwirksame siRNAs für antivirale Anwendungen zu entwickeln. Die wirksamste siRNA (siRdRP5), die mit Hilfe der Filter-Methode selektiert werden konnte, hatte, bezogen auf den Schutz der Zellen gegen die Lyse durch das Virus, einen sehr geringen IC<sub>50</sub>-Wert von etwa 1 nM (**Abbildung 4.11**).

Nach wie vor können RNA-Faltungen, wie sie in dieser Arbeit beispielsweise mit dem Programm *mfold* durchgeführt wurden, nur eine Näherung der tatsächlichen Struktur von Zielsequenz oder siRNA-Strängen darstellen (Eddy, 2004). Einerseits werden mögliche dreidimensionale RNA-Faltungen nicht berücksichtigt und andererseits können auch Interaktionen mit Proteinen oder anderen Molekülen die Struktur beeinflussen. Schon auf der Ebene der Sekundärstruktur zeigten sich deutliche Varianzen bei der Faltung der gesamten Zielsequenz in Form des RdRP-GFP-Transkripts (**Abbildung 5.1**). Obwohl sich die initialen Änderungen der Freien Energie kaum unterschieden ( $\Delta G$  von -643,8 kcal/mol bis -642,6 kcal/mol), wiesen die fünf stabilsten und daher wahrscheinlichsten Ziel-RNA-Strukturen, die für den dritten Schritt der systematischen Selektion von siRNAs verwendet wurden (**Abbildung 4.4**), zwei verschiedene Struktur motive auf. Es kann daher spekuliert werden, dass es im *in vivo*-System mehrere nebeneinander existente Strukturen gibt, die wiederum die Zugänglichkeit einer siRNA beeinflussen können.

Die systematische Selektion von siRNAs lieferte eine direkte, schnelle und preiswerte Methode, um wirksame siRNAs für den Schutz von Zellen gegen eine Virusinfektion zu erhalten. Unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien, die die Wirksamkeit einer siRNA bestimmen können, wurden sechs siRNAs selektiert, von denen fünf in Zellkultur eine hohe Effizienz zeigten, die Lyse der Zellen durch die Ausbreitung des Echovirus 30 zu verhindern. Diese Strategie ist nicht allein auf das EV-30, sondern auch auf andere Viren anwendbar und bietet daher einen neuartigen antiviralen RNAi-Ansatz.



**Abbildung 5.1: Vorhergesagte Sekundärstrukturen der Ziel-RNA**

Dargestellt sind die fünf stabilsten Sekundärstrukturen des GFP-RdRP-Transkripts, die durch Faltung mit der *mfold*-Software erhalten wurden.

### 5.3 siRNA-vermittelte *Downregulation* von endogen exprimiertem DAF

Da Viren durch die Anreicherung von Mutationen resistent gegen eine anhaltende siRNA-Behandlung werden können, wurden verschiedene Strategien entwickelt, um dieses Problem zu umgehen. Ein Ansatz ist, die Expression eines für das Virus wichtigen zellulären Rezeptors zu unterdrücken, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass sich das Virus an einen neuen Weg für den zellulären Eintritt adaptiert. Zum Beispiel führte der Knockdown von CCR5 zu einem Schutz der Makrophagen vor einer HIV-1 Infektion (Anderson und Akkina, 2007). Für das Coxsackievirus B3 (CVB3) konnte gezeigt werden, dass der Knockdown des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) die Ausbreitung des Virus verhindert (Coyne und Bergelson, 2006; Fechner et al., 2007; Werk et al., 2005). Eine der Voraussetzungen für diese Strategie ist, dass dieser Rezeptor für die normale zelluläre Funktion entbehrlich ist. DAF ist ein Membran-Protein mit Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, das die Komplement-Aktivierung auf der Zelloberfläche reguliert, in dem es die Komplement-Kaskade unterbricht (zusammengefasst in Kim und Song, 2006). In einem murinen DAF-GPI *Knockout*-Modell konnte keine spontane Komplement-Aktivierung *in vivo* beobachtet werden (Sun et al., 1999). Weiterhin wurden einige Individuen beschrieben, die aufgrund von Mutationen im DAF-Gen keine oder nur eine geringe DAF-Expression aufwiesen (Lublin et al., 1994). Als Folge fehlenden DAFs wurde eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse von Erythrozyten beobachtet (Telen und Green, 1989). Allerdings scheint CD59, ein weiterer wichtiger Regulator des Komplement-Systems, einen größeren Einfluss auf die Komplement-Sensitivität zu haben als DAF (Shichishima et al., 1999). Das Fehlen von DAF allein führte in dieser Studie nicht zu einer Hämolyse.

Die meisten Echoviren verwenden DAF als Eintrittsrezeptor (Bergelson et al., 1994), für einige Serotypen wurden jedoch auch andere Eintrittswege gefunden. So binden zum Beispiel EV-1 und EV-8 an eine Untereinheit des Integrin VLA2 (Bergelson et al., 1992; Bergelson et al., 1993). Dagegen sind die Umstände des Eintritts von EV-30 in eine Zelle noch nicht vollständig aufgeklärt. Experimente mit einem DAF-spezifischen monoklonalen Antikörper beziehungsweise löslichem DAF wiesen darauf hin, dass EV-30 an DAF binden kann (Powell et al., 1998). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass das Virus einen alternativen Zellrezeptor mit höherer Affinität erkennen könnte.

Diese Frage konnte nun mittels RNAi als neue Technologie wieder neu untersucht werden. Dafür wurden zunächst vier siRNAs hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht, die DAF-Expression zu unterdrücken. Zeigten sich noch alle siRNAs im Reporter-Assay als wirksame Inhibitoren der DAF-Expression (**Abbildung 4.15**), variierten ihre Wirksamkeiten bei der

genaueren Analyse der *Downregulation* von endogenem DAF in HeLa-Zellen (**Abbildung 4.16**) beziehungsweise RD-Zellen (**Abbildung 4.18**). Ein effizienter *Knockdown* von DAF durch siDAF2 resultierte in einer deutlichen Inhibition von EV-30; ein Ergebnis, das darauf hinweist, dass DAF auch der primäre Rezeptor für diesen Serotypen ist. Dies wurde in zwei unterschiedlichen Zelllinien (RD- und HEK293-Zellen) bestätigt (**Abbildung 4.21** und **Abbildung 4.22**). Die Hypothese wird weiter durch die Beobachtung gestützt, dass das Maß der Virusinhibition mit dem Grad der DAF-*Downregulation* korreliert (**Abbildung 4.20**). Das Vorhandensein eines Co-Rezeptors oder eines alternativen Rezeptors kann jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Interessanterweise lassen sich HeLa-Zellen nur schwer mit EV-30 infizieren, obwohl mehr DAF an ihrer Zelloberfläche detektiert werden kann als auf RD-Zellen (**Abbildung 4.17**). Möglicherweise spielen hierbei Interaktionen zwischen Membran-gebundenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle. Allerdings gibt es deutliche Hinweise darauf, dass nicht allein der vom Virus benötigte zelluläre Rezeptor für die Virusausbreitung wichtig ist, sondern dass vielmehr intrazelluläre Faktoren, die das Virus für seine Replikation benötigt, eine immense Bedeutung einnehmen. So replizieren beispielsweise Picornaviren CAP-unabhängig mit Hilfe ihrer Genom-codierten IRES und rekrutieren dafür zelluläre IRES-transaktivierende Faktoren (*IRES transactivating factors*, ITAFs) (Filbin und Kieft, 2009; Fitzgerald und Semler, 2009). Die Effizienz der viralen IRES-vermittelten Translation kann dabei in Abhängigkeit des Zelltyps oder/und der zellulären Bedingungen stark variieren. So ist zum Beispiel die Translation von EMCV (*encephalomyocarditis virus*) in HeLa-Zellen besonders effizient (Walter et al., 1999).

Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von DAF schützte die Zellen wirksam vor einer Lyse durch das EV-30. Daher kann geschlossen werden, dass DAF ein wichtiger zellulärer Faktor für die Ausbreitung des EV-30 ist und wahrscheinlich als Rezeptor für den Eintritt des Virus in die Zelle fungiert. Die Ergebnisse am Beispiel des EV-30 zeigen außerdem, dass die *Downregulation* des Rezeptors als ein vielversprechendes Ziel angesehen werden kann, um neue antivirale RNAi-Ansätze zu entwickeln.

## 5.4 AAV-vermittelte Inhibition von EV-30

Die Kombination von siRNAs gegen verschiedene virale Sequenzen und/oder gegen für das Virus essentielle endogene Faktoren kann das Risiko eines viralen *Escape* minimieren. Für Enteroviren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Kombination von zwei shRNAs ausreichte, um eine Zellkultur zu kurieren, die mit Poliovirus persistierend infiziert war (Saulnier et al., 2006). Außerdem konnten zwei siRNAs identifiziert werden, die das Risiko des viralen *Escape* von CVB3 drastisch reduzieren konnten, während mit einer Kombination von drei siRNAs eine deutlich verbesserte Inhibitions-Effizienz erreicht werden konnte (Merl und Wessely, 2007). Für andere Viren, wie zum Beispiel HIV, wurde die Kombination von vier shRNA-Expressionskassetten vorgeschlagen (ter Brake et al., 2008).

Basierend auf den Erkenntnissen der letzten Jahre wurde eine neue Klonierungsstrategie entwickelt, die es erlaubt, viele verschiedene shRNA-codierende Sequenzen in möglichst einfacher Weise zu generieren, die nachfolgend hinsichtlich ihrer Effizienz, die Expression ihrer Zielsequenz zu unterdrücken, untersucht werden können (**Abbildung 4.12**). Für die als paralleles Klonieren bezeichnete Methode wurden zunächst die nach Selektion erhaltenen siRNAs gegen die RdRP des EV-30 in shRNA-codierende Sequenzen überführt. Mit der *Primer Extension* wurde eine preiswerte und schnelle Methode gefunden, mit der aus dem Pool einzelsträngiger DNA-Moleküle, die jeweils für Sense- und Antisense-Strang einer siRNA gegen die RdRP des EV-30 codieren, ein doppelsträngiger DNA-Pool generiert und nachfolgend in ein Expressionsplasmid kloniert wurde. Die nachfolgende Untersuchung hinsichtlich der Wirksamkeit der entstandenen Expressionsplasmide zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den entsprechenden siRNAs (**Abbildung 4.8** und **4.14**). Der Grund dafür ist noch nicht vollständig verstanden. Es könnte in einer verminderten shRNA-Expression begründet sein oder aber durch eine inkorrekte Faltung und die damit verbundene falsche Reifung der shRNA hervorgerufen worden sein. Kürzlich erschien dazu eine Studie, die einen direkten Vergleich von siRNA mit der entsprechenden shRNA lieferte und damit zeigen konnte, dass keine enge Beziehung zwischen siRNA-shRNA-Paaren besteht (Schopman et al., 2010). In weiterführenden Experimenten konnte außerdem aufgeklärt werden, dass die Länge des Loops und auch die Sequenz der shRNA einen großen Einfluss auf die *silencing*-Aktivität hat. Durch Optimierung des *Loops* konnte so beispielsweise die Effizienz von wenig wirksamen shRNAs drastisch erhöht werden.

Die shRNA-Expressionskassetten, die durch das parallele Klonieren entstanden sind, waren mit einer zusätzlichen *MfeI*-Restriktionsschnittstelle ausgestattet. Durch eine Restriktion mit *MfeI* entstehen Enden, die mit denen kompatibel sind, die durch das Schneiden der *EcoRI*-Schnittstelle entstehen. Diese Strategie erlaubt die einfache und schnelle Kombination

von zwei oder mehr Expressionskassetten in einem einzigen Expressionsplasmid nach dem Baustein-Prinzip (**Abbildung 4.25**). Eine ähnliche Klonierungsstrategie wurde kürzlich unabhängig von der hier vorliegenden Arbeit beschrieben (Xu et al., 2009). Dabei stand jedoch das Generieren eines Expressionsvektors, der zwei endogen codierte Gene gleichzeitig herunterregulieren kann, im Vordergrund.

Die Form der Klonierung nach dem Baustein-Prinzip ist gerichtet, da durch einfache Test-Restriktionen die Anzahl der Expressionskassetten bestimmt werden kann (**Abbildung 4.26**). Allerdings können die shRNA-Expressionskassetten verschieden angeordnet sein und damit Einfluss auf die Expressionstärke der einzelnen shRNAs haben. Aus diesem Grund wurden zwei wirksame shRNA-Expressionskassetten in einem siRNA-Doppel-Expressionsplasmid (SiDEx) kombiniert und die resultierenden zwei Anordnungen hinsichtlich möglicher Effizienzunterschiede untersucht (**Abbildung 4.27**). Sowohl bei geringen als auch bei steigenden SiDEx-Konzentrationen konnten in einem GFP-Reporter-Assay keine wesentlichen Unterschiede beider Anordnungen detektiert werden.

Wirksame Einzel- und Doppel-Expressionskassetten wurden nachfolgend in *shuttle*-Plasmide für die AAV-Produktion überführt. Für die Verpackung wurde der AAV-Serotyp 2 verwendet, der sich im Vorfeld effizient bei der Transduktion von HeLa- und RD-Zellen gezeigt hatte (**Abbildung 4.28**). Für den AAV-Vektor mit der Einfach-Expressionskassette gegen DAF (scAAV2-shDAF2) konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition der DAF-Expression beobachtet werden (**Abbildung 4.29**). Die Kombination mit der antiviralen Expressionskassette in einem SiDEx scheint dagegen bei einer geringen AAV-Vektor-Konzentration etwas weniger effizient zu sein als die Einfach-Expressionskassette, was möglicherweise auf eine Konkurrenz beider shRNAs um Komponenten der RNAi-Maschinerie zurückzuführen ist. Bei einer höheren AAV-Vektor-Konzentration wurde jedoch auch mit dem SiDEx eine fast vollständige Unterdrückung der DAF-Expression erreicht. Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass das primäre Ziel der Verwendung eines SiDEx-Vektors nicht darin lag, die Effizienz zu erhöhen, sondern zwei unterschiedliche Zielsequenzen gleichzeitig zu inhibieren, um das Risiko eines viralen *Escape* zu minimieren.

Abschließend konnte nun die Wirksamkeit der einzelnen shRNA-Expressionskassetten (mit shDAF2 und shRdRP5) beziehungsweise deren Kombination in Versuchen mit infektiösem Virus untersucht werden. Wie die Ergebnisse der dazu durchgeführten Zellviabilitäts-Assays zeigen, inhibierte die gegen die RdRP gerichtete shRdRP5 deutlich die Ausbreitung von EV-30, während mit der gegen das endogene DAF gerichtete shDAF2 nur eine partielle Inhibition erreicht wurde (**Abbildung 4.30**). Diese Erkenntnisse sind im Einklang mit den

Daten der Zellviabilitäts-Assays, die nach Transfektion mit der entsprechenden siDAF2 erhalten wurden (**Abschnitt 4.5**). Möglicherweise ist das verbleibende DAF auf der Zelloberfläche nach RNAi-Behandlung immer noch ausreichend, um einer erheblichen Anzahl infektiöser Viren Eintritt in die Zelle zu verschaffen. Andererseits könnte das EV-30 auch einen alternativen (Co-)Rezeptor verwenden. Wichtig ist jedoch, dass der Doppel-Expressions-Vektor scAAV2-SiDEx bei einer AAV-Konzentration von 5000 Vg/Z zu einer starken Inhibition des Virus führt. Im Gegensatz zum AAV-Vektor, der nur eine shRNA gegen die virale RNA exprimiert, kann vom Doppel-Expressions-System erwartet werden, dass es das Auftreten von *Escape*-Mutanten wirksam verhindern und deshalb eine längerfristige Virusinhibition vermitteln kann.

Interessanterweise führte die Kombination von siRNAs (im ausgewählten Konzentrationsbereich) nicht zu einem verbesserten Schutz der Zellen vor Infektion und Ausbreitung des EV-30 (**Abbildung 4.23a**). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen einer anderen Studie, in der gezeigt wurde, dass die Kombination zweier siRNAs (gerichtet gegen CXCR4) im Gegensatz zu einer einzelnen siRNA in einer verbesserten Unterdrückung der Genexpression resultierte (Ji et al., 2003). In einer weiteren Studie führte die kombinierte Expression von shRNAs im Vergleich zur Verwendung einer einzelnen shRNA zu einer viel stärkeren Inhibition der HIV-Produktion (ter Brake et al., 2006). Andere Arbeiten konnten solche Einflüsse dagegen nicht beobachten. So fanden Ahn und Kollegen keine additiven antiviralen Effekte zweier shRNAs gegen CVB3 (Ahn et al., 2005) und es wurde sogar berichtet, dass zwei siRNAs um die Bindung des RISC konkurrieren und dadurch die Aktivität der jeweils anderen siRNA vermindern könnten (Koller et al., 2006). Es wurde deshalb weitergehend untersucht, welche Einflüsse eine nicht-wirksame siRNA auf die Aktivität von wirksamen siRNAs haben könnten. Dafür wurden die siRNAs in Kombination mit einer Kontroll-siRNA transfiziert, die keine Zielsequenz im menschlichen oder viralen Genom aufwies. Hierbei zeigte sich, dass die Wirksamkeit der spezifischen siRNA bei Zugabe der unspezifischen siRNA deutlich verringert wurde (**Abbildung 4.24**); ein Ergebnis, das die Hypothesen des Konkurrenzmodells stützt. Es ist jedoch auch möglich, dass mögliche additive Effekte in letzteren Experimenten aufgrund des gewählten Konzentrationsbereiches nicht zu beobachten waren.

Aufgrund der großen Diversität der Viren sollte die Zahl der miteinander zu kombinierenden shRNAs für jeden konkreten Fall bestimmt werden, um das Auftreten von *Escape*-Mutanten zu minimieren. Dabei ist zu beachten, dass rekombinante scAAV-Vektoren transgenes Material von bis zu 2,4 kb aufnehmen können (Daya und Berns, 2008).

Somit können theoretisch bis zu sechs shRNA-Expressionskassetten, jede in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor mit einer Größe von etwa 400 bp, in einem AAV-Vektor miteinander kombiniert werden.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden weder Rekombinations-Ereignisse beobachtet noch gab es Anhaltspunkte für eine Interferenz der beiden U6-Promotoren. Für die Verwendung von mehr als zwei shRNA-Expressionskassetten könnte es jedoch von Vorteil sein, wenn verschiedene Polymerase III-Promotoren (zum Beispiel die Promotoren H1, 7SK oder U1) miteinander kombiniert werden, um eventuell auftretende Rekombinationen zu verhindern (ter Brake et al., 2008).

Das hier beschriebene parallele Klonieren stellt einen einfachen Ansatz zur Herstellung eines Pools an shRNA-exprimierenden Vektoren dar. Die erhaltenen Expressionsvektoren können hinsichtlich ihrer Effizienz schnell in einem GFP-Reporter-Assay untersucht werden. Das Einfügen einer zusätzlichen *MfeI*-Schnittstelle liefert zusätzlich die Option, Doppel- oder Mehrfach-Expressionskassetten zu generieren, um gleichzeitig die Expression mehrerer viraler Gene oder für das Virus essentieller (aber für die Zelle entbehrlicher) Faktoren zu unterdrücken. Wirksame shRNA-Expressionskassetten können in AAV-Vektoren überführt werden, die ein effizientes *Delivery* in Zielzellen und die langfristige Expression von shRNAs vermitteln, was in einer dauerhaften Inhibition des Virus resultieren kann.

### **Ausblick**

Die in dieser Arbeit hergestellten AAV-Vektoren gegen das Echovirus 30 sollen mittelfristig in einem Tiermodell verwendet werden, um ihre Wirksamkeit *in vivo* zu untersuchen. Gegen das Coxsackievirus B3, das als einer der Hauptverursacher viraler Kardiomyopathien gilt, wurden bereits shRNA-exprimierende AAV-Vektoren *in vivo* eingesetzt (Fechner et al., 2008). Die Autoren verwendeten pseudotypisierte AAV-Vektoren, die eine Herz-spezifische Expression von zwei shRNAs vermittelten, die gegen die RdRP des Coxsackievirus B3 gerichtet waren. Dabei konnten sie sowohl eine deutlich Reduktion der Viruslast als auch eine Verbesserung kardialer Parameter beobachten. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit besteht ebenfalls die Möglichkeit einer Pseudotypisierung der AAV-Vektoren, um *in vivo* einen möglichst spezifischen Effekt gegen das Echovirus 30 zu erzielen. Außerdem sollen *in vivo*-Experimente klären, wie lange der antivirale Effekt anhält und ob eine Kombination der antiviralen shRNA gegen die RdRP mit der DAF-spezifischen shRNA tatsächlich *Escape-Mutanten* verhindern kann.

## 6. Zusammenfassung

Die Inhibition von Viren mittels RNA-Interferenz hat sich in den letzten Jahren als ein neuer und vielversprechender therapeutischer Ansatz erwiesen. Die vorliegende Arbeit beschreibt sowohl die Optimierung von siRNA-basierten antiviralen Ansätzen als auch neue Methoden, die eine therapeutische Anwendung vereinfachen können.

1. Für ihre Replikation synthetisieren Picornaviren einen RNA-Minus-Strang, der als Matrize für den genomischen Plus-Strang dient. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Strang-spezifischen siRNAs, die gegen das zur Picornavirus-Familie gehörende Coxsackievirus B3 gerichtet waren, eine Korrelation von Virusinhibition und der Fähigkeit einer siRNA, den genomischen Plus-Strang zu inhibieren, nachgewiesen werden.

2. Mit Hilfe von DAF-spezifischen siRNAs konnte in dieser Arbeit der in der Literatur umstrittene Einfluss der zellulären DAF-Expression auf die Ausbreitung des Echovirus 30 nachgewiesen werden. Eine *Downregulation* dieses Rezeptors, der von vielen jedoch nicht allen Echoviren für den zellulären Eintritt benötigt wird, führte zu einer deutlichen Inhibition der Ausbreitung des Virus.

3. Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin ein Modell entwickelt, anhand dessen schnell und kostengünstig hochwirksame antivirale siRNAs erhalten werden können. Durch eine Kombination von Kriterien, die die Effizienz einer siRNA beeinflussen können, wurden in Form einer schrittweisen Filterung sechs siRNAs gegen die RdRP des EV-30 selektiert, von denen fünf effizient die Ausbreitung des Virus inhibierten.

4. Schließlich wurde eine Methode entwickelt, die den schnellen Aufbau von (Mehrfach)-shRNA-Expressionskassetten erlaubt. Für ein effizientes *Delivery* in Zielzellen wurden diese in AAV-Vektoren verpackt und gewährleisteten so eine schnelle und potente Expression einer oder mehrerer shRNA(s). Mit AAV-Vektoren, die die Expression einer gegen die RdRP des Echovirus 30 gerichteten shRNA in Kombination mit einer shRNA gegen DAF vermittelten, gelang es, die Ausbreitung des Virus stark einzuschränken. Die Kombination beider shRNAs kann außerdem das Risiko von auftretenden *Escape*-Mutanten minimieren.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit liefern einen wichtigen Anteil an der Entwicklung von RNAi-basierten Ansätzen gegen Picornaviren. Darüber hinaus sind die Ergebnisse von großer Bedeutung, denn sowohl die Selektion von effizienten siRNAs als auch der schnelle Aufbau von Mehrfach-shRNA-Expressionskassetten nach dem Baustein-Prinzip sind nicht nur auf andere Viren, sondern auch auf weitere Medizin-orientierte Projekte übertragbar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahn, J., Jun, E.S., Lee, H.S., Yoon, S.Y., Kim, D., Joo, C.H., Kim, Y.K. and Lee, H., 2005. A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge. *J Virol* 79, 8620-4.
- Anderson, J. and Akkina, R., 2007. Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. *Gene Ther* 14, 1287-97.
- Baboonian, C., Davies, M.J., Booth, J.C. and McKenna, W.J., 1997. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 223, 31-52.
- Barnard, D.L., 2006. Current status of anti-picornavirus therapies. *Curr Pharm Des* 12, 1379-90.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y. and Bentwich, Z., 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 766-70.
- Bergelson, J.M., Chan, M., Solomon, K.R., St John, N.F., Lin, H. and Finberg, R.W., 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6245-8.
- Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M., Hemler, M.E. and Finberg, R.W., 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255, 1718-20.
- Bergelson, J.M., St John, N., Kawaguchi, S., Chan, M., Stubdal, H., Modlin, J. and Finberg, R.W., 1993. Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J Virol* 67, 6847-52.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R., 2002. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-7.
- Castanotto, D. and Rossi, J.J., 2009. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457, 426-33.
- Chapman, N.M. and Kim, K.S., 2008. Persistent coxsackievirus infection: enterovirus persistence in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* 323, 275-92.

- Colbere-Garapin, F., Blondel, B., Saulnier, A., Pelletier, I. and Labadie, K., 2005. Silencing viruses by RNA interference. *Microbes Infect* 7, 767-75.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M., 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119-31.
- Daya, S. and Berns, K.I., 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-93.
- de Fougères, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J. and Lieberman, J., 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-53.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-5.
- Dutkiewicz, M., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Lena, S.W., Wengel, J. and Kurreck, J., 2008. Design of LNA-modified siRNAs against the highly structured 5' UTR of coxsackievirus B3. *FEBS Lett* 582, 3061-6.
- Eddy, S.R., 2004. How do RNA folding algorithms work? *Nat Biotechnol* 22, 1457-8.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E. and Bienz, K., 2000. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 74, 6570-80.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E., 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 9-22.
- Fechner, H., Pinkert, S., Wang, X., Sipo, I., Suckau, L., Kurreck, J., Dorner, A., Sollerbrant, K., Zeichhardt, H., Grunert, H.P., Vetter, R., Schultheiss, H.P. and Poller, W., 2007. Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther* 14, 960-71.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. and Samulski, R.J., 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70, 3227-34.
- Filbin, M.E. and Kieft, J.S., 2009. Toward a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* 19, 267-76.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Fitzgerald, K.D. and Semler, B.L., 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789, 518-28.
- Giachetti, C. and Semler, B.L., 1991. Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J Virol* 65, 2647-54.
- Gitlin, L., Stone, J.K. and Andino, R., 2005. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol* 79, 1027-35.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. and Shiekhattar, R., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-40.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-40.
- Grimm, D. and Kay, M.A., 2003. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3, 281-304.
- Haasnoot, J. and Berkhout, B., 2006. RNA interference: its use as antiviral therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 117-50.
- Haasnoot, J., Westerhout, E.M. and Berkhout, B., 2007. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25, 1435-43.
- Haasnoot, P.C., Cupac, D. and Berkhout, B., 2003. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J Biomed Sci* 10, 607-16.
- Haley, B. and Zamore, P.D., 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11, 599-606.
- Hauck, B., Zhao, W., High, K. and Xiao, W., 2004. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol* 78, 13678-86.
- He, Y., Lin, F., Chipman, P.R., Bator, C.M., Baker, T.S., Shoham, M., Kuhn, R.J., Medof, M.E. and Rossmann, M.G., 2002. Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10325-9.

- Hemann, M.T., Fridman, J.S., Zilfou, J.T., Hernando, E., Paddison, P.J., Cordon-Cardo, C., Hannon, G.J. and Lowe, S.W., 2003. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet* 33, 396-400.
- Hohenadl, C., Klingel, K., Mertsching, J., Hofschneider, P.H. and Kandolf, R., 1991. Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes* 5, 11-20.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12, 99-110.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J., 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22-32.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-60.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2010. <http://www.ictvonline.org/>
- Ji, J., Wernli, M., Klimkait, T. and Erb, P., 2003. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* 552, 247-52.
- Karpala, A.J., Doran, T.J. and Bean, A.G., 2005. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol Cell Biol* 83, 211-6.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-16.
- Kim, D.D. and Song, W.C., 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118, 127-36.
- Kim, J.Y., Chung, S.K., Hwang, H.Y., Kim, H., Kim, J.H., Nam, J.H. and Park, S.I., 2007. Expression of short hairpin RNAs against the coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in Cos-7 cells and in mice. *Virus Res* 125, 9-13.
- Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Kariko, K., Ambati, B.K., Wilgus, T.A., DiPietro, L.A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J.R., Taylor, E.W. and Ambati, J., 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452, 591-7.
- Klingel, K., Hohenadl, C., Canu, A., Albrecht, M., Seemann, M., Mall, G. and Kandolf, R., 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 314-8.

- Koller, E., Propp, S., Murray, H., Lima, W., Bhat, B., Prakash, T.P., Allerson, C.R., Swayze, E.E., Marcusson, E.G. and Dean, N.M., 2006. Competition for RISC binding predicts in vitro potency of siRNA. *Nucleic Acids Res* 34, 4467-76.
- Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kuhl, U., Pauschinger, M., Schwimmbeck, P.L., Seeberg, B., Lober, C., Noutsias, M., Poller, W. and Schultheiss, H.P., 2003. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 107, 2793-8.
- Kurreck, J., 2006. siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. *J Biomed Biotechnol* 2006, 83757.
- Kurreck, J., 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 1378-98.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. and Tuschl, T., 2003. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9, 175-9.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-9.
- Lublin, D.M., Mallinson, G., Poole, J., Reid, M.E., Thompson, E.S., Ferdman, B.R., Telen, M.J., Anstee, D.J. and Tanner, M.J., 1994. Molecular basis of reduced or absent expression of decay-accelerating factor in Cromer blood group phenotypes. *Blood* 84, 1276-82.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-8.
- Luo, K.Q. and Chang, D.C., 2004. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 303-10.
- MacRae, I.J. and Doudna, J.A., 2007. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 17, 138-45.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A., 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-9.
- McCarty, D.M., Monahan, P.E. and Samulski, R.J., 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8, 1248-54.

- Merl, S., Michaelis, C., Jaschke, B., Vorpahl, M., Seidl, S. and Wessely, R., 2005. Targeting 2A protease by RNA interference attenuates coxsackieviral cytopathogenicity and promotes survival in highly susceptible mice. *Circulation* 111, 1583-92.
- Merl, S. and Wessely, R., 2007. Anti-coxsackieviral efficacy of RNA interference is highly dependent on genomic target selection and emergence of escape mutants. *Oligonucleotides* 17, 44-53.
- Novak, J.E. and Kirkegaard, K., 1991. Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65, 3384-7.
- Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G. and Robbins, I., 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol* 348, 871-81.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Conklin, D.S., 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-58.
- Patzel, V., Rutz, S., Dietrich, I., Koberle, C., Scheffold, A. and Kaufmann, S.H., 2005. Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* 23, 1440-4.
- Pettigrew, D.M., Williams, D.T., Kerrigan, D., Evans, D.J., Lea, S.M. and Bhella, D., 2006. Structural and functional insights into the interaction of echoviruses and decay-accelerating factor. *J Biol Chem* 281, 5169-77.
- Powell, R.M., Schmitt, V., Ward, T., Goodfellow, I., Evans, D.J. and Almond, J.W., 1998. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J Gen Virol* 79 ( Pt 7), 1707-13.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. and Khvorova, A., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-30.
- Robbins, F.C., Enders, J.F., Weller, T.H. and Florentino, G.L., 1951. Studies on the cultivation of poliomyelitis viruses in tissue culture. V. The direct isolation and serologic identification of virus strains in tissue culture from patients with nonparalytic and paralytic poliomyelitis. *Am J Hyg* 54, 286-93.
- Rothe, D., Wajant, G., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Fechner, H. and Kurreck, J., 2010. Rapid construction of adeno-associated virus vectors expressing multiple short hairpin RNAs with high antiviral activity against echovirus 30. *Oligonucleotides* 20, 191-8.

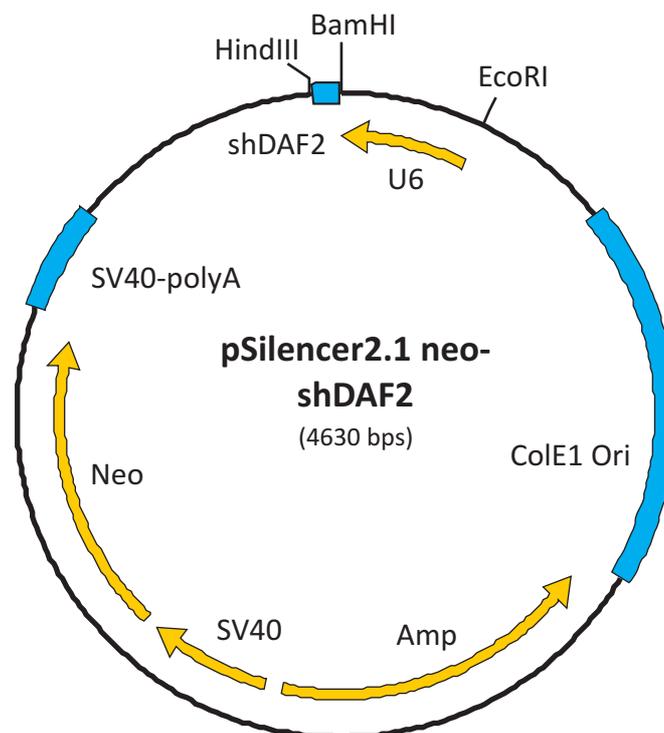
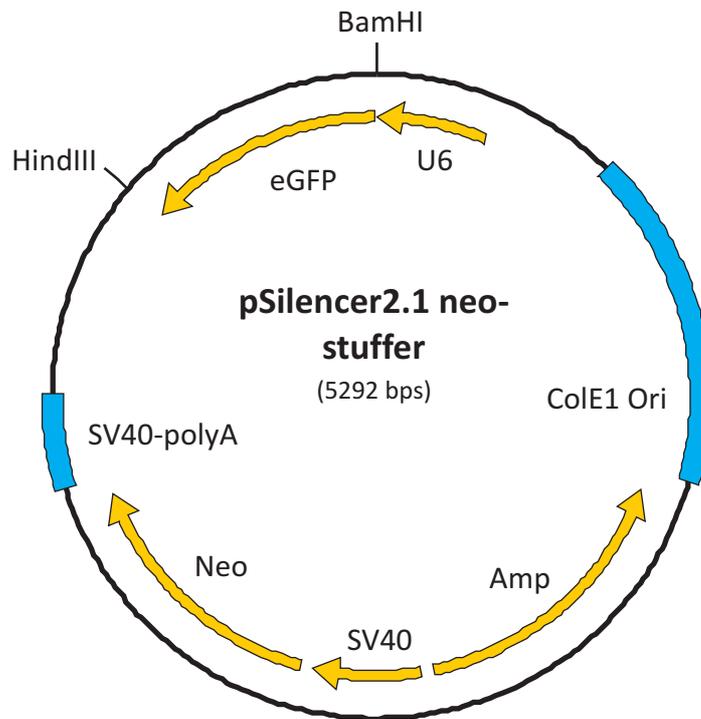
- Rothe, D., Werk, D., Niedrig, S., Horbelt, D., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2009. Antiviral activity of highly potent siRNAs against echovirus 30 and its receptor. *J Virol Methods* 157, 211-8.
- Ryther, R.C., Flynt, A.S., Phillips, J.A., 3rd and Patton, J.G., 2005. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 12, 5-11.
- Saulnier, A., Pelletier, I., Labadie, K. and Colbere-Garapin, F., 2006. Complete cure of persistent virus infections by antiviral siRNAs. *Mol Ther* 13, 142-50.
- Schopman, N.C., Liu, Y.P., Konstantinova, P., ter Brake, O. and Berkhout, B., 2010. Optimization of shRNA inhibitors by variation of the terminal loop sequence. *Antiviral Res* 86, 204-11.
- Schubert, S., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Werk, D., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2005a. Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. *J Mol Biol* 346, 457-65.
- Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2005b. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol* 348, 883-93.
- Schubert, S. and Kurreck, J., 2006. Oligonucleotide-based antiviral strategies. *Handb Exp Pharmacol*, 261-87.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Shichishima, T., Saitoh, Y., Terasawa, T., Noji, H., Kai, T. and Maruyama, Y., 1999. Complement sensitivity of erythrocytes in a patient with inherited complete deficiency of CD59 or with the Inab phenotype. *Br J Haematol* 104, 303-6.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., Sheth, N., Bradshaw, J., Burchard, J., Kulkarni, A., Cavet, G., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Cleary, M.A., Elledge, S.J. and Hannon, G.J., 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 37, 1281-8.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. and Lieberman, J., 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-51.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-7.
- Sonntag, F., Schmidt, K. and Kleinschmidt, J.A., 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10220-5.

- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Rohl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.P., 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-8.
- Sun, X., Funk, C.D., Deng, C., Sahu, A., Lambris, J.D. and Song, W.C., 1999. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 628-33.
- Swiss Institute of Bioinformatics 2008. Picornaviridae, Molecular biology, VIRION, [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_protein/33.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/33.html)
- Telen, M.J. and Green, A.M., 1989. The Inab phenotype: characterization of the membrane protein and complement regulatory defect. *Blood* 74, 437-41.
- ter Brake, O., Konstantinova, P., Ceylan, M. and Berkhout, B., 2006. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther* 14, 883-92.
- ter Brake, O., t Hooft, K., Liu, Y.P., Centlivre, M., von Eije, K.J. and Berkhout, B., 2008. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Mol Ther* 16, 557-64.
- Thomas, D.J. and Lublin, D.M., 1993. Identification of 5'-flanking regions affecting the expression of the human decay accelerating factor gene and their role in tissue-specific expression. *J Immunol* 150, 151-60.
- UNAIDS. 2009. AIDS epidemic update Dezember 2009., <http://www.unaids.org>.
- Veldwijk, M.R., Topaly, J., Laufs, S., Hengge, U.R., Wenz, F., Zeller, W.J. and Fruehauf, S., 2002. Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther* 6, 272-8.
- Walter, B.L., Nguyen, J.H., Ehrenfeld, E. and Semler, B.L., 1999. Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA* 5, 1570-85.
- Werk, D., Schubert, S., Lindig, V., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2005. Developing an effective RNA interference strategy against a plus-strand RNA virus: silencing of coxsackievirus B3 and its cognate coxsackievirus-adenovirus receptor. *Biol Chem* 386, 857-63.
- Westerhout, E.M. and Berkhout, B., 2007. A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucleic Acids Res* 35, 4322-30.

- Westerhout, E.M., Ooms, M., Vink, M., Das, A.T. and Berkhout, B., 2005. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res* 33, 796-804.
- WHO. 2010. Global Outbreak Alert & Response Network, <http://www.who.int>.
- Wu, J., Zhao, W., Zhong, L., Han, Z., Li, B., Ma, W., Weigel-Kelley, K.A., Warrington, K.H. and Srivastava, A., 2007. Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* 18, 171-82.
- Xia, H., Mao, Q., Eliason, S.L., Harper, S.Q., Martins, I.H., Orr, H.T., Paulson, H.L., Yang, L., Kotin, R.M. and Davidson, B.L., 2004. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10, 816-20.
- Xu, X.M., Yoo, M.H., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N. and Hatfield, D.L., 2009. Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression. *Nat Protoc* 4, 1338-48.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-6.
- Yuan, J., Cheung, P.K., Zhang, H.M., Chau, D. and Yang, D., 2005. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *J Virol* 79, 2151-9.
- Zeng, Y., Wagner, E.J. and Cullen, B.R., 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 9, 1327-33.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.
- Zimmermann, T.S., Lee, A.C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M.N., Harborth, J., Heyes, J.A., Jeffs, L.B., John, M., Judge, A.D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L.V., Palmer, L.R., Racie, T., Rohl, I., Seiffert, S., Shanmugam, S., Sood, V., Soutschek, J., Toudjarska, I., Wheat, A.J., Yaworski, E., Zedalis, W., Koteliensky, V., Manoharan, M., Vornlocher, H.P. and MacLachlan, I., 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111-4.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J. and Muzyczka, N., 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6, 973-85.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-15.

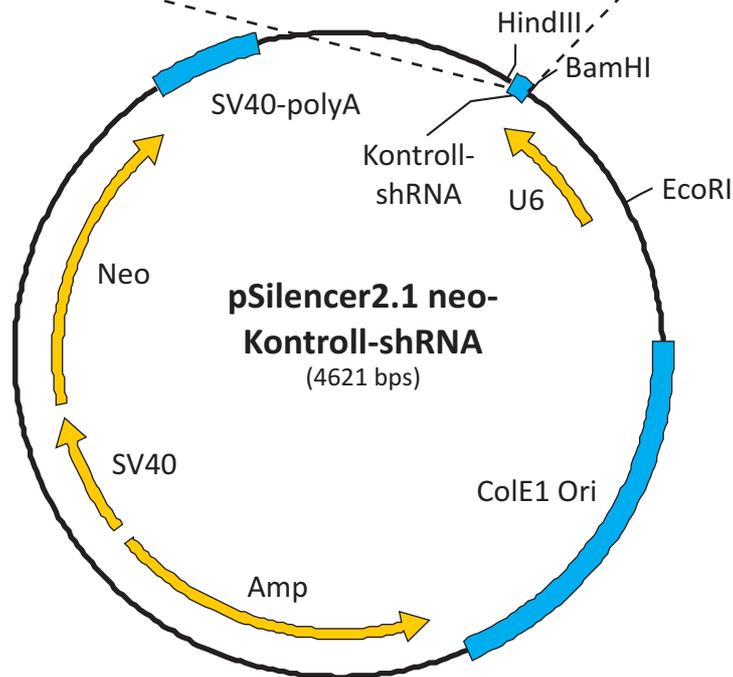
# 8. Anhang

## Anhang 1: Plasmidkarten



DNA-Sequenzen, die für den Sense- und Antisense der Kontroll-shRNA codieren (fett hervorgehoben):

5'- **ACTACCGTTGTTATAGGTGTTCAAGAGACACCTATAACAACGGTAGT** - 3'



<b>U6:</b>	U6-Promotor
<b>SV40:</b>	SV40-Promotor
<b>SV40-polyA:</b>	SV40-Polyadenylierungs-Signal
<b>Neo:</b>	Neomycin-Resistenz-Gen
<b>Amp:</b>	Ampicillin-Resistenz-Gen
<b>ColE1 Ori:</b>	Replikationsursprung des ColE1-Plasmids
<b>eGFP:</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

## Anhang A: Verzeichnis der Abkürzungen

AAP	<i>Assembly Activating-Protein</i>
AAV	<i>Adeno-associated virus, Adeno-assoziiertes Virus</i>
AGO	<i>Argonauten-Protein</i>
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIH	<i>Autoimmunhepatitis</i>
AMD	<i>Altersbedingte Makuladegeneration</i>
ApoB	<i>Apolipoprotein B</i>
APS	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
BGH-polyA	<i>bovine growth hormone polyadenylation signal</i>
Blotto	<i>Magermilchpulver in TBS</i>
bp	<i>Basenpaar(e)</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAR	<i>Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor</i>
CCR5	<i>CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	<i>Cytomegalievirus</i>
C <sub>t</sub>	<i>cycle of threshold</i>
CVB3	<i>Coxsackievirus B3</i>
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DAF	<i>decay accelerating factor, CD55</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleinsäure</i>
dNTP	<i>Desoxyribonucleosidtriphosphat</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA, doppelsträngige DNA</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Echo	<i>enteric cytopathic human orphan</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i>
endo-siRNA	<i>endogenous RNA, esiRNA</i>
EV	<i>Echovirus</i>
Exp-5	<i>Exportin-5</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FKS	<i>fötales Kälberserum</i>
GAM	<i>goat anti mouse</i>

GAR	<i>goat anti rabbit</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h.p.i.	<i>hours post infection</i>
HAART	<i>highly active anti-retroviral therapy</i>
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory concentration</i> , Konzentration, mit der die halbmaximale Inhibition erreicht wird
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> , CD54
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITAF	<i>IRES transactivating factor</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i>
LgB	<i>Lower Gel Buffer</i>
L-Protein	<i>Leader-Protein</i>
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
m <sup>7</sup> G	7-Methylguanosin
MCS	<i>multiple cloning site</i>
miRNA	<i>micro-RNA</i>
miRNP	miRNA-Ribonucleoprotein-Komplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
OD	<i>optical density</i> , Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p.f.u.	<i>plaque-forming units</i>
PAZ	<i>Piwi/Argonaute/Zwille</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBS-MK	PBS mit MgCl <sub>2</sub> und KCl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

piRNA	<i>PIWI-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-element-induced wimpy testis</i>
Poly-A	Polyadenylierungs-Signal
pre-miRNA	<i>precursor RNA</i>
pri-miRNA	Primärtranskript der miRNA
PTGS	<i>post transcriptional gene silencing</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> , RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i> , RNA-Interferenz
RNase	Ribonuclease
RRM2	M2-Untereinheit der Ribonucleotid-Reduktase
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
scAAV	<i>self-complementary AAV vector</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SiDex	siRNA-Doppelexpressionsvektor
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNALPS	<i>stable nucleic acid lipid particles</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> , einzelsträngige DNA
TBE	<i>TRIS-Borat-EDTA</i>
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TRBP	<i>TAR RNA binding protein</i>
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TTBS	<i>TRIS-buffered saline + Tween</i>
UgB	<i>Upper Gel Buffer</i>
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht-translatierte Region
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vg/Z	Virusgenome pro eingesäte Zelle
VLA	<i>very late antigen</i>
VP(g)	Virusprotein (genomassoziiert)

## Anhang B: Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jens Kurreck für die intensive Betreuung, die immerwährende Ungeduld und Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Volker Erdmann und den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe an der Freien Universität Berlin, vor allem Birgit Biber, Dr. Thomas Röhl und Mariola Dutkiewicz für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Sonja Niedrig und Denise Werk danke ich für die vielen praktischen Ratschläge aber auch für ihr offenes Ohr, wenn es mal nicht so vorwärts ging, wie man wollte. Weiterhin danke ich den Stuttgartern Gisela Wajant, Michaela Moses-Endewardt, Anne von Hacht, Jürgen Rac, Harleen Kaur und Oliver Seifert und auch den Mitarbeitern des Fachgebietes Angewandte Biochemie der Technischen Universität Berlin, vor allem Petra Seifert und Bernd Krostitz, die mich so herzlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Viola Khodaverdi und Dr. Anke Wagner für ihre schnellen und hilfreichen Kommentare zu dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Heinz Zeichhardt und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, besonders bei Vanessa Lindig und Dr. Hans-Peter Grunert, für ihre stete Hilfsbereitschaft in virologischen und praktischen Fragen bedanken. Dr. Henry Fechner und Dr. Sandra Pinkert danke ich für das „pSipo-Plasmid“ und die Hilfe bei allen Fragen zu AAVs sowie ihre praktische Unterstützung der ersten AAV-Vektorversuche. Daniel Horbelt danke ich für die Einführung in die Geheimnisse des FACS.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden „Gold-Maries“ und Marcus für ihre Liebe und Geduld und die Fähigkeit, Dinge auch einmal aus einem anderem Blickwinkel zu sehen. Ich danke auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre stete Unterstützung. Besonders möchte ich mich bei Peter von Salis bedanken, der in den letzten Wochen die richtigen aufmunternden Worte fand.

Darüber hinaus bedanke ich mich für die finanzielle Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

## Anhang C: Eigene Veröffentlichungen

### Primärartikel

- 1) Schubert, S., Rothe, D., Werk, D., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2007. Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Res* 73, 197-205.
- 2) Rothe, D., Werk, D., Niedrig, S., Horbelt, D., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A. and Kurreck, J., 2009. Antiviral activity of highly potent siRNAs against echovirus 30 and its receptor. *J Virol Methods* 157, 211-8.
- 3) Rothe, D., Wajant, G., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Fechner, H. and Kurreck, J., 2010. Rapid Construction of Adeno-Associated Virus Vectors Expressing Multiple Short Hairpin RNAs with High Antiviral Activity Against Echovirus 30. *Oligonucleotides* 20, 191-8.

### Übersichtsartikel

- 4) Rothe, D., Wade, E., Kurreck, J., 2011. Design of Small Interfering RNAs for Antiviral Applications in Antiviral RNAi: Concepts, Methods, and Applications. *Methods Mol Biol*, Vol 721, Ronald P. van Rij (ed.), Springer, Berlin; 1. Auflage (April 2011).