

RNA-Interferenz- und Rezeptor-basierte Kombinationstherapie zur Inhibierung von Coxsackievirus B3

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin der Biotechnologie
Agnes Elisabeth Stein
aus Dresden

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Titels
Doktorin der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurreck
Gutachter: Prof. Dr. Claus-Thomas Bock
Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster
Vorsitzender: Prof. Dr. Lothar W. Kroh

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.02.2014

Berlin 2014

D 83

Für Ed – "The Boss" –

1	Einleitung	5
1.1	Myokarditiden im Menschen	5
1.2	Coxsackieviren	7
1.2.1	Genomstruktur und Replikation von Coxsackieviren	8
1.2.2	Antivirale Therapie gegen CVB3-Infektionen	10
1.2.3	CVB3-Infektionen im Mausmodell	12
1.3	Der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR)	13
1.4	Inhibierung von Virusinfektionen mit Hilfe löslicher Rezeptorproteine	14
1.5	RNA-Interferenz (RNAi)	15
1.5.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	16
1.5.2	Vektorvermittelte RNA-Interferenz	18
1.5.3	RNA-Interferenz als antivirale Therapieoption	19
1.6	Virale Vektoren	21
2	Zielsetzung	24
3	Material	25
3.1	Geräte	25
3.2	Chemikalien	26
3.3	Molekularbiologische Kits und Reagenziensysteme	26
3.4	Enzyme	27
3.5	Plasmide	27
3.6	Virale Vektoren	29
3.7	Oligonukleotide	30
3.8	Bakterienstämme	31
3.9	Medien für die Kultivierung von Bakterien	31
3.10	Puffer für die Molekularbiologie	31
3.11	Molekulargewichts- und Größenmarker	32
3.12	Real-time PCR-Assays	32
3.13	Lösungen für den Dual-Luciferase Assay nach Hampf und Gossen (131)	32
3.14	Lösungen für den Iodixanol-Gradienten	32
3.15	Lösungen für die Fällung Adeno-assoziiierter Virusvektoren aus Zellkulturüberständen	33
3.16	Puffer und Lösungen für den Western Blot	33
3.17	Antikörper für den Western Blot	34

3.18	Zusammensetzung des agarhaltigen Mediums für den Plaque Assay	34
3.19	Lösungen und Antikörper für die Immunhistochemie	35
3.20	Zelllinien	35
3.21	Medien für die Zellkultur	36
4	Methoden	37
4.1	Arbeiten mit Bakterien	37
4.1.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	37
4.1.2	Transformation chemisch-kompetenter Zellen	37
4.2	Klonierungen	38
4.3	Molekularbiologische Methoden	38
4.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben	38
4.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	39
4.3.3	Isolation von RNA aus Zellen oder Geweben	39
4.3.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) mittels Random-Hexamer-Primern.....	40
4.3.5	Real-time PCR zur Quantifizierung der 18 S rRNA-Expression	40
4.3.6	Real-time PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression	41
4.3.7	Real-time PCR zur Quantifizierung von CVB3-Genomen	41
4.3.8	Nachweis von siRNAs durch stemloop RT-PCR und real-time PCR	42
4.3.9	Relative Quantifizierung zur Auswertung der real-time PCRs	44
4.4	Proteinchemische Methoden	44
4.4.1	Western Blot	44
4.4.2	Dual-Luciferase Assay.....	45
4.4.3	ELISA zum Nachweis von sCAR-Fc	45
4.5	Zellbiologische Methoden	46
4.5.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen	46
4.5.2	Zellviabilitätsassay	46
4.5.3	Transfektion	47
4.5.4	Transduktion	47
4.6	Virologische Methoden	47
4.6.1	Anzucht von Coxsackievirus B3 für <i>in vitro</i> Versuche	47
4.6.2	Bestimmung des CVB3-Titers virushaltiger Überstände durch Plaque Assay.....	48
4.6.3	Bestimmung des CVB3-Titers virushaltiger Gewebe durch Plaque Assay	49
4.6.4	Kristallviolett-Färbung.....	49
4.7	Produktion von Adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren) und Quantifizierung	50
4.7.1	Produktion von Adeno-assoziierten Virusvektoren	50
4.7.2	Fällung von AAV2/9-Vektoren aus Zellkulturüberständen	52
4.7.3	Reinigung von Adeno-assoziierten Virusvektoren im Iodixanol-Gradienten	52
4.7.4	AAV-Vektor-Konzentrierung.....	53
4.7.5	AAV-Vektor-Quantifizierung.....	53

4.8	Produktion von adenoviralen Virusvektoren (AdV) und Quantifizierung	54
4.8.1	Produktion von adenoviralen Virusvektoren	54
4.8.2	Bestimmung der biologisch-aktiven adenoviralen Partikelzahl	54
4.9	<i>In vivo</i> Mausexperimente	55
4.9.1	Infektion von Mäusen mit Coxsackievirus B3	55
4.9.2	Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats	56
4.9.3	Transduktion von Mäusen mit AdV und AAV-Vektoren über die Jugularvene... 56	
4.9.4	CVB3-Myokarditismodell in AdG12- und scAAV2/9-Vektor-transduzierten Mäusen.....	56
4.9.5	Gewebeverteilung von scAAV2/9-Vektoren nach intravenöser Transduktion... 57	
4.10	Immunhistochemische Färbung von scAAV2/9-GFP-transduzierten Geweben	58
4.11	HE-Färbung von Gewebeschnitten	58
4.12	Quantifizierung des Inflammationsgrades von kardialem Gewebe	59
4.13	Statistische Beurteilung	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Inhibierung der CVB3-Replikation durch vektorvermittelte Kombinations-therapie mit sCAR-Fc und shRdRP2.4	60
5.1.1	Funktionalitätstest von pdAAV-shRdRP2.4 und pdAAV-shGFP im Reporterassay.....	62
5.1.2	Funktionalitätstest von scAAV-shRdRP2.4 und scAAV-shGFP im Reporterassay.....	64
5.1.3	Inhibierung von CVB3 durch shRdRP2.4 <i>in vitro</i>	65
5.1.4	AdG12-vektorvermittelte Expression von sCAR-Fc	66
5.1.5	Inhibierung von CVB3 durch sCAR-Fc <i>in vitro</i>	68
5.1.6	Ein-Vektor-basierte Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und artifiziiellen microRNAs (amiRNAs)	69
5.1.7	Inhibierung von CVB3 durch Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4 <i>in vitro</i>	75
5.1.8	Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats für <i>in vivo</i> Experimente	81
5.1.9	Bestimmung des Gewebetropismus selbstkomplementärer AAV2/9-Vektoren <i>in vivo</i>	88
5.1.10	Inhibierung von CVB3 durch Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4 <i>in vivo</i>	92
6	Diskussion	104
6.1	Gewebetropismus selbstkomplementärer AAV2/9-Vektoren	104
6.2	Artifizielle microRNAs zur Inhibierung von CVB3	106
6.3	Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats für <i>in vivo</i> Versuche	109

6.4	Anti-CVB3-Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4	111
6.4.1	Wirksamkeit der Einzelkomponenten	112
6.4.2	Vorteile und mögliche Wirkmechanismen der Kombinationstherapie gegenüber der Einzeltherapie	116
6.4.3	Vergleich mit anderen antiviralen Kombinationstherapien.....	118
6.4.4	Sicherheit der verwendeten viralen Vektoren als gentherapeutisches Werkzeug.....	120
6.4.5	Mögliche Anwendung der Kombinationstherapie in der Klinik	122
6.5	Ausblick	124
7	Zusammenfassung	125
8	Summary	127
9	Literaturverzeichnis	129
10	Anhang	145
	Anhang 1: Plasmidkarten der Reporterkonstrukte	145
	Anhang 2: Plasmidkarten der <i>in vivo</i> eingesetzten Vektoren	147
	Anhang 3: Plasmidkonstruktionen	151
	Anhang 4: Signifikanzwerte des <i>in vivo</i> Kombinationsversuches.....	154
	Anhang A: Abkürzungsverzeichnis	156
	Anhang B: Danksagung.....	159
	Anhang C: Eigene Veröffentlichungen	160

1 Einleitung

1.1 Myokarditiden im Menschen

Als Myokarditis werden entzündliche Veränderungen bzw. Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet. Man unterscheidet dabei zwischen rein akut verlaufenden Myokarditiden und chronischen Formen, welche letztlich zu dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und Herzversagen führen können. Myokarditiden können durch eine Vielzahl infektiöser Erreger und anderweitiger Pathogene ausgelöst werden, zu denen Tabelle 1.1 einen Überblick gibt.

Tabelle 1.1: Auslöser humaner Myokarditiden. (modifiziert nach Kühl und Schultheiss, 2012, (1))

	Vertreter / Beispiele
Viren	Adenoviren, Enteroviren (z. B.: CVB3), Cytomegalievirus, Herpesvirus, Hepatitis-C-Virus, HIV, Poliovirus, Parvoviren Influenza (A/B), Varicella Zoster, Arboviren
Bakterien	Mycobakterien, Chlamydien, Streptokokken, Mycoplasmen, Legionellen, Salmonellen, Rickettsien, Borrelien, Corynebakterien
Pilze	Aspergillus spp., Candida spp., Cryptococcus, Histoplasmodium spp.
Protozoen	Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii, Trichinen, Echinococcus
parasitäre Erkrankungen	Schistosoma, Larva migrans
Toxine	Anthracycline, Zytokine, Alkohol, Chemotherapeutika, Kokain, Katecholamine
(Auto-) Immunaktivierung	Influenzaimpfung, Sarkoidose, Sjögrens Syndrom, Churg-Strauss Syndrom, Riesenzellmyokarditis
Allergene	Penicillin, tricyclische Antidepressiva, Antirheumatika, Cephalosporin, Sulfonamide, Clozapin
physikalische Pathogene	Arsen, Lithium, Röntgenstrahlung, Hypothermie, Hitzschlag

EINLEITUNG

Bakterien, wie zum Beispiel Listerien, werden in der Klinik nur in wenigen Fällen von Myokarditis mit deren Entstehung in Verbindung gebracht (2). Auch Pilze, wie Aspergillen und Candida, sind in einigen Fällen der infektiöse Auslöser für entzündliche Veränderungen des Myokards (3, 4). Neben den bereits genannten Erregern kommen auch Toxine, Protozoen und Parasiten sowie (Auto-) Immunreaktionen als Verursacher der Myokarditis infrage (1). Als Hauptauslöser für Myokarditiden im Menschen gelten allerdings Viren (5). Dabei wird eine Vielzahl von Viren mit der Entstehung dieser in Verbindung gebracht. Dazu gehören zum Beispiel das Ebstein-Barr-Virus (6), Cytomegalieviren (7), Hepatitis-C-Viren (8), Adenoviren (9) oder auch Parvovirus B19 (10). Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist der oftmals beschriebene Zusammenhang zwischen Coxsackievirus B3 (CVB3) und Herzmuskelentzündungen (11).

Die akute Anfangsphase einer viralen Myokarditis zeichnet sich durch die virusbedingte, direkte Lyse der infizierten Kardiomyozyten aus. Dadurch kommt es zur primären Nekrosebildung im Gewebe. Die während dieser Phase entstehenden sekundären Schäden können dem Immunsystem zugeschrieben werden. Die mit dem Virus infizierten Zellen werden dabei sowohl durch das angeborene als auch das erworbene Immunsystem erkannt und vernichtet. Dabei wird ein Chemokingradient erzeugt, der weitere Immunzellen akquiriert. Somit kommt es zu einer massiven Infiltration des kardialen Gewebes durch Immunzellen und einer zunehmenden Lyse kardialer Muskelzellen (12). Meist gelingt so eine schnelle und vollständige Eliminierung der Viren aus dem Herzen. Symptomatisch gesehen werden sowohl milde Verläufe der akuten Myokarditis beobachtet, die vom Patienten oft unbemerkt bleiben, als auch schwerere. Bei den schwerer verlaufenden, akuten Erkrankungen klagen Betroffene oftmals über Symptome wie Brustschmerzen, allgemeine Schlappeheit und Atemnot (13). Diese sind auf die Myokardnekrosen und die daraus resultierende akute Herzinsuffizienz zurückzuführen. Die Behandlung der akuten Erkrankung ist abhängig vom Auslöser und reicht von Antibiotikagabe bei bakteriellen Myokarditiden bis zur Gabe immunstimulierender oder -supprimierender Substanzen. Oftmals erfolgt die Behandlung aber auch rein symptomatisch (12). Die akute Myokarditis heilt in den meisten Fällen ohne dauerhafte Schäden aus. Lediglich manchmal bleiben geringfügige Narben im Myokard zurück, die die Funktion des Herzens allerdings selten beeinflussen.

In einigen Fällen gelingt keine vollständige Eliminierung des Virus aus dem Herzen und die akute Myokarditis geht in eine chronische Form über. Im Myokard befinden sich dann meist keine replikationskompetenten Viruspartikel mehr, virale Plus- und Minus-Strang RNA kann aber weiterhin nachgewiesen werden (14). Außerdem findet eine minimale Translation der

EINLEITUNG

viralen Proteine statt. Man spricht von einer Persistenz der Viren im Herzen. Diese löst einen langanhaltenden entzündlichen Prozess im Herzmuskelgewebe aus. In dieser Phase der viralen Myokarditis tragen auch zunehmend Autoimmunreaktionen zur Schädigung des Herzens bei (15). Durch die dauerhafte Immunreaktion ist eine vermehrte Zelllyse der Kardiomyozyten mit erheblicher Nekrosebildung zu beobachten. Verschiedene Studien legen einen kausalen Zusammenhang zwischen der chronischen Myokarditis und der Entwicklung einer DCM nahe, auch wenn dieser noch nicht abschließend bewiesen werden konnte (16, 17). Bei der DCM kommt es zu erheblichen Veränderungen der extrazellulären Matrix des Herzens mit Fibrosebildung, wodurch das Pumpvolumen und die Pumpkraft des Herzens bei Zunahme des Organvolumens nachhaltig vermindert werden (18). Die Funktionseinschränkung des Herzens bei DCM-Patienten ist unumkehrbar und führt letztlich zu Herzversagen. Die symptomatische Behandlung der DCM-Patienten mit Medikamenten, wie sie auch bei Herzinsuffizienz eingesetzt werden, stellt die einzige Therapiemöglichkeit dar. Als letzte Behandlungsoption kommt eine Herztransplantation infrage.

1.2 Coxsackieviren

Coxsackieviren gehören zur Familie der Picornaviren. Die Bezeichnung Picornavirus leitet sich vom lateinischen Wort *pico* für „klein“ und dem genomischen Material der Picornaviren, der RNA, ab. Picornaviren sind hüllenlose Viren, deren Nukleocapsid eine ungefähre Größe von 30 nm und eine typische Ikosaeder-Struktur aufweist (Abbildung 1.1). Mit einer genomischen Größe von 7000 bis 8500 Basen, gehören sie zu den kleinsten bekannten RNA-Viren. Die Familie der Picornaviridae umfasst 17 verschiedene Genera (ICTV, Stand 2012), wie zum Beispiel die Enteroviren, Cardioviren oder Hepatoviren, die sich erheblich hinsichtlich ihrer Pathogenität und ihres Wirtsspektrums unterscheiden. Wichtige Vertreter der Picornaviren sind zum Beispiel das Poliovirus als Auslöser von Kinderlähmung, Rhinoviren als Ursache für Hals-Nasen-Rachenrauminfektionen oder auch ein Verursacher von Meningitis, das Echovirus. Coxsackieviren gehören, genau wie das Poliovirus, dem Genus der Enteroviren an. Erstmals wurde ein Coxsackievirusisolat 1948 in der amerikanischen Stadt Coxsackie im Bundesstaat New York isoliert (19). Sie werden in zwei verschiedene Gruppen unterteilt. Insgesamt 24 Serotypen werden dabei der Gruppe A zugeordnet, während 6 verschiedene Serotypen der Gruppe B angehören. Die einzelnen Vertreter variieren hinsichtlich ihres Gewebetropismus und der durch sie ausgelösten Krankheitsbilder. Vertreter der Gruppe B gelten dabei im Vergleich zu denen der Gruppe A gemeinhin als Ursache ernsthafterer Erkrankungen im

EINLEITUNG

Menschen. So löst zum Beispiel Coxsackievirus B3 (CVB3) hauptsächlich Pankreatitis und Myokarditis aus (20), während Coxsackievirus A21 als Ursache für Infektionen der oberen Atemwege gilt (21). Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Mechanismen zur Inhibierung von Coxsackievirus B3.

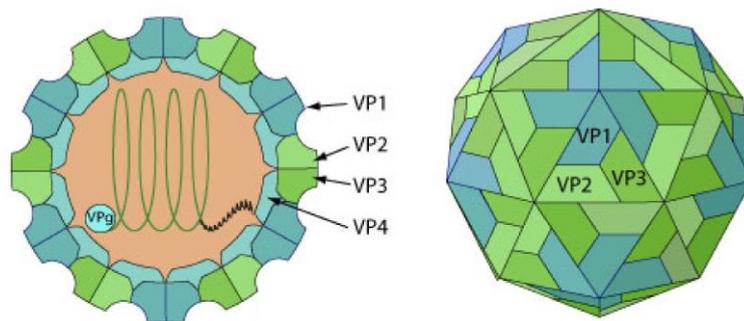


Abbildung 1.1: Schema der Struktur eines Picornavirus-Partikels. (Swiss Institute of Bioinformatics)

Das Kapsid von Picornaviren weist eine typische ikosaedrische Struktur auf (rechts). Dabei bilden die viralen Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 die äußere Kapsidhülle, während das Protein VP4 im Inneren des Kapsids mit dem viralen RNA-Genom assoziiert ist. Das Protein VPg ist an das 5' Ende der viralen RNA gebunden.

1.2.1 Genomstruktur und Replikation von Coxsackieviren

Coxsackieviren besitzen ein einzelsträngiges Genom von rund 7400 Basen in (+) Strang Orientierung (22). Am 5' Ende des Genoms befindet sich ein stark strukturierter Bereich, der als IRES (*internal ribosome entry site*) bezeichnet wird und für die Translationsinitiation des viralen Genoms unabhängig von einer Cap-Struktur erforderlich ist (23). Das 3' Ende des Genoms liegt polyadenyliert vor.

Die virale RNA kodiert für ein einziges Polyprotein, welches posttranslational in die insgesamt elf Virusproteine prozessiert wird. Dabei unterscheidet man zwischen Strukturproteinen und nicht-strukturellen Proteinen. Zu den ersteren gehören die viralen Proteine VP1, VP2, VP3 und VP4. VP1, 2 und 3 bilden das Nukleokapsid der Coxsackieviren, während VP4 im Inneren dieses Kapsids mit der genomischen RNA assoziiert ist (Abbildung 1.1 links). Zu den Nicht-Strukturproteinen gehören neben den viralen Proteasen auch Proteine, welche die Zellpermeabilität der Wirtszelle erhöhen, pro- oder auch antiapoptotisch auf die Zelle wirken, oder den Stofftransport innerhalb der Wirtszelle inhibieren. Außerdem gehört die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (*RNA dependent RNA polymerase*, kurz: RdRP) zu dieser Gruppe (24). Die für die IRES und die RdRP kodierenden Sequenzen gehören zu den am höchsten

EINLEITUNG

konservierten Regionen im Genom von Picornaviren (25). Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung des Picornavirus-Genoms.

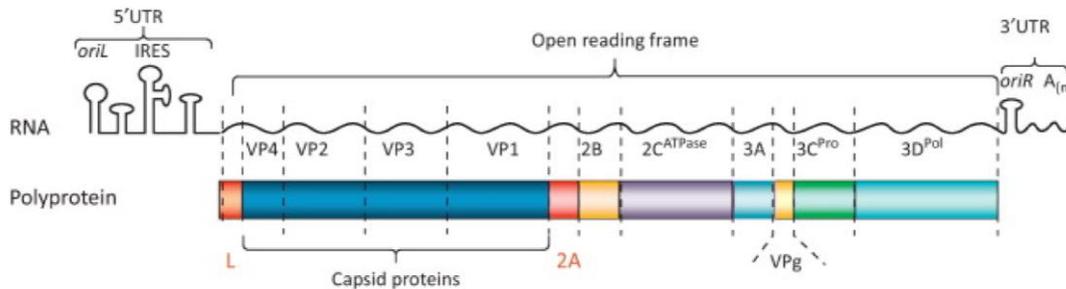


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Picornavirus-Genoms. (Agol, 2012, Trends in Microbiology (26)) Die Picornavirus-RNA weist am 5' Ende starke Sekundärstrukturen wie zum Beispiel die für die Translation erforderliche IRES auf. Das 3' Ende ist polyadenyliert. Das entstehende Polyprotein wird posttranslational in die Strukturproteine (VP1, VP2, VP3, VP4) sowie die nicht strukturellen Proteine prozessiert. Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP oder auch 3D^{Pol}) wird über eine Region am 3' Ende der RNA kodiert.

Coxsackieviren binden hauptsächlich über den Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR) an ihre Zielzellen (27). Einige Serotypen, wie zum Beispiel CVB3, interagieren zusätzlich mit dem *decay accelerating factor* (DAF) (28). DAF fungiert dabei als initiale Zellbindungsstelle und nicht als Internalisierungsrezeptor. Die Interaktion der Viren mit DAF führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, welche infolgedessen die Bindung der Viruspartikel an CAR und die Einschleußung ermöglichen (29). Durch Interaktion der Viruspartikel mit CAR erfahren die Viren eine Konformationsänderung, die zur Virusinternalisierung und Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma führt. Unmittelbar danach setzt die IRES-abhängige Translation des viralen Genoms ein. Das entstehende Polyprotein wird katalytisch in die Einzelproteine gespalten. Diese führen u. a. durch Interaktion mit Translations-Initiationsfaktoren zu einer weitgehenden Ausschaltung der Cap-abhängigen Translation in der Wirtszelle, wodurch die IRES-abhängige Translation des viralen Genoms weiter zunimmt. Die dabei entstehende RdRP schreibt das virale (+) Strang Genom daraufhin in einen komplementären (-) Strang um, der anschließend als Matrize für weitere (+) Stränge dienen kann. Die entstehenden neuen Virusgenome dienen entweder als Ausgangspunkt für eine neue Translationsrunde oder werden in einem aus VP1, VP3 und VP0 bestehendem Prokapsid verpackt, wobei VP0 anschließend im Zuge der endgültigen Kapsidreifung zu VP2 und VP4 prozessiert wird. Im

EINLEITUNG

letzten Schritt des Replikationszyklus folgt die Freisetzung der neu entstandenen Viruspartikel nach Lyse der Wirtszelle (24). Abbildung 1.3 fasst schematisch den Replikationszyklus von Coxsackieviren zusammen.

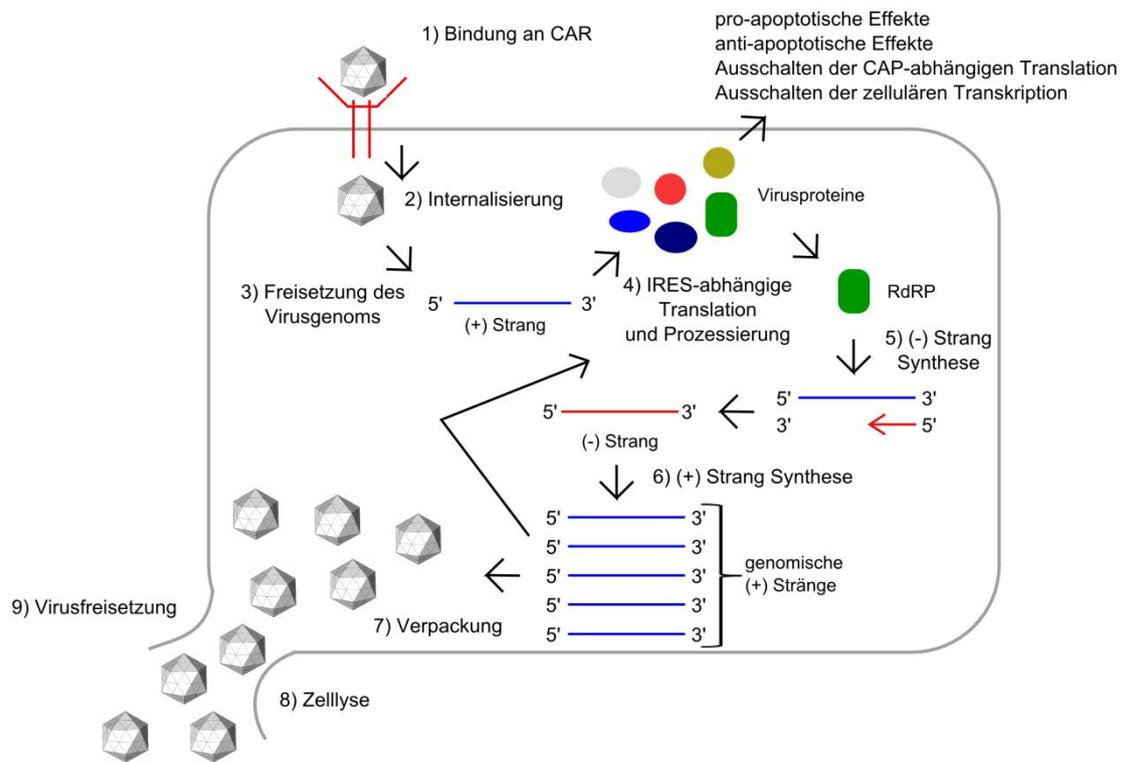


Abbildung 1.3: Replikationszyklus von Coxsackieviren. (schematisch nach Whitton et al., 2005 (24))

Die Internalisierung von Coxsackieviren (2) und Genomfreisetzung (3) erfolgt durch Bindung an CAR (1). Daraufhin setzen die IRES-abhängige Translation (4) und (-) Strang Synthese (5) ein. Der (-) Strang dient als Matrize für weitere (+) Stränge (6), die entweder zu neuen Viruspartikeln verpackt werden (7) oder erneut translatiert werden können. Nach Zellyse (8) erfolgt die Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel (9).

1.2.2 Antivirale Therapie gegen CVB3-Infektionen

Die Behandlung von CVB3-Infektionen in der Praxis basiert auf verschiedenen Wirkmechanismen. Dabei kann einerseits die Interaktion der viralen Partikel mit ihrem zellulären Rezeptor CAR inhibiert werden, das virale Genom gezielt zerstört oder blockiert werden oder das Immunsystem des betroffenen Wirts unspezifisch beeinflusst werden.

Zu den Wirkstoffen, welche die Aufnahme von CVB3-Partikeln inhibieren, gehört zum Beispiel Pleconaril, eine niedermolekulare pharmakologisch aktive Substanz der WIN-Gruppe (30). Es interagiert mit dem Viruskapsid und verhindert somit die Bindung von CVB3 an zelluläres CAR.

EINLEITUNG

In vitro konnte die Replikation einer Vielzahl von Enteroviren durch Pleconarilgabe inhibiert werden. Außerdem erhöhte sich die Überlebensrate von CVB3-infizierten Mäusen durch Pleconaril signifikant (31). In der Klinik wurde Pleconaril ebenfalls erfolgreich zur Behandlung von Coxsackievirus-B-Infektionen in Neugeborenen eingesetzt (32). Eine andere Variante zur Inhibierung der Virusaufnahme stellen lösliche Rezeptorvarianten, die auf CAR oder DAF basieren, dar. Beispiele für deren Anwendung zur Inhibierung von CVB3-Infektionen sowie der zugrunde liegende Mechanismus sind in Abschnitt 1.4 genauer beschrieben.

Antisense Oligonukleotide oder RNA-Interferenz-auslösende Substanzen wie *small interfering RNAs* (siRNAs) bzw. *short hairpin RNAs* (shRNAs) stellen die zweite Möglichkeit dar, die Replikation von CVB3-Viren zu inhibieren. Dabei können die Viren zwar ungehindert ihre Zielzellen infizieren, die Translation der viralen Proteine sowie die Vermehrung des Virusgenoms werden anschließend aber gestört. Bei Antisense Oligonukleotiden basiert diese Störung auf der Bindung der genomischen RNA. Im Falle von CVB3 konnte durch den Einsatz von Phosphothioat-Oligonukleotiden die Virusreplikation sowohl *in vitro* in kardialen Zellen als auch *in vivo* in CVB3-infizierten Mäusen inhibiert werden (33). Bei siRNAs bzw. shRNAs wird die CVB3-RNA auf Grund des RNA-Interferenz-Mechanismus (siehe Abschnitt 1.5.1) zerschnitten. Die Translation der viralen Proteine sowie die Generierung neuer Viruspartikel sind damit unmöglich. Die Inhibierung von CVB3 durch den Einsatz von siRNAs bzw. shRNAs, welche direkt gegen das virale Genom gerichtet sind, ist bereits von mehreren Gruppen in der Literatur beschrieben (34–37). Die Inhibierung des Virus war dabei besonders effektiv, wenn stark konservierte Regionen des Virusgenoms, wie die RdRP, durch den RNA-Interferenz-Mechanismus angegriffen wurden. Eine vollständige Inhibierung der Virusreplikation durch RNAi konnte allerdings sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell nicht erzielt werden.

Die Gabe von immunmodulatorischen Substanzen stellt die dritte Variante zur Behandlung von CVB3-Infektionen dar. Dabei wird zwischen immunsupprimierenden und -stimulierenden Substanzen unterschieden. Durch den Einsatz immunsupprimierender Substanzen soll die Immunreaktion auf die bestehende Virusinfektion gedämpft und damit der inflammatorische Schaden im Myokard begrenzt werden. Obwohl eine Vielzahl immunsupprimierender Substanzen wie Cyclosporin und Prednisolon zur Verfügung steht, war lediglich ein Medikament dieser Gruppe mit Namen FTY720 wirksam bei der Behandlung von CVB3-induzierter Myokarditis im Mausmodell. Mit diesem Wirkstoff behandelte Tiere hatten im Vergleich zu unbehandelten oder Cyclosporin-behandelten Tieren eine höhere Überlebensrate und wiesen ein geringeres Inflamationslevel im Herzen auf (38). Der Einsatz immunstimulierender Substanzen, wie Interferon- α oder Interferon- β hat dagegen die

EINLEITUNG

Unterstützung der körpereigenen, antiviralen Abwehr zum Ziel. In *in vivo* Mausstudien konnte gezeigt werden, dass Interferon- β und Interferon- α_2 zu einem verringerten Inflammationslevel im Myokard sowie niedrigeren Virustitern und einem verbesserten Allgemeinbefinden CVB3-infizierter Mäuse führen (39). Auch in einer bereits 1996 durchgeführten klinischen Untersuchung führte der Einsatz von Interferon- α bei Patienten mit Myokarditis oder DCM zu einer verbesserten Herzfunktionalität im Vergleich zu konventionell behandelten Patienten (40). Im Rahmen einer klinischen Phase-II-Studie an Patienten mit enteroviraler oder adenoviraler, myokardialer Persistenz konnte außerdem der protektive Effekt von Interferon- β im Menschen bestätigt werden. In den mit Interferon behandelten Patienten waren zum Ende des Untersuchungszeitraums keine viralen Genome mehr nachweisbar. Dies ging mit einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktionsparameter einher (41).

Obwohl die hier beschriebenen Optionen zur Behandlung von CVB3-Infektionen bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert haben, existiert in der Klinik weiterhin keine spezifische, antivirale Therapie gegen CVB3. Es besteht daher weiterhin eine Notwendigkeit für die Erforschung neuer Behandlungsmethoden. Auch die Kombination vorhandener Therapieansätze gegen CVB3-Infektionen stellt dabei eine Möglichkeit dar, um das antivirale Potential zu verstärken.

1.2.3 CVB3-Infektionen im Mausmodell

Obwohl Coxsackievirus B3-Infektionen natürlicherweise noch nicht in Mäusen nachgewiesen wurden, ist es experimentell möglich, Mäuse mit CVB3 zu infizieren. Das durch CVB3-Infektion in verschiedenen Mausstämmen hervorgerufene Krankheitsbild einer akuten oder chronischen Myokarditis ähnelt dabei dem im Menschen beobachteten. Allerdings existieren erhebliche Unterschiede in Verlauf und Stärke der Infektion, abhängig vom verwendeten Mausstamm, dem Geschlecht der Tiere sowie dem auslösenden Virusisolat.

Balb/c- und C57BL/6-Mäuse, die am häufigsten in der Forschung verwendeten Inzuchtstämme, zeigen nach CVB3-Infektion einen rein akuten Krankheitsverlauf, welcher durch eine initiale Pankreatitis und anschließende Myokarditis gekennzeichnet ist (42). Der Nachweis infektiöser Viruspartikel sowie inflammatorischer Zellen im Myokard ist bei beiden Mausstämmen nur innerhalb eines sehr engen Zeitfensters von maximal 2 Wochen nach Infektion möglich. Die stärkste Viruslast im Herzen wird zwischen 4 und 7 Tagen nach Infektion erreicht. Die Stärke der sich entwickelnden Inflammation sowie die Überlebenschance der Tiere hängen maßgeblich von der verwendeten Virusdosis sowie dem Alter der Mäuse bei Infektion ab (43).

EINLEITUNG

Generell fallen Infektion und daraus resultierende Inflammation bei jüngeren Mäusen stärker aus als bei älteren. Auch das Geschlecht der Mäuse beeinflusst die Stärke und Art der durch die Infektion hervorgerufenen akuten Inflammation (44).

Ein chronischer Krankheitsverlauf, ähnlich dem der DCM beim Menschen, kann nach CVB3-Infektion in A/J- oder NMRI-Mäusen beobachtet werden (45, 46). In beiden Stämmen führt die Infektion zu dauerhaften Schäden des Myokards mit Fibrosebildung und Umbauprozessen in der extrazellulären Matrix des Herzens (18). Außerdem kann persistierende Virus-RNA noch lange nach Infektion im Herzen nachgewiesen werden, obwohl keine replikationskompetenten Viruspartikel mehr vorhanden sind (47). Das beobachtete Krankheitsbild kann daher, ähnlich wie bei der DCM, nicht mehr auf die eigentliche Virusreplikation sondern auf Immun- und Autoimmunreaktionen in der Maus zurückgeführt werden (15).

Auf welchen Mausstamm die Wahl bei experimentellen Untersuchungen zu CVB3-induzierter Myokarditis fällt, hängt somit von der wissenschaftlichen Fragestellung ab. Sollen die akute Infektion oder die Virusaufnahme verhindert werden, stellen Balb/c- oder C57BL/6-Mäuse einen geeigneten Modellorganismus dar. Um Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen einzelnen Versuchen zu vermeiden, sollten die Tiere außerdem ein vergleichbares Alter bzw. Gewicht zum Infektionszeitpunkt aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich männliche, 5 bis 6 Wochen alte Balb/c-Mäuse verwendet.

1.3 Der Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptor (CAR)

CAR ist ein Transmembranprotein der IgG-Superfamilie und fungiert als zellulärer Rezeptor sowohl für verschiedene Coxsackie- als auch für Adenoviren. Die Bindung von Coxsackieviren des Typs B an CAR führt dabei zu einer unumkehrbaren Strukturveränderung der Viruspartikel hin zu sogenannten A-Partikeln (*altered particles*), welche letztlich die Virus-Internalisierung zur Folge hat. Das menschliche CAR-Gen ist auf Chromosom 21 (21q11.2) lokalisiert (48). Es beinhaltet 7 Exons, die für das reife, aus 346 Aminosäuren bestehende Protein kodieren. Seine Molekülmasse beträgt 38 kDa. CAR setzt sich aus einer phosphorylierbaren intrazellulären Domäne von 107 Aminosäuren, einer membranspannenden Domäne und zwei extrazellulären Domänen D1 und D2 mit diversen Glykosylierungsstellen zusammen. Die D1-Domäne ist für die Interaktion von CAR mit Coxsackie- und Adenoviren verantwortlich (27).

Die genaue Funktion von zellulärem CAR ist bis heute nicht aufgeklärt. Allerdings legt die hohe Expression von CAR in der frühen embryonalen Entwicklung besonders im kardialen Gewebe und im Gehirn eine Funktion des Proteins in der Entwicklung dieser Organsysteme nahe (49,

EINLEITUNG

50). Auch die Lokalisation von CAR in verschiedenen Zell-Zell-Kontaktstellen, wie zum Beispiel den *tight junctions* von Epithelzellen, lässt auf eine Funktion von CAR in der Herausbildung von komplexen Zellstrukturen und der Herstellung von Zell-Zell-Kontakten schließen (51, 29). Dies wird ebenfalls durch die Tatsache unterstützt, dass die D1-Domäne von CAR, Dimere ausbilden kann (52). CAR *knock out* Mäuse sind auf Grund schwerer Fehlbildungen des kardialen Systems embryonal letal (53). Auch wenn der *knock out* von CAR erst im adulten Tier induziert wird, wurden verschiedene Fehlfunktionen bzw. -strukturen sowohl im Herzen als auch diversen anderen Organsystemen beobachtet (54, 55). Eine komplette Ausschaltung des zellulären CARs als antivirale Strategie gegen Coxsackievirus B-Infektionen durch RNA-Interferenz oder Antagonisten kommt daher auf Grund der zu erwartenden Nebenwirkungen nicht infrage.

1.4 Inhibierung von Virusinfektionen mit Hilfe löslicher Rezeptorproteine

Lösliche Rezeptorproteine werden eingesetzt, um das Andocken von Viruspartikeln an ihre Zielzellen und die daraus resultierende Internalisierung zu verhindern. Dabei müssen die löslichen, oftmals extrazellulär vorliegenden Anteile der Virusrezeptorproteine in ausreichend hoher Konzentration im Serum der zu behandelnden Organismen vorliegen, um einen möglichst großen Anteil der Viruspartikel vor dem Eindringen in die Zielzellen abzufangen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine kompetitive Hemmung der Virusaufnahme, die bei höheren Viruskonzentrationen aufgehoben wird. In der Literatur ist die Hemmung verschiedenster Viren durch lösliche Varianten ihrer jeweiligen Rezeptoren beschrieben. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine oktamerische, lösliche Variante von CD46 in der Lage ist, das Masernvirus *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren (56). Lösliche Formen von Nukleolin konnten das respiratorische Synzytialvirus *in vitro* inhibieren (57). Auch Poliovirus, welches wie CVB3 zur Picornavirus-Familie gehört, konnte bereits durch lösliche Varianten des Poliovirus-Rezeptors inhibiert werden (58).

Im Falle von Coxsackievirus B3 kann die Infektion der Zielzellen durch Gabe einer löslichen Variante von CAR besonders effektiv und nicht rein kompetitiv inhibiert werden (59). Die Ursache dafür liegt in einer irreversiblen Konformationsänderung der Coxsackieviruspartikel beim Andocken an die löslichen Rezeptormoleküle. Genau wie bei der natürlichen Bindung der Viren an zelluläres CAR, bilden die CVB3-Partikel auch beim Andocken an die löslichen Rezeptoren A-Partikel aus (60). Infolge dieser Konformationsänderung ist es ihnen nicht mehr möglich, an die natürlichen, zellulären CAR-Moleküle anzudocken. Da die Viren die löslichen Rezeptoren nach Ausbildung der A-Partikel wieder verlassen, stehen die löslichen Moleküle

EINLEITUNG

erneut für die Inhibierung weiterer CVB3-Partikel zur Verfügung, was im Vergleich zur kompetitiven Hemmung die Effizienz der Virusinhibierung erheblich steigert. Lösliche Varianten von DAF, dem zweiten bekannten zellulären Rezeptor von CVB3, führen dagegen lediglich zu einer kompetitiven Hemmung der Virusaufnahme und sind daher weniger effektiv (28).

Als Applikationsmethoden für lösliche Rezeptormoleküle kommen zum Beispiel rekombinante Proteine infrage. Diese können sowohl in Bakterien als auch eukaryotischen Zellen hergestellt werden und müssen vor Applikation aufgereinigt werden. Alternativ ist eine Expression über virale Vektoren möglich. Beide Varianten wurden bereits zur Inhibierung von CVB3 mittels sCAR-Varianten verwendet (61–63).

1.5 RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz ist ein natürlich vorkommender Mechanismus der post-transkriptionalen Genregulation. Dabei führen doppelsträngige RNA-Moleküle zu einer sequenzspezifischen Inhibierung komplementärer mRNAs und verhindern so die Translation dieser in Proteine. Entdeckt und erstmals beschrieben wurde der Prozess 1998 von Andrew Fire und Craig Mello. Nach Injektion langer, doppelsträngiger RNA-Moleküle in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beobachteten sie eine Verringerung der Expression der Gene, deren mRNA Komplementaritäten zur eingebrachten RNA aufwies (64). Infolge dieser Beobachtung, wurde der Prozess der RNA-Interferenz auch in anderen Organismen wie *Drosophila melanogaster*, *Trypanosoma brucei* aber auch Pflanzen beschrieben (65–67).

In Säugerzellen induzieren lange, doppelsträngige RNA-Moleküle eine durch das angeborene Immunsystem regulierte Interferonantwort (68). Dadurch wurde die Nutzung der RNA-Interferenz als künstliches Werkzeug der Genregulation verhindert. Erst die Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl fand eine Möglichkeit, RNAi auch in Säugerzellen zu nutzen. Sie verwendeten chemisch synthetisierte, kleine dsRNA Moleküle, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs), welche künstlich in Säugerzellen eingebracht wurden und dort zu einer sequenzspezifischen Verminderung der Expression von Zielgenen führten (69). Die bei längeren RNA-Molekülen induzierte Interferonantwort, blieb im Falle dieser lediglich 21 Nukleotide kurzen RNAs aus. Infolge dieser Entdeckung kam es zu einem rasanten Anstieg der Nutzung der RNA-Interferenz in der Forschung. So konnten endogene Targets effektiv mit Hilfe von siRNAs unterdrückt werden (70). Außerdem wurde die Methode der künstlich induzierten RNAi vermehrt zur antiviralen Abwehr z. B. gegen das Hepatitis-C-Virus (HCV) oder das Humane Immundefizienz-

EINLEITUNG

Virus (HIV) eingesetzt (71, 72). RNAi-basierte Ansätze wurden ebenfalls im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung diverser Erkrankungen wie zum Beispiel Makula-Degeneration verwendet (73). Der rasante Anstieg von RNAi-basierten Publikationen in den wenigen Jahren seit ihrer Entdeckung verdeutlicht das große Potential des Mechanismus zur therapeutischen und klinischen Nutzung.

1.5.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Der natürlich vorkommende RNAi-Mechanismus basiert entweder auf siRNAs oder endogen transkribierten microRNAs (miRNAs).

Bei der siRNA-vermittelten RNAi werden doppelsträngige RNA-Moleküle, die z. B. bei der Replikation von RNA-Viren entstehen, im Zytoplasma durch das Molekül Dicer in kurze siRNAs prozessiert (74). Dicer gehört zur Enzymklasse der Ribonukleasen vom Typ III und besitzt eine RNaseIII-Aktivität (75). Die entstehenden siRNAs zeichnen sich durch ihre charakteristische Länge von 21 Nukleotiden aus. Neunzehn Nukleotide bilden dabei eine doppelsträngige Struktur, die an den beiden 3' Enden von jeweils zwei einzelsträngigen, ungepaarten Nukleotiden flankiert wird. Der siRNA/ Dicer-Komplex assoziiert anschließend mit weiteren RNA-bindenden Proteinen und bildet den *RISC-loading complex* (76). Dieser transferiert die siRNA zum *RNA induced silencing complex (RISC)*. Im *RISC* wird der *passenger strand* der siRNA mit Hilfe des Argonaut 2-Proteins degradiert, während der *guide strand* in den Proteinkomplex integriert wird. Dabei bestimmen vor allem die Sequenz sowie die sich daraus ergebenden thermodynamischen Eigenschaften der jeweiligen Stränge, welcher Strang degradiert wird bzw. im *RISC* verbleibt (77, 78). Durch die Beladung des *RISC* mit dem *guide strand* der siRNA wird dieser aktiviert. Infolge der Aktivierung sucht der *RISC* nach RNA-Molekülen im Zytoplasma, welche zur Sequenz des integrierten *guide strands* komplementär sind, und assoziiert mit diesen. Dabei kann es sich sowohl um endogen exprimierte mRNAs als auch um von Viren oder Bakterien stammende RNA-Transkripte oder Genome handeln. Die Komplementarität der beiden RNA-Moleküle beträgt im Falle der siRNA-vermittelten RNAi 100 %. Das im *RISC* enthaltene Ago-Protein besitzt eine Endonuklease-Aktivität und spaltet anschließend die zum *guide strand* komplementären RNA-Sequenzen (79). Durch die Spaltung verlieren die mRNAs ihren Schutz vor Abbau durch Exonukleasen, wie die 5' Kappe und den 3' Poly-A-Schwanz, und werden daher vollständig abgebaut, wodurch sich das entsprechende Proteinlevel verringert. Der Mechanismus der siRNA-gesteuerten RNAi ist schematisch in Abbildung 1.4a dargestellt.

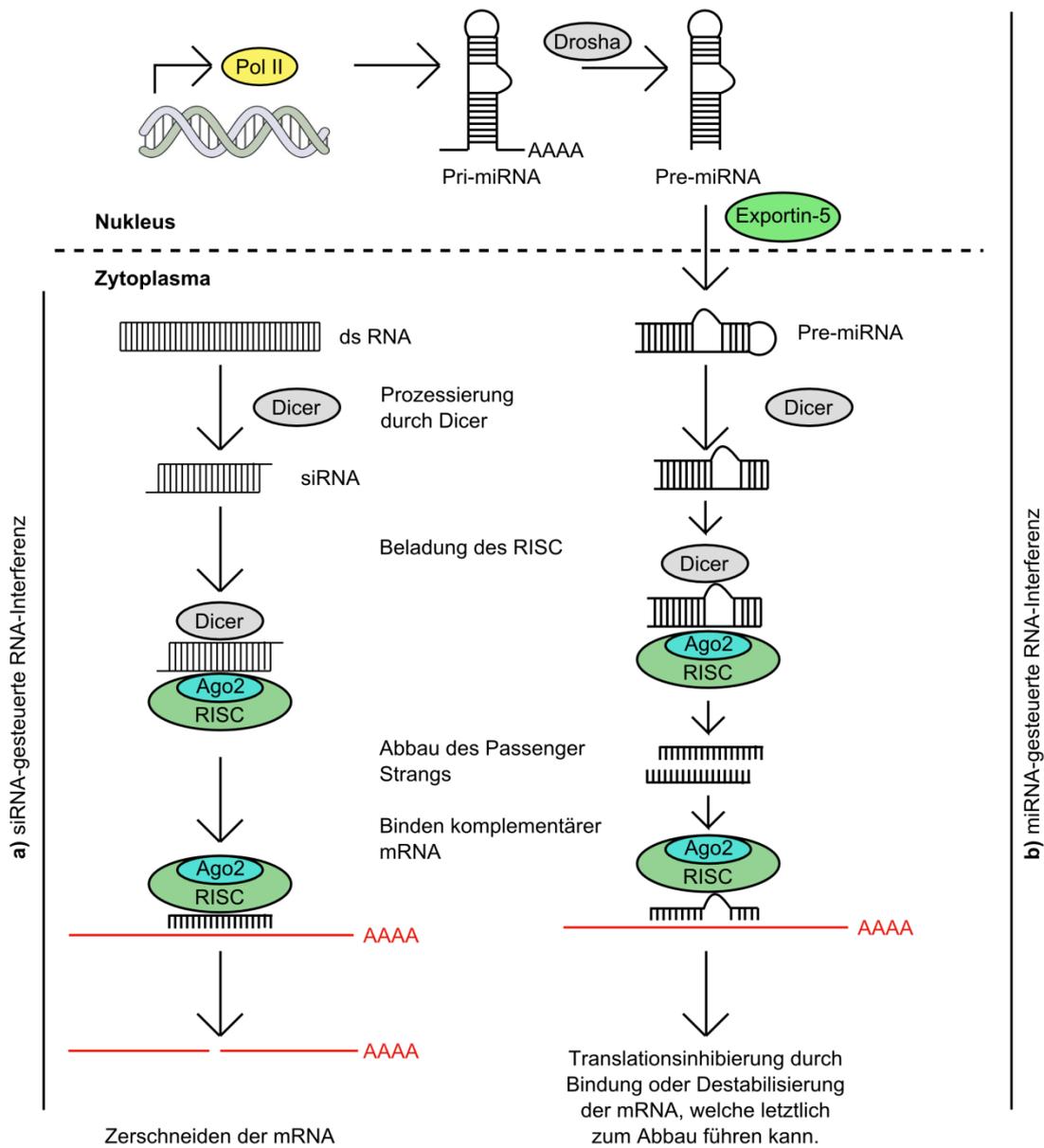


Abbildung 1.4: Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) (schematisch nach Fougerolles et al.; 2007 (80))

a) siRNA-vermittelte RNAi. Doppelsträngige RNA wird durch Dicer in kurze siRNAs prozessiert. Während der Beladung des RISC (*RNA induced silencing complex*) mit diesen wird der Passenger-Strang durch Ago2 abgebaut. Zum Guide-Strang komplementäre mRNAs werden anschließend zerschnitten und dann exonukleatisch abgebaut.

b) miRNA-vermittelte RNAi. Im Nukleus werden endogene pri-miRNA durch Polymerase II transkribiert, über Drosha in pre-miRNAs prozessiert und anschließend mittels Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt die Prozessierung zu miRNAs über Dicer, sowie die Beladung des RISC. Dabei wird erneut ein Strang der miRNA abgebaut. Die Translationsinhibition erfolgt entweder durch Bindung teilweise komplementärer mRNAs oder auch durch Destabilisierung der mRNA mit anschließendem exonukleolytischen Abbau.

EINLEITUNG

Zusätzlich zur siRNA-basierten Regulation der Genexpression können auch endogen kodierte miRNAs zu einer verringerten Proteintranslation führen (Abbildung 1.4b). Seit Entdeckung der ersten miRNA in *Caenorhabditis elegans* im Jahr 1993 (81), wurden auch in Pflanzen und Menschen eine Vielzahl dieser kleinen, regulatorischen RNAs beschrieben. Im humanen Genom sind bis heute mehr als 1000 miRNAs identifiziert worden (82). Die Vorstufen der miRNAs sind im Genom des jeweiligen Organismus kodiert und liegen oftmals in Intronbereichen oder untranslatierten Regionen von Protein-kodierenden Sequenzen (83). Durch Transkription der Bereiche durch RNA-Polymerasen vom Typ II entstehen pri-miRNAs. Diese werden im Nukleus durch Drosha, ein Protein mit RNaseIII-Aktivität, zu den rund 70 Nukleotide langen pre-miRNAs (*precursor micro RNAs*) prozessiert, welche eine typische Haarnadelstruktur aufweisen (84). Der anschließende Transport dieser aus dem Kern ins Zytoplasma erfolgt mit Hilfe von Exportin-5 (85). Dort erfolgt die weitere Prozessierung zu reifen miRNAs durch Dicer. Das Entwinden der doppelsträngigen pre-miRNA erfolgt dabei unter Mithilfe eines Cofaktors (TRBP), welcher eine dsRNA-Bindedomäne enthält. Die reife einzelsträngige miRNA formt zusammen mit Dicer, einem Argonautenprotein und dem Cofaktor TRBP einen Ribonucleoprotein-Komplex (86). Zur miRNA teilweise oder komplett komplementäre Ziel-RNAs werden an diesen Komplex gebunden. Die Translationsinhibierung bei miRNA-reguliertem *Silencing* kann auf verschiedene Arten erfolgen. Dabei kann zum Beispiel der Zusammenbau des Ribosoms durch Blockade der mRNA verhindert werden. Alternativ kommt es oftmals zu einer miRNA-vermittelten Destabilisierung der mRNA durch Decapping oder Deadenylierung, die letztlich den Abbau der mRNA zur Folge hat (87). Welcher der Mechanismen zur posttranskriptionalen Geninhibierung zur Anwendung kommt, wird z. B. durch den Grad der Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-RNA bestimmt (88).

1.5.2 Vektorvermittelte RNA-Interferenz

Um die RNAi als Werkzeug zur posttranskriptionalen Genregulation in Forschung und Therapie erfolgreich einzusetzen, mussten zuerst einige Hindernisse überwunden werden. Künstlich in die Zelle eingebrachte siRNAs führen lediglich zu einer temporären Unterdrückung der Genexpression. Im Laufe der Zeit werden sie durch die Zelle abgebaut oder gehen durch Zellteilung verloren. Außerdem verfügen kommerziell verfügbare Transfektionsreagenzien zum Einschleusen von siRNAs in Zellen nur über eine begrenzte Effektivität, so dass keine 100 %ige Transfektionsrate erzielt wird. Diesen Problemen kommt gerade beim *in vivo* Einsatz der RNAi eine besondere Bedeutung zu. Während zur *in vivo* Transfektion von Mäusen oftmals die

EINLEITUNG

hydrodynamische Schwanzveneninjektion zum siRNA-Delivery eingesetzt wurde, kommt diese Methode bei größeren Säugern oder gar dem Menschen nicht infrage (89). Die Möglichkeit der vektorvermittelten Expression von siRNAs stellte somit einen wichtigen Schritt zur therapeutischen Anwendung von RNAi *in vivo* dar.

Dabei werden die siRNAs als *short hairpin RNAs* (shRNAs), also kurze Haarnadelstruktur-Moleküle, bestehend aus dem *sense* und *antisense* Strang der siRNA, getrennt durch eine Loop-Sequenz, unter Kontrolle von Polymerase III-Promotoren von einem Vektor exprimiert. Erstmals wurde diese Art der *in vitro* vektorvermittelten RNAi 2002 beschrieben (90). Der erste *in vivo* Einsatz folgte bereits ein Jahr später (91). Eine weitere Möglichkeit siRNAs effektiv von einem Vektor zu exprimieren, stellt die Verwendung artifizierender microRNAs (amiRNAs) dar. Dabei werden der *sense* und *antisense* Strang einer siRNA in die Umgebung einer natürlich vorkommenden miRNA eingebettet. Diese kann dann durch einen Polymerase II-Promoter exprimiert werden (92). Die Prozessierung der exprimierten pri-miRNA erfolgt anschließend analog zu der natürlicher miRNAs (siehe Abschnitt 1.5.1). Dabei ist es ebenfalls möglich, durch die Verwendung gewebespezifischer Promotoren die Expression des RNAi-auslösenden Konstrukts auf ein bestimmtes Zielgewebe zu beschränken, wodurch Nebenwirkungen verringert werden (93, 94). Dieser Effekt wird noch verstärkt, da der jeweilige Zielorganismus die amiRNA auf Grund ihrer natürlichen miRNA-Umgebung nicht als fremdes Molekül erkennt. Die shRNA- und amiRNA-kodierenden Plasmide ermöglichen somit eine stabile, längerfristige Expression der RNAi-auslösenden Substanzen. Allerdings müssen auch diese Plasmide effektiv und in ausreichender Anzahl in Zellen transfiziert oder *in vivo* eingeschleust werden. Die Konstruktion viraler Vektoren, basierend auf den hier beschriebenen Plasmiden bietet hierfür ein effizientes Werkzeug. In gentherapeutischen Ansätzen wurden bisher vor allem adenovirale Vektoren (AdV), Adenovirus-assoziierte Vektoren (AAV-Vektoren) oder lentivirale Vektoren verwendet (95–98).

1.5.3 RNA-Interferenz als antivirale Therapieoption

Der Mechanismus der RNAi wird natürlicherweise in verschiedenen Organismen wie Pflanzen, Insekten aber auch Säugern zur antiviralen Abwehr benutzt (99–101). Daher liegt die Verwendung der RNAi als künstliches Werkzeug zur Virusabwehr in Forschung und Medizin nahe. Dabei können einerseits endogene, zelluläre Faktoren, die für die Virusreplikation essentiell sind, herunter reguliert werden. Hierfür muss vorab geklärt werden, dass ein *Silencing* des endogenen Targets nicht zu Nebenwirkungen für die Zelle oder den Organismus

EINLEITUNG

führt. Andererseits können auch das virale Genom oder virale Transkripte direkt mittels RNAi abgebaut werden. Beide Mechanismen sind bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.

Ein erster Schritt, um Viren durch *Silencing* endogener Targets zu inhibieren, ist die Identifikation zellulärer Faktoren, welche für die Virusreplikation essentiell sind. Zelluläre Virusattachment- oder Internalisierungsrezeptoren stellen dabei geeignete Kandidaten dar. Im Falle von CVB3 führte z. B. ein *Silencing* von CAR zu einer verringerten Virusreplikation in Zellkultur (102, 103). Auch die Replikation von HCV konnte durch RNAi-gesteuertes *Silencing* verschiedener HCV-Rezeptoren *in vitro* inhibiert werden (104). Zur Identifikation weiterer möglicher Targets wurden in der Vergangenheit genomweite RNAi-Screenings für verschiedene Viren durchgeführt (105–107). Dabei wird jedes einzelne Gen eines Organismus mithilfe spezifischer siRNAs ausgeschaltet und anschließend die Replikation des jeweiligen Virus in den Zellen beurteilt. Repliziert das Virus nach Ausschalten eines bestimmten Gens schlechter, so ist ein potentielles Target für eine antivirale RNAi-Therapie gefunden. Um negative Auswirkungen für den Organismus auszuschließen, kann zum Beispiel die Zellviabilität ohne Virusinfektion in der veränderten Zelle bestimmt werden. Im Rahmen des RNAi-Screenings für Coxsackievirus B3 wurde CAR als Target einer antiviralen RNAi-Therapie bestätigt (106).

Eine Alternative zum Targeting replikationsnotwendiger zellulärer Faktoren, stellt das direkte Targeting des viralen Genoms bzw. viraler Transkripte dar. Dabei muss zwischen DNA- und RNA-Viren unterschieden werden. Bei RNA-Viren, wie den Picornaviren, können siRNAs bzw. shRNAs direkt komplementär zum viralen Genom designed werden. Sie führen nach erfolgreichem Einbringen in die Zielzellen zu einem direkten Abbau des genetischen Materials der Viren. Dadurch steht auch kein Ausgangsmaterial für die Translation viraler Proteine zur Verfügung, wodurch die Virusreplikation insgesamt verringert wird. So konnte z. B. CVB3 durch si- bzw. shRNAs, welche gegen verschiedene Regionen des RNA-Genoms gerichtet waren, *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden (37, 108, 109). Aber auch andere RNA-Viren wie z. B. das Hepatitis-C-Virus oder das HI-Virus konnten bereits erfolgreich durch RNAi, welche das virale Genom zum Ziel hat, inhibiert werden (110, 111).

Im Falle von DNA-Viren, wie beispielsweise den Adenoviren, kann das virale Genom nicht direkt mittels RNAi zerstört werden. Allerdings können Transkripte des Genoms Ziel der RNAi-Maschinerie werden. Dabei werden oftmals Virusgene, welche für die Replikation essentiell sind, als Ziel ausgewählt. So konnte zum Beispiel die Replikation von Adenovirus 5 effektiv durch den Einsatz von gegen das E1A-Gen bzw. das Hexon- oder IVa2-Gen gerichteten siRNAs inhibiert werden (112). Ein wichtiger Aspekt, der bei der Inhibierung von Viren mittels RNAi

EINLEITUNG

beachtet werden muss, ist die Entstehung von Escape-Mutanten. Viren weisen oftmals eine hohe Mutationsrate und daraus entstehende genetische Variabilität auf. Dabei entstehen auch Mutationen in den genomischen Regionen, welche Ziel des RNAi-Mechanismus sind. Daher sollten mehrere antivirale siRNAs bzw. shRNAs mit verschiedenen Zielsequenzen kombiniert werden, um einem viralen *Escape* vorzubeugen. Diese Taktik ist ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (108, 113).

Auch klinische Studien beurteilen bereits die Wirksamkeit der RNAi als antiviralen Mechanismus. Die gegen das humane Nucleoprotein-Gen des respiratorischen Synzytialvirus (RSV) gerichtete siRNA ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) wurde in einer klinischen Phase-II-Studie untersucht. Die Verabreichung der siRNA erfolgte dabei durch Inhalation. Die Applikation war im Rahmen der Studie wirkungsvoll hinsichtlich der Bekämpfung von RSV und verursachte keine Nebenwirkungen (114, 115). NUC B1000 (Nucleonics), ein anderes auf RNAi basierendes, antivirales Medikament, enthält als aktive Substanz ein Plasmid, welches vier shRNAs gegen unterschiedliche Regionen des Hepatitis-B-Virus-Genoms enthält. Die Substanz wurde bereits erfolgreich in einer klinischen Phase-I-Studie hinsichtlich eventueller Toxizität getestet (116).

Die große Vielfalt von Viren, gegen die RNAi bereits erfolgreich eingesetzt werden konnte, sowie die Ergebnisse der bereits laufenden klinischen Untersuchungen verdeutlichen das Potential der RNAi zur antiviralen Therapie.

1.6 Virale Vektoren

Virale Vektoren bieten die Möglichkeit, Nukleinsäuren effizient in Zellen oder auch höhere Organismen einzuschleusen. Dabei wird die zu übertragende DNA-Sequenz in das Rückgrat eines viralen Vektors eingefügt. Das Genom der zugrunde liegenden Viren wird für die Konstruktion eines Vektors so verändert, dass zwar die für die Verpackung des Vektors notwendigen Sequenzen erhalten bleiben, nicht aber die für die Replikation und Zelllyse verantwortlichen. Dadurch wird gewährleistet, dass der Vektor die Zielzellen einerseits effizient transduzieren kann, sich aber andererseits nicht in diesen vermehrt. Ein weiterer entscheidender Vorteil gegenüber nicht viralen Deliverysystemen liegt in der langfristigen Expression der durch den Vektor übertragenen Substanz. So konnte im Falle von Adenovirus-assoziierten Vektoren eine Transgenexpression in Mäusen und Ratten auch ein Jahr nach Transduktion ohne ersichtliche Nebenwirkungen nachgewiesen werden (117, 118).

EINLEITUNG

Virale Vektoren können sowohl zum *Delivery* von proteinkodierenden Sequenzen im Rahmen von gentherapeutischen Ansätzen, als auch zur Übertragung RNAi-auslösender shRNAs oder amiRNAs verwendet werden. Beide Anwendungen sind bereits häufig in der Literatur beschrieben (119–123, 37). Des Weiteren basieren bislang mehr als 1000 klinische Studien auf der Verwendung viraler Vektoren (124–126). Auch die erste in der westlichen Welt zugelassene gentherapeutische Behandlung des Menschen nutzt einen AAV-Vektor zum *Delivery* (127).

Virale Vektoren werden nach dem ihnen zu Grunde liegenden Virus unterschieden. Die bisher am häufigsten in gentherapeutischen Ansätzen verwendeten Vektoren basieren dabei auf Adenoviren, Adenovirus-assoziierten Viren und Lentiviren. Dabei existieren erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Wirkmechanismus und der Dauer der durch den Vektor hervorgerufenen Genexpression. Während lentivirale Vektoren zu einer Integration der kodierten Sequenz in das Wirtsgenom und einer daraus resultierenden längerfristigen Expression führen, bleibt die kodierte Sequenz bei AdVs und AAV-Vektoren extrachromosomal vorliegend. AdVs werden kurzfristig aus dem Organismus durch das Immunsystem entfernt (128), während AAV-Vektoren nur eine moderate Immunantwort hervorrufen und somit eine langfristige Expression gewährleisten (129).

Bei AAV-Vektoren wird zusätzlich zwischen einzelsträngigen (ss) und selbstkomplementären (sc) Vektoren unterschieden (siehe Abbildung 1.5). Einzelsträngige Vektoren enthalten lediglich ein ss Genom. Von diesem muss nach Transduktion der Zielzelle zuerst ein komplementärer Zweitstrang synthetisiert werden, bevor die Transkription der enthaltenen Sequenz starten kann. Bei scAAV-Vektoren wurden die ITRs des Virus so verändert, dass sich nach Transduktion vorübergehend das Genom zu einer doppelsträngigen DNA falten kann und die Transkription schneller startet. Somit ist die durch scAAV-Vektoren gesteuerte Genexpression schneller und stärker als die von ssAAV-Vektoren (130). Auch der Gewebetropismus verschiedener viraler Vektoren variiert stark. Welcher Vektor im speziellen Fall verwendet wird, hängt somit von der jeweiligen Applikation, dem Zielgewebe und der gewünschten Dauer der Therapie ab. In der vorliegenden Arbeit kamen sowohl AdVs als auch scAAV-Vektoren zum Einsatz.

EINLEITUNG

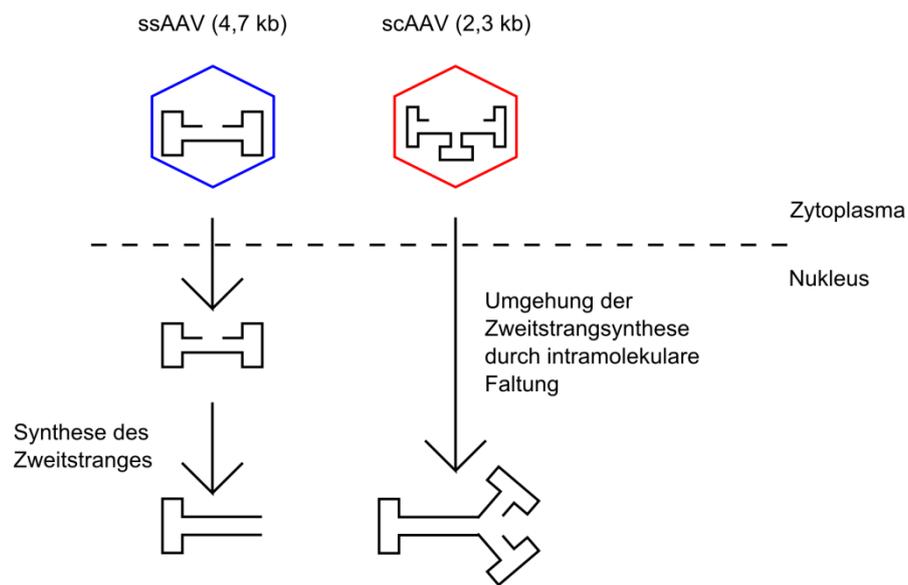


Abbildung 1.5: Rekombinante AAV-Vektoren im Vergleich. (schematisch nach Daya und Berns, 2008 (130))
 Bei ssAAV-Vektoren wird nach Transduktion zuerst der Zweitstrang der Vektor-DNA synthetisiert bevor die Transkription einsetzt. Bei scAAV-Vektoren entfällt dieser Schritt, da sich ihr Genom selbstständig zum Doppelstrang falten kann. Die Genexpression setzt daher schneller ein, die Kapazität des Vektors ist allerdings geringer.

2 Zielsetzung

Akute Myokarditiserkrankungen im Menschen können durch Coxsackievirus B3 hervorgerufen werden. Sie können einen chronischen Verlauf nehmen und letztlich zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen, eine der Ursachen für akutes Herzversagen und die Notwendigkeit für Herztransplantationen. Die Behandlung von CVB3-Infektionen in der Klinik erfolgt momentan größtenteils symptomatisch, eine spezifische gegen die CVB3-Infektion gerichtete Therapie ist derzeit nicht verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer effektiveren Behandlungsmethode gegen CVB3-Infektionen *in vitro* und *in vivo* durch kombinatorischen Einsatz verschiedener antiviraler Substanzen.

1. Die zwei viralen Vektoren zur regulierbaren Expression der löslichen Rezeptorvariante sCAR-Fc (AdG12) bzw. der gegen das CVB3-Genom gerichteten shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4 (scAAV-shRdRP2.4), sollten in Kombination in Zellkultur eingesetzt werden, um ein mögliches additives Potential beider Agenzien zu untersuchen.
2. Das auf AdG12 und scAAV-shRdRP2.4 beruhende Kombinationssystem sollte in ein CVB3-Maus-Myokarditismodell übertragen werden, um mögliche additive Effekte *in vivo* zu untersuchen und insbesondere die Wirkung auf die Herzfunktionsparameter zu analysieren. Dadurch sollte ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur therapeutischen Anwendung des Systems erfolgen.
3. Das Expressionssystem zur Expression der antiviralen siRNAs, siRdRP2 und siRdRP4, sollte von shRNAs auf amiRNAs umgestellt werden, um mögliche Nebenwirkungen der RNAi-Behandlung zu minimieren und mittels eines gewebespezifischen Polymerase II-Promoters eine herzspezifische Expression *in vivo* zu ermöglichen.
4. Die Expressionskassetten für sCAR-Fc und die neu gestalteten amiRNAs sollten auf einem scAAV-Vektor vereint werden, um die klinische Anwendung der CVB3-Kombinationstherapie zu vereinfachen.

3 Material

3.1 Geräte

Autoklav Laboklav MV80	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss,D
Bakterienschüttler Innova 42 Incubator	New Brunswick Scientific, St. Albans, GB
Beatmungsgerät für Nager Typ 7025	UgoBasile, Comerio, VA, IT
Blotapparatur Semi-Dry Electroblotter SEDEC	Peqlab, Erlangen, D
CO ₂ -Inkubator HERAcell 240i	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
CO ₂ -Inkubator MCO-20A1c	Sanyo, München, D
Elektrophoreseeinheit Mini Protean Tetra	BioRad, München, D
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 Axio	Zeiss, Berlin, D
Geldokumentation UV Solo TS	Biometra-Analytik Jena, Jena, D
Luminometer Lumat LB9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
Mikroplattenreader Sunrise Basic	Tecan, Männedorf, CH
Mikroskop Primo Vert	Zeiss, Berlin, D
Narkosegerät Univentor 400	Univentor, Zejtun, MLT
Operationslicht Schott KL 1500	Schott AG, Mainz, D
Operationsmikroskop LEICA MZ 125	Leica, Solms, D
PCR Thermocycler T Personal	Biometra, Göttingen, D
Realtime PCR Thermal Cycler CFX96™ C1000	BioRad, München, D
Sterilbank MSC Advantage 1.8	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Sterilbank MSC 2020 1.2	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Spektrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
Thermomixer Comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
UltraTurrax T25basic	IKA Labortechnik, Berlin, D
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ultrazentrifugenrotor Typ 70Ti	Beckman Coulter, Krefeld, D
Western Blot & Gel Imaging System, ChemiDoc MP	BioRad, München, D
Zentrifuge Sigma 3-18K	Sigma, Osterode am Harz, D
Zentrifuge Sigma 3-16PK	Sigma, Osterode am Harz, D

MATERIAL

3.2 Chemikalien

Standardchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Greiner Bio-One (Essen, Deutschland), Life Technologies (Darmstadt, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland) oder Roche (Mannheim, Deutschland). Die Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von der Firma PAA Laboratories (Coelbe, Deutschland) oder von Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

3.3 Molekularbiologische Kits und Reagenziensysteme

Dual-Luciferase® Assay	Promega (Mannheim, D)
Gelextraktion	Invisorb® Fragment CleanUp (Stratec, Berlin, D)
IgG-Nachweis	Hum. IgG ELISA (Bethyl Lab Inc., Montgomery, AL, USA)
PCR-Aufreinigung	Invisorb® Fragment CleanUp (Stratec, Berlin, D)
Plasmidisolierung	Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (Stratec, Berlin, D)
	Nucleobond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren, D)
	EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D)
	EndoFree® Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden, D)
Proteinbestimmung	BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA)
qPCR Mastermix	TaqMan Gene Expression Master Mix (2x) (Life Technologies, Darmstadt, D)
	SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio Rad, München, D)
Reverse Transkription	RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
RNA-Isolation	TRIzol® Reagent (Life Technologies, Darmstadt, D)
Transfektionsreagenzien	Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, Darmstadt, D)
	Polyethylenimin (Polysciences, Eppelheim, D)
Western Blot Substrat	Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
Zellviabilitätsassay	Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Mannheim, D)

MATERIAL

3.4 Enzyme

Alle Enzyme wurden entsprechend den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern und den empfohlenen Mengen eingesetzt.

Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Benzonase	Merck, Darmstadt, D
Proteinase K	Boehringer, Mannheim, D
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, Mannheim, D
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt/ Main, D
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim, D

3.5 Plasmide

Reporterplasmide

Die hier verwendeten und in Tabelle 3.1 aufgeführten Reporterplasmide stellen ein Indikatorsystem zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit von siRNAs, shRNAs und amiRNAs dar. Die Effizienz der RNAi-auslösenden Substanz kann dabei ohne den Einsatz des eigentlich zu inhibierenden Virus (Coxsackievirus B3) qualitativ und quantitativ ermittelt werden.

Tabelle 3.1: Verwendete Reporterplasmide und deren Funktion.

Name	Funktion
psiCheckII-RdRP	Reporterplasmid für den Dual Luciferase Assay
pcDNA3.1/NT-GFP-RdRP	Reporterplasmid für den Western Blot
pcDNA3.1/NT-GFP-RdRP (T→C Mutation an Bindungsstelle der siRdRP2)	Reporterplasmid für den Western Blot, wobei die Funktion von siRdRP4 einzeln nachgewiesen wird
pcDNA3.1/NT-GFP-RdRP (A→T Mutation an Bindungsstelle der siRdRP4)	Reporterplasmid für den Western Blot, wobei die Funktion von siRdRP2 einzeln nachgewiesen wird

MATERIAL

AAV-Basisplasmide

AAV-Basisplasmide, die auch als Shuttleplasmide bezeichnet werden, bilden die Grundlage für die Konstruktion Adeno-assoziiierter Virusvektoren (AAV-Vektoren). Sie enthalten die Sequenz, die später durch den viralen Vektor exprimiert werden soll, umgeben von den Flankierungssequenzen des AAV2-Virusgenoms. Tabelle 3.2 zeigt die in dieser Dissertation verwendeten AAV-Shuttleplasmide sowie die entscheidenden Elemente ihrer Expressionskassetten.

Tabelle 3.2: Verwendete AAV-Shuttleplasmide.

Name	Größe des Inserts einschließlich ITRs	Expressionskassette
pdAAV-shRdRP2.4	2283 bp	U6shRdRP2-U6shRdRP4
pdAAV-shGFP	1882 bp	U6shGFP
pdAAV-GFP	2243 bp	CMV-GFP-synPolyA
pdAAV-shRdRP2.4(neu)	1599 bp	U6shRdRP2-U6shRdRP4
pdAAV-shGFP-shLuc	1596 bp	U6shGFP-U6shLuc
pdAAV-amiRdRP2.4	1591 bp	MLC260-amiRdRP2-amiRdRP4-synPolyA
pdAAV-amiLuc-amiGFP	1591 bp	MLC260-amiLuc-amiGFP-synPolyA
pdAAV-sCAR-Fc-amiRdRP2	2509 bp	CMV-sCAR-Fc-amiRdRP2-synPolyA
pdAAV-sCAR-Fc-amiLuc	2509 bp	CMV-sCAR-Fc-amiLuc-synPolyA
pdAAV-sCAR _{trunc} -amiRdRP2	2509 bp	CMV-sCAR _{trunc} -amiRdRP2-synPolyA
pdAAV-sCAR _{trunc} -amiLuc	2509 bp	CMV-sCAR _{trunc} -amiLuc-synPolyA

Die in dieser Arbeit verwendeten Reporterplasmide lagen bereits zu Beginn des Projektes vor. Ihre Identität wurde erneut durch Testverdaus und Sequenzierungen bestätigt. Die AAV-Basisplasmide zur Untersuchung additiver Effekte sowie Vorstufen der AAV-Basisplasmide zum Vergleich antiviraler shRNAs mit amiRNAs wurden durch unsere Arbeitsgruppe (Dr. Henry Fechner) zur Verfügung gestellt. Ihre Sequenz wurde durch Testverdaus und Sequenzierungen bestätigt.

3.6 Virale Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl ein adenoviraler Vektor (AdV) als auch Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV-Vektoren) verwendet. Für *in vitro* Experimente wurden AAV-Vektoren vom Serotyp 2 benutzt, während für *in vivo* Versuche der Serotyp 9 angewandt wurde. Die folgende Tabelle 3.3 zeigt eine Aufstellung aller verwendeter viraler Vektoren.

Tabelle 3.3: Liste der verwendeten viralen Vektoren einschließlich deren Funktion.

Name des Vektors	Expressionskassette	Vektortyp
AdG12	Dox-regulierbare Expression von sCAR-Fc	AdV
scAAV-shRdRP2.4	U6-Promoter-gesteuerte Expression von shRdRP2 und shRdRP4	AAV-Vektor
scAAV-shGFP	U6-Promoter-gesteuerte Expression von shGFP	AAV-Vektor
scAAV-GFP	CMV-Promoter-gesteuerte Expression von GFP, zusätzliche Expressionskassette für U6-Promoter-gesteuerte Expression von Kontroll shRNA	AAV-Vektor
scAAV-shRdRP2.4(neu)	U6-Promoter-gesteuerte Expression von shRdRP2 und shRdRP4; im Vergleich zu scAAV-shRdRP2.4 wurde eine Stuffersequenz entfernt	AAV-Vektor
scAAV-shGFP-shLuc	U6-Promoter-gesteuerte Expression von shGFP und shLuc	AAV-Vektor
scAAV-amiRdRP2.4	MLC260-Promoter-gesteuerte Expression von amiRdRP2 und amiRdRP4	AAV-Vektor
scAAV-amiGFP-amiLuc	MLC260-Promoter-gesteuerte Expression von amiGFP und amiLuc	AAV-Vektor
scAAV-sCAR-Fc-amiRdRP2	CMV-Promoter-gesteuerte Expression von sCAR-Fc und amiRdRP2	AAV-Vektor
scAAV-sCAR-Fc-amiLuc	CMV-Promoter-gesteuerte Expression von sCAR-Fc und amiLuc	AAV-Vektor
scAAV-sCAR _{trunc} -amiRdRP2	CMV-Promoter-gesteuerte Expression einer trunkierten Version von sCAR-Fc und amiRdRP2	AAV-Vektor
scAAV-sCAR _{trunc} -amiLuc	CMV-Promoter-gesteuerte Expression einer trunkierten Version von sCAR-Fc und amiLuc	AAV-Vektor

3.7 Oligonukleotide

Primer und Sonden wurden von den Firmen Tib Molbiol (Berlin, D) und Life Technologies (Darmstadt, D) bezogen. Die siRdRP2, welche gegen CVB3 gerichtet ist, wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) erworben. Die Kontroll-siRNA, welche keine Homologien zum menschlichen Genom aufweist, stammt von der Firma Qiagen (Hilden, D).

Name, Sequenz sowie Funktion der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide können der folgenden Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Verwendete Oligonukleotide und deren Funktion.

Name	Sequenz in 5' - 3' Orientierung	Funktion
stemloop-siRdRP2	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA ACT AAG G	stemloop Primer für RT der siRdRP2
stemloop-siRdRP4	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACA AGT ACA G	stemloop Primer für RT der siRdRP4
siRdRP2 fw	GGC GCG AAC TTT GTT AGG T	siRNA-Quantifizierung
siRdRP2-probe	6'FAM-TCG CAC CAG AGC CAA CAA CTA AGG-BBQ	
siRdRP4 rev	GGC GCG GTA ATG TTT ATC C	
siRdRP4-probe	6'FAM-TCG CAC CAG AGC CAA CAA GTA CAG-BBQ	
universal loop rev	GTG CAG GGT CCG AGG T	
18 S rRNA fw	CGC GGT TCT ATT TTG TTG GT	18 S rRNA-Quantifizierung
18 S rRNA rev	AGT CGG CAT CGT TTA TGG TC	
CVB3 fw	CCC TGA ATG CGG CTA ATC C	CVB3-Quantifizierung
CVB3 rev	ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA	
CVB3-probe	5'FAM-TGC AGC GGA ACC G-MGB	
CMV fw	TGC CCA GTA CAT GAC CTT ATG G	AAV-Quantifizierung
CMV rev	GAA ATC CCC GTG AGT CAA ACC	
CMV enhancer-383T	6'FAM-AGT CAT CGC TAT TAC CAT GG-MGB	
AAV-ITR fw	GGA ACC CCT AGT GAT GGA GTT	AAV-Quantifizierung
AAV-ITR rev	CGG CCT CAG TGA GCG A	
AAV2-ITR probe	6'FAM-CAC TCC CTC TCT GCG CGC TCG-BBQ	

MATERIAL

sCAR-mut fw	AGA TCG AAT TCG ATG GCC CTG CTG CTG TGA TTC GTG CTG	Mutations-PCR sCAR-Fc
sCAR-mut rev	GTC TAC GCG TTC ACT TGC CAG GGC TCA G	
siRdRP2 AS	AAC UUU GUU AGG UCC UUA G [TT]	siRNA(2) gegen die RdRP von CVB3
siRdRP4 AS	GUA AUG UUU AUC CCU GUA C [TT]	siRNA(4) gegen die RdRP von CVB3
siKtrl	ACG UGA CAC GUU CGG AGA A [TT]	Kontroll siRNA

3.8 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- *E. coli* XL-10 Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

3.9 Medien für die Kultivierung von Bakterien

- LB-Medium
 - 1 % w/v Bacto-Trypton
 - 1 % w/v NaCl
 - 0,5 % w/v Hefeextrakt

Das Medium wurde unmittelbar nach der Herstellung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Selektion von *E. coli*, welche Plasmide mit einem Selektionsmarker (Ampizillin- oder Kanamycin-Resistenz) enthielten, wurde dem Medium 100 µg/ml Ampizillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

- LB-Agar
 - LB-Medium mit 1,5 % w/v Agar

3.10 Puffer für die Molekularbiologie

- 10-fach TBE-Rotiphorese®-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, D): 1 M Tris, 900 mM Borsäure, 10 mM EDTA
- 50-fach TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Acetat, 0,05 M EDTA
- Agarosegelelektrophorese-Laufpuffer: 1-fach TBE oder 1-fach TAE
- DNA-Ladepuffer: 6-fach Gel Loading Dye Blue (NEB, Frankfurt/ Main, D)

MATERIAL

3.11 Molekulargewichts- und Größenmarker

- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Quick-Load™ 1 kb DNA Ladder (NEB, Ipswich, MA, USA)
- Quick-Load™ 100 bp DNA Ladder (NEB, Ipswich, MA, USA)

3.12 Real-time PCR-Assays

- Mouse IL-6: Mm00446190_m1, Life Technologies, Darmstadt, D
- Mouse IFN- γ : Mm00801778_m1, Life Technologies, Darmstadt, D
- Mouse TNF- α : Mm0043258_m1, Life Technologies, Darmstadt, D

3.13 Lösungen für den Dual-Luciferase Assay nach Hampf und Gossen (131)

- Substrat für die Firefly-Luciferase: 100 mM Tris-HCl, 25 mM DTT, 15 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 1 mM ATP, 0,2 mM Coenzyme A, 200 μ M Luciferin (pH 8,0)
Dabei wurde ein Premix aus Tris-HCl, MgSO₄ und EDTA hergestellt. Die Zugabe der restlichen Zutaten erfolgte direkt am Messtag. Die so hergestellte Lösung wurde dann bei -20 °C gelagert und maximal 5 Mal wieder aufgetaut und eingefroren.
- Substrat für die Renilla-Luciferase: 500 mM NaCl, 500 mM Na₂SO₄, 25 mM Na₄PPi, 15 mM EDTA, 10 mM NaAc, 50 μ M APMBT, 4 μ M Coelenterazin
Der Premix dieser Substratlösung enthielt NaCl, Na₂SO₄, EDTA und NaAc. Am Messtag wurde diesem Mix zuerst Na₄PPi in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Anschließend wurde eine Mischung aus APMBT und Coelenterazin hergestellt, die dann abschließend zur Substratlösung gegeben wurde. Die Lagerung erfolgte erneut bei -20 °C.

3.14 Lösungen für den Iodixanol-Gradienten

- 60 % Iodixanol-Lösung (Opti Prep Density Gradient Medium, Sigma-Aldrich, München, D)
- PBS-MK: 1-fach PBS, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂
- 5 M NaCl
- 0,5 % Phenolrot in PBS-MK

MATERIAL

- Zusammensetzung 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	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

3.15 Lösungen für die Fällung Adeno-assoziiierter Virusvektoren aus Zellkulturüberständen

- NaCl/ Polyethylenglycol-Lösung: 1,86 M NaCl, 24 % PEG
- NaCl/ Hepes-Lösung: 150 mM NaCl, 50 mM Hepes, 25 mM EDTA
- 2,5 M CaCl₂ Lösung

3.16 Puffer und Lösungen für den Western Blot

- Lysispuffer: 62,5 mM Tris (pH 6,8; einstellen mit HCl), 2 % w/v SDS, 10 % Glycerol, 50 mM DTT, 0,01 % w/v Bromphenolblau
- 4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris (pH 6,8; einstellen mit HCl)
- 4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris (pH 8,8; einstellen mit HCl)
- 30 % AMBA: Acrylamid-/ Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 (Carl Roth, Karlsruhe, D)
- SDS-Laufpuffer: 1:10 Verdünnung von 10-fach Rotiphorese® SDS-PAGE (Carl Roth, Karlsruhe, D)
- SemiDry Blot-Puffer: 47,9 mM Tris, 38,9 mM Glycin, 0,038 % w/v SDS, 20 % Methanol
- TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7,5; einstellen mit HCl)
- TTBS: TBS + 0,1 % Tween 20
- Block-Puffer: 5 % Magermilchpulver in TBS
- Ponceau-Rot: 0,2 % Ponceau S, 3 % Essigsäure

MATERIAL

- Polyacrylamid-Gele:

	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	3,3 ml	3,1 ml
4-fach Trenngelpuffer	2,5 ml	-
4-fach Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
30 % AMBA	4,2 ml	0,65 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
10 % APS	40 µl	100 µl
TEMED	12 µl	10 µl

3.17 Antikörper für den Western Blot

Primärantikörper

- α GFP: Antikörper gegen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus Kaninchen (Anti-GFP, rabbit serum, polyclonal; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), eingesetzte Verdünnung: 1:5000
- α Actin: Antikörper gegen Actin aus der Maus (Anti-Actin, Clone C4, Millipore, Billerica, MA, USA), eingesetzte Verdünnung: 1:5000

Sekundärantikörper

- GAM-HRP: ImunoPure Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase-conjugated (Pierce/ Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, D), Stammlösung 400 µg/ml, eingesetzte Verdünnung: 1:200.000
- GAR-HRP: ImunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-conjugated (Pierce/ Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, D), Stammlösung 400 µg/ml, eingesetzte Verdünnung: 1:200.000

3.18 Zusammensetzung des agarhaltigen Mediums für den Plaque Assay

- Eagle-Overlay: 9,61 g MEM Eagle Pulver (Life Technologies, Darmstadt, D), 0,5 ml Nystatin (Life Technologies, Darmstadt, D), 0,1 ml Penicillin 1 Mio Einheiten (Grünenthal, Aachen, D), 0,1 g Streptomycin (Sigma, München, D), 1,7 g Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt, D); alles in 750 ml ddH₂O lösen
- Lösung A: 0,32 g Agar in 10 ml ddH₂O lösen; mittels Bunsenbrenner erhitzen, für 15 min kochen, bis keine Schlieren mehr vorhanden sind

MATERIAL

- Lösung B: 30 ml Eagle-Overlay mit 4 ml FKS mischen; Lösung im Wasserbad bei 41,5 °C warm halten
- Overlay-Medium: Lösung B in Lösung A unter Schwenken kippen und das Overlay-Medium bis zur Verwendung bei 41,5 °C warm halten

3.19 Lösungen und Antikörper für die Immunhistochemie

- Blockpuffer: 50 % Ziegenserum in TBS
- TBS-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6 (eingestellt mit HCl)
- α GFP Primärantikörper: polyclonaler Anti-GFP-Antikörper aus dem Hasen, (ab290, Abcam, Cambridge, GB), eingesetzte Verdünnung 1:15.000
- GAR-IgG Sekundärantikörper: polyclonaler Antikörper aus der Ziege, (BA1000, Vector Laboratories, Peterborough, GB), eingesetzte Verdünnung 1:200

3.20 Zelllinien

- HEK293T: Human embryonal kidney, ACC 305 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, D)
- HeLa: Human cervix carcinoma, ACC57 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, D)
- HeLa-Wis: Human cervix carcinoma, Wisconsin strain (Dr. R. Rueckert, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)

3.21 Medien für die Zellkultur

Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien kann der folgenden Tabelle 3.5 entnommen werden. Wenn die Zellen für Transfektionen verwendet werden sollten, wurden dieselben Medien allerdings ohne Zugabe der Antibiotika Penicillin und Streptomycin verwendet. Für Infektionsversuche wurde serumfreies Medium verwendet.

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Zelllinien mit dazugehöriger Mediumszusammensetzung.

Zelllinie	Zusammensetzung des Mediums
HEK 293T	500 ml DMEM (1 g/l Glucose) 10 % FKS Glucose (4,5 mg/ml) L-Glutamin (2 mM) 1x nicht-essentielle Aminosäuren Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
HeLa	500 ml DMEM (1 g/l Glucose) 10 % FKS L-Glutamin (2 mM) 1x nicht-essentielle Aminosäuren Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
HeLa-Wis	500 ml MEM (1 g/l Glucose) 5 % FKS 1x nicht-essentielle Aminosäuren 2 % Hepes Puffer Gentamycin (50µg/ml) Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

4.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen wurde eine 5 ml Kultur eines *E. coli* Stocks in LB-Medium angesetzt und diese über Nacht oder für mindestens 12 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 250 ml frisches LB-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und so lange bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis die Kultur eine OD von 0,5 erreicht hatte. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlten Zentrifugengefäßen bei 3000 g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 ml einer eiskalten 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und erneut bei 3000 g und 0 °C für 5 min zentrifugiert. Es folgte eine weitere Resuspendierung in 50 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung. Die Lösung wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Das dann entstandene Bakterienzellpellet wurde in 5 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung, welche 14 % Glycerin enthielt, vorsichtig resuspendiert. Jeweils 100 µl der Suspension wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und umgehend bei -80 °C eingefroren und gelagert. Anschließend wurde durch Retransformation eines beliebigen vorhandenen Plasmids überprüft, ob die Zellen durch die Behandlung die benötigte Kompetenz aufwiesen.

4.1.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Für die Transformation der zuvor hergestellten chemisch-kompetenten Zellen wurde ein Aliquot dieser für 30 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 15 µl eines Ligationsansatzes mit diesem vermischt. Es folgte die Transformation durch Hitzeschock. Hierfür wurde die Bakterien-DNA-Mischung für 50 sec bei 42 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend umgehend auf Eis für 1 min gekühlt. Nach Zugabe von 800 µl auf 37 °C vorgewärmten LB-Mediums wurde der Transformationsmix für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend auf Selektionsplatten (LB-Agar mit 100 µg/ml Ampizillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Diese wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde durch Auszählen der entstandenen Bakterienkolonien beurteilt.

4.2 Klonierungen

Die zur Klonierung von DNA-Fragmenten nötigen Vektor-Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II (NEB, Frankfurt am Main, D) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Dauer der Restriktion lag dabei konstant bei 45 min. Außerdem erfolgte eine Dephosphorilierung des geschnittenen Vektors mit alkalischer Phosphatase zur Vermeidung von Religationen bei 37 °C für 15 min. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden die Proben anschließend für 5 min auf 70 °C erhitzt, bevor sie per Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt wurden. Die Extraktion der für die Ligation benötigten Fragmente erfolgte mittels Gelextraktionskit. Um den Erfolg der Gelextraktion zu überprüfen, wurden die gewonnenen Fragmente erneut im Agarosegel hinsichtlich ihrer Größe überprüft. Außerdem erfolgte eine Abschätzung der Konzentrationsverhältnisse zwischen Vektor und Insert anhand dieses Agarosegels. Die extrahierten Fragmente wurden anschließend bei Raumtemperatur für 2 h ligiert. Dabei wurde das Insert im Vergleich zum geschnittenen Vektor in starkem Überschuss eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde abschließend in Bakterienzellen transformiert und die entstandenen Klone wurden mittels Minipräparation und Testverdau überprüft. Außerdem wurden die im Testverdau positiven Klone durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma LGC Genomics (Berlin, D). Wurden die zur Klonierung verwendeten Inserts durch Gensynthese gewonnen, so wurde diese von der Firma Geneart (Life Technologies, Darmstadt, D) durchgeführt. Sämtliche für die Klonierung relevanten Arbeitsschritte erfolgten entsprechend den in den Kits angegebenen Herstellerangaben.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben

Die Konzentration isolierter DNA- und RNA-Proben wurde mit Hilfe des Nanodrop 2000 Spectrophotometers bestimmt. Dabei wurde die Absorption der zu untersuchenden Probe bei 260 nm gemessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration ergibt sich aus der angenäherten Formel $\text{Absorption} = 1 \triangleq 50 \text{ ng}/\mu\text{l DNA}$. Für RNA-Proben werden entsprechend 40 ng/ μl angenommen. Zusätzlich wurde mit dem Nanodrop die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Probe beurteilt. Dafür wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm geteilt durch die Absorption bei 230 nm gemessen. Dieser sollte für reine Nukleinsäureproben größer als 2,0 sein. Werte unterhalb dieser Grenze deuten auf eine Verunreinigung der Probe mit organischen

METHODEN

Substanzen wie zum Beispiel Chloroform hin. Diese können für anschließende Anwendungen wie Transfektionen oder PCRs hinderlich sein. Des Weiteren wurde der Quotient aus Absorption bei 260 nm geteilt durch die Absorption bei 280 nm gemessen. Dieser sollte für reine DNA-Proben zwischen 1,8 und 2,0 liegen und für reine RNA-Proben größer als 2,0 sein. Werte außerhalb der Bereiche deuten auf eine Verunreinigung zum Beispiel mit der jeweils anderen Nukleinsäure hin und müssen bei folgenden Anwendungen und der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab, wurde eine 2 ml Übernachtkultur des entsprechenden Bakterienstocks oder eines Klonen angelegt. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde das Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit (Strattec, Berlin, D) entsprechend den Herstellerinformationen verwendet. Die Elution erfolgte dabei allerdings mit 80 µl ddH₂O und nicht mit dem im Kit enthaltenen TE-Puffer. Zur Transfektion wurden größere Mengen des jeweiligen Plasmides in einem höheren Reinheitsgrad benötigt. Daher wurden Midi-Präparationen mit Hilfe des Nucleo Bond® Xtra Midi Kits (Macherey-Nagel, Düren, D) durchgeführt. Das Anfangsvolumen der Bakterienkulturen betrug in diesem Fall 100 ml. Die abschließende Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 500 µl ddH₂O. Die zur AAV-Vektor-Produktion benötigten Plasmide sollten möglichst endotoxinfrei sein. Daher wurden diese mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi bzw. Mega Kits (Qiagen, Hilden, D) aus einem Anfangskulturvolumen von 200 bzw. 750 ml isoliert. Die DNA-Elution erfolgte in 1 ml ddH₂O für die Maxi-Präparationen und 2 ml ddH₂O für den Mega-Ansatz.

4.3.3 Isolation von RNA aus Zellen oder Geweben

Die Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen oder Geweben erfolgte mit Hilfe des TRIzol® Reagenz entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurde zur Isolation von RNA im 24- und 12-Well-Format mit 500 µl Trizol je Well gearbeitet, bei 6-Well-Platten mit 1 ml. Zur Isolation von RNA aus Gewebestücken wurde unabhängig von Art und Größe des Gewebes mit 1 ml Trizol je Probe gearbeitet. Die Zellyse erfolgte bei adhärennten Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Trizol-Zell-Gemisches im Zellkulturgefäß. Gewebestücke wurden mit Plastik-Pistillen so lange in der Trizol-Lösung zerkleinert, bis ein homogenes Zellysat vorlag. Nach Isolation, Fällung und Waschen der RNA wurde diese abschließend in DEPC-H₂O aufgenommen. Das Aufnahme-Volumen variierte je nach Größe des Ausgangsansatzes von

METHODEN

30 µl bis 60 µl. Es folgte die Quantifizierung der gewonnenen RNA am Nanodrop und Lagerung bei -80 °C.

4.3.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) mittels Random-Hexamer-Primern

Mittels reverser Transkription (RT) kann ausgehend von einer RNA-Matrize, ein komplementärer DNA-Strang hergestellt werden. Dafür wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Je Ansatz wurden 1,5 µg der isolierten RNA als Ausgangsmaterial benutzt. Es wurden randomisierte Hexamer-Primer verwendet, da diese sowohl für alle enthaltenen mRNAs als auch die 18 S rRNA geeignet sind. Die RNA wurde mit dem Primer gemischt und auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation des Mixes für 5 min bei 65 °C, bevor die restlichen, für die RT benötigten Zutaten (reverse Transkriptase, RNase-Inhibitor, RT-Puffer, dNTPs) dazu gegeben wurden. Das Temperaturprofil der reversen Transkription beinhaltete einen 5-minütigen Schritt bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 42 °C und 5 min bei 70 °C. Die cDNA wurde bei -80 °C gelagert oder gleich mittels qPCR analysiert.

4.3.5 Real-time PCR zur Quantifizierung der 18 S rRNA-Expression

Zur Normierung sämtlicher real-time PCR-Daten wurde die Expressionsstärke der 18 S rRNA herangezogen. Dies gleicht DNA-Konzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Proben aus. Diese Methode ermöglicht es, eine Aussage zu treffen über die genauen Unterschiede in der Expressionsstärke eines beliebigen Targets (z. B.: des inflammatorischen Zytokins IL-6) zwischen 2 verschiedenen Proben. Zur Quantifizierung der 18 S rRNA-Expression wurde ein EvaGreen®-basierter real-time PCR-Assay verwendet. EvaGreen® ist eine Weiterentwicklung des Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und es somit ermöglicht, die Amplifikation des gewünschten Produktes in Echtzeit zu verfolgen. Der PCR-Ansatz enthielt 10 µl des SsoFast™ EvaGreen® Supermixes, je 0,45 µl der Primer 18 S rRNA fw (10 µM) bzw. 18 S rRNA rev (10 µM), 7,1 µl nukleasefreies Wasser und 2 µl cDNA (siehe Abschnitt 4.3.4). Das Temperaturprofil der Amplifikation bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 30 sec bei 95 °C und 40 Zyklen bestehend aus 5 sec bei 95 °C und 5 sec bei 55 °C. Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde abschließend durch eine Schmelzkurvenanalyse bewertet. Dabei wurde die Temperatur nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 10 sec bei 95 °C schnell auf 60 °C abgekühlt und dann stufenweise erneut auf 95 °C erhöht. Die Temperaturerhöhungsrate lag dabei bei 0,5 °C alle 5 sec. Das

METHODEN

spezifische PCR-Produkt der 18 S rRNA zeichnet sich hierbei durch den typischen Schmelzpunkt von 84 °C aus.

4.3.6 Real-time PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression

Die real-time PCR wurde angewendet, um die Expression inflammatorischer Zytokine (IL-6, IFN- γ , TNF- α) im kardialen Gewebe von Mäusen zu ermitteln. Dafür wurden Genexpressionsassays und der TaqMan Gene Expression Master Mix von Life Technologies (Darmstadt, D) eingesetzt. Die verwendeten Assays sind alle Exon-überspannend, weshalb auf einen DNase-Verdau vor der cDNA-Synthese verzichtet werden konnte. Der Mastermix beinhaltet die für die Amplifikation nötigen dNTPs, die Polymerase sowie den Reaktionspuffer. Die Expressionsassays beinhalten ein für das jeweilige Target spezifisches Primer-Sonden-Set. Der Gesamtansatz setzte sich zusammen aus 5 μ l TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5 μ l des jeweiligen Expressionsassays (siehe 3.12), 2 μ l der zuvor generierten cDNA und 2,5 μ l nukleasefreiem Wasser. Die Amplifikation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben und beinhaltete einen initialen 2-min-Schritt bei 50 °C, gefolgt von 10 min bei 95 °C und 40 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Die erhaltene mRNA-Expression wurde auf die Expression der 18 S rRNA normalisiert.

4.3.7 Real-time PCR zur Quantifizierung von CVB3-Genomen

Zur Quantifizierung von CVB3-Genomen im kardialen Gewebe nach *in vivo* CVB3-Infektion, wurde ein TaqMan-basierter real-time PCR-Assay verwendet. Der PCR-Ansatz bestand dabei aus 5 μ l des TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,4 μ l des Primers CVB3 fw (5 μ M), 1,2 μ l des Primers CVB3 rev (5 μ M), 0,4 μ l der Sonde CVB3-*probe* (5 μ M) sowie 1 μ l nukleasefreiem Wasser. Diesem Ansatz wurden 2 μ l der zuvor hergestellten cDNA (siehe Abschnitt 4.3.4) hinzugefügt. Das Temperaturprofil der anschließenden PCR bestand aus 2 min bei 50 °C, 10 min bei 95 °C und 40 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Die Normalisierung der erhaltenen C_T-Werte erfolgte erneut auf die 18 S rRNA. Der Assay zum Nachweis von CVB3-Genomen wurde entwickelt und zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Lassner des IKDT (Institut Kardiale Diagnostik und Therapie GmbH), Berlin.

METHODEN

4.3.8 Nachweis von siRNAs durch stemloop RT-PCR und real-time PCR

Um die durch Plasmide oder Vektoren exprimierten und prozessierten siRNAs (siRdRP2 und siRdRP4) nachzuweisen, mussten diese mittels stemloop RT-PCR zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Für diesen Schritt können nicht wie beim Umschreiben langer mRNAs oder der 18 S rRNA randomisierte Hexamerprimer verwendet werden, da die siRNAs mit einer Länge von nur 21 Nukleotiden dafür zu kurz sind. Alternativ kamen stemloop Primer zum Einsatz, welche aus einem kurzen Basenpaarstamm, sowie einer Loop-Region bestehen. Am 3' Ende des Primers befinden sich 8 ungepaart vorliegende Basen, welche zum 3' Ende des Antisense-Stranges der nachzuweisenden siRNA komplementär sind. So wird ein Binden des stemloop Primers an die Ziel-siRNA während der reversen Transkription gewährleistet. Der stemloop Primer wird im Verlauf dieser dann in 5' - 3' Richtung komplementär zur siRNA verlängert. Anschließend kann das Produkt der stemloop RT-PCR mittels quantitativer real-time PCR nachgewiesen werden, wobei ein siRNA-spezifischer Vorwärtsprimer, eine spezifische TaqMan-Sonde und ein für den Loop spezifischer, universeller Rückwärtsprimer zum Einsatz kommen. Abbildung 4.1 zeigt schematisch den Ablauf der quantitativen stemloop RT-PCR zum siRNA-Nachweis. Der Nachweis von siRNAs durch stemloop RT-PCR und real-time PCR geht zurück auf die Gruppe um Chen et al. und wurde erstmals im Jahr 2005 beschrieben (132).

Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Dabei wurden zunächst 1,5 µg RNA mit 1 µl des stemloop Primers (1 µM) (stemloop-siRdRP2 bzw. stemloop-siRdRP4) gemischt und diese Mischung auf 12 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 65 °C, bevor 4 µl des 5-fach RT-Puffers, 1 µl RiboLock, 2 µl dNTPs und 1 µl reverse Transkriptase dem Ansatz zugesetzt wurden. Zur Umschreibung in cDNA wurde ein stufenweises Temperaturprofil bestehend aus 30 min bei 16 °C, 60 Zyklen von 30 sec bei 30 °C, 30 sec bei 42 °C und 1 sec bei 50 °C und einem abschließenden Schritt von 5 min bei 85 °C angewendet.

Für die TaqMan real-time PCR wurden 10 µl des TaqMan Gene Expression Master Mix mit 0,45 µl des Vorwärtsprimers (10 µM), 0,45 µl des Rückwärtsprimers (10 µM) und 0,45 µl der spezifischen Sonde (10 µM) vermischt. Zum Nachweis der siRdRP2 wurden dabei die Primer siRdRP2 fw, universal loop rev sowie die Sonde siRdRP2-*probe* eingesetzt. Im Falle der siRdRP4 wurden die Primer siRdRP4 fw, universal loop rev sowie die Sonde siRdRP4-*probe* verwendet. Zusätzlich wurden 6,65 µl nukleasefreies Wasser und 2 µl der zuvor über stemloop Primer hergestellten cDNA in den Mix gegeben. Die Amplifikation der DNA erfolgte für 2 min bei 50 °C, gefolgt von 10 min bei 95 °C und 40 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 55 °C. Die

METHODEN

Assays zum Nachweis von siRdRP2 und siRdRP4 mittels stemloop RT-PCR und TaqMan real-time PCR wurden durch Marcus Lindner im Rahmen seiner Studienarbeit etabliert.

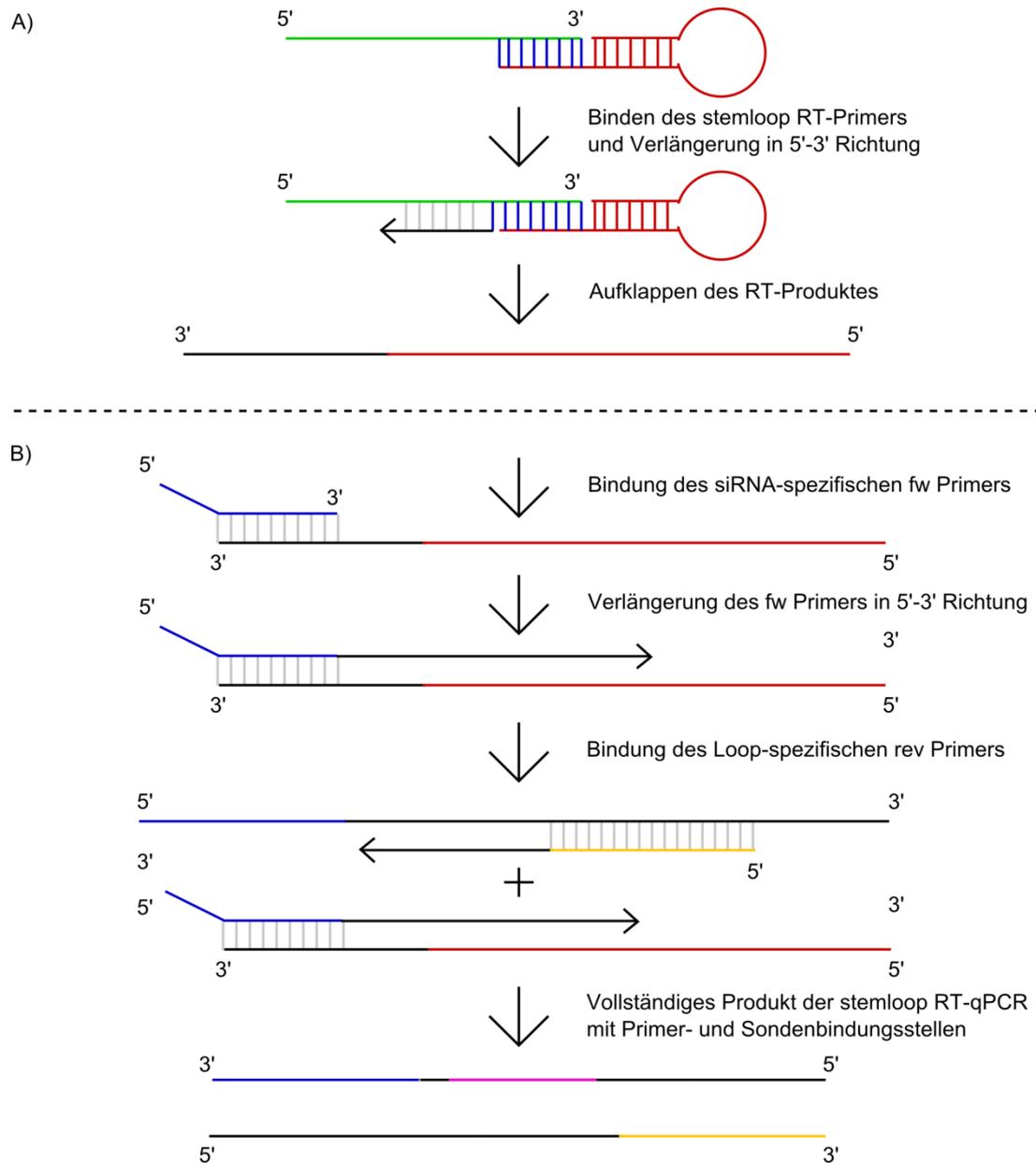


Abbildung 4.1: Schematischer Ablauf der quantitativen stemloop RT-PCR. (nach Varkonyi und Hellens, 2010, (133))

A) Ablauf der Reversen Transkription mit stemloop RT-Primer, grün: siRNA, rot: stemloop RT-Primer, blau: komplementäre Verbindung zwischen stemloop RT-Primer und dem 3' Ende der siRNA; **B)** Ablauf der real-time PCR zum Nachweis der siRNA, blau: siRNA-spezifischer Vorwärtsprimer, gelb: Loop-spezifischer Rückwärtsprimer, rosa: Bindungsstelle der TaqMan-Sonde.

METHODEN

4.3.9 Relative Quantifizierung zur Auswertung der real-time PCRs

Wurden Proben mehrerer verschiedener PCR-Läufe untereinander verglichen, so wurde zuerst der Hintergrundfluoreszenzwert zur Ermittlung des C_T -Wertes bei allen Läufen auf einen einheitlichen Wert angeglichen. Anschließend wurde der ermittelte C_T -Wert der zu untersuchenden mRNA (z. B. IL-6) mit dem dazugehörigen Referenz- C_T -Wert der 18 S rRNA ins Verhältnis gesetzt ($C_T \text{ mRNA} - C_T \text{ 18 S rRNA}$) und so der ΔC_T -Wert ermittelt. Die Expressionsstärke der mRNA relativ zur 18 S rRNA ergibt sich dann aus $2^{-\Delta C_T}$. Um den Expressionsunterschied zwischen 2 verschiedenen Proben zu ermitteln, wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ($= \Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$) berechnet. Der relative Expressionsunterschied zwischen Probe 1 und 2 konnte dann durch die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet werden (134).

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Western Blot

Im Western Blot werden Proteine aus einem Proteingel durch ein elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. Anschließend können diese spezifisch mittels Antikörper nachgewiesen werden. Der primäre Antikörper, welcher direkt gegen das Target-Protein gerichtet ist, wird nach erfolgter Bindung durch einen Sekundärantikörper gebunden, welcher den Fc-Teil des primären erkennt. Die Detektion der Bindung erfolgt anschließend über eine Enzym-Substrat-Reaktion, die durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym (z. B.: *Horseradishperoxidase*, HRP) ermöglicht wird.

Die zu analysierenden Zellkulturproben wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 35 μ l Lysispuffer je Well (24-Well-Platte) lysiert. Die initiale Denaturierung der Proteinproben erfolgte durch Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 min. Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte per Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Die Konzentration des Polyacrylamids hängt dabei von der Größe des zu detektierenden Proteins ab (12,5 % für GFP). Anschließend wurden die Proteine aus den Gelen auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Blotprozess erfolgte im *semidry*-Verfahren bei 70 mA je Gel für 70 min. Um den Erfolg des Blottens zu beurteilen, wurde die Membran für 5 min mit Ponceaurot gefärbt und anschließend mit H₂O gewaschen. Eine ungleichmäßige Verteilung der Proteinproben über den Blot oder das Vorhandensein von Luftblasen während des Blottens lassen sich so nachweisen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 %igem Block-Puffer inkubiert und mehrmals mit TTBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem in TTBS verdünntem Anti-GFP-Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Nach erneutem Waschen

METHODEN

wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h inkubiert, wiederum gewaschen und anschließend das Zielprotein (z. B.: GFP) über Chemilumineszenz nach Zugabe des ECL-Substrates detektiert. Zur Detektion des Referenzproteins Actin wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und dann mit dem in TTBS verdünnten Primärantikörper gegen Actin inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist analog zu der zur Detektion des primären Targets.

4.4.2 Dual-Luciferase Assay

Beim Dual-Luciferase Assay wird die relative Proteinmenge der Enzyme Renilla- und Fireflyluciferase in einer Zellkulturprobe anhand der Enzymaktivität der beiden Enzyme bestimmt. Beide Enzyme wandeln ihre jeweiligen Substrate unter Freisetzung von Licht um, welches mittels Luminometer direkt gemessen werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zur Messung der Luciferase-Aktivität sowohl das Dual-Luciferase® Assay Kit von Promega, als auch ein auf diesem Kit basierender, selbst hergestellter Assay nach Hampf und Gossen verwendet (131). Zu analysierende Zellkulturproben wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und dann je nach Größe des Zellkulturgefäßes mit 200 µl (für 24-Well-Platten) bis 1 ml Lysispuffer (für 6-Well-Platten) je Well lysiert. Die Platten wurden 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen der Proben konnten diese direkt im Luminometer analysiert werden. Dabei wurden jeweils 10 µl Probe unter Zugabe von jeweils 50 µl Substrat der beiden Luciferasen analysiert. Die Messzeit je Luciferase betrug 10 sec. Eventuell nötige Probenverdünnungen, um im messbaren Bereich des Luminometers zu bleiben, wurden mit Lysepuffer durchgeführt. Sämtliche Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

4.4.3 ELISA zum Nachweis von sCAR-Fc

Zum Nachweis des über AdG12 exprimierten sCAR-Fc wurde ein ELISA-Kit zur Detektion des Fc-Teils von humanem IgG entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die absolute Quantifizierung des in einer Probe enthaltenen sCAR-Fc erfolgt dabei über einen internen IgG-Standard. Der ELISA wurde sowohl zur Analyse von Zellkulturüberständen als auch Serum aus Mäusen verwendet. Die Hintergrundsignale bei der Analyse von Zellkulturüberständen stammten von Zellkulturmedium untransduzierter Zellen. Bei der Analyse von Serumproben aus Mäusen dienten die Signale untransduzierter, CVB3-infizierter Tiere als Hintergrund. Bei den ELISA-Experimenten der *in vivo* Versuchsreihe wurden leichte Abwandlungen am

METHODEN

empfohlenen Herstellerprotokoll vorgenommen. So erfolgte die Inkubation der Proben auf der Platte über Nacht bei 4 °C, anstelle von 1 h bei Raumtemperatur und die Plattenentwicklungszeit wurde, um ein besseres Auftrennen des Standards zu gewährleisten, von 15 min auf 1 h verlängert. Die Auswertung des ELISAs erfolgte mit Hilfe der Graph Pad Prism Software für nichtlineare Standardkurven durch nichtlineare Regression.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die Kultivierung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeter Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Zum Passagieren und Vereinzeln von Zellen wurde zuerst das verbrauchte Zellkulturmedium mittels Pasteurpipette und Vakuumpumpe aus dem Zellkulturgefäß entfernt. Die Zellen wurden mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsin/EDTA bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das zugegebene Trypsin/EDTA-Gemisch wurde durch serumhaltiges Medium inaktiviert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Menge an Zellen erneut in einem frischen Zellkulturgefäß ausgesät. Die Passagierung der Zellen erfolgte dabei zweimal wöchentlich.

4.5.2 Zellviabilitätsassay

Zur Messung der Zellviabilität in Zellkulturen wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) von Roche verwendet. Das Prinzip des Assays basiert auf der enzymatischen Umwandlung eines gelben Tetrazoliumsalzes (XTT) in einen orangenen Formazan-Farbstoff. Der dabei entstehende Farbumschlag wird photometrisch gemessen und korreliert direkt mit dem Anteil lebender Zellen in der untersuchten Kultur. Sämtliche Zellviabilitätsmessungen der vorliegenden Arbeit wurden im 96-Well-Maßstab durchgeführt. Dabei wurden 50 µl des fertig gemischten XTT-Substrates je Well direkt in das Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden anschließend 4 h lang kultiviert und der Farbumschlag durch Absorptionsmessung bei 450 nm gemessen. Sämtliche Messungen wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt. Als Referenzwert für die jeweiligen Messungen dienten die erhaltenen Absorptionswerte unbehandelter, nicht infizierter Zellen.

METHODEN

4.5.3 Transfektion

Das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu zwei verschiedene Reagenzien verwendet. Das kationische Liposomen-bildende Reagenz Lipofectamine® 2000 wurde zur Transfektion von siRNAs sowie zur Cotransfektion von Plasmiden mit siRNAs entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Wurden ausschließlich Plasmide transfiziert, so wurde das lineare Polymer Polyethylenimin (PEI) verwendet. Hierfür wurde 1 µl einer PEI-Lösung (2,58 mg PEI/ml) je µg zu transfizierender DNA in 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Die zu transfizierende DNA wurde ebenfalls in 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Anschließend wurde die PEI-Lösung tropfenweise in die DNA-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur für 25 min inkubiert. Das Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes lag dabei bei 10 % des Kulturvolumens im Well. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt und das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Vier bis acht Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel.

Die zu transfizierende DNA-Menge variierte je nach Größe des Zellkulturgefäßes. Bei 24-Well-Platten wurden 0,8 µg je Plasmid pro Well transfiziert. Für 12-Well-Platten betrug die zu transfizierende DNA-Menge 1 µg je Plasmid und Well.

4.5.4 Transduktion

Als Transduktion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen mit Hilfe von viralen Vektoren. Dafür wurden die Zellen in ihrem jeweiligen antibiotika-haltigem Medium ausgesät und unter Standardbedingungen für 8 bis 24 h kultiviert. Zur Transduktion wurden die viralen Vektoren in PBS so verdünnt, dass das Transduktionsvolumen mindestens 1 %, maximal jedoch 10 % des Kulturvolumens betrug. Die viralen Vektoren wurden dann direkt ins Medium gegeben und die Zellen weiter unter Standardbedingungen kultiviert.

4.6 Virologische Methoden

4.6.1 Anzucht von Coxsackievirus B3 für *in vitro* Versuche

Um eine ausreichend große Menge CVB3 für die *in vitro* Versuche herzustellen, wurde ein Aliquot eines vorrätigen CVB3-Ausgangsstock des Nancy-Stamms verwendet. Zur Virusanzucht wurden HeLa-Wis-Zellen in einer 175 cm² Zellkulturflasche so ausgesät, dass sie 24 h später

METHODEN

einen Konfluenzgrad von 95 % aufwiesen. Das Virusaliquot wurde mit serumfreiem Medium auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und anschließend auf den Zellrasen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach 30 min wurden weitere 20 ml serumhaltiges Medium auf die Zellen gegeben und diese wurden anschließend weiter im Brutschrank kultiviert. Das Fortschreiten der virusbedingten Zelllyse wurde stündlich im Mikroskop beurteilt. Je nach Ausgangskonzentration des verwendeten Virusaliquots wurde die vollständige Zelllyse 6 bis 8 h nach Beginn der Virusinokulation erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Zellkulturflasche mit dem darin enthaltenen Virus-Zelltrümmer-Gemisch bei -80 °C weggefroren. Am darauffolgenden Tag wurde die virusenthaltende Flasche wieder aufgetaut. Dieser Gefrier-Tau-Zyklus wurde zweimal wiederholt. Um einen möglichst vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, folgte die weitere Zerkleinerung der Viruslösung mit einem Zelmörser. Eine 30-minütige Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C entfernte die Zelltrümmer. Die virushaltigen Überstände wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Bevor die Viruspräparation für *in vitro* Versuchen benutzt werden konnte, wurde der CVB3-Titer mittels Plaque Assay im 6-Well-Format bestimmt. Die Bestimmung wurde zweimal jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.6.2 Bestimmung des CVB3-Titers virushaltiger Überstände durch Plaque Assay

Um die Konzentration infektiöser CVB3-Viruspartikel in einer unbekannt Probe zu ermitteln, wurden Plaque Assays durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Wis-Zellen so in Zellkulturgefäßen ausgesät, dass sie 24 h später einen konfluenten Zellrasen bildeten (2,5 x 10⁵ Zellen/Well bei 24-Well-Platten; 5 x 10⁵ Zellen/Well bei 12-Well-Platten; 10⁶ Zellen/Well bei 6-Well-Platten). Am darauffolgenden Tag wurde von der zu untersuchenden Probe eine dekadische Verdünnungsreihe in serumfreiem Medium angelegt. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, und diese wurden mit den virushaltigen Verdünnungsstufen für 30 min bei 37 °C inokuliert (300 µl Viruslösung/Well bei 24-Well-Platten; 500 µl Viruslösung/Well bei 12-Well-Platten; 1 ml Viruslösung/Well bei 6-Well-Platten). Anschließend wurde der Überstand erneut von den Zellen abgesaugt, und diese wurden sofort mit agarhaltigem, 41,5 °C warmen Medium (Eagle Overlay, siehe 3.18) überschichtet. Dabei wurden 500 µl je Well für eine 24-Well-Platte, 1 ml je Well für eine 12-Well-Platte und 2 ml Overlay je Well bei 6-Well-Platten verwendet. Zehn Minuten bei Raumtemperatur gewährleisteten ein Erkalten und Verfestigen des Overlays. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 48 bis 72 h. Im Anschluss wurden 500 µl einer Neutralrot enthaltenden PBS-

METHODEN

Lösung je Well einer 24-Well-Platte (1 ml bei 12-Well-Platten; 2 ml bei 6-Well-Platten) auf den Agar gegeben und die Platten für weitere 2,5 bis 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Färbelösung färbt intakte Zellen rot an, während lysierte Zellen ungefärbt, blass erscheinen. Nach Absaugen der Färbelösung konnten somit die Plaques im Zellrasen ausgezählt werden. Der endgültige Virustiter je ml (PFU/ml) ergibt sich dann aus der gezählten Plaquezahl multipliziert mit der Verdünnungsstufe und dem zusätzlichen Verdünnungsfaktor, welcher sich aus dem aufgetragenen Anfangsvolumen ergibt.

4.6.3 Bestimmung des CVB3-Titers virushaltiger Gewebe durch Plaque Assay

Um die Menge infektiöser Viruspartikel in einem Gewebestück zu bestimmen, wurde dieses in 1,5 ml serumfreien Medium aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines Ultraturrax Homogenisators zerkleinert, bis keine größeren Gewebeklumpen mehr erkennbar waren. Die Lösung wurde anschließend zum weiteren Aufschluss dreimal bei -80 °C eingefroren und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 g für 5 min, um die verbliebenen Zelltrümmer zu pelletieren. Der verbleibende virushaltige Überstand wurde dekadisch in serumfreiem Medium verdünnt und im Plaque Assay (siehe 4.6.2) analysiert. Die Gesamtmenge infektiöser Viruspartikel wurde abschließend auf das Ausgangsgewicht des Gewebestücks normiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich großen Gewebestücken herzustellen.

4.6.4 Kristallviolett-Färbung

Bei der Kristallviolett-Färbung werden intakte, adhärente Zellen dunkel violett gefärbt, während Zellplaques ungefärbt bleiben. Je stärker die Replikation eines Virus in den zu untersuchenden Zellen, desto mehr Plaques, d. h. lysierte Zellen entstehen während der Kultivierung und desto höher ist der Anteil an farbloser, klarer Fläche nach dem Färbevorgang. Die Kristallviolett-Färbung kann daher auch zur einführenden Beurteilung der antiviralen Effizienz möglicher Therapeutika eingesetzt werden, da diese die Anzahl und Größe entstehender Plaques verringern.

Die am Boden des Zellkulturgefäßes wachsenden Zellen wurden zuerst durch Zugabe von 10-prozentiger Trichloressigsäure fixiert. Diese wurde direkt auf den über den Zellen befindlichen Eagle-Overlay gegeben. Anschließend wurde der Agar mit Hilfe eines Spatels leicht vom Rand der Wells gelöst und aus diesen geschlagen. Agarreste wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Färbung der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe einer 0,5-prozentigen

METHODEN

Kristallviolett-Lösung auf die fixierten Zellen. Fünf Minuten später wurde die Färbelösung entfernt und Farbreste durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Platten wurden abschließend bei Raumtemperatur getrocknet und der Konfluenzgrad des gefärbten Zellrasens optisch bewertet.

4.7 Produktion von Adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren) und Quantifizierung

4.7.1 Produktion von Adeno-assoziierten Virusvektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren) basieren alle auf einer mutierten Variante des AAV2-Virusgenoms, welche die Produktion von selbst-komplementären Vektorpartikeln (scAAV-Vektor) erlaubt. Die vorübergehende Faltung des enthaltenen Virusgenoms zu einer doppelsträngigen DNA erlaubt dabei eine schnellere und stärkere Expression des kodierten Inserts als bei monomeren AAV-Vektoren (135). Zur Produktion von AAV-Vektoren wurden HEK293T-Zellen verwendet. Die Produktion der Vektoren erfolgte für die initialen *in vitro* Vorversuche in 6-Well-Platten, für größere *in vitro* Versuchsreihen in 175 cm² Flaschen. Für die *in vivo* Mausexperimente wurde die Produktion in 800 cm² Rollerflaschen durchgeführt. Diese wurden für 30 min mit Kollagen beschichtet, um ein besseres Anheften der Zellen während der Kultivierung zu gewährleisten und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die HEK293T-Zellen wurden in serumfreiem Medium eingesät, so dass sie 24 h später einen Konfluenzgrad von ca. 80 % aufwiesen (7,5 x 10⁵ Zellen je Well für 6-Well-Platten; 1,1 x 10⁷ Zellen pro T175; 7 x 10⁷ Zellen pro Rollerflasche).

Nach Erreichen dieses Konfluenzgrades erfolgte die Cotransfektion mit einem scAAV-Shuttleplasmid, welches das zu exprimierende Insert (z. B.: shRNA-Expressionskassette) trägt, und dem für die Verpackung notwendigen Verpackungsplasmid. Für die *in vitro* Experimente wurden AAV-Vektoren vom Serotyp 2 hergestellt, für deren Verpackung das Plasmid pDP2rs (Plasmid Factory, Bielefeld, D) notwendig ist. Zur Herstellung der *in vivo* verwendeten AAV-Vektoren vom Serotyp 9 wurden neben dem Shuttleplasmid sowohl das Plasmid p5E18-VP 2/9 als auch das P-Helper Plasmid (beide aus der eigenen Arbeitsgruppe durch Dr. Henry Fechner zur Verfügung gestellt) benötigt. Die transfizierten DNA-Mengen für die unterschiedlich großen Produktionsansätze können der folgenden Tabelle 4.1 entnommen werden.

METHODEN

Tabelle 4.1: DNA-Menge bei der Transfektion zur AAV-Vektor-Produktion.

Die Menge an zu transfizierender DNA ist in Abhängigkeit vom verwendeten Zellkulturgefäß dargestellt.

Zellkulturformat	scAAV-Shuttle	pDP2rs	p5E18-VP 2/9	P-Helper
6-Well-Platte	0,35 µg	1,05 µg		
175 cm² Flasche	6 µg	18 µg		
800 cm² Rollerflasche	50 µg		90 µg	90 µg

Zur Transfektion wurde 1 µl einer PEI-Lösung (2,58g/l) je µg zu transfizierender DNA verwendet. Die benötigte Menge PEI wurde in 150 mM NaCl-Lösung verdünnt und mit der ebenfalls in 150 mM NaCl-Lösung verdünnten DNA gemischt. Das Transfektionsgemisch wurde anschließend bei Raumtemperatur für 25 min inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Das Volumen des Transfektionsansatzes betrug dabei 10 % des Gesamtkulturvolumens. Nach Transfektion wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vierundzwanzig Stunden später erfolgte ein Mediumswechsel, bevor die Zellen für weitere 48 h unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Für die Rollerflaschenproduktion betrug die Drehrate während der gesamten Kultivierung 1 rpm.

Um die AAV-Vektoren zu ernten, wurden zunächst die Zellen vom Kulturgefäß gelöst. Im Falle der Rollerflaschen erfolgte dies durch kräftiges Rotieren der Flasche, während für die flachen Kulturgefäße Trypsin/EDTA verwendet wurde. Die Zellen wurden anschließend durch 5-minütige Zentrifugation bei 300 g pelletiert. Während der Produktion von AAV2/9-Vektoren wird ein Großteil dieser in den Überstand abgegeben. Dieser wurde daher für eine spätere Fällung aufgehoben. Die Zellpellets wurden in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurden sämtliche Zellpellets derselben Vektorproduktion in PBS resuspendiert und vereinigt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C im Gefrierschrank und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C. Nach Zugabe von Benzonase mit einer Endkonzentration von 250 U/ml, wurde die Lösung bei 37 °C für eine Stunde im Wasserbad inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4000 g für 30 min entfernt. Nach Überführung des vektorhaltigen Überstandes in neue Röhrchen wurde dieser Zentrifugationsschritt bei 6000 g wiederholt. Die vektorhaltigen Überstände wurden anschließend bei -80 °C gelagert oder direkt mittels Iodixanol-Gradient gereinigt.

4.7.2 Fällung von AAV2/9-Vektoren aus Zellkulturüberständen

Zur Fällung von AAV2/9-Vektoren aus Zellkulturüberständen wurde diesen 4 ml einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung je 200 ml Überstand zugesetzt. Die Lösung wurde für 1 h auf Eis inkubiert, bei 4000 g für 30 min zentrifugiert und anschließend wurden die Pellets verworfen. Je 400 ml der Überstände wurden mit 130 ml einer 1,86 M NaCl/ 24 % PEG-Lösung gemischt und bei 4 °C für 48 h inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 3000 g wurden die Überstände verworfen und die Pellets aus insgesamt 10 Rollerflaschen in 10 ml NaCl/HEPES-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 7500 g für 15 min wurde dem Überstand ebenfalls Benzonase (Endkonzentration 250 U/ml) zugegeben und das Gemisch für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Lösung wurde abschließend erneut zentrifugiert (7500 g, 30 min) und mit den vektorhaltigen Überständen aus dem Zellaufschluss vereinigt.

4.7.3 Reinigung von Adeno-assoziierten Virusvektoren im Iodixanol-Gradienten

Um die produzierten AAV-Vektoren für die weitere Verwendung zu reinigen und insbesondere verbliebene Zelltrümmerreste und eventuell toxisch wirkende Zytokine aus der Vektorproduktion zu entfernen, wurden Iodixanol-Gradienten verwendet. Hierfür wurde die vektorhaltige Lösung, wie in Abbildung 4.2 gezeigt, mit steigenden Konzentrationen von Iodixanol unterschichtet und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 18 °C und 54000 rpm im Rotor 70Ti (Beckmann) für 2 h zentrifugiert. Dadurch reichern sich die AAV-Vektoren in der farblosen Bande zwischen der 25-prozentigen und der 54-prozentigen Iodixanolschicht an und können anschließend mittels einer 18G-Kanüle steril abgezogen werden. Die farbliche Unterscheidung der Iodixanolbanden wird durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Phenolrot gewährleistet.

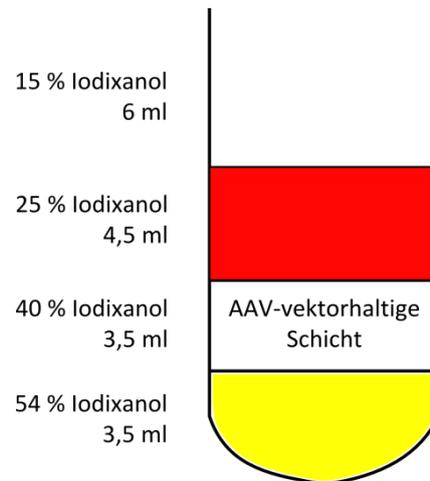


Abbildung 4.2: Iodixanol-Gradient. (schematisch nach Zolotukhin et al., 1999, (136))

Der Iodixanol-Gradient setzt sich aus vier verschiedenen farbigen Banden mit 15 %, 25 %, 40 % und 54 % Iodixanolgehalt zusammen. Die vektorhaltige, farblose Bande zwischen der 54-prozentigen und der 25-prozentigen Iodixanolschicht wurde nach der Ultrazentrifugation mittels 18G-Kanüle abgezogen. Die Unterscheidung der unterschiedlich dichten Iodixanolbanden erfolgte mittels Phenolrot.

4.7.4 AAV-Vektor-Konzentrierung

Für die *in vivo* Versuche war es notwendig, möglichst hohe AAV2/9-Vektor-Konzentrationen zu erreichen (min. 1×10^{13} VG/ml). Daher wurden die aus den Gradienten gewonnenen Vektorlösungen mit PBS-MK auf das zehnfache Volumen aufgefüllt und anschließend mit Hilfe von 15 ml Amicon Ultra Tubes (Millipore, Schwalbach, D) aufkonzentriert. Hierfür wurde die Lösung bei 2000 g so lange zentrifugiert, bis im Auffangbereich des Tubes das gewünschte Volumen verblieb. Ziel waren 100 μ l Endvolumen je Rollerflasche in der ursprünglichen Produktion. Die im Filter verbleibenden Vektorpartikel wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Filter gelöst und anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.7.5 AAV-Vektor-Quantifizierung

Um die gewonnenen Vektorpartikel zu quantifizieren, musste zuerst deren DNA isoliert werden. Zuvor erfolgte ein Abbau eventuell noch vorhandener Plasmidkontaminationen aus der Vektorproduktion durch einen 2-stündigen DNase-Verdau (Promega, Mannheim, D) bei 37 °C. Anschließend wurde die Vektorpräparation bei 37 °C und 350 rpm für 1 h im Thermoblock Proteinase K (Peglab, Erlangen, D) verdaut. Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wurde danach die Vektor-DNA isoliert und mittels Ethanol gefällt. Nach dem Waschen der DNA

METHODEN

wurde diese abschließend in DEPC-H₂O gelöst und in dekadischen Verdünnungsschritten in der quantitativen real-time PCR analysiert. Als Standard wurden die scAAV-Shuttleplasmide in dekadischen Verdünnungsschritten verwendet. Sämtliche Ansätze erfolgten dabei in Doppelbestimmung.

Bei Vektoren, die einen CMV-Promoter oder -Enhancer enthalten, wurden der CMV fw und CMV rev Primer sowie die 6'-FAM markierte Sonde CMV enhancer-383T verwendet. Das Temperaturprofil der PCR beinhaltet einen initialen 50 °C Schritt für 2 min, gefolgt von 10 min bei 95 °C. Anschließend folgten 40 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Bei Vektoren ohne CMV-Promoter oder -Enhancer erfolgte die Quantifizierung mittels Primern und Sonde, welche in der 5' ITR des Vektorgenoms binden. Die verwendeten Primer waren dabei AAV-ITR fw, AAV-ITR rev sowie die 6'-FAM-markierte Sonde AAV2-ITR probe. Das bei der ITR-Quantifizierung verwendete PCR-Temperaturprofil beinhaltet einen initialen Denaturierungsschritt von 10 min bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen von 1 min bei 95 °C und 1 min bei 64 °C.

4.8 Produktion von adenoviralen Virusvektoren (AdV) und Quantifizierung

4.8.1 Produktion von adenoviralen Virusvektoren

Der hier in dieser Arbeit verwendete adenovirale Vektor zur Expression von sCAR-Fc (AdG12) wurde produziert und zur Verfügung gestellt durch Fr. Xiaomin Wang der Arbeitsgruppe Poller der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin. Details zur Produktion adenoviraler Vektoren wurden anderweitig beschrieben (103). Zur Bestimmung der Partikelzahl je μl wurde die optische Dichte einer 1:10 Verdünnung der Präparation (in TBS) bei 260 nm in einem UV-Spektrometer gemessen. Die Partikelzahl/ μl ergibt sich dabei durch die Formel $\text{OD} \times 10 \times 10^9$. Die Vektorpräparation wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.8.2 Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelzahl

Zur Bestimmung der infektiösen Partikelzahl der adenoviralen Vektorpräparation wurde ein Plaque Assay auf HEK293T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden 6-Well-Platten zuerst mit Collagen beschichtet und anschließend HEK293T-Zellen so in diese ausgesät, dass sie 24 h später einen konfluenten Zellrasen bildeten. Die Vektorpräparation wurde dekadisch von 1:10 bis 1:10⁹ in serumfreiem Medium verdünnt und anschließend vorsichtig auf die konfluenten Zellen gegeben. Dabei ist es wichtig, dass der Zellrasen vollständig intakt bleibt. Es folgte ein

METHODEN

Inkubationsschritt für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Während dieser Inkubation wurde eine 5-prozentige Low-Melting-Agarose mittels Mikrowelle zum Schmelzen gebracht und auf 42 °C im Wasserbad temperiert. Die flüssige Agarose wurde mit Medium 1:4 vermischt, die Viruslösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden mit dem agarosehaltigen Medium bedeckt. Die Platten wurden zur Verfestigung des Agars bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und anschließend bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach 10 Tagen waren unter dem Mikroskop deutliche Plaques im Zellrasen zu erkennen, die nach 14 Tagen ausgezählt werden konnten. Die Bestimmung der infektiösen Viruspartikel in PFU/ml erfolgte nach der Formel (ausgezählte Plaques x Verdünnungsstufe)/Volumen der Virusverdünnung in ml. Die gesamte Bestimmung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei zwei vollständig unabhängige Verdünnungsreihen angelegt wurden.

4.9 *In vivo* Mausexperimente

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzverordnung und der Tierschutzgesetze gehalten und gepflegt. Alle an den Tieren durchgeführten Arbeiten wurden durch das LAGeSo Berlin genehmigt. Für die durchgeführten Tierversuche wurden ausschließlich männliche Balb/c-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, D) benutzt.

4.9.1 Infektion von Mäusen mit Coxsackievirus B3

Zur Infektion von Mäusen mit Coxsackievirus B3 wurde der vorliegende Virusstock so in serumfreiem Medium verdünnt, dass die pro Maus benötigte Virusmenge (meist 5×10^4 PFU/Maus) in einem Gesamtvolumen von 200 µl vorlag. Das so verdünnte Virus wurde über eine sterile Kanüle in die per Hand fixierten Mäuse intraperitoneal appliziert. Im Zuge der Coxsackievirus-Infektion kommt es üblicherweise zu einem Gewichtsverlust bei den Mäusen, welcher ca. 3 Tage nach Infektion einsetzt und bis zu maximal 20 % des Ausgangsgewichtes betragen kann. Zur Beurteilung des Infektionserfolges wurden die Tiere daher über den gesamten Versuchszeitraum täglich gewogen. Bei Einsetzen des Gewichtsverlustes erhielten sie, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern, Nassfutter.

METHODEN

4.9.2 Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats

Um ein CVB3-Isolat zu generieren, welches mit möglichst hoher Spezifität kardiales Gewebe infiziert und dort zu inflammatorischen Prozessen führt, wurde die Methode der Herzpassagierung angewendet. Hierfür wurden vier 6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse mit jeweils 5×10^4 PFU eines vorhandenen CVB3-Virusstocks intraperitoneal infiziert. Sechs Tage später wurden die Mäuse euthanasiert und die Herzen entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Das Herzgewebe aller vier Tiere wurde anschließend mittels Ultraturrax in serumfreiem Medium zerkleinert und durch 3 Einfrier-Auftau-Zyklen vollständig aufgeschlossen. Darauffolgend wurde der Virustiter des Herzlysats durch Plaque Assay (siehe Abschnitt 4.6.2) bestimmt. Neben der Bestimmung des infektiösen Herztiters wurde außerdem der Grad der Inflammation histologisch mittels HE-Färbung beurteilt. Nach dieser ersten Herzpassage wurden erneut vier männliche sechs Wochen alte Balb/c-Mäuse mit jeweils 5×10^4 PFU dieses neu gewonnenen CVB3-Isolats infiziert und die Prozedur der ersten Herzpassage wiederholt. Die aus dieser zweiten Herzpassage gewonnenen CVB3-Viren wurden erneut durch Plaque Assay quantifiziert und für den folgenden Hauptinfektionsversuch verwendet.

4.9.3 Transduktion von Mäusen mit AdV und AAV-Vektoren über die Jugularvene

Die Applikation sämtlicher, in dieser Arbeit verwendeter, viraler Vektoren erfolgte über die Jugularvene. Dafür wurden die verwendeten 5 bis 6 Wochen alten, männlichen Balb/c-Mäuse unter Isofluran-Inhalationsnarkose gehalten und die Jugularvene freipräpariert. Die Applikation der Vektoren erfolgte dann mit Hilfe einer Hamiltonspritze und eines Katheters. Das Gesamtvolumen der Applikation betrug dabei mindestens $40\ \mu\text{l}$ und maximal $100\ \mu\text{l}$. Vektorverdünnungen wurden in PBS durchgeführt. Nach erfolgreicher Applikation wurde die Blutung mittels eines Wattestäbchens gestillt und die Wunde vernäht.

4.9.4 CVB3-Myokarditismodell in AdG12- und scAAV2/9-Vektor-transduzierten Mäusen

Die 5-6 Wochen alten, männlichen Balb/c-Mäuse wurden, wie zuvor beschrieben, mit 1×10^{12} Vektorgenomen scAAV2/9-shRdRP2.4 oder scAAV2/9-shGFP über die rechte Jugularvene transduziert. Acht Tage später erfolgte die Transduktion von 1×10^{10} Vektorpartikeln AdG12 über die linke Jugularvene. Weitere 48 h später wurden die Mäuse i.p. mit 5×10^4 PFU des zuvor zweimal herzpassagierten CVB3-Isolats infiziert. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Tiere narkotisiert, ihre Herzfunktionsparameter wurden durch hämodynamische Messung

METHODEN

charakterisiert und anschließend euthanasiert. Organproben der Mäuse zur histologischen Untersuchung wurden in Formalinlösung fixiert, Proben für molekularbiologische Untersuchungen sowie für Plaque Assays in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Außerdem wurden Blutproben entnommen. Diese wurden für 15 min auf Eis gelagert, um die Gerinnung des Blutes zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben bei 3000 g für 8 min zentrifugiert, die Serumphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Analyse mittels humanem IgG-ELISA gelagert.

Die hämodynamischen Messungen wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. Dirk Westermann, Charité – Universitätsklinikum Berlin durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse durch intraperitoneale Applikation narkotisiert (0,8-1,2 g/kg Urethan; 0,05 mg/kg Buprenorphin), intubiert und künstlich beatmet (Beatmungsgerät Typ 7025, UgoBasile, Comerio, VA, IT). Die Aufnahme der Hämodynamikparameter erfolgte über einen Mikrokonduktanzkatheter 1,2 F (ScieSense Inc., Ontario, CAN). Aufgezeichnet wurden dabei die Herzfrequenz (HR), der linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP), die linksventrikuläre Kontraktilität (dP/dt_{max}), das Schlagvolumen (SV), die Schlagarbeit (SW), die linksventrikuläre Relaxation (dP/dt_{min}), die kardiale Gesamtleistung (CO), die linksventrikuläre Relaxationszeit (Tau), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) und die Ejektionsfraktion (EF) (137).

4.9.5 Gewebeverteilung von scAAV2/9-Vektoren nach intravenöser Transduktion

Um den Gewebetropismus von scAAV2/9-Vektoren im *in vivo* Maus-Modell zu untersuchen und einen Eindruck über die Expressionsstärke des vektorkodierten Transgens nach 10 Tagen zu erhalten, wurden drei 6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse mit jeweils 1×10^{12} Vektorgenomen eines GFP-exprimierenden scAAV2/9-Vektors (scAAV2/9-GFP) transduziert. Dafür wurden die Mäuse unter Inhalationsnarkose gesetzt, ihre linke Jugularvene wurde frei präpariert und der Vektor wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mittels Katheter und Hamiltonspritze appliziert. Anschließend wurden die Wunden vernäht. Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und Organproben entnommen. Proben, die für die HE-Färbung vorgesehen waren, wurden in 4-prozentigem Formalin fixiert. Proben für die immunhistochemische GFP-Färbung wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.10 Immunhistochemische Färbung von scAAV2/9-GFP-transduzierten Geweben

Um die Anwesenheit des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in scAAV2/9-GFP transduzierten Geweben nachzuweisen, wurden die Gewebe immunhistochemisch wie zuvor beschrieben untersucht (138). Kurz zusammengefasst, wurden die Gewebeprobe mit 50-prozentigem in TBS verdünntem Ziegenserum für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der polyclonale Anti-GFP-Antikörper (Abcam, Cambridge, GB) 1:15.000 in Trispuffer (50 mM TRIS, pH 7,6) verdünnt und bei 4 °C auf den Proben über Nacht inkubiert. Als Sekundäntikörper wurde ein polyclonaler Goat Anti-Rabbit IgG-Antikörper in der Verdünnungsstufe 1:200 verwendet. Als Chromogen wurde Diaminbenzidinetetrahydrochlorid benutzt. Die Kontrastfärbung erfolgte mit Hematoxylin. Gewebe von PBS-injizierten, untransduzierten Mäusen wurden als Negativkontrollen verwendet. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

4.11 HE-Färbung von Gewebeschnitten

Zur Beurteilung des Inflammationsgrades diverser Gewebe insbesondere des Herzens, wurde die Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eingesetzt. Dabei werden Zellen durch den sauren Farbstoff Eosin rötlich gefärbt, während Zellkerne durch den basischen Farbstoff Haematoxylin bläulich bis lila gefärbt erscheinen. Nach Entnahme der jeweiligen Organe wurden diese in 4 % gepufferter Formalinlösung (gepuffertes Formalin nach Lillie: 4 % Formalin, 45 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄) für mindestens 24 h fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom in 2 µm dünne Gewebescheiben zerschnitten. Diese wurden auf Objektträger übertragen. Die HE-Färbung erfolgte in einem automatisierten Prozess. Um die gewonnenen Schnitte länger haltbar zu machen, wurden sie nachfolgend mit Entellan® eingebettet. Die abschließende Beurteilung der Intaktheit der Gewebe bzw. des Infiltrationsgrades erfolgte mikroskopisch. Sämtliche HE-Färbungen der vorliegenden Arbeit wurden durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin und seine Mitarbeiter durchgeführt.

4.12 Quantifizierung des Inflammationsgrades von kardialem Gewebe

Die Quantifizierung der Inflammation im murinen Herz erfolgte mittels Myokarditis-Score durch Beurteilung möglichst gleichgroßer HE-gefärbter Gewebestücke (139). Dieser wird auf einer Skala von 0 bis 4 angegeben. Dabei steht 0 für ein intaktes Gewebe ohne Infiltrate. Bei einem Myokarditis-Score von 1 finden sich kleine fokale Ansammlungen von infiltrierenden Zellen zwischen Myozyten. Der Wert 2 wird vergeben, wenn größere Inflammationsfoki mit insgesamt mehr als 100 infiltrierenden Zellen verteilt über den untersuchten Gewebeschnitt zu finden sind. Bei einem Score von 3 liegen wiederum mehr Foki vor, wobei der Prozentsatz der von der Inflammation betroffenen Gewebefläche weniger als 10 % beträgt. Der höchste Score von 4 wird vergeben, wenn 10 bis 30 % des Gewebeschnittes von Inflammation betroffen sind und damit mit Immunzellen infiltriert. Die Beurteilung der Gewebe hinsichtlich ihres Inflammationsgrades erfolgte durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin in Doppelbestimmung im Blindverfahren.

4.13 Statistische Beurteilung

Die Daten der *in vivo* Experimente wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen Mann-Whitney U-Test hinsichtlich statistischer Signifikanz verglichen. Für die *in vitro* erlangten Ergebnisse wurde hierzu der Student-t-Test verwendet. Die Unterschiede zwischen zwei Messwertgruppen wurden als signifikant angesehen, wenn die errechneten P-Werte kleiner als 0,05 waren. Dabei entsprach ein Wert zwischen 0,05 und 0,01 der Signifikanzstufe von einem Sternchen (*), während bei P-Werten die kleiner als 0,01 waren, zwei Sternchen (**) vergeben wurden.

5 Ergebnisse

5.1 Inhibierung der CVB3-Replikation durch vektorvermittelte Kombinationstherapie mit sCAR-Fc und shRdRP2.4

Coxsackievirus B3, welches zur Familie der Picornaviren gehört, ist ein wichtiger Auslöser akuter und chronischer Myokarditis im Menschen. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl sCAR-Fc, eine lösliche Form des Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptors, als auch direkt gegen das CVB3-Genom gerichtete shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, in der Lage sind, CVB3 effektiv *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren (37, 63). Eine vollständige Inhibierung der Virusinfektion gelang allerdings bei keiner der beiden Behandlungsmethoden. In der vorliegenden Dissertation sollte daher das Potential von sCAR-Fc und antiviralen shRNAs (shRdRP2.4) untersucht werden, additive Effekte gegen Coxsackievirus B3 hervorzurufen. Die Expression der aktiven Agenzien erfolgte hierzu mithilfe viraler Vektoren.

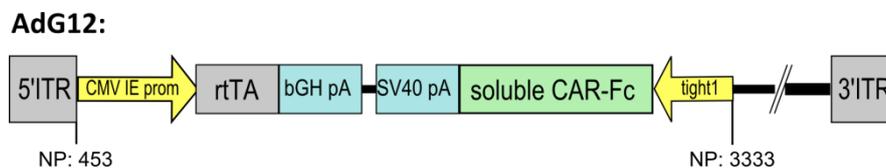


Abbildung 5.1: Schema des adenoviralen Vektors AdG12. (Abbildung schematisch nach Pinkert et al. 2009, (63)) Der adenovirale Vektor AdG12 ermöglicht die Doxycyclin-abhängige Expression von sCAR-Fc. Die zwei Expressionskassetten wurden in entgegengesetzter Richtung in einen von Adenovirus Typ 5 abgeleiteten, adenoviralen Vektor inseriert. CMV IE prom = immediate early CMV-Promoter, rtTA = reverser, Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator rtTA-M2, tight1 = Doxycyclin-abhängiger Promoter, bGH pA und SV40 pA = Polyadenylierungssignale, soluble CAR-FC = Fusionsprotein bestehend aus der löslichen, extrazellulären Domäne von humanem CAR und der humanen IgG-Fc-Region, ITR = Terminationssequenzen des Adenovirus Typ 5.

Für die Expression von sCAR-Fc wurde ein adenoviraler Vektor, welcher von Adenovirus 5 abgeleitet ist und mit AdG12 bezeichnet wird, verwendet. Dieser verfügt über zwei Expressionskassetten, welche in entgegengesetzter Richtung auf dem Vektor vorliegen. Die erste Kassette kodiert dabei für die kontinuierliche Expression des Doxycyclin-abhängigen (Dox) Transaktivators rtTA-M2. Die zweite Expressionskassette ist für die Dox-regulierbare Expression von sCAR-Fc unter Kontrolle eines TREtight1-Promoters zuständig. Das lösliche

ERGEBNISSE

Protein sCAR-Fc setzt sich aus den beiden extrazellulären Domänen D1 und D2 des Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptors zusammen. Diese sind zusätzlich an den Fc-Teil von humanem IgG fusioniert. Das entstehende Molekül ist somit in der Lage Dimere zu bilden, die es zusätzlich im Serum stabilisieren. Die Expression von sCAR-Fc erfolgt ausschließlich in Anwesenheit des Transaktivators Dox. Als Kontrolle für den Einsatz von sCAR-Fc konnte in den folgenden Experimenten somit derselbe Vektor AdG12 lediglich ohne Dox verwendet werden. Abbildung 5.1 zeigt den schematischen Aufbau des Vektors AdG12.

Für die Expression von shRdRP2.4, zwei shRNAs gerichtet gegen die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) von CVB3, wurde ein selbstkomplementärer (sc) AAV-Vektor verwendet. Dieser mit scAAV-shRdRP2.4 bezeichnete Vektor verfügt über zwei U6-Promoter-gesteuerte Kassetten zur Expression von shRdRP2 und shRdRP4. Sie sind in entgegengesetzter Richtung zueinander angeordnet. Das Vorhandensein von zwei unabhängigen shRNAs dient dabei der Verhinderung von Escape-Mutanten. Als Kontrolle für den aktiven AAV-Vektor fungierte ein scAAV-Vektor (scAAV-shGFP), welcher die Expression einer shRNA gegen das grün-fluoreszierende Protein (GFP) ermöglicht. Für die *in vitro* Versuche wurden AAV-Vektoren vom Serotyp 2 verwendet, da diese die verwendeten HeLa-Zellen effizient transduzieren können (37). Für sämtliche *in vivo* Experimente wurden dagegen AAV-Vektoren des kardiotropen Serotyps 9 verwendet (140). Abbildung 5.2 zeigt schematisch die verwendeten AAV-Vektoren. Die hier beschriebenen Vektoren AdG12 und scAAV-shRdRP2.4 sind identisch zu den in den vorangegangenen Studien verwendeten Vektoren (37, 63).

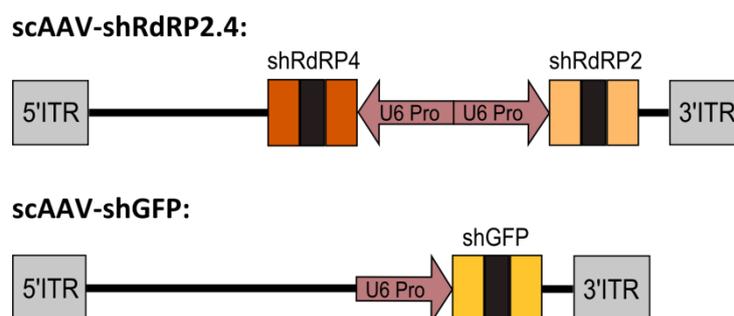


Abbildung 5.2: scAAV-Vektoren zur Expression von shRNAs. (schematisch nach Fechner et al. 2008, (37))

Die Expression von shRdRP2 und shRdRP4 wurde durch jeweils einen U6-Promoter (U6 Pro) gesteuert. Die Expressionskassetten sind dabei in entgegengesetzter Richtung in das Rückgrat eines selbstkomplementären AAV-Vektors inseriert. Die ITRs (inverted terminal repeats) stammen von AAV Typ 2, wobei eine Deletion in der 3' ITR zur Ausbildung der scAAV-Vektoren führt. Als Kontrolle für den Vektor scAAV-shRdRP2.4 dient ein scAAV-Vektor zur Expression von shGFP (scAAV-shGFP).

ERGEBNISSE

5.1.1 Funktionalitätstest von pdAAV-shRdRP2.4 und pdAAV-shGFP im Reporterassay

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung der in Abbildung 5.2 gezeigten selbstkomplementären AAV-Vektoren dienen die AAV-Shuttleplasmide pdAAV-shRdRP2.4 bzw. pdAAV-shGFP. Diese wurden initial auf die Funktionstüchtigkeit der von ihnen exprimierten shRNAs überprüft. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit 0,8 µg eines GFP-Reporterkonstrukts sowie 0,8 µg des jeweiligen Shuttleplasmides cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Proteinlösungen mittels Western Blot analysiert. Das Reporterplasmid für den Western Blot enthält dabei eine GFP-Expressionskassette, wobei in die 3' UTR des GFPs die cDNA der RdRP von CVB3 eingefügt ist (siehe Abbildung 5.3A). Die Expression der gegen die RdRP gerichteten shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, führt somit zu einer Translationsinhibierung des GFPs, welche im Western Blot nachgewiesen werden kann. Die Expression der Kontroll-shRNA, shGFP, führt ebenfalls zur GFP-Translationsinhibierung, unabhängig von der viralen RdRP.

Um nachzuweisen, dass beide antiviralen shRNAs durch das Plasmid pdAAV-shRdRP2.4 exprimiert werden, standen zusätzlich zwei weitere Reporterkonstrukte zur Verfügung. Beide enthielten erneut die CVB3-RdRP in der 3'UTR des GFPs. In die Zielsequenz jeweils einer shRNA in der RdRP wurde allerdings eine Punktmutation eingeführt, so dass die jeweilige shRNA wirkungslos wurde. Eine Translationsinhibierung des GFPs konnte also nur dann auftreten, wenn beide shRNAs exprimiert werden.

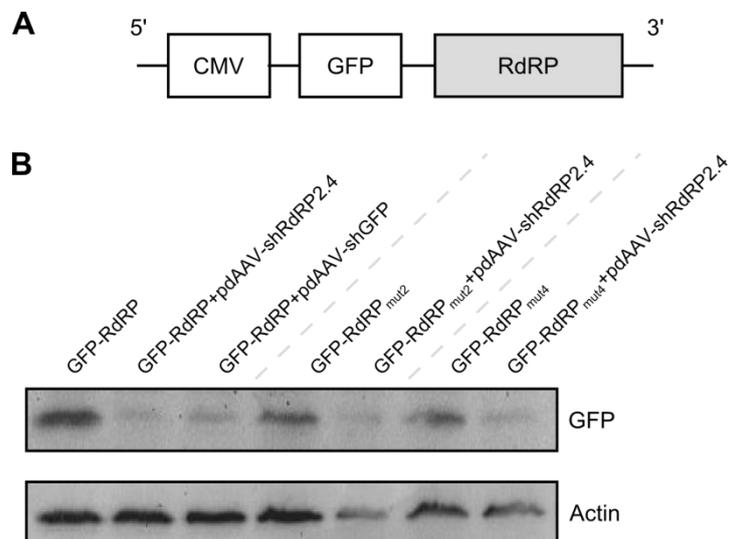


Abbildung 5.3: Funktionsüberprüfung von pdAAV-shRdRP2.4 und pdAAV-shGFP mittels Western Blot.

A) GFP-Reporterkonstrukt für den Western Blot. Die cDNA der CVB3-RdRP wurde in die 3' UTR des Reportergens GFP kloniert. **B)** Western Blot zur Überprüfung der exprimierten shRNAs. HeLa-Zellen wurden mit 0,8 µg des GFP-RdRP-Reporters und 0,8 µg des jeweiligen Shuttleplasmides cotransfiziert, nach 48 h lysiert und mittels Western Blot analysiert. Actin ist als Ladekontrolle gezeigt. GFP-RdRP_{mut2}: GFP-Reporterkonstrukt mit Mutation in Zielsequenz der shRdRP2; GFP-RdRP_{mut4}: GFP-Reporterkonstrukt mit Mutation in Zielsequenz der shRdRP4

ERGEBNISSE

Sowohl das Plasmid pdAAV-shRdRP2.4 als auch das Plasmid pdAAV-shGFP führten zu einer deutlichen Reduktion der GFP-Expression (Bahn 2 und 3 Abbildung 5.3B). Diese konnte ebenfalls erzielt werden, wenn die Zielsequenz der shRdRP2 an einer Stelle mutiert war (Bahn 5). Auch bei Mutation der shRdRP4-Zielsequenz war das Plasmid pdAAV-shRdRP2.4 wirkungsvoll und führte zu einer Reduktion des GFP-Signals (Bahn 7). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl die shRdRP2 als auch shRdRP4 durch das Plasmid pdAAV-shRdRP2.4 exprimiert werden und ihre Zielsequenz in der RdRP von Coxsackievirus B3 erkennen. Außerdem wurde die funktionelle Expression der Kontroll-shRNA, shGFP, durch das Shuttleplasmid pdAAV-shGFP nachgewiesen.

Da beim Western Blot auch die Expression der Kontroll-shRNA zu einer Reduktion der Reporterexpression führt, wurde zusätzlich ein Dual-Luciferase Reporterassay durchgeführt, um die Spezifität des RNA-Interferenz-Ansatzes nachzuweisen. Dabei ist die cDNA-Sequenz der CVB3-RdRP in die 3'UTR der Renilla-Luciferase eingefügt. Die Expression von shRdRP2 und shRdRP4 führt somit zum Abbau der mRNA der Renilla-Luciferase (Abbildung 5.4A). Durch dasselbe Reporterkonstrukt wird außerdem die Firefly-Luciferase exprimiert, welche zur Normierung verwendet werden kann. Die Kontroll-shRNA, shGFP, sollte keinen Einfluss auf die Expression der beiden Luciferasen haben.

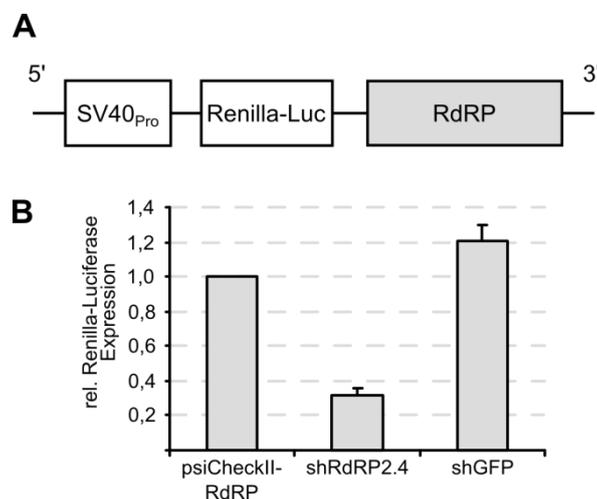


Abbildung 5.4: Funktionsüberprüfung von pdAAV-shRdRP2.4 im Dual-Luciferase Assay.

A) Luciferase-Reporterkonstrukt (psiCheckII-RdRP) für den Dual-Luciferase Assay. Die cDNA der RdRP von CVB3 ist in die 3'UTR der Renilla-Luciferase eingefügt. Zur Normierung wird die ebenfalls vom Reporterkonstrukt exprimierte Firefly-Luciferase verwendet. **B)** Unterdrückung der Reporter-Luciferase-Expression durch shRdRP2.4. HeLa-Zellen wurden mit 0,8 µg des Reporterkonstrukts psiCheckII-RdRP und 0,8 µg pdAAV-shRdRP2.4 bzw. pdAAV-shGFP cotransfiziert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte 48 h später. Die Normierung der Renilla-Lumineszenz erfolgte auf die Firefly-Luciferase. Als Bezugswert diente das Verhältnis von Renilla- zu Fireflyluciferase-Aktivität aus HeLa-Zellen, die nur mit dem psiCheckII-RdRP-Plasmid transfiziert worden waren.

ERGEBNISSE

Die Expression von shRdRP2 und shRdRP4 führte zu einer Verringerung der relativen Luciferase-Expression auf ca. 30 % (Abbildung 5.4B). Die Expression von shGFP verringerte die Renilla-Luciferase-Expression dagegen nicht und führte lediglich zu einem geringen Anstieg der relativen Luciferase-Expression im Vergleich zu den nur mit dem Reporterplasmid transfizierten Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass die durch pdAAV-shRdRP2.4 kodierte shRNAs spezifisch zu einer Inhibierung der CVB3-RdRP führen und die durch pdAAV-shGFP kodierte shGFP als Kontrolle für diesen RNA-Interferenz-Ansatz dienen kann.

5.1.2 Funktionalitätstest von scAAV-shRdRP2.4 und scAAV-shGFP im Reporterassay

Die vorangegangenen Reporterassay-Versuche (Abschnitt 5.1.1) haben die Wirksamkeit der AAV-Basisplasmide zur Expression von shRdRP2, shRdRP4 und shGFP sowie die Funktionalität dieser nachgewiesen. Daher wurden anschließend scAAV2/2-Vektoren basierend auf diesen Basisplasmiden produziert. Die Funktionalität der AAV-Vektoren wurde erneut im Dual-Luciferase Assay überprüft. Hierfür wurden HeLa-Zellen zunächst mit aufsteigenden Konzentrationen der Vektoren transduziert und 24 h später mit 0,8 µg des Reporterkonstrukts psiCheckII-RdRP transfiziert. Abbildung 5.5 zeigt die relative Luciferase-Expression der so behandelten Zellen 48 h nach Transfektion.

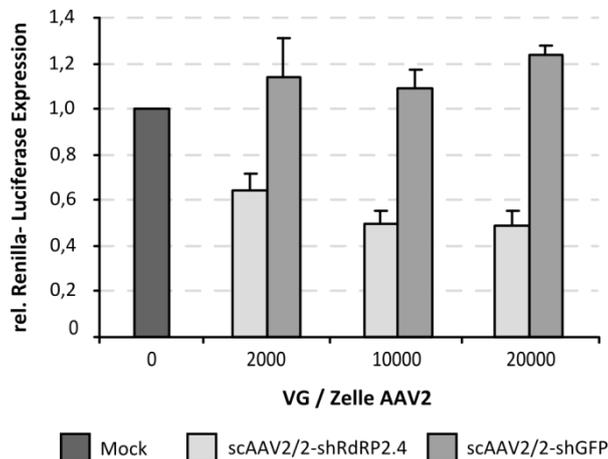


Abbildung 5.5: Funktionstest scAAV2/2-shRdRP2.4 und scAAV2/2-shGFP in Dual-Luciferase Assay.

HeLa-Zellen wurden mit steigenden Mengen von scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP transduziert und 24 h später mit 0,8 µg psiCheckII-RdRP transfiziert. Weitere 48 h später wurden die Zellen lysiert und die relative Luciferase-Expression gemessen. Der Mock-Wert stammt von untransduzierten Zellen, die lediglich mit psiCheckII-RdRP transfiziert wurden.

ERGEBNISSE

Wie bereits für das AAV-Basisplasmid beobachtet (Abbildung 5.4), führte auch der scAAV-Vektor, welcher shRdRP2 und shRdRP4 exprimiert, zu einer Translationsinhibierung der Renilla-Luciferase des psiCheckII-RdRP-Reporters. Dieser Effekt war direkt abhängig von der eingesetzten Vektorkonzentration. Die maximale Verringerung der relativen Renilla-Luciferase-Expression auf ca. 48 % wurde bei der höchsten eingesetzten Vektordosis von 20.000 VG/Zelle erreicht (Abbildung 5.5). Der Kontrollvektor scAAV2/2-shGFP führte nicht zu einer Verringerung der relativen Renilla-Luciferase-Expression. Sie lag für alle drei hier untersuchten Vektordosen leicht über dem Kontrollniveau nicht transduzierter Zellen.

Das im Vergleich zum Plasmidtest geringere Inhibierungslevel der aktiven shRNAs lässt sich durch das Assaysystem erklären. Durch die Transduktion wird Stress auf die Zellen ausgeübt, der durch die darauffolgende Transfektion noch verstärkt wird. Den inhibierenden Effekt kann man allerdings nur in Zellen beobachten, die sowohl erfolgreich transduziert als auch transfiziert wurden. Da in dieser Population allerdings ein höherer Anteil an Zellen auf Grund der Behandlung stirbt, fällt der inhibitorische Effekt, welcher durch shRdRP2.4 hervorgerufen wird, geringer aus als beim reinen Plasmidansatz, wo lediglich eine Transfektion stattfand.

5.1.3 Inhibierung von CVB3 durch shRdRP2.4 *in vitro*

Durch die Dual-Luciferase Reporterassays konnte gezeigt werden, dass shRdRP2 und 4 in der Lage sind, die Translation der CVB3-RdRP effektiv zu inhibieren. Die Ergebnisse von Reporterassays sind dabei allerdings nicht zwangsläufig auf Virus-Inhibierungsassays zu übertragen, da zum Beispiel die Faltung des vollständigen CVB3-Genoms von der Faltung der RdRP-cDNA abweicht, was zu einer Verminderung oder auch Verstärkung der Inhibierung führen kann. Daher wurden die AAV2/2-Vektoren im nächsten Schritt auf ihre Fähigkeit zur CVB3-Inhibierung überprüft. Dabei sollte außerdem eine optimale Dosis für die Verwendung der AAV-Vektoren für die anschließenden Kombinationsexperimente gefunden werden.

Um die Fähigkeit von shRdRP2 und shRdRP4 zur CVB3-Inhibierung zu beurteilen, wurden HeLa-Wis-Zellen mit unterschiedlichen Dosen scAAV2/2-shRdRP2.4 transduziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert und für weitere 16 h kultiviert. Nach Zellaufschluss wurde die Menge replikationsfähiger CVB3-Partikel mittels Plaque Assay bestimmt.

ERGEBNISSE

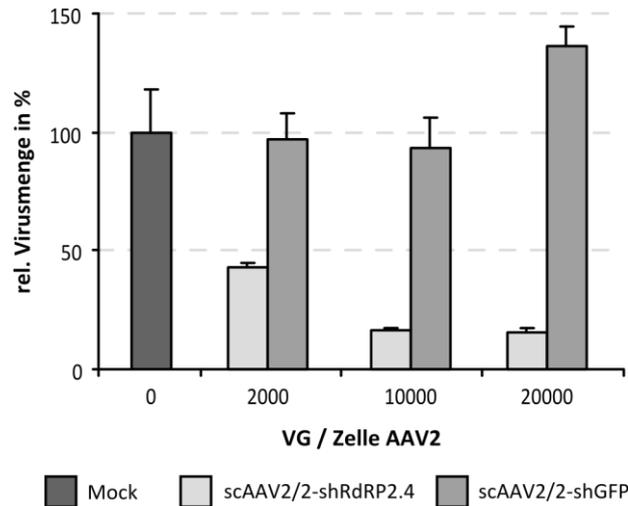


Abbildung 5.6: Virus-Inhibitionsassay mittels scAAV2/2-shRdRP2.4.

HeLa-Wis-Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP transduziert und 48 h später mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert. Nach weiteren 16 h Kultivierung wurde die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel mittels Plaque Assay bestimmt. Die Normierung erfolgte relativ zu untransduzierten, CVB3-infizierten Zellen.

Wie aus Abbildung 5.6 ersichtlich, führt scAAV2/2-shRdRP2.4 zu einer dosisabhängigen Inhibierung von CVB3. Bei der niedrigsten AAV2-Vektorkonzentration von 2000 VG/Zelle beträgt diese rund 60 %. Bei der höchsten verwendeten Dosis von 20.000 VG/Zelle erreicht der Inhibierungsgrad rund 85 %, was einer Virusinhibierung von ca. einer \log_{10} -Stufe entspricht. Die Kontroll-shRNA, shGFP, war nicht in der Lage, die Virusreplikation zu inhibieren.

Für die folgenden Experimente zur Ermittlung möglicher additiver antiviraler Effekte war es wichtig, dass die antiviralen Effekte, welche durch die Einzelkomponenten hervorgerufen werden, deutlich sichtbar und klar zu quantifizieren sind. Dies ist im Plaque Assay erst ab einer Inhibierung um ca. 1 \log_{10} -Stufe möglich. Da dieser Wert reproduzierbar nur bei der höchsten verwendeten Vektordosis von 20.000 VG/Zelle erreicht wurde, wurde diese Vektorkonzentration für die folgenden *in vitro* Additivversuche als Standarddosis verwendet.

5.1.4 AdG12-vektorvermittelte Expression von sCAR-Fc

Der in Abbildung 5.1 beschriebene adenovirale Vektor AdG12 ermöglicht die Expression von sCAR-Fc in Abhängigkeit von Dox. Um die hier verwendete Vektorcharge auf generelle Funktionstüchtigkeit zu überprüfen, wurden HeLa-Wis-Zellen mit verschiedenen Dosen von AdG12 transduziert und in Anwesenheit von Dox (1 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Nach 48 h wurden die

ERGEBNISSE

Überstände der Zellen durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit und anschließend mittels humanem IgG-Fc-ELISA auf das Vorhandensein von sCAR-Fc untersucht. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen, die in Anwesenheit von Dox kultiviert wurden.

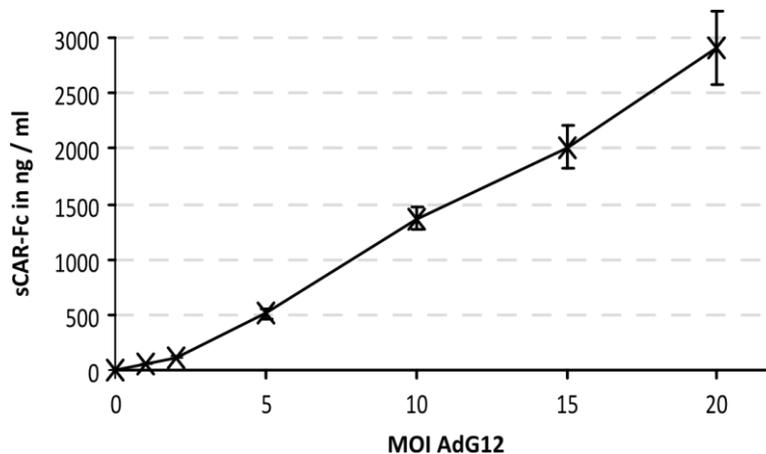


Abbildung 5.7: Expression von sCAR-Fc in Abhängigkeit von der AdG12-Dosis.

HeLa-Wis-Zellen wurden mit steigender MOI AdG12 transduziert und in Anwesenheit von Dox (1 µg/ml) kultiviert. Die Überstände wurden 48 h nach Transduktion mittels humanem IgG-Fc-ELISA auf das Vorhandensein von sCAR-Fc untersucht. Als Nullwert dienten Überstände untransduzierter Zellen, welche in Anwesenheit von Dox kultiviert wurden. Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM aus zwei unabhängigen Experimenten jeweils in Doppelbestimmung.

Die Expression von sCAR-Fc stieg mit steigender Dosis des Vektors AdG12 nahezu linear an (Abbildung 5.7). Für die niedrigste verwendete Moi von 1 wurde dabei eine Konzentration von rund 50 ng/ml gemessen. Die höchste sCAR-Fc-Konzentration von rund 2.900 ng/ml wurde bei der AdG12-MOI von 20 erreicht. Für die untransduzierten Zellen, welche in Anwesenheit von Dox kultiviert worden waren, konnte kein sCAR-Fc nachgewiesen werden. Gleiches galt für Zellen, die mit steigenden MOI des Vektors transduziert worden waren, allerdings ohne Dox kultiviert wurden (Daten nicht in Abbildung gezeigt).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression des vektorkodierten Transgens sCAR-Fc in direkter Abhängigkeit von der Vektordosis steht und der hier verwendete Vektor funktional ist. Außerdem wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben, gezeigt, dass das Expressionssystem streng über die Zugabe von Dox reguliert wird (63). Die Verwendung desselben Vektors AdG12 ohne Zugabe von Dox (AdG12 – Dox) in den folgenden Virusinhibierungsassays, als Negativkontrolle zur sCAR-Fc Behandlung (AdG12 + Dox), war damit möglich.

ERGEBNISSE

5.1.5 Inhibierung von CVB3 durch sCAR-Fc *in vitro*

Im nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, ob und wie stark sCAR-Fc in der Lage ist, CVB3 *in vitro* zu inhibieren. Außerdem sollte die optimale Vektorkonzentration für die Kombinationsversuche bestimmt werden. Dafür wurden HeLa-Wis-Zellen mit steigenden Dosen von AdG12 (MOI 1, 2, 5, 10, 15 und 20) transduziert und mit Dox (1 µg/ml) kultiviert. Nach 48 h wurden die Überstände mit CVB3 (MOI 0,1) bei 4 °C für 30 min präinkubiert und anschließend zur Infektion zurück auf die transduzierten Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Infektion bei 37 °C wurde die virushaltige Lösung durch frisches Medium ausgetauscht und die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert. Die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel wurde anschließend mittels Plaque Assay bestimmt.

Dabei wurde eine konzentrationsabhängige CVB3-Inhibierung durch AdG12-vermitteltes sCAR-Fc beobachtet (Abbildung 5.8). Mit steigender Vektordosis stieg auch die Inhibierung an, wobei für die beiden höchsten Vektordosen eine vollständige Inhibierung von CVB3 erreicht wurde. Bei der MOI von 1 oder 2 wurde eine Verringerung des CVB3-Titers um ½ bis 1 log₁₀-Stufe erreicht. Für die AdG12-MOI von 5 betrug die Inhibierung konstant 2 bis 3 log₁₀-Stufen. Größere Schwankungen wurden dagegen bei der verwendeten AdG12-MOI von 10 beobachtet. In einem der beiden durchgeführten Experimente führte sie bereits zu einer kompletten Virusinhibierung, während sie im zweiten Experiment den Virustiter lediglich um ca. 4 ½ log₁₀-Stufen senkte.

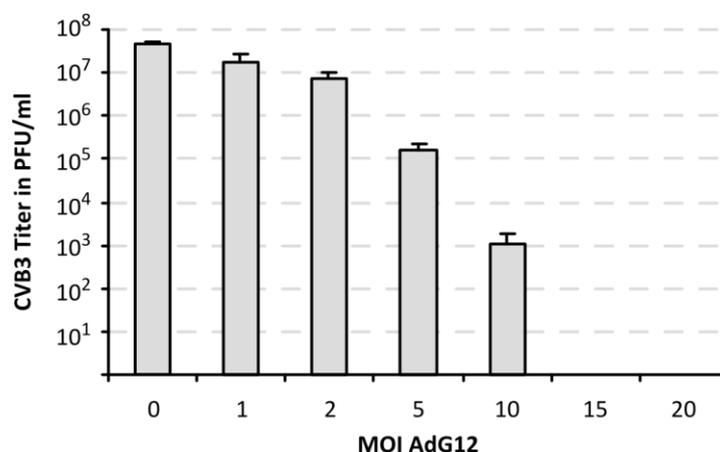


Abbildung 5.8: AdG12-vermittelte CVB3-Inhibierung im Zwei-Stufen Plaque Assay.

HeLa-Wis-Zellen wurden mit unterschiedlichen MOI AdG12 transduziert und in Anwesenheit von Dox (1 µg/ml) kultiviert. Nach 48 h wurden die Kulturüberstände mit CVB3 (MOI 0,1) für 30 min bei 4 °C präinkubiert und anschließend die transduzierten Zellen mit diesen Überständen infiziert. Nach weiteren 24 h Kultivierung und anschließendem Zellaufschluss wurden die CVB3-Titer mittels Plaque Assay bestimmt. Der 0-Wert stammt von untransduzierten Zellen, die in Anwesenheit von Dox kultiviert wurden. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte ± SEM aus 2 unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung.

ERGEBNISSE

Für die sich anschließenden Versuche zur Erkennung möglicher additiver antiviraler Effekte durch kombinatorische Anwendung von sCAR-Fc und shRdRP2.4, konnte auf Grund dieser Ergebnisse die optimale AdG12-Dosis mit MOI 5 abgeleitet werden. Diese gewährleistet eine konstant gut messbare Inhibierung von CVB3. Dabei wird allerdings keine Komplettinhibierung erreicht, welche die Untersuchung additiver Effekte verhindern würde.

5.1.6 Ein-Vektor-basierte Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und artifiziellen microRNAs (amiRNAs)

Die zuvor einzeln getesteten antiviralen Komponenten sCAR-Fc und shRdRP2.4 sollten im nächsten Schritt kombiniert gegen CVB3 eingesetzt werden. Dabei wäre eine gleichzeitige Expression beider Wirkstoffe vom selben Vektor wünschenswert, da sie einen therapeutischen Einsatz in der Klinik wahrscheinlicher machen würde. Da die Kapazität dimerischer AAV-Vektoren allerdings auf rund 2400 bp einschließlich der ITRs begrenzt ist, kommt die Kombination der sCAR-Fc-Expressionskassette (ca. 2100 bp) mit den U6-Promoter-shRNA-Kassetten (jeweils ca. 400 bp) nicht infrage. Eine Möglichkeit zur Verringerung der Größe der Expressionskassetten stellt die Umwandlung der shRNAs in amiRNAs dar. Dabei wird die shRNA in eine natürliche microRNA-Umgebung gesetzt. Anders als bei shRNAs erfolgt die Expression dieser amiRNAs dann über einen Polymerase II-Promoter, der zusätzlich auch noch die Expression eines Proteins (zum Beispiel sCAR-Fc) regulieren kann.

Initial wurden daher sämtliche shRNA-Sequenzen in die Umgebung der humanen microRNA 155 eingefügt. Die Expression der amiRNAs erfolgte über einen MLC260-Promoter, der durch einen CMV-Enhancer verstärkt wird. Dieser Promoter verfügt über eine gewisse Kardiospezifität im Vergleich zum ubiquitär wirksamen CMV-Promoter (141). Die Konstruktion der amiRNA-exprimierenden AAV-Basisplasmide ist in Anhang 3 beschrieben.

Die Shuttleplasmide der selbstkomplementären AAV-Vektoren wurden dabei so gebaut, dass der genomische Bereich einschließlich der ITRs eine vergleichbare Größe für alle Plasmide aufwies. So sollten für die später daraus gebauten AAV-Vektoren Unterschiede in der Transduktionseffizienz und damit der Wirksamkeit minimiert werden. Abbildung 5.9 zeigt schematisch die selbstkomplementären AAV-Vektoren zur Expression der antiviralen shRNAs bzw. amiRNAs und deren Kontrollen.

ERGEBNISSE

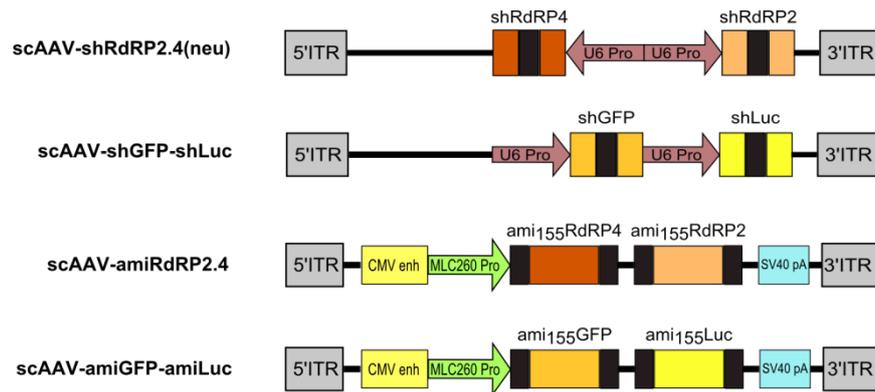


Abbildung 5.9: scAAV-Vektoren für die Expression antiviraler shRNAs und amiRNAs und deren Kontrollen.

Vektorkonstrukte zur Expression von shRdRP2 und shRdRP4 bzw. amiRdRP2 und amiRdRP4. Als Kontrollen dienten shRNAs bzw. amiRNAs gerichtet gegen GFP und Luciferase. Die Expression der shRNAs erfolgte durch U6-Promotoren, während ein durch einen CMV-Enhancer verstärkter MLC260-Promoter für die Expression der amiRNAs verwendet wurde. Der genomische Bereich einschließlich der ITRs betrug für alle 4 Vektoren rund 1600 bp.

In einem ersten Schritt wurden die amiRNA-Basisplasmide im Dual-Luciferase Reporterassay (Prinzip siehe Abbildung 5.4A) vergleichend mit den shRNA-Konstrukten auf ihre Fähigkeit zur Inhibierung der Renilla-Luciferase-Expression hin untersucht. Dabei waren sowohl shRdRP2.4 als auch amiRdRP2.4 effektiv in der Lage, die relative Luciferase-Expression signifikant zu senken (Abbildung 5.10). Die Stärke der Reduktion war dabei vergleichbar für beide Konstrukte. Durch die Kontrollplasmide wurde die relative Luciferase-Expression dagegen nicht wesentlich beeinflusst.

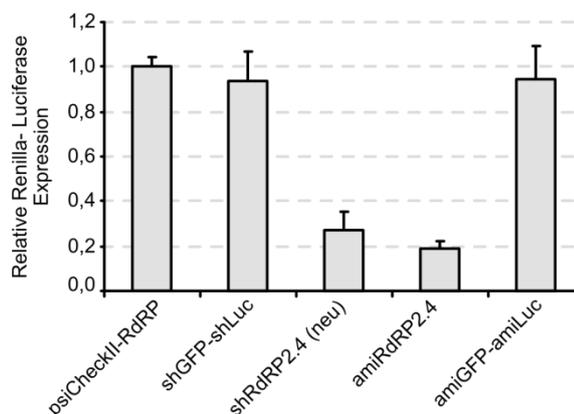


Abbildung 5.10: Dual-Luciferase Reporterassay zur Funktionsüberprüfung von shRdRP2.4(neu) und amiRdRP2.4.

HeLa-Zellen wurden mit 0,8 µg des Plasmides psiCheckII-RdRP und 0,8 µg des jeweiligen AAV-Shuttleplasmids cotransfiziert und 48 h später hinsichtlich der Luciferase-Expression untersucht. Die Normierung der Renilla-Luciferase erfolgte auf die Firefly-Luciferase. Die shLuc und amiLuc sind komplementär zu einer Luciferasesequenz designed, welche nicht in psiCheckII-RdRP enthalten ist und können daher als Kontrollen verwendet werden.

ERGEBNISSE

Auf Grund der Ergebnisse des Reporterassays wurden anschließend scAAV-Vektoren des Serotyps 2 produziert. Sie wurden im Zwei-Stufen Plaque Assay und Zellviabilitätsassay hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inhibierung der CVB3-Replikation untersucht. Dafür wurden HeLa-Wis-Zellen mit den jeweiligen Vektoren (10^5 VG/Zelle) transduziert und 48 h später mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte zu den angegebenen Zeiten. Die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel wurde 24 h nach Infektion durch Plaque Assays bestimmt.

Dabei war lediglich der shRdRP2.4-exprimierende Vektor scAAV2/2-shRdRP2.4(neu) in der Lage, die CVB3-Replikation effektiv zu inhibieren. Dies zeigte sich in einer Reduktion des CVB3-Titers im Zwei-Stufen Plaque Assay um ca. 2 \log_{10} -Stufen (Abbildung 5.11A). Diese ging einher mit einer gleichbleibend hohen Zellviabilität auf dem Niveau der nicht infizierten Zellen über den Untersuchungszeitraum von 72 h nach Infektion (Abbildung 5.11B). Die antiviralen amiRNAs, welche im Reporterassay noch eine zu den shRNAs vergleichbare Effektivität gezeigt hatten, waren in beiden hier durchgeführten Untersuchungsmethoden wirkungslos. So blieb der Virustiter der mit scAAV2/2-amiRdRP2.4 transduzierten Zellen mit rund 3×10^7 PFU/ml annähernd auf Kontrollniveau und die Zellen waren 72 h nach Infektion, genau wie die unbehandelten oder kontrollbehandelten Zellen, vollständig lysiert.

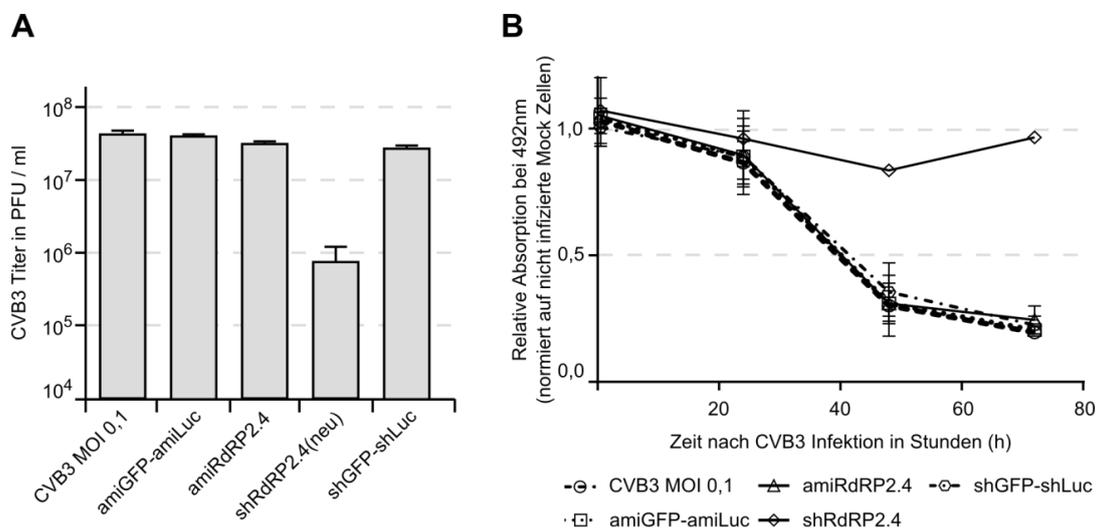


Abbildung 5.11: Inhibierung von CVB3 mittels shRdRP2.4(neu) und amiRdRP2.4.

A) Zwei-Stufen Plaque Assay: HeLa-Wis-Zellen wurden mit scAAV2/2-shRdRP2.4(neu) bzw. scAAV2/2-amiRdRP2.4 oder deren Kontrollen transduziert (10^5 VG/Zelle), 24 h später mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert und die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel durch Plaque Assay bestimmt. **B)** XTT-Zellviabilitätsassay: HeLa-Wis-Zellen wurden ebenfalls mit den shRNA- und amiRNA-exprimierenden scAAV-Vektoren transduziert, mit CVB3 infiziert und die Zellviabilität über 72 h gemessen. Als Referenz diente die Viabilität untransduzierter, nicht infizierter Mock-Zellen.

ERGEBNISSE

Um die Ursache für die fehlende Wirksamkeit der amiRNA-exprimierenden scAAV-Vektoren zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Expressionsstärke der amiRdRP2 bzw. 4 mit der von shRdRP2 bzw. 4 verglichen. Es konnte eine dosisabhängige Expression von siRdRP2 und siRdRP4 sowohl für die shRNA-exprimierenden als auch die amiRNA-exprimierenden AAV-Vektoren nachgewiesen werden (Abbildung 5.12). Die Expression der antiviralen siRNAs lag dabei allerdings deutlich höher für die shRNA-Konstrukte. So wurde die siRdRP2 abhängig von der Dosis zwischen 25- und 100-fach stärker durch das shRNA-Konstrukt exprimiert. Der Unterschied fiel für siRdRP4 noch wesentlich höher aus. Eine Expression dieser siRNA war bei der geringsten verwendeten Vektordosis von 1000 VG/Zelle für den amiRNA-Vektor nicht nachweisbar. Für die beiden höheren Vektordosen lag die Expression der siRdRP4 mehr als 5000-fach höher für den shRNA-Vektor im Vergleich zum amiRNA-Konstrukt. Die Expressionsdaten der antiviralen siRNAs korrelierten also mit der beobachteten fehlenden Wirksamkeit von amiRdRP2.4 im Plaque Assay und XTT-Zellviabilitätsassay.

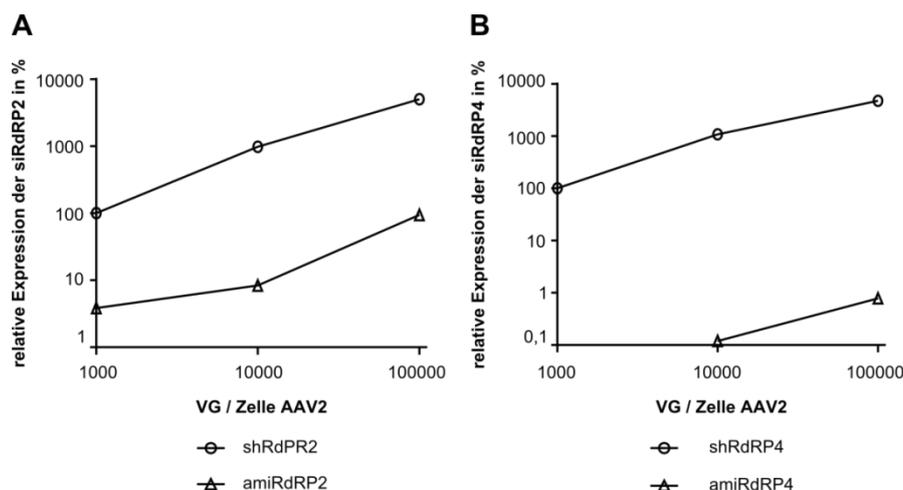


Abbildung 5.12: Expression von vektorvermittelten amiRNAs im Vergleich zu shRNAs.

HeLa-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von scAAV2/2-shRdRP2.4(neu) bzw. scAAV2/2-amiRdRP2.4 transduziert und die Expressionsstärke der antiviralen siRNAs 48 h später mittels RT-qPCR bestimmt. Die Normierung erfolgte dabei auf die 18 S rRNA. Die Expressionsstärke der jeweiligen siRNA bei Transduktion mit 1000 VG/Zelle von scAAV2/2-shRdRP2.4(neu) wurde auf 100 % gesetzt. **A)** Expression siRdRP2. **B)** Expression siRdRP4.

Mögliche Ursachen für die zu geringe Expression der antiviralen amiRNAs können einerseits ein zu schwacher Promoter oder andererseits Probleme bei der Verpackung der Plasmide in scAAV-Vektoren sein. Um die Gründe näher zu untersuchen, wurden im Folgenden

ERGEBNISSE

Ausgangsplasmide zur Produktion selbstkomplementärer AAV-Vektoren kloniert, welche einen CMV-Promoter zur Expression der amiRdRP2 bzw. amiLuc verwenden. Damit sollte einerseits der Einfluss eines abweichenden Promoters auf die Expressionsstärke der amiRNAs untersucht werden. Zum Anderen sollte ausgeschlossen werden, dass das unmittelbare Hintereinanderschalten zweier amiRNAs im selben Vektor zu Problemen in der Verpackung der Vektoren oder Expression der amiRNAs führt. Die so produzierten Plasmide enthielten außerdem noch die für sCAR-Fc bzw. eine trunkierte Version des Moleküls kodierende Sequenz unter Kontrolle desselben CMV-Promoters. So konnten die Konstrukte außerdem zur Untersuchung möglicher additiver Anti-CVB3-Effekte von sCAR-Fc und amiRdRP2 verwendet werden. Die Konstruktion der Plasmide ist ausführlich in Anhang 3 beschrieben.

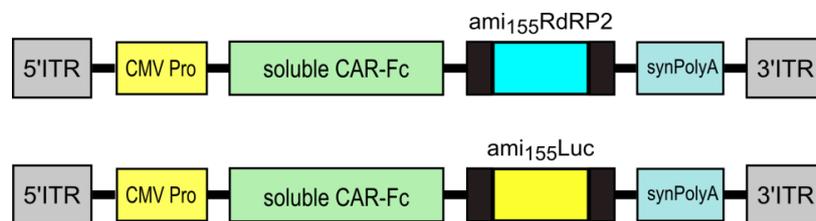


Abbildung 5.13: sAAV-Vektoren zur gleichzeitigen Expression von sCAR-Fc und amiRNAs.

Vektorkonstrukte zur Expression von sCAR-Fc und amiRdRP2 bzw. amiLuc unter Kontrolle eines CMV-Promoters (CMV Pro). Die artifizellen microRNAs sind in die 3'UTR von sCAR-Fc eingebaut. Die amiLuc (artifizielle microRNA gegen Luciferase) dient als Kontrolle zur amiRdRP2. Zwei weitere baugleiche Konstrukte standen mit einer trunkierten Version von sCAR-Fc zur Verfügung, bei der das Codon der 6. AS von sCAR-Fc durch ein STOP-Codon ausgetauscht war (Bilder nicht gezeigt). Die ITRs (inverted terminal repeats) stammen von AAV Typ 2, wobei eine Deletion in der 3' ITR zur Ausbildung der sAAV-Vektoren führt; synPolyA: synthetisches Polyadenylierungssignal.

Basierend auf den in Abbildung 5.13 gezeigten Basisplasmiden wurden AAV-Vektoren des Serotyps 2 produziert und hinsichtlich der Expression von sCAR-Fc bzw. amiRdRP2 untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit steigenden Vektordosen (10^3 , 10^4 , 10^5) je Zelle transduziert, und die Expression von sCAR-Fc bzw. amiRdRP2 wurde 48 h später analysiert. Dabei konnte für beide Vektoren, welche die amiRdRP2 kodieren (sAAV2/2-sCAR-Fc-amiRdRP2; sAAV2/2-sCAR_{trunc}-amiRdRP2), eine dosisabhängige Expression der amiRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vergleichende Aussagen über die Stärke der Expression waren dabei nicht möglich, da kein vergleichendes Konstrukt vorlag, welches lediglich die shRdRP2 unter Kontrolle eines U6-Promoters exprimiert. Ein Nachweis der sCAR-Fc-Expression durch die Vektoren sAAV2/2-sCAR-Fc-amiRdRP2 und sAAV2/2-sCAR-Fc-amiLuc war erst bei der höchsten Vektordosis von 10^5 VG/Zelle möglich. Die für diese Konzentration erzielte sCAR-Fc-

ERGEBNISSE

Konzentration lag bei rund 50 ng/ml (Mittelwert aus Dreifachbestimmung). Diese Konzentration liegt deutlich unter den wirksamen Konzentrationen von sCAR-Fc (≈ 500 ng/ml), welche durch Transduktion von HeLa-Zellen mit dem adenoviralen Vektor AdG12 (MOI 5) in den Vorexperimenten erzielt worden waren (siehe Abbildung 5.7).

Im Folgenden sollte trotz der vergleichsweise geringen Expression von sCAR-Fc die Wirksamkeit der in Abbildung 5.13 beschriebenen scAAV-Vektoren hinsichtlich ihrer CVB3-inhibierenden Fähigkeiten getestet werden. Dafür wurden erneut, wie bereits für die Doppel-amiRNA-Vektoren beschrieben, Zwei-Stufen Plaque Assays und Zellviabilitätsassays durchgeführt.

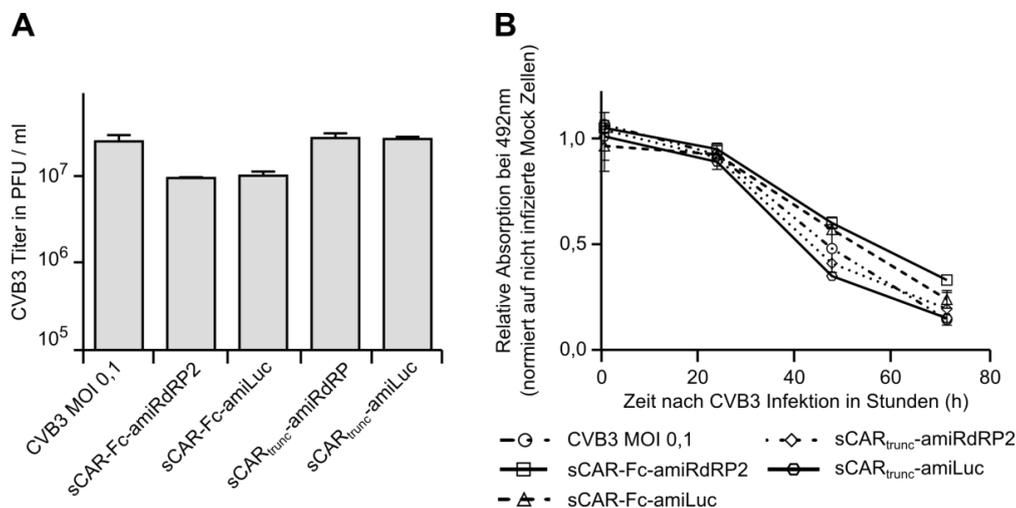


Abbildung 5.14: Inhibition von CVB3 mittels scAAV-vektorvermittelter Expression von sCAR-Fc und amiRdRP2.

A) Zwei-Stufen Plaque Assay: HeLa-Wis-Zellen wurden mit scAAV2/2-sCAR-Fc-amiRdRP2, scAAV2/2-sCAR-Fc-amiLuc, scAAV2/2-sCAR_{trunc}-amiRdRP2 oder scAAV2/2-sCAR_{trunc}-amiLuc (10^5 VG/Zelle) transduziert, mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert und die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel 24 h später durch Plaque Assay bestimmt. **B)** XTT-Zellviabilitätsassay: HeLa-Wis-Zellen wurden wie in A beschrieben transduziert und infiziert und die Zellviabilität über 72 h gemessen. Als Referenz diente die Viabilität untransduzierter, nicht infizierter Mock-Zellen.

Dabei zeigte sich, wie schon zuvor für die amiRdRP2.4-Konstrukte beschrieben, dass die vektorvermittelte Expression von amiRdRP2 nicht zu einer Inhibition der CVB3-Replikation führt. Der Virustiter und die Zellviabilität der mit scAAV2/2-sCAR_{trunc}-amiRdRP2 transduzierten und mit CVB3 infizierten Zellen waren vergleichbar zu denen unbehandelter bzw. Kontroll-behandelter, infizierter Zellen. Auch die Expression von sCAR-Fc führte nur zu einer geringfügigen Virusinhibition. So wurde der Virustiter im Zwei-Stufen Plaque Assay um ca. $\frac{1}{2}$ log₁₀-Stufe gesenkt. Dabei spielte es keine Rolle, ob zusätzlich zum löslichen Rezeptor noch

ERGEBNISSE

die amiRdRP2 oder amiLuc exprimiert wurde. Auch die Zellviabilität der mit sCAR-Fc behandelten Zellen lag nur geringfügig höher als die der unbehandelten, CVB3-infizierten Zellen. Ein deutlicher Schutz vor virusbedingter Zellyse konnte nicht erzielt werden.

Zusammenfassend konnte im Abschnitt 5.1.6 gezeigt werden, dass die vektorvermittelte Expression von amiRdRP2 bzw. amiRdRP4 nicht zu einer effektiven Inhibierung von CVB3 *in vitro* führte. Dabei war es unerheblich, ob beide amiRNAs gleichzeitig vom selben Vektor exprimiert wurden oder lediglich eine amiRNA durch den Vektor kodiert wurde. Durch den Austausch des Promoters konnte keine Verbesserung hinsichtlich der Expressionsstärke erzielt werden. Die fehlende Wirksamkeit der amiRNAs beschränkte sich außerdem ausschließlich auf die Vektorebene. Im Reporterassay auf Plasmidebene konnten amiRdRP2 und 4 die Translation des Reporterkonstrukts effizient inhibieren, vergleichbar zum Inhibierungslevel von shRdRP2.4. Wurde zusätzlich zur amiRNA ein Transgen (sCAR-Fc) vom selben Vektor exprimiert, so lag auch dessen Expression erheblich unter der zu erwartenden Expressionsstärke. Die Kombination der beiden antiviralen Komponenten auf einem Vektor war auf Grund der erzielten niedrigen Expression beider Substanzen somit nicht möglich. Zur Durchführung der sCAR-Fc- und shRdRP2.4-anti-CVB3-Kombinationstherapie mussten daher im Folgenden zwei einzelne virale Vektoren (AdG12 und scAAV-shRdRP2.4) verwendet werden.

5.1.7 Inhibierung von CVB3 durch Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4

in vitro

Um die Fragestellung zu klären, ob sCAR-Fc und shRdRP2.4 generell in der Lage sind, additive antivirale Effekte gegen CVB3 zu erwirken, wurden Plaque Assays durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Wis-Zellen mit AdG12 (MOI 5) und scAAV2/2-shRdRP2.4 (2×10^4 VG/Zelle) sowohl einzeln als auch in Kombination transduziert, mit und ohne Dox (1 µg/ml) kultiviert und 48 h später mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert. Die verwendeten Vektordosen wurden dabei entsprechend der Vorversuche so gewählt, dass additive Effekte zu erkennen sein sollten. Direkt nach Infektion wurden die Zellen mit agarhaltigem Medium bedeckt und weitere 48 h kultiviert. Der Konfluenzgrad des Zellrasens wurde mittels Kristallviolett-Färbung beurteilt.

ERGEBNISSE

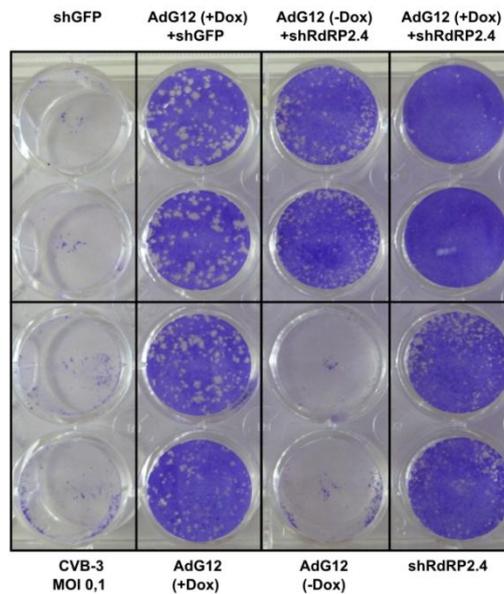


Abbildung 5.15: Plaque Assay zur Beurteilung möglicher additiver Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4.

HeLa-Wis-Zellen wurden mit den angezeigten viralen Vektoren transduziert, mit und ohne Dox (1 µg/ml) kultiviert, 48 h später mit CVB3 infiziert und direkt mit agarhaltigem Medium bedeckt. Nach weiteren 48 h erfolgte die Beurteilung des Konfluenzgrades des Zellrasens mittels Kristallviolett-Färbung. Die Abbildung ist exemplarisch für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche, jeweils in Doppelbestimmung.

Unbehandelte Zellen waren 48 h nach Infektion komplett lysiert. Das gleiche Bild zeigte sich für die Zellen, welche mit dem Kontrollvektor scAAV2/2-shGFP bzw. mit dem Vektor AdG12 transduziert und in Abwesenheit von Dox kultiviert worden waren (Abbildung 5.15). Der lösliche Virusrezeptor sCAR-Fc vermittelte einen teilweisen Schutz der Zellen gegen die virusbedingte Zelllyse, was durch einen Konfluenzgrad von ca. 50 % verdeutlicht wurde. Dabei waren keine Unterschiede ersichtlich zwischen Zellen, die mit AdG12 in Anwesenheit von Dox behandelt worden waren und Zellen, die zusätzlich noch den Kontrollvektor scAAV2/2-shGFP erhalten hatten. Auch die antiviralen shRNAs (shRdRP2.4) vermittelten einen teilweisen Schutz gegen CVB3. Der Konfluenzgrad der mit scAAV2/2-shRdRP2.4 behandelten Zellen lag ebenfalls bei ca. 50 %, wobei auffallend war, dass die entstehenden Plaques wesentlich kleiner waren als in den mit sCAR-Fc behandelten Proben. Gleiches traf für die Zellen zu, die neben dem wirksamen AAV2/2-Vektor noch zusätzlich mit AdG12, allerdings in Abwesenheit des Aktivators Dox, transduziert worden waren. Der höchste Konfluenzgrad von nahezu 100 % wurde beobachtet für die mit sCAR-Fc und shRdRP2.4 behandelten Zellen. Die Anzahl und Größe der Plaques war in diesem Fall erheblich geringer als für die einfach behandelten Zellen. Dadurch konnte qualitativ gezeigt werden, dass die kombinatorische Anwendung von sCAR-Fc

ERGEBNISSE

und shRdRP2.4 zu einem stärkeren Schutz gegen virusbedingte Zellyse führt, als die individuelle Anwendung beider Substanzen.

Mithilfe der durchgeführten Plaque Assays konnte allerdings keine Aussage über das Ausmaß des beobachteten additiven Effekts getroffen werden. Deshalb wurden im Anschluss Zwei-Stufen Plaque Assays zur Quantifizierung replikationskompetenter CVB3-Partikel durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Wis-Zellen, wie zuvor beschrieben, mit AdG12 und scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP transduziert und mit bzw. ohne Dox kultiviert. Nach zwei Tagen Kultivierung wurden die Überstände der Zellen mit CVB3 (MOI 0,1) bei 4 °C für 30 min präinkubiert und anschließend zurück auf die transduzierten Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Infektionsdauer wurde das Medium erneuert und die Zellen wurden für weitere 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die in den Zellen und Zellkulturüberständen enthaltenen CVB3-Partikel mittels Plaque Assay quantifiziert.

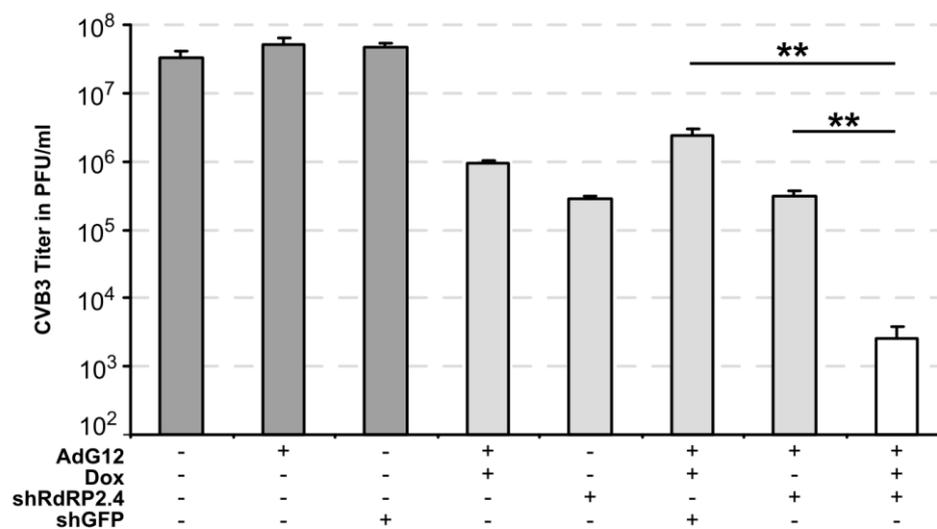


Abbildung 5.16: Zwei-Stufen Plaque Assay zur Beurteilung antiviraler Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4.

HeLa-Wis-Zellen wurden mit AdG12 (MOI 5), scAAV2/2-shRdRP2.4 und scAAV2/2-shGFP (beide je 2×10^4 VG/Zelle) transduziert und mit und ohne Dox (1 µg/ml) für 48 h kultiviert. Die Zellkulturüberstände wurden 30 min bei 4 °C mit CVB3 (MOI 0,1) vorinkubiert und anschließend erneut auf die transduzierten Zellen gegeben. Die Bestimmung der replikativen CVB3-Menge erfolgte 24 h später mittels Plaque Assay. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. (** \triangleq P<0,01)

ERGEBNISSE

Dabei zeigten unbehandelte, genau wie kontrollbehandelte Zellen den höchsten CVB3-Titer von ca. 5×10^7 PFU/ml (Abbildung 5.16). Sowohl sCAR-Fc, als auch shRdRP2.4 waren in der Lage, den CVB3-Titer signifikant im Vergleich zu allen Kontrollgruppen zu senken. Dabei lag der Virustiter in den mit sCAR-Fc behandelten Proben um 1 bis $1 \frac{1}{2}$ \log_{10} -Stufen niedriger als bei den Kontrollen. Die Behandlung der Zellen mit scAAV2/2-shRdRP2.4 führte zu einer Verringerung des Virustiters um ca. 2 \log_{10} -Stufen. Der größte protektive Effekt wurde erneut für die Zellen erzielt, welche sowohl mit AdG12 als auch scAAV2/2-shRdRP2.4 transduziert worden waren und deren Kultivierung in Anwesenheit von Dox erfolgte. Die Verringerung des CVB3-Titers betrug dabei rund 4 \log_{10} -Stufen. Der beobachtete additive Effekt war signifikant mit $P < 0,01$ im Vergleich zu den Effekten, welche durch die Einzelbehandlung erzielt worden waren.

Der additive antivirale Effekt wurde ebenfalls durch Zellviabilitätsassays bestätigt. Hierfür wurden HeLa-Wis-Zellen wie für die Zwei-Stufen Plaque Assays beschrieben, transduziert und mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert. Die Zellviabilität wurde täglich über einen Zeitraum von 72 h gemessen und ist in Abbildung 5.17 in Relation zur Viabilität unbehandelter, nicht infizierter Zellen dargestellt.

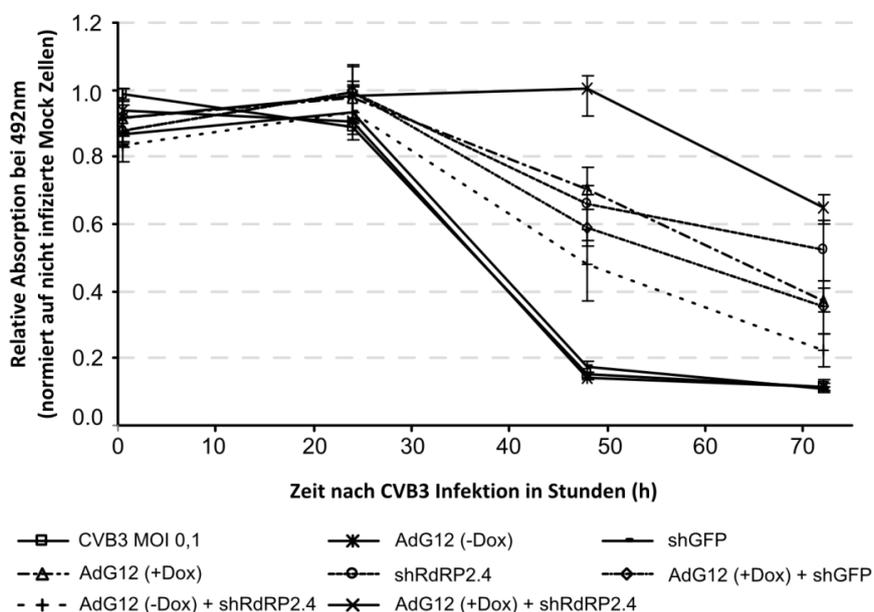


Abbildung 5.17: Zellviabilitätsassay zur Beurteilung additiver antiviraler Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4. HeLa-Wis-Zellen wurden mit AdG12 (MOI 5) und scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP (je 2×10^4 VG/Zelle) transduziert, mit bzw. ohne Dox (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert und 48 h später mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert. Die Zellviabilität wurde mittels XTT-Assay über einen Zeitraum von 72 h beobachtet und ist relativ zur Viabilität unbehandelter, nicht infizierter Mock-Zellen dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt in Vierfachbestimmung.

ERGEBNISSE

Einen Tag nach Infektion der Zellen mit CVB3 zeigten sich noch keine Unterschiede in Bezug auf die Zellviabilität zwischen den verschiedenen Gruppen. Weitere 24 h später waren sämtliche unbehandelten, CVB3-infizierten Zellen vollständig lysiert. Gleiches galt auch für die mit dem Kontrollvektor scAAV2/2-shGFP transduzierten Zellen und für Zellen, welche mit AdG12 transduziert worden waren und deren Kultivierung ohne Dox erfolgte. Die Viabilität der mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 behandelten Zellen lag dagegen zu diesem Zeitpunkt noch bei 50 bis 70 % im Vergleich zu den Mock-Zellen. Auch 72 h nach Infektion waren diese Zellen noch nicht vollständig lysiert, was durch eine relative Absorption von ca. 25 bis 50 % verdeutlicht wird. Somit konnten sCAR-Fc und shRdRP2.4 auch im Zellviabilitätsassay einen teilweise protektiven Effekt gegenüber CVB3-bedingter Zellyse ausüben. Der additive antivirale Effekt durch Kombinationsgabe von sCAR-Fc und shRdRP2.4 wurde erneut deutlich. Die Doppelbehandlung schützte die Zellen zu 100 % vor virusbedingter Lyse 48 h nach Infektion, so dass die Zellviabilität auf Kontrollniveau verblieb. Weitere 24 h später verblieb die Zellviabilität noch bei rund 70 % im Vergleich zu den Mock-Zellen und damit signifikant höher als bei allen einfach behandelten Zellen.

Um die Spezifität des beobachteten additiven antiviralen Effektes nachzuweisen, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Dabei sollte sowohl die Dosis des scAAV2-Vektors als auch die AdG12-Dosis variiert werden. Die Vorexperimente mit AdG12 zeigten allerdings, dass MOIs oberhalb von 5 zu einer vollständigen Inhibierung von CVB3 führen können. Additive Effekte könnten in diesem Fall nicht nachgewiesen werden. Wurden MOIs kleiner als 5 verwendet, konnte die CVB3-Replikation in einigen Fällen um ca. 1 \log_{10} -Stufe inhibiert werden. In anderen Fällen war allerdings nahezu keine Wirkung ersichtlich. Lediglich bei der verwendeten AdG12-MOI von 5 betrug die Replikationsinhibierung nahezu konstant $1\frac{1}{2}$ bis 3 \log_{10} -Stufen. Diese Inhibierung war ausreichend groß, um den individuellen Effekt, welcher durch sCAR-Fc hervorgerufen wird, zu erkennen. Gleichzeitig blieb durch die unvollständige Inhibierung ausreichend Spielraum, um additive Effekte zu erzielen. Für die Dosis-Wirkungs-Experimente wurde daher die Dosis des Vektors AdG12 konstant bei einer MOI von 5 belassen und lediglich die Dosis der eingesetzten scAAV2/2-Vektoren variiert. Die verwendete Dosis für die scAAV2/2-Vektoren wurde dabei von 10^3 stufenweise auf 2×10^4 VG/Zelle erhöht. Zur Beurteilung der antiviralen Effekte wurden wie bereits zuvor für Abbildung 5.16 beschrieben, Zwei-Stufen Plaque Assays durchgeführt.

ERGEBNISSE

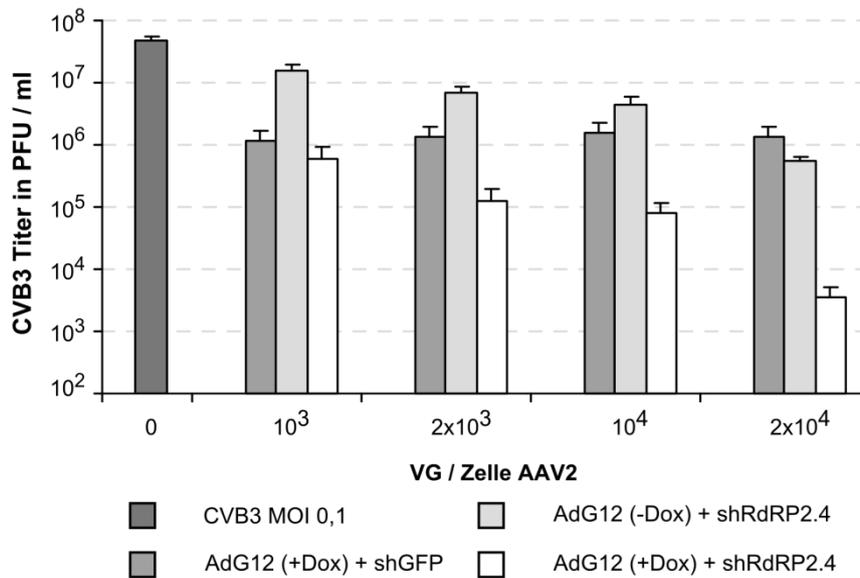


Abbildung 5.18: Dosis-Wirkungskurve für scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP in Kombination mit AdG12. HeLa-Wis-Zellen wurden mit AdG12 (MOI 5) und ansteigenden Konzentrationen von scAAV2/2-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/2-shGFP transduziert und - wo angezeigt - mit Dox (1 µg/ml) kultiviert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit CVB3 (MOI 0,1) infiziert und für weitere 24 h kultiviert. Die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel wurde mittels Plaque Assay bestimmt. (Daten sind Mittelwerte ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung.)

Unbehandelte, mit CVB3 infizierte Zellen, zeigten einen Virustiter von ca. 5×10^7 PFU/ml (Abbildung 5.18). Soluble CAR-Fc führte zu einer Verringerung des CVB3-Titers um rund $1\frac{1}{2}$ \log_{10} -Stufen, unabhängig von der Dosis des zusätzlich applizierten Kontroll-AAV-Vektors scAAV2/2-shGFP. Die Inhibierung von CVB3, hervorgerufen durch scAAV2/2-shRdRP2.4, betrug rund $\frac{1}{2}$ \log_{10} -Stufe bei der Dosis von 1000 VG/Zelle. Dabei stieg die Inhibierung mit steigenden Konzentrationen des verabreichten Vektors an und erreichte bei der höchsten verwendeten Dosis von 20.000 VG/Zelle ihr Maximum bei ca. 2 \log_{10} -Stufen. Auch der bereits beobachtete additive antivirale Effekt folgte dieser Dosisabhängigkeit. So betrug die Inhibierung des CVB3-Titers, hervorgerufen durch AdG12 (MOI 5) in Anwesenheit von Dox und 1000 VG/Zelle scAAV2/2-shRdRP2.4 rund 2 \log_{10} -Stufen, während sie bei der höchsten, in diesem Dosisexperiment verwendeten Vektordosis von 20.000 VG/Zelle rund 4 \log_{10} -Stufen erreichte. Diese Daten verdeutlichen, dass der beobachtete additive antivirale Effekt spezifisch durch sCAR-Fc und die antiviralen shRNAs hervorgerufen wird. Unspezifische Effekte, welche allgemein durch AAV-Vektoren, oder durch Kontroll-shRNAs wie zum Beispiel shGFP

ERGEBNISSE

hervorgerufen werden, können für den hier verwendeten Konzentrationsrahmen ausgeschlossen werden.

5.1.8 Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats für *in vivo* Experimente

Um die sCAR-Fc- und shRdRP2.4-Kombinationstherapie in einem *in vivo* Modell anzuwenden, war es zuerst nötig ein CVB3-Isolat zu generieren, welches nicht nur *in vitro* einen zytopathischen Effekt auf HeLa-Zellen ausübt, sondern *in vivo* zu einer inflammationsbedingten Schädigung des kardialen Gewebes führt. Die Virulenz des Virus darf dabei einerseits nicht so stark sein, dass die Versuchstiere bereits vor Ende des eigentlichen Versuchszeitraumes auf Grund tierschutzrechtlicher Bestimmungen getötet werden müssen. Andererseits muss eine ausreichend starke Inflammation im Herzen erzielt werden, so dass keine der beiden Einzeltherapien mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 bereits zu einer vollständigen Heilung führt und additive antivirale Effekte verborgen bleiben.

Um die Virulenz verschiedener Virusstämme *in vivo* zu testen, wurden 5 bis 6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit verschiedenen Dosen CVB3 infiziert und 6 Tage später hinsichtlich der Stärke der kardialen Infektion und Inflammation beurteilt. Hierfür wurden einerseits HE-Färbungen des Herzens und andererseits Plaque Assays von Herzlysaten durchgeführt. Außerdem sollte die Toxizität für andere Organe wie zum Beispiel Pankreas und Leber durch histologische Begutachtung untersucht werden.

Initial wurde ein CVB3-Isolat getestet, welches *in vitro* zu einem starken zytopathischen Effekt in HeLa-Zellen führte (CVB3_{in vitro}). Es wurden 5 Mäuse mit jeweils 5×10^5 PFU CVB3_{in vitro} infiziert. Als Vergleich diente eine mit PBS scheininfizierte Maus. Alle mit CVB3_{in vitro} infizierten Mäuse, zeigten einen typischen Gewichtsverlust, welcher ca. 2 Tage nach Infektion einsetzte und am Tag 6 seinen Höhepunkt mit knapp 20 % des Ausgangsgewichts erreichte (Daten nicht gezeigt). Die Kontrollmaus legte dagegen während der sechstägigen Untersuchungszeit an Gewicht zu.

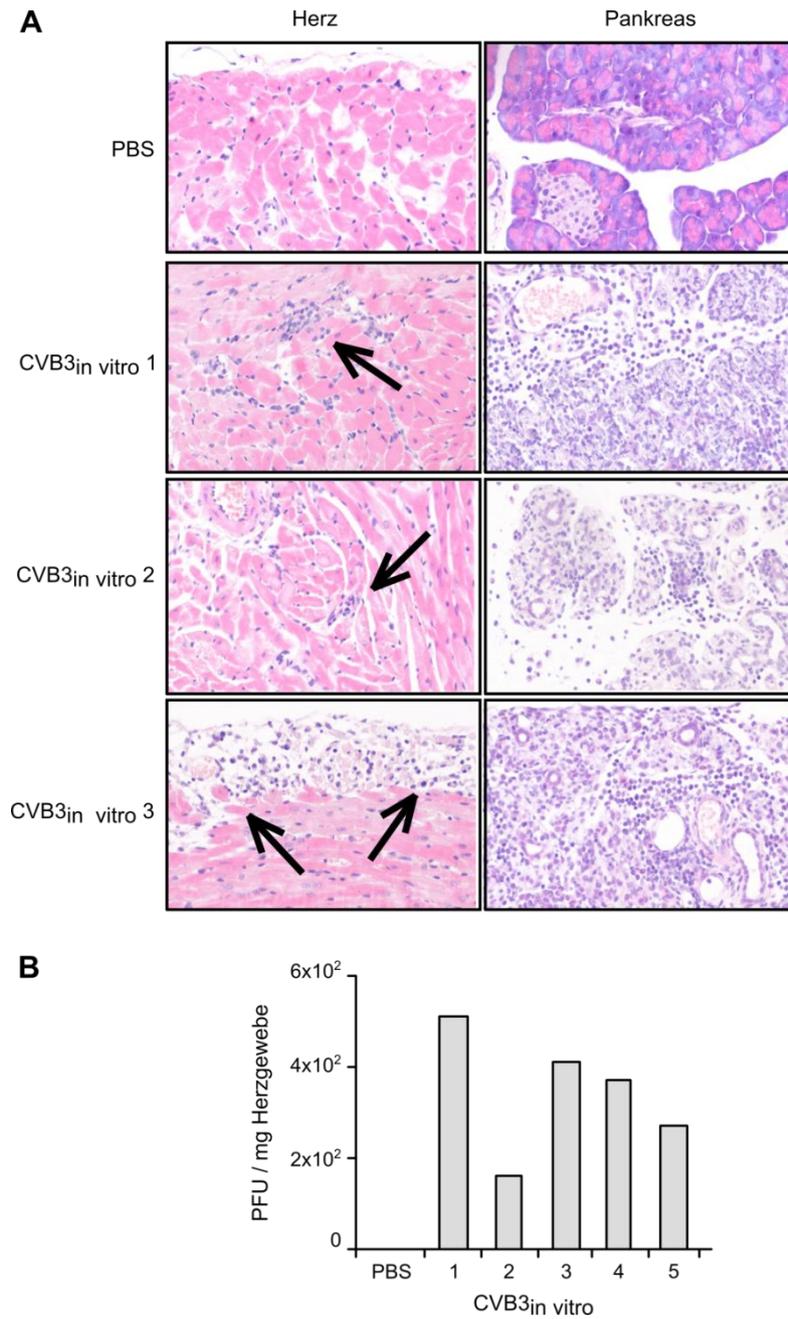


Abbildung 5.19: Einfluss der CVB3_{in vitro}-Infektion auf Gewebeintegrität und Virustiter im Herzen.

5-6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse wurden mit 5×10^5 PFU CVB3_{in vitro} infiziert. Als Kontrolle diente ein scheininfiziertes PBS-Tier. Sechs Tage später wurden alle Tiere euthanasiert. **A)** Exemplarische HE-Färbung von Herz und Pankreas dreier infizierter Tiere sowie des PBS-Kontrolltieres, Pfeile zeigen Inflammationsherde im Herzen an. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Klopfeisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. **B)** Virustiter im Herzgewebe aller Tiere.

ERGEBNISSE

Alle mit dem Virus CVB3_{in vitro} infizierten Tiere zeigten in der HE-Färbung eine ausgeprägte Pankreatitis. Intakte Organstrukturen waren im Vergleich zum PBS-Tier nicht mehr zu erkennen. Die Leber aller untersuchten Tiere wies keine Veränderungen auf (Bilder nicht gezeigt). Das Herz der infizierten Mäuse zeigte kaum Veränderungen im Vergleich zum PBS-Tier (siehe Abbildung 5.19A). Zwei der fünf infizierten Versuchstiere zeigten dabei gar keine Veränderung (Bilder nicht gezeigt). Die anderen drei Tiere wiesen lediglich eine geringgradige Inflammation mit minimaler Infiltration von Immunzellen auf, wobei bei Maus 3 eher das Epikard als das Myokard betroffen war. Die beobachtete Inflammation im Herzen der Tiere 1 bis 3 entspricht dabei einem Myokarditis-Score von 1, während die beiden nicht von Inflammation betroffenen Tiere, sowie das PBS-Tier mit dem Myokarditis-Score von 0 bewertet wurden. Die geringfügige Inflammation im Herzen ging einher mit niedrigen Virustitern im kardialen Gewebe. So betrug der durchschnittliche Virustiter aller 5 infizierten Mäuse lediglich $3,4 \times 10^2$ PFU/mg Herzgewebe (Abbildung 5.19B). Für das PBS-infizierte Kontrolltier konnten keine replikationskompetenten CVB3-Partikel im Herzen nachgewiesen werden.

Das Virusisolat CVB3_{in vitro} erwies sich damit auf Grund des niedrigen Inflamationslevels im Herzen als nicht geeignet, um mögliche additive Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4 *in vivo* zu untersuchen.

In einem zweiten *in vivo* Vorversuch wurden nun 3 verschiedene CVB3-Isolate hinsichtlich ihrer Kardiopathogenität untersucht. Das Isolat CVB3_{Tübingen} wurde bereits in einem länger zurück liegenden Versuch erfolgreich *in vivo* eingesetzt und ist ein Isolat des Nancy-Stammes. Das Isolat CVB3_{chronisch} führt in NMRI-Mäusen zu chronischer Myokarditis (46) und sollte hier nun hinsichtlich seines Potentials zur Erzeugung akuter Myokarditis in Balb/c-Mäusen untersucht werden. Es wurde durch mehrmalige Herzpassagierung mit anschließender Aufreinigung aus einem Nancy-Isolat generiert. Außerdem wurde das Isolat CVB3_{1,HP} untersucht. Es wurde isoliert aus den Herzen von mehreren Mäusen, welche mit CVB3_{Tübingen} infiziert waren. Es wurden jeweils 4 Mäuse mit 5×10^4 PFU des entsprechenden Virus infiziert und erneut 6 Tage später analysiert. Die im Vergleich zum ersten Vorversuch niedrigere Virusdosis wurde gewählt, da der Gewichtsverlust der Mäuse während des ersten Versuchs bereits nah an der Maximalgrenze von 20 % des Ausgangsgewichts lag. Im Falle einer höheren Virulenz der jetzt eingesetzten Isolate wäre ein noch höherer Gewichtsverlust zu erwarten gewesen, welcher einen vorzeitigen Abbruch des Experiments erforderlich gemacht hätte.

ERGEBNISSE

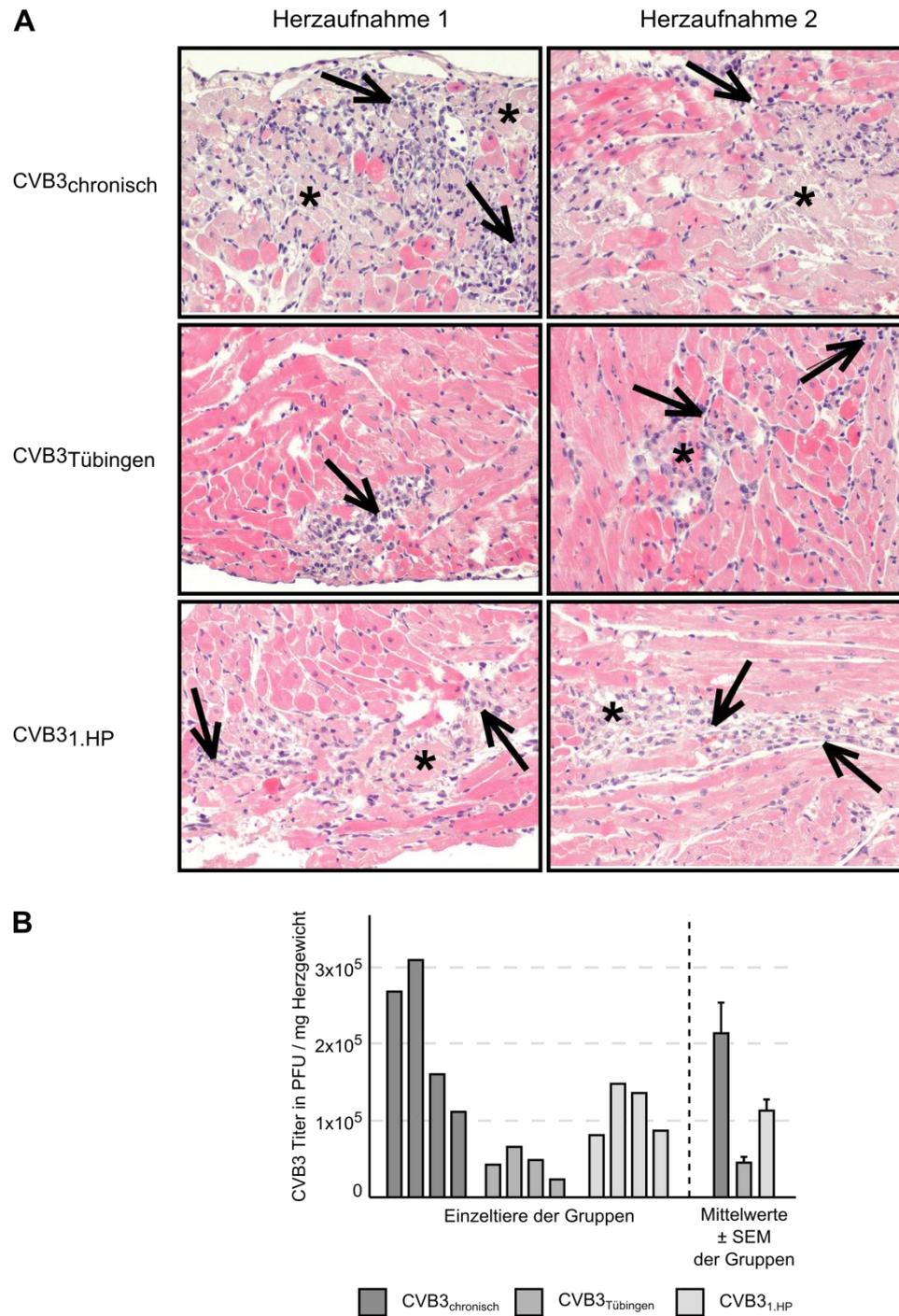


Abbildung 5.20: Einfluss der CVB3_{chronisch}-, CVB3_{Tübingen}- und CVB3_{1,HP}-Infektion auf Gewebeeintegrität und Virustiter im Herzen.

5-6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse wurden mit je 5×10^4 PFU des jeweiligen CVB3-Isolats infiziert und 6 Tage später euthanasiert und analysiert. Zwei Tiere der Gruppe CVB3_{chronisch} wurden bereits an Tag 5 nach Infektion euthanasiert. **A)** Exemplarische HE-Färbungen vom Herz des stärksten von Inflammation betroffenen Tieres jeder Gruppe. Pfeile zeigen Inflammationsherde, Sternchen Nekroseherde an. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. **B)** Virustiter im Herzgewebe aller Tiere und Mittelwert \pm SEM jeder Gruppe.

ERGEBNISSE

Sämtliche infizierten Mäuse wiesen erneut eine starke Pankreatitis mit Inflammation und Nekrosen, vergleichbar zu der im ersten *in vivo* Vorversuch beobachteten, auf (Bilder nicht gezeigt). Dabei zeigten sich lediglich geringfügige Unterschiede zwischen den verwendeten Virusstämmen. Die Leber aller infizierten Mäuse war dagegen unauffällig. Alle mit den verschiedenen CVB3-Isolaten infizierten Tiere verloren während des sechstägigen Untersuchungszeitraumes erheblich an Gewicht, was auf eine erfolgreiche Infektion mit CVB3 hinweist und auf die beobachtete Pankreatitis zurückzuführen ist. Den höchsten Gewichtsverlust sowie das schlechteste Allgemeinbefinden zeigten dabei die mit CVB3_{chronisch} infizierten Mäuse. Zwei der mit diesem Isolat infizierten Tiere mussten bereits an Tag 5 nach Infektion getötet werden, da ihr Gewicht einerseits 80 % des Ausgangsgewichts erreichte und sie außerdem apathisches Verhalten zeigten. Beide Beobachtungen stellen ein Abbruchkriterium nach tierschutzrechtlichen Bestimmungen dar. Daher können diese beiden Tiere beim Vergleich des Herzinflammationslevels nur bedingt berücksichtigt werden. Zusätzlich zur histologischen Beurteilung wurden erneut die CVB3-Titer im Herzen aller Mäuse mittels Plaque Assay bestimmt (Abbildung 5.20B). Dabei bestätigte sich die Tendenz hinsichtlich der Virulenz der verschiedenen Isolate aus der histologischen Bewertung. Der höchste CVB3-Titer wurde für das Isolat CVB3_{chronisch} mit durchschnittlich $2,14 \times 10^5$ PFU/mg Herzgewebe gefunden. Dabei wiesen die am Tag 5 getöteten Tiere die höchsten Viruskonzentrationen auf, was mit ihrem beobachteten schlechten Allgemeinzustand korrelierte. Der durchschnittliche Virustiter für die mit CVB3_{Tübingen} infizierten Mäuse lag bei $4,50 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe und damit rund eine halbe \log_{10} -Stufe niedriger als bei den mit CVB3_{1,HP} infizierten Tieren ($1,13 \times 10^5$ PFU/mg Herzgewebe).

Die folgende Tabelle 5.1 gibt die Beurteilung des Inflammationslevels sowie die Schwere der Nekrosebildung im kardialen Gewebe aller 12 Mäuse des zweiten *in vivo* Vorversuches zusammengefasst wieder. Sie verdeutlicht erneut die Unterschiede hinsichtlich der Virulenz der verschiedenen Virusisolate.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.1: Schwere der Inflammation bzw. Nekrosebildung im Herzen 6 Tage nach Infektion mit 5×10^4 PFU unterschiedlicher CVB3-Isolate.

Das maximal im Experiment aufgetretene Inflammations- bzw. Nekroselevel wurde mit +++ bewertet, die Bewertung der anderen Tiere orientierte sich an dieser Bewertung. Die mit * gekennzeichneten Tiere wurden auf Grund ihres schlechten Allgemeinzustandes bereits am Tag 5 nach Infektion getötet. Die Beurteilung des Inflammations- und Nekroselevels wurde durchgeführt von Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

Virusisolat	Maus	Herz		Gesamtanzahl (+) je Gruppe	
		Inflammation	Nekrose	Inflammation	Nekrose
CVB3 _{Tübingen}	1	+	+	6	4
	2	+	+		
	3	++	+		
	4	++	+		
CVB3 _{chronisch}	1*	++	+	7	8
	2*	+	++		
	3	+++	+++		
	4	+	++		
CVB3 _{1.HP}	1	+	+	6	8
	2	++	++		
	3	++	+++		
	4	+	++		

Auf Grund der im zweiten *in vivo* Vorversuch erzielten Ergebnisse kam das Virusisolat CVB3_{chronisch} für die *in vivo* Kombinationsversuche nicht infrage, da die Infektion mit diesem zu einer zu starken Inflammation und Nekrosebildung im Herzen und einem zu schlechten Allgemeinzustand der Mäuse führte. Dies hätte einen möglichen Abbruch des Additivversuches zur Folge haben können. Die für das Isolat CVB3_{Tübingen} und CVB3_{1.HP} erzielten Ergebnisse ließen vermuten, dass die Herzpathogenität von CVB3 durch *in vivo* Herzpassagierung verstärkt werden kann. Daher wurde dieser Vorgang im Rahmen eines dritten *in vivo* Vorversuches wiederholt.

Hierfür wurden die Viren aus den Herzen der mit CVB3_{1.HP} infizierten Mäuse isoliert. Die Viren aller vier Mäuse wurden gepoolt und der CVB3-Titer dieser Lösung mittels Plaque Assay bestimmt. Das durch Poolen entstandene neue Isolat der zweiten Herzpassage wurde mit CVB3_{2.HP} bezeichnet. Es folgte die Infektion von vier 6 Wochen alten Balb/c-Mäusen mit

ERGEBNISSE

5×10^4 PFU des Isolats CVB3_{2,HP}. Als Vergleich dienten erneut vier Mäuse, welche mit CVB3_{1,HP} infiziert wurden.

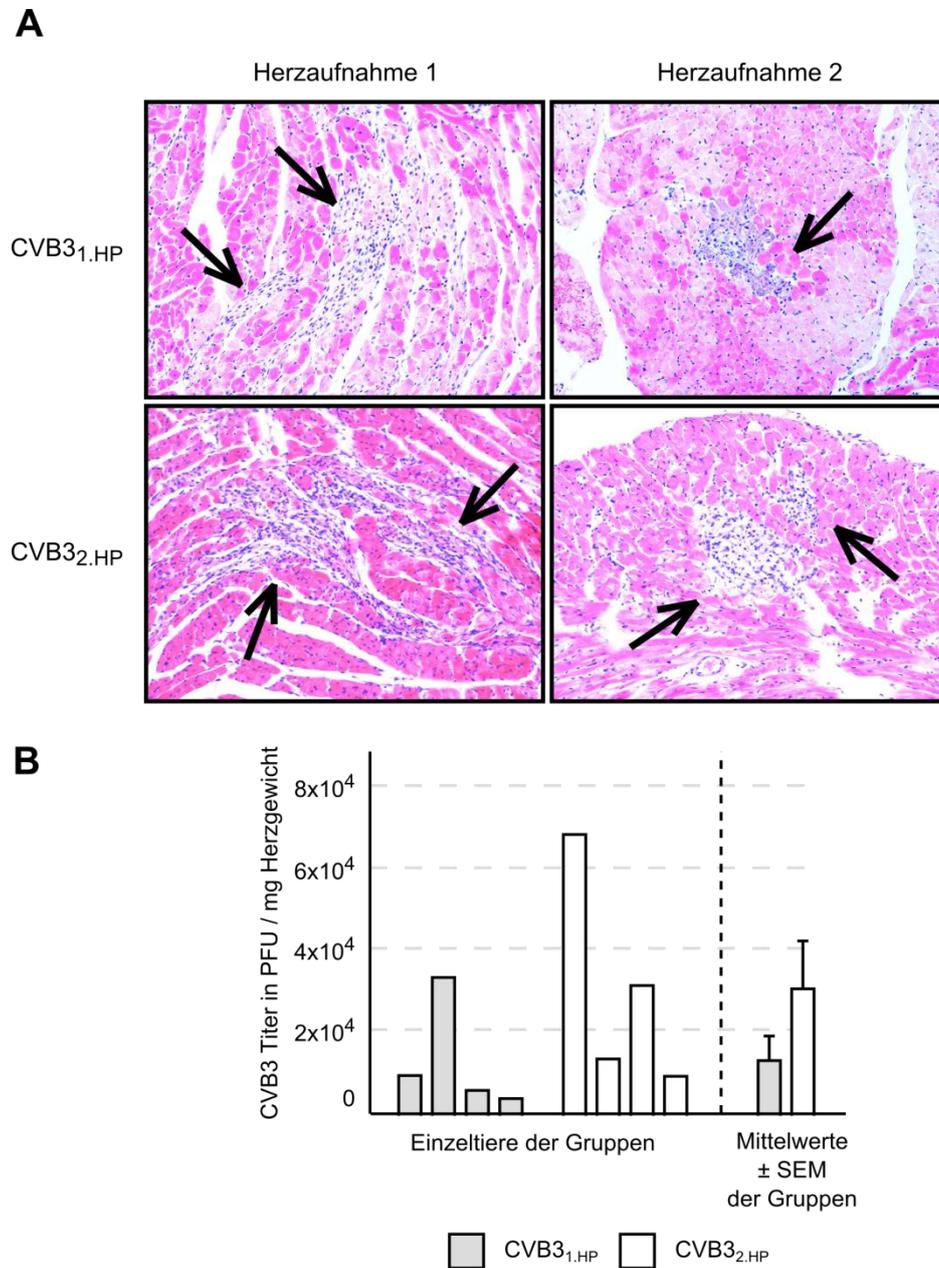


Abbildung 5.21: Einfluss der CVB3_{1,HP}- und CVB3_{2,HP}-Infektion auf Gewebeintegrität und Virustiter im Herzen. 6 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse wurden mit je 5×10^4 PFU des jeweiligen CVB3-Isolats infiziert und 6 Tage später euthanasiert und analysiert. **A)** Exemplarische HE-Färbungen vom Herz der 2 jeweils am stärksten von Inflammation betroffenen Tiere jeder Gruppe. Pfeile zeigen Inflammationsherde an. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Klopfeisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. **B)** Virustiter im Herzgewebe aller Tiere und Mittelwert \pm SEM jeder Gruppe.

ERGEBNISSE

Die Tendenz des zweiten *in vivo* Vorversuchs, wonach die Herzpathogenität eines CVB3-Isolats durch Herzpassagierung steigt, wurde auch in diesem Versuch bestätigt. So lag der durchschnittliche CVB3-Titer im Herz der mit CVB3_{1,HP} infizierten Tiere bei $1,36 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe, während der durchschnittliche Titer in der mit CVB3_{2,HP} infizierten Gruppe bei $3,12 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe, und damit rund doppelt so hoch lag (Abbildung 5.21B). Der beobachtete Unterschied fiel dabei allerdings geringer aus als beim Vergleich von CVB3_{Tübingen} mit CVB3_{1,HP}. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der histologischen Bewertung des Herzgewebes aller infizierten Tiere (Abbildung 5.21A). So konnten nur minimal mehr Entzündungsherde in den mit CVB3_{2,HP} infizierten Tieren gefunden werden. Ein signifikanter Unterschied wurde nicht festgestellt. Keines der infizierten Tiere überschritt in diesem Versuch ein Herzinflammationslevel von 20 %. Auch die Pankreatitis fiel im Vergleich zu allen anderen durchgeführten Versuchen wesentlich schwächer aus. In sieben der insgesamt acht infizierten Tiere wurden lediglich geringgradige lymphozytäre Infiltrate festgestellt, während sowohl im ersten als auch zweiten Vorversuch sämtliche infizierten Mäuse hochgradige Veränderungen des Pankreas aufwiesen. Die insgesamt geringer ausgefallene Inflammation von Herz und Pankreas ging mit den um rund eine \log_{10} -Stufe niedrigeren CVB3-Titern im Herzen einher. Eine mögliche Ursache liegt im höheren Ausgangsgewicht und dem vermutlich höheren Alter der Mäuse. Während die Mäuse der vorangegangenen Versuche bei Infektion zwischen 17 und 19 Gramm wogen, lag das Gewicht in diesem Fall bei 18 bis 21 Gramm, was auf ein höheres Alter der Mäuse bei Infektion und damit auf eine milder verlaufende Infektion schließen lässt (43).

Da trotz dieser Beobachtung die Herzpathogenität des Isolats CVB3_{2,HP} geringfügig höher als bei CVB3_{1,HP} ausgefallen war, wurde das Isolat CVB3_{2,HP} für den *in vivo* Versuch zur Untersuchung möglicher additiver antiviraler Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4 verwendet. Auf eine weitere Herzpassage wurde verzichtet, da die beobachteten Steigerungen hinsichtlich des Inflammationslevels und Virustiters zwischen den einzelnen Passagen nur gering ausfielen und die Anzahl der zu verwendenden Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen begrenzt werden sollte.

5.1.9 Bestimmung des Gewebetropismus selbstkomplementärer AAV2/9-Vektoren *in vivo*

Im vorliegenden Projekt wurden scAAV-Vektoren für das Delivery der antiviralen shRNAs verwendet. Dabei kam der Serotyp 2 für alle *in vitro* Versuche zum Einsatz. Für spätere *in vivo* Versuche ist dieser allerdings nicht geeignet, da er das Herz nur sehr schlecht transduzieren

ERGEBNISSE

kann (37). Auf Grund verschiedener Berichte in der Literatur sollten AAV-Vektoren des Serotyps 9 im Maus-Myokarditismodell eingesetzt werden, da diese effektiv *in vivo* das Herz transduzieren und dort für eine langanhaltende Expression des vektorvermittelten Transgens bzw. vektorkodierter shRNAs sorgen (123, 140). Im Rahmen eines Vorversuches sollte nun einerseits der Kardiotropismus der verwendeten scAAV2/9-Vektoren bestätigt werden. Andererseits sollte untersucht werden, ob der Zeitraum von 10 Tagen zwischen Transduktion und Infektion ausreicht, um eine für die Virusinhibierung ausreichend starke Expression der antiviralen shRNAs im Herzen der Tiere zu erzielen. Dieser Zeitraum war für den späteren *in vivo* Versuch als Abstand zwischen AAV-Vektor-Transduktion und CVB3-Infektion vorgesehen. Dafür wurde ein selbstkomplementärer Reporter-AAV2/9-Vektor verwendet (scAAV2/9-GFP), welcher eine CMV-Promoter-kontrollierte Expressionskassette für GFP kodiert. Zusätzlich trug der Vektor eine U6-Promoter-gesteuerte Expressionskassette für eine Kontroll-shRNA, die keine Komplementarität zum humanen oder murinen Genom aufweist. Das Level der GFP-Expression im Herzen 10 Tage nach Transduktion sollte einen Anhaltspunkt liefern, wie stark die Expression von shRdRP2 und shRdRP4 im Herz zum Zeitpunkt der CVB3-Infektion während des *in vivo* Kombinationsversuches sein könnte. Eine genaue Relation ist dabei allerdings nicht möglich, da die Expression durch unterschiedliche Promotoren gewährleistet wird. Zusätzlich sollten durch histologische Begutachtung verschiedener Organe der transduzierten Mäuse Hinweise auf eine mögliche Toxizität der scAAV-Vektoren im Verlauf des Untersuchungszeitraums von 10 Tagen gewonnen werden.

Im Rahmen des Vorversuches wurden drei männliche, 6 Wochen alte Balb/c-Mäuse mit 1×10^{12} Vektorkopien von scAAV2/9-GFP intravenös transduziert und 10 Tage später hinsichtlich der GFP-Expression in verschiedenen Organen mittels Immunhistochemie untersucht. Zusätzlich wurden Organproben fixiert, mit HE angefärbt und histologisch untersucht. Als Kontrolle für sämtliche Untersuchungen dienten scheinoperierte Balb/c-Mäuse, denen PBS injiziert worden war.

Die höchste Transduktionseffizienz von nahezu 100 % lag im Herzen der mit scAAV2/9-GFP transduzierten Mäuse vor (Abbildung 5.22). Der selbstkomplementäre AAV2/9-Vektor war außerdem in der Lage, effizient die Leber und das Pankreas zu transduzieren (Abbildung 5.23). Die GFP-Level lagen allerdings vor allem im Pankreas deutlich unter denen im Herz bestimmten. Außerdem konnte eine GFP-Expression in einem Blutgefäß der Niere nachgewiesen werden, während im eigentlichen Nierengewebe kein GFP gemessen wurde. Auch Milz, Darm und Skelettmuskel konnten im durchgeführten Experiment nicht transduziert werden bzw. zeigten keine GFP-Expression. Die Spezifität des immunhistochemischen GFP-

ERGEBNISSE

Nachweises wurde über die mit PBS scheintransduzierten Mäuse nachgewiesen. In sämtlichen Geweben dieser Tiere konnten keine GFP-Signale gemessen werden.

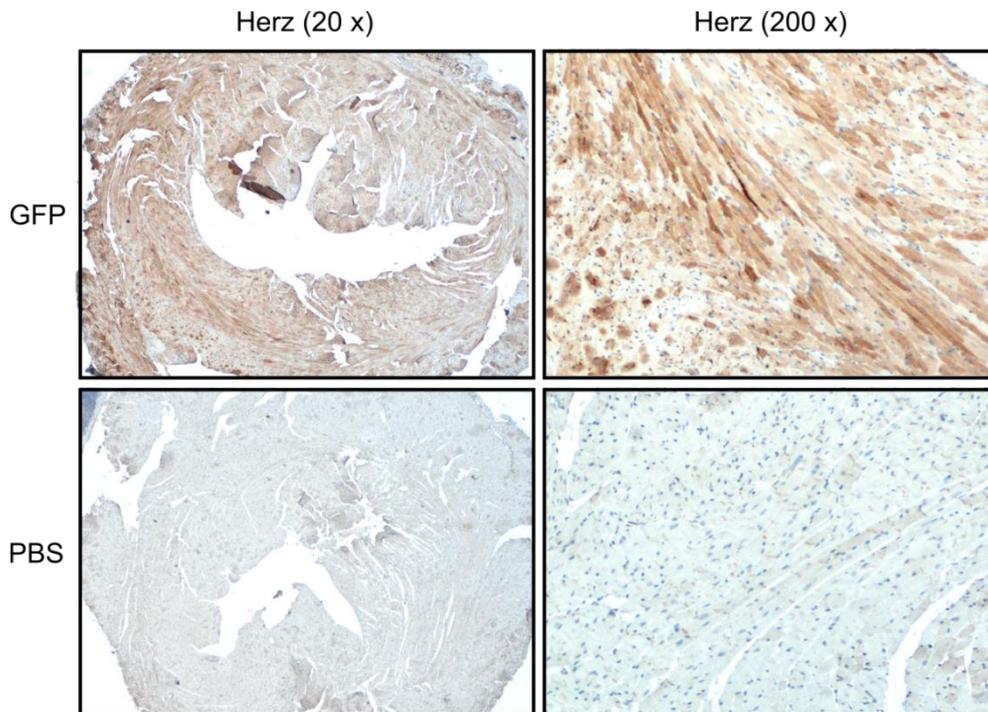


Abbildung 5.22: scAAV2/9-vektorvermittelte GFP-Expression im Herzen 10 Tage nach Transduktion.

Sechs Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse wurden mit 1×10^{12} Vektorgenomen scAAV2/9-GFP über die Jugularvene transduziert. Zehn Tage später wurden die Herzen entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Nachweis der GFP-Expression erfolgte über Immunhistochemie. Die Bilder zeigen exemplarisch die GFP-Expression im Herzen der transduzierten Tiere. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere, denen PBS injiziert wurde. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

Bei der Auswertung der HE-gefärbten histologischen Schnitte aller untersuchten Organe wies keines der Organe Veränderungen auf. Es fanden sich keine auf eine Inflammation hinweisenden Ansammlungen von infiltrierenden Immunzellen. Auch nekrotisches Gewebe konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die in der Studie verwendeten scAAV2/9-Vektoren zeigten im Untersuchungszeitraum von 10 Tagen somit keine offensichtlich toxische Wirkung. Da durch den scAAV2/9-GFP-Vektor auch eine U6-Promoter-gesteuerte Kontroll-shRNA exprimiert wird, kann zusätzlich die Sicherheit von scAAV2/9-vektorvermittelten shRNAs bewertet werden. Für den Untersuchungszeitraum und für die verwendete Vektordosis wurde dabei keine toxische Wirkung beobachtet. Diese wurde zum Beispiel für die Leber von anderen Gruppen in der Vergangenheit beschrieben (142, 143).

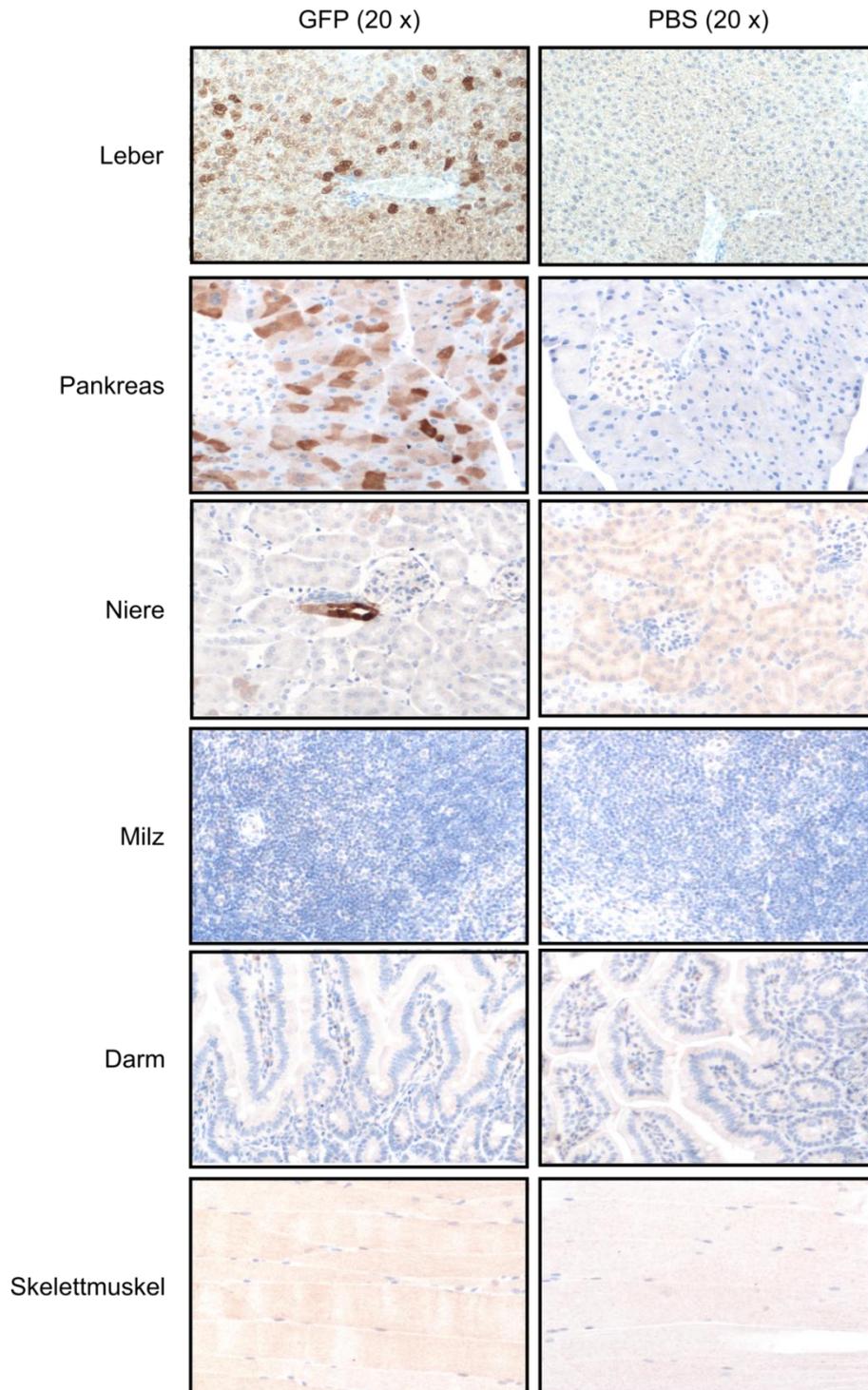


Abbildung 5.23: scAAV2/9-Vektor-Gewebeverteilung 10 Tage nach Transduktion.

Sechs Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse wurden mit 1×10^{12} Vektorgenomen scAAV2/9-GFP über die Jugularvene transduziert. Zehn Tage später wurden die Organe entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der Nachweis der GFP-Expression erfolgte über Immunhistochemie. Die Bilder zeigen exemplarisch die GFP-Expression in verschiedenen Organen der transduzierten Tiere. Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere, denen PBS injiziert wurde. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

ERGEBNISSE

5.1.10 Inhibierung von CVB3 durch Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4

in vivo

Auf Grund der beobachteten additiven antiviralen Effekte *in vitro* (Abschnitt 5.1.7), wurde der Kombinationsansatz mit sCAR-Fc und shRdRP2.4 zur Behandlung von CVB3-Infektionen in die *in vivo* Ebene übertragen. Hierfür wurde ein bereits etabliertes, durch CVB3 induziertes, akutes Maus-Myokarditismodell verwendet. Der exakte Versuchsablauf sowie die Zusammensetzung der Gruppen können der folgenden Abbildung 5.24 entnommen werden.



Abbildung 5.24: Zeitlicher Ablauf und Gruppenzusammensetzung beim *in vivo* Kombinationsversuch.

Balb/c-Mäuse wurden mit 1×10^{12} VG scAAV2/9-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/9-shGFP über die Jugularvene transduziert. Acht Tage später erfolgte die Transduktion mit 1×10^{10} Partikeln AdG12 ebenfalls über die Jugularvene. Die Infektion mit 5×10^4 PFU CVB3_{2,HP} folgte nach weiteren 2 Tagen. Dox wurde über das Trinkwasser (200 µg/ml) in 5 %iger Saccharoselösung beginnend einen Tag nach Infektion gegeben. Die Analyse der Tiere fand 7 Tage nach Infektion statt. Kontrollgruppen wurden scheinoperiert, Negativkontrollen mit PBS scheininfiziert. (N = 6 für alle Gruppen)

Die 5 bis 6 Wochen alten, männlichen Balb/c-Mäuse wurden mit 1×10^{12} VG scAAV2/9-shRdRP2.4 bzw. scAAV2/9-shGFP intravenös transduziert. AAV-Vektoren des Serotyps 9 wurden verwendet, da diese einen hohen Kardiotropismus aufweisen und somit die Expression der shRNAs direkt im Zielgewebe von CVB3 gewährleisten (140, Abschnitt 5.1.9). Acht Tage später wurden die Mäuse zusätzlich intravenös mit 1×10^{10} Partikeln AdG12 transduziert. Die i.p. Infektion mit 5×10^4 infektiösen Partikeln CVB3_{2,HP} erfolgte weitere zwei Tage später. Die über AdG12 vermittelte sCAR-Fc-Expression wurde durch die Gabe von Dox mit dem Trinkwasser (200 µg/ml) einen Tag nach Infektion induziert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in einem vorangegangenen Tierversuch die prophylaktische Gabe von sCAR-Fc zu einer vollständigen Inhibierung von CVB3 im akuten Modell geführt hatte, während bei sCAR-Fc-Gabe einen Tag nach Infektion nur eine teilweise Inhibierung beobachtet wurde (63). Bei vollständiger Virusinhibierung durch eine der beiden Einzelkomponenten wären additive

ERGEBNISSE

antivirale Effekte nicht nachweisbar, weswegen eine prophylaktische Induktion der sCAR-Fc-Expression ausschied. Das Doxycyclin wurde in 5-prozentiger Saccharoselösung gelöst, welche den bitteren Geschmack des Antibiotikums überdecken sollte. Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen auf Grund der Saccharosegabe auszuschließen, wurden auch die Tiere mit 5-prozentiger Saccharoselösung gefüttert, welche kein Dox benötigten. Sieben Tage nach Infektion wurden die Tiere hinsichtlich der Stärke der entstandenen Myokarditis bewertet. Während der Vorversuche zur Virusgenerierung (siehe Abschnitt 5.1.8) kam es mit der hier verwendeten 2. Herzpassage des CVB3-Isolats nicht zu einer Unterschreitung des kritischen Gewichts von 80 % des Ausgangsgewichts. Gegen Ende der Versuchszeit konnte sogar eine Stabilisierung des Körpergewichts beobachtet werden. Daher konnte der Analysezeitpunkt von 6 auf 7 Tage nach Infektion erhöht werden. Da die Einwanderung von Immunzellen an den Ort der Virusinfektion einer gewissen Zeit bedarf, sollte durch diese Maßnahme das detektierbare Inflammationslevel im Herzen weiter erhöht und somit mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verstärkt werden. Im Rahmen des Tierversuches sollten sowohl die durch sCAR-Fc bzw. shRdRP2.4 hervorgerufenen Einzeleffekte, als auch der kombinatorische Effekt beider Substanzen auf die CVB3-Replikation untersucht werden. Daher wurden fünf verschiedene Versuchsgruppen untersucht. Als Positivkontrolle für das Myokarditismodell dienten scheinoperierte, mit CVB3 infizierte Tiere. Um die Wirkung der Einzelkomponente sCAR-Fc zu untersuchen wurden Tiere mit AdG12 und scAAV2/9-shGFP transduziert, mit CVB3 infiziert und erhielten Dox über das Trinkwasser. Tiere, bei denen die Einzelwirkung von shRdRP2.4 untersucht werden sollte, wurden mit scAAV2/9-shRdRP2.4 und AdG12 transduziert, mit CVB3 infiziert, erhielten allerdings kein Dox. Die Kombinationsgruppe wurde sowohl mit scAAV2/9-shRdRP2.4 als auch AdG12 transduziert, mit CVB3 infiziert und erhielt Dox. Als Vergleichsgruppe dienten Wildtyp-Balb/c-Mäuse, welche scheinoperiert und zum Infektionszeitpunkt mit PBS scheininfiziert wurden. Pro Gruppe wurden sechs Mäuse verwendet.

Bei den für die Transduktion erforderlichen Operationen kann es zu kleineren Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren kommen, welche eine unterschiedliche Transduktionseffizienz zur Folge haben. Ein wichtiges Kriterium, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, ist daher eine zwischen den unterschiedlichen Gruppen gleichmäßige Verteilung des vektorvermittelten Transgens sCAR-Fc im Serum bzw. der shRNAs im kardialen Gewebe.

Um diese zu überprüfen, wurden 7 Tage nach Infektion Blutproben aller Mäuse entnommen, und das Serum dieser wurde auf das Vorhandensein von sCAR-Fc hin untersucht. Des Weiteren

ERGEBNISSE

wurde RNA aus dem Herzgewebe der Tiere isoliert und die relative Expression der antiviralen shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, bestimmt.

Im Serum der scheinoperierten und nicht infizierten Mäuse konnte kein sCAR-Fc nachgewiesen werden (Abbildung 5.25A). In beiden Gruppen, in denen die Expression von sCAR-Fc durch Dox induziert worden war, konnte ein sCAR-Fc-Serumlevel deutlich über dem Hintergrund gemessen werden. Die Höhe der gemessenen Werte war dabei vergleichbar für beide Gruppen ($39,0 \pm 4,5$ ng/ml für Gruppe AdG12 (+ Dox) + shGFP; $51,0 \pm 22,5$ ng/ml für Gruppe AdG12 (+ Dox) + shRdRP2.4). Für die Positivkontrollgruppe (Sham) sowie die Gruppe AdG12 (-Dox) + shRdRP2.4 konnten lediglich Hintergrundsignale detektiert werden, die jedoch deutlich niedriger waren als die Werte der mit Dox induzierten Gruppen.

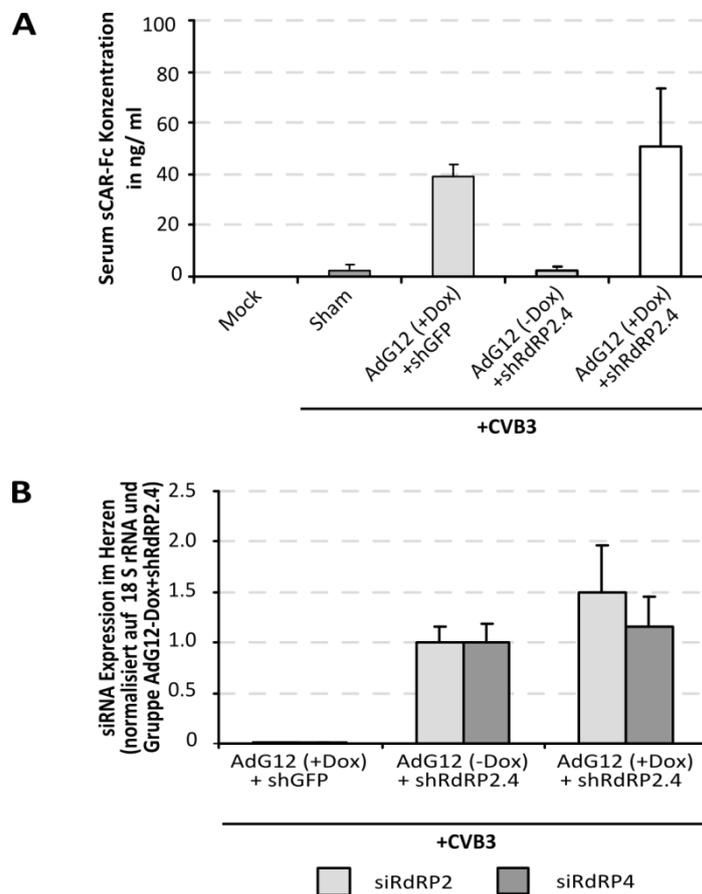


Abbildung 5.25: Expression von sCAR-Fc und shRdRP2.4 *in vivo*.

Experimentelles Design entsprechend Abbildung 5.24. **A)** Konzentration von sCAR-Fc im Serum 7 Tage nach Infektion. Den Mäusen wurden 7 Tage nach Infektion Blutproben entnommen und aus diesen Serum gewonnen. Dieses wurde mittels humanem IgG-Fc-ELISA hinsichtlich der sCAR-Fc-Konzentration untersucht. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM für die jeweilige Gruppe. **B)** Aus kardialem Gewebe scAAV2/9-transduzierter Mäuse wurde 7 Tage nach CVB3-Infektion die RNA isoliert. Diese wurde mittels stemloop RT-PCR in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels TaqMan-PCR quantitativ analysiert. Die Normierung erfolgte auf die Expression der 18 S rRNA und die Expression in der Gruppe AdG12 (-Dox) + shRdRP2.4. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

ERGEBNISSE

Auch das Expressionslevel der antiviralen shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4 im Herzen der mit scAAV2/9-shRdRP2.4 transduzierten Mäuse war im Mittel vergleichbar zwischen den unterschiedlichen Gruppen (Abbildung 5.25B). In der Gruppe AdG12 (+ Dox) + shRdRP2.4 fiel dabei die Streuung zwischen den einzelnen Tieren geringfügig höher aus als in der Gruppe AdG12 (-Dox) + shRdRP2.4. Für die mit dem Vektor scAAV2/9-shGFP transduzierten Tiere wurden bei der stemloop RT-qPCR zur Quantifizierung von shRdRP2 und 4 lediglich geringe Positivsignale im hohen C_T -Wert-Bereich erzielt, welche auf die teilweise Sequenzidentität der fertig prozessierten siRNAs zurückgeführt werden können. Da sämtliche C_T -Werte der mit scAAV2/9-shRdRP2.4 transduzierten Mäuse allerdings erheblich niedriger ausfielen, können diese vernachlässigt werden. Eine Sequenzanpassung der Primer und Sonden zur Gewährleistung einer höheren PCR-Spezifität war auf Grund der Kürze der nachzuweisenden siRNAs nicht möglich. Für die scheinoperierten, untransduzierten Tiere wurden keine Amplifikationssignale erzielt.

Die akute CVB3-induzierte Myokarditis zeichnet sich durch starke Inflammation des kardialen Gewebes mit Infiltration von Immunzellen aus (144). Als erster Parameter um die antivirale Effizienz von sCAR-Fc und shRdRP2.4 zu bewerten, wurde daher die Inflammation im Herzen der behandelten Tiere untersucht. Hierfür wurden Gewebeschnitte aller Versuchsgruppen fixiert und mittels HE-Färbung gefärbt (Abbildung 5.27). Die Beurteilung des Inflamationsgrades wurde anhand des Myokarditis-Scores, auch Inflammations-Score genannt, durchgeführt. Dieser teilt die Schwere der Inflammation in 5 Grade von 0 bis 4 ein, wobei bei einem Myokarditis-Score von 0 keine Inflammation und bei einem Wert von 4 die höchst mögliche Inflamationsstufe vorliegt.

Die Tiere der Negativkontrollgruppe (Mock), welche nicht infiziert wurden, wiesen alle einen Myokarditis-Score von 0 auf (Abbildung 5.26). Ihr Myokard zeigte keine Veränderungen oder Ansammlungen von infiltrierenden Immunzellen. In der Gruppe der unbehandelten, CVB3-infizierten Mäuse (Sham) konnte bei allen Tieren der höchstmögliche Inflammations-Score von 4 festgestellt werden. Die Behandlung der Tiere mit sCAR-Fc (AdG12 (+Dox) + shGFP) oder shRdRP2.4 (AdG12 (-Dox) + shRdRP2.4) reduzierte diesen Wert auf 2 oder 3 für jeweils 3 Tiere jeder Gruppe. Für die jeweils anderen 3 Mäuse konnte im Rahmen dieser sehr groben Beurteilung keine Verbesserung erzielt werden. In der Gruppe der kombinatorisch behandelten Tiere (AdG12 (+ Dox) + shRdRP2.4) wurde ein additiver antiviraler Effekt erzielt. Vier der sechs Mäuse wiesen keine Anzeichen von Inflammation im Myokardgewebe auf und wurden mit dem niedrigsten Myokarditis-Score von 0 bewertet. Lediglich bei einem Tier dieser Gruppe konnte keine Verbesserung in Hinblick auf den Inflammations-Score erzielt werden.

ERGEBNISSE

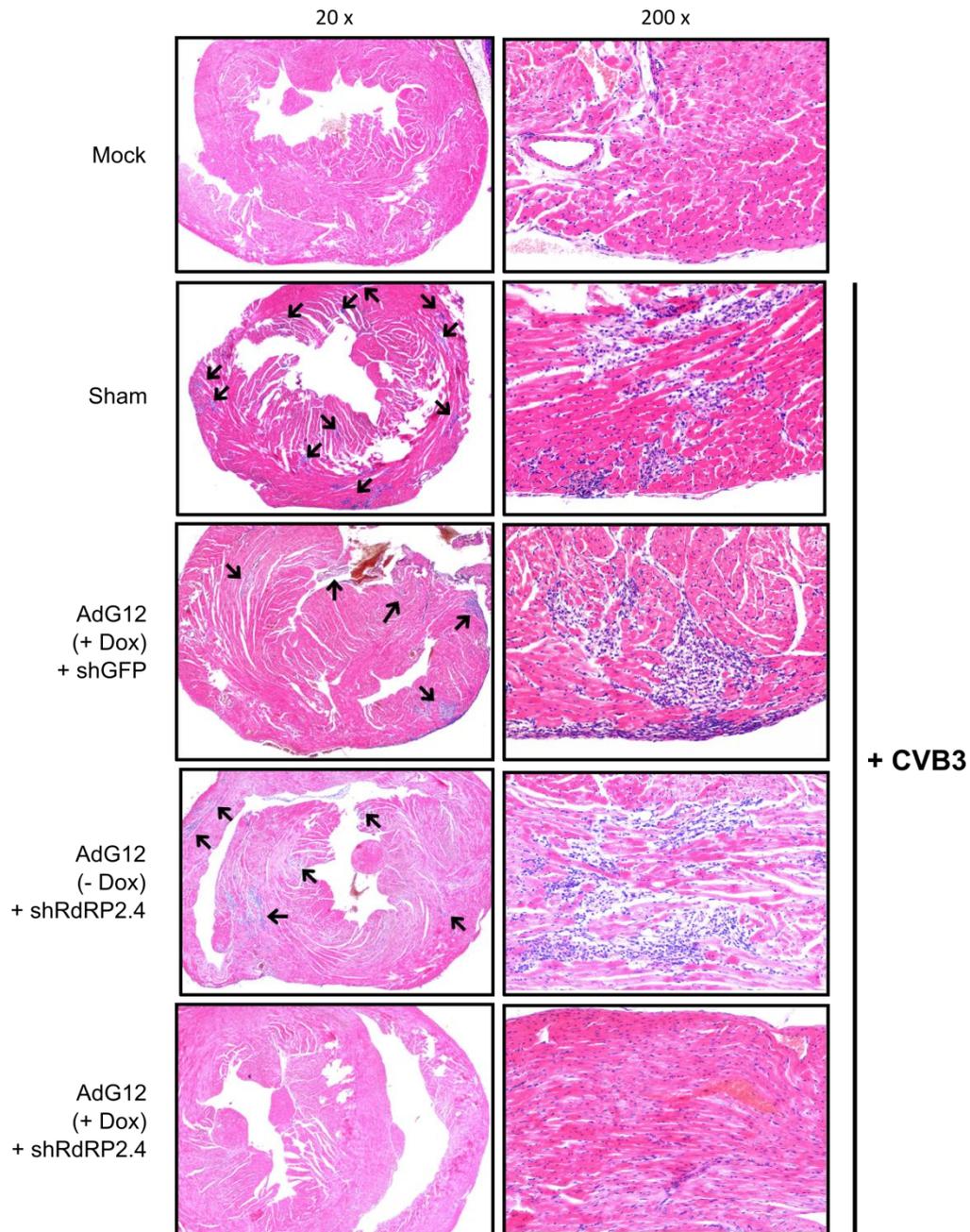


Abbildung 5.27: Inflamationslevel im kardialen Gewebe nach CVB3-Infektion.

Experimentelles Design entsprechend Abbildung 5.24. Ventrikuläres Herzgewebe wurde fixiert, in Paraffin eingebettet, in 2 µm dünne Scheiben geschnitten und mittels HE-Färbung angefärbt. Gezeigt sind exemplarische Übersichtsaufnahmen in 20-facher Vergrößerung (links) der verschiedenen Versuchsgruppen. Rechts ist jeweils die Detailaufnahme (200x) eines für die Gruppe exemplarischen Inflammationsherdes dargestellt. Lag keine Inflammation vor, so zeigt das rechte Bild die Vergrößerung einer beliebigen Stelle vom linken Übersichtsbild. Die Färbungen wurden durchgeführt und ausgewertet durch Prof. Dr. Robert Klopffleisch und die Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

ERGEBNISSE

Um die durch HE-Färbung aufgezeigten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen in Bezug auf das Inflammationslevel näher zu charakterisieren und quantifizieren, wurde daher im Folgenden das Expressionslevel verschiedener inflammatorischer Zytokine im Myokard bestimmt. Hierfür wurde die kardiale RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR auf das Expressionslevel von IL-6, TNF- α und IFN- γ hin untersucht.

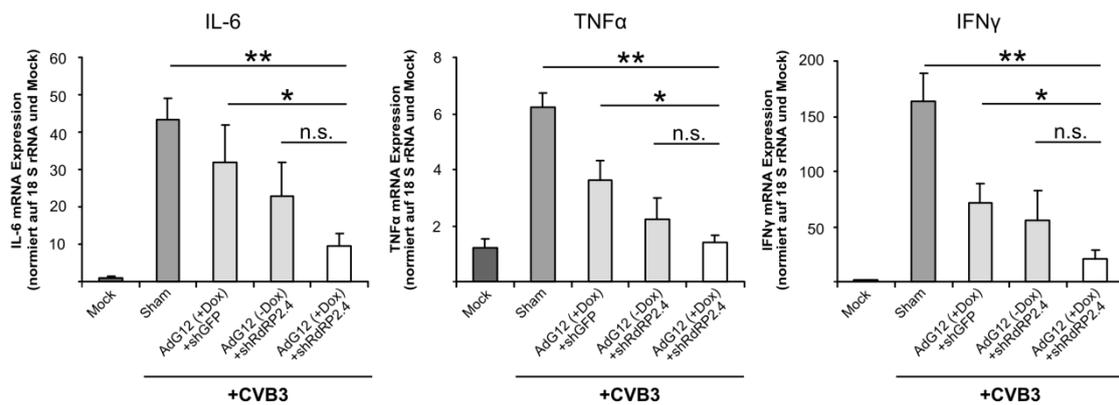


Abbildung 5.28: Expression inflammatorischer Zytokine im Myokard 7 Tage nach CVB3-Infektion.

Experimentelles Design entsprechend Abbildung 5.24. Die RNA aus dem Myokard wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qPCR auf die Expression inflammatorischer Zytokine hin untersucht. Die Expression wurde normiert auf die Expression der 18 S rRNA und die Gruppe Mock. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aller Gruppen. *: $0,01 \leq P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$

Infolge der Infektion mit CVB3 stieg das Expressionslevel der inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IFN- γ im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe stark an (Abbildung 5.28). Dabei war der Anstieg bei IFN- γ am stärksten (Faktor 134), gefolgt von IL-6 (Faktor 39) und TNF- α (Faktor 5). Infolge der Behandlung mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 kam es zu einer deutlichen Reduktion des Expressionslevels aller drei Zytokine im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Das normale Expressionslevel (Gruppe Mock) wurde dabei allerdings nicht erreicht. Nach Doppelbehandlung mit sCAR-Fc und shRdRP2.4 zeigte sich ein additiver Effekt in Bezug auf die Zytokininduktion. So wurde deutlich weniger IL-6, TNF- α und IFN- γ im Herzen ausgeschüttet als bei den Einzeltherapien. Für TNF- α wurde dabei sogar das Ausgangsniveau der Expression erreicht. Die quantitativen Daten der Expressionsanalyse unterstützen somit die vorangegangenen Beobachtungen im Rahmen der histologischen Untersuchungen.

ERGEBNISSE

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (Sham) verringerte Inflammationslevel der mit sCAR-Fc und/ oder shRdRP2.4 behandelten Gruppen einherging mit einer Verringerung des CVB3-Titers im Myokard. Hierfür wurden Herzstücke aller Versuchstiere aufgeschlossen, und anschließend die Herzlysate mittels Plaque Assay auf das Vorhandensein replikationskompetenter CVB3-Partikel hin untersucht. Die Normierung der Gesamtvirenanzahl erfolgte dabei auf das Gewicht des eingesetzten Herzstückes, um Unterschiede in der Größe der Tiere und damit auch der Organgröße auszugleichen.

Für die Gruppe der nicht behandelten, CVB3-infizierten Tiere wurden durchschnittlich $4,7 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe nachgewiesen (Abbildung 5.29A). Die Einzelbehandlung mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 führte zu einer signifikanten Reduktion des Titers um jeweils ca. 70 % ($1,35 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe bzw. $1,47 \times 10^4$ PFU/mg Herzgewebe). Es konnte ein ausgeprägt additiver antiviraler Effekt nachgewiesen werden, da der Virustiter der kombinatorisch behandelten Gruppe mit $2,5 \times 10^3$ PFU/mg Herzgewebe signifikant niedriger lag als in den nur mit einer Komponente behandelten Gruppen ($P < 0,05$). In der Negativkontrollgruppe (Mock) konnten keine replikationskompetenten CVB3-Partikel nachgewiesen werden.

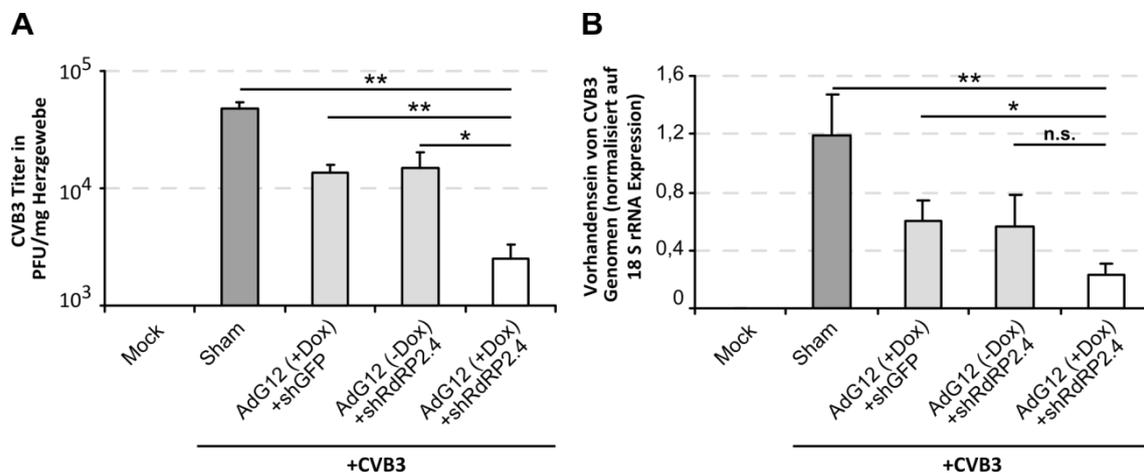


Abbildung 5.29: Nachweis replikationskompetenter CVB3-Partikel bzw. von CVB3-RNA im Herzgewebe.

Experimentelles Design entsprechend Abbildung 5.24. **A)** Bestimmung des CVB3-Titers im Herzen mittels Plaque Assay. Herzgewebe wurde in Medium aufgeschlossen und Lysate mittels Plaque Assay analysiert, die Normierung erfolgte auf das Herzgewicht. **B)** Nachweis genomischer CVB3-RNA mittels RT-qPCR. Das Vorhandensein genomischer RNA wurde normiert auf die Expression der 18 S rRNA und das RNA-Level in der Gruppe Sham. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM jeder Gruppe. *: $0,01 \leq P \leq 0,05$; **: $P \leq 0,01$

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des Plaque Assays wurden zusätzlich durch eine quantitative PCR bestätigt, welche im Myokard vorhandene CVB3-Genome direkt nachwies. Hierfür wurde die kardiale RNA mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben, und anschließend wurden die CVB3-Genome durch ein spezifisches Primer/ Sondenpaar in der qPCR amplifiziert. Dabei konnte keine CVB3-RNA in der Negativkontrollgruppe (Mock) nachgewiesen werden, während für die unbehandelten, CVB3-infizierten Tiere (Sham) diese eindeutig nachweisbar war (Abbildung 5.29B). Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren lag für die mit sCAR-Fc behandelten Mäuse (AdG12 (+ Dox) + shGFP) das nachgewiesene CVB3-RNA-Level im Herzen etwa 50 % niedriger. Gleiches traf für die Gruppe der mit shRdRP2.4 behandelten Tiere (AdG12 (-Dox) + shRdRP2.4) zu. Der im Plaque Assay ermittelte additive antivirale Effekt für die Kombinationsgruppe (AdG12 (+ Dox) + shRdRP2.4) wurde auch durch die CVB3-qPCR bestätigt. Das Level an nachgewiesener RNA lag bei ca. 20 % im Vergleich zu den unbehandelten Tieren und damit deutlich unter dem der Einzeltherapien.

Als wichtigstes Kriterium für den Erfolg einer antiviralen Behandlung im Herzen ist die Auswirkung dieser auf die eigentliche Herzfunktion anzusehen. Um diese zu bestimmen, wurden sämtliche Versuchstiere 7 Tage nach Infektion narkotisiert, intubiert und über einen Mikrokonduktanzkatheter analysiert. Über diesen Katheter konnten anschließend die systolischen sowie diastolischen Funktionsparameter des Herzens aufgezeichnet werden.

Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Herzfrequenz der einzelnen Gruppen (Abbildung 5.30). Unterschiede in den systolischen und diastolischen Funktionsparametern können somit ausschließlich auf die CVB3-Infektion bzw. die Behandlung mit sCAR-Fc und/oder shRdRP2.4 zurückgeführt werden und nicht auf unterschiedliche Narkosestärken, welche die Herzfrequenz beeinflussen würden. Die Infektion mit CVB3 führte in den unbehandelten Tieren (Sham) zu einer starken Beeinträchtigung der linksventrikulären Herzfunktion. So verringerte sich die Gesamtleistung des Herzens, gemessen als Pumpvolumen je Minute, von $12.759 \pm 229 \mu\text{l}/\text{min}$ auf $5.818 \pm 134 \mu\text{l}/\text{min}$ ($P < 0,01$). Außerdem verringerten sich die systolische Kontraktilität (dP/dt_{max} 5.922 ± 230 vs. $3.295 \pm 143 \text{ mmHg}/\text{s}$, $P < 0,01$) sowie die diastolische Relaxation (dP/dt_{min} -4.576 ± 66 vs. $-2.013 \pm 170 \text{ mmHg}/\text{s}$, $P < 0,01$) erheblich.

Die Behandlung mit der löslichen Rezeptorvariante sCAR-Fc führte zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Leistung ($6.847 \pm 116 \mu\text{l}/\text{min}$, $P < 0,01$) sowie der Kontraktilität (dP/dt_{max} $4.091 \pm 148 \text{ mmHg}/\text{s}$, $P < 0,05$) und Relaxation (dP/dt_{max} $-3.063 \pm 132 \text{ mmHg}/\text{s}$, $P < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Gruppe. Durch die Behandlung mit shRdRP2.4 wurden gegenüber den nicht therapierten Tieren ebenfalls signifikant bessere Herzleistungsparameter

ERGEBNISSE

erreicht. So lag die kardiale Leistung bei $8.027 \pm 84 \mu\text{l}/\text{min}$ ($P < 0,01$), die systolische Kontraktilität bei $4.380 \pm 113 \text{ mmHg}/\text{s}$ ($P < 0,01$) und die diastolische Relaxation bei $-2.854 \pm 194 \text{ mmHg}/\text{s}$ ($P < 0,05$).

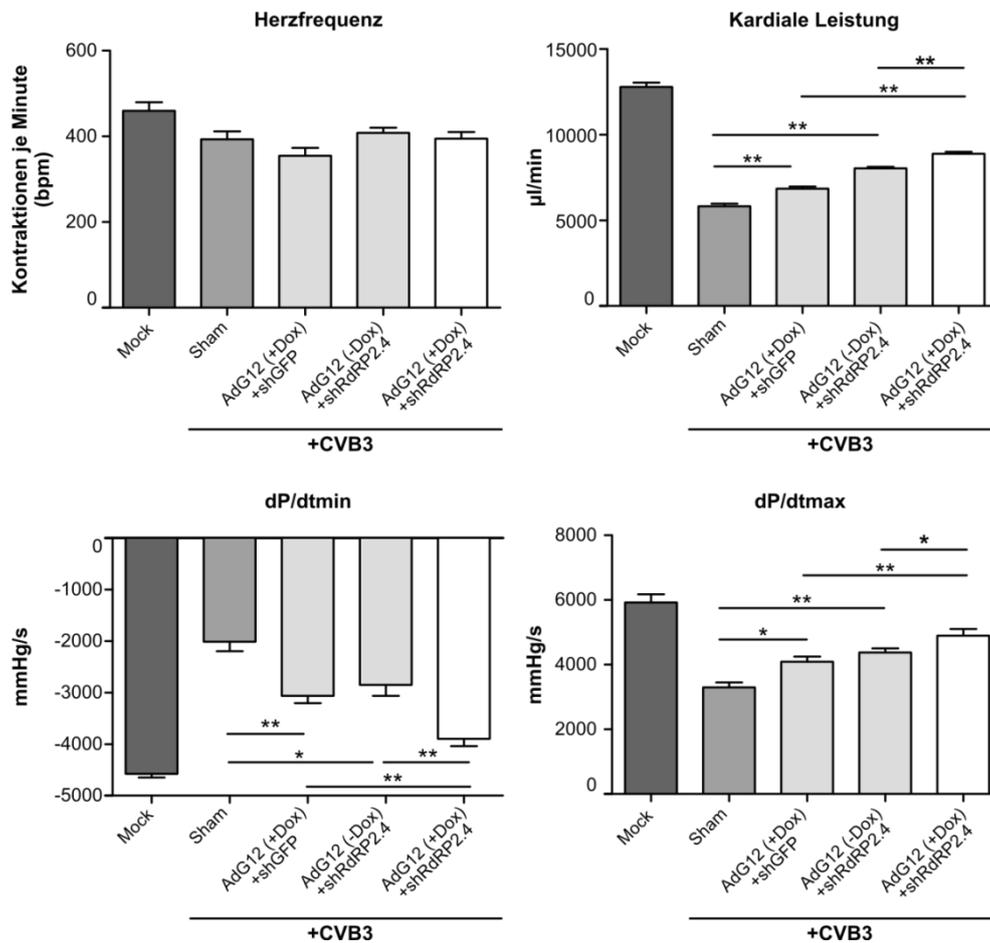


Abbildung 5.30: Herzfunktionsparameter 7 Tage nach CVB3-Infektion.

Experimentelles Design entsprechend Abbildung 5.24. Die Mäuse wurden 7 Tage nach Infektion narkotisiert, intubiert und kathetert. Gemessen wurden die Herzfrequenz, systolische sowie diastolische Parameter des Herzens wie zum Beispiel die linksventrikuläre Kontraktilität (dP/dt_{max}), die linksventrikuläre Relaxation (dP/dt_{min}) und die kardiale Gesamtleistung. Als Vergleichsgruppe dienen scheinoperierte, nicht infizierte Tiere (Mock). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der einzelnen Gruppen. *: $0,01 \leq P \leq 0,05$; **: $P < 0,01$. Die hämodynamischen Messungen wurden durchgeführt von Dr. Moritz Becher der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Der durch die Doppelbehandlung mit sCAR-Fc und shRdRP2.4 hervorgerufene additive antivirale Effekt konnte auch in Bezug auf die Herzfunktionalität nachgewiesen werden. So lag die kardiale Leistung mit $8.879 \pm 108 \mu\text{l}/\text{min}$ signifikant über der Leistung, welche durch

ERGEBNISSE

Einzelbehandlung mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 erzielt werden konnte ($P < 0,01$ für beide Fälle). Auch die systolische Kontraktilität lag mit 4.898 ± 185 mmHg/s signifikant über denen der Einzelkomponenten ($P < 0,01$ im Falle von sCAR-Fc, $0,01 \leq P < 0,05$ für shRdRP2.4) genau wie die diastolische Relaxation mit -3.899 ± 127 mmHg/s ($P < 0,01$ für beide Fälle).

Eine vollständige Übersicht aller gemessenen hämodynamischen Parameter kann der folgenden Tabelle 5.2 entnommen werden. Der additive antivirale Effekt der Kombinationstherapie im Vergleich zu den beiden Einzeltherapien wird dabei durch alle gemessenen Parameter bestätigt.

Tabelle 5.2: Hämodynamische Charakterisierung der Versuchstiere 7 Tage nach CVB3-Infektion.

Experimentelles Design und Gruppenzusammensetzung entsprechend Abbildung 5.24. Die Tiere wurden 7 Tage nach CVB3-Infektion narkotisiert, intubiert und die Hämodynamikparameter mittels Mikrokonduktanzkatheter gemessen. HR = Herzfrequenz; SV = Schlagvolumen; SW = Schlagarbeit; CO = kardiale Gesamtleistung; EF = Ejektionsfraktion; LVESP = linksventrikulärer endsystolischer Druck; dP/dt_{max} = linksventrikuläre Kontraktilität; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck; dP/dt_{min} = linksventrikuläre Relaxation; Tau = linksventrikuläre diastolische Relaxationszeit; alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. Die hämodynamischen Messungen wurden durchgeführt von Dr. Moritz Becher der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

	Mock	Sham + CVB3	AdG12 + Dox + shGFP + CVB3	AdG12 -Dox + shRdRP2.4 + CVB3	AdG12 + Dox + shRdRP2.4 + CVB3
Globale Parameter					
HR (bpm)	460 \pm 18	393 \pm 17	355 \pm 17	408 \pm 11	395 \pm 14
SV (μ l)	27.2 \pm 0.8	14.7 \pm 1.3	18.8 \pm 0.6	20.0 \pm 0.3	22.5 \pm 0.8
SW (μ l*mmHg)	1895 \pm 29	883 \pm 31	1429 \pm 47	1360 \pm 59	1516 \pm 53
CO (μ l/min)	12786 \pm 229	5818 \pm 134	6847 \pm 116	8027 \pm 84	8880 \pm 108
EF (%)	76.4 \pm 3.2	48.5 \pm 1.7	59.2 \pm 0.7	65.8 \pm 2,6	73.1 \pm 1.6
Systolische Parameter					
LVESP (mmHg)	75.6 \pm 1.6	48.2 \pm 1.6	61.4 \pm 1.9	57.2 \pm 1.9	64.5 \pm 1.0
dP/dt_{max} (mmHg/s)	5922 \pm 230	3295 \pm 143	4091 \pm 148	4380 \pm 113	4898 \pm 185
Diastolische Parameter					
LVEDP (mmHg)	1.9 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6	4.3 \pm 0.2	4.5 \pm 0.4	3.7 \pm 0.5
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-4576 \pm 66	-2013 \pm 170	-3063 \pm 132	-2854 \pm 194	-3899 \pm 127
Tau (ms)	9.3 \pm 0.3	15.5 \pm 0.3	14.1 \pm 0.3	13.9 \pm 0.2	11.1 \pm 0.2

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die lösliche Rezeptorvariante sCAR-Fc als auch direkt gegen das CVB3-Genom gerichtete shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, in der Lage sind, CVB3 effektiv *in vitro* und *in vivo* zu inhibieren. Ihr

ERGEBNISSE

Einsatz führte in Zellkultur zu einer Verringerung des Virustiters und einer Erhöhung der Zellviabilität. In einem CVB3-induzierten Maus-Myokarditismodell zeigten mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 behandelte Tiere geringere Inflammations- und Nekroselevel im Herzen. Auch die CVB3-Titer im kardialen Gewebe dieser Tiere waren signifikant niedriger als die der unbehandelten Kontrollen. Katheter-Messungen zeigten außerdem, dass der Einsatz von sCAR-Fc und shRdRP2.4 zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktionsparameter führt. Bemerkenswert ist dabei die unglaubliche Konsistenz der im *in vivo* Versuch erzielten Daten. So führte die Expression von sCAR-Fc bzw. shRdRP2.4 zu einer geringeren Viruslast im Herzen, wodurch die eingeleitete Immunreaktion in Form inflammatorischer Zytokine schwächer ausfiel. Folgerichtig wurden weniger Inflammationsherde im Myokard nachgewiesen und die Herzfunktion dementsprechend weniger negativ beeinflusst als bei den unbehandelten, CVB3-infizierten Tieren.

Als wichtigstes Resultat dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass durch kombinatorische Anwendung beider aktiver Substanzen ein additiver antiviraler Effekt erzielt werden kann. Dieser zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in allen untersuchten Parametern und war in den meisten Fällen signifikant gegenüber den Einzeleffekten. *In vitro* wurden dabei sowohl Virus-Plaque-Titer als auch die Zellviabilität untersucht. Im Maus-Myokarditismodell wiesen kombinatorisch behandelte Mäuse signifikant niedrigere Virus-Titer im Herzen auf als die einzeltherapierten Tiere. Auch das Herzinflammationslevel der mit sCAR-Fc und shRdRP2.4 therapierten Mäuse lag deutlich unter dem der Tiere, welche nur eine wirksame Komponente erhalten hatten. Außerdem zeigten doppelt behandelte Tiere signifikant bessere Herzfunktionsparameter, wie kardiale Gesamtleistung und linksventrikuläre Kontraktilität und Relaxation, im Vergleich zu den einfach behandelten. Antagonistische Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4 wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht beobachtet.

6 Diskussion

6.1 Gewebetropismus selbstkomplementärer AAV2/9-Vektoren

Vektoren, die auf Adenovirus-assoziierten Viren beruhen (AAV-Vektoren), stellen ein beliebtes Deliverysystem für die Übertragung genetischen Materials in Zellen oder auch *in vivo* dar. Dabei kommen verschiedene Serotypen zum Einsatz, deren Kapsidstrukturen variieren und die sich hinsichtlich ihres Gewebetropismus erheblich unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden selbstkomplementäre AAV-Vektoren des Serotyps 9 *in vivo* in Mäusen eingesetzt. Die Applikation der Vektoren erfolgte dabei intravenös. Durch immunhistochemischen Nachweis des vektorkodierten GFPs (grün fluoreszierendes Protein) zehn Tage nach Applikation wurde der Gewebetropismus der Vektoren untersucht. Dabei wurde die Expression in Herz, Leber, Pankreas, Niere, Milz, Darm und Skelettmuskel analysiert. Der Analysezeitpunkt zehn Tage nach Applikation wurde gewählt, da er dem Infektionszeitpunkt nach Transduktion im CVB3-Kombinationsversuch entsprach (Abbildung 5.24). Somit sollte die Expression des Transgens GFP ein Indiz für die Expressionsstärke der scAAV2/9-vektorkodierten shRNAs im Infektionsversuch liefern.

Die stärkste GFP-Expression in nahezu allen Zellen des Gewebes wurde im Herzen nachgewiesen. Diese Beobachtung korreliert mit den Untersuchungen von Pacak et al., die die Fähigkeit von scAAV2/9-Vektoren untersuchten, kardiales Gewebe zu transduzieren (145). Sie konnten eine weitreichende Expression des vektorkodierten Transgens im Herzen nach i.v. Transduktion nachweisen. Dabei wurde allerdings eine andere Vektordosis als im hier durchgeführten Experiment verwendet, und die Analyse erfolgte erst 4 Wochen nach Injektion, wodurch ein quantitativer Vergleich der erzielten Expressionsmenge nicht möglich ist. Ein weiterer Grund dafür ist, dass die Nachweissensitivität für verschiedene Targets (GFP vs. β -Galactosidase) variiert. Auch vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe konnten den hohen Kardiotropismus von scAAV2/9-Vektoren nachweisen (37, 146). Da allerdings auch dort anderweitige Vektordosen verwendet wurden und die Analyse nicht 10 Tage nach Injektion sondern 7 Tage bzw. 4 Wochen nach Transduktion erfolgte, lassen auch diese Studien keinen direkten Vergleich der Expressionslevel mit den hier erzielten Werten zu.

DISKUSSION

Auch in Pankreas und Leber konnte eine hohe Expression des scAAV2/9-vektorkodierten GFPs nachgewiesen werden. Dabei betrug die Transduktionsrate in der Leber nahezu 100 %, wobei die Signalintensität im Vergleich zum Herzen deutlich schwächer war. Im Pankreas wurde eine geringere Transduktionsrate erzielt. Außerdem beschränkte sich die GFP-Expression auf bestimmte Bereiche des Pankreas. So konnte im Vergleich zum restlichen Pankreasgewebe keine oder nur eine äußerst geringe GFP-Expression in den Langerhans-Inseln nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Leber und Pankreas wurden auch von der Gruppe um Inagaki erzielt (147). Sie applizierten steigende scAAV2/9-Vektordosen von 1×10^{10} VG/Maus bis $1,8 \times 10^{12}$ VG/Maus über die Schwanzvene der Mäuse und analysierten die Transgenexpression 10 Tage nach Transduktion. Bei einer Vektordosis von 1×10^{12} VG/Maus, welche der von uns verwendeten entspricht, konnte eine starke Transgenexpression in der Leber mit nahezu 100-prozentiger Transduktionsrate erzielt werden, wobei diese immer noch unterhalb der im Herzen detektierten lag. Im Pankreas konnte deutlich weniger Transgen detektiert werden. Die Studie von Inagaki et al. kommt in Bezug auf den Studienaufbau der von uns durchgeführten am nächsten und bestätigt weitestgehend unsere Ergebnisse. Lediglich das vektorkodierte Transgen weicht von dem von uns verwendeten GFP ab, so dass dennoch keine direkte Korrelation zwischen den Expressionsleveln möglich ist.

In allen anderen hier untersuchten Organen (Niere, Milz, Darm und Skelettmuskel) konnte keine GFP-Expression nachgewiesen werden. Lediglich ein in der Niere befindliches Blutgefäß wies deutliche GFP-Signale auf, wobei das eigentliche Nierengewebe frei von GFP war. Andere Studien zeigten dagegen, dass alle diese Organe erfolgreich mit scAAV2/9-Vektoren transduziert werden können, wenn auch die Transduktionseffizienz deutlich unter der von Herz und Leber liegt. So konnten Inagaki et al. Vektorgenome von zuvor i.v. applizierten scAAV2/9-Vektoren in Niere, Milz, Darm und Skelettmuskel mittels Southern Blot nachweisen (147). Auch Geisler et al. zeigten eine deutliche Expression eines scAAV2/9-vektorkodierten Transgens nach i.v. Applikation im Skelettmuskel (140). Allerdings wurden in beiden Studien entweder variierende Vektordosen verwendet oder aber das Transgen und damit die Nachweismethode wichen von den hier verwendeten ab. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die GFP-Signale in unserer beschriebenen Untersuchung lediglich unterhalb der Nachweisgrenze des Assays lagen. Um dies zu bestätigen, wären weiterführende Untersuchungen mit steigenden Vektordosen oder aber längeren Expressionszeiten erforderlich. Da der eigentliche Zweck der hier durchgeführten Untersuchung der Nachweis

DISKUSSION

des vektorvermittelten Transgens im Herzen, dem Zielorgan von CVB3, war, und dieser auch eindeutig und in ausreichender Menge gelang, wurden diese Dosisstudien nicht durchgeführt. Zusammenfassend konnte im hier beschriebenen Abschnitt der starke kardiale Tropismus von scAAV2/9-Vektoren in Übereinstimmung mit der Literatur bestätigt werden. Auch die weitreichend beschriebene Transduktion von Leber und Pankreas wurde nachgewiesen. Um sämtliche durch scAAV2/9-Vektoren transduzierten Organe zu identifizieren und damit ältere Studien zu bestätigen, wären weitergehende Untersuchungen mit alternativen Vektordosen, Transgenen oder Expressionszeiten erforderlich. Außerdem müssten weitere Organe wie Magen, Lunge und Gehirn untersucht werden. Auch ein Wechsel des Detektionssystems von der Immunhistochemie zum Southern Blot oder der quantitativen PCR wäre denkbar.

6.2 Artifizielle microRNAs zur Inhibierung von CVB3

Um dauerhaft oder zumindest über einen längeren Zeitraum siRNAs in einer Zelle zur Verfügung zu haben, müssen diese über Vektoren exprimiert werden. Dabei gibt es einerseits die Möglichkeit über einen Polymerase III-Promoter shRNAs oder andererseits amiRNAs über einen Polymerase II-Promoter zu exprimieren. Beide Formen werden anschließend prozessiert und sollten, bei entsprechendem Design der Haarnadelstruktur, dieselbe funktionale siRNA ergeben.

Da einige Gruppen bei Verwendung von shRNAs, welche in sehr hohen Mengen exprimiert werden, unerwünschte toxische Effekte insbesondere in der Leber beobachtet haben (142, 143), kann es zur Vermeidung der Toxizität sinnvoll sein, amiRNAs zu verwenden. Dass eine Verwendung von amiRNAs unter Kontrolle eines Polymerase II-Promoters anstelle von shRNAs zu einer verringerten Lebertoxizität *in vivo* führt, wurde zum Beispiel von Giering et al. gezeigt (148). Dabei wurde einerseits eine shRNA unter Kontrolle eines U6-Promoters *in vivo* exprimiert und führte zu starker Lebertoxizität und teilweise zum Tod der behandelten Tiere. Andererseits wurde dieselbe Haarnadelstruktur über einen leberspezifischen Polymerase II-Promoter exprimiert. Dabei konnte keinerlei Lebertoxizität nachgewiesen werden bei in etwa gleichbleibender Effektivität der entstehenden siRNA. Die Autoren führen dies auf das verringerte Expressionslevel und die höhere Gewebespezifität zurück. Ein weiterer Vorteil, welcher für die Verwendung von amiRNAs anstelle von shRNAs spricht, liegt in der geringen Verpackungskapazität der scAAV-Vektoren, welche in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen. Die Kombination von shRNA mit U6-Promoter ergibt eine ungefähre Größe von 400 bp, während eine amiRNA nur ungefähr 120 bp lang ist. Diese kann man einfach mit einer

DISKUSSION

Expressionskassette für ein Transgen (z. B.: sCAR-Fc) kombinieren und beide, gesteuert durch denselben Promoter, exprimieren. Diese Kombination wäre bei Verwendung von shRNAs nicht oder nur sehr schwer möglich, da der Platzbedarf bei Verwendung zweier Promotoren (einer für das Transgen, einer für die shRNA) zu hoch wäre. Des Weiteren könnte man bei Verwendung gewebespezifischer Polymerase II-Promotoren eine höhere Spezifität des RNAi-Ansatzes erzielen und somit mögliche Off-Target-Effekte minimieren. Die Umstellung von antiviralen shRNAs auf amiRNAs, wie unter 5.1.6 beschrieben, bietet somit mehrere Vorteile: die Verringerung der Expressionskassettengröße und damit mögliche Kombination mit der Expressionskassette für sCAR-Fc auf nur einem Vektor, geringere zu erwartende toxische Nebeneffekte *in vivo* und die Möglichkeit, in Zukunft einen herzspezifischen Promoter einzusetzen.

In der Literatur ist der Einsatz antiviraler amiRNAs ebenfalls umfangreich beschrieben. So konnten z. B. Liu et al. 2008 zeigen, dass mehrere Anti-HIV-1-amiRNAs, welche simultan von einem Polycistron exprimiert werden, das Virus effektiver inhibieren können als von ihnen zuvor entwickelte shRNA-Konstrukte (110). Das von ihnen verwendete Polycistron basierte dabei auf dem natürlicherweise im Menschen vorkommenden miR-17-92-Cluster. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Zhang et al. im Jahr 2012 erzielt, wobei sie ein artifizielles microRNA-Polycistron zur Inhibierung von HIV-1 verwendeten (149). Aber auch andere Viren, wie z. B. das Hepatitis-B-Virus, wurden bereits erfolgreich durch den Einsatz von amiRNAs inhibiert (150). Auf Grund des weitreichenden Einsatzes artifizierender microRNAs gegen Viren und der damit verbundenen Vorteile, lag auch im vorliegenden Projekt eine Umwandlung der shRNAs in amiRNAs nahe.

Die amiRNAs (amiRdRP2 und 4) zeigten bei Expression von einem Plasmid eine zu den shRNAs (shRdRP2 und 4) vergleichbare Wirksamkeit im Reporterassay (Abbildung 5.10). Bei Expression der amiRNAs unter Kontrolle eines Polymerase II-Promoters von einem scAAV-Vektor konnte allerdings keine antivirale Wirksamkeit nachgewiesen werden (Abbildung 5.11). Die Expressionsstärke der amiRNAs lag dabei erheblich unter der der shRNAs (Abbildung 5.12), was die Vermutung nahelegt, dass die Menge vorhandener siRNAs zur Inhibierung des sehr schnell replizierenden Virus CVB3 nicht ausreichte. Diese These wird auch durch eine Untersuchung von Maczuga et al. aus dem Jahr 2013 unterstützt (151). Dabei wurde gezeigt, dass bei Expression von amiRNAs im Vergleich zu shRNAs ca. 30-fach weniger prozessierte siRNAs nachgewiesen werden können. In der genannten Studie konnten allerdings sowohl shRNAs als auch amiRNAs das endogene Target (Apolipoprotein B) effektiv herunterregulieren. Die Effektivität der amiRNAs hängt somit wahrscheinlich von der Wahl des Targets und der

DISKUSSION

vorhandenen Menge dieses ab, wobei das schnell replizierende CVB3 eine zu große Anzahl viraler Genome generiert, um effektiv durch die geringer exprimierten amiRNAs inhibiert zu werden. Da bereits sehr hohe Vektordosen verwendet wurden und eine weitere Steigerung zu Zytotoxizität *in vitro* führen würde, ließe sich diese Vermutung lediglich durch eine Verringerung der Virusdosis bestätigen. Es bleibt allerdings auf Grund der geringen Expression fraglich, ob ein Einsatz der amiRNAs insbesondere *in vivo* sinnvoll wäre, da eine Behandlung erst nach Auftreten erster Symptome erfolgen würde und dann sehr schnell sehr große Mengen antiviraler siRNAs vorhanden sein sollten.

In einem weiteren Versuch, den RNAi-Ansatz über amiRNAs zu gewährleisten, wurde eine codonoptimierte Expressionskassette für sCAR-Fc mit der amiRdRP2 auf einem scAAV-Vektor kombiniert. Dies ist außerdem von Vorteil bei der Translation der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung, da der Einsatz zweier verschiedener viraler Vektoren als eher unwahrscheinlich gilt. Dabei zeigte sich allerdings erneut die äußerst geringe Expression sowohl des Transgens sCAR-Fc als auch der amiRdRP2, so dass nur marginale inhibitorische Effekte gegen CVB3 erzielt werden konnten (Abbildung 5.14). In einer bisher nicht veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe mit dem Vektor scAAV-sCAR-Fc, der sich vom hier verwendeten Vektor lediglich durch das Fehlen der amiRdRP2 unterscheidet, konnten allerdings sehr hohe sCAR-Fc-Konzentrationen im Überstand transduzierter Zellen erzielt werden, die mehr als 10x über den hier gemessenen lagen (Daten nicht gezeigt). Somit liegt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein der amiRdRP2 die Wirkung des AAV-Vektors negativ beeinflusst. Ursache dafür könnte zum Beispiel die zu große Insertlänge der Expressionskassette sein (≈ 2500 bp inklusive ITRs), so dass bei Vektorproduktion keine selbstkomplementären Vektoren, sondern einzelsträngige entstehen. Dies wird zum Beispiel durch die Veröffentlichung von Daya und Berns oder auch Gray et al. unterstützt, die die maximale Verpackungskapazität zur Ausbildung selbstkomplementärer AAV-Vektoren mit 2200 bp bzw. 2300 bp angeben (130, 152). Abweichend dazu fanden allerdings Wu et al. heraus, dass bis zu einer Insertgröße von 3300 bp scAAV-Vektoren gebildet werden können, allerdings mit einer geringeren Effizienz, wobei die Vektorpräparation dann auch teilweise einzelsträngige Vektoren enthält (153). Um abschließend zu klären, ob die Bildung einzelsträngiger AAV-Vektoren für die geringe Effizienz dieser verantwortlich ist, könnten z. B. Southern Blots durchgeführt werden, die ein charakteristisches Bild sowohl für einzelsträngige als auch selbstkomplementäre Vektoren ergeben.

Da die Probleme der zu geringen amiRNA-Expression allerdings auch für die Vektoren auftraten, die kein sCAR-Fc enthielten, und damit deutlich kleinere Inserts als 2200 bp

DISKUSSION

aufwiesen, ist es ebenfalls möglich dass die generelle Verpackung von amiRdRP2 und 4 bzw. der Kontrollen in scAAV-Vektoren problematisch ist. Zwar konnten amiRNAs bereits erfolgreich über scAAV-Vektoren transduziert und exprimiert werden (154), allerdings ermöglicht dies keine Aussage über amiRNAs im Allgemeinen. So ist zum Beispiel die Ausbildung von Sekundärstrukturen denkbar, die das korrekte Zusammenbauen von scAAV-Vektoren und damit eine effiziente Transduktion und Expression verhindern. Dieses Problem ließe sich durch die Verwendung eines alternativen Vektortyps wie z. B. eines lentiviralen Vektors aufklären und umgehen.

Zusammenfassend gelang zwar die Umwandlung der antiviralen shRNAs in amiRNAs im Rahmen der vorliegenden Arbeit, nicht aber die erforderliche hohe Expression dieser bei Verwendung von AAV-Vektoren. Da die Expressionslevel in diesem Fall weit hinter den erwarteten und auch notwendigen zurückblieben, konnte die CVB3-Replikation nicht durch amiRdRP2.4 inhibiert werden. Gleiches galt bei Kombination von sCAR-Fc und lediglich einer amiRNA (amiRdRP2) auf nur einem AAV-Vektor. Die Ein-Vektorstrategie konnte somit nicht verwirklicht werden.

6.3 Generierung eines herzpathogenen CVB3-Isolats für *in vivo* Versuche

Eine wichtige Eigenschaft von Viren stellt ihre hohe Anpassungsfähigkeit an äußere Bedingungen dar. Die Ursache für diese liegt in der relativ hohen Mutationsrate der meisten Viren. Im Falle von Coxsackieviren bedeutet dies, dass im Zuge eines Replikationszyklus ein Fehler auf ca. 1000 bis 2000 Basen des neu entstehenden Genoms durch die RdRP eingebaut wird. Die Virusnachkommen können dann je nach Lage und Art der Mutation eine veränderte Virulenz aufweisen. In einigen Fällen ergibt sich aus den entstehenden Mutationen ein Selektionsvorteil für die Virusnachkommen, so dass bestimmte Mutationen vermehrt beobachtet werden können. Die Passagierung von Viren *in vitro* oder auch *in vivo* in einem Wirtsorganismus stellt eine Möglichkeit dar, Mutationen in Viren herbeizuführen und somit eventuell die Virulenz des Virus gegenüber einer bestimmten Zellkultur oder einem Zielorganismus zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein CVB3-Isolat des Nancy-Stammes durch zweimalige *in vivo* Herzpassagierung in Balb/c-Mäusen so verändert, dass es anschließend eine höhere Herzpathogenität aufwies (siehe Abschnitt 5.1.8). Die neu entstandenen Virusnachkommen CVB3_{1,HP} bzw. CVB3_{2,HP} wiesen im Vergleich zu ihrem jeweiligen Vorfahren eine stärkere Tendenz zur Infektion kardialen Gewebes auf, so dass nach erneuter *in vivo* Inokulation in

DISKUSSION

Balb/c-Mäusen, bei gleicher Virusdosis, höhere Virustiter im Herzen nachgewiesen wurden. Begleitend nahm auch die Inflammation des Herzens zu. Die Fähigkeit der Viren zur Infektion anderer Gewebe wie z. B. des Pankreas blieb davon unbeeinflusst. Dementsprechend wurde auch keine Verstärkung unerwünschter Nebenwirkungen, wie zum Beispiel dem schlechten Allgemeinbefinden, welches durch die Pankreatitis hervorgerufen wird, beobachtet.

Eine Veränderung von Virulenzeigenschaften infolge der Passagierung des jeweiligen Virus wurde auch für andere Viren bereits beschrieben. So zeigte die Gruppe um Dortmans im Jahr 2011, dass durch mehrmalige Passage des *pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1)* in Hühnern die Virulenz dieses eigentlich nur geringgradig pathogenen Virus erheblich verstärkt werden konnte (155). Diese Beobachtung ging mit der Anreicherung bestimmter Mutationen in Genen, welche für die Virusreplikation essentiell sind, einher. Dadurch konnten höhere Virustiter *in vivo* erzielt werden. Auch für das Ebolavirus konnte gezeigt werden, dass sich bestimmte Mutationen im Genom anhäufen, wenn das Virus wiederholt in Primaten passagiert wird (156). Die wohl wichtigste Arbeit der letzten Jahre auf dem Feld der Viruspassagierung stammt aus der Gruppe um Herfst et al. aus dem Jahr 2012 (157). Die Gruppe benutzte Frettchen zur mehrmaligen Passage eines Influenza-H5/N1-Isolats und konnte eine Anreicherung bestimmter Mutationen im Genom des Grippevirus nachweisen. Diese Veränderung führte dazu, dass das neu entstandene Virusisolat, anders als sein Vorgänger, auch über die Luft zwischen den Tieren übertragen werden konnte. Die hier vorgestellten Arbeiten zur Passage anderer Viren legen den Verdacht nahe, dass sich auch im Falle des in der vorliegenden Arbeit verwendeten CVB3-Isolats während der *in vivo* Herz-Passagierung, Mutationen angereichert haben könnten, welche letztlich die veränderte Virulenz und erhöhte Herzpathogenität zur Folge haben. Um dies nachzuweisen, müssten die hier verwendeten Virusisolate vergleichend sequenziert werden. Auch das Virusisolat CVB3_{chronisch}, welches in NMRI-Mäusen zu chronischer Myokarditis führt, wurde ursprünglich durch mehrere Herzpassagen eines CVB3-Nancy-Isolats generiert (46) und beweist somit, dass generell die Virulenzeigenschaften von Coxsackieviren durch Passage in Mäusen verändert werden können.

Zusammenfassend bestätigen die in Abschnitt 5.1.8 erzielten Ergebnisse, dass die *in vivo* Passage von Viren die Virulenzeigenschaften eines Virusisolats verändern kann. Im Falle des hier verwendeten CVB3-Isolats erhöhte sich die Herzpathogenität in Balb/c-Mäusen. Ob, wie im Falle von Influenzavirus, Ebola-Virus oder auch PPMV-1, die hohe Mutationsrate der Viren für diese Tatsache verantwortlich ist, könnten nur weiterführende Sequenzanalysen aufklären. Dafür wären allerdings höhere Tierzahlen erforderlich, um eine statistische Signifikanz bestimmter Mutationen zu erzielen.

6.4 Anti-CVB3-Kombinationstherapie mittels sCAR-Fc und shRdRP2.4

Infektionen mit CVB3 gelten als eine der Hauptursachen für akute Myokarditiserkrankungen im Menschen. Diese können zu chronischer Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie fortschreiten. Da die bisher in der Klinik vorhandenen Therapieoptionen lediglich symptombezogen sind, nicht aber die eigentliche CVB3-Infektion bekämpfen, kommt der Entwicklung neuer, ursächlicher Behandlungsmethoden für die Klinik eine große Bedeutung zu. In der vorliegenden Dissertation wurde das Potential einer RNAi- und Rezeptor-basierten Kombinationstherapie zur Behandlung von CVB3-Infektionen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei kamen einerseits direkt gegen das CVB3-Genom gerichtete shRNAs, shRdRP2.4, und andererseits eine lösliche Variante des Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptors, sCAR-Fc, sowohl einzeln als auch in Kombination zum Einsatz. Dabei fungiert sCAR-Fc als lösliches Fusionsprotein bestehend aus den extrazellulären Domänen D1 und D2 des Coxsackievirus-Adenovirus Rezeptors, fusioniert an die Fc-Domäne von humanem IgG, als Virusfalle, die Viruspartikel in der Peripherie abfängt und so deren Interaktion mit dem eigentlichen zellulären Rezeptor CAR verhindert. Die shRNAs shRdRP2 und 4 sind direkt gegen eine hoch konservierte Region des CVB3-Genoms, die RdRP, gerichtet und bewirken die Zerstörung viraler Genome innerhalb infizierter Zellen auf Grundlage des RNAi-Mechanismus. Die Expression beider Komponenten erfolgte über virale Vektoren. Sowohl sCAR-Fc als auch shRdRP2.4 waren in Zellkultur in der Lage, die CVB3-Replikation effizient zu inhibieren. So verringerte sich der Virustiter CVB3-infizierter HeLa-Zellen, wenn diese vorher mit sCAR-Fc oder shRdRP2.4 behandelt worden waren. Dieser Effekt ging ebenfalls mit einer Erhöhung der Zellviabilität einher und war von der Dosis der eingesetzten Vektoren abhängig. HeLa-Zellen, welche kombinatorisch mit beiden Substanzen behandelt worden waren, zeigten einen noch weitreichenderen protektiven Effekt in Bezug auf Virustiter und Zellviabilität, so dass die Vermutung additiver antiviraler Effekte bestätigt werden konnte.

Die antiviralen Effekte von sCAR-Fc und shRdRP2.4 wurden *in vivo* in einem akuten CVB3-Maus-Myokarditismodell bestätigt. Dabei verringerte sich bei Behandlung mit einer der beiden Komponenten sowohl das Inflammationslevel als auch der Virustiter im Herzen der CVB3-infizierten Mäuse. Diese Beobachtung ging mit einer signifikanten Verbesserung hämodynamischer Herzfunktionsparameter einher. Der bereits *in vitro* beobachtete additive antivirale Effekt bei gleichzeitiger Anwendung von sCAR-Fc und shRdRP2.4, konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Kombinatorisch behandelte Mäuse zeigten insbesondere eine signifikant bessere Herzfunktionalität im Vergleich zu den einzeln behandelten Tieren. Antagonistische

DISKUSSION

Effekte bei gleichzeitiger Anwendung beider Substanzen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht beobachtet.

6.4.1 Wirksamkeit der Einzelkomponenten

Sowohl RNAi-basierte Methoden als auch der Einsatz löslicher Rezeptorvarianten von CAR zur Inhibierung von CVB3 sind bereits umfangreich in der Literatur beschrieben. Dies ermöglicht einen Vergleich der in der vorliegenden Studie mit den Einzelkomponenten erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen.

In einer 2009 durchgeführten Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Vektor AdG12 zur Expression von sCAR-Fc hinsichtlich seines prophylaktischen und therapeutischen Potentials zur Inhibierung von CVB3 *in vitro* und *in vivo* untersucht (63). Dabei konnte bei einer Vektor-MOI von 5 eine vollständige Inhibierung von CVB3 *in vitro* erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit führte eine AdG12-MOI von 5 lediglich zu einer partiellen Inhibierung der CVB3-Replikation in HeLa-Wis-Zellen (Abbildung 5.8). Dies lässt sich allerdings durch die Verwendung unterschiedlicher Vektorchargen mit variierender Qualität sowie eventuelle Ungenauigkeiten in der Vektor-Quantifizierung erklären.

In derselben Studie wurde AdG12 auch im akuten CVB3-Maus-Myokarditismodell eingesetzt. Dabei führte ein prophylaktischer Einsatz von sCAR-Fc zu einer vollständigen CVB3-Inhibierung, wodurch dieser Einsatz für den hier beschriebenen Kombinationsversuch nicht infrage kam. Bei therapeutischer Anwendung von sCAR-Fc konnte in dem vorangegangenen Versuch allerdings keine signifikante Verbesserung der Hämodynamikparameter in CVB3-infizierten Mäusen erzielt werden. Dies steht im Gegensatz zu den hier erzielten Daten, da bereits nur mit sCAR-Fc behandelte Mäuse eine signifikant bessere Herzfunktion aufwiesen als die unbehandelten Tiere (Abbildung 5.30). Auch diese Tatsache lässt sich durch die Verwendung einer anderen Vektorcharge, aber auch eines neu generierten Virus erklären. Dieses wies eine geringere Virulenz als das im Vorversuch verwendete auf, was bereits durch geringere Inflamationslevel in der HE-Färbung des Herzens deutlich wurde. Somit konnte bei gleicher Vektordosis ein höherer therapeutischer Effekt erzielt werden. Ähnliche Effekte wurden auch von Yanagawa et al. beschrieben (61). Dabei wurde CAR-Fc als rekombinantes Protein sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch in CVB3-infizierten Mäusen eingesetzt. Auch dort führte ein prophylaktischer Einsatz zu einer vollständigen Virusinhibierung, während bei therapeutischer Gabe lediglich teilweise protektive Effekte erzielt wurden. Diese Beobachtung wurde auch im Rahmen des Kombinationsversuches bestätigt, da zwar die Gabe von sCAR-Fc

DISKUSSION

allein die Hämodynamik und Viruslast im Herzen signifikant verbesserte, das Ausgangslevel dabei allerdings nicht erreicht wurde (siehe Abbildung 5.29 und Abbildung 5.30). In einer Studie von Dörner et al. wurde eine andere natürlich vorkommende Form von CAR, CAR4/7, rekombinant zur Behandlung von CVB3-Infektionen in Mäusen eingesetzt. Dabei führte der Einsatz allerdings zu nicht erwünschter, vermehrter Inflammation im Herzen im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren. Derartige Nebenwirkungen wurden im vorliegenden Projekt nicht beobachtet, wodurch sCAR-Fc im Vergleich zu CAR4/7 als effektiveres, besser geeignetes antivirales Agens angenommen werden kann. Allerdings kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass die durch CAR4/7 hervorgerufenen Nebenwirkungen auf produktionsbedingte Verunreinigungen mit Endotoxinen zurückzuführen waren.

Auch das antivirale Potential der Anti-CVB3-shRNAs, shRdRP2.4, wurde von unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit bereits untersucht (37). Dabei führte der prophylaktische Einsatz von scAAV2/9-shRdRP2.4 *in vivo* zu einer signifikanten Verbesserung der Hämodynamik CVB3-infizierter Mäuse. Derselbe Effekt konnte auch in der vorliegenden Dissertation bei Einzelbehandlung mit shRdRP2.4 erzielt werden. Da in dieser Studie weder Virustiter im Herzen noch das Inflammationslevel untersucht wurden, sind keine weiteren vergleichenden Schlüsse zum hier durchgeführten Experiment möglich. Allerdings belegen vorangegangene *in vitro* Studien unserer Arbeitsgruppe die gute Eignung der viralen RdRP als *Target* RNAi-auslösender Substanzen. So konnten wir bereits 2005 zeigen, dass siRNAs, welche gegen die CVB3-RdRP gerichtet sind, zu einer Verminderung des Virustiters und einer höheren Zellviabilität *in vitro* führen (102). Dies unterstützt die hier mittels scAAV2/2-shRdRP2.4 generierten Ergebnisse in HeLa-Wis-Zellen (Abbildung 5.6 und Abbildung 5.17).

Auch andere Gruppen haben die RNAi zur Inhibierung von CVB3 eingesetzt. So untersuchten Yuan et al. 2005 das Potential zur Inhibierung der CVB3-Replikation von fünf siRNAs, die gegen verschiedene Regionen des CVB3-Genoms gerichtet waren (36). Dabei erreichten sie bei prophylaktischer Applikation der siRNAs eine Inhibierung der CVB3-Replikation in HeLa-Zellen um mehr als eine \log_{10} -Stufe. Diese ging auch mit einer Erhöhung der Zellviabilität im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen einher. Die Ergebnisse dieser Untersuchung konnten im Rahmen der vorliegenden Dissertation bestätigt werden. HeLa-Wis-Zellen, die mit scAAV2/2-shRdRP2.4 vorbehandelt und anschließend mit CVB3 infiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu unbehandelten oder kontrollbehandelten Zellen einen um ca. 1 bis 2 \log_{10} -Stufen niedrigeren Virustiter (Abbildung 5.6). Auch ihre Zellviabilität war genau wie in der Studie von Yuan et al. erhöht (Abbildung 5.17). Eine andere *in vitro* Studie zur Inhibierung von CVB3 mittels RNAi stammt aus dem Jahr 2012 von der Gruppe um Luan et al. (109). Dabei wurden elf

DISKUSSION

verschiedene siRNAs mit Targetsequenzen, welche über das gesamte CVB3-Genom verteilt lagen, hinsichtlich ihres antiviralen Potentials in HeLa-Zellen charakterisiert. Auch siRNAs, die gegen die CVB3-RdRP gerichtet waren, kamen zum Einsatz. Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse sind ebenfalls mit den hier vorgestellten *in vitro* Ergebnissen vergleichbar. So konnte die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel nach siRNA-Transfektion und anschließender CVB3-Infektion um bis zu 90 % gesenkt werden, ähnlich wie in unserem AAV-Transduktionsmodell. Allerdings wurden in der Studie von Luan et al. andere siRNA-Targets wie z. B. die 2C-Region des CVB3-Genoms identifiziert, die zu einer weitreichenderen CVB3-Inhibierung führten. Es ist also möglich, dass der antivirale, durch RNAi hervorgerufene Effekt größer ausfallen könnte, wenn shRNAs gegen andere Targets, eventuell zusätzlich zu den von uns eingesetzten shRNAs, vom AAV-Vektor exprimiert werden würden.

Für einen anderen Vertreter der Picornaviren, das Poliovirus, konnte durch Einsatz mehrerer siRNAs, welche sowohl gegen kodierende als auch nicht-kodierende Bereiche des Poliovirusgenoms gerichtet waren, eine vollständige Viruseliminierung in einer persistent infizierten Zelllinie erreicht werden (158). In der Arbeit von Saulnier et al. waren dafür allerdings wiederholte Transfektionen der entsprechenden siRNA-Mischung erforderlich, die einmalige Applikation der siRNAs führte lediglich zu einer Verringerung des Virustiters *in vitro*. Dies steht in Einklang mit den hier erzielten *in vitro* Ergebnissen. So führte die einmalige Behandlung von HeLa-Wis-Zellen mit den antiviralen shRNAs, shRdRP2 und 4, zu einer nur teilweisen Verringerung des CVB3-Titers. Ob die vollständige Eliminierung durch erneute Vektorapplikation erzielt werden könnte, wurde nicht untersucht. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass dafür erheblich höhere Vektordosen oder eine mehr als zweimalige Applikation nötig wäre, da HeLa-Wis-Zellen, anders als die in der Studie von Saulnier et al. verwendeten Zellen, permissiv für CVB3 sind und keine persistierende Infektion etablieren. Somit ist die Anzahl entstehender Viruspartikel in HeLa-Wis-Zellen erheblich höher als in der erwähnten Studie. Da Polioviren eine hohe Ähnlichkeit zu CVB3 hinsichtlich Genomstruktur und Replikation aufweisen, erlaubt die Untersuchung von Saulnier auch vergleichende Aussagen zu den hier durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Wahl der Zielsequenzen für die siRNAs bzw. shRNAs. So wurde auch dort eine siRNA, welche gegen die RdRP von Poliovirus gerichtet ist, verwendet, was die hohe Eignung dieser konservierten Region als Target RNAi-auslösender Substanzen unterstreicht. Diese wurde mit einer gegen die 5'UTR gerichteten siRNA kombiniert. Das Ziel der siRNA lag dabei zwischen der Poliovirus-IRES und der für das VP4-Protein kodierenden Sequenz. Somit kommt auch die 5'UTR von CVB3 als mögliches Ziel weiterer shRNAs, welche eventuell zusätzlich zu shRdRP2 und shRdRP4

DISKUSSION

verwendet werden sollten, infrage. Dabei sollte allerdings nicht die IRES als Zielsequenz verwendet werden, da vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe belegen, dass siRNAs, welche gegen die IRES gerichtet sind, nicht zu einer CVB3-Inhibierung führen (102).

Die Untersuchungen von Yuan, Luan und Saulnier beschränkten sich ausschließlich auf die *in vitro* Ebene und lassen somit keine vergleichenden Schlüsse zu den von uns im Maus-Myokarditismodell erzielten *in vivo* Ergebnissen zu. Anders sieht es bei einer Analyse von Kim et al. aus dem Jahr 2007 aus. Hier wurde eine U6-Promoter-gesteuerte shRNA, welche das hoch konservierte *cis-acting* Replikationselement (CRE) in der 2C-Region des CVB3-Genoms als Target besitzt, über einen lentiviralen Vektor exprimiert (159). Die Effizienz dieser shRNA wurde in einem CVB3-Maus-Myokarditismodell untersucht. Ähnlich wie in unserem *in vivo* Versuch führte auch dort der Einsatz antiviraler RNAi zu einer Verminderung der Inflammation des Herzens mit verringerten Mengen inflammatorischer Zytokine. Außerdem stieg die Überlebensrate der behandelten Tiere im Vergleich zu den kontrollbehandelten, infizierten Mäusen an. Auch in diesem Versuch wurde allerdings durch den alleinigen Einsatz antiviraler shRNAs das Ausgangslevel uninfizierter Kontrolltiere in Bezug auf Inflammation und Überleben nicht erreicht. Gleiches trifft auf die Untersuchungen von Merl et al. zu, bei denen die hydrodynamische Injektion einer antiviralen, gegen die 2A-Protease von CVB3 gerichteten siRNA, nach CVB3-Infektion die Überlebensrate der betroffenen Mäuse zwar erhöhte, allerdings nicht auf 100 % setzte (34). Beide Studien unterstützen somit die Notwendigkeit für Kombinationstherapien zur besseren Behandlung von CVB3-Infektionen.

Die Ergebnisse aller hier vorgestellten Untersuchungen verdeutlichen das antivirale Potential löslicher Rezeptorvarianten von CAR bzw. RNAi-auslösender Substanzen zur Behandlung von CVB3-Infektionen. Dieses wurde eindringlich durch den individuellen Einsatz von sCAR-Fc und shRdRP2.4 im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Dabei führten beide Komponenten bei alleinigem Einsatz zu signifikant niedrigeren Virustitern *in vitro* und *in vivo*. Die Tendenz aus vorangegangenen Untersuchungen unserer und anderer Gruppen, dass der alleinige Einsatz einer der beiden Behandlungsoptionen nicht für eine vollständige Viruseliminierung und damit die Verhinderung von Inflammation und Nekrose *in vivo* ausreicht, wurde auch im Falle der hier vorliegenden Dissertation bestätigt.

6.4.2 Vorteile und mögliche Wirkmechanismen der Kombinationstherapie gegenüber der Einzeltherapie

Die lösliche Rezeptorvariante sCAR-Fc führte in einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe bei prophylaktischem Einsatz zu einer vollständigen Inhibierung von CVB3 in einem Maus-Myokarditismodell (63). Die nach AdG12-Vektorapplikation und Dox-Behandlung mit CVB3 infizierten Mäuse zeigten keinerlei Zeichen von Inflammation und Nekrose im Herzen und wiesen Hämodynamikparameter ähnlich denen uninfizierter Kontrolltiere auf. Trotz dieser eindrucksvollen Wirksamkeit bei prophylaktischem Einsatz birgt die Anwendung von sCAR-Fc einige Limitierungen. Die extrazellulär vorliegende Komponente sCAR-Fc bindet virale Partikel außerhalb ihrer Zielzellen, was zur Ausbildung viraler A-Partikel führt und damit die Interaktion mit dem eigentlichen zellulären Rezeptor CAR verhindert. Damit wird die Aufnahme von CVB3-Partikeln in ihre Zielzellen verhindert. Übersteigt die Menge viraler Partikel in der Peripherie allerdings ein gewisses Niveau, oder liegt sCAR-Fc nicht in ausreichenden Mengen vor, so dass Viruspartikel ungehindert in die Kardiomyozyten eindringen können, bleiben die folgenden Schritte des Replikationszyklus durch sCAR-Fc unbeeinflusst. Das erklärt auch, warum in der oben genannten und auch der hier durchgeführten Studie der alleinige, therapeutische Einsatz von sCAR-Fc nur zu einer partiellen Verbesserung des Inflamationslevels sowie der Herzfunktionsparameter führte. Diese Tatsache ist besonders im Falle der chronischen Myokarditis von Nachteil, da bei Behandlungsbeginn dieser die Viruspartikel bereits intrazellulär vorliegen und somit nicht zugänglich für die extrazelluläre Komponente sCAR-Fc sind. Auch während der späten chronischen Phase der CVB3-Infektion kann sCAR-Fc nicht effektiv antiviral eingesetzt werden, da dann die Menge infektiöser Viruspartikel, welche durch sCAR-Fc abgefangen werden können, abnimmt, während virale RNA im Herzen persistierend verbleibt, was zu langanhaltenden inflammatorischen Prozessen führt (14, 160). Das erklärt die Notwendigkeit für den parallelen Einsatz einer zweiten antiviralen Komponente zur Inhibierung von CVB3 innerhalb der Zellen.

In der vorliegenden Studie wurde daher die extrazelluläre Komponente sCAR-Fc mit einer intrazellulär wirksamen Komponente shRdRP2.4 kombiniert. In der Vergangenheit konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Kombination von vektorvermitteltem sCAR-Fc mit chemisch synthetisierten siRNAs, welche gegen die RdRP von CVB3 gerichtet sind, in Zellkultur einen synergistischen antiviralen Effekt hervorruft (161). Die Untersuchungen beschränkten sich dabei aber ausschließlich auf die *in vitro* Ebene und lassen sich auf Grund des schwierigen *Deliverys* von siRNAs auch nicht in die *in vivo* Ebene oder ein therapeutisches Modell übertragen. Für das vorliegende Projekt wurden die wirksamen siRNAs daher in Form

DISKUSSION

von shRNAs über einen viralen Vektor exprimiert und kombinativ mit AdG12-vermitteltem sCAR-Fc eingesetzt. Die Wirksamkeit der vektorvermittelten shRNAs, shRdRP2 und 4, zur partiellen Inhibierung von CVB3 bei prophylaktischer Applikation in einem Maus-Myokarditismodell, wurde ebenfalls wie unter 6.4.1 beschrieben von unserer Gruppe in der Vergangenheit nachgewiesen (37). Die gegen die CVB3-RNA gerichteten shRNAs führen dabei zu einer direkten Zerstörung des viralen Genoms nach Infektion der Zellen und verhindern somit sowohl die Bildung neuer Viruspartikel als auch die Translation viraler Proteine.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Protease 2A von CVB3 direkt in der Lage ist, mit zellulärem Dystrophin zu interagieren und dieses zu zerschneiden. Da Dystrophin ein Bestandteil des Zytoskeletts ist, führt dies unmittelbar zur Zerstörung der Zellstruktur, was die Freisetzung neuer viraler Partikel unterstützt (162, 163). Indem wir durch den Einsatz der antiviralen shRNAs die Translation viraler Proteine und damit auch der Protease 2A inhibieren, können wir diesen virusbedingten Dystrophinabbau höchstwahrscheinlich verhindern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CVB3-Proteine Apoptose induzieren, indem sie Kaspase aktivieren und mit dem proapoptotischen Protein Siva interagieren (164, 165). Diese proapoptotischen Eigenschaften von CVB3 sind strikt auf die intrazelluläre Ebene beschränkt, finden also ausschließlich nach erfolgter Infektion der Kardiomyozyten statt und können wahrscheinlich durch den RNAi-basierten Einsatz von shRdRP2.4 inhibiert werden. Die Verhinderung des Dystrophinabbaus sowie die Inhibierung von apoptotischen Prozessen in der Zelle mittels shRdRP2.4 stellen mögliche Wirkmechanismen der RNAi-basierten Anti-CVB3-Therapie dar. Um diese endgültig zu bestätigen, müssten allerdings weiterführende Analysen durchgeführt werden. So könnte ein Western Blot der myokardialen Proteine aller Mäuse aus dem beschriebenen CVB3-Kombinationsversuch, zur Detektion von Dystrophin, die These des durch RNAi unterdrückten Dystrophinabbaus untermauern. Auch eine verringerte Apoptose ließe sich mithilfe spezifischer Apoptoseassays, die z. B. die Kaspaseaktivität bestimmen, nachweisen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Anti-CVB3-Kombinationstherapie verbindet das Potential der extrazellulär wirksamen Komponente sCAR-Fc mit den Vorteilen der intrazellulär wirksamen Komponente shRdRP2.4. Sie verbindet dabei erstmals in einer *in vivo* Studie eine lösliche Proteinkomponente mit einer RNAi-basierten Komponente zur Behandlung einer viralen Erkrankung und zeigt damit eventuell eine komplett neue Behandlungsmethode auch für andere Viruserkrankungen auf. Viruspartikel werden mittels sCAR-Fc vor Zelleintritt weggefangen bzw. die Neuinfektion weiterer Zellen nach erfolgtem ersten Replikationszyklus wird verhindert. Viren, die diesem Mechanismus entgehen, werden anschließend durch die

DISKUSSION

antiviralen shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, innerhalb der Zielzellen bekämpft. Dabei verhindert der Abbau viraler Genome einerseits die Neuproduktion viraler Folgepartikel und inhibiert andererseits die Translation viraler Proteine. Möglicherweise wird dadurch der Abbau zellulärem Dystrophins durch CVB3 sowie die Induktion von Apoptose verhindert. Zur Bestätigung hierzu sind weitere Analysen notwendig. Die gesteigerte Effizienz der Kombinationstherapie gegenüber den beiden Einzeltherapien konnte hier *in vitro* durch Plaque Assays (siehe Abbildung 5.16) und Zellviabilitätsassays (siehe Abbildung 5.17) gezeigt werden. Im *in vivo* CVB3-Myokarditismodell zeigte sich der additive antivirale Effekt im Herzinflammationslevel (Abbildung 5.26, Abbildung 5.27 und Abbildung 5.28), der Viruslast im Herzen (Abbildung 5.29) sowie in Bezug auf funktionale Herzparameter (Abbildung 5.30 und Tabelle 5.2).

6.4.3 Vergleich mit anderen antiviralen Kombinationstherapien

Kombinationstherapien, welche die Replikation eines Virus an verschiedenen Punkten des Replikationszyklus inhibieren, kommen häufig in Forschung und Klinik zur Anwendung (161, 166–168). Ein entscheidender Vorteil gegenüber einer Einfachtherapie ist dabei die Verhinderung von sogenannten Escape-Mutanten. Viren sind in der Lage sehr schnell und effizient ihr Genom zu verändern, so dass Resistenzen gegen Therapeutika entstehen.

Im Falle von CVB3 ist die Entstehung von Escape-Mutanten auf die relativ hohe Fehlerrate der RdRP zurückzuführen. So wird im Zuge der Generierung viraler (+) Stränge im Schnitt ein Fehler auf 1000 bis 2000 Basen in das neu entstehende Genom eingebaut. Führt dieser zufällig zu einer Resistenz gegenüber einem Therapeutikum, so ergibt sich daraus ein Selektionsvorteil und die Mutation wird angereichert. Unsere Arbeitsgruppe lieferte bereits 2005 ein Indiz dafür, dass die Kombination mehrerer unabhängiger shRNAs gegen unterschiedliche Target-Regionen des CVB3-Genoms zur Verhinderung von Escape-Mutanten beitragen könnte (108). Ein endgültiger Beweis dafür wurde in dieser Studie von Schubert et al. allerdings nicht geliefert, da sie lediglich auf der Durchführung von Reporterassays, nicht aber Virusinhibierungsassays beruhte. Die Entstehung von CVB3-Escape-Mutanten bei RNAi-basierter antiviraler Therapie wurde auch von Merl und Wessely im Jahr 2007 untersucht (113). Sie konnten zeigen, dass es bei Einsatz von nur einer siRNA sehr schnell zur Entstehung von Escape-Mutanten kommt, die Mutationen in exakt der Zielsequenz der siRNA aufweisen. Merl und Wessely schlugen daher eine Kombinationstherapie bestehend aus mindestens drei siRNAs, welche verschiedene Regionen des CVB3-Genoms zum Ziel haben sollten, als effektiv

DISKUSSION

vor und konnten damit die Entstehung der Escape-Mutanten verhindern. Um einen ähnlichen Effekt zu erzielen, wurden im hier verwendeten scAAV-shRdRP2.4-Vektor, genau wie bei der Studie von Schubert et al., zwei unabhängige shRNAs vereint. Diese behalten jeweils ihre Wirksamkeit auch wenn die Zielsequenz der jeweils anderen shRNA eine Mutation aufweist.

Dass eine Kombination verschiedener shRNAs bzw. amiRNAs wirkungsvoller als eine einzelne shRNA bzw. amiRNA ist und die Entstehung von Escape-Mutanten verhindert, konnte auch schon für andere Viren gezeigt werden. So wurde 2008 die Entstehung von resistenten Escape-Mutanten von HIV-1 durch die Kombination von vier verschiedenen antiviralen shRNAs in Zellkultur verhindert (169). Bei der genannten Studie sowie den vorher erwähnten Anti-CVB3-Therapien handelt es sich um Kombinationstherapien, die durch Einsatz mehrerer verschiedener siRNAs bzw. shRNAs gekennzeichnet sind, die allerdings alle direkt gegen das virale Genom gerichtet sind.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kombination antiviraler shRNAs mit shRNAs, welche gegen zelluläre, für die Virusreplikation essentielle Faktoren, gerichtet sind. Diese wurde für HIV von Boutimah et al. im Jahr 2013 beschrieben (167). Dabei wurden effektive, gegen das HIV-Genom gerichtete shRNAs mit shRNAs kombiniert, die zelluläre Faktoren wie zum Beispiel Importin-7 oder das Hitzeschockprotein 1 targeteten. Die über RNAi regulierten zellulären Faktoren sind im Zuge der HIV-Replikation zum Beispiel für nukleare Transportprozesse essentiell. Die Kombination verschiedener shRNAs zeigte sich dabei effektiver als der alleinige Einsatz der Anti-HIV-shRNAs. Diese Tatsache könnte in der Zukunft auch für CVB3 genutzt werden, indem die hier beschriebenen shRNAs mit einer gegen zelluläres CAR gerichteten shRNA kombiniert werden könnten. Dass das *Silencing* von CAR zu einer verringerten Virusreplikation in Zellkultur führt, wurde von unserer Gruppe in der Vergangenheit bereits bewiesen (103).

Die Studie von Boutimah et al. untersuchte außerdem noch die Wirksamkeit einer Anti-HIV-Kombinationstherapie, welche sich aus antiviralen bzw. gegen den Wirt gerichteten shRNAs und standardmäßig zum Einsatz kommenden antiretroviralen Medikamenten zusammensetzt. Dabei konnte für einige Kombinationen ein additiver oder auch synergistischer Effekt beobachtet werden. Die Kombination mehrerer verschieden wirkender antiviraler Agenzien gegen HIV-Infektionen wurde auch von Li et al. im Jahr 2005 beschrieben (170). Dabei wurde eine shRNA, welche direkt gegen eine virale mRNA gerichtet ist, mit einem RNA-*decoy*, welcher an das HIV-Tat-Protein bindet und so die HIV-Replikation verhindert, kombiniert. Als dritte wirksame antivirale Komponente wurde ein Ribozym verwendet, das den CCR5-Rezeptor, welcher von HIV für den Zelleintritt verwendet wird, schneidet. Die Expression aller drei

DISKUSSION

Komponenten erfolgte von nur einem lentiviralen Vektor. Wurden hämatopoetische Vorläuferzellen mit dem lentiviralen Vektor transduziert und anschließend mit HIV infiziert, so reduzierte sich der Virustiter erheblich. Zusätzlich wurde ein synergistischer antiviraler Effekt durch Kombination der verschiedenen Agenzien, im Vergleich zu Einzel- oder Doppeltherapie, beobachtet. Diese Studie, die bereits teilweise erfolgreich in die Klinik übertragen wurde (171), bestätigt das große Potential antiviraler Kombinationstherapien. Diese Erkenntnis hat auch für die Behandlung von CVB3-Infektionen eine große Bedeutung. Sie legt die Vermutung nahe, dass eine Kombination der hier beschriebenen antiviralen Substanzen sCAR-Fc und shRdRP2.4 mit den momentan zur Anwendung kommenden symptomatischen Medikationen zu einer weiteren Steigerung der antiinflammatorischen Aktivität führen könnte. Hierfür wären allerdings weitere Studien nötig, vor allem auch um antagonistische Effekte auszuschließen.

Des Weiteren stellt bereits die derzeit standardmäßig zum Einsatz kommende HIV-Therapie eine Kombinationstherapie aus verschiedenen Wirkstoffen dar. Dabei werden Wirkstoffe kombiniert, die verschiedene Schritte der Virusreplikation wie das Ankoppeln des Virus an die Zielzellen (Wirkstoff Maraviroc), die reverse Transkription (Wirkstoff Emtriva) oder auch die Zusammensetzung neuer Viruspartikel (Wirkstoff Apretivus) inhibieren (172). Diese hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) zeigt sich in der Klinik als wirksames Mittel zur Eindämmung, wenn auch nicht endgültigen Eliminierung, einer HIV-Infektion und verdeutlicht das große Potential antiviraler Kombinationstherapien (173). Gleiches trifft für die Behandlung von Hepatitis-C-Erkrankungen zu, die ebenfalls standardmäßig durch Kombinationstherapie mehrerer Wirkstoffe erfolgt (168).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die große Anzahl momentan zur Anwendung kommender antiviraler Kombinationstherapien das Potential von Mehrfachstrategien im Kampf gegen virale Erkrankungen unterstreicht. Die hier beschriebene Doppeltherapie aus sCAR-Fc und shRdRP2.4 beweist dabei in einem *proof of principle* Ansatz, dass auch im Falle von CVB3-Infektionen das antivirale Potential einer Therapie durch gleichzeitige Anwendung mehrerer Komponenten gesteigert werden kann. Die Kombination aus zwei verschiedenen Agenzien stellt dabei erst eine Anfangsstufe kombinatorischer Therapien dar und könnte in Zukunft noch durch zusätzliche Komponenten erweitert werden.

6.4.4 Sicherheit der verwendeten viralen Vektoren als gentherapeutisches Werkzeug

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die antiviral wirksamen Komponenten mit Hilfe viraler Vektoren exprimiert. Dabei wurde sCAR-Fc von einem adenoviralen Vektor, welcher von

DISKUSSION

Adenovirus 5 abstammt (AdG12), exprimiert. Für die Expression der antiviralen shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4, wurden scAAV-Vektoren verwendet. Getherapeutische Ansätze hängen stark von der Sicherheit der verwendeten viralen Vektoren ab.

Im Rahmen der durchgeführten Maus *in vivo* Versuche wurden keinerlei Nebenwirkungen durch die Anwendung beider viraler Vektoren beobachtet. Die mit den scAAV2/9-Vektoren transduzierten Mäuse wiesen in den darauffolgenden Tagen keine Verhaltensauffälligkeiten wie Appetitlosigkeit oder Apathie auf, die auf das Vorhandensein toxischer Nebeneffekte hätten schließen lassen. Auch nach der folgenden Applikation von AdG12 wurden bis zur CVB3-Infektion keine Verhaltensauffälligkeiten oder Krankheitsanzeichen beobachtet. Um diese allerdings eindeutig auszuschließen, wären Blutuntersuchungen wie zum Beispiel die Bestimmung von Leberenzymen nötig. So wies zum Beispiel die Gruppe um Grimm et al. nach, dass das Serumlevel der Alaninaminotransferase nach Applikation von shRNA-exprimierenden scAAV-Vektoren ansteigt, was auf eine Lebertoxizität schließen lässt (174). Auf weiterführende Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings verzichtet, da die Tiere auf Grund zweimaliger Operation und anschließender Infektion bereits weitreichenden Belastungen ausgesetzt waren.

Abgesehen von den unmittelbar nach Applikation möglichen Nebenwirkungen können virale Vektoren und die von ihnen exprimierten Substanzen auch Langzeitfolgen für den Organismus haben. Im Falle von sCAR-Fc ist nicht mit derartigen Langzeitwirkungen zu rechnen, da adenovirale Vektoren schnell durch das Immunsystem erkannt und innerhalb weniger Tage bis Wochen eliminiert werden (128). Vom vektorexprimierten sCAR-Fc selbst sind keine unerwünschten Nebenwirkungen zu erwarten, da er auf den körpereigenen Substanzen CAR und IgG basiert. Des Weiteren ist die Expression von sCAR-Fc strikt durch die Gabe von Doxycyclin reguliert, wodurch sie nach erfolgreichem Einsatz sofort ausgeschaltet werden kann und damit unerwünschte Off-Target-Effekte oder Langzeitwirkungen vermieden werden (63). Im Falle der scAAV-Vektoren, welche zur Expression der antiviralen shRNAs verwendet wurden, konnte von anderen Gruppen gezeigt werden, dass eine stabile Transgenexpression nach Applikation über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erzielt wird (118). Des Weiteren basiert die erste in der westlichen Welt für den Menschen zugelassene getherapeutische Medikation auf dem Einsatz von AAV-Vektoren, was die Sicherheit dieses Vektortyps unterstreicht (127). Allerdings sollte insbesondere die Lebertoxizität, welche durch die AAV-vektorvermittelten shRNAs hervorgerufen werden kann, über einen längeren Zeitraum *in vivo* beobachtet werden, als es im Rahmen des beschriebenen Tierversuchs (Beendigung des Experiments 17 Tage nach Vektorapplikation) möglich war.

DISKUSSION

Damit könnten toxische Effekte der shRNAs, wie sie von anderen Gruppen bei hohen Vektordosen beschrieben wurden, untersucht werden (142, 143).

Generell lassen die während des CVB3-Mausexperimentes gemachten Beobachtungen sowohl den adenoviralen Vektor AdG12 als auch den scAAV2/9-Vektor zur Expression von shRdRP2.4 als geeignete gentherapeutische Werkzeuge für die antivirale Therapie gegen CVB3 erscheinen.

6.4.5 Mögliche Anwendung der Kombinationstherapie in der Klinik

Coxsackievirus B3-Infektionen und die aus ihnen resultierenden Myokarditiserkrankungen werden momentan im medizinischen Alltag lediglich symptomatisch behandelt. Daher sollte die hier beschriebene Kombinationstherapie aus sCAR-Fc und shRdRP2.4 hinsichtlich ihres Potentials zur Anwendung in der Klinik untersucht werden.

Eine Schwierigkeit der Behandlung von CVB3-Infektionen im Menschen ist die Tatsache, dass die Behandlung erst dann eingeleitet werden kann, wenn erste Symptome der durch CVB3 ausgelösten Erkrankungen bestehen. Zu diesem Zeitpunkt kann also die initiale Aufnahme der Viren in die Zielzellen mittels sCAR-Fc nicht mehr inhibiert werden. Eine Gabe von sCAR-Fc ist dann allerdings immer noch sinnvoll, weil sie weiterführende Infektionen nach Lyse der initial betroffenen Zellen verhindern kann. Die Gabe eines adenoviralen Vektors zur Expression von sCAR-Fc, wie AdG12, erscheint zur Behandlung einer viralen Infektion in einem medizinisch realistischen Szenario allerdings ungeeignet. Daher sollte die Herstellung von sCAR-Fc als rekombinantes Protein mit entsprechender Aufreinigung für die klinische Verwendung in Betracht gezogen werden. Prinzipiell ist es möglich, lösliche Rezeptorvarianten von CAR rekombinant herzustellen und diese dann zur antiviralen Therapie gegen CVB3 einzusetzen, wie die Studie von Yanagawa et al. aus dem Jahr 2004 beweist (61). Die rekombinante Gabe des Proteins hätte genau wie bei AdG12 den Vorteil, dass sie zu einer schnellen, unmittelbaren Wirksamkeit von sCAR-Fc führt. Auch unerwünschte Nebenwirkungen oder Langzeitfolgen wären genau wie bei der Vektorapplikation unwahrscheinlich, da der Verbleib des Proteins in der Peripherie auf Grund des *Turnovers* auf wenige Tage bis Wochen begrenzt wäre.

Die Wirksamkeit von sCAR-Fc im Patienten wäre allerdings limitiert. Zum einen kann, wie erwähnt, die initiale Virusaufnahme nicht durch therapeutische Gabe des Proteins inhibiert werden. Zum anderen nimmt die Menge replikationskompetenter CVB3-Partikel in der chronischen Phase der CVB3-Infektion ab, wobei persistierende, virale RNA fortwährend nachgewiesen werden kann. Diese persistierende RNA dient als Ausgangsmaterial für die

DISKUSSION

Translation viraler Proteine, führt zu langanhaltenden inflammatorischen Prozessen im Myokard und kann nicht durch die extrazellulär wirksame Komponente sCAR-Fc inhibiert werden (14, 160). Daher wäre die Applikation der zusätzlichen Komponente shRdRP2.4 als Bestandteil einer Kombinationstherapie, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, auch in der Klinik angezeigt. Diese kann, wie hier gezeigt, auf Grund der nur geringfügig zu erwartenden Nebenwirkungen (siehe Abschnitt 6.4.4) über einen AAV-Vektor appliziert werden, was eine langfristige Expression der antiviralen shRNAs direkt im Zielgewebe, dem Myokard, gewährleisten würde. Allerdings würde auch im Falle der shRNAs die Applikation der antiviralen Substanz erst nach Auftreten der ersten Symptome der akuten Myokarditis erfolgen. Ehe dann ein ausreichendes Level an prozessierten siRNAs zur Zerstörung aller viralen Plusstränge in den Kardiomyozyten vorliegt, würde eine gewisse Zeitspanne vergehen, in der CVB3 ungehindert replizieren kann.

Daher wird auch bei Verwendung beider Komponenten, sCAR-Fc und shRdRP2.4, zur antiviralen Therapie im Klinikalltag eine Schädigung des Myokards im gewissen Rahmen nicht zu verhindern sein. Eventuell sollten deshalb zusätzlich die bisher symptomatisch eingesetzten Agenzien verwendet werden. Der Nutzen bzw. auch eventuelle Nebenwirkungen einer damit erfolgenden Triple- oder auch Mehrfachtherapie müssen allerdings vorab in Tierversuchen bzw. präklinischen Studien geklärt werden. Alternativ könnte eine Möglichkeit zur Steigerung des antiviralen Potentials der Therapie die Applikation der antiviralen siRNAs, siRdRP2 und siRdRP4, in chemisch synthetisierter Form über Herzkatheter sein, welche eine schnellere Viruseliminierung im Myokard herbeiführen könnte. Die Applikation nackter Nukleinsäuren per Katheter ins Myokard wurde auch schon erfolgreich in Schweinen durchgeführt (175). Der scAAV-Vektor zur Expression von shRdRP2.4 könnte dann zusätzlich für die spätere chronische Infektionsphase appliziert werden.

Ein weiteres wichtiges Indiz für die mögliche Weiterentwicklung der beschriebenen Kombinationstherapie hin zu einer am Patienten eingesetzten Therapie liefert die Tatsache, dass eine Vielzahl von Fc-Fusionsproteinen bereits für die Behandlung von Menschen bei verschiedenen Krankheitsbildern zugelassen ist. So kommt zum Beispiel das Medikament Etanercept®, ein Fusionsprotein bestehend aus der löslichen Domäne des TNF-Rezeptors und dem Fc-Teil von humanem IgG, seit 1998 zur Behandlung von rheumatoider Arthritis zur Anwendung (176). Dies zeigt auch, dass durch den Fc-Teil keine unerwünschten Nebenwirkungen zu erwarten sind und sich das Molekül sCAR-Fc grundsätzlich zum Einsatz im Patienten eignen könnte. Auch RNAi-auslösende Substanzen werden bereits umfangreich im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen im Menschen wie

DISKUSSION

z. B. Virusinfektionen eingesetzt (siehe Abschnitt 1.5.3). Aber auch anderweitige Erkrankungen wie die Makula-Degeneration können mittels RNAi bekämpft werden. Somit scheint auch der Einsatz antiviraler shRNAs, wie shRdRP2 und shRdRP4, welche gegen das CVB3-Genom gerichtet sind, als realistische Therapieoption im Menschen. Auch die erste in der westlichen Welt zugelassene gentherapeutische Medikation zur Behandlung einer seltenen Fettstoffwechselerkrankung zeigt das generelle Potential gentherapeutischer Anwendungen als Therapieoption in der Klinik auf (127).

Die vektorvermittelte Expression von sCAR-Fc und shRdRP2.4 zur Behandlung von CVB3-Infektionen im Menschen erscheint somit als realistisch für die Zukunft. Dennoch könnte die Gabe von sCAR-Fc, trotz der gegebenen Sicherheit des adenoviralen Vektors AdG12, dabei vermutlich als rekombinantes Protein erfolgen, während für die Expression von shRdRP2.4 durchaus ein AAV-Vektor infrage kommt. Um die dennoch zu erwartenden Myokardschäden bei CVB3-bedingter Myokarditis abzuwenden, sollten zusätzlich symptommildernde Substanzen oder schnell wirksame, antivirale siRNAs appliziert werden.

6.5 Ausblick

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kombinationstherapie akuter CVB3-bedingter Myokarditis wurden die antiviralen shRNAs prophylaktisch verabreicht. Um dem medizinisch relevanten Verlauf eher zu entsprechen, sollte dieses Modell so abgeändert werden, dass nicht nur sCAR-Fc sondern auch shRdRP2 und shRdRP4 therapeutisch, d. h. nach CVB3-Infektion appliziert werden. Im weiteren Verlauf soll dann die Kombinationstherapie in einem chronischen CVB3-Myokarditismodell hinsichtlich ihres antiviralen Potentials getestet werden. Da die Behandlung der chronischen Myokarditis und der sich aus ihr entwickelnden dilatativen Kardiomyopathie das Hauptproblem in der Klinik darstellen, wäre eine Übertragung des Doppeltherapieansatzes in ein chronisches Modell von großer Bedeutung. Des Weiteren kommt auch eine Kombination mit zusätzlichen Wirkstoffen wie Immunsuppressiva oder -stimulanzien sowohl im akuten als auch chronischen Myokarditismodell infrage.

Eine weitere Aufgabe wird in der Etablierung eines rekombinanten Expressionssystems für sCAR-Fc sowie einer darauffolgenden Aufreinigungsmethode für das Protein bestehen. Da die rekombinante Applikation von sCAR-Fc wahrscheinlicher als die vektorvermittelte Expression für eine Verwendung im Patienten erscheint, stellt dies eine Voraussetzung für die Anwendung der Kombinationstherapie im Patienten dar.

7 Zusammenfassung

Akute Myokarditiserkrankungen im Menschen stellen ein schwerwiegendes Problem in der Klinik dar und sind eine der Hauptursachen für Herzinsuffizienz. Die sich aus ihnen entwickelnden chronischen Formen bis hin zur DCM können zu Herzversagen und der Notwendigkeit einer Herztransplantation führen. Myokarditiden können durch eine Vielzahl infektiöser Erreger ausgelöst werden, wobei Enteroviren, insbesondere Coxsackievirus B3, einen hohen Anteil ausmachen. Da die Behandlung CVB3-bedingter Myokarditiserkrankungen in der Klinik größtenteils symptomatisch erfolgt, besteht ein großer Bedarf an der Entwicklung neuer, virusspezifischer Behandlungsoptionen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt das antivirale Potential einer Anti-CVB3-Kombinationstherapie, bestehend aus einer löslichen Rezeptorvariante sCAR-Fc und Anti-CVB3-shRNAs, shRdRP2 und shRdRP4. Die Expression der Substanzen erfolgte dabei ausschließlich über virale Vektoren.

1. Sowohl sCAR-Fc als auch shRdRP2.4 waren in Zellkultur in der Lage, die CVB3-Replikation effektiv zu inhibieren. Dies zeigte sich in der Verminderung des Virustiters und einer Erhöhung der Zellviabilität.
2. Bei gleichzeitigem Einsatz beider Komponenten *in vitro* konnte ein additiver antiviraler Effekt beobachtet werden, der eine signifikante Steigerung gegenüber den Einzeltherapien aufwies. Der antivirale Effekt war ferner abhängig von der Dosis der eingesetzten Komponenten, was die Spezifität des additiven Effekts belegt.
3. Auch in einem akuten *in vivo* CVB3-Maus-Myokarditismodell zeigte sich das antivirale Potential von therapeutisch eingesetztem sCAR-Fc und prophylaktisch verabreichten shRdRP2 und 4. Beide Substanzen waren bei individuellem Einsatz in der Lage das Inflammationslevel des Herzens sowie die Viruslast im Myokard signifikant zu verringern. Ferner verbesserten sie die hämodynamischen Parameter signifikant.
4. Der *in vitro* beobachtete, additive antivirale Effekt bei gleichzeitigem Einsatz von sCAR-Fc und shRdRP2.4, wurde auch *in vivo* deutlich. So wiesen die zweifach behandelten Tiere, im Vergleich zu den einzeltherapierten, signifikant niedrigere Virustiter und Inflammationslevel im Herzen auf. Auch ihre Herzfunktionsparameter, als wichtigste Kriterien für den Erfolg einer antiviralen Therapie gegen CVB3, waren signifikant besser, als die der einzeltherapierten.

ZUSAMMENFASSUNG

5. Die *in vivo* erzielten Ergebnisse der Kombinationstherapie wiesen eine äußerst starke Konsistenz auf. So konnte nach Behandlung mit AdG12 und Dox bzw. mit scAAV2/9-shRdRP2.4 die jeweils wirksame Komponente sCAR-Fc bzw. shRdRP2.4 erfolgreich nachgewiesen werden. Durch diese verringerten sich die Virustiter im Herzen signifikant, was zu einer schwächeren Immunreaktion auf das Virus mit verringerter Inflammation und letztlich zu einer verbesserten Herzfunktion führte.
6. Nebenwirkungen oder antagonistische Effekte bei gleichzeitigem Einsatz beider antiviraler Komponenten wurden weder *in vitro* noch *in vivo* beobachtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation veranschaulichen das große Potential von Kombinationstherapien bei der Behandlung viraler Erkrankungen. Die Strategie, Viren an verschiedenen Stellen ihres Replikationszyklus anzugreifen und somit stärker zu inhibieren, ist dabei nicht nur für CVB3-Infektionen anwendbar, sondern kann generell auf alle Viren übertragen werden. Insbesondere bei schnell mutierenden Viren kann dadurch außerdem die Entstehung von Escape-Mutanten verhindert werden. Die Kombination zweier verschiedener Wirkstoffe stellt dabei nur den ersten Schritt einer Kombinationstherapie dar und kann in Zukunft je nach Komplexität und Virulenz des Virus um weitere Komponenten erweitert werden.

8 Summary

Acute myocarditis in humans is a major issue in the clinic and one of the main causes for heart insufficiency. Chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy can develop upon acute myocarditis and lead to heart failure and the necessity for heart transplantation. Myocarditis can be caused by a wide variety of infectious agents, with enteroviruses and especially CVB3 being the most prevalent. Since the treatment of CVB3 caused myocarditis is mostly symptomatic, there is a big need for the development of new, virus-specific treatment options.

The present study describes the antiviral potential of an anti-CVB3 combination therapy consisting of a soluble receptor variant, called sCAR-Fc, and anti-CVB3 shRNAs, namely shRdRP2.4. For the expression of both components, viral vectors were employed.

1. *In vitro*, both sCAR-Fc and shRdRP2.4 were capable of inhibiting CVB3 replication effectively. This was shown by the reduction of virus titer as well as the enhancement of cell viability.
2. When combining both components *in vitro*, an additive antiviral effect was observed. The enhancement of the antiviral potency was significant compared to the individual effects of sCAR-Fc and shRdRP2.4. Furthermore the antiviral effect was dose-dependent, proving its specificity.
3. In an acute *in vivo* CVB3 mouse myocarditis model, the antiviral potential of therapeutically applied sCAR-Fc and prophylactically applied shRdRP2.4 was also confirmed. When individually applying each of the components, the inflammation level and virus titer in the heart were significantly reduced. Furthermore, the hemodynamic parameters of the animals were also improved significantly.
4. The additive antiviral effect, which was observed *in vitro* when applying sCAR-Fc and shRdRP2.4 simultaneously, also became apparent *in vivo*. Combined treated mice showed significantly less inflammation and lower virus titers in the heart compared to each of the individually treated groups. Also their heart parameters, as the most important criteria for the success of an antiviral treatment against CVB3, were significantly improved compared to single treatment.

SUMMARY

5. The results of the *in vivo* approach show a remarkable consistency. After treatment with AdG12 and Dox or scAAV2/9-shRdRP2.4 respectively, the antiviral agents sCAR-Fc and shRdRP2.4 were present in the animals, leading to a significant decrease of the virus titer in the heart. Therefore the immune reaction towards the virus was strongly reduced as shown by a reduced level of inflammation in the heart. Consequently the heart function in treated animals was significantly improved compared to virus-infected, untreated mice.

6. No side effects or antagonistic effects were observed following combined application of sCAR-Fc and shRdRP2.4 both *in vitro* and *in vivo*.

The results of the present study prove the great potential of combination therapies for the treatment of viral diseases. The strategy to target viruses at distinct points of their replication cycle to gain higher antiviral efficacy, is not only applicable for CVB3 infections but can also be transferred to virus infections in general. Another major advantage of combination treatment is the prevention of escape mutants especially in fast mutating viruses. The combination of two active components is only the first possible step of a combined therapy and can be extended in the future depending on virus complexity and virulence.

9 Literaturverzeichnis

1. Kühl,U. and Schultheiss,H.-P. (2012) Myocarditis: early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.*, **109**, 361–368.
2. Haddad,F., Berry,G., Doyle,R.L., Martineau,P., Leung,T.-K. and Racine,N. (2007) Active bacterial myocarditis: a case report and review of the literature. *J. Hear. Lung Transplant.*, **26**, 745–749.
3. Sergi,C., Weitz,J., Hofmann,W.J., Sinn,P., Eckart,A., Otto,G., Schnabel,P.A. and Otto,H.F. (1996) Aspergillus endocarditis, myocarditis and pericarditis complicating necrotizing fasciitis. Case report and subject review. *Virchows Arch.*, **429**, 177–180.
4. Harris,M., Narayan,S.A. and Orchard,E.A. (2012) Fungal myocarditis in a preterm neonate. *BMJ Case Rep.*, doi: **10.1136**, 1–3.
5. Calabrese,F. and Thiene,G. (2003) Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc. Res.*, **60**, 11–25.
6. Takano,H., Nakagawa,K., Ishio,N., Daimon,M., Daimon,M., Kobayashi,Y., Hiroshima,K. and Komuro,I. (2008) Active myocarditis in a patient with chronic active Epstein–Barr virus infection. *Int. J. Cardiol.*, **130**, e11–e13.
7. Roubille,C., Brunel,A.-S., Gahide,G., Vernhet Kovacsik,H. and Le Quellec,A. (2010) Cytomegalovirus (CMV) and acute myocarditis in an immunocompetent patient. *Intern. Med.*, **49**, 131–133.
8. Matsumori,A., Shimada,T., Chapman,N.M., Tracy,S.M. and Mason,J.W. (2006) Myocarditis and heart failure associated with hepatitis C virus infection. *J. Card. Fail.*, **12**, 293–298.
9. Treacy,A., Carr,M.J., Dunford,L., Palacios,G., Cannon,G.A., O’Grady,A., Moran,J., Hassan,J., Loy,A., Connell,J., et al. (2010) First report of sudden death due to myocarditis caused by adenovirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 642–645.
10. Molina,K.M., Garcia,X., Denfield,S.W., Fan,Y., Morrow,W.R., Towbin,J.A., Frazier,E.A. and Nelson,D.P. (2013) Parvovirus B19 myocarditis causes significant morbidity and mortality in children. *Pediatr. Cardiol.*, **34**, 390–397.
11. Fairweather,D., Stafford,K.A. and Sung,Y.K. (2012) Update on coxsackievirus B3 myocarditis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **24**, 401–407.

LITERATURVERZEICHNIS

12. Shauer,A., Gotsman,I., Keren,A., Zwas,D.R., Hellman,Y., Durst,R. and Admon,D. (2013) Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment. *Isr. Med. Assoc. J.*, **15**, 180–185.
13. Naegeli,B. (2004) Myokarditis: Diagnostik und Verlauf. *Kardiovaskuläre Medizin*, **7**, 248–257.
14. 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. U. S. A.*, **89**, 314–318.
15. Fairweather,D., Frisancho-Kiss,S. and Rose,N.R. (2005) Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev. Med. Virol.*, **15**, 17–27.
16. Wessely,R., Klingel,K., Santana,L.F., Dalton,N., Hongo,M., Lederer,W.J., Kandolf,R. and Knowlton,K.U. (1998) Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.*, **102**, 1444–1453.
17. Yajima,T. and Knowlton,K.U. (2009) Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation*, **119**, 2615–2624.
18. Pauschinger,M., Chandrasekharan,K., Li,J., Schwimmbeck,P.L., Noutsias,M. and Schultheiss,H.P. (2002) Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy. *Herz*, **27**, 677–682.
19. Dalldorf,G. and Sickles,G.M. (1948) An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis human saliva as a germination inhibitor. *Science*, **108**, 61–62.
20. Ramsingh,A.I. (1997) Coxsackieviruses and pancreatitis. *Front. Biosci.*, **2**, e53–62.
21. Shafren,D.R., Dorahy,D.J., Ingham,R.A., Burns,G.F. and Barry,R.D. (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.*, **71**, 4736–4743.
22. Klump,W.M., Bergmann,I., Müller,B.C., Ameis,D. and Kandolf,R. (1990) Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, **64**, 1573–1583.
23. Bailey,J.M. and Tappich,W.E. (2007) Structure of the 5' nontranslated region of the coxsackievirus b3 genome: Chemical modification and comparative sequence analysis. *J. Virol.*, **81**, 650–668.

LITERATURVERZEICHNIS

24. Whitton,J.L., Cornell,C.T. and Feuer,R. (2005) Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 765–776.
25. Hughes,A.L. (2004) Phylogeny of the Picornaviridae and differential evolutionary divergence of picornavirus proteins. *Infect. Genet. Evol.*, **4**, 143–152.
26. Agol,V.I. (2012) Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity? *Trends Microbiol.*, **20**, 570–576.
27. Coyne,C.B. and Bergelson,J.M. (2005) CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 869–882.
28. Goodfellow,I.G., Evans,D.J., Blom,A.M., Kerrigan,D., Miners,J.S., Morgan,B.P. and Spiller,O.B. (2005) Inhibition of coxsackie B virus infection by soluble forms of its receptors: binding affinities, altered particle formation, and competition with cellular receptors. *J. Virol.*, **79**, 12016–12024.
29. Coyne,C.B. and Bergelson,J.M. (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, **124**, 119–131.
30. Fechner,H., Pinkert,S., Geisler,A., Poller,W. and Kurreck,J. (2011) Pharmacological and biological antiviral therapeutics for cardiac coxsackievirus infections. *Molecules*, **16**, 8475–8503.
31. Pevear,D.C., Tull,T.M., Seipel,M.E. and Groarke,J.M. (1999) Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2109–2115.
32. Bauer,S., Gottesman,G., Sirota,L., Litmanovitz,I., Ashkenazi,S. and Levi,I. (2002) Severe Coxsackie virus B infection in preterm newborns treated with pleconaril. *Eur. J. Pediatr.*, **161**, 491–493.
33. Yuan,J., Cheung,P.K.M., Zhang,H., Chau,D., Yanagawa,B., Cheung,C., Luo,H., Wang,Y., Suarez,A., McManus,B.M., et al. (2004) A phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide specifically inhibits coxsackievirus B3 replication in cardiomyocytes and mouse hearts. *Lab. Investig.*, **84**, 703–714.
34. 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**, 1583–1592.
35. Ahn,J., Jun,E.S., Lee,H.S., Yoon,S.Y., Kim,D., Joo,C., Kim,Y.K. and Lee,H. (2005) A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge. *J. Virol.*, **79**, 8620–8624.

LITERATURVERZEICHNIS

36. Yuan,J., Cheung,P.K.M., 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**, 2151–2159.
37. Fechner,H., Sipo,I., Westermann,D., Pinkert,S., Wang,X., Suckau,L., Kurreck,J., Zeichhardt,H., Müller,O., Vetter,R., et al. (2008) Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *J. Mol. Med.*, **86**, 987–997.
38. Miyamoto,T., Matsumori,A., Hwang,M.-W., Nishio,R., Ito,H. and Sasayama,S. (2001) Therapeutic effects of FTY720, a new immunosuppressive agent, in a murine model of acute viral myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**, 1–6.
39. Wang,Y.-X., da Cunha,V., Vincelette,J., White,K., Velichko,S., Xu,Y., Gross,C., Fitch,R.M., Halks-Miller,M., Larsen,B.R., et al. (2007) Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and -alpha2 in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H69–76.
40. Mirić,M., Vasiljević,J., Bojić,M., Popović,Z., Keserović,N. and Pesić,M. (1996) Long-term follow up of patients with dilated heart muscle disease treated with human leucocytic interferon alpha or thymic hormones initial results. *Heart*, **75**, 596–601.
41. Kühl,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**, 2793–2798.
42. Leipner,C., Grün,K., Schneider,I., Glück,B., Sigusch,H.H. and Stelzner,A. (2004) Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, **193**, 141–147.
43. Li,M., Wang,X., Xie,Y., Xie,Y., Zhang,X., Zou,Y., Ge,J. and Chen,R. (2013) Initial weight and virus dose: two factors affecting the onset of acute coxsackievirus B3 myocarditis in C57BL/6 mouse-a histopathology-based study. *Cardiovasc. Pathol.*, **22**, 96–101.
44. Huber,S.A. and Pfaeffle,B. (1994) Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J. Virol.*, **68**, 5126–5132.
45. Frizelle,S., Schwarz,J., Huber,S.A. and Leslie,K. (1992) Evaluation of the effects of low molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice. *Am. J. Pathol.*, **141**, 203–209.

LITERATURVERZEICHNIS

46. Schmidtke,M., Merkle,I., Klingel,K., Hammerschmidt,E., Zautner,A.E. and Wutzler,P. (2007) The viral genetic background determines the outcome of coxsackievirus B3 infection in outbred NMRI mice. *J. Med. Virol.*, **79**, 1334–1342.
47. Wee,L., Liu,P., Penn,L., Butany,J.W., McLaughlin,P.R., Sole,M.J. and Liew,C.C. (1992) Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction. *Circulation*, **86**, 1605–1614.
48. Bowles,K.R., Gibson,J., Wu,J., Shaffer,L.G., Towbin,J.A. and Bowles,N.E. (1999) Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum. Genet.*, **105**, 354–359.
49. Carson,S.D. (2001) Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. *Rev. Med. Virol.*, **11**, 219–226.
50. Dorner,A.A., Wegmann,F., Butz,S., Wolburg-Buchholz,K., Wolburg,H., Mack,A., Nasdala,I., August,B., Westermann,J., Rathjen,F.G., et al. (2005) Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J. Cell Sci.*, **118**, 3509–3521.
51. Sinnreich,M., Shaw,C.A., Pari,G., Nalbantoglu,J., Holland,P.C. and Karpati,G. (2005) Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle. *Neuromuscul. Disord.*, **15**, 541–548.
52. Van Raaij,M.J., Chouin,E., van der Zandt,H., Bergelson,J.M. and Cusack,S. (2000) Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure*, **8**, 1147–1155.
53. Asher,D.R., Cerny,A.M., Weiler,S.R., Horner,J.W., Keeler,M.L., Neptune,M.A., Jones,S.N., Bronson,R.T., DePinho,R.A. and Finberg,R.W. (2005) Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis*, **42**, 77–85.
54. Lisewski,U., Shi,Y., Wrackmeyer,U., Fischer,R., Chen,C., Schirdewan,A., Jüttner,R., Rathjen,F., Poller,W., Radke,M.H., et al. (2008) The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J. Exp. Med.*, **205**, 2369–79.
55. Pazirandeh,A., Sultana,T., Mirza,M., Rozell,B., Hultenby,K., Wallis,K., Vennström,B., Davis,B., Arner,A., Heuchel,R., et al. (2011) Multiple phenotypes in adult mice following inactivation of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (Car) gene. *PLoS One*, **6**, e20203.
56. Christiansen,D., Devaux,P., Réveil,B., Evtashev,A, Horvat,B., Lamy,J., Raboutdin-Combe,C., Cohen,J.H. and Gerlier,D. (2000) Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J. Virol.*, **74**, 4672–4678.

LITERATURVERZEICHNIS

57. Tayyari,F., Marchant,D., Moraes,T.J., Duan,W., Mastrangelo,P. and Hegele,R.G. (2011) Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.*, **17**, 1132–1135.
58. Colston,E. and Racaniello,V.R. (1994) Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.*, **13**, 5855–5862.
59. Lim,B., Choi,J., Nam,J., Gil,C. and Shin,J. (2006) Virus receptor trap neutralizes coxsackievirus in experimental murine viral myocarditis. *Cardiovasc. Res.*, **71**, 517 – 526.
60. Milstone,A.M., Petrella,J.E., Sanchez,M.D., Mahmud,M., Whitbeck,J.C. and Bergelson,J.M. (2005) Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J. Virol.*, **79**, 655–660.
61. Yanagawa,B., Spiller,O.B., Proctor,D.G., Choy,J., Luo,H., Zhang,H.M., Suarez,A., Yang,D. and McManus,B.M. (2004) Soluble recombinant coxsackievirus and adenovirus receptor abrogates coxsackievirus b3-mediated pancreatitis and myocarditis in mice. *J. Infect. Dis.*, **189**, 1431–1439.
62. Dörner,A., Grunert,H.P., Lindig,V., Chandrasekharan,K., Fechner,H., Knowlton,K.U., Isik,A., Pauschinger,M., Zeichhardt,H. and Schultheiss,H.P. (2006) Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with the soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. *J. Mol. Med.*, **84**, 842–851.
63. Pinkert,S., Westermann,D., Wang,X., Klingel,K., Dörner,A., Savvatis,K., Grössl,T., Krohn,S., Tschöpe,C., Zeichhardt,H., et al. (2009) Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation*, **120**, 2358–2366.
64. 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**, 806–811.
65. Kennerdell,J.R. and Carthew,R.W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017–1026.
66. Waterhouse,P.M., Graham,M.W. and Wang,M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 13959–13964.
67. Ngô,H., Tschudi,C., Gull,K. and Ullu,E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 14687–14692.

LITERATURVERZEICHNIS

68. Karpala,A.J., Doran,T.J. and Bean,A.G.D. (2005) Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol. Cell Biol.*, **83**, 211–216.
69. 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**, 494–498.
70. McCaffrey,A.P., Meuse,L., Pham,T.-T.T., Conklin,D.S., Hannon,G.J. and Kay,M.A. (2002) RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38–39.
71. Wilson,J.A., Jayasena,S., Khvorova,A., Sabatino,S., Rodrigue-Gervais,I.G., Arya,S., Sarangi,F., Harris-Brandts,M., Beaulieu,S. and Richardson,C.D. (2003) RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2783–2788.
72. Ter Brake,O. and Berkhout,B. (2005) A novel approach for inhibition of HIV-1 by RNA interference: counteracting viral escape with a second generation of siRNAs. *J. RNAi Gene Silenc.*, **1**, 56–65.
73. Kaiser,P.K., Symons,R.C.A., Shah,S.M., Quinlan,E.J., Tabandeh,H., Do,D.V, Reisen,G., Lockridge,J.A., Short,B., Guercioli,R., et al. (2010) RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *Am. J. Ophthalmol.*, **150**, 33–39.
74. 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**, 363–366.
75. Doi,N., Zenno,S., Ueda,R., Ohki-Hamazaki,H., Ui-Tei,K. and Saigo,K. (2003) Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr. Biol.*, **13**, 41–46.
76. Tomari,Y. and Zamore,P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.*, **19**, 517–529.
77. 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.
78. Khvorova,A., Reynolds,A. and Jayasena,S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209–216.
79. 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**, 1434–1437.
80. 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**, 443–453.

LITERATURVERZEICHNIS

81. Lee,R.C., Feinbaum,R.L. and Ambros,V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843–854.
82. Fang,Z., Du,R., Edwards,A., Flemington,E.K. and Zhang,K. (2013) The sequence structures of human microRNA molecules and their implications. *PLoS One*, **8**, e54215.
83. Lin,S. and Ying,S. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. *Methods Mol. Biol.*, **342**, 295–312.
84. Lee,Y., Ahn,C., Han,J., Choi,H., Kim,J., Yim,J., Lee,J., Provost,P., Kim,S. and Kim,V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415–419.
85. 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**, 3011–3016.
86. Kurreck,J. (2009) RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 1378–1398.
87. 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**, 102–114.
88. Chekulaeva,M. and Filipowicz,W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **31**, 452–460.
89. Lewis,D.L. and Wolff,J.A. (2005) Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods Enzymol.*, **392**, 336–350.
90. 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**, 948–958.
91. 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.
92. 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**, 1327–1333.
93. Zeng,Y., Cai,X. and Cullen,B.R. (2005) Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods Enzymol.*, **392**, 371–380.
94. Yuan,J., Wang,X., Zhang,Y., Hu,X., Deng,X., Fei,J. and Li,N. (2006) shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. *Mol. Biol. Rep.*, **33**, 43–49.

LITERATURVERZEICHNIS

95. Chen,W., Liu,M., Jiao,Y., Yan,W., Wei,X., Chen,J., Fei,L., Liu,Y., Zuo,X., Yang,F., et al. (2006) Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J. Virol.*, **80**, 3559–3566.
96. Grimm,D. and Kay,M.A. (2007) RNAi and gene therapy: a mutual attraction. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 473-481.
97. Dissen,G.A., Lomniczi,A., Neff,T.L., Hobbs,T.R., Kohama,S.G., Kroenke,C.D., Galimi,F. and Ojeda,S.R. (2009) In vivo manipulation of gene expression in non-human primates using lentiviral vectors as delivery vehicles. *Methods*, **49**, 70–77.
98. Koornneef,A., Maczuga,P., van Logtenstein,R., Borel,F., Blits,B., Ritsema,T., van Deventer,S., Petry,H. and Konstantinova,P. (2011) Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma cholesterol in mice. *Mol. Ther.*, **19**, 731–740.
99. Fukunaga,R. and Doudna,J.A. (2009) dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J.*, **28**, 545–555.
100. Li,Y., Lu,J., Han,Y., Fan,X. and Ding,S.-W. (2013) RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, **342**, 231–234.
101. Karlikow,M., Goic,B. and Saleh,M.-C. (2014) RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: Setting up a systemic immune response. *Dev. Comp. Immunol.*, **42**, 85–92.
102. 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**, 857–863.
103. Fechner,H., Pinkert,S., Wang,X., Sipo,I., Suckau,L., Kurreck,J., Dörner,A., Sollerbrant,K., Zeichhardt,H., Grunert,H.P., et al. (2007) Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther.*, **14**, 960–971.
104. Jahan,S., Samreen,B., Khaliq,S., Ijaz,B., Khan,M., Siddique,M.H., Ahmad,W. and Hassan,S. (2011) HCV entry receptors as potential targets for siRNA-based inhibition of HCV. *Genet. Vaccines Ther.*, **9**, 15.
105. Karlas,A., Machuy,N., Shin,Y., Pleissner,K.P., Artarini,A., Heuer,D., Becker,D., Khalil,H., Ogilvie,L.A., Hess,S., et al. (2010) Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, **463**, 818–822.
106. Coyne,C.B., Bozym,R., Morosky,S.A., Hanna,S.L., Mukherjee,A., Tudor,M., Kim,K.S. and Cherry,S. (2011) Comparative RNAi screening reveals host factors involved in enterovirus infection of polarized endothelial monolayers. *Cell Host Microbe*, **9**, 70–82.

LITERATURVERZEICHNIS

107. Mercer,J., Snijder,B., Sacher,R., Burkard,C., Bleck,C.K.E., Stahlberg,H., Pelkmans,L. and Helenius,A. (2012) RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection. *Cell Rep.*, **2**, 1036–1047.
108. Schubert,S., Grunert,H.-P., Zeichhardt,H., Werk,D., Erdmann,V.A. and Kurreck,J. (2005) Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs. *J. Mol. Biol.*, **346**, 457–465.
109. Luan,Y., Dai,H.-L., Yang,D., Zhu,L., Gao,T.-L., Shao,H.-J., Peng,X. and Jin,Z.-F. (2012) Small interfering RNA against the 2C genomic region of coxsackievirus B3 exerts potential antiviral effects in permissive HeLa cells. *Virus Res.*, **163**, 183–189.
110. Liu,Y.P., Haasnoot,J., ter Brake,O., Berkhout,B. and Konstantinova,P. (2008) Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2811–2824.
111. Chandra,P.K., Kundu,A.K., Hazari,S., Chandra,S., Bao,L., Ooms,T., Morris,G.F., Wu,T., Mandal,T.K. and Dash,S. (2012) Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Mol. Ther.*, **20**, 1724–1736.
112. Eckstein,A., Größl,T., Geisler,A., Wang,X., Pinkert,S., Pozzuto,T., Schwer,C., Kurreck,J., Weger,S., Vetter,R., et al. (2010) Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. *Antiviral Res.*, **88**, 86–94.
113. 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.
114. DeVincenzo,J., Lambkin-Williams,R., Wilkinson,T., Cehelsky,J., Nochur,S., Walsh,E., Meyers,R., Gollob,J. and Vaishnav,A. (2010) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 8800–8805.
115. Zamora,M.R., Budev,M., Rolfe,M., Gottlieb,J., Humar,A., DeVincenzo,J., Vaishnav,A., Cehelsky,J., Albert,G., Nochur,S., et al. (2011) RNA interference therapy in lung transplant patients infected with respiratory syncytial virus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **183**, 531–538.
116. Gish,R.G., Satishchandran,C., Young,M. and Pachuk,C. (2011) RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a Phase I safety and tolerability study. *Antivir. Ther.*, **554**, 547–554.

117. Sandalon,Z., Bruckheimer,E.M., Lustig,K.H. and Burstein,H. (2007) Long-term suppression of experimental arthritis following intramuscular administration of a pseudotyped AAV2/1-TNFR:Fc Vector. *Mol. Ther.*, **15**, 264–269.
118. Bish,L.T., Morine,K., Sleeper,M.M., Sanmiguel,J., Wu,D., Gao,G., Wilson,J.M. and Sweeney,H.L. (2008) Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum. Gene Ther.*, **19**, 1359–1368.
119. Reetz,J., Genz,B., Meier,C., Kowtharapu,B.S., Timm,F., Vollmar,B., Herchenröder,O., Abshagen,K. and Pützer,B.M. (2013) Development of adenoviral delivery systems to target hepatic stellate cells in vivo. *PLoS One*, **8**, e67091.
120. Zhang,W., Wu,F., Shao,H., Wang,T., Huang,X., Li,W., Shen,H. and Huang,S. (2013) Chimeric adenoviral vector Ad5F35L containing the Ad5 natural long-shaft exhibits efficient gene transfer into human T lymphocytes. *J. Virol. Methods*, **194**, 52–59.
121. Bartel,M.A., Weinstein,J.R. and Schaffer,D. V (2012) Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery. *Gene Ther.*, **19**, 694–700.
122. Maddalena,A., Tereshchenko,J., Bähr,M. and Kügler,S. (2013) Adeno-associated virus-mediated, mifepristone-regulated transgene expression in the brain. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **16**, 1–11.
123. Suckau,L., Fechner,H., Chemaly,E., Krohn,S., Hadri,L., Kockskämper,J., Westermann,D., Bisping,E., Ly,H., Wang,X., et al. (2009) Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation*, **119**, 1241–1252.
124. Rosengart,T.K., Bishawi,M.M., Halbreiner,M.S., Fakhoury,M., Finnin,E., Hollmann,C., Shroyer,A.L. and Crystal,R.G. (2013) Long-term follow-up assessment of a phase 1 trial of angiogenic gene therapy using direct intramyocardial administration of an adenoviral vector expressing the VEGF121 cDNA for the treatment of diffuse coronary artery disease. *Hum. Gene Ther.*, **24**, 203–208.
125. Lipinski,D.M., Thake,M. and MacLaren,R.E. (2013) Progress in retinal and eye research Clinical applications of retinal gene therapy. *Prog. Retin. Eye Res.*, **32**, 22–47.
126. McGarrity,G.J., Hoyah,G., Winemiller,A., Andre,K., Stein,D., Blick,G., Greenberg,R.N., Kinder,C., Zolopa,A., Binder-Scholl,G., et al. (2013) Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J. Gene Med.*, **15**, 78–82.

127. Kastelein,J.J.P., Ross,C.J.D. and Hayden,M.R. (2013) From mutation identification to therapy: discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Hum. Gene Ther.*, **24**, 472–478.
128. Wei,K., Kuhnert,F. and Kuo,C.J. (2008) Recombinant adenovirus as a methodology for exploration of physiologic functions of growth factor pathways. *J. Mol. Med.*, **86**, 161–169.
129. Michelfelder,S. and Trepel,M. (2009) Adeno-associated viral vectors and their redirection to cell-type specific receptors. *Adv. Genet.*, **67**, 29–60.
130. Daya,S. and Berns,K.I. (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 583–593.
131. Hampf,M. and Gossen,M. (2006) A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays. *Anal. Biochem.*, **356**, 94–99.
132. Chen,C., Ridzon,D.A., Broomer,A.J., Zhou,Z., Lee,D.H., Nguyen,J.T., Barbisin,M., Xu,N.L., Mahuvakar,V.R., Andersen,M.R., et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179.
133. Varkonyi-Gasic,E. and Hellens,R.P. (2010) qRT-PCR of small RNAs. *Methods Mol. Biol.*, **631**, 109–122.
134. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**, 402–408.
135. 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**, 1248–1254.
136. 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**, 973–985.
137. Becher,P.M., Lindner,D., Miteva,K., Savvatis,K., Zietsch,C., Schmack,B., Van Linthout,S., Westermann,D., Schultheiss,H.P. and Tschöpe,C. (2012) Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and β -receptor blockade. *Hypertension*, **59**, 949–957.
138. Klopffleisch,R., Lenze,D., Hummel,M. and Gruber,A.D. (2010) Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*, **10**, 618.

139. Szalay,G., Sauter,M., Hald,J., Weinzierl,A., Kandolf,R. and Klingel,K. (2006) Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am. J. Pathol.*, **169**, 2085–2093.
140. Geisler,A., Schön,C., Größl,T., Pinkert,S., Stein,E.A., Kurreck,J., Vetter,R. and Fechner,H. (2013) Application of mutated miR-206 target sites enables skeletal muscle-specific silencing of transgene expression of cardiotropic AAV9 vectors. *Mol. Ther.*, **21**, 924–933.
141. Müller,O.J., Leuchs,B., Pleger,S.T., Grimm,D., Franz,W.-M., Katus,H.A. and Kleinschmidt,J.A. (2006) Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.*, **70**, 70–78.
142. Grimm,D., Streetz,K.L., Jopling,C.L., Storm,T.A., Pandey,K., Davis,C.R., Marion,P., Salazar,F. and Kay,M.A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, **441**, 537–541.
143. Suhy,D.A., Kao,S.-C., Mao,T., Whiteley,L., Denise,H., Souberbielle,B., Burdick,A.D., Hayes,K., Wright,J.F., Lavender,H., et al. (2012) Safe, long-term hepatic expression of anti-HCV shRNA in a nonhuman primate model. *Mol. Ther.*, **20**, 1737–1749.
144. Leslie,K., Blay,R., Haisch,C., Lodge,A, Weller,A and Huber,S. (1989) Clinical and experimental aspects of viral myocarditis. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 191–203.
145. Pacak,C.A., Mah,C.S., Thattaliyath,B.D., Conlon,T.J., Lewis,M.A., Cloutier,D.E., Zolotukhin,I., Tarantal,A.F. and Byrne,B.J. (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.*, **99**, e3–9.
146. Geisler,A., Jungmann,A., Kurreck,J., Poller,W., Katus,H.A., Vetter,R., Fechner,H. and Müller,O.J. (2011) microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther.*, **18**, 199–209.
147. Inagaki,K., Fuess,S., Storm,T.A., Gibson,G.A., Mctiernan,C.F., Kay,M.A. and Nakai,H. (2006) Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: Efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.*, **14**, 45–53.
148. Giering,J.C., Grimm,D., Storm,T.A. and Kay,M.A. (2008) Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol. Ther.*, **16**, 1630–1636.
149. Zhang,T., Cheng,T., Wei,L., Cai,Y., Yeo,A.E., Han,J., Yuan,Y.A., Zhang,J. and Xia,N. (2012) Efficient inhibition of HIV-1 replication by an artificial polycistronic miRNA construct. *Viol. J.*, **9**, 118.

LITERATURVERZEICHNIS

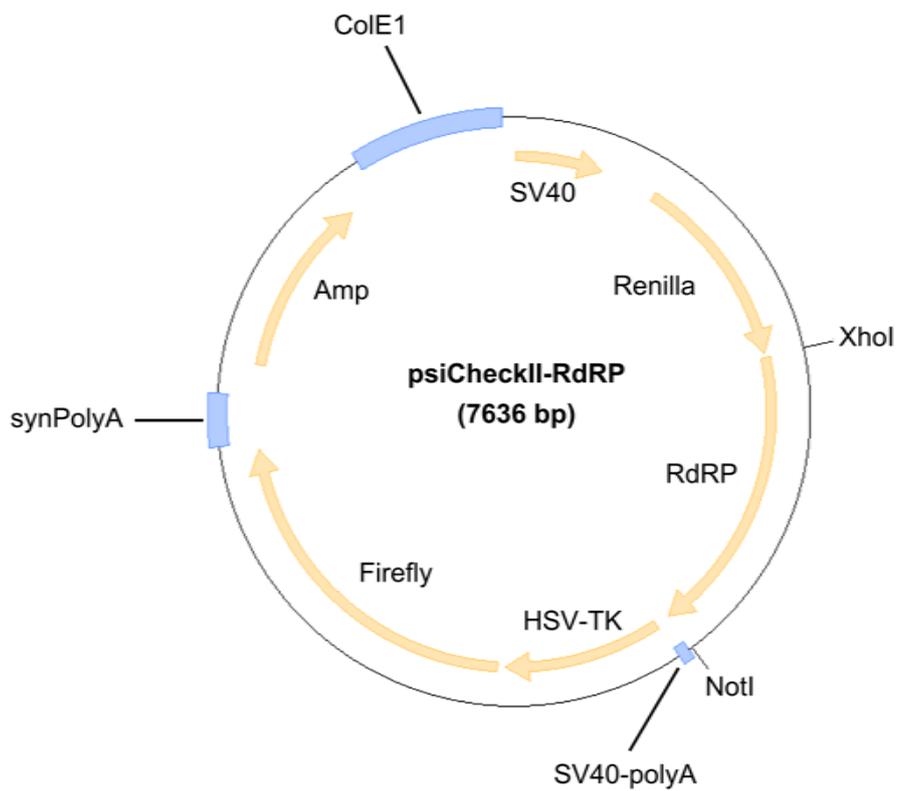
150. Ely,A., Naidoo,T. and Arbuthnot,P. (2009) Efficient silencing of gene expression with modular trimeric Pol II expression cassettes comprising microRNA shuttles. *Nucleic Acids Res.*, **37**, e91.
151. Maczuga,P., Lubelski,J., van Logtenstein,R., Borel,F., Blits,B., Fakkert,E., Costessi,A., Butler,D., van Deventer,S., Petry,H., et al. (2013) Embedding siRNA sequences targeting apolipoprotein B100 in shRNA and miRNA scaffolds results in differential processing and in vivo efficacy. *Mol. Ther.*, **21**, 217–227.
152. Gray,S.J., Foti,S.B., Schwartz,J.W., Bachaboina,L., Taylor-Blake,B., Coleman,J., Ehlers,M.D., Zylka,M.J., McCown,T.J. and Samulski,R.J. (2011) Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.*, **1153**, 1143–1153.
153. 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**, 171–182.
154. White,M.D., Milne,R.V.J. and Nolan,M.F. (2011) A molecular toolbox for rapid generation of viral vectors to up- or down-regulate neuronal gene expression in vivo. *Front. Mol. Neurosci.*, **4**, 1–15.
155. Dortmans,J.C.F.M., Rottier,P.J.M., Koch,G. and Peeters,B.P.H. (2011) Passaging of a newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence. *J. Gen. Virol.*, **92**, 336–345.
156. Kugelman,J.R., Lee,M.S., Rossi,C.A., McCarthy,S.E., Radoshitzky,S.R., Dye,J.M., Hensley,L.E., Honko,A., Kuhn,J.H., Jahrling,P.B., et al. (2012) Ebola virus genome plasticity as a marker of its passaging history: a comparison of in vitro passaging to non-human primate infection. *PLoS One*, **7**, e50316.
157. Herfst,S., Schrauwen,E.J.A., Linster,M., Chutinimitkul,S., de Wit,E., Munster,V.J., Sorrell,E.M., Bestebroer,T.M., Burke,D.F., Smith,D.J., et al. (2012) Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, **336**, 1534–1541.
158. Saulnier,A., Pelletier,I., Labadie,K. and Colbère-Garapin,F. (2006) Complete cure of persistent virus infections by antiviral siRNAs. *Mol. Ther.*, **13**, 142–150.

159. Kim,Y.-J., Ahn,J., Jeung,S.-Y., Kim,D.-S., Na,H.-N., Cho,Y.-J., Yun,S.-H., Jee,Y., Jeon,E.-S., Lee,H., et al. (2008) Recombinant lentivirus-delivered short hairpin RNAs targeted to conserved coxsackievirus sequences protect against viral myocarditis and improve survival rate in an animal model. *Virus Genes*, **36**, 141–146.
160. Kim,K.S., Tracy,S., Tappich,W., Bailey,J., Lee,C.K., Barry,W.H. and Chapman,N.M. (2005) 5'-terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.*, **79**, 7024–7041.
161. Werk,D., Pinkert,S., Heim,A., Zeichhardt,H., Grunert,H.P., Poller,W., Erdmann,V.A., Fechner,H. and Kurreck,J. (2009) Combination of soluble coxsackievirus-adenovirus receptor and anti-coxsackievirus siRNAs exerts synergistic antiviral activity against coxsackievirus B3. *Antiviral Res.*, **83**, 298–306.
162. Badorff,C., Lee,G.H., Lamphear,B.J., Martone,M.E., Campbell,K.P., Rhoads,R.E. and Knowlton,K.U. (1999) Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat. Med.*, **5**, 320–326.
163. Badorff,C., Berkely,N., Mehrotra,S., Talhouk,J.W., Rhoads,R.E. and Knowlton,K.U. (2000) Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11191–11197.
164. Henke,A., Launhardt,H., Klement,K., Stelzner,A., Zell,R. and Munder,T. (2000) Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J. Virol.*, **74**, 4284–4290.
165. Chau,D.H.W., Yuan,J., Zhang,H., Cheung,P., Lim,T., Liu,Z., Sall,A. and Yang,D. (2007) Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis*, **12**, 513–24.
166. Li,M., Li,H. and Rossi,J.J. (2006) RNAi in combination with a ribozyme and TAR decoy for treatment of HIV infection in hematopoietic cell gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1082**, 172–179.
167. Boutimah,F., Eekels,J.J., Liu,Y.P. and Berkhout,B. (2013) Antiviral strategies combining antiretroviral drugs with RNAi-mediated attack on HIV-1 and cellular co-factors. *Antiviral Res.*, **98**, 121–129.
168. Casey,L.C. and Lee,W.M. (2013) Hepatitis C virus therapy update 2013. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **29**, 243–249.

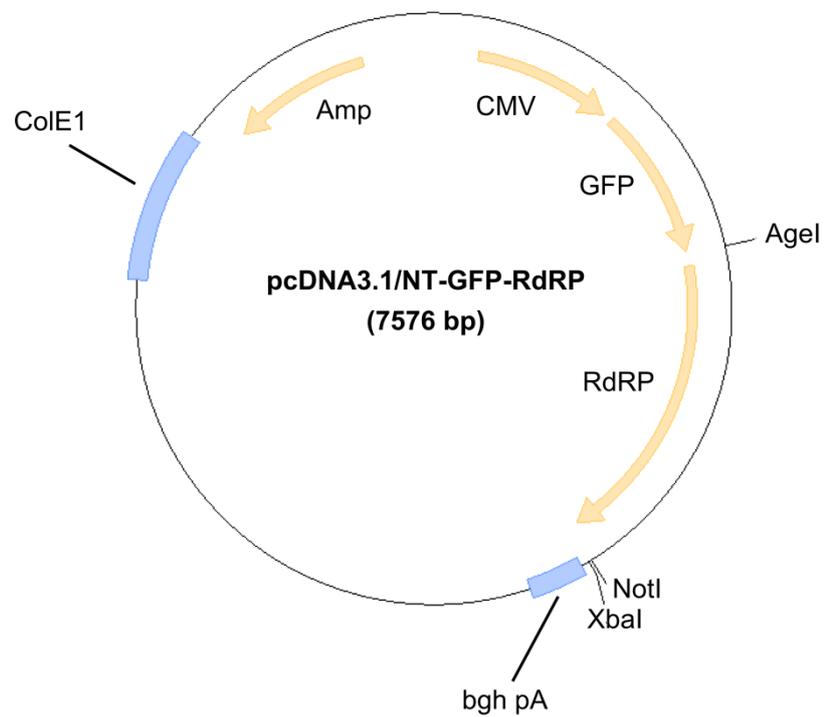
169. Ter Brake,O., Hooft,K., Liu,Y.P., Centlivre,M., von Eije,K.J. and Berkhout,B. (2008) Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Mol. Ther.*, **16**, 557–564.
170. Li,M.-J., Kim,J., Li,S., Zaia,J., Yee,J.-K., Anderson,J., Akkina,R. and Rossi,J.J. (2005) Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol. Ther.*, **12**, 900–909.
171. DiGiusto,D.L., Krishnan,A., Li,L., Li,H., Li,S., Rao,A., Mi,S., Yam,P., Stinson,S., Kalos,M., et al. (2010) RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci. Transl. Med.*, **2**, 36ra43.
172. Zhang,J. and Crumpacker,C. (2013) Eradication of HIV and cure of AIDS, now and how ? *Front. Immunol.*, **4**, 1–9.
173. Deeks,S.G., Autran,B., Berkhout,B., Benkirane,M., Cairns,S., Chomont,N., Chun,T.W., Churchill,M., Di Mascio,M., Katlama,C., et al. (2013) Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 607–614.
174. Grimm,D., Wang,L., Lee,J.S., Schürmann,N., Gu,S., Börner,K., Storm,T.A. and Kay,M.A. (2010) Argonaute proteins are key determinants of RNAi efficacy, toxicity, and persistence in the adult mouse liver. *J. Clin. Invest.*, **120**, 3106–3119.
175. Alino,S.F., Herrero,M.J., Bodi,V., Noguera,I., Mainar,L., Dasi,F., Sempere,A., Snchez,M., Diaz,A., Sabater,L., et al. (2010) Naked DNA delivery to whole pig cardiac tissue by coronary sinus retrograde injection employing non-invasive catheterization. *J. Gene Med.*, **12**, 920–926.
176. Beck,A. and Reichert,J.M. (2011) Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs*, **3**, 415–416.

10 Anhang

Anhang 1: Plasmidkarten der Reporterkonstrukte

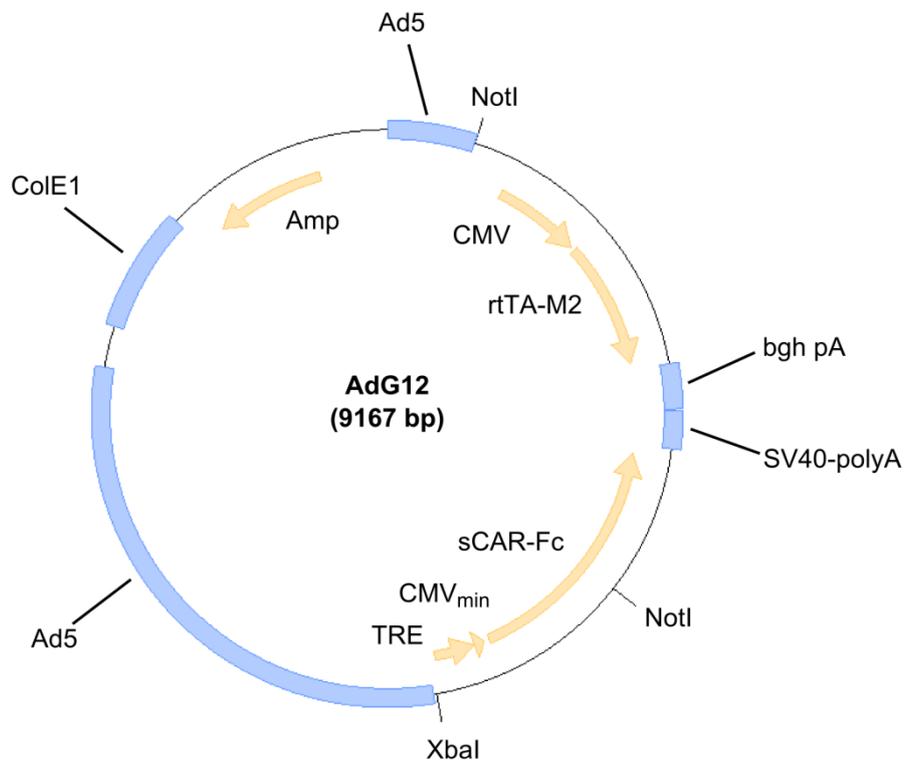


Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
Firefly:	synthetisches Firefly-Luciferase-Gen
HSV-TK:	HSV-TK-Promoter
RdRP:	cDNA der Coxsackievirus B3-RdRP
Renilla:	synthetisches Renilla-Luciferase-Gen
SV40:	SV40-Promoter
SV40-polyA:	Polyadenylierungssignal
synPolyA:	Polyadenylierungssignal

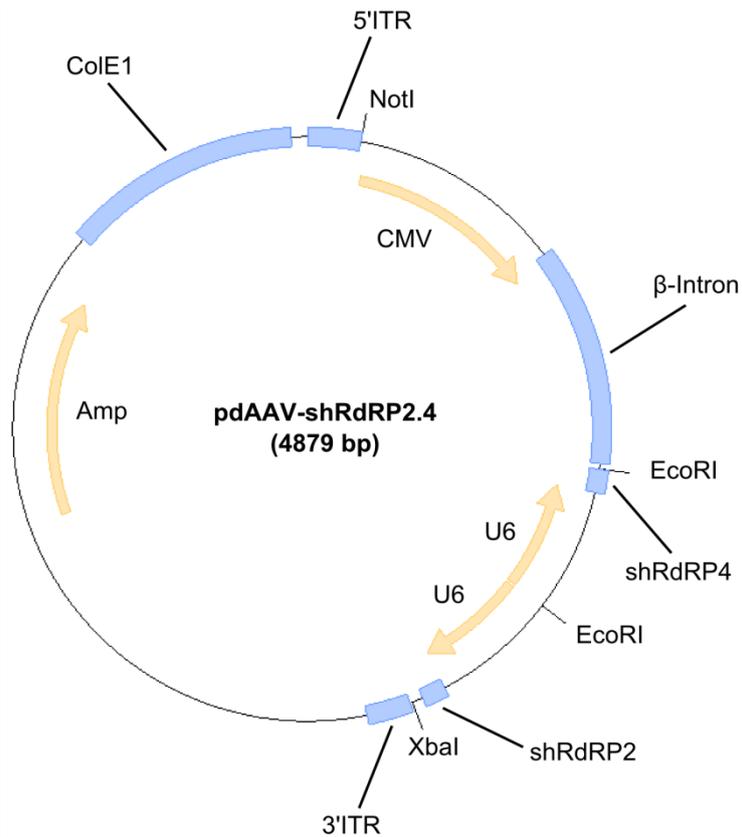


Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
bgh pA:	Polyadenylierungssignal
CMV:	CMV-Promoter
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
GFP:	synthetisches Gen des grün fluoreszierenden Proteins
RdRP:	cDNA der Coxsackievirus B3-RdRP

Anhang 2: Plasmidkarten der *in vivo* eingesetzten Vektoren

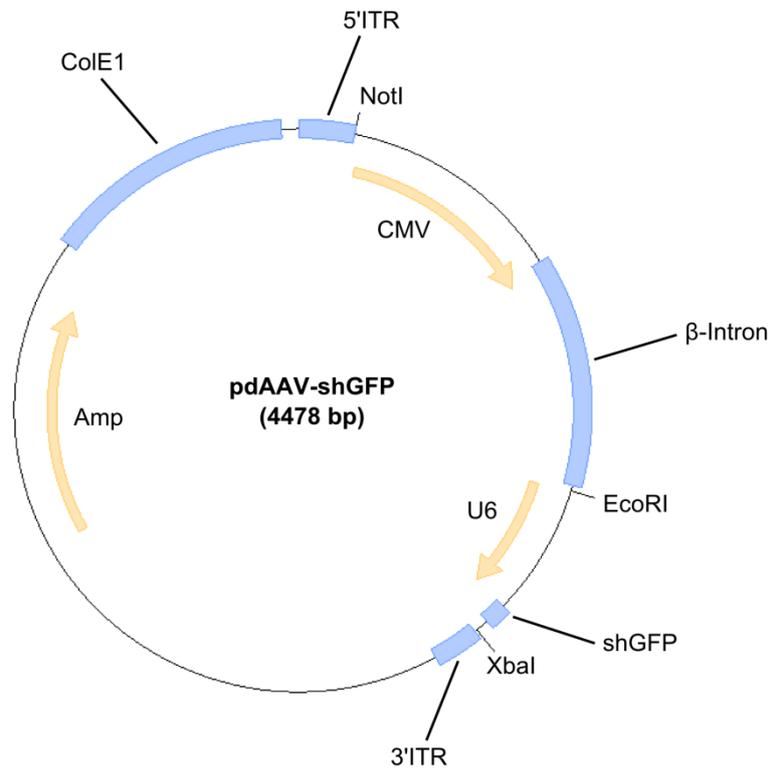


Ad5:	Rückgrat von Adenovirus 5
Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
bgh pA:	Polyadenylierungssignal
CMV:	CMV-Promoter
CMV_{min}	minimaler CMV-Promoter, aktiviert durch TRE
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
rtTA-M2:	reverser, Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
sCAR-Fc:	Fusionsprotein aus der löslichen extrazellulären Domäne von CAR mit der humanen IgG-Fc-Domäne
SV40-polyA:	Polyadenylierungssignal
TRE:	Dox-abhängiger Promoter TRE-tight1



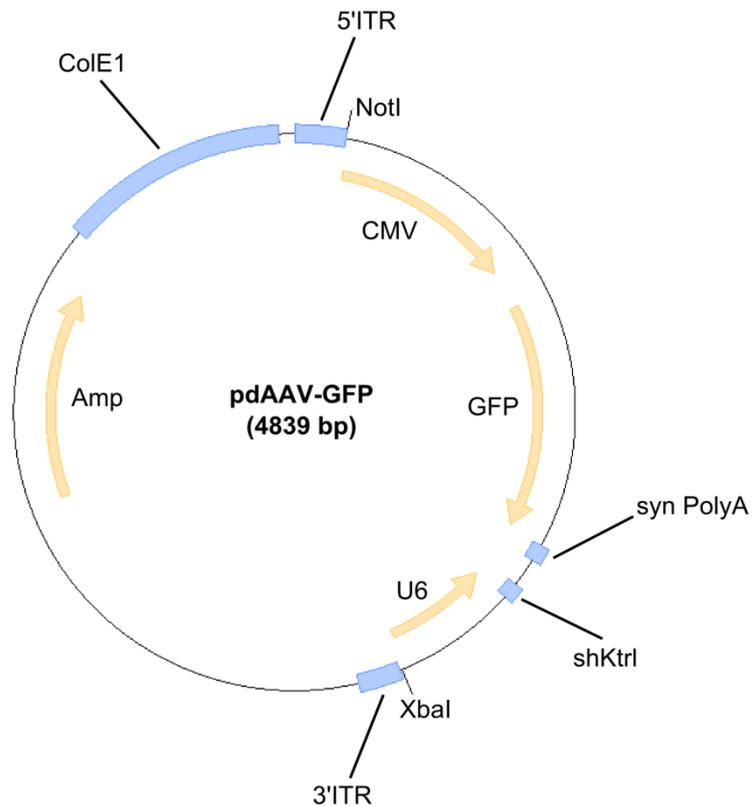
Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
β-Intron:	als Stuffersequenz fungierendes Intron
CMV:	CMV-Promoter (in diesem Plasmid funktionslos)
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
5' ITR:	5' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2
3' ITR:	3' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2; enthält Deletion, welche die Ausbildung selbstkomplementärer AAV-Vektoren zur Folge hat
shRdRP2 & 4:	shRNAs gerichtet gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) von Coxsackievirus B3 (CVB3)
U6:	U6-Promotor

ANHANG



Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
β-Intron:	als Stuffersequenz fungierendes Intron
CMV:	CMV-Promoter (in diesem Plasmid funktionslos)
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
5' ITR:	5' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2
3' ITR:	3' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2; enthält Deletion, welche die Ausbildung selbstkomplementärer AAV-Vektoren zur Folge hat
shGFP:	shRNA gerichtet gegen das grün fluoreszierende Protein (GFP)
U6:	U6-Promotor

ANHANG



Amp:	Ampizillin-Resistenz-Gen
CMV:	CMV-Promoter
ColE1:	prokaryotischer Replikationsursprung des Plasmids ColE1
GFP:	synthetisches Gen des grün fluoreszierenden Proteins
5' ITR:	5' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2
3' ITR:	3' <i>inverted terminal repeat</i> von AAV2; enthält Deletion, welche die Ausbildung selbstkomplementärer AAV-Vektoren zur Folge hat
shKtrl:	Kontroll-shRNA (ohne Komplementarität zum humanen oder murinen Genom)
syn PolyA:	Polyadenylierungssignal
U6:	U6-Promotor

Anhang 3: Plasmidkonstruktionen

Konstruktion von pdAAV-shRdRp2.4(neu)

Um das AAV-Shuttleplasmid zur Produktion von scAAV-shRdRP2.4(neu) zu generieren, wurde aus dem Plasmid pdAAV-shRdRP2.4 der CMV-Promoter durch Restriktion mit EagI entfernt. Dabei entstand ein rund 4200 bp großes Fragment und der rund 680 bp große CMV-Promoter. Das größere Fragment wurde religiert und bildete das 4879 bp große Ausgangsplasmid zur Produktion von scAAV-shRdRP2.4(neu).

Konstruktion von pdAAV-shGFP-shLuc

Ausgangsplasmid für die Konstruktion des dimerischen AAV-Shuttleplasmides zur Expression von shGFP und shLuc bildete das Plasmid pdAAV-shGFP. Dieses wurde initial mit HindIII geöffnet (≈ 4500 bp). Als Insert diente eine Expressionskassette bestehend aus U6-Promoter und der shRNA gegen Luciferase (shLuc), welche über Gensynthese gewonnen worden war. Diese wurde als Bestandteil eines Trägerplasmides geliefert und konnte über 2 HindIII-Schnittstellen aus diesem entfernt werden. Das entstehende rund 400 bp große Fragment HindIII-U6-Promoter-shLuc-HindIII wurde ungerichtet in den verdauten Vektor ligiert. Anschließend wurde in einem weiteren Klonierungsschritt, wie zuvor für pdAAV-shRdRP2.4(neu) beschrieben, der CMV-Promoter über EagI entfernt, wodurch das Plasmid pdAAV-shGFP-shLuc entstand.

Konstruktion von pdAAV-amiRdRP2.4

Als Ausgangsplasmid für das Plasmid zur Expression zweier amiRNAs gegen die CVB3-RdRP wurde das Plasmid pdAAV-amiRdRP2 verwendet. Dieses enthält eine Expressionskassette zur Expression von amiRdRP2 unter Kontrolle des MLC260-Promoters im Rückgrat eines dimerischen AAV-Basisplasmides und wurde von der eigenen Arbeitsgruppe (Dr. Henry Fechner) zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid wurde durch Restriktion mit EcoRI und BamHI geöffnet, wodurch ein ca. 4050 bp langes, lineares Fragment entstand. Als Insert diente die amiRdRP4, flankiert von einer EcoRI- und einer BamHI-Schnittstelle (≈ 140 bp), welche durch Gensynthese erworben und aus dem Trägervektor entfernt wurde. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte auf Grund der verschiedenen Schnittstellen gerichtet, zwischen die im Plasmid bereits vorhandene amiRdRP2 oder das SV40PolyA-STOP-Signal.

ANHANG

Konstruktion von pdAAV-amiLuc-amiGFP

Das dimerische AAV-Shuttleplasmid pdAAV-amiLuc ist analog zum Plasmid pdAAV-amiRdRP2, wobei die amiRdRP2 durch eine artifizielle microRNA gegen Luciferase ausgetauscht ist. Es wurde von unserer Arbeitsgruppe (Dr. Henry Fechner) zur Verfügung gestellt und mittels Restriktion mit EcoRI und BamHI linearisiert (≈ 4050 bp). Die per Gensynthese hergestellte amiGFP, flankiert von einer EcoRI- und einer BamHI-Schnittstelle, wurde durch EcoRI- und BamHI-Verdau als ca. 140 bp großes Fragment aus ihrem Trägervektor geschnitten und anschließend gerichtet in den linearisierten Ausgangsvektor ligiert. Dadurch entstand ein dimerisches AAV-Basisplasmid zur Expression zweier artifizieller microRNAs gegen GFP und Luciferase, welches als Kontrolle zum Plasmid pdAAV-amiRdRP2.4 genutzt werden konnte.

Konstruktion von pdAAV-sCAR-Fc-amiRdRP2 bzw. pdAAV-sCAR-Fc-amiLuc

Ausgangskonstrukt für die Klonierung dieses dimerischen AAV-Shuttleplasmides war ein Gensyntheseprodukt (Life Technologies, Darmstadt, GER), welches den CMV-Promoter, sCAR-Fc sowie das synthetische Polyadenylierungssignal enthielt. Dieses wurde mit MluI geöffnet. Die per Gensynthese hergestellten amiRdRP2 bzw. amiLuc wurden mittels MluI aus ihren Trägerplasmiden ausgeschnitten und anschließend ungerichtet in den geöffneten Vektor zwischen sCAR-Fc und das synthetische Polyadenylierungssignal ligiert. Mittels Sequenzierung konnte die Richtung der amiRNAs überprüft werden. Anschließend wurden die kompletten Expressionskassetten (CMV-sCAR-Fc-amiRdRP2-synPolyA bzw. CMV-sCAR-Fc-amiLuc-synPolyA) mit XbaI und NotI aus ihren Trägerplasmiden geschnitten und in ein mit XbaI und NotI verdautes dimerisches AAV-Rückgrat ligiert.

Konstruktion von pdAAV-sCAR_{trunc}-amiRdRP2 bzw. pdAAV-sCAR_{trunc}-amiLuc

Um eine trunkierte Version von sCAR-Fc herzustellen, wurde eine Mutations-PCR mit den Primern sCAR-mut fw sowie sCAR-mut rev durchgeführt. Als DNA-Matrize diente dasselbe Gensyntheseprodukt (CMV-sCAR-Fc-synpolyA), welches im vorangegangenen Abschnitt (Konstruktion von pdAAV-sCAR-Fc-amiRdRP2 bzw. pdAAV-sCAR-Fc-amiLuc) beschrieben wurde. Durch den Primer sCAR-mut fw wurde dabei das Codon für die 6. Aminosäure von sCAR-Fc durch ein STOP-Codon ausgetauscht. Für die PCR wurden die Proben initial für 90 sec bei 95 °C denaturiert. Es folgten 30 Zyklen von 30 sec bei 95 °C, 30 sec bei 64 °C und 210 sec bei 72 °C. Abschließend wurden die Proben für 10 min bei 72 °C inkubiert. Das so entstandene mutierte sCAR-Fc PCR-Produkt wurde mit EcoRI und MluI verdaut und anstelle der originalen

ANHANG

sCAR-Fc Sequenz in das ebenfalls mit EcoRI und MluI verdaute Trägerplasmid ligiert. Das anschließende Einfügen von amiRdRP2 bzw. amiLuc über MluI sowie der Transfer der gesamten Expressionskassetten (CMV-sCAR_{trunc}-amiRdRP2-synPolyA bzw. CMV-sCAR_{trunc}-amiLuc-synPolyA) in ein dimerisches AAV-Rückgrat erfolgten wie zuvor für pdAAV-sCAR-Fc-amiRdRP2 und pdAAV-sCAR-Fc-amiLuc beschrieben.

Anhang 4: Signifikanzwerte des *in vivo* Kombinationsversuches

A: Signifikanzwerte (P-Werte) der hämodynamischen Parameter des *in vivo* Kombinationsansatzes

	Hämodynamischer Parameter									
	HR	Pes	Ped	dP/dtmax	dP/dtmin	SW	SV	CO	EF	tau
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3	0.1797	0.0022	0.0022	0.0152	0.0022	0.0022	0.0260	0.0022	0.0022	0.0152
Sham+CVB3 vs. AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.3939	0.0022	0.0087	0.0043	0.0260	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0043
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.9372	0.0022	0.0043	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022	0.0022
AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.1320	0.2403	0.3095	0.0087	0.0043	0.3095	0.0152	0.0022	0.0022	0.0022
AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.3939	0.0411	0.3939	0.0411	0.0043	0.1797	0.0649	0.0022	0.0649	0.0022

HR = Herzrate; Pes = endsystolischer, linksventrikulärer Druck; Ped = enddiastolischer, linksventrikulärer Druck; dp/dtmax = linksventrikuläre Kontraktilität; dP/dtmin = linksventrikuläre diastolische Relaxation; SW = Schlagarbeit; SV = Schlagvolumen; CO = kardiale Gesamtleistung; EF = Ejektionsfraktion; tau = linksventrikuläre Relaxationszeit, Alle Werte wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test bestimmt.

B: Signifikanzwerte (P-Werte) der RT-qPCRs (inflammatorische Zytokine, CVB3-Nachweis) des *in vivo* Kombinationsansatzes

	Gemessener Parameter			
	IL-6	IFN- γ	TNF- α	CVB3
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3	0.3095	0.0152	0.0411	0.1320
Sham+CVB3 vs. AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.1320	0.0649	0.0087	0.1087
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0022	0.0022	0.0022	0.0043
AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0411	0.0411	0.0022	0.0411
AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.3939	0.5887	1.000	0.3939

Alle Werte wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test bestimmt.

ANHANG

C: Signifikanzwerte (P-Werte) des Plaque Assays und Myokarditis-Scores des *in vivo* Kombinationsansatzes

	Gemessener Parameter	
	CVB3 titer	MS
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3	0.0022	0.1818
Sham+CVB3 vs. AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0087	0.1818
Sham+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0022	0.0152
AdG12(+Dox)+shGFP+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0043	0.0823
AdG12(-Dox)+shRdRP2.4+CVB3 vs. AdG12(+Dox)+shRdRP2.4+CVB3	0.0260	0.0476

MS = Myokarditis-Score; Alle Werte wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney U-Test bestimmt.

Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AdV	adenoviraler Vektor
AGO	Argonauten-Protein
amiRNA	artifizielle microRNA
Amp	Ampizillin
bp	Basenpaare
bpm	<i>beats per minute</i> , Schläge pro Minute
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO	<i>cardiac output</i> , kardiale Gesamtleistung
C _t	<i>treashhold cycle</i>
CVB3	Coxsackievirus B3
DAF	<i>decay accelerating factor</i> , CD55
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Gemisch
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EF	Ejektionsfraktion
FKS	fötales Kälberserum
GAM	<i>goat anti-mouse</i>
GAR	<i>goat anti-rabbit</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
HAART	<i>highly active anti retroviral therapy</i> , hochaktive anti-retrovirale Therapie

ANHANG

HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxydase</i> , Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Gruppe G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
i.v.	intravenös
Kan	Kanamycin
LV	<i>left ventricular</i> , linksventrikulär
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
miRNA	microRNA
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
n.s.	nicht significant ($p > 0,05$)
qPCR	quantitative PCR
pA	Polyadenylierungssignal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-MK	PBS mit $MgCl_2$ und KCl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i>
PPMV	<i>pigeon paramyxovirus type 1</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung ($\triangleq g$)
RdRP	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> , RNA-abhängige RNA-Polymerase
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
sc	<i>self-complementary</i> , selbstkomplementär
sCAR	<i>soluble CAR</i> , lösliches CAR

ANHANG

shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngig
TNF	Tumornecrosefaktor
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
VG	Vektorgenome
z. B.	zum Beispiel

Anhang B: Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jens Kurreck für die interessante Aufgabenstellung, seine umfangreiche Betreuung und dauerhafte Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

Prof. Dr. Claus-Thomas Bock gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens. Prof. Dr. Roland Lauster möchte ich ebenfalls für die Begutachtung dieser Arbeit sowie für sein großes Engagement bereits während meines Biotechnologie-Studiums danken.

Weiterhin danke ich Dr. Henry Fechner, Dr. Sandra Pinkert und Dr. Anja Geisler für die Bereitstellung diverser viraler Vektoren, das Einarbeiten in virologische Arbeitstechniken, die Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen sowie ungezählte hilfreiche Diskussionen und Anregungen. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Heinz Zeichhardt und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Vanessa Lindig, bedanken, für die Unterstützung bei allen virologischen Fragestellungen. Prof. Dr. Robert Klopffleisch gilt mein Dank für die immer sehr schnelle und exakte Durchführung aller pathologischen Untersuchungen sowie immunhistochemischer Färbungen. Dr. Moritz Becher danke ich für die Durchführung der hämodynamischen Messungen und Analysen im Rahmen der *in vivo* Versuche.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kurreck an der TU Berlin danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei der Einarbeitung. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Utta Kretzschmar, Petra Seifert und Bernd Krostitz bedanken, deren Unterstützung und andere Sicht auf die Dinge mich auch in schwierigen Phasen meiner Arbeit zum Weitermachen motiviert haben. Dr. Tatjana Schütze danke ich für ihre hilfreichen Kommentare beim Schreiben dieser Arbeit und die Unterstützung bei der Fehlersuche.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt, an mich geglaubt und zum Weitermachen angetrieben haben. Ohne ihre aufmunternden Worte, ihr nicht enden wollendes Verständnis und ihren Optimismus wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Anhang C: Eigene Veröffentlichungen

Primärartikel

- 1) Geisler, A., Schön, C., Größl, T., Pinkert, S., **Stein, E.A.**, Kurreck, J., Vetter, R. and Fechner, H., 2013. Application of mutated miR-206 target sites enables skeletal muscle-specific silencing of transgene expression of cardiotropic AAV9 vectors. *Mol Ther* 21, 924-33.
- 2) Morgan, E.L., Morgan, B.N., **Stein, E.A.**, Vitrs, E.L., Thoman, M.L., Sanderson, S.D. and Phillips, J.A., 2009. Enhancement of *in vivo* and *in vitro* immune functions by a conformationally biased response-selective agonist of human C5a: implications for a novel adjuvant in vaccine design. *Vaccine* 28, 463-9.

Eingereichter Primärartikel

- 1) **Stein, E.A.**, Pinkert, S., Becher, P.M., Geisler, A., Zeichhardt, H., Klopffleisch, R., Poller, W., Tschöpe, C., Lassner, D., Fechner, H., Kurreck, J., 2013. Combination of RNA interference and proteinaceous virus trap exerts additive antiviral activity and improves cardiac function in acute coxsackievirus B3-induced myocarditis.

Konferenzbeiträge

- 1) Vortrag beim "ESGCT and SETGyC collaborative Congress", 25.-28. Oktober 2013 in Madrid, Spanien;
Stein, E.A., Pinkert, S., Becher, P.M., Geisler, A., Zeichhardt, H., Klopffleisch, R., Kurreck, J. and Fechner, H.: „Combinatorial RNAi-and Receptor-based therapy against coxsackievirus B3 exerts additive antiviral effect *in vitro* and *in vivo*.”
- 2) Posterpräsentation beim "23rd Annual Meeting of the Society for Virology", 06.-09. März 2013 in Kiel, Deutschland;
Stein, E.A., Pinkert, S., Geisler, A., Zeichhardt, H., Klopffleisch, R., Fechner, H. and Kurreck, J.: "Combinatorial RNAi-and Receptor-based Cocksackievirus B3 Therapy exerts additive antiviral effects *in vitro* and *in vivo*.”
- 3) Posterpräsentation beim ESF-EMBO Symposium "Antiviral RNAi: From molecular biology towards applications", 11.-15. Juni 2012 in Pultusk, Polen;
Stein, E.A., Pinkert, S., Zeichhardt, H., Fechner, H. and Kurreck, J.: "Combinatorial RNAi-and Receptor-based Cocksackievirus B3 Therapy.”